



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

NANOESTRUCTURAS HÍBRIDAS:  
“NANOTUBOS DE CARBONO/NYLON-6”  
Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
EN ESTUDIOS DE BIOCMPATIBILIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

OMAR ELIGIO OCHOA OLMOS

TUTORA: DRA. ELENA GOLOVATAYA DZHYMBEEVA



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

<p>1. Datos del alumno Ochoa Olmos Omar Eligio 58 24 93 13 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 301245436</p>
<p>2. Datos del tutor Dra Golovataya Dzhymbeeva Elena</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra Montero Montoya Regina Dorinda</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr Jiménez García Luis Felipe</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 M en C Vázquez Cuevas María de Jesús</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dr Álvarez Zauco Edgar</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Nanoestructuras híbridas: "nanotubos de carbono / nylon-6" y su actividad biológica en estudios de biocompatibilidad 120p. 2008</p>

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar una carrera profesional.
- ❖ A los profesores de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM por transmitirme las herramientas y los conocimientos necesarios para concluir satisfactoriamente mi licenciatura.
- ❖ Al Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo tecnológico y al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por el préstamo de sus instalaciones, la infraestructura y el material necesario para llevar a cabo los estudios realizados en el presente trabajo.
- ❖ A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico por el apoyo económico para los proyectos de investigación DGAPA-IN101906 e IN100107.
- ❖ A mi tutora la Dra. Elena Golovataya Dzhymbeeva por asesorarme y guiarme durante todo este largo tiempo en la elaboración de mi tesis y por las becas que solicitó para mí; pero principalmente por confiar en mí en todo momento y enseñarme el arduo camino que me espera durante mi formación como investigador y científico.
- ❖ A la Dra. Regina Montero Montoya y su grupo de investigación por permitirme trabajar dentro del mismo y brindarme su apoyo para complementar con éxito el presente trabajo.
- ❖ A mis sinodales: el Dr. Luis Felipe Jiménez García por los conocimientos que adquirí durante el curso de biología molecular; María de Jesús Vázquez Cuevas por que sin tu ayuda no sabría lo que ahora sé sobre genética; Edgar Álvarez Zauco por tu ayuda durante mi estancia en el laboratorio de Materiales y Sensores. Pero principalmente gracias por el tiempo que dedicaron en la revisión de mi tesis.
- ❖ A Luis Serrano García por haberme apoyado y brindado el tiempo necesario para aprender las técnicas y el manejo del material para realizar la prueba de micronúcleos, en verdad gracias.
- ❖ Al Doctor Vladimir Basiuk Evdokimenko, a Víctor Hugo Meza Laguna y a Obed Solís González por apoyarme en el manejo del equipo para realizar las reacciones de funcionalización y las técnicas para la caracterización de los nanotubos de carbono.
- ❖ A mi mejor amiga del alma María Bassioux Golovataya por que con tu ayuda y consejos siempre salí adelante; tú siempre confiaste en mí, te lo agradezco mucho. Sin tu apoyo tal vez no hubiera realizado esta tesis. ¡Mil gracias!
- ❖ A Virginia Armendáriz Rivera, por enseñarme el uso de los paquetes estadísticos empleados en el presente trabajo, así como la interpretación de los datos obtenidos con los mismos.
- ❖ A Xanath Vargas Meza por enseñarme el uso de los programas de diseño y edición que fueron realmente muy útiles para la elaboración de mi tesis.
- ❖ A mis padres, a mis hermanos (sobre todo a ti Rebequita) por todo el apoyo que recibí de ellos para poder continuar con mis estudios, en verdad no sé cómo hubiera logrado todo esto sin ustedes, los quiero mucho.
- ❖ A mi sobrinito Santiago por cambiarnos la vida a todos. ¡Qué bueno que llegaste!
- ❖ Gracias a todos ustedes por su colaboración, ya que este trabajo también les pertenece. Muchas gracias.



*Esta tesis te la dedico a ti mi sobrinito, espero algún día cuando crezcas te conviertas no sólo en un gran científico sino también en un gran investigador.*

この卒業論文は僕の甥のために書きました。大人になったとき、いい科学者どころか、すばらしい研究者になればいいのに。

# ÍNDICE

	Página
<b>Capítulo 1. Introducción a los conceptos básicos: “nanotubos de carbono”</b> .....	1
1.1. Nanotecnología .....	2
1.1.2. Bionanotecnología .....	2
1.1.3. Los riesgos de la nanotecnología .....	2
1.2. Nanoestructuras de carbono .....	2
1.2.1. Historia sobre los nanotubos de carbono .....	3
1.1.2. Clasificación de los nanotubos de carbono .....	4
1.3. Estructura de los nanotubos de carbono de pared sencilla (SWNTs) .....	5
1.3.1. Primera región (superficie cilíndrica) .....	6
1.3.2. Segunda región (terminaciones cerradas) .....	8
1.4. Estructura de los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTs) .....	10
1.5. Otras estructuras derivadas de los nanotubos de carbono .....	11
Referencias .....	12
<b>Capítulo 2. Síntesis, configuración electrónica y propiedades de los nanotubos de carbono</b> .....	14
2.1. Crecimiento de nanotubos de carbono .....	14
2.1.1. Formación de defectos .....	15
2.2. Síntesis de nanotubos de carbono .....	16
2.2.1. Método por descarga de arco .....	16
2.2.2. Método por vaporización laser .....	17
2.2.3. Método por deposición química .....	18
2.2.3. Método por descomposición catalítica.....	18
2.3. Purificación de nanotubos de carbono .....	19
2.3.1. Métodos de purificación .....	19
2.4. Configuración electrónica del átomo de carbono .....	20
2.4.1. Hibridación $sp^3$ .....	21
2.4.2. Hibridación $sp^2$ .....	21
2.4.1. Hibridación $sp$ .....	22
2.5. Propiedades de los nanotubos de carbono .....	22
2.5.1. Propiedades electrónicas .....	22
2.5.1.1. Determinación de la conductividad eléctrica de un nanotubo de carbono .....	24
2.5.2. Propiedades mecánicas .....	24
2.5.2.1. Elasticidad .....	25
2.5.2.2. Tensión .....	27
2.5.3. Propiedades térmicas y ópticas .....	27
Referencias .....	27

<b>Capítulo 3. Funcionalización y caracterización de nanotubos de carbono</b> .....	29
3.1. Funcionalización de nanotubos de carbono .....	29
3.1.1. Método de funcionalización covalente por defectos oxidados .....	30
3.1.2. Métodos de funcionalización libres de solventes .....	31
3.1.2.1. Funcionalización por fluorinación .....	32
3.1.2.2. Funcionalización con especie de aril diazonium .....	32
3.1.2.3. Funcionalización electroquímica .....	33
3.1.2.4. Funcionalización fotoquímica .....	33
3.1.2.5. Funcionalización mecanoquímica .....	33
3.1.2.6. Funcionalización por ultrasonificación .....	34
3.1.2.7. Funcionalización en fase de gas .....	34
3.2. Funcionalización en fase de gas con aminas .....	34
3.1.2. Características del nylon-6 .....	35
3.1.2. Síntesis de $\epsilon$ -caprolactam .....	35
3.1.2. Síntesis de nylon-6.....	36
3.3. Antecedentes sobre la funcionalización de MWNTs con nylon-6 en fase de gas .....	38
3.4. Técnicas para la caracterización de nanotubos de carbono prístinos y funcionalizados .....	38
3.4.1. Espectroscopia de infrarrojo (IR) .....	39
3.4.2. Espectroscopia RAMAN .....	40
3.4.3. Termogravimetría (TGA).....	40
3.4.4. Técnicas de microscopía .....	41
3.4.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	41
3.4.4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	42
3.4.4.3. Microscopía óptica .....	42
Referencias .....	43

<b>Capítulo 4. Estudio para la obtención de nuevas nanoestructuras híbridas: “funcionalización de MWNTs con nylon-6 por el método en fase de gas”</b> .....	45
4.1. Objetivo general del estudio .....	45
4.1.1. Objetivos particulares .....	45
4.2. Materiales y métodos .....	45
4.2.1. Funcionalización de MWNTs con nylon-6 .....	45
4.2.1.1. Desgasificación de MWNTs prístinos.....	46
4.2.1.2. Primera etapa de funcionalización (reacción con 1,8-diaminooctano) .....	46
4.2.1.3. Desgasificación de MWNTs funcionalizados con 1,8-diaminooctano (MWNTs-DA) .....	46
4.2.1.4. Segunda etapa de funcionalización (reacción con $\epsilon$ -caprolactam) .....	47
4.2.1.5. Desgasificación de MWNTs funcionalizados con nylon-6 (MWNTs-N6) .....	47
4.2.2. Caracterización de MWNTs prístinos y MWNTs-N6 .....	48
4.2.2.1. Espectroscopia de infrarrojo (IR).....	48
4.2.2.2. Espectroscopia RAMAN .....	48
4.2.2.3. Termogravimetría (TGA).....	48
4.2.2.3. Microscopía óptica .....	49
4.2.2.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	49
4.2.2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	49

4.3. Resultados y discusión .....	50
4.3.1. Análisis de espectroscopia RAMAN .....	50
4.3.2. Análisis de espectroscopia de infrarrojo (IR).....	51
4.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	52
4.3.4. Análisis por Microscopía óptica .....	54
4.3.5. Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	55
4.3.6. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	56
4.4. Conclusiones .....	57
Referencias .....	59

<b>Capítulo 5. Estudios de biocompatibilidad para nanotubos de carbono .....</b>	<b>60</b>
5.1. Biocompatibilidad .....	60
5.1.1. Estudios de biocompatibilidad .....	60
5.2. Antecedentes sobre la biocompatibilidad de los nanotubos de carbono .....	61
5.3. Bioensayos citogenéticos .....	62
5.3.1 La prueba de micronúcleos como biomarcador de eventos genotóxicos y citotóxicos .....	63
5.3.1.1. Micronúcleos.....	64
5.3.1.2. Puentes nucleoplásmicos.....	65
5.3.1.3. Gemaciones de cromatina.....	65
5.3.1.4. Muerte celular.....	67
Referencias .....	69

<b>Capítulo 6. Estudio comparativo: determinación de la biocompatibilidad para MWNTs prístinos y MWNTs-N6 a través de la prueba de micronúcleos .....</b>	<b>71</b>
6.1. Objetivo general del estudio .....	71
6.1.1. Objetivos particulares .....	71
6.2. Materiales y métodos .....	71
6.2.1. Extracción de sangre .....	71
6.2.1.1. Obtención de linfocitos .....	72
6.2.1.2. Conteo de linfocitos .....	72
6.2.2. Preparación de los cultivos con linfocitos .....	73
6.2.3. Tratamiento de los cultivos con MWNTs prístinos y MWNTs-N6 .....	73
6.2.4. Cosecha de los cultivos con linfocitos.....	74
6.2.5. Elaboración de muestras para el microscopio óptico.....	75
6.2.5.1. Tinción de las muestras a través de inmunohistoquímica.....	75
6.2.5.2. Montaje de las muestras .....	77
6.2.6. Observación y evaluación de las muestras al microscopio óptico .....	77
6.2.6.1. Criterios de evaluación .....	77
6.2.6.2. Análisis del índice de proliferación o de marcaje .....	78
6.2.6.3. Análisis de las frecuencias para cada bioindicador .....	79
6.2.6.4. Obtención de imágenes .....	79
6.2.7. Análisis estadístico.....	79
6.2.7.1. Análisis de la varianza multivariable (MANOVA) .....	79
6.2.7.2. Análisis de regresión lineal .....	79

6.3. Resultados .....	80
6.3.1. Análisis del índice de proliferación .....	80
6.3.2. Análisis de la frecuencia de micronúcleos .....	82
6.3.3. Análisis de la frecuencia de gemaciones de cromatina .....	85
6.3.4. Análisis de la frecuencia de puentes nucleoplásmicos .....	87
6.3.4. Análisis de la frecuencia de apoptosis .....	90
6.4. Discusión de resultados .....	93
6.4.1. Proliferación celular.....	93
6.4.2. Eventos genotóxicos .....	94
6.4.3. Muerte celular .....	99
6.5. Conclusiones .....	101
Referencias .....	102
<b>Apéndice "A". Aplicaciones generales de los nanotubos de carbono.....</b>	<b>105</b>
A.1. Dispositivos electroquímicos .....	105
A.2. Dispositivos para la creación de imagen y video .....	106
A.3. Dispositivos electrónicos .....	107
A.4. Dispositivos mecánicos y de escaneo .....	108
A.5. Materiales de máxima resistencia .....	109
A.6. Soportes catalíticos y dispositivos térmicos .....	110
Referencias .....	111
<b>Apéndice "B". Aplicaciones biológicas de los nanotubos de carbono.....</b>	<b>112</b>
B.1. Ingeniería de tejidos .....	112
B.2. Biosensores .....	113
B.3. Biomotores y biovectores .....	116
B.4. Diagnóstico y tratamiento .....	118
B.5. Filtros de agua y aire .....	119
Referencias .....	119

## RESUMEN

Los nanotubos de carbono son una forma alotrópica del carbono en forma cilíndrica, cuyos diámetros se encuentran alrededor de unos cuantos nanómetros. Debido a sus únicas e inigualables propiedades físico-químicas y a la capacidad que tienen para interactuar con otras moléculas por medio de su funcionalización, los nanotubos de carbono han sido propuestos para el desarrollo de nuevas aplicaciones en diversos campos de estudio, que incluyen las ciencias biológicas. Por tal razón, es imprescindible determinar a través de estudios de biocompatibilidad, el riesgo que representa el empleo de los nanotubos de carbono dentro de diferentes sistemas biológicos. Una de las herramientas más validadas para evaluar y determinar la actividad tóxica de estos nanomateriales, es la prueba de micronúcleos, la cual emplea diferentes bioindicadores de genotoxicidad y citotoxicidad para determinar la actividad tóxica de un agente. Tales bioindicadores son: a) los micronúcleos; b) las gemaciones de cromatina; c) los puentes nucleoplásmicos y d) la muerte celular. Se ha visto que la actividad tóxica de los nanotubos de carbono disminuye considerablemente cuando son modificados químicamente; ejemplo de ello es el empleo de polímeros que cubren total o parcialmente la superficie del nanotubo. Recientemente, la funcionalización covalente de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTs) con poliamidas (ej. nylon-6) empleando métodos libres de solventes, ha llamado la atención de muchos grupos de investigación por la posibilidad de obtener nanoestructuras híbridas con nuevas características y propiedades que puedan ser aprovechadas para el desarrollo de diversas aplicaciones, así como el aumento de la biocompatibilidad para los mismos. En el presente estudio se empleó el método de funcionalización en fase de gas, el cual evade el empleo de solventes orgánicos y aprovecha la presencia de defectos encontrados sobre la superficie de los nanotubos de carbono para adherir diversos grupos funcionales (ej. aminas) debido a que éstos presentan una gran reactividad química. Asimismo, se emplearon diversas técnicas para la caracterización de las nanoestructuras híbridas obtenidas, con el propósito de determinar la morfología de los MWNTs funcionalizados con nylon-6 (MWNTs-N6) obtenidos, así como conocer qué parámetros son los mejores para llevar a cabo las reacciones de funcionalización de MWNTs con nylon-6 y finalmente poder optimizarlos. Las técnicas empleadas fueron: espectroscopia RAMAN, espectroscopia de infrarrojo, termogravimetría, microscopia óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM), y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio comparativo de biocompatibilidad empleando la prueba de micronúcleos con cultivos de linfocitos humanos. Tal prueba permitió determinar la actividad genotóxica y citotóxica de los MWNTs no funcionalizados (MWNTs prístinos) y de los MWNTs-N6. Finalmente fue posible definir el nivel de biocompatibilidad para cada uno de los MWNTs empleados para tratar los cultivos.

**Palabras clave:** MWNTs, defectos, nylon-6, funcionalización en fase de gas, nanoestructuras híbridas, biocompatibilidad, prueba de micronúcleos, genotoxicidad, citotoxicidad.

# CAPÍTULO

# 1

## Introducción a los conceptos básicos: “nanotubos de carbono”

### 1.1. Nanotecnología

La tecnología que se desarrolla dentro del mundo de los átomos, moléculas y clústeres de tamaño nanométrico, se conoce como “*Nanotecnología*” [1]. La nanotecnología está encargada del diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas controlados por materiales de escala nanométrica (Figura 1) desde 1 a 100 nm (aproximadamente 10,000 veces menor que el tamaño de un cabello humano) o también conocidos como “*nanomateriales*” [2,3].

Los nanomateriales comprenden diversos rangos de tamaño y formas que incluyen desde formas cilíndricas como los nanotubos y las nanofibras, formas dendríticas y ramificadas, hasta formas esféricas como los fullerenos [2]. Tales características proveen a estos nanomateriales de extraordinarias propiedades (ópticas, magnéticas, eléctricas, mecánicas, etc.) [3] con las cuales es posible llevar a cabo el desarrollo de diversas aplicaciones dentro campos como la industrial (desarrollo de dispositivos electrónicos, catalizadores químicos, nanomáquinas, etc.), y la medicina (vacunas, medicamentos, etc.) [2]. Es posible incluso realizar la modificación química de estos nanomateriales para producir novedosas “*híbridos*” con aplicaciones mucho más específicas, a partir de la

interacción con diferentes grupos funcionales (ej. aminas, amidas, etc.) y otros compuestos [3].

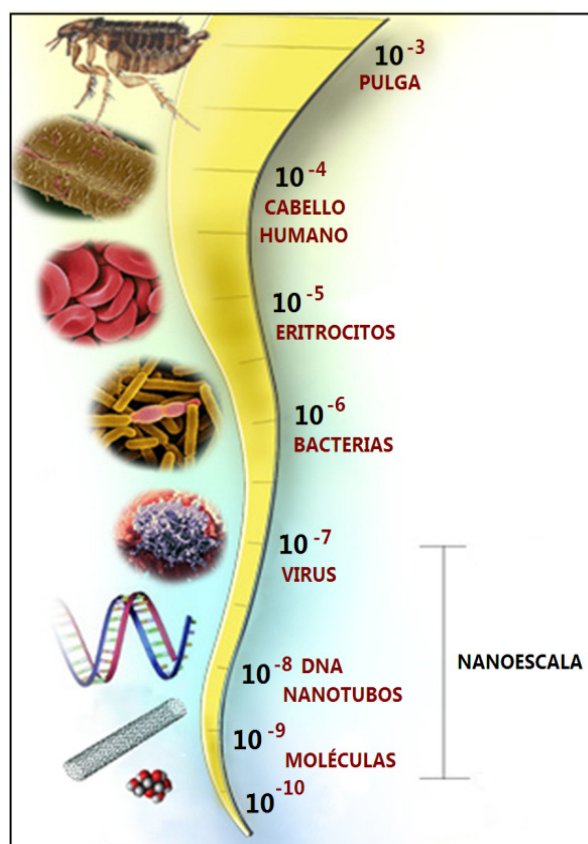


Figura 1. El mundo de la escala nanométrica ([http://www.discovernano.northwestern.edu/whatis/index\\_html/images/howsmall.jpg](http://www.discovernano.northwestern.edu/whatis/index_html/images/howsmall.jpg)).

### 1.1.2. Bionanotecnología

El área de estudio donde la nanotecnología tiene un sin fin de aplicaciones en el campo de la biología y las ciencias médicas, es conocida como “*Bionanotecnología*” [4]. La bionanotecnología se encarga del desarrollo de técnicas de caracterización, procesamiento, y organización de los nanomateriales dentro de sistemas biológicos, a través del uso de biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, etc.) y mecanismos de reconocimiento biomolecular. Los cuales pueden ser empleados para fabricar novedosos biomateriales con diferentes aplicaciones, principalmente con fines terapéuticos, de diagnosis, biotecnológicos y de investigación [2, 4].

Las principales actividades que se realizan dentro de la bionanotecnología están relacionadas con la manipulación y organización de biomoléculas capaces de autoensamblarse en la superficie de un nanomaterial: a) técnicas de alineamiento por bioinducción y desarrollo de nanofilmes; b) desarrollo de nanoestructuras híbridas basadas en la interacción de biomoléculas y nanomateriales con únicas propiedades ópticas, electrónicas, mecánicas, térmicas, etc.; c) técnicas de autoensamblaje para la fabricación de diversas las nanoestructuras híbridas; d) desarrollo de técnicas bioanalíticas fundamentales dentro de los estudios y procesos bionanotecnológicos; e) selección y caracterización de las nanoestructuras híbridas funcionales; f) así como la modelación y predicción del comportamiento de las mismas [1].

### 1.1.3. Los riesgos de la nanotecnología

El potencial riesgo a la salud y al ambiente asociado con la fabricación y el empleo de estos nanomateriales aún es desconocido [5]. Diversas áreas dentro de la

toxicología se han encargado de estudiar las propiedades tóxicas que estos materiales podrían poseer. A través de los estudios toxicológicos es posible identificar cuáles son las diferentes vías de exposición y los mecanismos por los cuáles estos nanomateriales actúan como verdaderos agentes nocivos, Una vez que estas necesidades puedan ser cubiertas, se podrán definir niveles de exposición seguros, así como el diseño de metodologías de control que permitan emplear estos nanomateriales con seguridad [2].

### 1.2. Nanoestructuras de carbono

Uno de los grupos de nanomateriales más empleados e investigados dentro de la nanotecnología, es el grupo de nanoestructuras basadas en átomos de carbono. Entre los cuales se encuentran las hojas de grafito, las esferas de fullereno y los nanotubos de carbono. Tales nanoestructuras (principalmente los nanotubos de carbono) han sido propuestos como materiales electrónicos superconductores, dispositivos ópticos, superconductores de temperatura, nanomáquinas, etc., e incluso se han propuesto para uso biomédico (Apéndice A ,B).

Se ha predicho que más de cien millones de toneladas de nanotubos de carbono serán producidos anualmente alrededor del mundo, lo que indudablemente incrementa un riesgo para la salud y el ambiente [6].

El interés particular del presente estudio se enfoca en estudiar no sólo las propiedades tóxicas de los nanotubos de carbono; sino también, se enfoca en el estudio de la interacción de éstos con polímeros (principalmente aminas) que permiten la formación de nuevas y sorprendentes nanoestructuras híbridas.



### 1.2.1 Historia sobre los nanotubos de carbono

Antiguamente se pensaba que sólo existían dos formas básicas de carbono elemental, las cuales eran el diamante y el grafito (Figura 3). Sin embargo en 1985 Harold Kroto de la Universidad de Sussex, James Heath, Sean O'Brien, Robert Curl y Richard Smalley de la Universidad de Rice [7], encontraron extraordinarios descubrimientos al analizar el espectro de masas de muestras de carbono evaporado. Se observaron picos que correspondían a moléculas con masa de 60 y 70 átomos de carbono [7,8]; así entonces descubrieron una nueva familia de formas elementales de carbono conocida como "fullerenos". Los fullerenos son cajas cerradas formadas por átomos de carbono, las cuales tienen diferentes propiedades y aplicaciones. Existen muchas estructuras exóticas de fullerenos, esferas regulares, conos, tubos y también figuras extrañas y complejas [9].

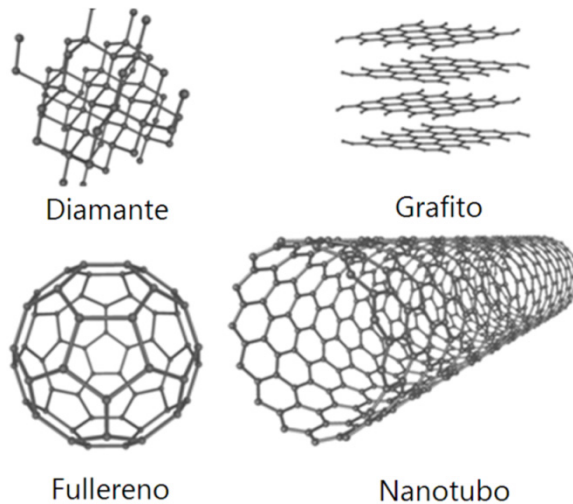


Figura 2. Representación gráfica de las estructuras elementales del carbono elemental. ([http://content.answers.com/main/content/wp/en/thumb/d/db/333px-Eight\\_Allotropes\\_of\\_Carbon-.png](http://content.answers.com/main/content/wp/en/thumb/d/db/333px-Eight_Allotropes_of_Carbon-.png)).

En 1991, el físico microscopista japonés Sumio Iijima de la corporación NEC de la Universidad de Sukuba en Japón, quien

se dedicaba al análisis molecular de las fibras de carbono, hizo pasar chispas eléctricas a través de dos barras de grafito, vaporizándola y obteniendo una masa condensada de carbono. Él esperaba encontrar moléculas de fullereno  $C_{60}$  [10]; pero al observar sus muestras al microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés), observó por primera vez la existencia de moléculas tubulares huecas que presentaban muchas capas (Figura 4). Descubriendo así una nueva familia de formas elementales de carbono, la cual fue denominada como: "nanotubos de carbono de pared múltiple" [11,12].

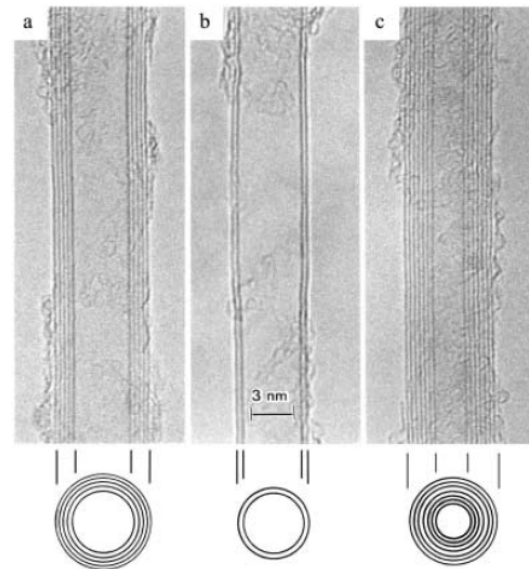


Figura 3. Observaciones originales realizadas por Iijima, S. (1991) a través de HRTEM. Se pueden observar MWNTs formados por diferentes capas con diferentes diámetros [11].

Los nanotubos de pared múltiple observados por Iijima presentaban semiesferas de fullereno en sus extremos y múltiples capas concéntricas formadas por hojas de grafito enrolladas formando cilindros [11, 12]. Tales observaciones permitieron rápidamente hacer una conexión entre la estructura de los nanotubos de carbono y los fullerenos, ya que el diámetro más pequeño reportado para un nanotubo de carbono contenía el mismo diámetro que la molécula de

fullereno más pequeña  $C_{60}$  [8]. Una vez que Iijima mostró sus resultados, muchos investigadores se interesaron en los nanotubos, en un principio fueron atraídos por los efectos cuánticos unidimensionales que predijeron para sus propiedades electrónicas, y posteriormente por las aplicaciones únicas que se obtendrían a partir de la estructura y las características que sólo los nanotubos de carbono podrían poseer. Según las predicciones teóricas sobre estas moléculas, los nanotubos de carbono presentarían propiedades físico-químicas mucho más interesantes que las de los fullerenos, y a su vez, serían mucho más resistentes que las fibras sintéticas [8].

En un principio, las observaciones realizadas por Iijima sólo contemplaban imágenes relacionadas con nanotubos de carbono de pared múltiple (Figura 1); sin embargo, dos años después en el año de 1993, Iijima y sus colaboradores en la corporación NEC, al igual que Donald S. Bethune del laboratorio de IBM, descubrieron los primeros nanotubos de carbono de pared sencilla [13,14]. Estos descubrimientos fueron de gran importancia, ya que la estructura de los nanotubos de pared sencilla es fundamental para lo que ha sido la base teórica de los estudios y las predicciones generales en los nanotubos de carbono [8]. Una de las predicciones más importantes fue el hecho de que los nanotubos de carbono pueden comportarse tanto como semiconductores como conductores, dependiendo del diámetro y de la orientación geométrica de sus hexágonos con respecto al eje de su cilindro [15]. Sin embargo, no fue hasta 1998 que tales predicciones fueron corroboradas experimentalmente [16].

### 1.2.2. Clasificación de los nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono son macromoléculas cilíndricas con un radio de

unos cuantos nanómetros, su longitud puede llegar a mediar unas cuantas micras e incluso pueden ser crecidos hasta varios centímetros en longitud. Las paredes están formadas por átomos de carbono, dispuestos de tal manera que forman un enrejado de hexágonos parecidos a un panel. Los extremos pueden encontrarse cerrados por semi-esferas con la estructura de moléculas de fullereno (para el caso de un nanotubo de carbono ideal) [17, 18].

Los nanotubos de carbono presentan 3 clasificaciones básicas: la primera clasificación está basada en el número de capas que presentan, existiendo 2 tipos [12] (Figura 4): a) los “nanotubos de carbono de pared sencilla” (SWNTs, por sus siglas en inglés) [13,20] y b) los “nanotubos de carbono de pared múltiple” (MWNTs, por sus siglas en inglés) [11,19].

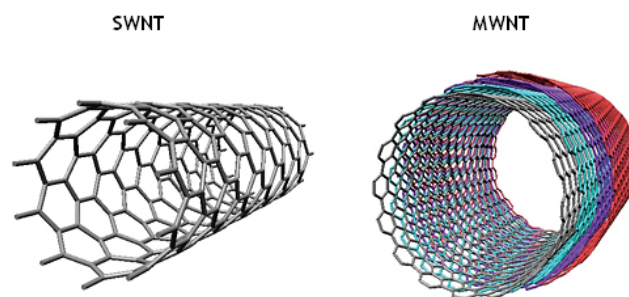


Figura 3. A la izquierda se observa un nanotubo de carbono de pared sencilla (SWNT) y a la derecha se observa un nanotubo de carbono de pared múltiple (MWNT) (<http://www.pharmacy.uwaterloo.ca/research/foldvari/images/SWNTMWNT.jpg>).

La segunda clasificación es de acuerdo con su simetría, y se divide en dos tipos: los nanotubos que presentan simetría de reflexión y que son isomórficos (armchair y zigzag), y los nanotubos que no presentan simetría de reflexión y que no son isomórficos (quirales) [12] (Figura 4).

La tercera clasificación está basada en los índices de Hamada o de quiralidad (explicados más adelante), y se dividen en tres tipos: el primer tipo son los nanotubos de tipo *armchair* cuando sus índices de hamada son iguales entre si ( $n=m$ ), y además presenta un ángulo quiral  $\Phi$  igual a  $30^\circ$

[15]; el segundo tipo son los nanotubos de tipo *zigzag* el cual presenta en su índice de hamada una  $m=0$  y presenta una  $\Phi = 0^\circ$ ; el último tipo es el nanotubo de tipo *quiral*, el cual presenta un índice de hamada de tipo ( $n > m > 0$ ), y además posee una  $\Phi = 0^\circ < \Phi < 30^\circ$  [12] (Figura 4, 9).

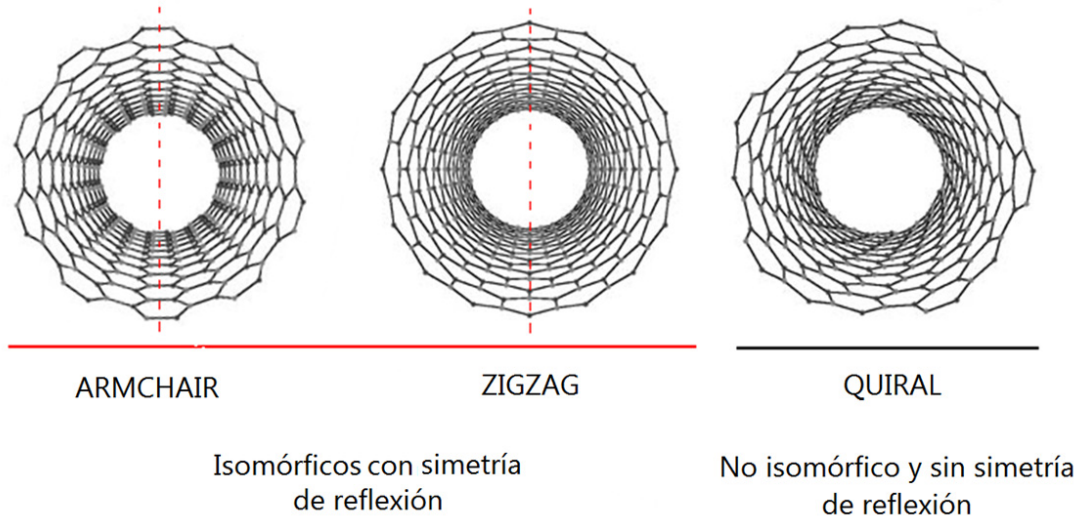


Figura 4. Se observan los nanotubos de carbono de acuerdo a su clasificación por simetría, los nanotubos que presentan simetría de reflexión y que son isomórficos (armchair y zigzag) sobre la línea roja y un nanotubo no isomórfico que sin simetría de reflexión (quiral) sobre la línea negra (<http://theory.lsi.polytechnique.fr/results-/nanotubes/nanotubes.jpg>)

### 1.3. Estructura de los nanotubos de carbono de pared sencilla (SWNTs):

El descubrimiento de estas estructuras también fue debido a Iijima y sus colaboradores [13,20]. Su estructura ha sido corroborada y analizada a través de técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y microscopía de efecto túnel (STM, por sus siglas en inglés) [8]. La estructura de los SWNTs hace que estos sean mucho más difíciles de sintetizar que los MWNTs [21]. Tal estructura en los SWNTs consiste básicamente en dos regiones separadas que

poseen diferentes propiedades físicas y químicas. La primer región es una hoja de grafito enrollada, la cual forma un cilindro que normalmente puede o no presentar un segundo componente en sus extremos [20, 21], el diámetro de este cilindro se encuentra aproximadamente entre 0.7 nm y 10 nm donde los más observados son aquellos cuyos diámetros se encuentran a partir de los 2 nm [27]. La segunda región se conforma por semiesferas con la estructura de la molécula de fullereno  $C_{60}$  cerrando los extremos del cilindro, las cuales pueden ser removidas por diferentes métodos [20, 21] (Figura 5).

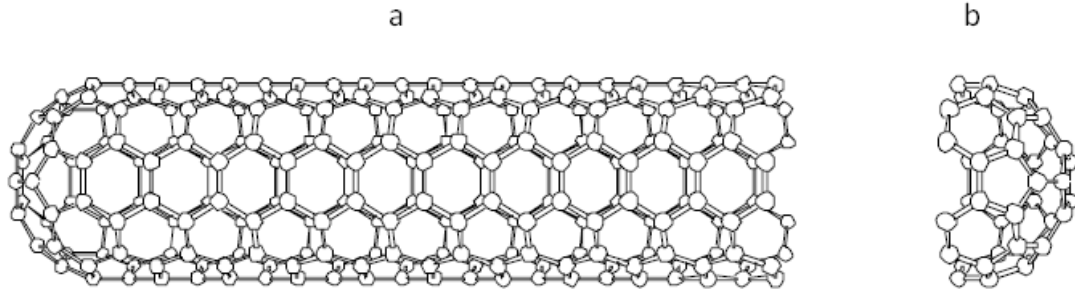


Figura 5. En la figura se observan las dos regiones que componen a un nanotubo de carbono: el cilindro (a) y los extremos cerrados con semiestructura de fullereno (b) [8].

### 1.3.1. Primera Región (superficie cilíndrica).

La estructura del cilindro en los SWNT es explicada en términos de sus unidades de celda unidimensional, definida por los vectores  $C_h$  y  $T$  [8]. La circunferencia de cualquier nanotubo de carbono está expresada en términos del vector quiral  $C_h$  el cual conecta dos sitios equivalentes (cristalográficamente hablando) sobre una hoja de grafito bidimensional [8,22]. A su vez, está

determinado por el par de números enteros ( $n, m$ ) o índices de Hamada, y por los vectores unitarios de la red hexagonal  $\hat{a}_1$  y  $\hat{a}_2$ , por lo que el vector quiral se expresa entonces de la siguiente manera:  $C_h = n\hat{a}_1 + m\hat{a}_2$  [12]. El vector  $O-B$  es el primer punto que determina el vector fundamental de una dimensión  $T$ . La “unidad de celda unidimensional” es el rectángulo definido por los vectores  $C_h$  y  $T$  o por los puntos  $O-B-B'-A$  (Figura 6). El ángulo que se forma entre el vector quiral  $C_h$  y el eje zigzag se conoce como “ángulo quiral” [8].

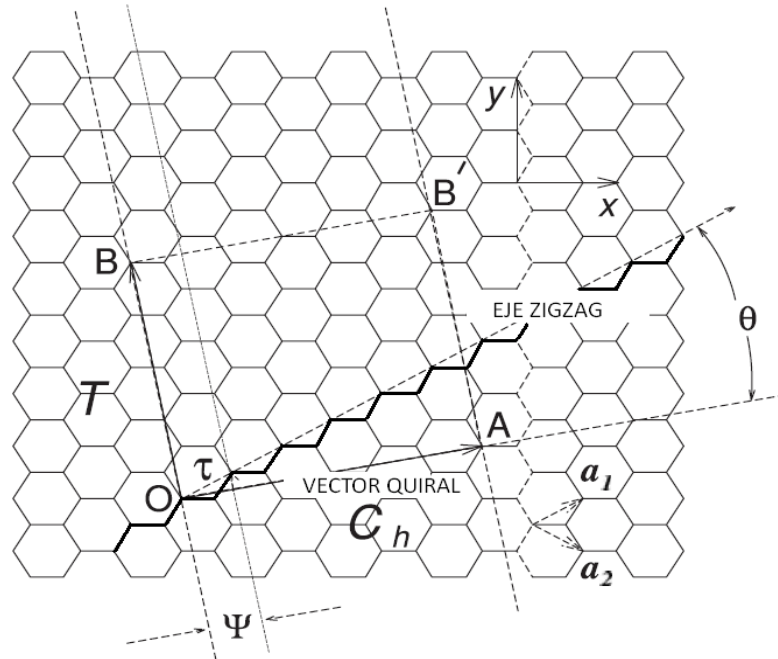


Figura 6. El vector  $OA$  llamado vector quiral o  $C_h = n\hat{a}_1 + m\hat{a}_2$  está definido por los vectores  $a_1$  y  $a_2$  y el ángulo quiral  $\theta$  respecto al eje zigzag sobre el enrejado tipo panal de átomos de carbono. También se muestra el vector  $OB = T$  de la unidad de celda unidimensional y el ángulo de rotación  $\psi$  y el de translación lo cuales constituyen la operación de simetría básica  $R = (\psi/\tau)$  del nanotubo de carbono [8].



Existe un vector llamado “vector de simetría  $R$ ” (Figura 7), este vector determina el sitio que presenta el componente más pequeño en dirección a  $C_h$ , y a su vez determina también las coordenadas atómicas para la formación de un nanotubo [25]. El vector  $R$  consiste en un evento de rotación alrededor del eje del nanotubo, representado por el ángulo  $\psi=2\pi/N$  (número de hexágonos  $N$  formados por átomos de carbono en dirección  $C_h$ ), que junto con el parámetro de traslación  $\tau$  en dirección a  $T$ , determinan la operación de simetría básica  $R = (\psi/\tau)$  [8,27].

La formación de un SWNTs puede ser visualizada a través del enrollamiento de la hoja de grafito (Figura 8) al conectar los puntos  $O$  y  $A$  dentro del vector quiral  $C_h$ . A su vez, se pueden formar tres diferentes

tipos de SWNT [18], esta construcción depende únicamente de los índices de quiralidad  $(n,m)$  para determinar el vector quiral [8].

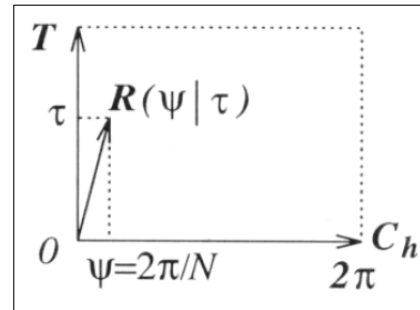


Figura 7. Se muestra el vector de simetría  $R$ , el cual determina la posición de los átomos de carbono dentro de la unidad de celda unidimensional [12].

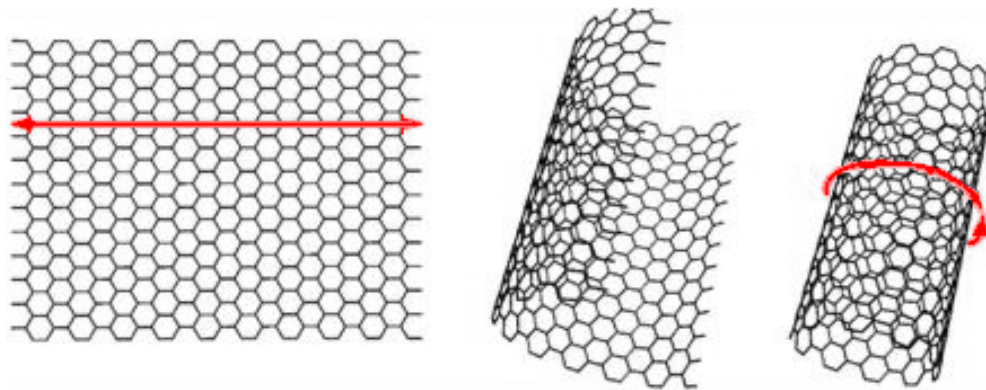


Figura 8. Enrollamiento de hoja de grafito para formar un SWNT, se puede observar una flecha que representa el vector quiral de un nanotubo de tipo armchair (<http://www.physik.uni-regensburg.de/aktuell/-KollSS05-/Thomsen-Vortrag-Dateien/image004.jpg>)

Los tres diferentes nanotubos que pueden formarse tras la rotación de la hoja de grafito, tienen diferentes propiedades en términos de conductividad y geometría (Figura 9-a). Estos 3 diferentes arreglos geométricos son dependientes de sus índices de quiralidad o del ángulo de quiralidad  $\phi$  correspondientes, y de acuerdo con el arreglo geométrico resultante para la red hexagonal presente en la superficie de los nanotubos, estos se conocen como: *armchair*,

*zigzag* y *quiral* (Figura 9-b). Los nanotubos *armchair* muestran índices de quiralidad donde  $(n=m)$ ; los nanotubos de carbono de tipo *zigzag* tienen su origen a partir del arreglo geométrico de los átomos de carbono en las costuras del tubo y el valor de su índice de quiralidad es  $(m=0)$ . Debido a que estos dos últimos tipos de nanotubos presentan una simetría de espejo (simetría de reflexión), son considerados como estructuras “aquirales”, mientras que el tercer tipo de

nanotubos con un índice de quiralidad ( $n \neq m$ ) y una simetría de reflexión inexistente, son considerados como estructuras “quirales” [8,18]. En términos del ángulo quiral  $\Phi$  los nanotubos de tipo armchair muestran una  $\Phi$

igual a  $30^\circ$ ; los nanotubos de tipo zigzag muestran  $\Phi = 0^\circ$ ; mientras que los nanotubos quirales se encuentran en los rangos donde  $0^\circ < \Phi < 30^\circ$  [8].

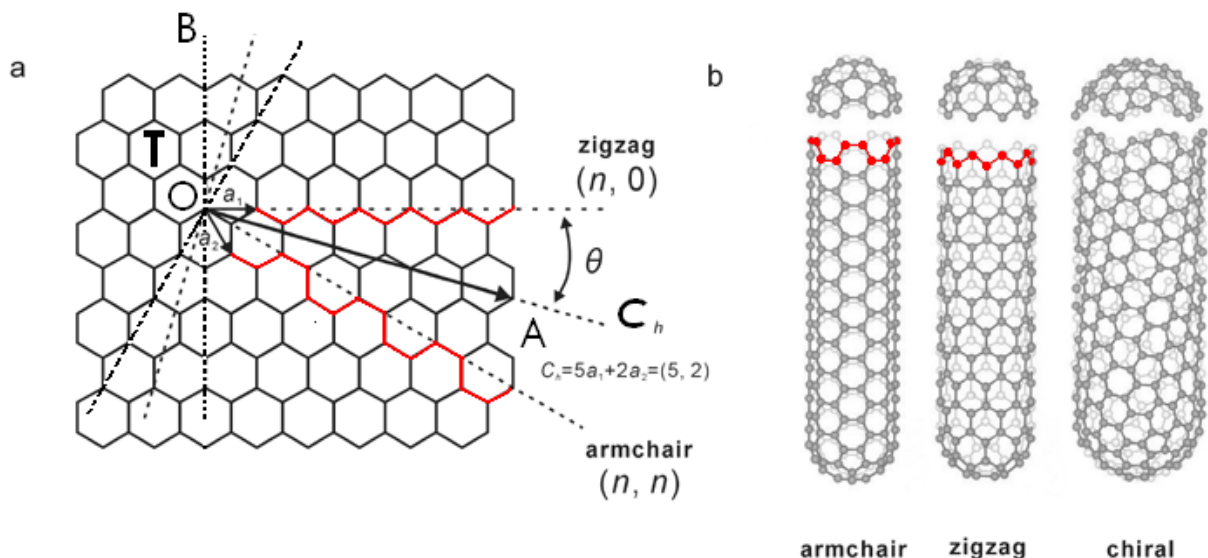


Figura 9. La figura de la derecha muestra los 3 diferentes tipos de SWNTs formados tras el enrollamiento de la hoja de grafito (b) armchair, zigzag y quiral, éstos a su vez dependen de su respectivo vector quiral como se muestra en la figura de la izquierda (a) ([http://fgmdb.nsl.go.jp/sspsimg/jimages/jimage3\\_1/fig-3\\_1\\_1.gif](http://fgmdb.nsl.go.jp/sspsimg/jimages/jimage3_1/fig-3_1_1.gif), [18]).

### 1.3.2. Segunda Región (terminaciones cerradas).

Como se ha descrito anteriormente, la región terminal de los nanotubos puede presentar semiesferas con la estructura de moléculas de fullereno  $C_{60}$  o de otros fullerenos en sus terminaciones [9]. Estas terminaciones están formadas por la combinación de algunos pentágonos y hexágonos formados también por átomos de carbono, por lo que los son considerados primos cercanos de las moléculas de fullereno y también pueden ser nombrados como “fullerenos tubulares” [21]. Por medio del “teorema de Euler” es posible determinar que se necesitan 12 pentágonos para la obtención de un nanotubo sin imperfecciones con termina-

ciones en forma de caja cerrada, el cual consistiría únicamente de los pentágonos y hexágonos (Figura 10) [9,23]. Cuando se coloca un pentágono y alrededor de éste 5 hexágonos, se obtiene una curvatura de la superficie que encierra un volumen. Una segunda regla es “la regla del pentágono aislado”, la cual establece que la distancia entre los pentágonos debe estar maximizada para obtener una mínima curvatura local y un mínimo estrés superficial, resultando así una estructura muy estable [9]. Sin embargo, entre mas alejados se encuentren los pentágonos entre si, el diámetro del nanotubo aumenta. El diámetro típico de un SWNT se encuentra alrededor de 1.4 nm, muy cercano al diámetro de un nanotubo ideal con valores de quiralidad (10,10) [26].

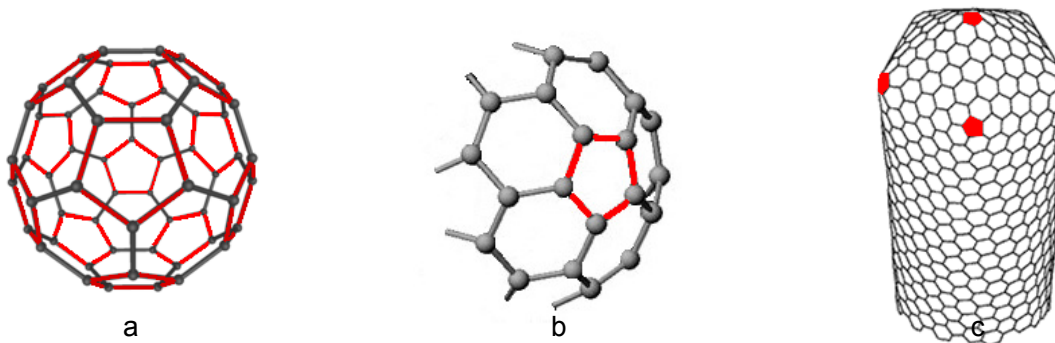


Figura 10. La figura "a" representa a una estructura estable que cumple la regla del teorema de Euler, en este caso un fullereno que presenta 12 pentágonos (en rojo); la figura "b" muestra un pentágono (en rojo) y 5 hexágonos a su alrededor dando como resultado una curvatura de superficie convexa; figura "c" muestra la regla del pentágono aislado, donde la distancia entre los pentágonos (en negro) es proporcional al diámetro del nano-tubo, mientras que al aumentar la distancia entre pentágonos disminuye la curvatura local y el estrés superficial de la estructura (<http://content.answers.com/main/content/wp/en/thumb/3/31/200px-C60a.png>, <http://www.nanonet.g-o.jp/english/mailmag/2006/files/070a1.gif>).

La estructura más estable y pequeña que puede formarse con las reglas anteriores, es una molécula de fullereno formada por 60 átomos de carbono ( $C_{60}$ ) (Figura 11-b). Para formar un nanotubo de carbono ideal se toma una molécula  $C_{60}$ , se corta a la mitad, y se inserta entre las dos mitades un anillo de 10 átomos de carbono (una hoja de grafito enrollada), formándose así una es-

tructura con 70 carbonos ( $C_{70}$ ) que podría considerarse como el nanotubo de carbono de menor tamaño existente. Así, al aumentar de 10 en 10 el número de átomos de carbono en arreglo de anillo, se obtienen cilindros con incrementos de 10,  $C_{60}$ ,  $C_{70}$ ,  $C_{80}$ , y el largo de un nanotubo de carbono tiende al aumento (Figura 11-a) [24].

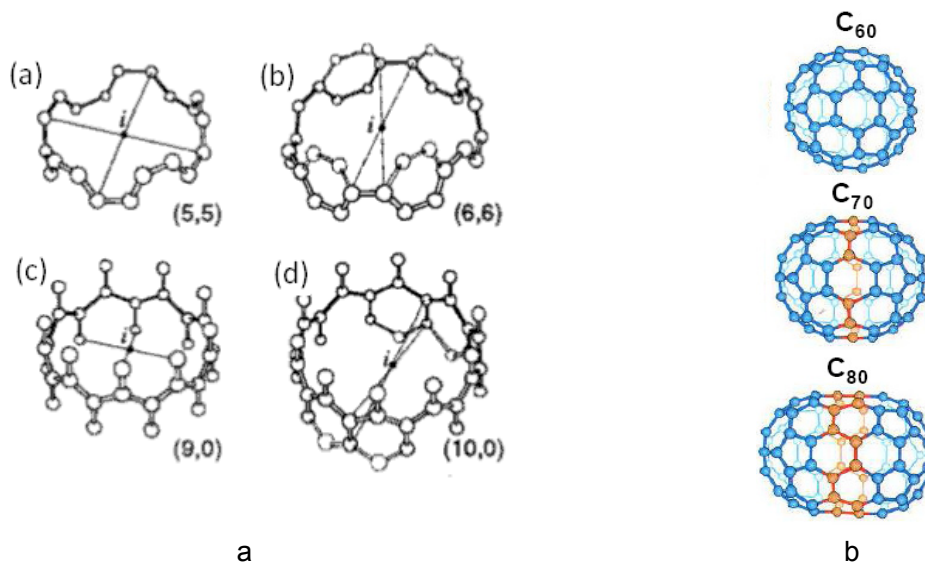


Figura 11. a) Anillos de carbono; b) Inserción de anillos de 10 átomos de carbono a dos mitades de una molécula de fullereno  $C_{60}$  (en azul), dando como resultado la formación de un nanotubo de carbono ideal, donde cada vez que se inserta un anillo el largo del nanotubo aumenta (<http://nano.nchc.org.tw/dictionary/ima-ge/c60-4.gif>, [28]).

#### 1.4. Estructura de los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTs)

Originalmente fueron descubiertos al observar los productos obtenidos tras la síntesis de fullerenos  $C_{60}$  [20]. Estas primeras observaciones (Figura 12) como se ha mencionado anteriormente, fueron hechas por el Iijima 2 años antes del descubrimiento de los SWNT [13]. Los MWNTs pueden ser considerados como una colección concéntrica de cilindros coaxiales con diferentes diámetros, cuyo rango se encuentra entre los 10 y los 100 nm de diámetro, siendo cada cilindro un SWNT (Figura 12) [8, 9, 20]. Pueden llegar a presentarse desde 2 hasta 50 cilindros concéntricos [20], y la distancia que separa a un cilindro de otro es aproximadamente de 0.342-0.375 nm (muy similar a la distancia interplanar del grafito, la cual es de 0.335 nm), manteniéndose unidos a través de interacciones Van der Waals [28].



Figura 12. Imagen de un nanotubo de pared múltiple (MWNT) (<http://www.oviedo.es/personales/carbon/nanotubos/swcn%20y%20mwcn.jpg>).

El arreglo de los cilindros en un MWNT es muy similar a las muñecas rusas llamadas “Matryoshka” (Figura 13) [21]. Se ha reportado que la variación de la distancias entre cilindros de un MWNT está en función del número de cilindros que lo componen, y del efecto de curvatura que se produce en los espacios entre los cilindros [29].

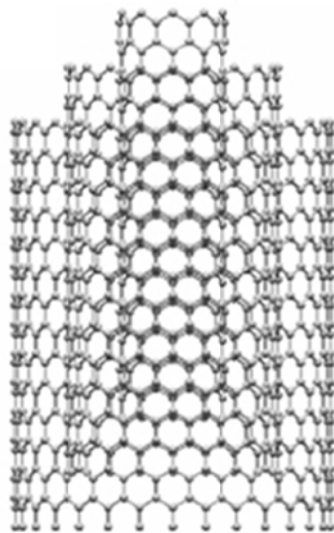


Figura 13. A la izquierda se muestran las diferentes capas concéntricas que forman a los MWNT, se puede observar que cada cilindro que lo conforma es un SWNT. A la izquierda se muestra una muñeca Rusa que es muy similar al arreglo concéntrico de los cilindros de un MWNT (<http://www.ahwahneetech.com>, <http://www.jyu.fi/science/laitokset/fysiikka/en/research/material/nanophys/moltech/research/MWNT.jpg>).



Los diferentes SWNTs que conforman a un MWNT pueden presentar diferente quiralidad y longitud; por tal razón, los MWNTs normalmente son 100 veces más largos y anchos que los SWNTs. En el grafito las hojas adyacentes se encuentran únicamente unidas por fuerzas van der Waals, por lo tanto las hojas de grafito pueden ser fácilmente removidas una de la otra; sin embargo no es tan fácil realizar tal proceso de

desprendimiento en un MWNT. Debido a que los MWNTs normalmente presentan extremos cerrados, es mucho más complejo desprender las capas internas de las capas externas que las contienen [30]. A pesar de eso, se han descrito novedosos métodos que han logrado con éxito separar por procesos de “peeling” cada una de las capas que componen a un MWNT (Figura 14) [31].

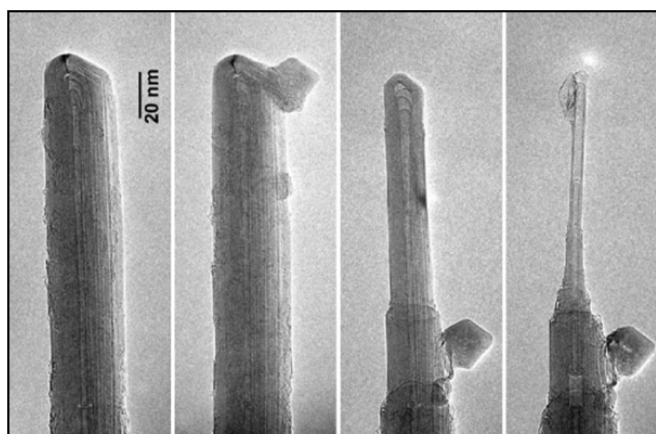


Figura 14. Proceso de “peeling” por el cual se separan las diferentes capas que componen a un MWNT [31].

### 1.5. Otras estructuras derivadas de los nanotubos de carbono

Existen estructuras más complejas originadas a partir de la inducción de defectos en la superficie de varios nanotubos y asu posterior ensamblaje. Ejemplos de ellas son: las ramas T, las ramas Y, las ramas X,

(mejor conocidas como “empalmes de SWNTs”) y las transiciones por tamaños (Figura 15). Tales defectos pueden ser de cierto modo controlados. Estas estructuras tan originales pueden dar lugar a complejos ensambles con únicas e interesantes propiedades y aplicaciones (Apéndice A, B) [9,32].

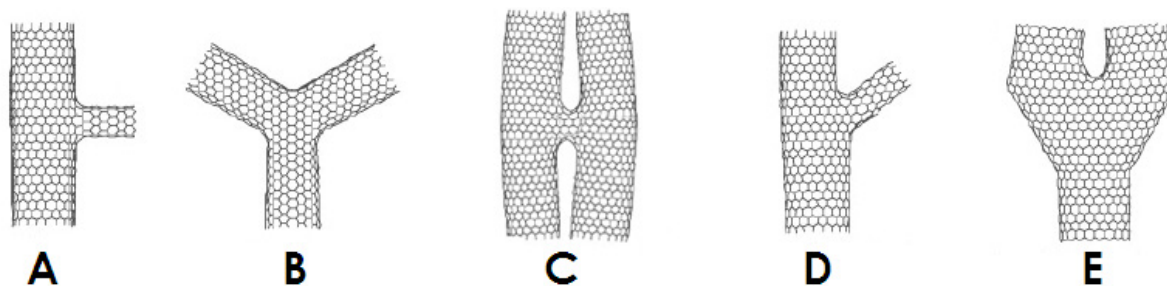


Figura 15. Otras estructuras formadas por nanotubos de carbono: a) ramas T; b) ramas Y; c) ramas X; d) transiciones por tamaños ([http://www.madrimasd.org/VigTecnologica/Documentos/JornadaNano-tuboscimtan/Propiedades\\_Interes\\_Nanotubos\\_JAAlonso.pdf](http://www.madrimasd.org/VigTecnologica/Documentos/JornadaNano-tuboscimtan/Propiedades_Interes_Nanotubos_JAAlonso.pdf)).

Entre las más interesantes estructuras que pueden obtenerse a través del uso de nanotubos, se encuentran los llamados “peapods”. Los cuales son básicamente nanotubos de carbono que en su interior contienen moléculas de fullerenos (Figura 6-a).

En el interior de éstos, las moléculas de fullereno pueden sufrir una transformación fascinante cuando se produce una coalescencia entre éstas; formándose así, uniones estrechas entre cada una de ellos (Figura 16-b) [9,33].

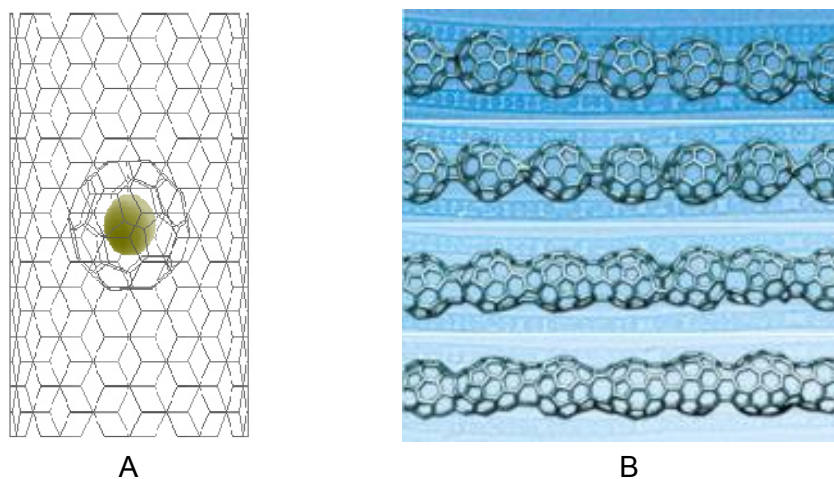


Figura 16. Se puede observar dentro del nanotubo una molécula de fullereno (a). Coalescencia de las moléculas de fullereno dentro del nanotubo de carbono (b). (<http://www.tu-darmstadt.de/fb/ch/PCIII/peapod.jpg>, [33]).

## 1.6. Referencias

[1] Schalkhammer, T. (2004): Bionanodevices. In: *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. (ed) American Scientific Publishers. USA; 1: 329 pp.

[2] Mark, D. (2004): Nanomaterials a risk to health at work?. In: *First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials*. U.K. ([http://www.hsl.gov.uk/capabilities/nanosymrep\\_final.pdf](http://www.hsl.gov.uk/capabilities/nanosymrep_final.pdf)).

[3] Hunt, W. H. (2004): Nanomaterials: Nomenclature, Novelty, and Necessity. *Journal of Metals*; 56: 13-18.

[4] Wickramasinghe, N.; Choudhary, S.; Geisler, E. (2007): Bionanotechnology: its applications and relevance to healthcare. *International Journal of Biomedical Engineering and Technology*; 1: 41-58.

[5] Colvin, V. L. (2003): The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*; 21: 1160-1170.

[6] Tian, T.; Cui, D.; Schwarz, H.; Gomez Estrada, G.; Kobayashi, H. (2006): Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicology in Vitro*; 20: 1202–1212.

[7] Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. (1985): C60: Buckminsterfullerene. *Nature*; 318, 162–163.

[8] Dresselhaus G., Dresselhaus, M. S.; Avouris, P. (2001): *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*. (ed.) Springer Berlin-Heidelberg. Berlin; 80:142 pp.

[9] Daenen, M.J.M.; Fouw, R.; Hamers, B.; Janssen, P.G.A.; Schouteden, K.; Veld, M.A.J. (2003): *Multi Disciplinair Project: Wondrous World of Carbon Nanotubes*. (<http://students.chem.tue.nl/ifp0-3>)

- [10] Ball, P. (1999): Focus Carbon Nanotubes. *Nature Scienceupdate*. (<http://www.nature.com/n-su/99-1202/991202-1.html>).
- [11] Iijima, S. (1991): Helical microtubes of graphitic carbon. *Nature* ; 354: 56-58.
- [12] Alcaá Quispe, F. (2005): *Estructura y síntesis de nanotubos de carbono*. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 37pp.
- [13] Iijima, S.; Ichihashi, T. (1993): Single shell carbon nanotubes of 1-nm diameter, *Nature*; 363: 603-605.
- [14] Bethune, D. S.; Kiang, C. H.; Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vazquez, J.; Beyers, R. (1993): Cobalt-Catalyzed Growth of Carbon Nanotubes with Single-Atomic-Layer Walls. *Nature*; 363: 605-607.
- [15] Hamada, N.; Sawada, S.; Oshiyama, A. (1992): New one-dimensional conductors: Graphitic microtubules. *Physical Review Letters*; 68:1579–1581
- [16] Wildöer, J. W. G.; Venema, L. C. ; Rinzler, A. G.; Smalley, R. E.; Dekker, C. (1998): Electronic structure of atomically resolved carbon nanotubes. *Nature*; 391: 59–62.
- [17] Zhu, H. W.; Xu, C. L.; Wu, D. H.; Wei, B. Q.; Vajtai, R.; Ajayan, P. M. (2002): Direct synthesis of Long Singled-Walled Carbon Nanotube Strands. *Science*; 296: 884 - 886.
- [18] Balasubramanian, K.; Burghard M. (2005): Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *Small* ;1: 180 –192.
- [19] Zhao, X.; Ohkohchi, M.; Wang, M.; Iijima, S.; Ichihashi, T.; Ando, Y. (1997): Preparation of high-grade carbon nanotubes by hydrogen arc discharge. *Carbon*; 35: 775-781.
- [20] Tanaka, K.; Yamabe T.; Fukui K. (1999): *The science and technology of carbon nanotubes*. (ed.) Elsevier, Londres; 191pp.
- [21] Houllister, P.; Harper T. E.; Vas Román, C. (2003): *Nanotubes White paper*. (ed.) CMP Científica. (<http://nanoparticles.org/pdf/nanotubes.pdf> ).
- [22] Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R. (1992): Carbon fibers based on C<sub>60</sub> and their symmetry. *Physical Review B* ; 45: 6234-6242.
- [23] Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., and Eklund, P. C. (1996): *Science of fullerenes and carbon nanotubes*. (ed.) Academic Press, USA; 965 pp.
- [24] Fowler, P. W.; Manolopoulos, D. E. (1992): Magic Numbers and stable structures for fullerenes, fullerides and fullerenium ions. *Nature*; 355:428-430.
- [25] Tu, Z.C.; Ou-Yang, Z. C. (2006): Structures, Symmetries, Mechanics and Motors of carbon nanotubes, *Trends in Nanotubes Research*; 3: 77-92.
- [26] Thess, A.; Lee, R.; Nikolaev, P.; Dai, H.; Petit, P.; Robert, J.; Xu, C.; Lee, Y. H.; Kim, S. G.; Rinzler, A. G.; Colbert, D. T.; Scuseria, G. E.; Tománek, D.; Fischer, J. E.; Smalley, V. (1996): Crystalline ropes of metallic nanotubes. *Science* 273; 483:487.
- [27] Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R. (1998): *Physical properties of carbon nanotubes*. (ed.) Imperial College Press, U.K.; 276 pp.
- [28] Rodney, S. R.; Dong Q.; Wing K. L. (2003): Mechanical properties of carbon nanotubes theoretical predictions. *Le Centre de Ressources Physique*; 4: 993-1008
- [29] Kiang, C.H.; Endo, M.; Ajayan, P.M.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M.S.(1998): Size effects in carbon nanotubes, *Physical Review Letters*; 81: 1869–1872.
- [30] Treacy, M. J.; Ebbesen, T. W.; Gibson, J. M.(1996): Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature*; 381:678–680.
- [31] Cumings, J.; Collins P.G.; Zettl, A. (2000): Peeling and sharpening multiwall nanotubes. *Nature*; 406: 586.
- [32] M. Terrones, F. Banhart, N. Grobert, J.-C. Charlier, H. Terrones, and P.M. Ajayan (2002): Molecular junctions by joining single-walled carbon nanotubes *Physical Review Letters*; 89: 075505/1-075505/4.
- [33] Hernandez, E.; Smith, B. W.; Ruráli, R.; Terrones, H.; Meunier, V.; Zacharia, T.; Terrones, M.; Luzzi, D. E.; Charlier, J.-C. (2003): Fullerenes coalescence in nanopeapods: a path to novel tubular carbon. *Nano Letters*; 3: 1037-1042.

# CAPÍTULO

# 2

## Síntesis, configuración electrónica y propiedades de los nanotubos de carbono

### 2.1. Crecimiento de nanotubos de carbono.

La forma en la que los nanotubos de carbono crecen aún es una incógnita. Se han propuesto distintos modelos que podrían explicar los mecanismos que operan durante el crecimiento de los nanotubos de carbono. El modelo más aceptado consiste en 3 pasos: 1) partículas metálicas catalizadoras de la síntesis se concentran sobre una superficie; 2) a causa de las altas temperaturas y a partir de una fuente de  $C_2$ , los átomos de

carbono se difunden dentro de la superficie de las partículas catalizadoras y forman un precursor a la formación de nanotubos y fullerenos, el cual rápidamente origina un cilindro; 3) lentamente se da el proceso de grafitización de dicho cilindro, como los nanotubos de carbono siempre están abiertos durante la síntesis, los átomos de carbono se incorporan en las extremidades culminando con la formación de los extremos cerrados del nanotubo (Figura 1) [1,2, 3].

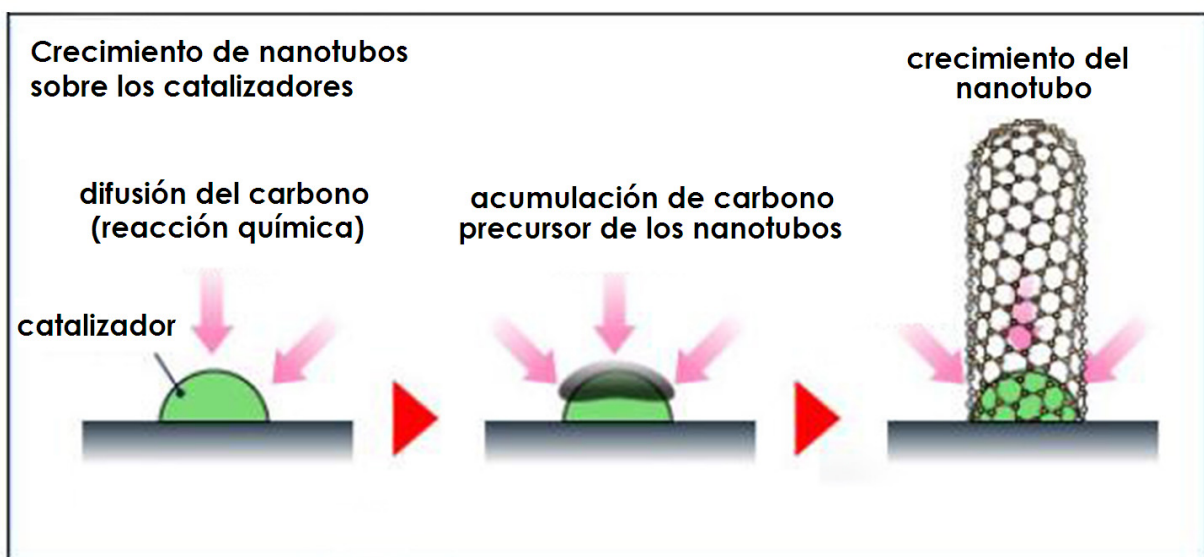


Figura 1. Modelo de crecimiento para nanotubos de carbono sobre catalizador durante su síntesis [3].

### 2.1.2 Formación de defectos

Los nanotubos de carbono no son estructuras ideales, ya que en el momento en que son crecidos y sintetizados pueden formarse defectos sobre su superficie, alterando el número de átomos de carbono que normalmente componen la red hexagonal característica. Tales defectos pueden ser o no zonas químicamente reactivas, dependiendo de la geometría que adquieran. Típicamente del 1 al 3% de los átomos de carbono de un nanotubo están localizados en sitios con defectos [4].

En general, la presencia de defectos en forma de anillos pentagonales sobre la superficie de un nanotubo, puede modificar drásticamente las propiedades de estos nanomateriales. Cuando esto ocurre, se produce una deformación local de la superficie y se forma una curvatura convexa mucho más pronunciada y tensa, la cual puede favorecer algunas reacciones químicas. Ejemplo de los anterior son las reacciones de adición princi-

palmente empleando grupos amina (Capítulo 3) [5, 6]. Una de las estructuras más comunes formadas por anillos pentagonales son las unidades de piracileno (Capítulo 3, Figura 1), las cuales pueden ser encontradas principalmente en los extremos cerrados de un nanotubo. Existen otras estructuras conocidas como “stone-wales” o defectos de tipo “7-5-5-7”, los cuales presentan 2 pares de anillos pentagonales y 2 pares de anillos heptagonales (Figura 2). Los enlaces que conectan al par de anillos pentagonales son zonas químicamente reactivas [4].

Únicamente se considera que los SWNTs pueden crecer con una menor cantidad de defectos sobre su superficie, y es por eso que estos son mucho más resistentes que los MWNTs [7]. Es posible inducir a través de diversos métodos químicos (radiación, oxidación, etc.) defectos sobre la superficie de los nanotubos, o simplemente inducirlos al modificar las condiciones de su síntesis, modificando drásticamente las propiedades intrínsecas de los mismos [4].

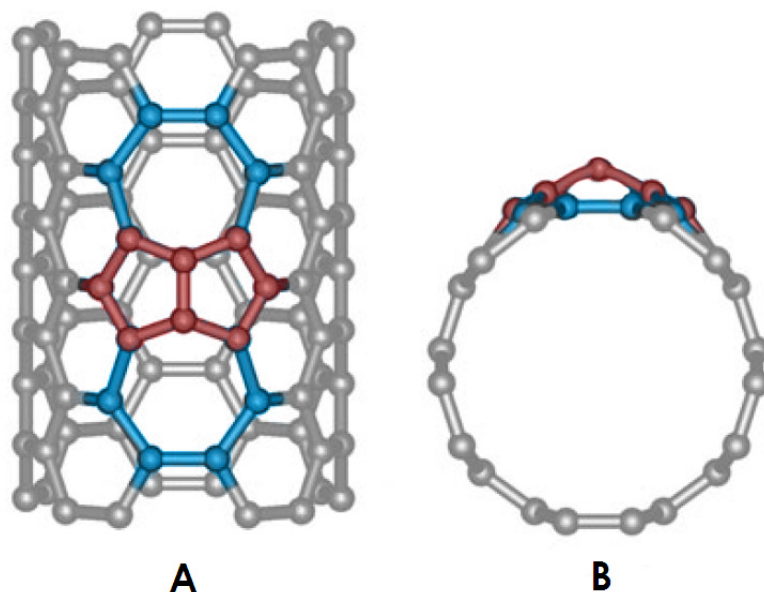


Figura 2. Figura A: vista lateral de la superficie de un SWNT, se observa una estructura “stone-wales” inducida por la formación de defectos de tipo pentagonal y heptagonal; figura B: vista transversal del mismo nanotubo, donde es posible observar la curvatura convexa local inducida por los defectos pentagonales [4].



## 2.2. Síntesis de nanotubos de carbono

En términos de productividad masiva, es mucho más fácil producir significantes cantidades de MWNTs que de SWNTs debido a su gran variedad y complejidad, por lo que se dificulta su producción en tiempo y cantidad; sin embargo, la estructura de un MWNT es mucho menos entendible que la estructura de un SWNT. En términos de defectos, los MWNTs poseen una mayor cantidad de defectos que los SWNT y esto puede disminuir algunas de sus deseables propiedades. Muchas de las aplicaciones que se tienen en consideración o que se están poniendo en práctica involucran más a los MWNTs, ya que estos son más fáciles de producir en grandes cantidades a un precio razonable, y han estado disponibles por más

tiempo que los SWNTs [8]. Existen en la actualidad diversos métodos de síntesis. Las principales técnicas para sintetizar nanotubos son: síntesis por descarga de arco, síntesis por vaporización láser, la síntesis mediante vaporización por deposición química, y síntesis por descomposición catalítica de hidrocarburos.

### 2.2.1. Método por descarga de arco

El método de síntesis por descarga de arco es una técnica que produce una mezcla de componentes, que requiere de la separación de los nanotubos a partir del hollín, así como de las partículas catalíticas presentes en el producto [2]. Este método se considera una forma excelente para producir SWNTs y MWNTs de alta calidad [9].

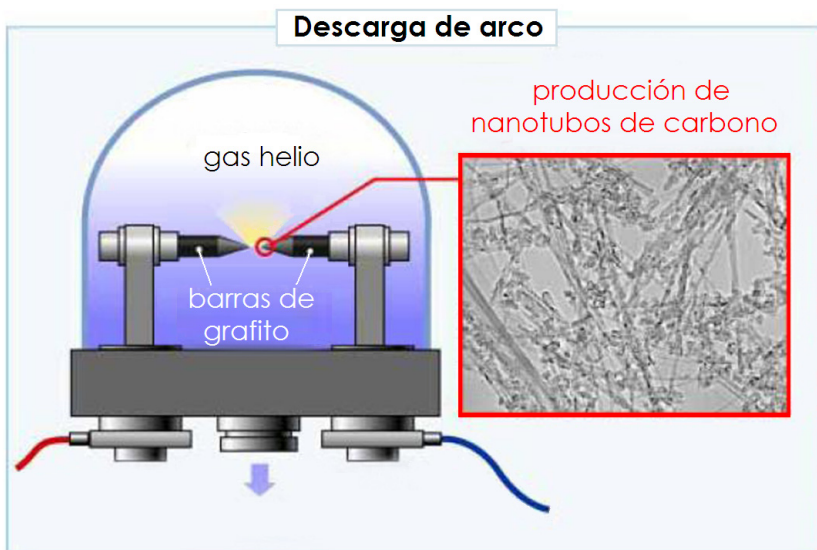


Figura 3. Esquema para el método de síntesis por descarga de arco [3].

El método se realiza al colocar dos barras de grafito separadas aproximadamente por 1mm la una de la otra. Las barras de grafito se encuentran dentro de un contenedor que es usualmente llenado con gas helio o argón a baja presión (300-400 Torr). Una corriente directa de 50 a 100A es mane-

jada con aproximadamente 20-50V, produciendo una temperatura de descarga entre los dos electrodos (Figura 3) [2]. La descarga vaporiza una de las dos barras, formándose un plasma caliente que posteriormente se condensa sobre la superficie de la otra barra encontrada en el cátodo. Los depósi-

tos consisten en dos porciones: a) la porción interna, la cual es negra y frágil y que contiene nanotubos, fullerenos y nanopartículas de grafito poliédricos; b) la porción externa está formada por cristales de grafito por lo que es muy rígida y dura [10].

Si se quiere obtener únicamente SWNTs, el ánodo debe ser complementado con catalizadores metálicos como Fe, Co, Ni, Y o Mo. De otro modo sí los dos electrodos están compuestos sólo por grafito el resultado será principalmente MWNTs, pero estos estarán mezclados con fullereno, carbono amorfo y hojas de grafito. La calidad de los nanotubos dependerá de parámetros como son la concentración de los catalizadores, la presión de los gases, el tipo de gas, la corriente empleada, y la geometría del sistema. Los SWNTs obtenidos presentan diámetros entre 1.2 y 1.4 nm; mientras los MWNTs obtenidos, diámetros de 1 a 3 nm [2].

### 2.2.2. Método por vaporización laser

El método de vaporización por laser consiste en el empleo de un laser continuo o en forma de pulsaciones. El cual dentro de un horno a una temperatura de 1200°C, vaporiza un blanco formado por grafito con una mezcla de Co, Ni, Fe o Y (Figura 4). El horno

es llenado con gas helio o argón de modo que la presión se mantiene a unos 500 Torr. Un vapor caliente se forma, se expande, y se enfría rápidamente. Mientras el vapor se enfría se van formando moléculas de carbono que podrían incluir fullerenos y carbono amorfo [2, 3]. La catálisis comienza cuando el vapor se condensa lentamente sobre una superficie de Cu. Los clústeres de carbono se van adhiriendo para prevenir la formación de estructuras parecidas al fullereno en todo caso durante la catálisis; tales estructuras se pueden deshacer en el momento en el que se van adhiriendo. Al principio los clústeres iniciales crecen para dar origen únicamente a SWNTs, hasta que se terminen las fuentes de carbono o las condiciones de enfriamiento, eviten la difusión del carbono hacia la superficie de las partículas catalíticas.

Los SWNTs obtenidos tienden a formar conglomerados por medio de fuerzas Van der Waals. El polvo que se obtiene durante la condensación de este método está contaminado con SWNTs y nanopartículas de carbono, este método es muy utilizado para obtener SWNTs de gran calidad, con formas mucho más definidas y con mejores propiedades que las que se obtienen por el método de descarga de arco [2, 3].

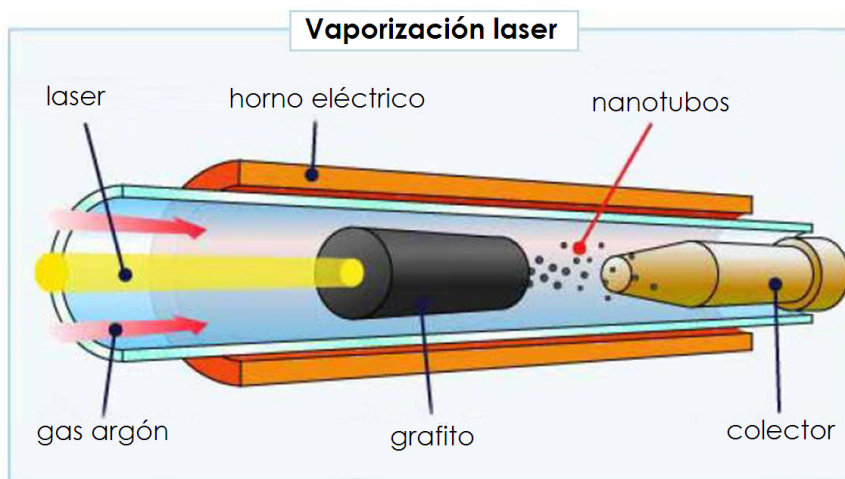


Figura 4. Esquema para método de síntesis por vaporización laser [3].

### 2.2.3. Método de vaporización por deposición química (CVD)

El método de vaporización por deposición química (CVD, por sus siglas en inglés) es otro método ampliamente utilizado para producir nanotubos de carbono a gran escala (normalmente SWNTs). La técnica se realiza al colocar una fuente de carbono en fase de gas [2,3]. Las fuentes de carbono pueden provenir al descomponer gas metano, monóxido de carbono y acetileno dentro de un horno (llenado normalmente con gas argón) a altas temperaturas; originándose

así, un carbono atómico reactivo (Figura 5). El carbono reactivo difunde a través del sustrato que puede estar formado por Ni, Fe o Co [1]. Los nanotubos de carbono se formarán si los parámetros adecuados se mantienen constantes, para lo cual se requiere de dos pasos importantes: 1) el primer paso es la preparación de la catálisis, la cual es crítica para la síntesis de los nanotubos respecto a sus diámetros, ya que el tamaño de los clústeres del sustrato definirá tal diámetro; 2) el siguiente paso es el establecimiento de la temperatura de tal sustrato, normalmente entre 500-1000°C [1, 3].

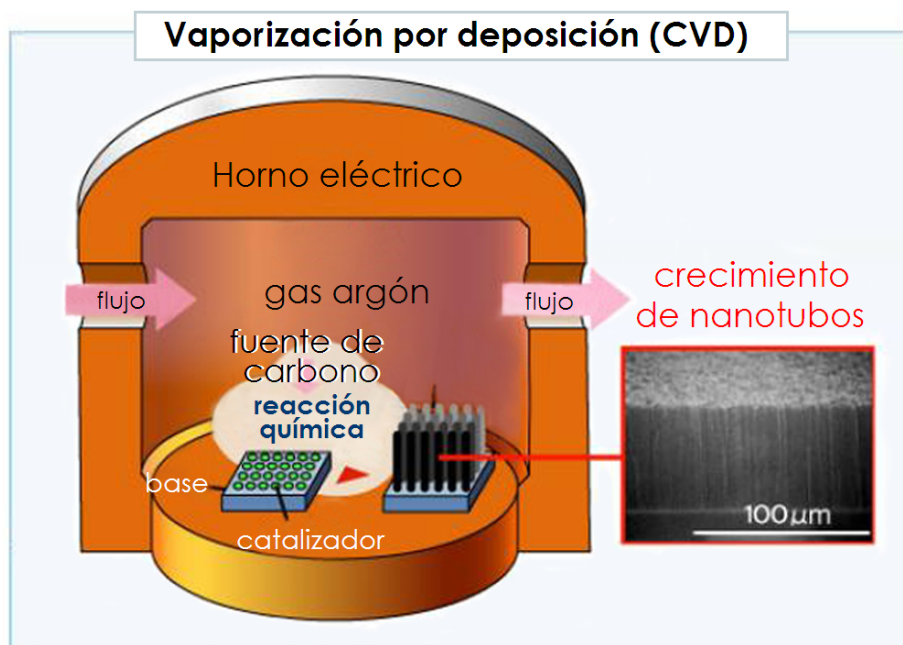


Figura 5. Esquema para el método de síntesis por vaporización por deposición química (CVD) [3].

Los SWNTs resultantes normalmente presentan un diámetro entre 1 y 3 nm; mientras que los MWNTs alrededor de 10 nm. La longitud obtenida es desde unas cuantas micras y puede llegar a unos cuantos milímetros [1]. Existen variantes para este método que se diferencian respecto a los parámetros empleados, la forma en la que se introducen al sistema las fuentes de carbono, o los componentes del catalizador que pueden mejorar la síntesis de los nanotubos.

Entre las principales variantes se encuentran: CVD por alcohol catalítico, CVD por fase de crecimiento en vapor, CVD aéreo con soporte en gel y CVD asistido por láser [1].

### 2.2.4. Método por descomposición catalítica

La descomposición catalítica de hidrocarburos es una técnica muy utilizada para sintetizar MWNTs. Este método fue de-



sarrollado para obtener una producción masiva y de alta calidad de MWNTs, de manera que su producción tuviera un bajo costo (Figura 6). El método requiere como fuente de carbono al benceno o al acetileno, los cuales se hacen pasar a través de un tubo de cuar-

zo, y normalmente se utiliza como catalizador al Fe. Por medio de este método no se produce carbono amorfo ni otras partículas de carbono; sin embargo la forma de los nanotubos resultantes no es recta y es más bien desalineada [9].

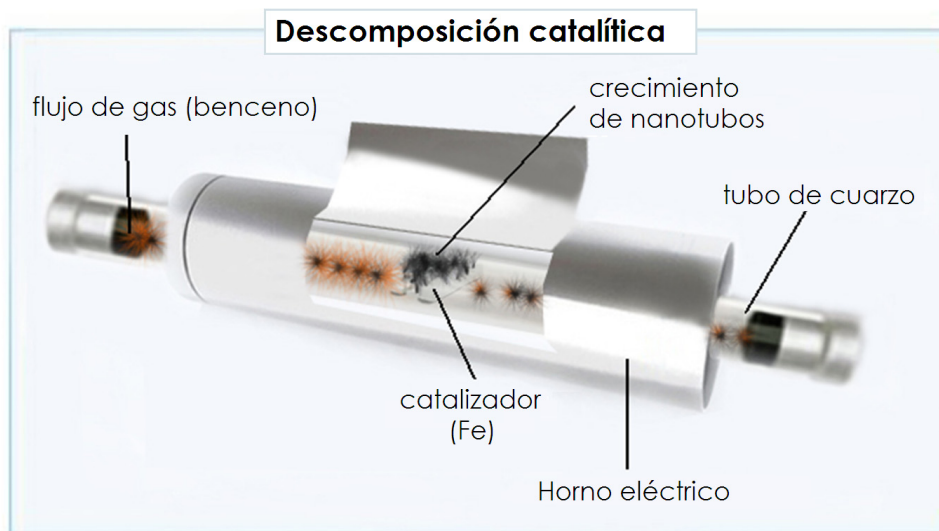


Figura 6. Esquema para método de síntesis por descomposición catalítica.

### 2.3. Purificación de nanotubos de carbono

La purificación de los nanotubos de carbono una vez que estos han sido sintetizados, consiste en procedimientos complejos de oxidación selectiva, tratamientos con sustancias químicas, centrifugaciones, filtraciones, etc. El objetivo principal es separar a los nanotubos de otras formas indeseables que son producidas durante la síntesis. Tales productos pueden ser: fullerenos, carbono

no amorfo y partículas metálicas. Éstos procesos permiten también separar a los nanotubos por tamaños e incluso separar a los SWNTs de los MWNTs [9,11].

#### 2.3.1. Métodos de purificación

La siguiente tabla resume los métodos de purificación existentes para nanotubos de carbono después de ser sintetizados [2, 9, 11,12].

<b>Tratamiento ácido</b>
El tratamiento con ácidos permite remover los metales utilizados como catalizadores, normalmente se utilizan ácidos como HNO <sub>3</sub> o HF. La ventaja es que normalmente los ácidos sólo afectan al catalizador, y en muy baja intensidad a los nanotubos de carbono.
<b>Tratamiento térmico</b>
Por medio de altas temperaturas (600°C - 1600°C) lo primero que se elimina es el carbono amorfo, posteriormente los nanotubos sufren el reordenamiento de sus átomos permitiendo disminuir los defectos sobre sus superficies.

<b>Ultrasonificación</b>
Con esta técnica, por medio de vibraciones las partículas de carbono son separadas y dispersadas; logrando así, eliminar los aglomerados y realizar una separación más eficiente.
<b>Purificación magnética</b>
Los nanotubos de carbono son mezclados con nanopartículas inorgánicas ( $ZrO_2$ o $CaCO_3$ ), formando una suspensión, los cuales se colocan en un baño ultrasónico para remover las partículas ferromagnéticas, obteniendo nanotubos con alta pureza.
<b>Microfiltración</b>
Consiste en la separación de los nanotubos y otras partículas de carbono de mayor tamaño que son atrapadas por un filtro, permitiendo solamente el paso de los metales catalizadores, fullerenos, y partículas de carbono de menor tamaño a través del filtro.
<b>Centrifugación</b>
El método se realiza a través de ultracentrifugas donde el material es separado de acuerdo al tamaño de las partículas. Incluso es posible la separación de los nanotubos de acuerdo a su longitud.
<b>Oxidación</b>
EL proceso se realiza para poder remover las impurezas los metales de la superficie de los nanotubos. Los nanotubos pueden verse afectados de manera no tan drástica, pero sí disminuyendo la calidad debida a la oxidación. La oxidación de los nanotubos se realiza a altas temperaturas, y la reacción se representa de la siguiente manera: $C+O_2 \rightarrow CO_2$ / $2C+O_2 \rightarrow 2CO$ .
<b>Cortado</b>
Consiste en técnicas químicas por medio de tratamiento con ácidos fuertes (tales como: $H_2SO_4$ y otras mezclas), lo que provoca la formación de defectos oxidados (CO, COOH, OH) que promueven un rompimiento fácil del nanotubo, o tratamientos mecánicos (por medio de molinos) que permiten que los nanotubos puedan separarse de la zona catalítica. Normalmente los nanotubos son cortados en las zonas donde existen defectos. Los dos métodos tanto el mecánico y el químico pueden ser combinados.
<b>Funcionalización</b>
Por medio de la funcionalización se puede adherir a la superficie de los nanotubos moléculas diferentes que los pueden hacer más solubles, de modo que es más fácil separarlos de las impurezas que los acompañan. Este método es de gran importancia para el presente estudio, y será explicado con mayor detalle más adelante (capítulo 3).
<b>Cromatografía</b>
Esta técnica es usada principalmente para separar pequeñas cantidades de SWNT en diferentes tamaños y diámetros. Los nanotubos se corren en un gel y en columnas de exclusión por tamaños, las cuales están formadas de un material poroso que permite la discriminación por tamaños. Este método se combina con ultrasonidos y funcionalización para obtener la disolución y dispersión de los nanotubos.

## 2.4. Configuración electrónica del átomo de carbono

Los materiales basados en carbono son únicos en muchos sentidos, principalmente por que los átomos de carbono que los constituyen presentan múltiples configuraciones de sus estados electrónicos, lo cual es conocido como hibridación de los orbita-

les atómicos del carbono [13]. El carbono es el sexto elemento de la tabla periódica, aparece al centro del segundo período, y está enlistado justo al principio de la familia IVB [13,14]. De acuerdo con su posición en el centro del período, el carbono sólo es estable cuando comparte electrones; sin embargo, a diferencia de otros elementos, para el carbono se aplica “la regla de Hund” para su

configuración electrónica. Por tal razón, el carbono no aparece con una configuración electrónica  $1s^2 2s^2 2p_x^2$  originada por el número de electrones presentes, ya que el sexto y último electrón debe encontrarse más alejado del quinto electrón, para que así la repulsión entre ambos sea menor y el sistema se encuentre en equilibrio.

La configuración electrónica del átomo de carbono contiene un orbital  $1s^2$ , el cual presenta 2 electrones con una unión muy fuerte. Estos dos electrones también son conocidos como los electrones centrales ya que están más ligados al núcleo. Por otro lado 4 electrones ocupan los orbitales  $2s^2 2p_x^2$ , los cuales poseen una unión más débil y son llamados electrones de valencia. En algunos casos, los electrones de valencia encontrados en el orbital "p" pueden dar lugar a orbitales  $p_x$ ,  $p_y$  y  $p_z$ , y son muy importantes en la formación de enlaces covalentes. La energía de los orbital  $2s$  en comparación al  $2p$  es mínima; sin embargo las ondas eléctricas de sus 4 electrones pueden sumarse y cambiar la ocupación de los orbitales  $2s$  y de los  $p_x$ ,  $p_y$  y  $p_z$ , para promover la unión química con otros átomos vecinos [15].

### 2.4.1. Hibridación $sp^3$

Cuando un orbital  $2s$  se une a tres orbitales  $2p$ , se originan 4 orbitales híbridos equivalentes  $sp^3$ . El ángulo entre los cuatro orbitales  $sp^3$  es aproximadamente de  $109.5^\circ$  formando un tetraedro (Figura 7).

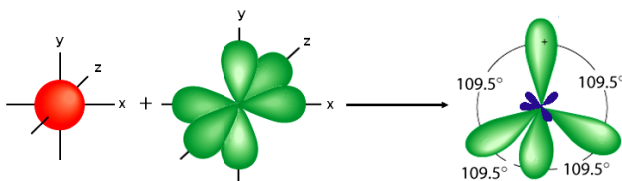


Figura 7. Formación de orbital  $sp^3$  [16].

Cuando átomos con hibridación  $sp^3$  se superponen para formar moléculas, lo hacen formando únicamente enlaces  $\sigma$  (enlace fuerte), ya sea entre átomos de carbono o con átomos de hidrógeno (como es el caso de los alcanos y el diamante), o formando moléculas con enlaces simples entre sus átomos (Figura 8) [15].

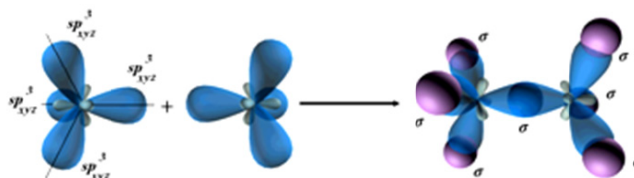


Figura 8. Formación de enlaces de etano ( $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ ) por hibridación  $sp^3$  [16].

### 2.4.2. Hibridación $sp^2$

La hibridación  $sp^2$  o trigonal (Figura 9), se origina cuando el orbital  $2s$  y 2 orbitales  $2p$ , originando tres orbitales híbridos equivalentes  $sp^2$  que son planos, dando como resultado un ángulo de  $120^\circ$  [15].

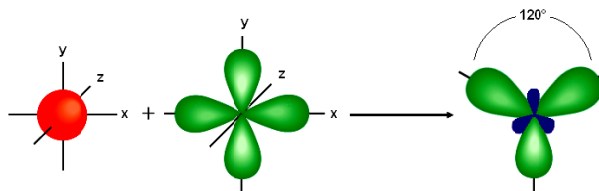


Figura 9. Formación de orbital  $sp^2$  [16].

En el caso de los alquenos o en las moléculas de carbono cíclicas como el grafito, los átomos de carbono presentan una hibridación  $sp^2$ . Uno de los tres orbitales híbridos de cada átomo de carbono se une junto con el otro formando un enlace  $\sigma$ , mientras que el orbital  $p_z$  que no está hibridado forma un enlace  $\pi$  (enlace débil) con el orbital  $p_z$  no hibridado de otro átomo de carbono, y se origina una molécula con doble enlace. Los otros dos orbitales híbridos  $sp^2$  (Figura 10) pueden unirse a moléculas de hidrógeno para formar enlaces  $\sigma$  (como en el

caso del etileno) o en todo caso, formar enlaces  $\sigma$  con otros átomos de carbono (como en el caso del grafito) [15,16].

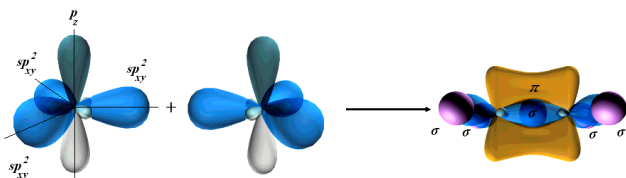


Figura 10. Formación de enlaces para etileno ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ) por hibridación  $sp^2$  [16].

### 2.4.3. Hibridación $sp$

La unión del orbital “s” y del orbital “p” es conocida como hibridación  $sp$ . Mientras que al combinar un único electrón del orbital  $2s$  con los “n” electrones del orbital  $2p$ , se denomina hibridación  $sp^n$ . En el carbono, existen 3 posibles hibridaciones:  $sp$ ,  $sp^2$  y  $sp^3$ ; lo que convierte al carbono en un elemento capaz de formar compuestos orgánicos fácilmente a diferencia de otros los elementos de la tabla periódica [13, 17]. La hibridación  $sp$  (Figura 6), es la combinación lineal de un orbital  $2s$  y un orbital  $2p$  puro, dando lugar a dos equivalentes denominados “orbitales  $sp$  híbridos”, los cuales consisten en 2 lóbulos, uno de los cuales tienen mucho mayor extensión en el espacio que el otro, y ambos se encuentran a  $180^\circ$  uno del otro [15].

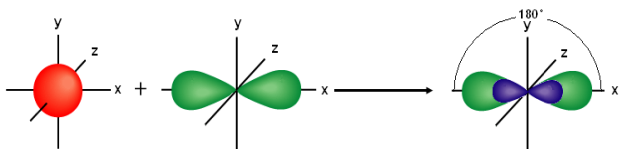


Figura 11. Formación de orbital  $sp$  [16].

Cuando dos átomos de carbono con orbitales híbridos  $sp_x$  se unen para formar una molécula, lo hacen a través de solapamientos de sus orbitales híbridos. Así, se forma un enlace  $\sigma$  entre ellos (quedando 4 átomos alineados en línea recta), y además

puede existir un segundo solapamiento entre sus orbitales  $p_y$  y  $p_z$  (no hibridados) cuyos ejes son perpendiculares entre sí, formando 2 enlaces  $\pi$ . Como resultado se obtiene una molécula con 3 enlaces covalentes. En el caso del acetileno ( $\text{H-C}\equiv\text{C-H}$ ) existe la formación de otros dos enlaces  $\sigma$  entre carbono e hidrógeno [15,16] (Figura 12).

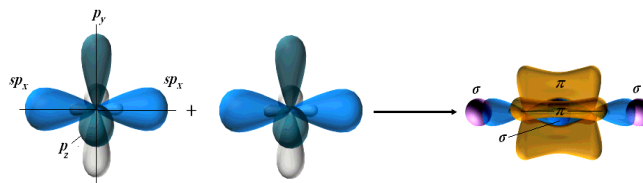


Figura 12. Formación de enlaces para acetileno ( $\text{CH}\equiv\text{CH}$ ) por hibridación  $sp$  [16].

## 2.5. Propiedades de los nanotubos de carbono

Los nanotubos presentan estructuras únicas que poseen extraordinarias propiedades, las cuales se originan a partir de los enlaces formados entre los átomos de carbono que componen su estructura y a partir de la simetría de su cilindro. Se sabe que los nanotubos de carbono también pueden ser metálicos o semiconductores, y a partir este descubrimiento se han realizado la mayoría de los trabajos teóricos a cerca de sus propiedades. En las últimas 3 décadas se han desarrollado poderosos métodos experimentales que han permitido comprobar muchas de las predicciones entorno a las propiedades de los nanotubos de carbono [7].

### 2.5.1. Propiedades electrónicas

Los nanotubos de carbono muestran una inusual combinación, al poseer diámetros de tamaños nanométricos y longitudes milimétricas. Tal topología combinada con la ideal ausencia de defectos sobre sus super-

ficies (muy difícil de conseguir), da lugar a singulares propiedades electrónicas en los SWNTs. Las propiedades electrónicas dependen del diámetro del nanotubo y la quiralidad que éstos presenten, lo que puede dar lugar a estructuras metálicas o semiconductoras [18]. Los nanotubos de carbono entonces pueden ser vistos como largos cables moleculares por los cuales los electrones se propagan libremente, como lo harían en un metal ordinario.

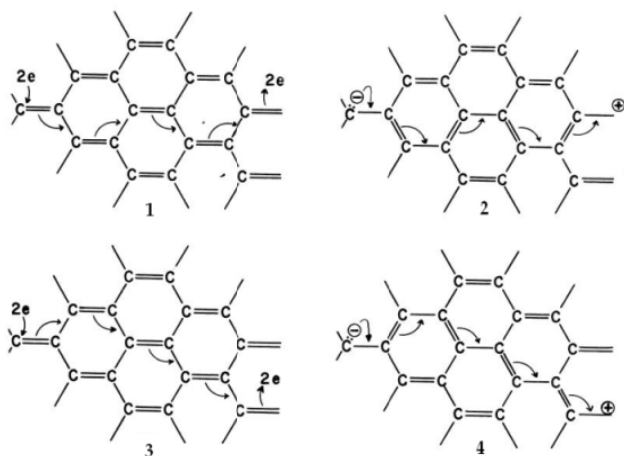


Figura 13. Transferencia de electrones a lo largo de la hoja de grafito [14].

Las propiedades electrónicas de un SWNT pueden ser entendidas a partir de la configuración electrónica de la hoja del grafito, la cual al enrollarse da origen a un SWNT

[13]. En el grafito, los átomos de carbono con hibridación  $sp^2$  se encuentran unidos covalentemente. La semiconductividad en el grafito (Figura 13) se debe a la transferencia de electrones a través de los átomos de carbono por un proceso de salto de electrones por estimulación. Así, los electrones corren a través de los orbitales  $\pi$  de los enlaces dobles y sencillos  $\sigma$  alternantes [14].

En el caso de los nanotubos de carbono, el cilindro formado a partir de la hoja de grafito también presenta un patrón hexagonal, que se repite periódicamente en el espacio. Como resultado de tal periodicidad, cada átomo de carbono está unido covalentemente a tres átomos de carbono vecinos que presentan una hibridación  $sp^2$ . Los enlaces  $\pi$  que se encuentran fuera del plano son enlaces muy débiles, y contribuyen a la interacción entre las capas de los nanotubos de carbono de pared múltiple, o a la formación de agregados “bundles” formados por la interacción entre la superficie de unos cuantos o varios nanotubos de carbono. A diferencia del grafito, las uniones  $sp^2$  en nanotubos no son “puras”, como consecuencia del proceso de enrollamiento de la hoja de grafito, se produce una rehibridación de los orbitales  $\sigma$  y  $\pi$  (Figura 14) cambiando el tamaño de sus lóbulos [19].

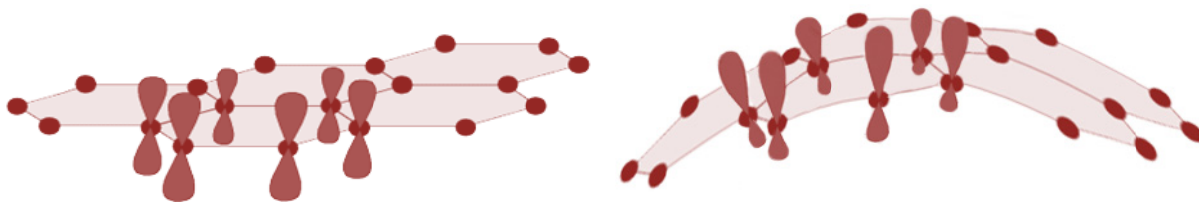


Figura 14. Rehibridación de orbitales  $sp^2$  como consecuencia del enrollamiento de la hoja del grafito durante la formación del nanotubo de carbono. ([http://www.fq.uh.cu/dpto/qi/nestor/enlace\\_web/descriptiva\\_final\\_web/Periodicidadlaminas/Grafito-Pi.gif](http://www.fq.uh.cu/dpto/qi/nestor/enlace_web/descriptiva_final_web/Periodicidadlaminas/Grafito-Pi.gif))



De acuerdo con las predicciones teóricas, un nanotubo de carbono perfecto debería ser un conductor balístico; es decir, cada electrón inyectado dentro de la pared del nanotubo debe entrar por un extremo y salir por el otro, viajando a través de eje del mismo (Figura 15). Sin embargo los conductores balísticos presentan un poco de resistencia independiente de su longitud [7].

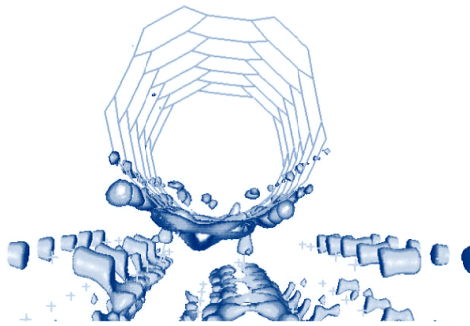


Figura 15. Flujo de electrones a través de las paredes de un SWNT.

Se esperaría encontrar un comportamiento de mayor complejidad para los MWNTs, debido a las interacciones adyacentes entre sus capas, las cuales parecen tener un comportamiento individual metálico o semiconductor, dependiente de su geometría [20]. No obstante, se ha visto que los MWNTs tienen conductancia similar a los SWNTs, y una resistencia dependiente de su longitud [18]. Lo que parece indicar que los MWNTs podrían ser buenos conductores balísticos en menor magnitud que los SWNTs.

En adición los defectos estructurales, pueden afectar el transporte de electrones en los nanotubos de carbono. Experimentos de magnetotransporte han indicado que la corriente eléctrica en los MWNTs parece fluir principalmente en las capas más externas del tubo. Sin embargo puede existir un comportamiento complejo, especialmente cuando la corriente eléctrica es transportada

desde una capa externa hacia una capa más interna [20, 21].

### 2.5.1.1. Determinación de la conductividad eléctrica de un nanotubo de carbono

Un nanotubo con quiralidad tipo zigzag ( $n, 0$ ) posee 2 diferentes tipos de comportamiento. Estos nanotubos serán metálicos cuando  $(n/3)$  es un número entero, y de otro modo serán semiconductores. Nanotubos con simetría quiral ( $n \neq m$ ) tendrán propiedades metálicas si  $(2n+m / 3)$  es igual a un número entero; de lo contrario serán semiconductores. Para los nanotubos con quiralidad armchair ( $n=m$ ) se espera siempre un comportamiento como verdaderos conductores (Figura 16). Se ha visto que los SWNTs sintetizados por los métodos de descarga de arco y vaporización por laser, consisten predominantemente en nanotubos de carbono metálicos con quiralidad  $(10, 10)$  [22]. Parece ser que al aumentar el diámetro de un nanotubo su conductividad también se ve incrementada [13].

### 2.5.2. Propiedades mecánicas

En los nanotubos de carbono como consecuencia a la formación del enlace  $\sigma$  entre los carbonos que componen la red hexagonal, se obtiene el reforzamiento contra el daño físico; así mismo estos enlaces permiten que el nanotubo posea una rigidez muy similar a la del diamante, ya que el enlace  $\sigma$  formado tras la hibridación  $sp^2$  es un enlace altamente energético y muy resistente (Figura 17) [19,23]. Muchas simulaciones que se han realizado en torno a las propiedades de los nanotubos de carbono, han predicho sus propiedades de torsión, compresión, doblamiento y elasticidad en los nanotubos de carbono [7].

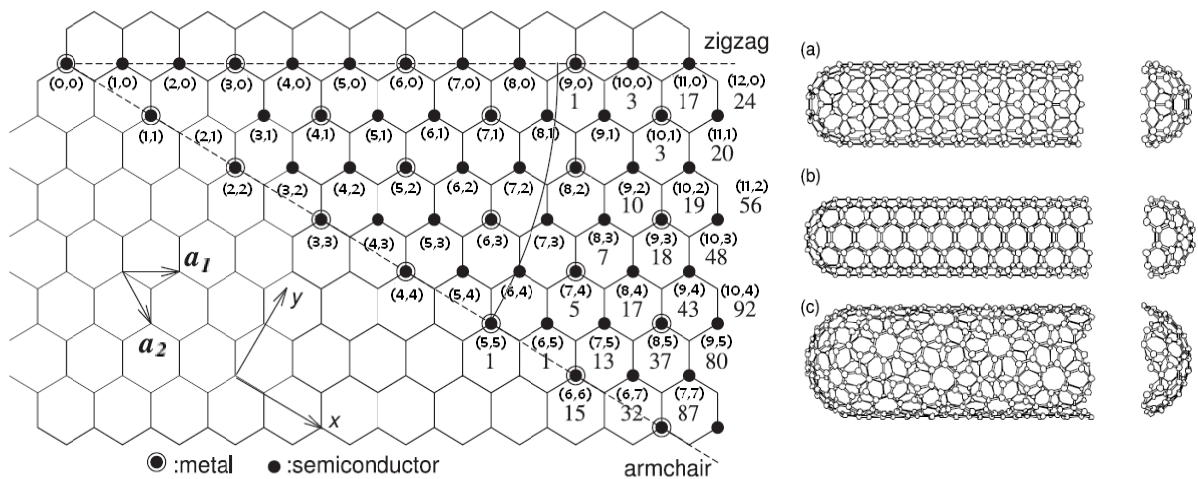


Figura 16. Vectores específicos por índices de quiralidad  $(n, m)$  en general para nanotubos de carbono, incluyendo nanotubos de tipo zigzag, armchair y quirales (2,18). Los puntos que se encuentran dentro de un círculo representan nanotubos de carbono metálicos o conductores y los puntos negros representan nanotubos de carbono semiconductores. Los nanotubos que se muestran en la imagen corresponden a nanotubos con índices de quiralidad siguientes: a) nanotubo zigzag (9,0); b) nanotubo armchair (5,5) y c) nanotubo quiral con valores de (10,5) [9,24].

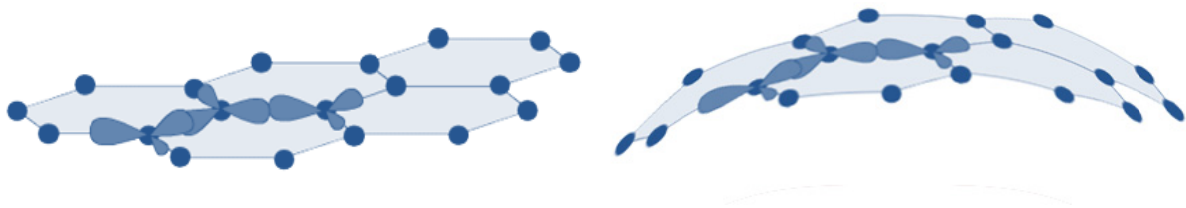


Figura 17. Enrollamiento de la hoja del grafito durante la formación del nanotubo de carbono. Se muestran los enlaces  $\sigma$  altamente energéticos. ([http://www.fq.uh.cu/dpto/qi/nelson/enlace\\_web/descriptiva\\_final\\_web/Periodicidadlaminas/Grafito-Pi.gif](http://www.fq.uh.cu/dpto/qi/nelson/enlace_web/descriptiva_final_web/Periodicidadlaminas/Grafito-Pi.gif)).

### 2.5.2.1. Elasticidad

Algunos experimentos han demostrado que los SWNTs pueden ser doblados o comprimidos a lo largo de su eje sin causar daño sobre su superficie. El efecto que ocurre cuando un nanotubo es comprimido a lo largo de su eje es denominando como “com-

presión axial”. Inicialmente el nanotubo permanece derecho mientras la compresión aumenta hasta curvarse; una vez que se retira esta fuerza de compresión, el nanotubo regresa a su estado original, indicando que la deformación puede ser reversible al realizarla en diferentes ángulos perpendiculares al eje del tubo (Figura 18) [23, 25].

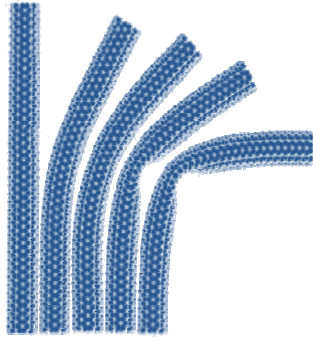


Figura 18. Compresión axial de un SWNT [8].

Observaciones experimentales en HRTEM, han demostrado las propiedades elásticas de los nanotubos (Figura 19) [7, 26]. Al mismo tiempo por medio de estas observaciones, se han dado explicaciones en torno a la reducción de la conductividad de estos materiales, debido a la formación de largos ángulos de doblamiento que distorsionan su superficie y que causan la rehibridación de los orbitales en los átomos de carbono [27,28].

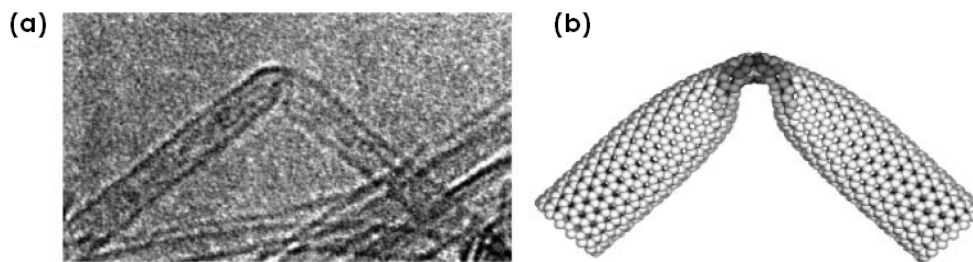


Figura 19. (a) Imagen por HRTEM de una nanotubo de carbono de pared sencilla con diámetros aproximados de 0.8 and 1.2 nm, en la imagen se puede observar el nanotubo doblado por la influencia de una fuerza mecánica. (b) Estructura atómica simulada para un nanotubo de carbono con diámetros mayores a 1.2 nm [26].

Una medida de la fuerza de elasticidad es conocida como “módulos de Young”, los cuales están determinados por los enlaces entre carbonos. Esta medida fue calculada por Treacy y colaboradores [29]. Ellos colocaron nanotubos de carbono en forma vertical sobre una superficie donde fueron sujetos firmemente de la base y dejaron los extremos libres al movimiento. Después, con ayuda del microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), calcularon las vibraciones térmicas de tales extremos; descubriendo así que tanto los SWNTs y los MWNTs presentaban valores de elasticidad muy altos de hasta 10 veces mayores que el acero [30].

Por otro lado Salvetat y colaboradores, colocaron por encima de una superficie con “nanoporos” nanotubos de carbono, y

utilizando un microscopio TEM lograron doblarlos por la mitad; de este modo pudieron calcular su deflexión. La cual es inversamente proporcional a los valores obtenidos para los módulos de Young [7] (Figura 20).

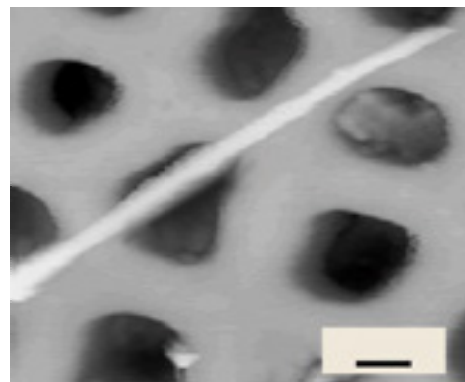


Figura 20. Imágenes obtenidas por microscopía TEM de un nanoporo, sobre el mismo se localiza un nanotubo que ha sido doblado [7].



El mismo equipo de investigación, descubrió que los MWNTs que eran sintetizados por el método de descarga de arco, presentaban valores para módulos de Young muy altos. Mientras que aquellos MWNTs sintetizados por el método de descomposición catalítica, presentaban valores de módulos de Young mucho más bajos. Tales resultados demostraron que únicamente los nanotubos que han sido perfectamente grafitezados durante su síntesis (es decir que presentan menor cantidad de defectos sobre su superficie), presentan una rigidez comparable a la del grafito. Mientras que aquellos que fueron sintetizados por el método de descomposición catalítica, presentan muchos defectos sobre su superficie [7].

### 2.5.2.2. Tensión

Experimentos realizados por Louis y colaboradores, demuestran que al sujetar los extremos de un MWNT a través de un par de puntas, y estirándolo hasta romperlo, la fuerza de tensión era mucho menor en comparación a la de un SWNT. Ellos esperaban que la tensión se distribuyera uniformemente entre las capas del MWNT; sin embargo las capas más externas presentaban mayor tensión cuando las puntas hacían contacto con

las mismas. Al romperse esta capa, la tensión era transmitida hacia las siguientes capas (más internas) provocando así su ruptura [7].

### 2.5.3. Propiedades térmicas y ópticas

Se ha observado que los nanotubos de carbono son buenos conductores térmicos en dirección al eje del tubo [11]. Investigaciones han revelado que la conductividad térmica es inversamente proporcional al diámetro de sus cilindros, y directamente proporcional a la cantidad de defectos que se encuentren sobre su superficie [32].

Por su parte, otros estudios han revelado que la actividad óptica de los SWNTs disminuye al aumentar su longitud. Tales estudios también parecen indicar que tal actividad difiere dependiendo si estos son metálicos o semiconductores [31]. Estas diferencias relacionadas con su geometría, promueven la emisión de fotones en diferentes longitudes de onda, lo que permite que un nanotubo posea propiedades fluorescentes y una excelente fotoestabilidad. Por lo anterior, los nanotubos se han propuesto como candidatos para la producción de dispositivos ópticos, sensores y biosensores ópticos [2, 33] (Apéndice A, B).

---

## Referencias

[1] Liu, X. (2006): *Synthesis, Devices and Applications of Carbon Nanotubes*. Tesis. Universidad del sur de California. 130pp

[2] Daenen, M. J. M.; Fouw, R.; Hamers, B.; Jansen, P. G. A.; Schouteden, K.; Veld. M. A. J. (2003): *Multi Disciplinair Project: Wondrous World of Carbon Nanotubes*. (<http://students.chem.tue.nl/ifp03>).

[3] Kageyama, T. (2007): Manipulating carbon nanotubes (カーボンナノチューブのマニピュレーション).

ヨシ). Tesis. Universidad Tecnológica de Kouchi, Japón; 17 pp.

[4] Balasubramanian, K.; Burghard M. (2005): Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *Small*; 1:180–192.

[5] Basiuk, E. V.; Monrroy-Peláez, Marel.; Puente-Lee, I.; Basiuk, V. A. (2004): Direct Solvent-Free Amination of Closed-Cap Carbon Nanotubes: A Link to Fullerene Chemistry. *Nano Letters*; 4:863-866.

[6] Charlier, J.-C. (2002): Defects in Carbon Nanotubes. *Accounts of Chemical Research*; 35:1063 - 1069.

- [7] **Schönenberger, C. (2000):** Multiwall Carbon Nanotubes. *Physics World*. (<http://physicsworld.com/cws/article/print/606>).
- [8] **Houliester, P.; Harper T. E.; Vas Román, C. (2003):** *Nanotubes White paper*. (ed.) CMP Científica. (<http://nanoparticles.org/pdf/nanotubes.pdf>).
- [9] **Dresselhaus G., Dresselhaus, M. S.; Avouris, P. (2001):** *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*. (ed.) Springer Berlin-Heidelberg, Berlin;80:142 pp.
- [10] **Tanaka, K.; Yamabe T.; Fukui K. (1999):** *The science and technology of carbon nanotubes*. (ed.) Elsevier, Londres; 191pp.
- [11] **Alcaa-Quispe, F. (2005):** *Estructura y síntesis de nanotubos de carbono*. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 37pp.
- [12] **Feng, Q.-P.; Xie, X.-M.; Liu, Y.T.; Gao, Y.-F.; Wang X.-H.; Ye X.-Y. (2007):** Length sorting of multi-walled carbon nanotubes by high-speed centrifugation. *Carbon*; 45:2311-2313.
- [13] **Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R. (1998):** *Physical properties of carbon nanotubes*. (ed.) Imperial College Press. Londres; 276 pp.
- [14] **Smith, L. O.; Cristol, S.J. (1970):** *Química Orgánica*. (ed.) Retiré Mexicana. México; 990 pp.
- [15] **Ander, P.; Sonnessa, J.A. (2000):** *Principles of Chemistry*. (ed.) The Macmillan Company. California; 845 pp.
- [16] **Web de estudio interactivo de química orgánica:** ([http://rabfis15.uco.es/weiqo/Tutorial\\_weiqo/](http://rabfis15.uco.es/weiqo/Tutorial_weiqo/)).
- [17] **Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Sughara, K.; Spain, I. L.; Goldberg, H. A. (1988):** Graphite fibers and filaments (ed.) Springer-Verlag, Berlin; 5:382 pp.
- [18] **Kwon, Y.-K.; Toma'nek, D. (1998):** Electronic and structural properties of multiwall carbon nanotubes. *Physical Review B*; 58:R1600/1-R1600/4.
- [19] **Rodney, S. R.; Dong Q.; Wing K. L. (2003):** Mechanical properties of carbon nanotubes theoretical predictions. *Le Centre de Ressources Physique*; 4:993-1008.
- [20] **Zettl, A.; Cumings, J. (2001):** Electromechanical Properties of Multiwall Carbon Nanotubes. In: *Nanonetwork Materials: Fullerenes, Nanotubes, and Related Systems (AIP Conference 590, American Institute of Physics)*; 107-111.
- [21] **Cumings, J.; Collins P. G.; Zettl, A. (2000):** Peeling and sharpening multiwall nanotubes. *Nature*; 406: 586.
- [22] **Odom, T. W.; Huang, J.-L.; Kim P.; Lieber, C. M. (1997):** Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes. *Nature*; 391: 62-64.
- [23] **Cherian, R.; Mahadevan P. (2006):** Elastic Properties of Carbon Nanotubes: An atomistic approach. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*; 7: 1779-1782.
- [24] **Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R. (1995):** Physics of carbon nanotubes. *Carbon*; 33: 883–891.
- [25] **Hornbaker, D. J. (2003):** *Electronic Structure of Carbon Nanotube Systems Measured with scanning Tunneling Microscopy*. Tesis. Universidad de Illinois, Illinois;103 pp.
- [26] **Bernholc, J.; Brenner, D.; Nardelli., M. B.; Meunier, V.; Roland C. (2002):** Mechanical and Electrical properties of Nanotubes. *Annual Review of Materials Research*; 32:247-375.
- [27] **Tombler, TW.; Zhou, C.; Alexseyev, L.; Kong, J.; Dai, H.; Lei, L.; Jyanthi, C. S.; Tang M.; Wu, S.-Y. (2000):** Reversible electromechanical characteristics of carbon nanotubes under local-probe manipulation. *Nature*; 405:769-772.
- [28] **Maiti, A. (2000):** Mechanical deformation in carbon nanotubes – bent tubes vs. tubes pushed by atomically sharp tips. *Chemical Physics Letters*; 331: 21-25.
- [29] **Krishnan, A.; Dujardin, E.; Ebbesen, T. W.; Yianilos, P. N.; Treacy, M. J. (1998):** Young's modulus of single-walled nanotubes. *Physical Review B*; 58:14013-14019.
- [30] **Treacy, M. J.; Ebbesen, T. W.; Gibson, J. M.(1996):** Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature*; 381: 678–680.
- [31] **Kataura, H.; Kumazawa, Y.; Maniwa, Y.; Umez, I.; Suzuki, S.; Otsuka, Y.; Achiba, Y. (1999):** Optical Properties of Single-Walled Nanotubes. *Synthetic Metals*; 103:2555-2558.
- [32] **Llaguno, M.C.; Hone, J.; Johnson, A.T.; Fischer, J.E. (2001):** Thermal Conductivity of Single Wall Carbon Nanotubes: Diameter and Annealing Dependence. In: *Nanotubes IV: Thermal Properties, (AIP Conference W20.004, Washington State Convention Center)*. (<http://arxiv.org/ftp/cond-mat/papers/01-08/0108142.pdf>).
- [33] **Ziegler, K.J. (2005):** Developing implantable optical biosensors. *Trends in Biotechnology*; 23: 440-444.

# CAPÍTULO

## 3

### Funcionalización y caracterización de nanotubos de carbono

#### 3.1. Funcionalización de nanotubos de carbono

En general los nanotubos de carbono poseen una baja solubilidad que limita su procesamiento; sin embargo, una de las formas de incrementar su solubilidad y su dispersión es a través de su modificación química, o a través de su funcionalización [1]. Tal y como se ha descrito anteriormente (Capítulo 1), un nanotubo de carbono ideal posee 2 regiones básicas (un cilindro que tiene la estructura hexagonal del grafito y 2 extremos cerrados con la estructura de semiesferas de fullereno  $C_{60}$ ), las cuales pueden sufrir cambios en su composición, constitución o en su configuración; lo que los hace mucho más reactivos. Tal reactividad permite que los nanotubos de carbono puedan tener interacciones covalentes o no covalentes con otras moléculas [2].

La reactividad que los extremos cerrados presentan, es debida a la presencia de las unidades de piracileno (Figura 1) que producen una curvatura convexa, aumentando la tensión superficial entre los enlaces de carbono. En el caso de la estructura cilíndrica, dependiendo del diámetro que ésta posea, y qué tan pronunciada sea la misma, la relativa reactividad puede aumentar. La reactividad en las paredes casi siempre es

mucho menor a la que se presenta en los extremos cerrados, por lo que para aumentarla es necesario que existan defectos en la superficie del nanotubo; tales como defectos pentagonales que provocan la formación de una superficie convexa en el sitio en el que se encuentran [1,3,4].

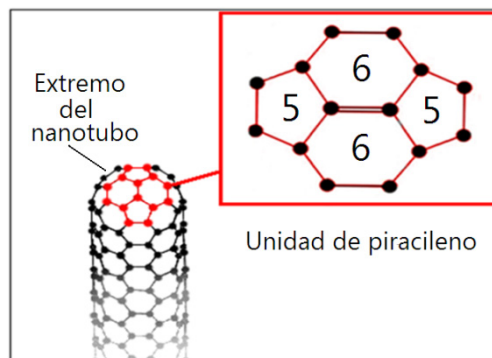


Figura 1. Unidad de piracileno

En general las reacciones de adición se realizan al romper los enlaces dobles parciales entre los átomos de carbono. Al romperlos se produce un evento de rehibridación de orbitales  $sp^2$  a una hibridación  $sp^3$ , lo que implica una serie de cambios conformacionales geométricos de tipo trigonales a geometrías de tipo tetrahédrico. Este proceso es energéticamente más favorable en la zona de alta curvatura de los extremos cerrados que en la zona de baja curvatura en la superficie del cilindro [3].

Cuando se efectúa un cambio en la naturaleza química de un nanotubo de carbono, se emplea el término “modificación química”. El término “funcionalización” es usualmente empleado cuando la interacción requiere de la introducción de grupos funcionales o grupos químicamente reactivos respecto al nanotubo de carbono. El término derivatización, es la formación de derivados

químicos a partir de los grupos funcionales previamente introducidos a un nanotubo. Tanto la modificación química como la funcionalización pueden realizarse por medio de interacciones covalentes y no covalentes, dando origen a nanoestructuras híbridas con diferentes propiedades químicas (Figura 2) [1].

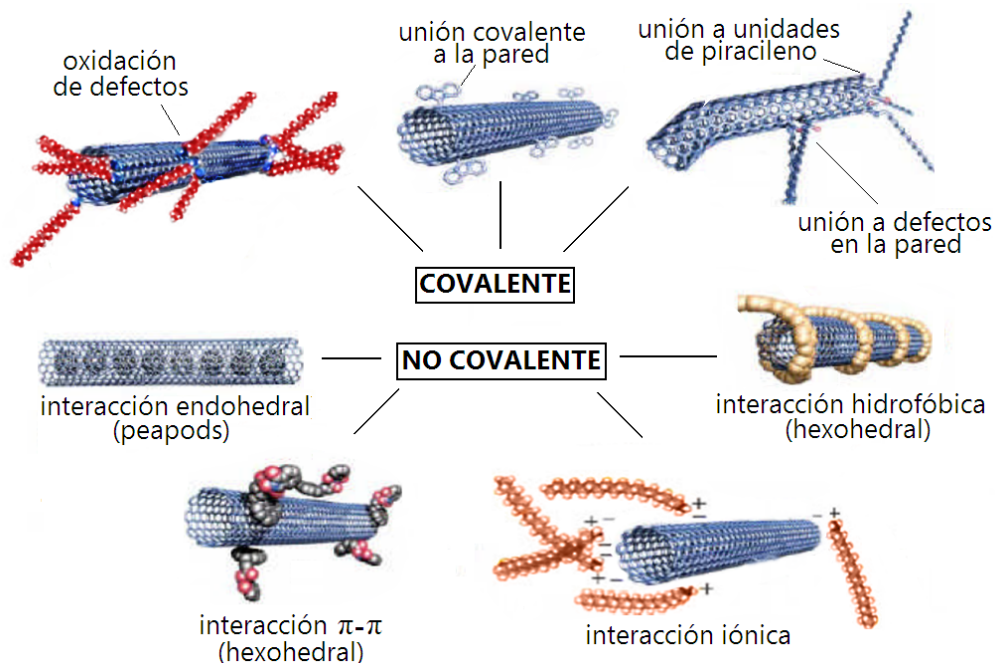


Figura 2. Esquema general para los tipos de modificación química para los nanotubos de carbono. <http://www.etudes.ecp.fr/option-pa/seminaires/nanotubeJPBourgoinECP12007.pdf>

Muchas de las aplicaciones de los nanotubos, requieren funcionalizaciones de tipo covalente, por lo que se ha intentado desarrollar técnicas eficientes en las cuales se aplica: (a) funcionalización covalente de los defectos oxidados y (b) la funcionalización covalente por medio de la química de los fullerenos y de la hoja del grafito [2]. El primer grupo de reacciones (a) requiere de tratamientos oxidativos (frecuentemente a través de ácidos inorgánicos fuertes como:  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  y sus mezclas), los cuales producen principalmente grupos carboxilos en la superficie de los nanotubos de carbono.

Las reacciones de funcionalización covalente (b) emplean los sitios activos encontrados sobre la superficie del nanotubo para llevar a cabo la funcionalización o alternativamente pueden hacer uso de la química del grafito y reactantes activos como el flúor [1].

### 3.1.1. Metodo de funcionalización covalente por defectos oxidados

Este método requiere generalmente de tratamientos ultrasónicos de una mezcla de ácidos nítricos o sulfúricos, propiciando condiciones sumamente drásticas. Tales

promueven la apertura de los extremos cerrados en los nanotubos, así como la formación de agujeros sobre la superficie de sus paredes, y la formación de grupos carboxilos en las terminaciones abiertas o cerca de los agujeros ya formados [3].

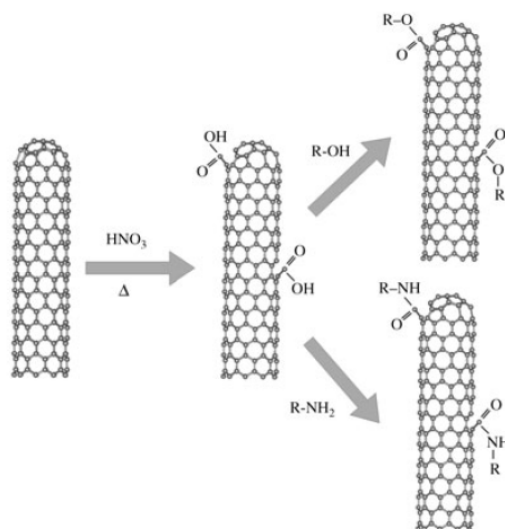


Figura 3. Esquema para funcionalización de los defectos oxidados [3].

Dependiendo de las condiciones de la reacción de oxidación, se puede obtener fragmentos de nanotubos de carbono de aproximadamente 100 y 300 nm de largo, cuyos extremos y paredes están decoradas con grupos funcionales oxigenados (principalmente grupos carboxilos) (Figura 3). Los nanotubos obtenidos no pierden del todo sus propiedades electrónicas y mecánicas, aunque sus superficies se ven drásticamente dañadas [3].

La presencia de grupos carboxilos sobre la superficie de un nanotubo, permite la reducción de las interacciones Van der Waals cuando estos están en arreglos de conglomerados, facilitando su separación en nanotubos individuales. Por otro lado, la funcionalización por oxidación también permite el aumento de la solubilidad de los nanotubos en disolventes polares. Los nanotubos de carbono funcionalizados con grupos carboxilos se pueden emplear para la

obtención de diversos derivados. Para ello los nanotubos de carbono se hacen reaccionar con compuestos activadores de grupos carboxilos (cloruro de tionilo,  $\text{SOCl}_2$  que es muy tóxico y corrosivo), promoviendo la formación de grupos cloroanhídridos, que a su vez se condensan con aminas o alcoholes y producen derivados de amidas y éteres.

Todas las reacciones que se utilizan para este tipo de funcionalización son usualmente realizadas con disolventes orgánicos, y es muy difícil realizar los lavados, las centrifugaciones, y los secados necesarios para eliminar residuos, ya que éstos pueden afectar las propiedades de los productos obtenidos [2].

### 3.1.2. Métodos de funcionalización libres de solvente

La tendencia por la búsqueda de técnicas mucho más “amigables” o “ecológicas”, que eviten el consumo de solventes orgánicos para realizar la funcionalización de los nanotubos de carbono, ha venido incrementado. Tales técnicas permiten una funcionalización covalente mucho más “limpia” al emplear únicamente los reactivos necesarios para la funcionalización [5].

Algunos ejemplos de estas técnicas pueden ser las reacciones por adición, como el caso de la fluorinación, la funcionalización por medio de sales de diazonium, anilina, y la aminación por ataque nucleofílico (sobre los defectos encontrados en los extremos cerrados y en las paredes de los nanotubo) con vapores de aminas alifáticas [5,2].

Existen otros tipos de funcionalización que también evitan el uso de disolventes orgánicos: la funcionalización fotoquímica, la funcionalización electroquímica, la funcionalización mecanoquímica, y la funcionalización por ultrasonificación [3,6].



Mientras las reacciones de oxidación influyen extremadamente sobre las propiedades de los nanotubos de carbono, las reacciones libres de solventes promueven la adición directa de grupos funcionales sobre la superficie del nanotubo de carbono sin causarle daños drásticos [3]. La funcionalización en fase de gas libre de solventes para aminación, amidación y tiolización, se realiza normalmente a través de la activación térmica [7]. Sin embargo el mecanismo por el cual se adhieren las moléculas sobre la superficie de los nanotubos es muy poco comprendido. En un principio la reacción de adición puede ser iniciada sobre los sitios activos (enlaces 6,6, pentágonos) donde la reacción pueda llevarse a cabo [3].

### 3.1.2.1. Funcionalización por fluorinación

La fluorinación es una reacción de adición directa de  $F_2$  a las paredes de los nanotubos de carbono (Figura 4). Tal reacción requiere de elevadas temperaturas ( $T > 150^\circ C$ ) [3] donde los nanotubos son tratados con un gas de  $F_2$ , el cual es muy reactivo. En etapas tempranas de la fluorinación la reacción es de tipo selectiva, los nanotubos que presentan menor diámetro (SWNTs) van a reaccionar mucho antes que aquellos que presentan un diámetro mayor (MWNTs).

Esta técnica aumenta la solubilidad de los nanotubos en muchos solventes orgánicos (dimetilformamida, tetrahidrofurano y alcoholes) [2]. Los átomos de flúor unidos covalentemente a los nanotubos de carbono pueden ser reemplazados a través de reacciones de sustitución nucleofílica con relativa facilidad, adhiriendo diferentes moléculas orgánicas sobre la superficie del nanotubo.

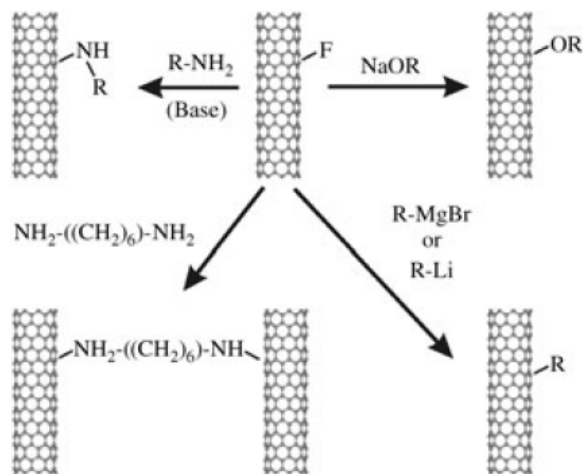


Figura 4. Funcionalización por fluorinación [3].

### 3.1.2.2. Funcionalización con especies de aril diazonium

Especies reactivas de aril diazonium pueden ser generadas a partir de anilinas sustituibles ( $R-C_6H_4-NH_2$ , donde  $R = Cl, Br, CO_2CH_3, NO_2$ , etc.), adhiriendo isoamil nitrito o nitrito de sodio en  $H_2SO_4$  o ácido acético. El isoamil nitrito, el  $H_2SO_4$ , y el ácido acético son líquidos que pueden servir como medios reactivos sin la necesidad de utilizar solventes orgánicos comunes. Antes de la reacción es necesario separar parcialmente los nanotubos de los conglomerados que se han formado. La reacción se realiza dentro de un frasco equipado con un condensador de reflujo y un agitador magnético (Figura 5); los SWNTs obtenidos presentan una mayor solubilidad.

También los MWNTs pueden ser funcionalizados con esta técnica; sin embargo se obtiene un nivel de funcionalización muy bajo que el encontrado en SWNTs. Se piensa que esto se debe a que los MWNTs presentan un diámetro externo y una longitud mucho mayor, lo que provoca que éstos sean menos reactivos que los SWNTs más de menor tamaño. También se cree que la estructura concéntrica de los MWNTs evita



el acceso a las paredes durante la reacción [2,8].

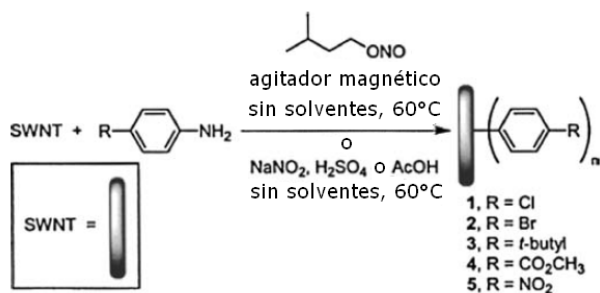


Figura 5. Funcionalización con especies de aril diazonium [8].

### 3.1.2.3. Funcionalización electroquímica

Una forma elegante de funcionalizar a los nanotubos es a través técnicas electroquímicas. Estas técnicas permiten un óptimo control de la reacción durante la funcionalización. Una corriente constante es aplicada a los nanotubos de carbono que se encuentran inmersos en una solución que contiene los reactivos necesarios para su funcionalización. Como resultado de la transferencia de electrones a través del nanotubo, se originan especies reactivas (radicales), las cuales tienden a reaccionar con los reactivos o a autopolimerizarse, dando origen a un polímero que cubre la superficie de los nanotubos de carbono. Dependiendo del reactivo empleado las capas poliméricas sobre el nanotubo podrán o no unirse de manera covalente a la superficie de los mismos. La técnica permite manipular de una manera fácil, limpia y eficiente las condiciones de la reacción, tales como la duración y la magnitud de la reacción [3].

### 3.1.2.4. Funcionalización fotoquímica

En contraste a las diferentes rutas de funcionalización química basadas en activación térmica o electroquímica, la funcio-

nalización fotoquímica se ha empleado mucho menos, por lo que no se conoce mucho acerca de esta técnica. Los nanotubos son fotoirradiados para producir especies reactivas como nitrenos durante las reacciones de adición. En el caso de la fotoactivación de nitrenos se emplean exclusivamente compuestos precursores a este que contienen  $N_3$ . La técnica ha sido únicamente realizada para los SWNTs metálicos, y se ha visto que al exponerlos a  $OsO_4$  bajo la irradiación de luz UV (Figura 6), incrementándose la resistencia eléctrica durante el ataque nucleofílico a los dobles enlaces parciales entre carbonos [3].

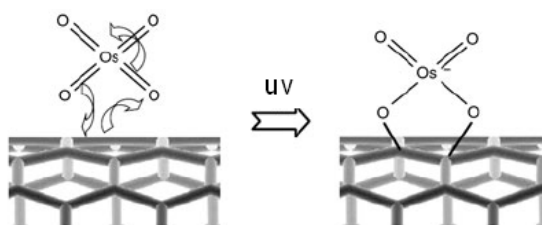


Figura 6. Funcionalización fotoquímica [3].

### 3.1.2.5. Funcionalización mecanoquímica

Un método alternativo a los anteriores fue empleado a gran escala para MWNT, uniéndolos a grupos funcionales como tioles, aminas, amidas, grupos carbonilos, etc. Esta técnica consiste en generar presión sobre la superficie de los nanotubos, formando especies reactivas que permitan causar las reacciones necesarias para llevar a cabo la funcionalización. Normalmente se emplean 2 métodos para tal propósito: 1) utilizando un mortero que contiene a los nanotubos y haciendo presión con una esfera de ágata, y 2) utilizando un mortero metálico que contiene varias esferas metálicas que producen presión, el mortero metálico puede ser manipulado con calor para apresurar la reacción [2,6].

### 3.1.2.6. Funcionalización por ultrasonificación

La ultrasonificación es principalmente utilizada para disolver y dispersar eficientemente los nanotubos dentro de un disolvente. Así, es posible preparar los nanotubos para posteriores observaciones al microscopio o para facilitar su manejo. Sin embargo, durante el proceso siempre se induce una reacción química incontrolable sobre los nanotubos de carbono. Es por eso que exposiciones por largo tiempo (más de 10 minutos) generalmente no son recomendadas [6].

### 3.1.2.7. Funcionalización en fase de gas

El ejemplo más conocido de funcionalización de nanotubos en fase de gas es el método de fluorinación descrito anteriormente, aunque también existen ejemplos donde se emplean compuestos orgánicos relativamente volátiles como aminas y tioles. Existe una gran cantidad de reactivos no volátiles con los que es posible llevar a cabo la reacción, siempre y cuando se realice a bajas presiones constantes y elevadas temperaturas (arriba de los 100°C); formándose así una fase gaseosa del reactivo que cubre la superficie del nanomaterial. Este método fue desarrollado inicialmente para la funcionalización de superficies de sílica, y más tarde se realizó sobre la superficie de fullereno C<sub>60</sub> y de nanotubos de carbono, donde diferentes grupos químicos fueron empleados (aminas, tioles, aminoácidos, etc.) [1,4,5,9,10].

Basiuk y colaboradores, a través de una serie de cálculos y predicciones, determinaron cuáles son sitios preferenciales donde es posible realizar la adición de diferentes moléculas (principalmente aminas) sobre la superficie los nanotubos de carbono sin necesidad de emplear métodos de oxidación previos a las reacciones de adición.

Los cálculos realizados, determinaron que: a) la presencia de unidades de piracileno en los extremos cerrados no es crucial durante la adición de los grupos amino; b) la reacción sitio-específica depende de la posición en la que se encuentren los anillos pentagonales, si los extremos cerrados contienen unidades de piracileno (Figura 1), la adición se realiza preferencialmente entre los enlaces 6,6 de los anillos hexagonales, y si no es así, los sitios preferenciales serán las uniones entre carbonos pertenecientes a los anillos pentagonales; c) en cualquier evento de funcionalización los nanotubos de carbono cuya superficie se encuentre exenta de defectos pentagonales, éstos serán relativamente inertes a las reacciones de adición; d) la inducción y la presencia de defectos (pentagonales, etc.) sobre la superficie de un nanotubo ideal, promueven una distorsión en el cilindro provocando su curvatura, lo que se traduce en un aumento en la reactividad respecto a los grupos amino [1,2].

Estas predicciones no solamente poseen un significado académico y práctico; sino también, a través del uso de reacciones mucho más limpias y específicas como la funcionalización en fase de gas con aminas, abren las puertas a futuras aplicaciones en áreas de interés biológico como las ciencias biomédicas [5,10].

### 3.2. Funcionalización en fase de gas con aminas

Los aminoácidos y sus derivados son ejemplos importantes de los ácidos carboxílicos. La unión de éstos a la superficie de los nanotubos de carbono permite aumentar la solubilidad del mismo, así como aumentar su biocompatibilidad (Capítulo 5). Existen muchos polímeros sintetizados a partir de largas cadenas de aminoácidos, y un ejemplo de esto es la formación de nylon-6 a partir del ε-caprolactam. Recientemente el nylon

llamado la atención de muchos grupos de investigación debido al interés en la formación de nuevos materiales híbridos obtenidos a partir del mismo. Dando lugar a novedosos nanocompuestos con innovadoras propiedades y potenciales aplicaciones (Apéndice A, B) [5].

### 3.2.1. Características del nylon-6

Fue sintetizado por primera vez por Wallace Carothers. Es un polímero blanquecino y translúcido con una densidad de  $1140 \text{ kg/m}^3$ , el cual se funde a los  $255^\circ\text{C}$ . Tiene una resistividad (grado de dificultad que encuentran los electrones durante su desplazamiento) del orden de  $10^{14} \Omega\text{m}$ . El nylon es un polímero isotáctico (sustituyentes de la cadena principal de un polímero están enlazados a un carbono quiral en la misma posición), de modo que sus secuencias se encuentran ordenadas y de forma periódica. Es un polímero muy estable químicamente hablando, siendo únicamente degradado por ácidos minerales a través de altas temperaturas. Tiene una elasticidad superior a otros polímeros como la seda, y es muy resistente a las arrugas [11,12].

Nylon-6 posee diferentes propiedades que lo hacen inatacable por microorganismos, evitando contagios cuando se usa en suturas. Su solubilidad es casi nula en la mayoría de los disolventes orgánicos y en agua; a pesar de eso no es biodegradable, pero es posible reciclarlo. Absorbe muy poca humedad ambiental y es fácil de secarlo, siendo un buen aislante del agua al acumular cargas estáticas por fricción.

Hoy en día el nylon es aún un polímero muy importante en muchas áreas por sus propiedades prácticas para diferentes aplicaciones por lo que es una fibra muy utilizada [11,12].

### 3.2.2. Síntesis de $\epsilon$ -caprolactam.

$\epsilon$ -caprolactam (Figura 7) es un producto utilizado entre otras cosas para la síntesis de nylon-6. Es un compuesto volátil que se derrite a partir de los  $68^\circ\text{C}$ , y cuyo punto de fusión se encuentra alrededor de los  $138^\circ\text{C}$  a bajas presiones (aproximadamente 10 Torr) [5].  $\epsilon$ -caprolactam se sintetiza principalmente a partir de la ciclohexanona (obtenida a partir de la destilación fraccional del petróleo por un proceso de hidrogenación del benceno [13]).

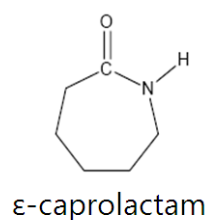


Figura 7. Estructura química de  $\epsilon$ -caprolactam [11].

$\epsilon$ -caprolactam entonces es sintetizado a partir un proceso mono-hidrogenación de dinitrilos conocida "oximación" (normalmente se emplea hidroxilamina), seguido por una reacción de "Beckmann" de la oxima, que genera aproximadamente 4.5 Kg de sulfato amónico por cada kilogramo de  $\epsilon$ -caprolactam (Figura 8-a). Existe otro método de síntesis mucho más directo empleando  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual es menos costoso y evitar el uso de la hidroxilamida y la obtención de productos como el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [11] (Figura 8-b).

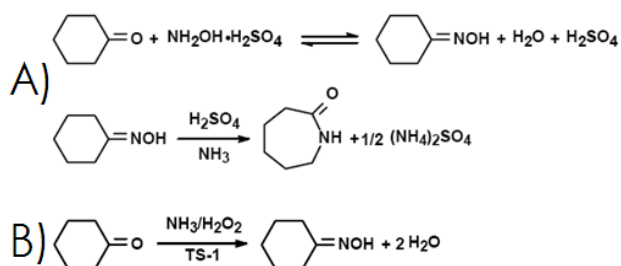


Figura 8. Síntesis de  $\epsilon$ -caprolactam por oximación (A) y por el método directo (B) [13].

### 3.2.3. Síntesis de nylon-6

Existen muchos métodos para la formación de nylon-6 a partir de  $\epsilon$ -caprolactam, pero el más común es el proceso por "apertura hidrolítica del anillo de  $\epsilon$ -caprolactam". El inicio de la polimerización se da por la hidrólisis de una porción del  $\epsilon$ -caprolactam presente en la reacción. El oxígeno perteneciente al grupo carbonilo toma un hidrógeno del agua, donándole un par de electrones y dejando un grupo hidroxilo libre [13]. A consecuencia de esto el oxígeno del grupo carbonilo ahora tiene carga positiva, de modo que toma un par de electrones del doble enlace encontrado en el grupo carbonilo dejando una carga positiva sobre el átomo de carbono del mismo grupo (ahora es un carbocatión) [14] (Figura 9).

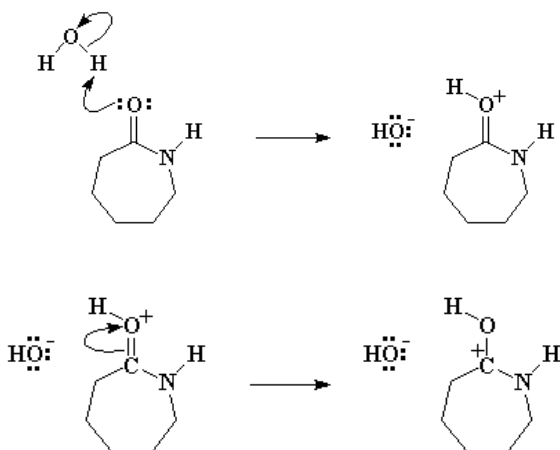


Figura 9. Inicio de la reacción de polimerización [14].

El grupo hidroxilo que se ha formado ataca al carbocatión, originándose una molécula que ahora es un diol inestable. A continuación se produce un reordenamiento de los electrones. El átomo de nitrógeno dona un par de electrones al átomo de hidrógeno de uno del grupo hidroxilo. Los electrones que compartía el hidrógeno con su oxígeno ahora forman parte de un doble

enlace entre el oxígeno y el átomo de carbono, provocando que los electrones compartidos por el átomo de carbono y nitrógeno sean atraídos hacia el nitrógeno, rompiendo el enlace entre éstos y produciendo la apertura del anillo de  $\epsilon$ -caprolactam [14] (Figura 10).

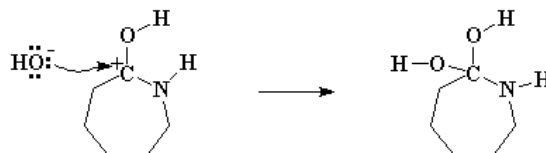


Figura 10. Apertura del anillo cíclico de  $\epsilon$ -caprolactam [14].

Ahora se ha formado un aminoácido lineal (Figura 11) que puede reaccionar y adherirse a otra molécula de  $\epsilon$ -caprolactam, de la misma manera que lo hizo el agua, tomando el hidrógeno del extremo amino. El oxígeno del carbonilo dona un par de electrones a ese hidrógeno, separándolo del aminoácido y dejando dos electrones libres [13,66].

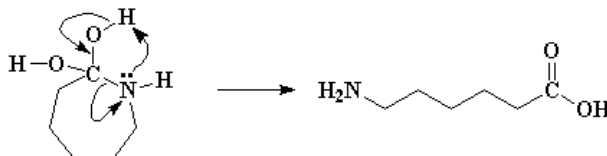


Figura 11. Formación de un aminoácido lineal precursor de nylon-6 [14].

Cuando se rompe el doble enlace con el oxígeno, el par de electrones libres en el extremo amino ataca al carbocatión que se ha formado en el extremo carboxilo de la segunda molécula de  $\epsilon$ -caprolactam, tal y como ocurrió cuando se unió a la molécula agua (Figura 12-A) [14].

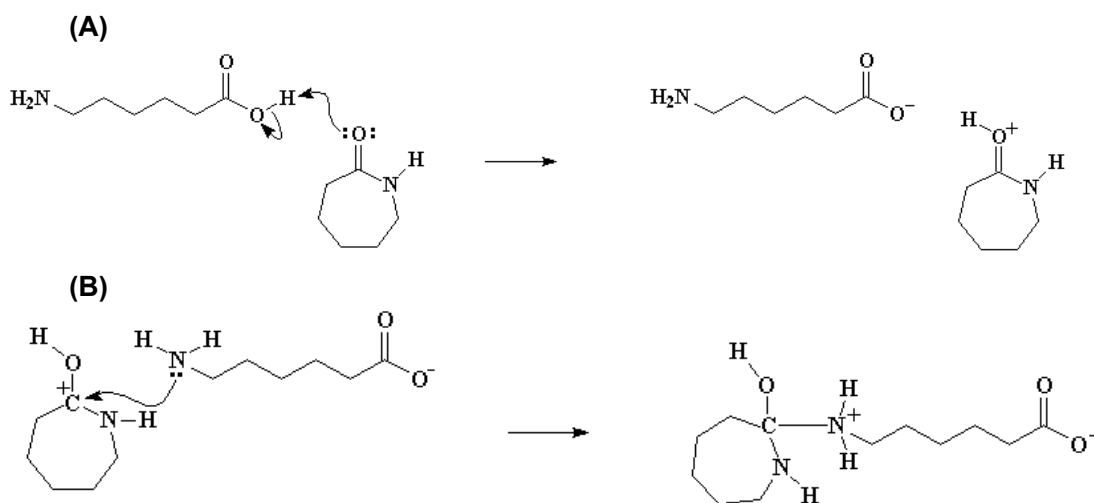


Figura 12. Adición de una segunda molécula de  $\epsilon$ -caprolactam [14].

Se origina entonces un derivado de amonio muy inestable (Figura 12-B). De este modo el nitrógeno encontrado en el anillo cíclico toma un hidrógeno del amonio (Figura 13-A). Posteriormente, el enlace entre el carbono y el nitrógeno se rompe promoviendo la apertura del anillo de la segunda molécula de  $\epsilon$ -caprolactam (Figura 13-B). El grupo carboxilato que se forma en el extremo terminal toma el hidrógeno del alcohol formado durante la unión del segundo anillo de  $\epsilon$ -caprolactam, y origina la formación de un nuevo grupo carbonilo en la mitad de la molécul, lo cual regenera la formación del

ácido carboxílico al final de la cadena. Este carboxilo terminal será el catalizador que mediará las reacciones con otras moléculas de  $\epsilon$ -caprolactam y el proceso se repetirá  $n$  veces hasta formar una larga cadena de la poliamida "nylon-6" [14].

La concentración inicial de agua es importante para que se promueva la apertura de los anillos, y a su vez la eliminación de la misma concentración es necesaria para que se realice la policondensación de la molécula de nylon-6 [13].

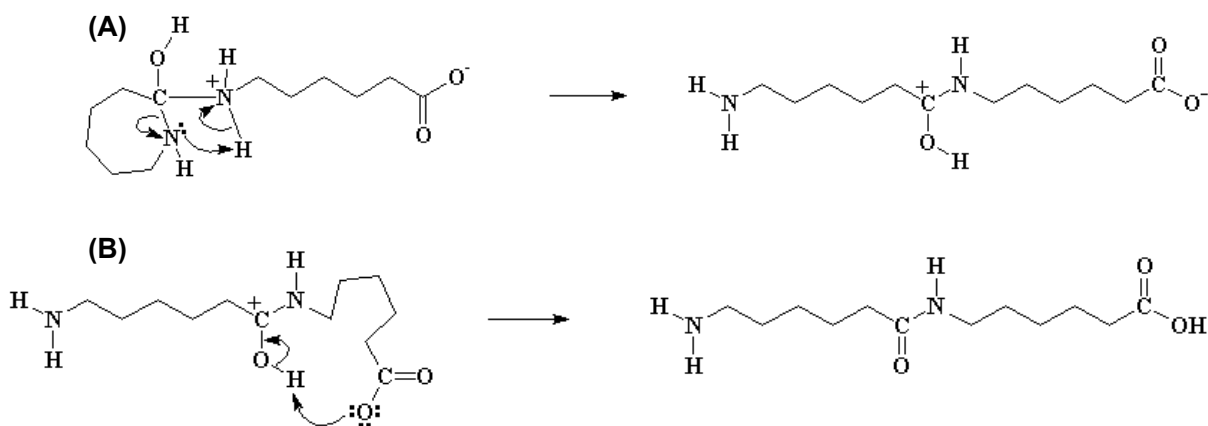


Figura 13. Apertura de anillo cíclico para una segunda molécula de  $\epsilon$ -caprolactam durante la formación de la poliamida "nylon-6" [14].

### 3.3. Antecedentes sobre la funcionalización de MWNTs con nylon-6 en fase de gas

Recientemente Basiuk y colaboradores, llevaron a cabo la funcionalización de MWNTs con nylon-6 en fase de gas aprovechando los numerosos defectos sobre la superficie de los nanotubos y las unidades de piracileno localizadas en los extremos cerrados (Figura 1). Para realizar la polimerización de nylon-6 sobre la superficie del nanotubo, se empleó como catalizador de la reacción la amina "1,8-diamino-octano", ya que de otro modo la polimerización de nylon-6 no se llevaría a cabo [5]. Una vez que obtuvieron MWNTs funcionalizados con 1,8-diaminooctano (MWNTs-DA), realizaron una segunda fase de funcionalización con  $\epsilon$ -caprolactam, empleando los mismos nanotubos.

Debido a su alta volatilidad, la molécula de  $\epsilon$ -caprolactam satisface el criterio general de los reactivos empleados para la funcionalización a través del método en fase de gas. A través de la reacción de funcionalización se favoreció la apertura del anillo de  $\epsilon$ -caprolactam, al unirse al extremo libre de la 1,8-diaminooctano que ahora ya se encuentra unida covalentemente a la superficie del nanotubo, formándose una amina secundaria lineal. Consecuentemente una segunda molécula de  $\epsilon$ -caprolactam reaccionó con la tal molécula lineal, promoviendo la apertura del anillo cíclico. Asimismo, otras moléculas de  $\epsilon$ -caprolactam se unirían al polímero en crecimiento, dando lugar a la formación de la cadena de nylon-6 sobre la superficie del nanotubo de carbono (Figura 14) [5].

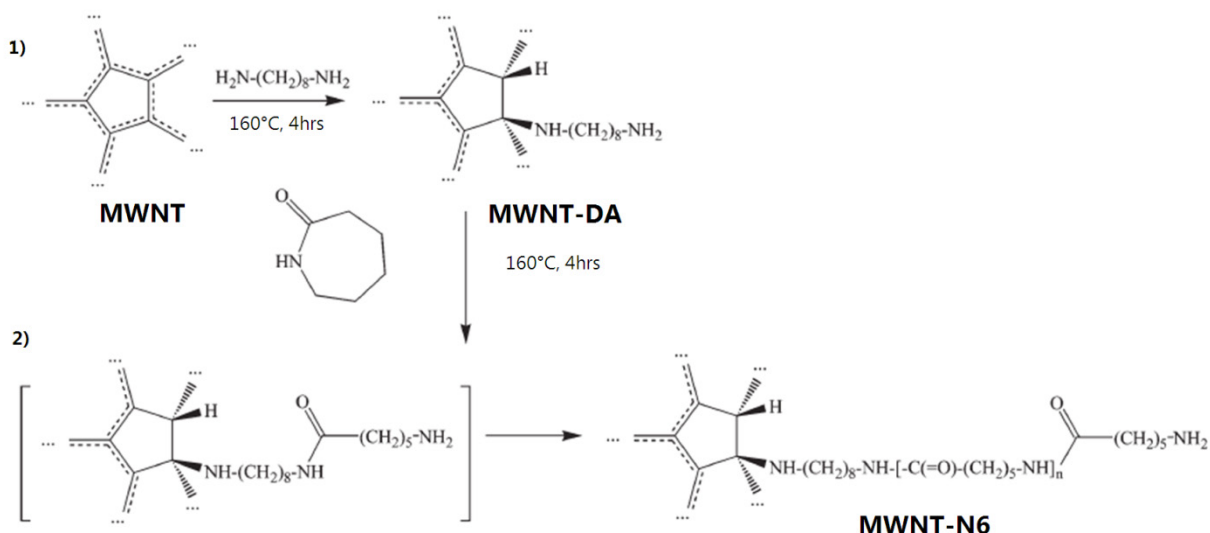


Figura 14. Reacción de polimerización para la formación de nylon-6 a partir de caprolactam sobre la superficie de MWNTs usando como catalizador de la reacción 1,8-diaminooctano adherida a los defectos encontrados en las paredes del nanotubo y en los extremos cerrados del mismo [5].

### 3.4. Técnicas para la caracterización de nanotubos de carbono prístinos y funcionalizados

Existen diferentes técnicas que permiten determinar las características morfológicas, físico-químicas y la pureza para un

nanotubo prístino (no funcionalizado) y para un nanotubo funcionalizado. Éstas técnicas son capaces de determinar si la funcionalización se realizó con éxito al confirmar la presencia de los grupos funcionales sobre la superficie de los nanotubo. A continuación se describen dichas técnicas en detalle.



### 3.4.1. Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Una importante herramienta para caracterizar compuestos orgánicos es a través de la espectroscopia en el infrarrojo (espectroscopia de IR). Esta técnica permite obtener información acerca de la estructura de un compuesto y la pureza del mismo.

La luz infrarroja se presenta en una región del espectro electromagnético (energía radiante, rayos x, UV, luz visible, etc.) entre la luz visible y las microondas. Cada componente del espectro electromagnético puede ser considerado como una onda o una partícula que viaja a la velocidad de la luz, y difieren unos con otros en longitud y frecuencia [15]. Los espectrofotómetros para espectroscopia de IR convencionales están equipados con dos proyectores de luz infrarroja, uno de ellos hace pasar la luz infrarroja a través de la muestra y la otra es empleada como referencia (el aire). La luz infrarroja contiene cierto rango de frecuencia, y al atravesar la muestra se absorbe una parte de ésta, por lo que una menor cantidad de radiación pasa del otro lado de la muestra. Un detector compara la energía que es transmitida por la muestra con la energía de referencia que pasa a través del aire, y posteriormente es graficada [16].

Cuando la luz infrarroja es absorbida por la muestra, los átomos que se encontraban estáticos tienden a perder el equilibrio en la posición que se encuentran, por lo que se produce una vibración entre los enlaces de la molécula. Existen dos tipos de vibraciones: los estiramientos y las flexiones. Las moléculas están formadas por enlaces entre átomos que tienen la libertad de moverse relativamente en 3 ángulos (rotacionales de translación), los cuales están representados por el plano cartesiano. La frecuencia de estas vibraciones depende del tamaño de los átomos, así como de su masa y de la

fuerza que poseen los enlaces que unen a cada átomo. Las vibraciones moleculares son estimuladas por los enlaces que han absorbido a luz infrarroja a la misma frecuencia que lo hacen en sus frecuencias vibracionales naturales; por lo que para cada molécula existe una variedad de vibraciones posibles y determinadas [15,16].

Es posible graficar dentro de un análisis de espectroscopia de IR (Figura 15) en el eje de las Y la transmitancia (porcentaje de luz que pasa a través de la muestra) o la absorbancia (al cociente entre la radiación absorbida y la radiación incidente.), y en el eje de las X la frecuencia de luz radiada expresada en unidades de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

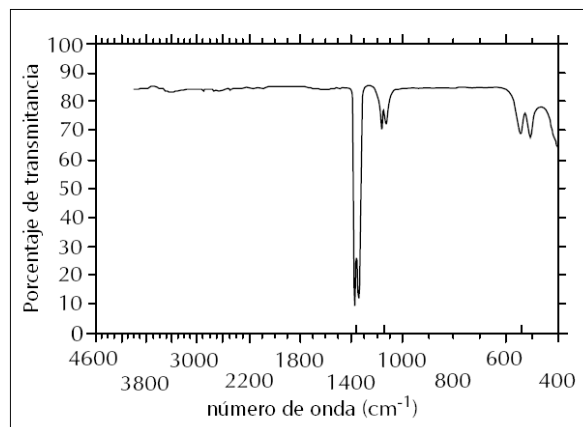


Figura 15. Ejemplo de un espectro obtenido por espectroscopia de IR. En el eje de las X se grafica el número de onda y en el eje de las Y se grafica el porcentaje de transmitancia (o en su defecto el de absorbancia) [15].

Para obtener un buen espectro es necesario disminuir la humedad tanto dentro del equipo como de la muestra, así como también es importante que los soportes donde se montan las muestras (comúnmente de cristales de KBr o de ZnSe) se encuentren limpios y transparentes para que permitan el paso de la luz y no tengan interferencias [16].

### 3.4.2. Espectroscopia RAMAN

La espectroscopia RAMAN es una forma de espectroscopia vibracional muy semejante a la espectroscopia IR. Mientras que el análisis de IR emplea bandas que se originan por la carga en el momento dipolo de una molécula, el análisis de RAMAN emplea bandas que se originan a partir de la polarización de una molécula [17].

Cuando un haz luminoso es incidido sobre la muestra, los fotones son absorbidos por el material, mientras que otros son desviados por a la excitación de los electrones en la muestra. La mayoría de los fotones que son desviados poseen exactamente la misma longitud de onda que los fotones incidentes. Sin embargo una porción pequeña de estos fotones cambia su longitud de onda, ya sea a longitudes de ondas muy largas o longitudes de onda muy cortas. Estos fotones desviados son empleados para determinar las vibraciones de una molécula presente en la muestra, y la energía detectada a partir de tales vibraciones es graficada en forma de espectros, lo cual es de gran ayuda para identificar la presencia o ausencia de moléculas a través de vibraciones específicas y determinadas [17].

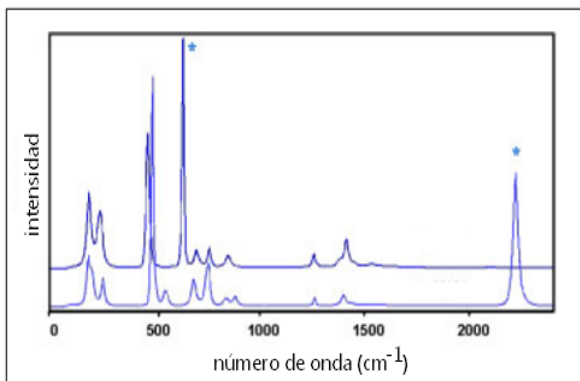


Figura 16. Ejemplo de un espectro RAMAN. En el eje de las X se grafica el número de onda y en el eje de las Y la intensidad de los fotones en unidades de absorbancia o de transmitancia [17].

En un gráfico de RAMAN (Figura 16), normalmente se grafica en el eje de las Y la intensidad de la radiación proveniente de los fotones desviados, lo cual se traduce como vibraciones en las moléculas de la muestra; mientras que en el eje de las X se grafica la frecuencia de tal radiación (usualmente en unidades de número de onda  $\text{cm}^{-1}$ ) [17].

### 3.4.3. Termogravimetría (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que se emplea para medir la estabilidad térmica de un compuesto, a través de los cambios en su peso (pérdida o ganancia) en función de la temperatura cuando la muestra es calentada.

Un instrumento TGA consiste básicamente de una microbalanza localizada dentro de un horno donde se coloca la muestra, con lo que es posible registrar constantemente la pérdida de peso tras la combustión. Normalmente las mediciones son realizadas en presencia de aire o de un ambiente en presencia de gases inertes, tales como el helio o el argón. Mientras el material es calentado, se puede perder peso a través de una simple deshidratación, o a través de reacciones químicas liberadoras de gases. Algunos materiales pueden ganar peso reaccionando con los gases de la atmósfera o los gases liberados en la combustión [18,19].

El análisis de TGA produce una gráfica a través de las señales detectadas durante los tratamientos térmicos de la muestra. En el eje de las Y grafica el porcentaje de peso que se pierde o se gana, y en el eje de las X grafica la temperatura empleada durante el tratamiento (Figura 17). A través de esta gráfica es posible determinar a qué temperatura se produce la pérdida o la ganancia de peso [18].

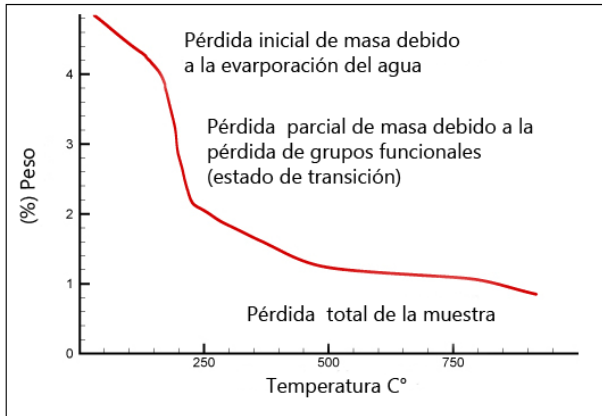


Figura 18. Gráfico obtenido en un análisis de TGA. En el eje de las X se grafica la temperatura, mientras que en el eje de las Y se grafica el porcentaje de peso que se pierde en la muestra durante la combustión. La curva obtenida se divide a su vez en diferentes fases [18].

### 3.4.4. Técnicas de microscopía

Las técnicas de microscopía (Figura 19) son muy útiles durante la observación y caracterización de materiales orgánicos e inorgánicos, incluyendo la observación de los nanotubos de carbono (ya sea prístinos o funcionalizados con alguna molécula orgánica). Dependiendo del propósito, es posible determinar qué técnicas son las más adecuadas para caracterizar las muestras, por lo que el tamaño de la muestra es un punto clave para la obtención de una buena imagen. Cada técnica presenta diferentes alcances o resoluciones (Figura 18) que dependen del método por el cual se obtienen las imágenes de las muestras (principalmente a través de fotones o electrones).

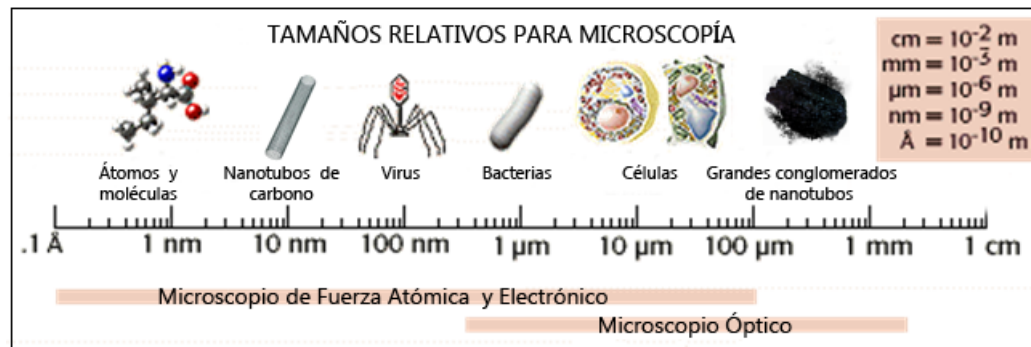


Figura 18. Escalas dentro de las diferentes técnicas de microscopía. <http://www.angelfire.com/bc2/biologia/microscopia.htm>

#### 3.4.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) es muy útil para la observación de material tanto orgánico como inorgánico al vacío, y su resolución está limitada al rededor de los 2 nm. La imágenes se obtienen al hacer incidir a través de un tubo o filamento de rayos catódicos, un haz de electrones sobre la muestra. Algunos electrones son difractados, otros absorbidos por la muestra,

y otros la atraviesan formando una imagen aumentada de la misma hasta un millón de veces o más. La interacción de los electrones con la muestra depende de la densidad de carga del material, estas interacciones son altamente afectadas por la forma en la que la muestra es preparada. Los electrones pueden penetrar a lo mucho de 50 a 100 nm de la muestra, y cuando algunos de los electrones logran atravesar la muestra, estos son desviados hacia una serie de lentes que permiten definir y amplificar la imagen [20,21,23].

Un microscopio TEM está constituido básicamente por (Figura 19): 1) dos o tres lentes condensadoras que enfocan el haz de electrones hacia la muestra; 2) una lente objetiva que produce la difracción en el plano focal posterior y crea la imagen de la muestra en el plano de la imagen; 3) algunas lentes intermediarias que magnifican el tamaño de la imagen o el patrón de difracción de la misma; 4) un diafragma que es colocado en la zona del plano focal posterior para seleccionar los haces de electrones que se están transmitiendo, y obtener una imagen con mayor contraste. Es posible combinar imágenes obtenidas de diferentes ángulos tomados de la muestra para crear representaciones en 3 dimensiones [20,23].

#### **3.4.4.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) permite la observación y caracterización superficial de materiales orgánicos e inorgánicos, proporciona información sobre su morfología. Al igual que el microscopio TEM, la resolución de éste, está limitada cerca de los 2 nm. Cuando se hace incidir un haz de electrones sobre la muestra al vacío, distintos tipos de señales son generadas desde la muestra, y se utilizan para examinar muchas de sus características. Cuando el haz de electrones choca con la muestra, los electrones y rayos-x son rebotados desde la muestra.

Es relativamente sencillo preparar las muestras a observar con esta técnica; pero es necesaria la tinción de éstas con iones de metales pesados. Las imágenes obtenidas del SEM son de alta resolución, y debido a la gran profundidad de campo se obtiene una apariencia tridimensional.

El microscopio electrónico de barrido está equipado con diversos detectores

(Figura 19): 1) un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image); 2) un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image) y 3) un detector de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra, y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas [22,23].

#### **3.4.4.3. Microscopia óptica**

La técnica de microscopía óptica a diferencia de las otras técnicas, no emplea haces de electrones para formar imágenes para las muestras. En cambio emplea fotones producidos por alguna fuente luminosa (lámparas, etc.). Su resolución está restringida aproximadamente a los 200 nm debido a la longitud de la luz (0.4-0.7  $\mu\text{m}$ ).

En el microscopio óptico, un haz luminoso es producido por una lámpara, y se hace pasar a través de un condensador que conduce el haz hacia la muestra. En cuanto a las muestras, se asume que éstas son capaces de absorber los fotones provenientes del haz luminoso. Una parte de la luz puede tanto a través la muestra (luz directa), como pasar alrededor de ella (luz de fondo). Parte de la luz puede ser desviada cuando se encuentra con algunas partes de gran densidad en la muestra, la luz desviada (luz difractada) es redirigida hacia la luz directa causando así que ambas se intercepten al llegar al plano intermediario de la imagen en el diafragma.

El microscopio óptico contiene un condensador que es un sistema de lentes situadas debajo de la platina donde se coloca la muestra, y su función es la de concen-

trar la luz hacia la preparación. En el interior del condensador existe un diafragma, el cual regula la cantidad de luz que atraviesa el sistema de lentes, eliminando los rayos demasiado desviados [24].

El microscopio óptico consiste de dos sistemas de lentes (Figura 19), el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. El objetivo está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examina-

do. Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentre en el punto focal del ocular. Cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real. El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes. Las lentes de los oculares a su vez amplifican la imagen, la cual finalmente es proyectada hacia la retina, hacia una cámara, o hacia un procesador de imágenes [24,25].

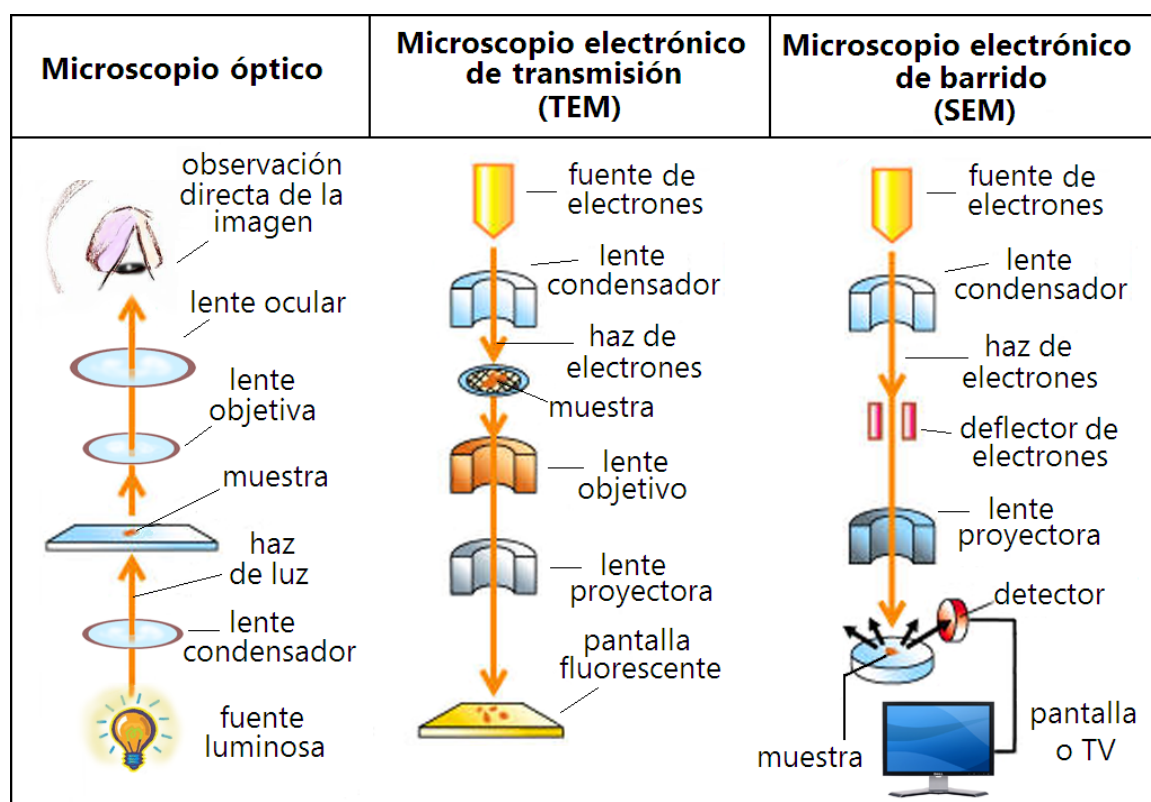


Figura 19. Diagrama y mecanismo por el cual se obtiene la imagen de las muestras observadas a través de las principales técnicas de microscopía: a) microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). <http://www.educa.aragob.es/iescarin/depart/biogeoe/varios/BiologiaCurtis/Seccion%201/4-21.jpg>

## Referencias

[1] Basiuk, E. V.; Monrroy-Peláez, Marel.; Puente-Lee, I.; Basiuk, V. A. (2004): Direct Solvent-

Free Amination of Closed-Cap Carbon Nanotubes: A Link to Fullerene Chemistry. *Nano Letters*; 4:863-866.



- [2] Basiuk, V. A.; Basiuk E. V. (2004), Solvent-Free Techniques for Carbon Nanotube Derivatization In: *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. (ed.) American Scientific Publishers. USA; In press.
- [3] Balasubramanian, K.; Burghard M. (2005): Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *Small*; 1: 180–192.
- [4] Basiuk, E. V.; Puente-Lee, J.- L; Sánchez, C.; Basiuk, V. A.(2006): Gas-phase functionalization of carbon nanotubes. *Materials Letters*; 60: 3741-3746.
- [5] Basiuk, V.A.; Salvador-Morales C., Basiuk, E. V.; Jacobs, R.; Ward M.; Chu, B.; Sim, R.B.; Green, M. L. H. (2006): “Green” derivatization of carbon nanotubes with Nylon 6 and L-alanine. *Journal of Materials Chemistry*; 16:4420-4426.
- [6] Kónya, Z.; Vesselényi, I.; Niesz, K.; Kukovecz, Á.; Demortier, A.; Fonseca, A.; Delhalle, J.; Mekhalif, Z.; Nagy, J. B.; Koós, A.; Osváth, Z.; Kocsonya, A.; Biró, L. P.; Kiricsi, I. (2002): Large scale production of short functionalized carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters*; 360:429-435.
- [7] Li,X.; Liu, L.; Qin, Y.; Wu, W.; Guo, Z.-X.; Dai, L.; Zhu D. (2003): C<sub>60</sub> modified single-walled carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters*; 377:32-36.
- [8] Dyke, C. A.; Tour, J. M. (2003): Solvent-Free Functionalization of Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* ; 125:1156-1157.
- [9] Basiuk, E. V.; Basiuk, V. A.; Bañuelos, J. G.; Saniger-Blesa, J. M.; Pokrovsky, V. A., Gromovoy, T. Y.; Misschanchuk, A. V.; Misschanchuk, B. G. (2002): Interaction of Oxidized Single-Walled Carbon Nanotubes with Vaporous Aliphatic Amines. *Journal of Physical Chemistry B*; 106:1588-1597.
- [10] Basiuk, E. V.;Gromovoy, T. Y.; Datsyuk, A.; Palyanytsya, B. B.; Pokrovskiy, V. A. (2005): Solvent-free derivatization of pristine multi-walled carbon nanotubes with amines. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*; 5:984-990.
- [11] Serra Queralt, M. (2002): *Estudio de sistemas níquel-magnesia. Aplicación a la hidrogenación de dinitrilos*. Tesis. Universidad URV. Tarragona; 230pp.
- [12] *Nylon 6,6*: ([www.iesgaherrera.com/fiqui/nylon.pdf](http://www.iesgaherrera.com/fiqui/nylon.pdf)).
- [13] Adrianus Johannes, M. van D. (2006): *6-aminocapronitrile as an alternative monomer for the nylon 6 synthesis*. Tesis. Technical University of Eindhoven. Holanda; 155 pp.
- [14] *Making Nylon-6*: (<http://www.pslc.ws/spanish/ny-six.htm>).
- [15] Feist, P. (2002): Infrared Spectroscopy: Theory. In: *Online edition for students of organic chemistry lab course*. (ed.) University of Colorado: (<http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/irtutor/IRtheory.pdf>).
- [16] *Infra red Spectroscopy*: ([http://www.chemsoc.org/pdf/LearnNet/rsc/IR\\_txt.pdf](http://www.chemsoc.org/pdf/LearnNet/rsc/IR_txt.pdf)).
- [17] *Raman Technical Notes. Raman Spectroscopy - An Overview*: (<http://www.kosi.com/raman/resources/technotes/index.asp>).
- [18] *Thermal Gravimetric Analysis*: (<http://www.siemex.com.mx/PDFS/orthon/Thermal%20Gravimetric%20Analysis%20brochure.pdf>).
- [19] Hooker, S. (2007): Measurement Issues in Single Wall Carbon Nanotubes: Thermogravimetric Analysis (TGA). (<http://www.msel.nist.gov/Nanotube2>).
- [20] *Transmission Electron Microscopy*: (<http://ocw.mit.edu/NR/rdonlyres/Biology/7-343Fall-2004/427769F7-C5BE-47AC-8761-BF6CA8A5A935/0/tem.pdf>).
- [21] Hall. C. E. (1966): *Introduction to electron microscopy*. (ed.) Mc Graw Hill. New York; 451 pp.
- [22] Zegarra, M. G.; Montesinos, S. (2005): Aplicaciones de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Análisis de Fractura de una Aleación de CU-10 Al. (<http://cabierta.uchile.cl/revista/28/articulos/pdf/edu3.pdf>).
- [23] Egerton, R. F. (2000): Transmission Electron Microscopy. In: *Physical Principles of Electron Microscopy. An Introduction to TEM, SEM and EM*. (ed.) Springer USA; 219pp
- [24] Davidson, M. W.; Abramowitz, M. (1999): *Optical Microscopy*. (<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/pdfs/microscopy.pdf>).
- [25] *Hipertextos del área de biología. Principios de Microscopía*: (<http://fai.unne.edu.ar/biologia/microscopia/microscopia1.htm>).



# CAPÍTULO

## 4

### Estudio para la obtención de nuevas nanoestructuras híbridas: “funcionalización de MWNTs con nylon-6 por el método en fase de gas”

#### 4.1. Objetivo general del estudio

- Determinar qué concentraciones de  $\epsilon$ -caprolactam son las más óptimas para la obtención de nylon-6 sobre la superficie de los MWNTs.

#### 4.1.1 Objetivos particulares

- Comprobar la existencia de nylon-6 sobre la superficie de MWNTs, y en todo caso determinar el porcentaje del mismo obtenido para cada una de las muestras de MWNTs-DA tratadas con diferentes concentraciones de  $\epsilon$ -caprolactam.
- Conocer la morfología del nuevo nanocompuesto híbrido obtenido a través de técnicas de microscopía, y si es posible obtener las imágenes correspondientes.
- A través de las diferentes técnicas de caracterización empleadas, determinar qué factores podrían estar afectando la formación de nylon-6 durante las reacciones de funcionalización.

#### 4.2. Materiales y métodos

El siguiente estudio fue realizado en el laboratorio de Materiales y Sensores (M y S) del Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET) de la UNAM. La metodología empleada para el mismo está basada en los estudios previos realizados por Basiuk y colaboradores [1,2,3,4].

#### 4.2.1. Funcionalización de MWNTs con nylon-6

Para realizar la reacción de funcionalización libre de solventes en fase de gas en el presente estudio, se emplearon MWNTs prístinos (Nanostructured & Amorphous Materials Inc.) sintetizados por el método CVD. Los cuales presentan un diámetro externo aproximado de 8nm y un diámetro con un rango aproximado de entre 10 y 50nm. La pureza que presentan es aproximadamente del 95%, ya que el 5% restante lo conforman impurezas compuestas por nanopartículas de carbono, nanopartículas metálicas y carbono amorfo.

La funcionalización de los nanotubos de carbono se realizó básicamente en 2

etapas. Las reacciones de funcionalización se realizaron bajo temperaturas y tiempos optimizados en los estudios previos [1].

#### 4.2.1.1. Desgasificación de MWNTs prístinos

Previo a las reacciones de funcionalización, los nanotubos fueron introducidos al

reactor del equipo de vidrio (diseñado en el laboratorio de M y S, CCADET) para desgasificación (Figura 1), a una temperatura de 120°C, y al vacío ( $10^{-1}$ - $10^{-2}$  Torr) durante 2 horas. De este modo algunas impurezas y el exceso de vapor de agua existente dentro de la muestra pudieron ser eliminados, condensándose en la parte superior más fría del reactor.

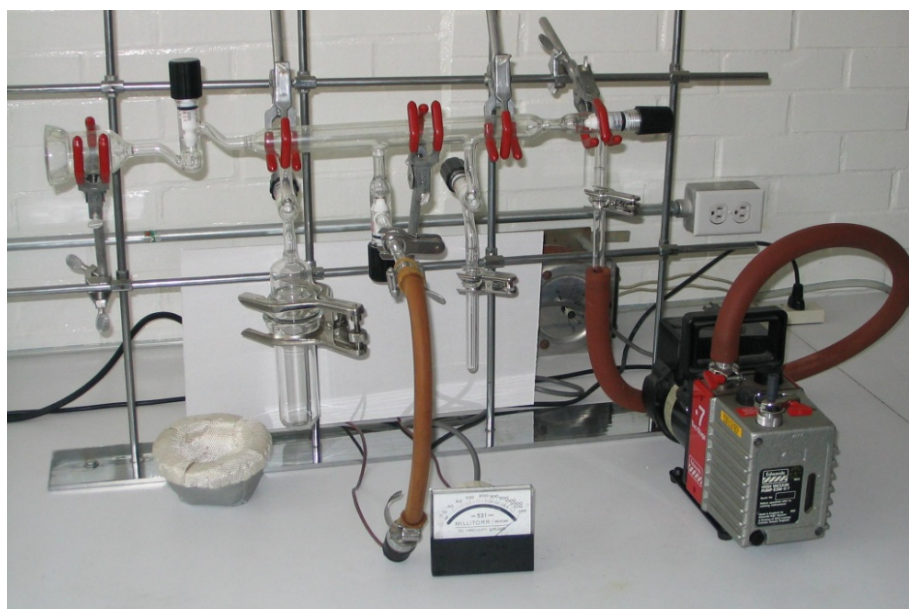


Figura 1. Equipo de vidrio para funcionalización diseñado en el laboratorio de Materiales y Sensores del CCADET, UNAM.

#### 4.2.1.2. Primera etapa de funcionalización (reacción con 1,8 Diaminooctano)

Una vez que los nanotubos de carbono fueron desgasificados, se llevó a cabo la primera reacción de funcionalización. La cual consistió en la adición nucleofílica de la 1,8-diaminooctano a sitios preferenciales (principalmente a defectos pentagonales y enlaces 6,6 en unidades de piracileno) encontrados sobre la superficie de los MWNTs [1,2].

Se pesaron aproximadamente 3g (2.9596g) de nanotubos de carbono previamente desgasificados, y aproximadamente

3g (3.0031g) de 1,8-diaminooctano (ALFA AESA, A Johnson Matthey Co.) con una pureza del 98%, previamente deshidratados al vacío. El material pesado fue colocado dentro de la misma ampollita Pyrex con un diámetro aproximado de 5 mm y un largo de 10 cm, la cual posteriormente fue sellada y colocada dentro de un horno a 160°C durante 8 horas [1].

#### 4.2.1.3. Desgasificación de MWNTs con 1,8 diaminooctano (MWNTs-DA)

Después de llevar a cabo la reacción arriba mencionada, la ampollita fue coloca-

da dentro del reactor del equipo de desgasificación durante 40 minutos, a una temperatura de 120°C y al vacío ( $10^{-1}$ - $10^{-2}$  Torr) [1]. De tal manera que se promueve la separación y condensación de la 1,8-diaminooctano que no reaccionó y que aún se encontraba en la muestra. De este modo se obtuvieron 3.8049g de nanotubos de carbono funcionalizados con 1,8-diaminooctano (MWNTs-DA).

#### 4.2.1.4. Segunda etapa de funcionalización (reacción con $\epsilon$ -caprolactam)

La segunda etapa de funcionalización consistió en llevar a cabo las reacciones de polimerización para la formación de ny-

lon-6 a partir de  $\epsilon$ -caprolactam. La reacción se llevo a cabo sobre la superficie de los nanotubos de carbono previamente desgasificados y funcionalizados con 1,8-diaminooctano [1].

Se colocó la misma cantidad de MWNTs-DA dentro de 10 ampolletas de vidrio (300mg para cada una), las cuales fueron etiquetadas para su posterior reconocimiento con números del 1 al 10. Se agregaron diferentes cantidades de  $\epsilon$ -caprolactam dentro de cada una de las ampolletas (desde 10 hasta 100 mg, con incrementos de 10mg entre cada una de las ampolletas), tal y como se muestra en la tabla 1.

MUESTRA (AMPOLLETA)	MWNT-DA (mg)	$\epsilon$ -CAPROLACTAM (mg)	RELACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA
1	300.3	300.1	1:1
2	300.6	270.1	1:0.9
3	300.2	240.2	1:0.8
4	300.4	210.1	1:0.7
5	300.4	180.2	1:0.6
6	300.2	150.2	1:0.5
7	300.7	120.0	1:0.4
8	300.4	090.4	1:0.3
9	300.0	059.9	1:0.2
10	300.3	030.5	1:0.1

Tabla 1. Estequiometrias empleadas para el tratamiento de las 10 muestras de MWNT-DA con  $\epsilon$ -caprolactam para la polimerización de nylon-6.

Después de realizar el tratamiento de las muestras, las ampolletas fueron selladas y colocadas en el horno para funcionalización a 190°C durante 6 horas.

#### 4.2.1.5. Desgasificación de MWNTs funcionalizados con nylon-6 (MWNTs-N6)

Al término de la reacción, las ampolletas se extrajeron del horno y fueron colo-

cadadas dentro del reactor del equipo de vidrio para su desgasificación, a una temperatura de 120°C durante 50 minutos y al vacío ( $10^{-1}$ - $10^{-2}$  Torr). Aquellas moléculas de  $\epsilon$ -caprolactam que no reaccionaron con los MWNTs-DA fueron extraídas de la muestra y condensadas en la parte superior más fría del reactor. Finalmente la muestra ya desgasificada, contiene MWNTs funcionalizados con nylon-6 (MWNTs-N6).

#### 4.2.2. Caracterización de MWNT-N6 prístinos y MWNTs-N6

Cada una de las muestras fue analizada a través de espectroscopia de infrarrojo (espectroscopia de IR) y a través del análisis de termogravimetría (TGA). Las imágenes obtenidas a través de microscopía óptica, AFM, SEM y TEM, se obtuvieron a partir de la muestra 1 (estequiometría 1:1). Por otro lado, fue necesaria la separación de las fases morfológicas visibles que componen a la muestra 1. Empleando una espátula muy fina se obtuvieron las 2 fases independientes, y posteriormente fueron caracterizadas a través de microscopía óptica, SEM y TEM, y a través de espectroscopia de IR para determinar los componentes en cada una.

##### 4.2.2.1. Espectroscopia RAMAN

Para el análisis, se empleó un equipo de espectroscopia RAMAN modelo NICOLET-ALMENA XR (Figura 2). Las muestras de MWNTs prístinos y MWNTs-N6 se observaron al microscopio óptico integrado en el equipo, hasta obtener un buen enfoque de las mismas. Seguido de esto, el microscopio fue cubierto de modo que se evitara la entrada de luz que pudiera interferir con la toma de los espectros.



Figura 2. Equipo para espectroscopia RAMAN NICOLET-ALMENA XR.

##### 4.2.2.2. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

La espectroscopia de IR se realizó empleando un espectrofotómetro modelo Nicolet Nexus 670 FT-IR (Figura 3). La muestra con MWNTs-N6 fue diluida en isopropanol al 90% por ultrasonificación durante 10 minutos, hasta obtener una solución oscura. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se colocaron continuamente un par de gotas de la misma solución sobre una ventana de ZnSe, hasta que el centro de la misma se tornara color gris oscuro. Posteriormente las ventanas fueron calentadas a 80°C en una parrilla eléctrica para evaporar los residuos de isopropanol.

El espectrofotómetro fue purgado durante 30 minutos con gas nitrógeno para eliminar la humedad, y antes de realizar el análisis de las muestras, se utilizó una ventana de ZnSe muy limpia como referencia. Los datos obtenidos tras el análisis fueron procesados a través del programa Origin 6.1, el cual realizó los gráficos correspondientes para cada espectro obtenido.



Figura 3. Espectrofotómetro empleado para la obtención de los espectros en el IR para la caracterización de las muestras.

##### 4.2.2.3. Termogravimetría (TGA)

El análisis de TGA se realizó por medio del equipo DuPont Thermal Analyzer 951 (Figura 4), en colaboración con la Facultad de Química de la UNAM. El equipo se

trabajó a una temperatura inicial ajustada de 10°C/min, hasta una temperatura final de 1000°C/min, empleando un flujo de aire de 100ml/min. La muestra con nanotubos sin ningún tratamiento adicional fue colocada sobre la microbalanza del equipo de TGA, la cual es capaz de detectar los cambios en la masa mientras la muestra es calentada. Los datos obtenidos fueron procesados con ayuda del programa Origin 6.1.



Figura 4. Imagen del equipo de TGA empleado para el análisis de las muestras (<http://www.bamko.com/lab/dla090603q.jpg>).

#### 4.2.2.4. Microscopía óptica

Las muestras fueron observadas a través de un microscopio óptico convencional, se emplearon aumentos de 400X. Con ayuda de una cámara digital se obtuvieron las imágenes necesarias.

#### 4.2.2.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para realizar las observaciones de las muestras a través del microscopía TEM, se empleó el equipo JOEL 4000Ex, operado a 200kV. Para montar las muestras de MWNTs-N6, se utilizaron rejillas especiales para TEM con "collodion". Cada muestra fue previamente macerada, y luego dispersada con ultrasonido durante 10 minutos en isopropano. Con ayuda de una pipeta se colo-

caron un par de gotas de la misma solución sobre la rejilla.

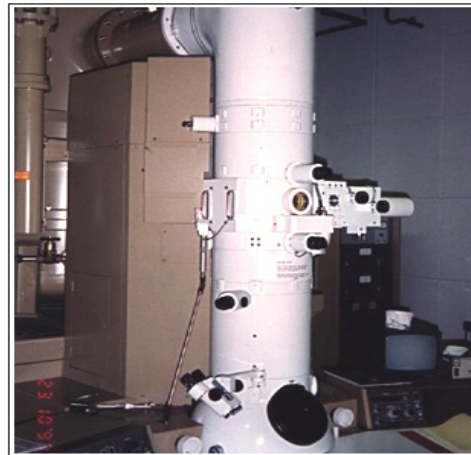


Figura 5. Imagen del microscopio TEM empleado para la obtención de micrografías ([http://www.mse.gatech.edu/Research/Equipment\\_Facilities/CNC/JOEL400EX/joel400ex.html](http://www.mse.gatech.edu/Research/Equipment_Facilities/CNC/JOEL400EX/joel400ex.html)).

#### 4.2.2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El modelo JOEL JSM-5900 fue empleado para analizar las muestras con la técnica de microscopía SEM, operado a 20 kV. Se utilizaron soportes metálicos especiales para SEM en forma de cilindros, sobre los cuales por medio de una cinta conductora de grafito, se adhirió la muestra de MWNTs-N6 previamente macerada.



Figura 6. Imagen del microscopio SEM empleado para el estudio <http://yamato.nipr.ac.jp/AMRC/facility/image/JSM5900.JPG>



### 4.3. Resultados y discusión

A continuación se muestran los gráficos obtenidos como resultado de los diversos análisis realizados para la caracterización de las 10 muestras funcionalizadas con nylon-6. A través de estos resultados se puede determinar la eficiencia para la producción nylon-6 en cada una de las estequiometrías empleadas durante la polimerización de nylon-6 sobre la superficie de los nanotubos. Así mismo es posible determinar qué muestra ha sido la más óptima para la obtención del polímero. Las imágenes ópticas, apoyan rotundamente los datos obtenidos a través de los análisis de espectroscopia de IR y en el análisis termogravimétrico (TGA).

#### 4.3.1. Análisis de espectroscopia RAMAN

Los espectros RAMAN obtenidos para MWNTs prístinos y MWNTs-N6 han detectado señales características para nanotubos de carbono. Esta información es rele-

vante ya que por medio de ésta es posible confirmar que las muestras empleadas están constituidas evidentemente por MWNTs.

En particular, dentro de un espectro RAMAN característico para nanotubos de carbono, se pueden observar las bandas originadas por: 1) Los modos de respiración radial (RBM) característicos de los MWNTs dentro de los rangos de 200 y 500  $\text{cm}^{-1}$ ; tales bandas (normalmente muy poco intensas) proveen información acerca del diámetro y quiralidad de los mismos [1,5]. 2) La banda tangencial G cercana a los 1600  $\text{cm}^{-1}$ , cuyo perfil indica el carácter metálico o semiconductor de los MWNTs. 3) Las bandas D (“Disorder-induced”) cercanas a los 1300  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales proveen información acerca de la presencia de defectos sobre la superficie del nanotubo. A partir de la banda G y D puede extraerse información sobre el número de defectos presentes en un nanotubo. Finalmente 4) las bandas G’ (sobre-tono de D) cercanas a los 2650  $\text{cm}^{-1}$ , de las cuales se extrae información sobre la conducción de los MWNTs a partir del comportamiento dispersivo de las mismas [1,6].

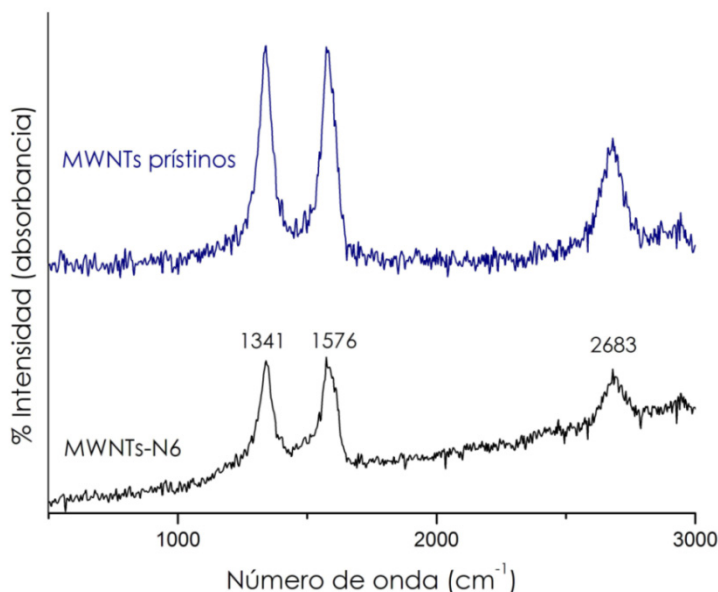


Figura 7. Espectros RAMAN obtenidos para MWNTs prístinos y MWNTs-N6 (muestra 1 relación 1:1).



La figura 7 muestra los espectros RAMAN obtenidos para MWNTs prístinos y para MWNTs-N6 (obtenidos de la muestra 1, estequiometría 1:1). Al observar los espectros RAMAN (Figura 7) para ambos tipos de MWNTs, se puede observar la presencia de 3 bandas características: 1) la primera banda corresponde a la banda característica D localizada a  $1341\text{ cm}^{-1}$ ; 2) la segunda banda característica corresponde a la banda tangencial G cercana a los  $1576\text{ cm}^{-1}$  y 3) finalmente la última banda visible corresponde a la banda G' localizada a  $2683\text{ cm}^{-1}$ . En ambos casos las bandas RMB son demasiado débiles, por lo que no son detectables. Las tres bandas visibles descritas anteriormente proveen la información necesaria para confirmar la presencia de MWNTs dentro de las muestras.

#### 4.3.2. Análisis de espectroscopia de IR

El espectro típico obtenido para MWNTs-N6 debe presentar diversas bandas características, correspondientes a vibraciones producidas por los enlaces entre nanotubos y moléculas orgánicas (en el caso particular de este estudio es la poliamida nylon-6). Tales vibraciones son: a) vibraciones (estiramientos) pertenecientes a los enlaces C=O (conocidas como "amida I") con intervalos de absorción, entre  $1640\text{-}1641\text{ cm}^{-1}$ ; b) vibraciones (flexiones) de enlaces N-H + vibraciones (estiramientos) de enlaces C-N (conocidas como "amida II") con intervalos de absorción, entre  $1540\text{-}1546\text{ cm}^{-1}$ . Otras bandas características pueden ser observadas en los intervalos: a)  $2850\text{-}2855\text{ cm}^{-1}$  perteneciente a vibraciones (estiramientos simétricos) de enlaces C-H; b)  $2922\text{-}2928\text{ cm}^{-1}$  para vibraciones (estiramientos asimétricos) pertenecientes a enlaces C-H; c)  $3060\text{ cm}^{-1}$  para vibraciones armónicas (deformación en el mismo plano) pertenecientes a enlaces N-H y d)  $3296\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$  para

vibraciones (estiramientos) pertenecientes a enlaces de hidrógeno para grupos N-H [1,7, 8].

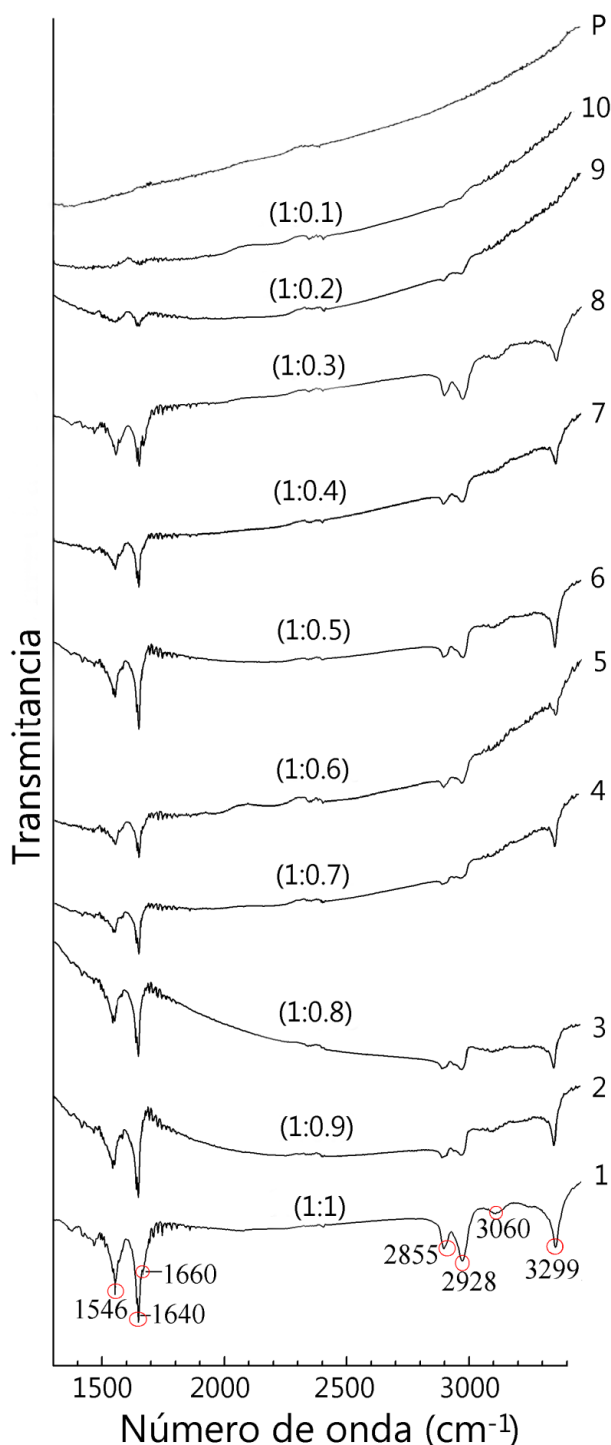


Figura 8. Espectros en el infrarrojo para MWNTs-DA tratadas con  $\epsilon$ -caprolactam (1-10); la letra "P" representa el espectro obtenido para MWNTs prístinos.

La figura 8 muestra los espectros en el infrarrojo obtenidos en el presente estudio durante la caracterización de las muestras de MWNTs-N6. Dentro del mismo gráfico se muestran todos los espectros pertenecientes a cada una de las 10 muestras obtenidas durante las reacciones de funcionalización, así como sus respectivas bandas.

Los espectros obtenidos a través del análisis de espectroscopia infrarroja concuerdan con las bandas típicas obtenidas para un MWNT-N6 [1]. Al observar los espectros de IR (Figura 8), se observan bandas pertenecientes a vibraciones C=O para el grupo "amida I", cercanas a los  $1640\text{ cm}^{-1}$ , y las vibraciones de enlaces N-H + vibraciones C-N para el grupo "amida II", cercanas a los  $1546\text{ cm}^{-1}$  y  $1546\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Asimismo, es posible observar vibraciones pertenecientes a los enlaces N-H localizadas a  $3060\text{ cm}^{-1}$  y  $3299\text{ cm}^{-1}$ , y vibraciones pertenecientes a los diferentes enlaces C-H localizadas a  $2855\text{ cm}^{-1}$ ,  $2928\text{ cm}^{-1}$  y  $3060\text{ cm}^{-1}$ . Todas estas señales son claramente visibles a partir de la muestra 8 (1:03), y mucho más intensas en la muestra 1 (1:1), lo que indica un incremento en la concentración de nylon-6 dependiente de la cantidad de  $\epsilon$ -caprolactam empleada para el tratamiento de los MWNT-DA (Tabla 1). Al comparar los espectros de las muestras (1-10) contra el espectro obtenido para los MWNTs prístinos, se puede corroborar la presencia de nylon-6 sobre la superficie de los MWNTs. Corroborando la formación de una poliamida que está unida covalente mente a la superficie de los mismos.

En general las bandas obtenidas en todas las muestras son relativamente débiles, al compararlos con los espectros obtenidos para nylon-6 en el estudio previo realizado por Basiuk [1]. Lo que podría indicar que la reacción de polimerización de nylon-6 a partir de  $\epsilon$ -caprolactam no está optimizada al

100%. A pesar de eso los espectros realizados para la muestra 1(1:1), 2 (1:0.9) y 3 (1:0.8) presentan las bandas más intensas de todos los espectros, y no existe grandes diferencia entre las mismas. Por lo cual se considera que existe una estabilización de la reacción de polimerización de nylon-6 a partir de la muestra 3 (1:0.8). Por otro lado, la muestra 6 (1:05) presenta un aumento en la concentración de nylon-6, debido a la intensidad que presentan sus bandas. Este incremento es explicado por medio de las imágenes obtenidas a través de microscopía óptica y SEM (Figura 11, 23). Tales imágenes muestran morfología heterogénea de las muestras, que implica que en el momento en que la muestra fue tomada, lo más probable es que se haya removido también una zona que contenía una mayor concentración de nylon.

Otra observación interesante dentro del análisis de espectroscopia de IR es la presencia de pequeñas bandas localizadas a  $1660\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas son mucho más intensas en los espectros 1(1:1), 6 (1:0.5) y 8 (1:0.3), mientras que en el resto de los espectros tales señales son muy débiles y casi imperceptibles. Estas bandas son típicas en los espectros que caracterizan a  $\epsilon$ -caprolactam, por lo que se sugiere que una porción de este material no reaccionó para formar nylon-6, y no pudo ser eliminada por completo durante la etapa de desgasificación, quedando atrapado entre los conglomerados de MWNT-N6. Las curvas que no muestran tales señales, aparentemente han consumido óptimamente la mayor cantidad posible de  $\epsilon$ -caprolactam durante la formación de nylon-6.

### 4.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los resultados obtenidos a través del análisis termogravimétrico (TGA), al igual

que los obtenidos a través de espectroscopia de IR, confirman la presencia de nylon-6 sobre la superficie de los MWNTs.

En la figura 9 se muestran las curvas de TGA obtenidas para MWNT prístinos y MWNTs-N6, obtenidos únicamente para las muestras 1, 3, 5, 9 y 10 (1:1 – 1:0.1) de MWNT-DA tratados con  $\epsilon$ -caprolactam. Al

comparar las curvas de las diferentes muestras de MWNTs-N6, es posible identificar diferentes intervalos de temperatura (denominados A, B y C), los cuales están ausentes en la curva de TGA para MWNTs prístinos. Así mismo las curvas proveen información acerca del porcentaje de nylon-6 presente sobre la superficie de los nanotubos.

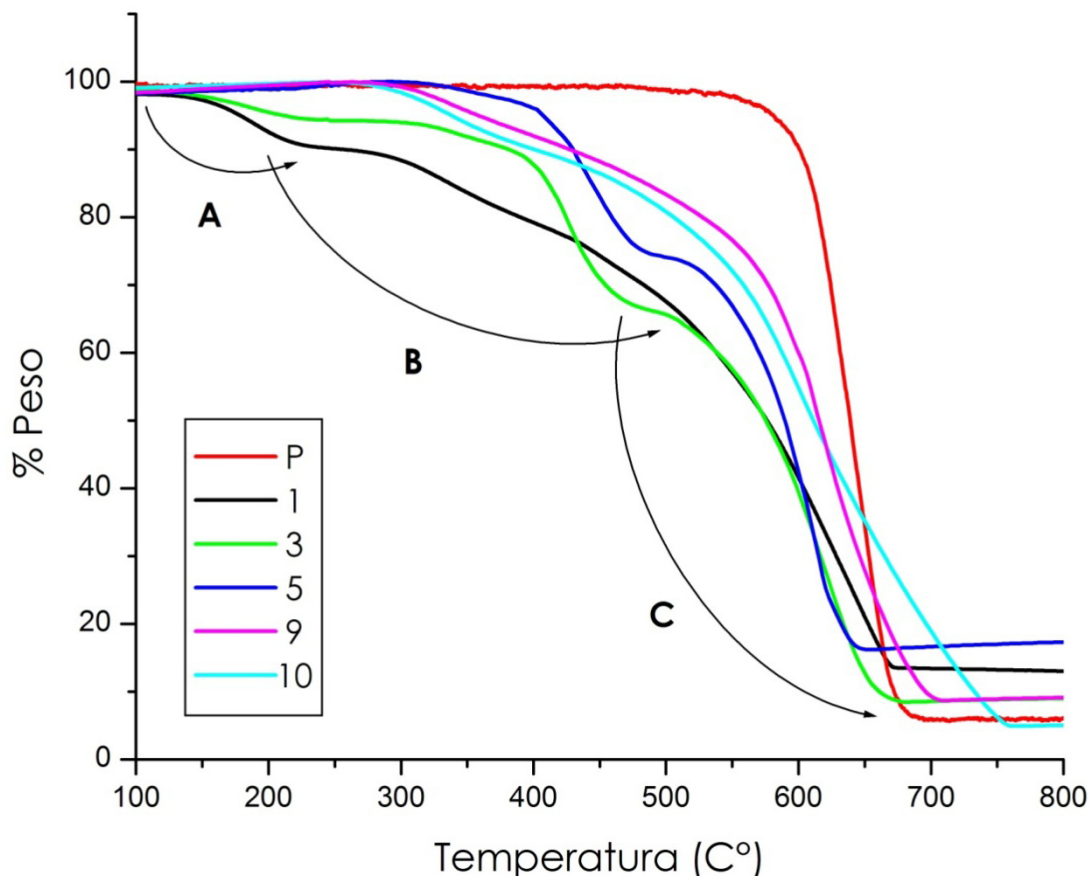


Figura 9. Curvas de TGA obtenidas para MWNTs prístinos “P” y para MWNTs-N6 de las muestras 1, 3, 5, 9 y 10. En la figura también pueden observarse 3 intervalos de temperatura generales presentes en las curvas para MWNTs-N6, los cuales están ausentes en la curva para MWNTs prístinos.

De acuerdo con los estudios realizados por Basiuk, existen 3 intervalos de temperatura característicos para una curva de TGA obtenida a partir de MWNTs-N6. Estas curvas determinan las temperaturas en las cuales se pierde determinada cantidad de peso de la muestra, debido a la descomposición de sus componentes [1]. Estos intervalos

coinciden perfectamente con los encontrados en las curvas obtenidas para las muestras de MWNTs-N6 (Figura 9). El primer intervalo “A” corresponde a la pérdida del peso atribuida a residuos de  $\epsilon$ -caprolactam que no reaccionaron con los MWNTs-DA, y que quedaron atrapados dentro de las muestras. Este intervalo se manifiesta en el rango de

0-220°C. El segundo intervalo de temperatura “B”, se encuentra alrededor de los 220-520°C, y corresponde a la pérdida de peso atribuida a la descomposición de nylon-6, que se encontraba adherido a la superficie de los MWNTs. Finalmente el tercer y último intervalo “C” de temperatura, se manifiesta después de los 520°C, e indica la pérdida final de peso atribuida a la descomposición de los MWNTs que ya no presentan nylon-6 sobre su superficie por la combustión del mismo. Tal intervalo es observado también en el gráfico perteneciente a MWNTs no funcionalizados.

Se ha estimado a través del intervalo “B”, que el porcentaje general de nylon-6 presente dentro las muestras (1-10) es alrededor del 20%, donde para las muestras 1-3 (1:1-1:0.8) se encontraron los porcentajes más altos (alrededor del 30%), y en el caso particular de las muestras 9 (1:0.2) y 10 (1:0.1) el porcentaje de nylon-6 presente no excede más allá del 10%.

Por otro lado, para las muestras 1-3 (1:1 - 1:0.8) se determinó a través del intervalo “A” que alrededor del 5 y 10% de masa pertenece a residuos de  $\epsilon$ -caprolactam, no reaccionaron durante la reacción de funcionalización. Esto concuerda con las bandas observadas en el análisis de espectroscopia de IR pertenecientes al mismo (Figura 8).

#### 4.3.4. Análisis por microscopía óptica

Al observar las imágenes obtenidas a través de microscopía óptica (Figura 11), es posible detectar claramente dos fases que componen a la muestra. A través de un análisis de espectroscopia de IR fue posible determinar la composición de estas dos fases (Figura 10).

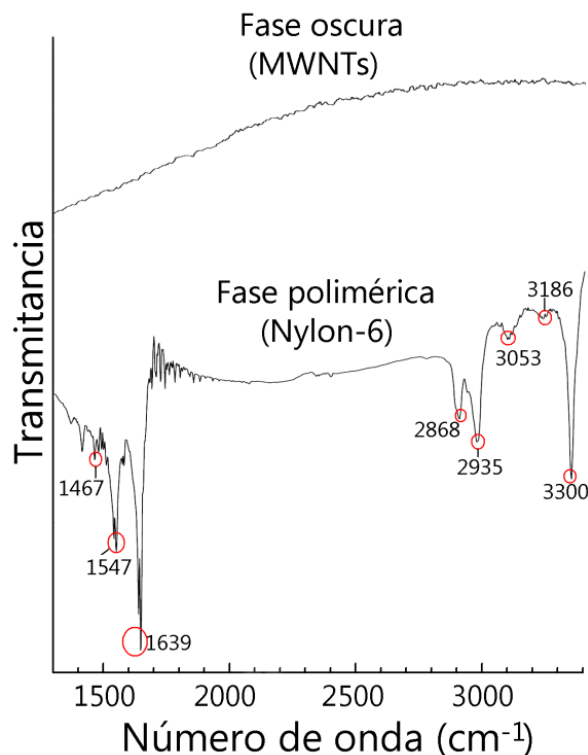


Figura 10. Espectros en el infrarrojo obtenidos para las dos fases observables dentro de la muestra 1 (1:1). El primer espectro corresponde a la fase compuesta únicamente por MWNTs; el segundo espectro corresponde a la fase polimérica, formada en su mayoría por nylon-6.

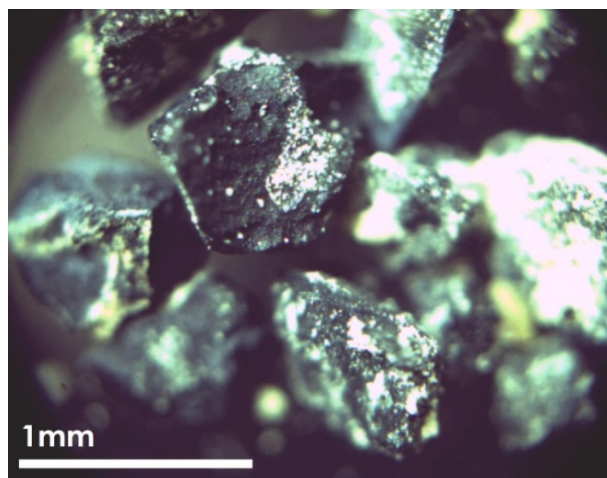


Figura 11. Micrografía óptica obtenida para la muestra 1 (relación 1:1). Se pueden observar claramente 2 fases; 1) la fase negra perteneciente a los MWNTs y 2) la fase amarillenta clara o fase polimérica compuesta por nylon-6. A su vez se observa una distribución muy heterogénea del mismo polímero.

La primera fase visible es la más abundante, y presenta un color gris oscuro, la cual está formada básicamente por conglomerados de MWNTs, y presenta un espectro muy semejante al de los MWNTs prístinos. La segunda fase de color amarillento claro corresponde a la fase polimérica de la muestra, formada por nylon-6, su espectro posee bandas muy intensas correspondientes a esta poliamida. Asimismo, es posible observar que la fase polimérica presenta una distribución muy heterogénea, donde existen zonas con una mayor concentración de nylon-6 depositado. Existen otras zonas donde

la concentración de nylon-6 es mínima o nula y estas representadas por la fase de color negro que es mucho más predominante en comparación a la fase amarillenta.

#### 4.3.5. Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las micrografías obtenidas a través de microscopía TEM (Figura 12) son muy interesantes debido a que presentan la morfología compleja de las estructuras híbridas obtenidas a través de la funcionalización de los MWNTs con  $\epsilon$ -caprolactam.

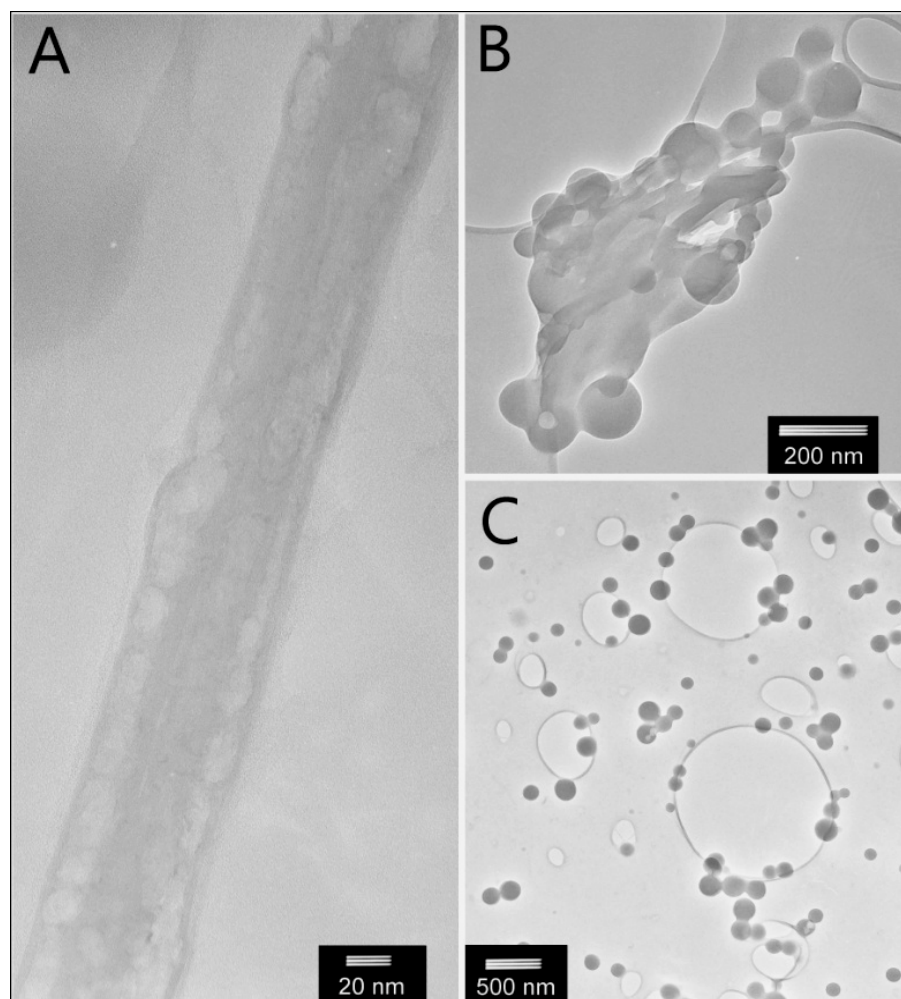


Figura 12. Micrografías TEM obtenidas para la muestra 1 (relación 1:1). Figura "A" muestra un MWNT con un diámetro de 50nm, cubierto por aglomerados de nylon-6; la figura "B" es la fase polimérica que se extrajo de la muestra de nanotubos, donde se observan aglomerados de nylon-6 alrededor de 1 μm, los cuales pueden ser desintegrados en pequeños gránulos de alrededor de 100 nm (figura "C").



En la figura "A" se observa la imagen de un MWNT cubierto por una densa capa de nylon-6 con un espesor aproximado de 20 nm. En la figura "B" se pueden observar unas esferas translúcidas de tamaño y forma muy regular de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales pertenecen a la fase polimérica amarillenta observada en las micrografías ópticas, y están formadas básicamente de nylon-6. Estas estructuras esféricas pueden ser desintegradas en pequeños gránulos con un tamaño aproximado de 10nm al ser fundidas por medio de las altas temperaturas producidas por el haz de electrones es incidido sobre la muestra con nylon-6 durante su observación al microscopio. Cabe mencionar que debido a la mala dis-

persión obtenida para las muestras en los disolventes comunes y que a pesar del tratamiento de ultrasonicación, las imágenes obtenidas fueron casi imposibles de conseguir.

#### 4.3.6. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizaron las mismas muestras empleadas para la obtención de las micrografías ópticas (Figura 13). En estas imágenes es posible observar las dos fases que componen a la muestra con MWNT-N6, y en particular con mucho mayor detalle la fase polimérica de color amarillento.

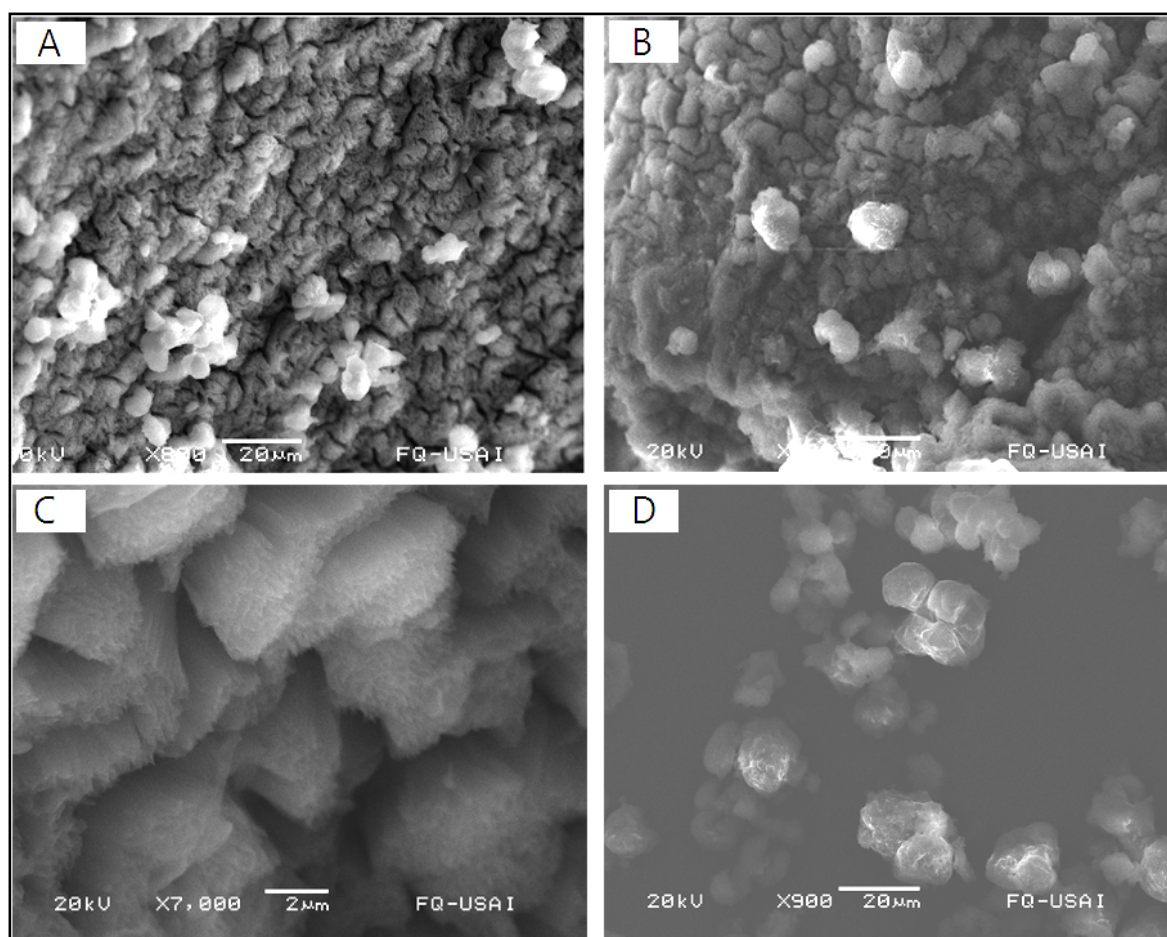


Figura 13. Micrografías obtenidas de las fases polimérica y oscura que componen las muestras empeladas anteriormente para la obtención de las imágenes ópticas.



A través de las micrografías (A, B y D), se ha determinado que la fase formada por nylon-6 está compuesta por gránulos que presentan una dimensión aproximada de 10  $\mu\text{m}$ ; sin embargo, la estructura más interesante, es la perteneciente a la fase oscura compuesta por MWNTs. Su superficie se encuentra uniformemente fracturada, de manera no muy profunda (Figura 7-A). La imagen ampliada (Figura 7-C) revela que el patrón de fracturas está formado por un gran número de láminas onduladas, las cuales se encuentran agrupadas ordenadamente. Este agrupamiento proporciona información necesaria para concluir que lo que se está observando no es una morfología típica de conglomerados de MWNT, y más bien se trata de regiones donde se ha iniciado el proceso de crecimiento de las cadenas poliméricas de nylon-6. Estas cadenas crecieron con dificultad desde el interior de los conglomerados de MWNT-DA que componían la muestra tratada con  $\epsilon$ -caprolactam.

El mecanismo por el cual se forman los aglomerados de nylon-6 aún es desconocido; sin embargo se puede observar dentro de las figuras (A, B y D) la existencia de regiones donde se forman estructuras globulares de color claro, compuestas por nylon-6. Es posible que la formación de tales estructuras globulares se deba al aumento en la temperatura durante la incidencia del haz de electrones hacia la muestra, ya que cuando la temperatura sobrepasa los 210°C (punto de fusión del nylon) las cadenas poliméricas en forma de láminas onduladas adquieren una forma de globular, tal y como sucede al derretir un material de plástico.

#### 4.4. Conclusiones

A través de la caracterización por medio de las técnicas de espectroscopia de IR (sección 4.3.2.), análisis de TGA (sección

4.3.3.) y microscopía SEM, TEM y óptica (sección 4.3.4 - 4.3.6.), se comprobó la presencia de nylon-6 unido covalentemente a la superficie de los nanotubos para las 10 muestras de MWNTs-N6.

La concentración de nylon-6 determinada a través de espectroscopia de IR, incrementa de acuerdo con la cantidad de  $\epsilon$ -caprolactam empleada para tratar las muestras de MWNTs-DA. A través del análisis de TGA (Figura 9) se estimó que el porcentaje de nylon-6 producido durante la funcionalización para las muestras 1-10 en general presentan un porcentaje promedio de nylon-6 cercano al 20%. En particular, las muestras 1 y 2 (1:1 y 1:0.9) presentaron un porcentaje cercano al 30%, con poca variación entre las mismas. Por su parte la muestra 5 mostró un porcentaje de nylon-6 cercano al 20%; mientras que para las muestras 9 y 10 (1:0.2 - 1:0.1) el porcentaje no excedió más allá del 10% del total de nylon producido. Por lo que se concluye que a bajas concentraciones de  $\epsilon$ -caprolactam la formación de nylon-6 es mínima y por lo tanto no es óptima.

Con respecto a las muestras 1-3 (1:1-1:0.8), en general son muy homogéneas respecto al contenido de nylon-6 que presentaron. Esto se atribuye a la estabilización de las reacciones de polimerización de nylon-6 a partir de la muestra 3 (1:0.8), tal lo cual se fundamenta a través de la detección de residuos de  $\epsilon$ -caprolactam que no reaccionaron durante la formación de nylon-6 (Figura 8). Estos residuos se presentan en un rango del 5 al 10% dentro de las mismas muestras (Figura 9), indicando que un tratamiento excesivo con  $\epsilon$ -caprolactam dentro de las muestras de MWNTs-DA, no proporciona las condiciones adecuadas para una polimerización óptima, ya que se disminuye la probabilidad de que  $\epsilon$ -caprolactam se transforme en nylon-6 y queda atrapado dentro de los conglomerados de MWNTs-N6

como residuos inertes. No obstante, tales residuos parecen encontrarse ausentes en las muestras 4 – 8 (1:0.7-1:0.3), donde el porcentaje de nylon-6 producido es relativamente abundante (Figura 8), y pueden ser propuestas para futuras aplicaciones biomédicas, entre otras (Apéndice A, B). Por lo tanto, se concluye que no es necesario saturar las muestras de MWNTs-DA con  $\epsilon$ -caprolactam durante su tratamiento para obtener una óptima funcionalización.

Por otro lado, las imágenes obtenidas a través de microscopía óptica (Figura 11) revelaron la morfología para una nueva nanoestructura híbrida formada por MWNTs-N6. Esta morfología está compuesta principalmente por 2 diferentes fases, que de acuerdo con los análisis de IR (Figura 10) la fase predominante y de color oscuro corresponde a los MWNTs prístinos, mientras que la fase amarillenta con distribución heterogénea, corresponde al nylon-6 unido a la superficie de los mismos. Las imágenes obtenidas por microscopía SEM (Figura 13) corroboran lo anterior, ya que no sólo muestran la distribución heterogénea del polímero sobre la superficie de los MWNTs, sino también revelan una estructura mucho más detallada en ambas fases descritas.

Los conglomerados de MWNTs, parecen estar organizados en un patrón de laminillas onduladas sobre una superficie uniformemente fracturada, mientras que la fase polimérica de nylon-6 se encuentra organizada en cúmulos semiredondos con dimensiones cercanas a los 10  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con las imágenes obtenidas por microscopía TEM (Figura 12), estos cúmulos están formados por pequeños aglomerados de nylon (aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ ), los cuales a su vez al ser derretidos por el haz de

electrones del mismo microscopio, forman gránulos de no más de 10 nm de diámetro.

Cabe mencionar la necesidad de realizar una serie de estudios posteriores que permitan determinar con mayor precisión los parámetros de la reacción de funcionalización de Nylon-6. De este modo se evitaría la aparición de residuos de  $\epsilon$ -caprolactam presentes en las muestras y se llevaría a cabo una reacción de polimerización para nylon-6 mucho más óptima y eficiente a concentraciones mayores a las obtenidas en el presente estudio. Por otro lado se requieren estudios que puedan determinar las propiedades físico-químicas de los MWNTs-N6 obtenidos, permitiendo determinar con detalle las posibles aplicaciones que se puedan desarrollar con estas nanoestructuras dentro de diferentes áreas de estudio (Apéndice A), y en particular en áreas interés biológico y biomédico (apéndice B).

Por tal motivo, es imprescindible realizar estudios biológicos que determinen la presencia o ausencia de actividad tóxica para estas nanoestructuras, con el fin de llevar a cabo con seguridad las futuras aplicaciones dentro de sistemas biológicos [9,10,11]. Por tal razón, en el presente estudio se realiza una prueba de biocompatibilidad (Capítulo 5) empleando la muestra 1 (1:1), la cual complementaría la escasa información que existe acerca de las propiedades tóxicas atribuidas a los nanotubos de carbono [12,13,14]. Haciendo uso de una prueba citogenética altamente validada conocida como “la prueba de micronúcleos” (Capítulo 6), se determinan algunas de las propiedades toxicológicas para los MWNTs prístinos y los MWNTs-N6.

---

## Referencias

- [1] Basiuk, V.A.; Salvador-Morales C., Basiuk, E. V.; Jacobs, R.; Ward M.; Chu, B.; Sim, R.B.; Green, M. L. H. (2006): "Green" derivatization of carbon nanotubes with Nylon 6 and L-alanine. *Journal of Materials Chemistry*; 16: 4420-4426.
- [2] Basiuk, E. V.; Monrroy-Peláez, Marel.; Puente-Lee, I.; Basiuk, V. A. (2004): Direct Solvent-Free Amination of Closed-Cap Carbon Nanotubes: A Link to Fullerene Chemistry. *Nano Letters*; 4:863-866.
- [3] Basiuk, E. V.; Gromovoy, T. Y.; Datsyuk, A.; Palyanytsya, B. B.; Pokrovskiy, V. A. (2005): Solvent-free derivatization of pristine multi-walled carbon nanotubes with amines. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*; 5: 984-990.
- [4] Basiuk, E. V.; Puente-Lee, J.- L.; Sánchez, C.; Basiuk, V. A. (2006): Gas-phase functionalization of carbon nanotubes. *Materials Letters*; 60: 3741-3746.
- [5] Kataura, H.; Achiba, Y; Zhao, X.; Ando, Y. (1999): Resonance Raman Scattering of Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Furaren Sogo Shinpojumu Koen Yoshishu*; 16:116-117.
- [6] Domingo. C.; Santoro, G. (2007): Espectroscopia RAMAN de nanotubos de carbono. *Óptica Pura y Aplicada*; 40:175-180
- [7] Coltelli, M.-B.; Angiuli, M.; Passaglia, E.; Castelvetro V.; Ciardelli, F. (2006): Formation of short and long chain branches during the free radical functionalization of polyamide 6 in the melt *Macromolecules*; 39:2153 -2161.
- [8] Gao, J.; Itkis, M. E.; Yu, A.; Bekyarova, E.; Zhao, B.; Haddon, R. C. (2005): Continuous Spinning of a Single-Walled Carbon Nanotube-Nylon Composite Fiber. *Journal of the American Chemical Society*; 127:3847-3854.
- [9] Williams, D. F. (2003): Revisiting the Definition of Biocompatibility. *Medical Device Technology*; 14: 10-13.
- [10] Shim, M.; Shi Kam, N. W.; Chen, R. J.; Li, Y.; Dai H. (2002): Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition. *Nano Letters*; 2:285 -288
- [11] Jia, G.; Wang, H.; Yan, L.; Wang, X.; Pei, R.; Yan, T.; Zhao, Y.; Guo, X. (2005): Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene. *Environmental Science & Technology*; 39: 1378-1383.
- [12] Decordier, I.; Kirsch-Volders, M. (2006): The *in vitro* micronucleus test: From past to future. *Mutation Research*; 607:2-4.
- [13] Klaassen, C. D.; Ph., D.; Watkins III, J. B. (2003): *Essentials of Toxicology*. (ed.) McGraw Hill, New York; 523 pp.
- [14] Zalacain, M.; Sierrasesúmag, L.; Patiño, A. (2005): The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents, *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; 28:227-236.

# CAPÍTULO

## 5

### Estudios de biocompatibilidad para nanotubos de carbono

#### 5.1. Biocompatibilidad

La definición de biocompatibilidad tradicionalmente se refiere a la habilidad de un material para actuar con una respuesta apropiada, a través de una aplicación específica dentro de un sistema biológico de manera segura, y sin causar daños o efectos adversos [1]. Sin embargo, esta definición se basa únicamente en los materiales en sí y no en las distintas aplicaciones de los mismos. Williams, D. F. propone que el concepto de biocompatibilidad debe redefinirse en relación con la variedad de aplicaciones que el material pueda poseer y no al material en sí, respetando las bases originales del concepto [2].

##### 5.1.1. Estudios de biocompatibilidad

La necesidad de realizar estudios de la biocompatibilidad surge a partir del reconocimiento de la notoria diferencia entre un tejido vivo y los materiales no vivos. La existente y común interacción entre tejidos vivos y materiales implantados es bien conocida. Tal interacción puede originar efectos benéficos o perjudiciales dentro de un sistema biológico. Aquel material diseñado para interactuar con los sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir

alguna función o estructura dentro de dichos sistemas es conocido como "biomaterial". El estudio de biocompatibilidad entonces se entiende como la descripción y caracterización de una respuesta reproducible por parte del sistema biológico, en relación con el biomaterial en cuestión [3].

Recientemente, ha surgido el interés por el desarrollo de potenciales aplicaciones biológicas a partir de novedosos nanomateriales, especialmente por aquellos obtenidos a partir de nanotubos de carbono, debido a las magníficas propiedades físicas y químicas que poseen. Un hecho importante es que la específica funcionalización de los nanomateriales es un factor crucial para su reconocimiento e interacción dentro de los sistemas biológicos. De acuerdo con lo anterior, es necesario realizar estudios de biocompatibilidad para determinar la posible actividad tóxica de estos nanomateriales, permitiendo llevar a cabo con seguridad aplicaciones *in vivo* dentro de los sistemas biológicos [4].

Para determinar la biocompatibilidad de estos nanomateriales deben realizarse diversos estudios toxicológicos. La toxicología está encargada de estudiar los efectos adversos que los agentes físicos y químicos pueden causar en los organismos vivos. Dentro de la toxicología existen diversas

áreas encargadas del estudio de los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares con los que tales agentes provocan sus efectos adversos [5].

Dentro de las pruebas toxicológicas recomendadas para determinar la biocompatibilidad, destacan las pruebas para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de un biomaterial [6]. El término citotóxico es empleado para describir la capacidad de un agente para producir la muerte o inhibir el crecimiento de las células [7]. En contraste el término genotóxico es utilizado para describir la capacidad de un agente para inducir cambios adversos sobre la estructura y expresión del material genético de una célula, dando origen a mutaciones y aberraciones cromosómicas. Estos cambios pueden producir la transformación de las células durante el proceso de carcinogénesis [8].

## 5.2. Antecedentes sobre la biocompatibilidad de los nanotubos de carbono

Se han realizado diversos estudios toxicológicos para poder determinar si estos nanomateriales pueden ser utilizados con seguridad en los sistemas biológicos. Sin embargo la mayoría de estos estudios se han enfocado en determinar la biocompatibilidad para los SWNTs prístinos, y un porcentaje muy pequeño se ha dedicado exclusivamente al estudio de los MWNT prístinos.

Shvedova y colaboradores, realizaron estudios con SWNTs, utilizando células de queratinocitos de piel humana. Ellos proponen que los SWNTs prístinos que tienen niveles de pureza bajos (metales, carbono amorfo, etc.) están muy relacionados con la inducción de estrés oxidante debido a la formación de radicales libres, acumulación de productos peroxidantes, inhibición antioxidante y pérdida de la viabilidad celular, dañando componentes celulares, DNA, etc.,

así como la inducción de los mecanismos naturales de reparación para los mismos [9]. Otro estudio realizado por Manna y colaboradores con el mismo tipo celular, demostró que los SWNTs poseen propiedades antiproliferativas a través de la inducción de estrés oxidante y de la inducción del factor TNF $\alpha$  por medio de proteínas proinflamatorias (NF- $\kappa$ B, IL6, IL8, etc.) [10]. A su vez, Fenoglio y colaboradores describen dentro de su estudio que los MWNTs no son generadores de ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés) significativamente, y que más bien actúan como “scavengers” atrapando ROS en solución [11].

En los estudios realizados por Jia y colaboradores, se reportó la relativa citotoxicidad de SWNTs, MWNTs y C<sub>60</sub> utilizando macrófagos alveolares de cobayos adultos. Ellos determinaron que la magnitud de la citotoxicidad de estos nanomateriales aparentemente tiene el siguiente orden: SWNTs > MWNTs > C<sub>60</sub> [12]. Resultados similares obtuvieron en un estudio realizado por Salvador-Morales y colaboradores. Utilizando SWNTs y nanotubos de pared doble (DWNTs, por sus siglas en inglés), detectaron que los niveles de proteínas relacionadas con la activación de la respuesta inmune incrementaban considerablemente en presencia de SWNTs en comparación con la presencia de DWNTs [13]. Estos estudios proponen que el tamaño de un nanotubo (diámetro del nanotubo, grado de dispersión, formación de agregados, etc.) influye considerablemente sobre sus propiedades citotóxicas [14].

Posteriormente Tian y colaboradores empleando fibroblastos humanos, compararon los efectos producidos por SWNTs y MWNTs prístinos con niveles de pureza bajos contra los efectos producidos por los mismos con un nivel de pureza mucho mayor, así como los efectos debidos a la dispersión de los mismos. A través de este

estudio determinaron que los SWNTs presentaban un efecto citotóxico mucho mayor a efecto causado por los MWNTs, también observaron que los nanotubos de carbono con niveles de pureza bajos eran responsables de la producción de ROS e inducción de estrés oxidante, mientras que los nanotubos con niveles de pureza mucho mayor se relacionaban estrechamente a procesos de apoptosis y necrosis celular. En el mismo estudio se determinó que los conglomerados de nanotubos de carbono, causaban un efecto citotóxico mucho menor al provocado por los nanotubos que se dispersaban homogéneamente en solución, ya que el área de contacto con las células era mucho mayor para estos últimos [15]. Estudios realizados por Wick y colaboradores, corroboraron que el grado de aglomeración en los nanotubos influye en sus propiedades citotóxicas [31]. Estos estudios recalcan la importancia que tiene el tamaño y la dispersión de las partículas sobre su efecto tóxico.

Lindberg, y sus colaboradores, han demostrado a través de pruebas citogenéticas (micronúcleos y ensayo cometa) empleando células epiteliales bronquiales, que diversos nanomateriales como SWNTs aparentemente poseen propiedades genotóxicas, a través de la interacción directa con el DNA o a través de vías indirectas por la inducción de estrés oxidante y respuesta inflamatoria [32]. Al mismo tiempo Muller y colaboradores utilizando células epiteliales, encontraron incrementos significativos dosis-dependiente en la frecuencia de daño al DNA al ser tratados con MWNTs, adjudicándole a estos nanomateriales la capacidad de inducir eventos genotóxicos [16].

En realidad existen muy pocos reportes enfocados en determinar las propiedades tóxicas de nanotubos funcionalizados. Sin embargo los reportes existentes demuestran que dependiendo del tipo de funcionalización el grado de biocompatibilidad

podría aumentar o disminuir. Bottini y colaboradores, comparando MWNTs prístinos y MWNTsox (funcionalizados por el método de oxidación), determinaron que la frecuencia de apoptosis en linfocitos humanos aumentaba de manera considerablemente al exponerlos a MWNTsox en comparación a la exposición a MWNTs prístinos [17]. En contraste otro estudio realizado por Salvador-Morales y colaboradores indica que la activación del sistema de complemento a través de la vía clásica, es mínima cuando es activada por efecto de MWNTs funcionalizados con aminas (ej. 1,8-diaminooctano,  $\epsilon$ -caprolactam.etc.), mientras que los MWNTs prístinos elevan los niveles de proteínas asociadas con la activación de la respuesta inmune de manera considerablemente alta [18].

### 5.3. Bioensayos citogenéticos

Es posible determinar la actividad genotóxica y citotóxica de un nanomaterial a través de bioensayos que emplean técnicas de citogenética *in vitro*. Estos ensayos emplean cultivos de diferentes linajes de células eucariontes (linfocitos, eritrocitos, células de medula ósea, etc.), exponiéndolos directamente al agente en estudio. Estos ensayos tienen como ventaja la observación directa de las células a través del microscopio, lo cual facilita la detección de las posibles anomalías producidas por tal agente en cuestión. En los bioensayos de citogenética convencionales, las células deben ser tratadas con algún agente durante un periodo de gran sensibilidad (normalmente durante la fase de síntesis de DNA "S" del ciclo celular), y los daños celulares incluyendo el daño visible a los cromosomas, deben ser evaluados al término de la primera división mitótica después del tratamiento. Es importante que el número de células analizadas durante el análisis sea considerablemente alto para evitar resultados equívocos e inconclusos [5].



### 5.3.1 La prueba de micronúcleos como biomarcador de eventos genotóxicos y citotóxicos.

Sin duda alguna uno de los bioensayos citogenéticos más utilizados debido a su accesibilidad y facilidad es la “Prueba de Micronúcleos” en linfocitos humanos. Esta prueba ha sido universalmente validada como un potente biomarcador dentro de las pruebas toxicológicas [19].

Existen tres métodos que pueden utilizarse para evaluar este biomarcador: 1) “el método tradicional” que consiste en la tinción de las células a través del colorante giemsa; 2) el método por bloqueo de la citocinesis, el cual es ampliamente usado y consiste en inhibir la síntesis de actina a través de la citocalasina B durante la telofase. El resultado de esta técnica es la obtención de células binucleadas sobre las cuales es posible observar daños inducidos [19,20]; 3) el método por incorporación de la bromo-

desoxiuridina (BrdU), el cual hace uso de técnicas inmunohistoquímicas para la tinción e identificación de los bioindicadores asociados con el daño celular [20].

Asimismo, la prueba de micronúcleos emplea diversos bioindicadores para la evaluación de eventos genotóxicos y citotóxicos [21,22]. Se ha observado que el nivel de daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica refleja la cantidad de daño en células precursoras que promueven el proceso de carcinogénesis en tejidos blancos o más susceptibles. Es por eso que los biomarcadores empleados en esta prueba están fuertemente correlacionados con el riesgo al desarrollo de cáncer [23,24].

Los principales bioindicadores que pueden ser evaluados a través de la prueba de micronúcleos son: a) micronúcleos; b) puentes nucleoplásmicos; c) gemaciones de cromatina; d) inducción de muerte celular por apoptosis o necrosis (Figura 1).

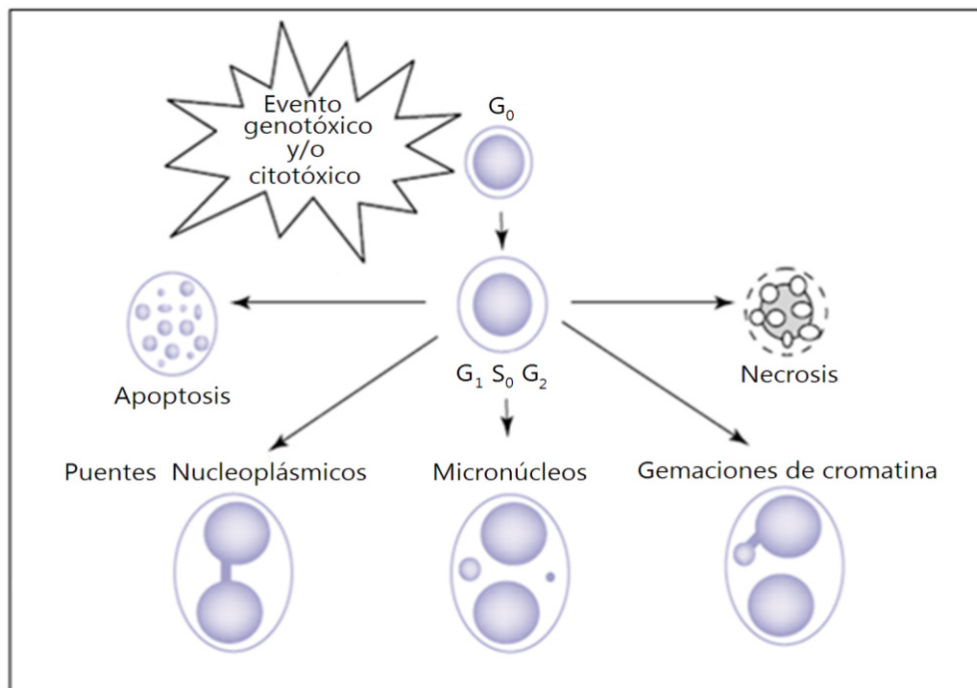


Figura 1. Diferentes bioindicadores que pueden ser evaluados dentro de la prueba de micronúcleos y que reflejan tanto eventos genotóxicos como citotóxicos [25].

### 5.3.1.1. Micronúcleos

Los micronúcleos o también conocidos como cuerpos de Howell-Jolly en eritrocitos [22], son fragmentos de cromosomas acéntricos o cromosomas completos que no logran incorporarse al huso mitótico durante la división celular. Estos a su vez quedan excluidos del núcleo principal durante la telofase, dando lugar a un núcleo secundario de menor tamaño [22,25].

Se han propuesto dos mecanismos básicos que pueden dar origen a micronúcleos (Figura 2) [19]. El primer mecanismo es el rompimiento de cromosomas debido a un agente clastogénico, el cual tiene la capacidad de romperlos y de provocar rearrreglos en su estructura [22,26], originando fragmentos acéntricos que son incapaces de adherirse al huso mitótico del núcleo de las células hijas durante la mitosis [20]. El segundo mecanismo es la alteración de la maquinaria de segregación de los cromosomas, provocada por agentes aneuploidogénicos

que interactúan con proteínas del cinetocoro, durante la formación del huso mitótico, lo que genera un rezago anafásico de cromosomas completos y culmina en un reparto no equitativo entre las células hijas durante la segregación [19,20,22]. Existe un tercer mecanismo indirecto propuesto recientemente llamado "gemación nuclear". Este mecanismo puede originar micronúcleos o estructuras semejantes a estos debido a la inducción de amplificación génica durante la fase de síntesis de DNA [25].

Se sabe que existe una tasa basal espontánea de micronúcleos originada por errores naturales, la cual no es necesariamente inducida por exposición directa a diversos agentes genotóxicos y citotóxicos durante la división celular. Esta aparición espontánea dependería principalmente del estilo de vida, del ambiente geofísico que rodea al individuo, factores genéticos como polimorfismos o síndromes, y también la edad del individuo [19,21].

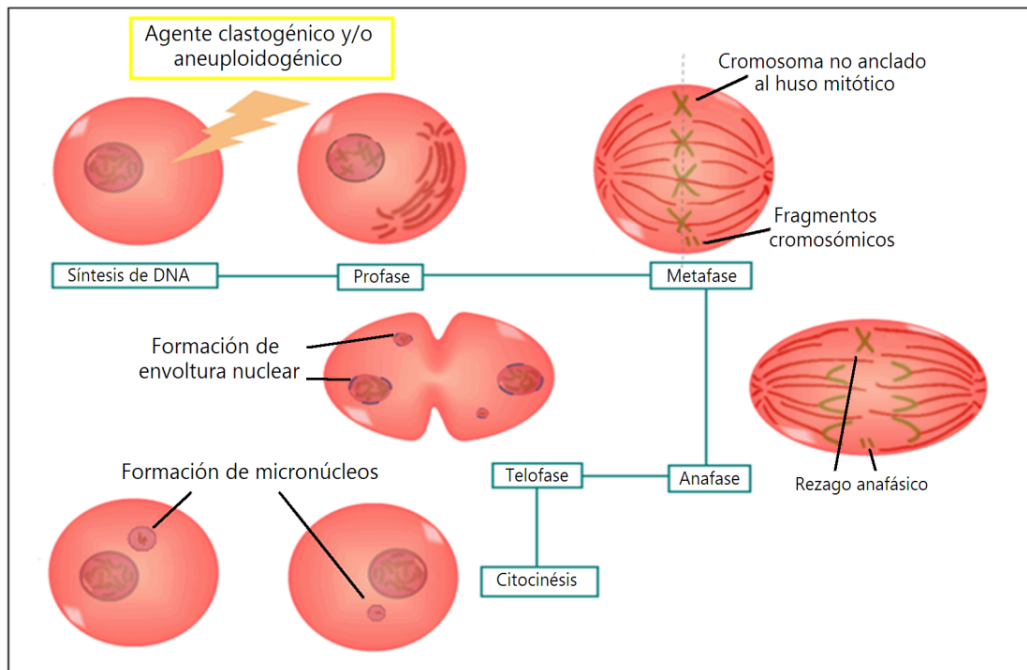


Figura 2. Mecanismos básicos generadores de micronúcleos debido a diferentes agentes genotóxicos (<http://www.cancerquest.emory.edu/images/mitosis-cyclai.gif>).

### 5.3.1.2. Puentes nucleoplásmicos

Recientemente se propuso un nuevo bioindicador dentro de la prueba de micronúcleos conocido como “puentes nucleoplásmicos”. De acuerdo con el modelo (Figura 3) de “rompimiento y fusión” propuesto por McClincktock, los puentes nucleoplásmicos se originan cuando dos cromátidas hermanas sufren un doble rompimiento debido a un agente clastogénico [25,27]. Los pequeños fragmentos de cromosomas restantes, pueden dar origen a micronúcleos (Figura 3), o quedar incluidos dentro de alguno de los núcleos principales.

Debido al rompimiento de las cromátidas se originan terminaciones “pegajosas” o cohesivas, las cuales permiten la fusión distal de los fragmentos (posiblemente te-

lomérica), formando un solo cromosoma dicéntrico, el cual posee ahora dos centrómeros. Durante la anafase, las cromátidas hermanas fusionadas que dieron origen al cromosoma dicéntrico son atraídas al mismo tiempo hacia polos opuestos dentro de la célula [23], y cuando la célula entra en telofase comienza la formación de la membrana nuclear en cada una de las células hijas, pero también alrededor del cromosoma dicéntrico formados. Como consecuencia se forma una conexión entre los núcleos de las células hijas, como si existiera un puente entre los dos núcleos al término de la citocinesis [25]. El puente formado entre los dos núcleos puede romperse debido a la fuerza de atracción que ejercen los polos opuestos sobre el cromosoma dicéntrico provocando un rompimiento asimétrico del mismo.

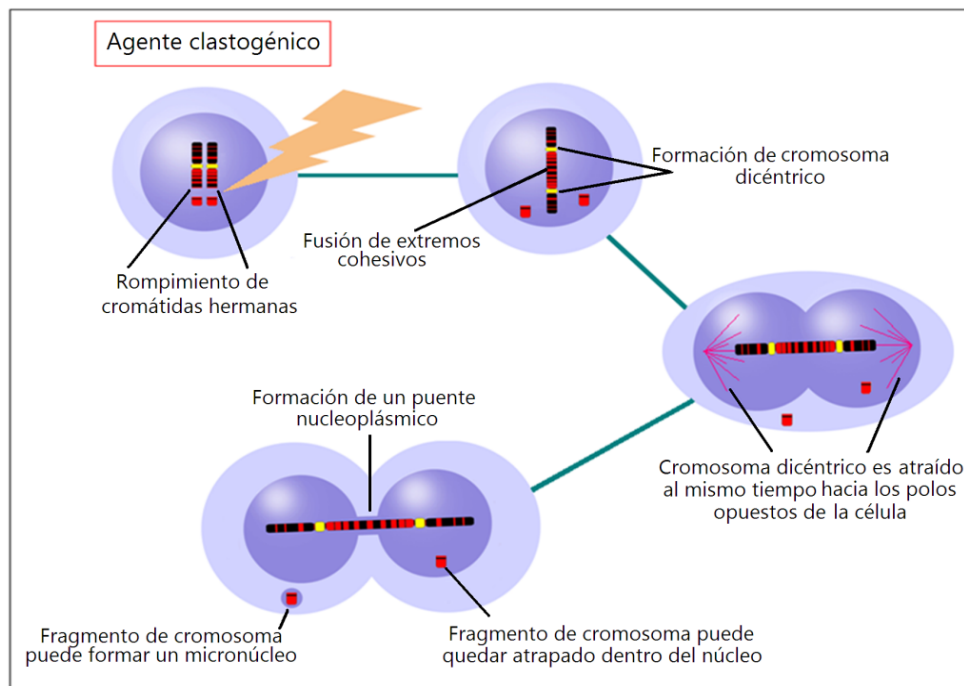


Figura 3. Mecanismo de inducción de puentes nucleoplásmicos entre dos núcleos que comparten el mismo citoplasma.

### 5.3.1.3. Gemaciones de Cromatina

Las gemaciones de cromatina son estructuras originadas durante la fase de

síntesis, las cuales presentan la misma morfología que los micronúcleos, a excepción de que éstas quedan unidas al núcleo principal a través de una unión en forma de “cuello”.

La longitud de este cuello depende del estadio en el que se encuentre durante su proceso de gemación [25]. En un principio se pensaba que estas estructuras no reflejaban ningún evento de genotoxicidad, por lo que no eran considerados como biomarcadores dentro de la prueba de micronúcleos;

sin embargo diferentes estudios demostraron que la frecuencia de aparición de estas estructuras incrementaba considerablemente cuando las células eran expuestas ante un agente genotóxico, y más tarde fueron consideradas como uno más de los biomarcadores dentro de esta prueba [20].

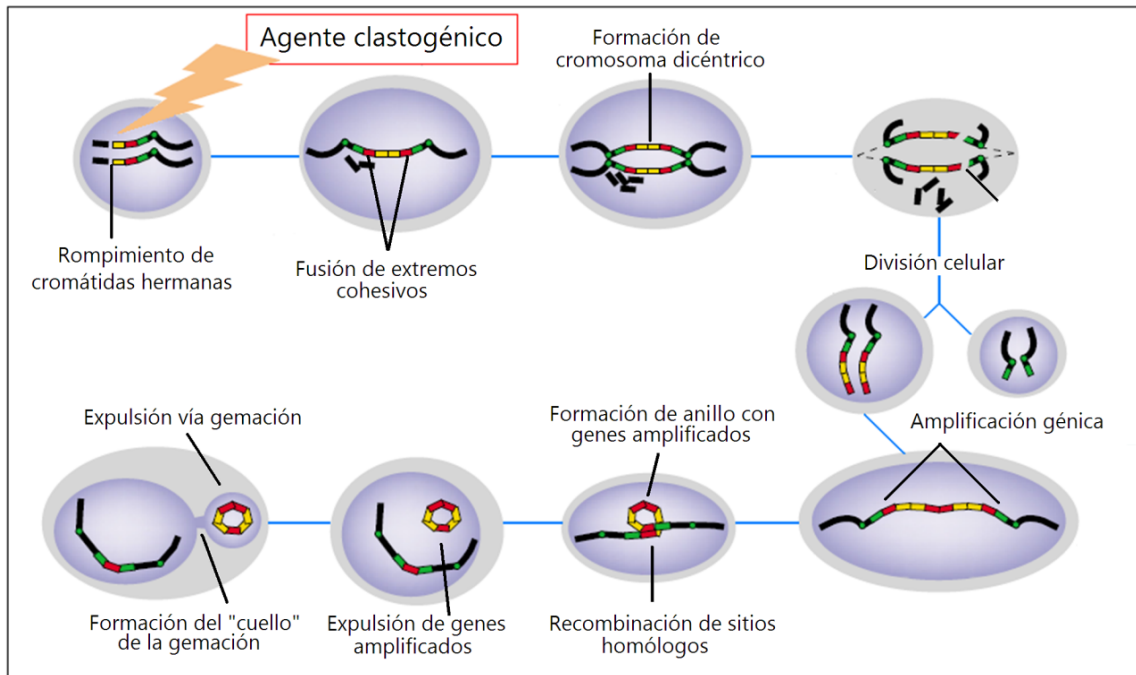


Figura 4. Modelo propuesto por Fenech para la inducción de la amplificación de DNA durante la formación de gemaciones de cromatina [25].

El mecanismo por el cual se generan las gemaciones es conocido como “eliminación vía gemación nuclear” (Figura 4). De acuerdo con el modelo, debido a la formación de cromosomas dicéntricos durante la citocinesis, y su posterior rompimiento asimétrico, las cromátidas resultantes podrían fusionarse nuevamente durante la interfase dando lugar a un cromosoma dicéntrico. Este cromosoma presenta tanto dos copias de uno o más genes, como fragmentos que no han sido amplificados. El modelo propone que los genes amplificados serán eliminados a través de la recombinación de regiones homólogas localizadas entre las regiones amplificadas. Posteriormente, se forman pequeños anillos acéntricos de DNA que no

contienen telómeros. Estos anillos son conocidos como “minutas dobles”, y son reconocidos por el núcleo como secuencias extranucleares que no encajan dentro de la matriz nuclear, ya que presentan una gran actividad de reparación y de procesos de “house keeping”. Finalmente son enviados hacia la periferia del núcleo y son excretados lentamente [25]. Durante el proceso de carcinogénesis, la amplificación de genes es uno de los mecanismos que una célula transformada emplea para obtener resistencia a diferentes fármacos, y sobrevivir adaptando ante un ambiente de estrés, evadiendo la respuesta inmune e incrementando su proliferación, promoviendo la progresión de tumores en tejidos específicos [25].

### 5.3.1.4. Muerte celular

Existen dos modalidades básicas de muerte celular (Figura 5), las cuales difieren tanto en origen como en morfología. El primer tipo de muerte celular es conocido como necrosis, la cual es una muerte patológica originada por procesos catabólicos pasivos como respuesta a un factor externo (inflamación, isquemia, agentes tóxicos, daños mecánicos, infecciones etc.). Se caracteriza principalmente por la pérdida de la membrana plasmática, hinchamiento de las mitocondrias, dispersión de la cromatina y la violenta destrucción temprana de la estructura celular [28].

En contraste, el segundo tipo de muerte celular conocido como apoptosis es una muerte genéticamente codificada de metabolismo activo, la cual puede ser me-

diada por diferentes rutas seleccionadas evolutivamente para mantener la homeostasis de la población celular en un tejido. La apoptosis ocurre tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas. Se caracteriza principalmente por la ondulación de la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, y la activación de procesos endonucleares, los cuales permiten la segmentación secuencial del DNA en fragmentos diminutos de unos cuantos pares de bases. Debido a la fragmentación y a la condensación del DNA se forman pequeñas estructuras esféricas conocidas como “cuerpos apoptóticos”, los cuales son posteriormente removidos y fagocitados por los macrófagos del tejido, evitando la filtración del contenido citoplasmático al espacio intercelular. A diferencia de la necrosis este proceso minimiza la inflamación y evita el posible daño a células vecinas [28].

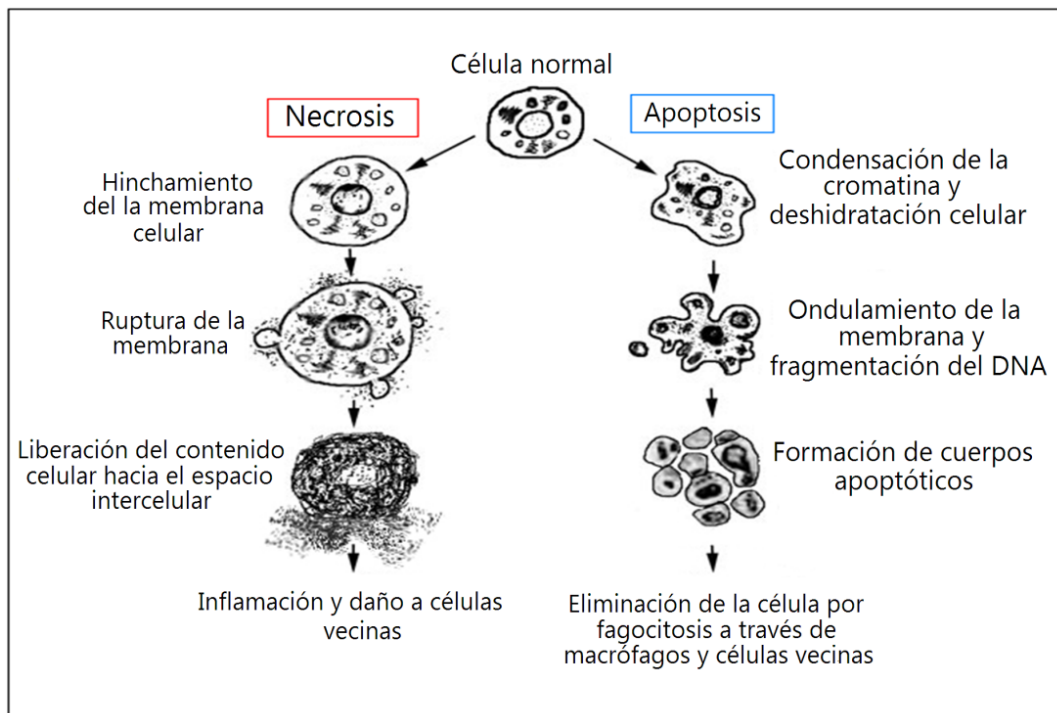


Figura 5. Modalidades básicas de muerte celular. En el lado derecho la apoptosis, del lado izquierdo la necrosis (<http://hercules oulu.fi/isbn9514266676/html/graphic11.jpe>).



Existen dos rutas esenciales para la inducción de apoptosis en las células (figura 6). La primera vía es conocida como “vía extrínseca” e involucra la activación de receptores transmembranales de muerte celular en respuesta a señales extracelulares inducidas por los ligandos como los TNF

(TNF $\alpha$ , Fas L y Trail) que a su vez inducen una serie de señales intracelulares que promueven la activación de un grupo de proteasas conocidas como “caspasas”. Las caspasas tienen la función de degradar diversas proteínas y componentes intracelulares, promoviendo así el inicio de la apoptosis [29].

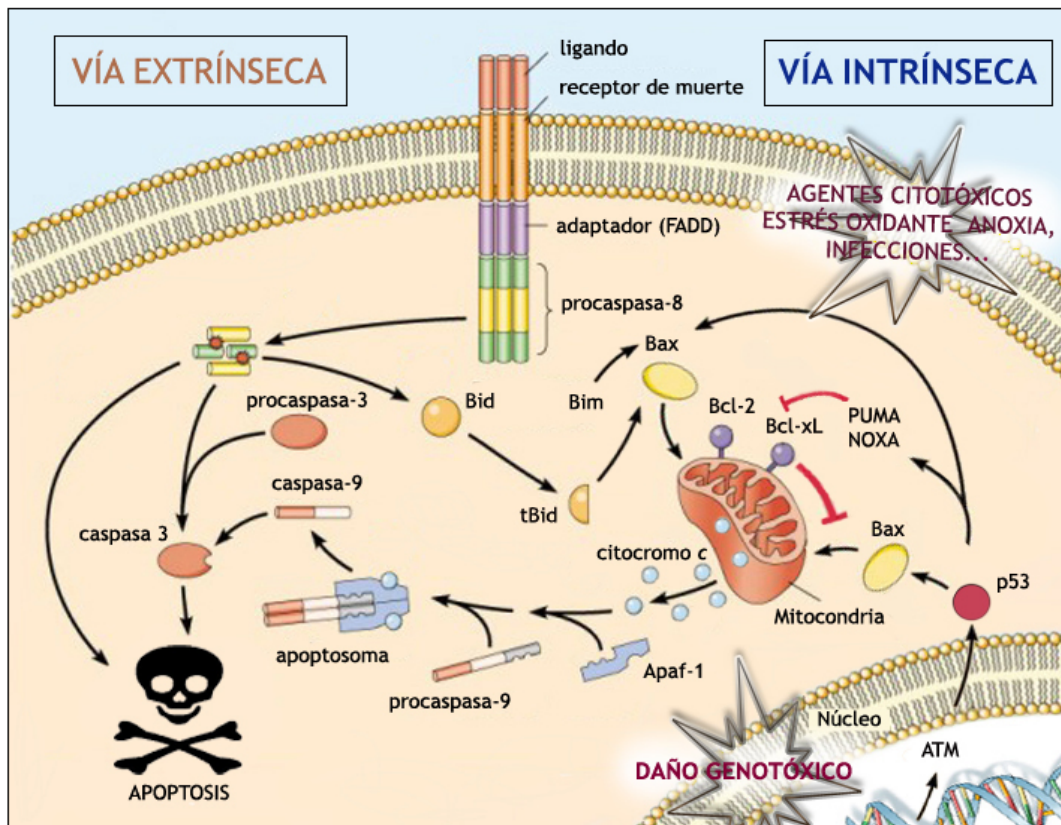


Figura 6. Modelo muy básico que esquematiza las vías de inducción para apoptosis (<http://www.meduniwien.ac.at/pharmakologie/mitarbeiter/images/apoptosis.jpg>).

La segunda vía es la intrínseca o vía mitocondrial, esta vía es activada principalmente por la proteína nuclear p53. Cuando un agente genotóxico causa daños irreparables sobre el material genético de la célula, p53 arresta el ciclo celular e induce la transcripción de genes proapoptóticos y generadores de ROS, que dan lugar a la liberación de proteínas mitocondriales conocidas como “citocromos c”, desde la mitocondria hacia el citosol. La vía intrínseca también

puede ser promovida por la ausencia de factores de crecimiento, falta de nutrientes, hipoxia, estrés oxidante, agentes citotóxicos etc. Estos agentes producen un cambio en la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria, promoviendo también la liberación del citocromo c. El citocromo c que es liberado a causa de cualquiera de estos casos, promueve la activación de las caspasas, y el inicio de la apoptosis celular [29,30].



---

## Referencias

- [1] Williams, D. F. (1999): The Williams Dictionary of Biomaterials. (ed.) Liverpool University Press, Liverpool; 368 pp.
- [2] Williams, D. F. (2003): Revisiting the Definition of Biocompatibility. *Medical Device Technology*; 14: 10-13.
- [3] Rodríguez Rius, D. (1999): *Obtención de capas de nitruro de titanio mediante tratamiento termoquímico en titanio y Ti6Al4V y caracterización de sus propiedades para aplicaciones biomédicas*. Tesis. Univesidad Politécnica de Cataluña. Cataluña; 138 pp.
- [4] Shim, M.; Shi Kam, N. W.; Chen, R. J.; Li, Y.; Dai H. (2002): Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition. *Nano Letters*; 2:285 -288
- [5] Klaassen, C. D.; Ph., D.; Watkins III, J. B. (2003): *Essentials of Toxicology*. (ed.) McGraw Hill, New York; 523 pp.
- [6] Pareja López, A.; Garcia Garcia, C. P.; Abad Mejia, P. J.; Máquez Fernandez, M. E. (2006): Estudio in vitro de la citotoxicidad y genotoxicidad de los productos liberados del acero inoxidable 316L con recubrimientos cerámicos bioactivos. *IATREIA*; 20:12-20.
- [7] Jiménez Planas, A. (2003): *Compartamiento de los materiales en el medio biológico. Biocompatibilidad de los materiales*. In: Arte y ciencia de los materiales odontológicos. (ed) Avances; 537pp
- [8] Alghabban, A. (2004): *Dictionary of Pharmacovigilance*. (ed.) USA; 1: 554 pp.
- [9] Shvedova, A. A.; Castranova, V.; Kisin, E.R.; Schwegler-Berry, D.; Murray, A.R.; Gandelsman, V.Z.; Maynard, A.; Baron, P. (2003): Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*; 66: 1909–1926.
- [10] Manna, S. K.; Sarkar, S.; Barr, J.; Wise, K.; Barrera, E. V.; Jejelowo, O.; Rice-Ficht, A. C.; Ramesh, G. T. (2005): Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor-KB in Human Keratinocytes. *Nano Letters*; 5:1676-1684.
- [11] Fenoglio, I.; Tomatis, M.; Lison, D.; Muller, J.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Fubini B. (2006): Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity?. *Free Radical Biology & Medicine*; 40:1227–1233.
- [12] Jia, G.; Wang, H.; Yan, L.; Wang, X.; Pei, R.; Yan, T.; Zhao, Y.; Guo, X. (2005): Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene. *Environmental Science & Technology*; 39:1378-1383.
- [13] Salvador-Morales C.; Flahaut, E.; Sim, E.; Sloan, J.; Green, M. L. H.; Sim, R. B. (2006): Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Molecular Immunology*; 43:193-201.
- [14] M. V. Raja, P.; Connolley, J.; Ganesan, G. P.; Ci, L.; Ajayan, P. M.; Nalamasu, O.; Thompson, D. M. (2007): Impact of carbon nanotube exposure, dosage and aggregation on smooth muscle cells. *Toxicology Letters*; 169: 51-63.
- [15] Tian, T.; Cui, D.; Schwarz, H.; Gomez Estrada, G.; Kobayashi, H. (2006): *Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts*. *Toxicology in Vitro*; 20:1202–1212.
- [16] Muller, J.; Decordier, I.; Hoet, P.; Lombaert, N.; Thomassen, L.; Huaux, F.; Lison, D.; Kirsch-Volders, M. (2008): Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis*; 29:427-433
- [17] Bottini, M.; Bruckner, S.; Nika, K.; Bottini, N.; Bellucci, S.; Magrini, A.; Bergamaschi, A.; Mustelin, T.(2006): Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology Letters*; 160:121–126.
- [18] C. Salvador-Morales, E. V. Basiuk, V. A. Basiuk, M. L. H. Green, and R. B. Sim, (2008): Effects of chemical modification on the complement-activating and protein-binding characteristics of carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, in press.
- [19] Zalacain, M.; Sierrasesúмага, L.; Patiño, A. (2005): The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents, *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; 28:227-236.
- [20] Montero, R.; Serrano, L. (1997): Micronuclei and Chromatid Buds Are the Result of Related Genotoxic Events. *Mutagenesis* ; 38:38-45.

- [21] Varga, D.; Johannes, T.; Jainta, S.; Schuster, S.; Schwarz-Boeger, U.; Kiechle, M.; Patino Garcia, M.; Vogel W. (2004): An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis. *Mutagenesis* ;19: 391-397.
- [22] Decordier, I.; Kirsch-Volders, M. (2006): The *in vitro* micronucleus test: From past to future. *Mutation Research*; 607: 2-4.
- [23] El-Zein, R. A.; Schabath, M. B.; Etzel C. J.; Lopez M. S.; Franklin J. D.; Spitz M. R. (2006): Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk. *Cancer Research*; 66:6449-6456.
- [24] Hagmar, L.; Bonassi, S.; Stromberg, U.; Brogger, A.; Knudsen, L. E.; Norppa, H.; Reuterwall, C.(1998): Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH), *Cancer Research*; 58:4117-4121.
- [25] Fenech, M. (2002): Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today* ; 7:1128-1137.
- [26] Montero, R.; Serrano, L.; Araujo, A.; Dávila, V.; Ponce, J.; Camacho, R.; Morales, E.; Méndez, A. (2006): Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*; 21: 335–342.
- [27] McClintock, B. (1941): The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*; 26: 234–282.
- [28] Wu, M.; Ding, H.-F.; Fisher, D. E. (2001): Apoptosis: Molecular Mechanisms. *Encyclopedia of Life Science*; 1-8
- [29] Müllauer, L.; Wohlfart, S.; Scheucher, B. (2006): Apoptosis: Regulatory Genes and Disease. *Encyclopedia of Life Science*; 1-7.
- [30] Evan, G. I.; Vousden, K. H. (2001): Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*; 411: 342-348.
- [31] Wick, P.; Manser, P.; Limbach, L. K.; Detlaff-Weglikowska, U.; Krumeich, F.; Roth, S.; Stark, W. J.; Bruinink A. (2007): The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters*; 168:121–131.
- [32] Lindberg, H.; Falck, G.; Suhonen, S.; Savolainen, K.; Norppa, H. (2007): Induction of DNA damage and micronuclei by carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells. In: *37th Annual EEMS meeting, Switzerland*.

# CAPÍTULO

## 6

### **Estudio comparativo: determinación de la biocompatibilidad para MWNTs prístinos y MWNTs-N6 a través de la prueba de micronúcleos**

#### **6.1. Objetivo general del estudio**

- Determinar el nivel de biocompatibilidad de los MWNTs prístinos y de los MWNTs funcionalizados con nylon-6 a través de la prueba de micronúcleos.

#### **6.1.1. Objetivos particulares del estudio**

- Calcular el índice de marcaje en cada cultivo tratado con diferentes concentraciones de ambos tipos de nanotubos de carbono.
- Identificar los diferentes bioindicadores de daño, y calcular su respectiva frecuencia de aparición en cada uno de los tratamientos.
- A través de una serie de análisis estadísticos, determinar si existe o no un efecto significativo en las frecuencias de los bioindicadores debido a los tratamientos realizados, así como una posible relación dosis-efecto.
- Interpretación de los resultados obtenidos a partir de los análisis estadísticos.

#### **6.2. Materiales y métodos**

El siguiente estudio fue realizado en el laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. La metodología empleada para el mismo está basada en estudios previos realizados por Regina Montero y colaboradores [1,2].

#### **6.2.1. Extracción de sangre**

Se obtuvieron 30 ml de sangre periférica heparinizada (Figura 1) de un individuo de 19 años del sexo masculino. A través de un cuestionario, el individuo indicó que no se encontraba medicado ni había estado expuesto a algún agente que pudieran interferir en los resultados análisis.



Figura 1. Obtención de sangre heparinizada.

El manejo de los reactivos y de la sangre se realizó en una campana con flujo laminar vertical bajo estrictas condiciones de esterilidad.

### 6.2.1.1. Obtención de linfocitos

La sangre se repartió dentro de 6 tubos con ficoll (Sigma Aldrich) en proporción 1:1 (5 ml: 5 ml) para su posterior centrifugación (Figura 2-a) durante 30 minutos a 1400 rpm. En cada tubo se obtuvieron 4 fases (Figura 2-b): La primera fase corresponde al plasma sanguíneo de color amarillento; la segunda fase que es muy delgada y de color blanquecino corresponde a las células mononucleadas como linfocitos y monocitos; la tercera fase corresponde al ficoll utilizado anteriormente, el cual es transparente y presenta el mayor volumen; y la última fase es la fase de color rojizo correspondiente a eritrocitos y granulocitos.

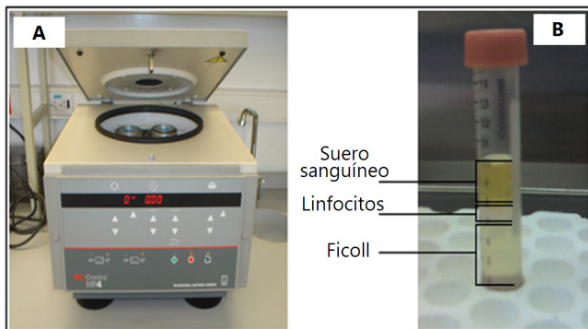


Figura 2. a) Centrifuga (IEC, Centra MP4); b) fases sanguíneas.

En este estudio sólo se utilizó la fase blanquecina que contenía a los linfocitos, y más adelante la fase amarillenta que contenía el plasma. La fase con linfocitos se colocó en un tubo que contenían previamente 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con aminoácidos esenciales y glutamina (GIBCO). El suero simplemente se centrifugó sin agregarle sustancia alguna. Todos los tubos fueron centrifugados duran-

te 10 minutos a 1400 rpm. Posteriormente, se extrajo el sobrenadante para limpiar los residuos de ficoll, dejando únicamente 1 ml de cultivo por encima del paquete celular. En el plasma también se precipitó un paquete celular de linfocitos al fondo del tubo y se extrajo. Los paquetes celulares fueron reunidos y colocados en 2 tubos (etiquetados como tubo "A" y tubo "B"), a los cuales se les agregaron 10 ml de medio de cultivo, y se resuspendieron para realizar una segunda limpieza por centrifugación. Una vez más se extrajo el sobrenadante que aún podía contener residuos de ficoll, y después, sólo se añadieron 2 ml de medio de cultivo. Finalmente ambos tubos con linfocitos quedaron libres de residuos de ficoll en 3 ml de medio de cultivo.

### 6.2.1.2. Cuento de linfocitos

Por medio de la cámara de Neubauer fue posible contabilizar el número de linfocitos que contenían tanto el tubo A como el tubo B. El paquete celular presente en cada tubo fue resuspendido con agitación suave a través del vórtex. Una vez que los tubos fueron homogenizados, se preparó la muestra para contabilizar las células en la cámara de Neubauer. En 2 tubos eppendorf de 2 ml (uno para tubo A y otro para tubo B), se añadieron 0.9 ml de medio RPMI y 0.1 ml de azul de tripano. Dentro de esta mezcla se añadieron 20  $\mu$ l (factor de dilución 1:50) de medio con linfocitos, pertenecientes al tubo A y 20  $\mu$ l pertenecientes al tubo B correspondientemente. La solución de color azul obtenida fue resuspendida, y con ayuda de una pipeta pasteur, se agregaron unas gotas de la misma hasta llenar cada una de las pequeñas cámaras que componen la cámara de Neubauer. La cámara se observó al microscopio óptico para realizar el conteo de células en cada cuadrante.

La fórmula para calcular el número de células contenidas obtenidas en el proceso, y considerando el factor de dilución (1:50) es:

$$\left( \frac{\text{número de células observadas}}{8} \right) \times 10^6$$

En total se obtuvieron aproximadamente 23.625 millones de linfocitos en 6 ml de cultivo (tubo A y B), de los cuales sólo se aprovecharon 18 millones para preparar 18 cultivos; cada uno con 1 millón de células.

### 6.2.2. Preparación de los cultivos con linfocitos

Para preparar 18 cultivos, se preparó una mezcla con los siguientes reactivos:.

- a) Para 1 ml de medio de cultivo:
- 30 µl de Fitohemaglutinina (PHA) al 2.8%
  - 15 µl de 5'-Bromo2'-Desoxiuridina (15 µM)
  - 200 µl de Suero sanguíneo
- 
- 245 µl en total +755 µl de medio con 1 millón de células
- b) Para 18 tubos de medio de cultivo:
- 540 µl de PHA al 2.8%
  - 270 µl de BrdU (15 µM)
  - 3600 µl de Suero sanguíneo
- 
- 4410 µl en total+ 13.59ml de medio con 18 millones de células

A partir de la mezcla final, se tomó 1 ml para cada uno de los 18 tubos, y fueron incubados a 37°C durante 24 horas con flujo de CO<sub>2</sub> (Figura 3).

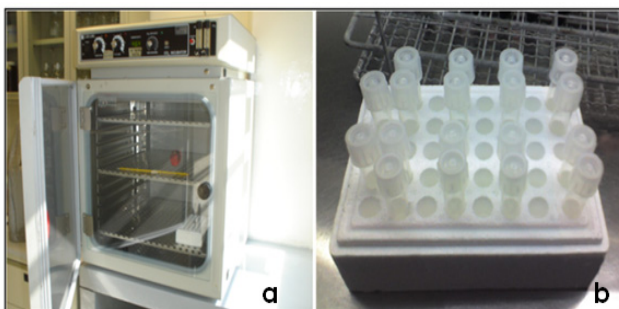


Figura 3. a) Incubadora con flujo de CO<sub>2</sub>, b) cultivos con linfocitos humanos.

### 6.2.3. Tratamiento de los cultivos con MWNT prístinos y con MWNT-N6.

Los cultivos fueron sacados de la incubadora para su posterior tratamiento y etiquetamiento. Los cultivos fueron tratados con MWNTs prístinos y con MWNTs-N6 (obtenidos de la muestra 1, relación 1:1). Para realizar el tratamiento de los cultivos, fue necesario elaborar un “stock” para ambos tipos de nanotubos. Se añadió un 1mg de cada uno (previamente esterilizado bajo luz UV durante 3 minutos y macerados hasta obtener un polvo muy fino) en un 1 ml de medio de cultivo RPMI (sin linfocitos) (Figura 4-a). Los nanotubos fueron dispersados durante 10 minutos dentro del sonicador a 32°C, hasta lograr homogeneizarlos lo mejor posible (Figura 4-c).

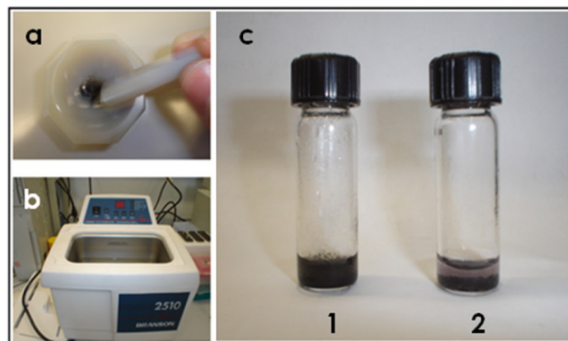


Figura 4. a) Macerado de MWNT; b) sonicador; c) soluciones “stock” para ambos tipos de MWNTs: (1) MWNTs prístinos y (2) MWNTs-N6.

A partir de las soluciones stock (1 mg/ml) preparadas se obtuvieron los volúmenes necesarios para tratar cada uno de los cultivos con linfocitos (por duplicado). se obteniendo diferentes concentraciones (60 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml y 10 µg/ml) para ambos tratamientos dentro de los cultivos con linfocitos (Figura 5). Únicamente de 18 cultivos preparados, 16 fueron empleados para realizar los tratamientos con MWNTs, y los 2 cultivos restantes se emplearon como control (sin tratarlos). Cada cultivo fue etiquetado, e incubado durante 24 horas a 37°C con flujo de CO<sub>2</sub>.



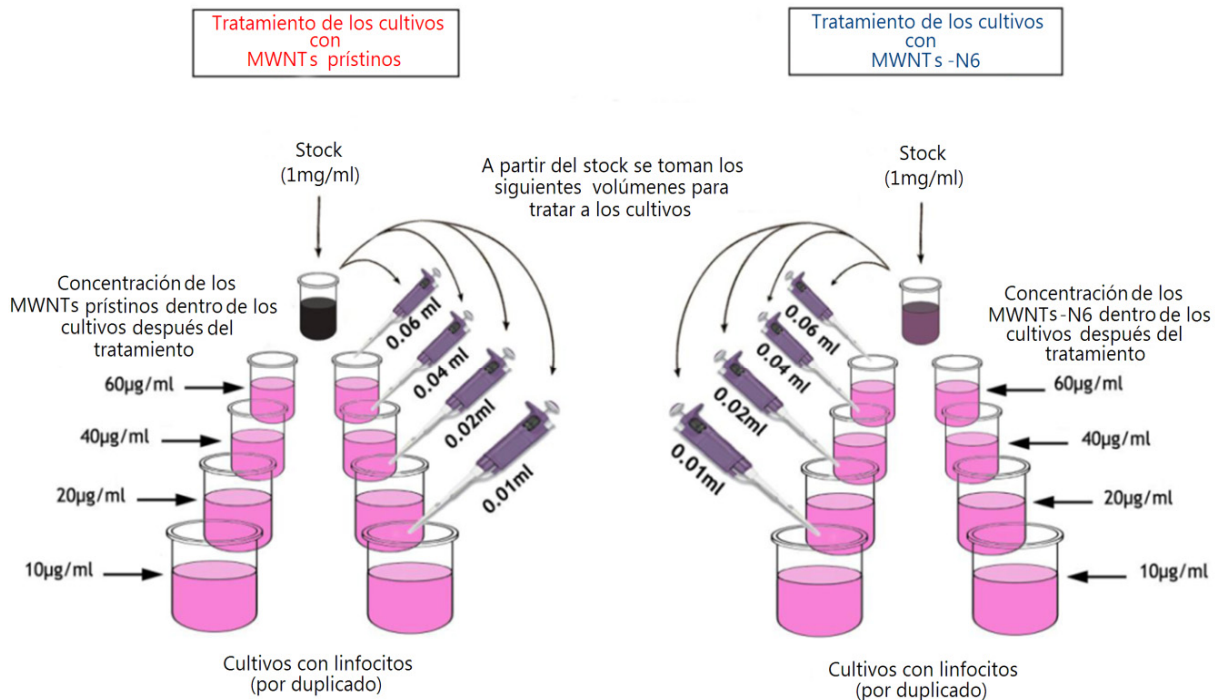


Figura 5. En el lado derecho se muestra el tratamiento de los cultivos con MWNTs prístinos y del lado izquierdo se muestra el tratamiento de los cultivos con MWNTs-N6.

#### 6.2.4. Cosecha de los cultivos con linfocitos

Los cultivos fueron sacados de incubación y cada uno de ellos fue resuspendido por medio del vórtex hasta obtener una completa resuspensión de las células. Posteriormente, a cada cultivo se le añadió 1 ml de KCl (0.075M a temperatura ambiente), resuspendiéndolos rápidamente, y centrifugándolos a 1300 rpm durante 7 minutos. Los tubos fueron retirados de la centrifuga y se les extrajo el sobrenadante hasta una distancia de 3mm por encima del paquete de linfocitos precipitado al fondo de cada tubo.

Una vez más, los cultivos fueron resuspendidos con el vórtex y se les añadió a cada uno 5 ml de solución fijadora de Carnoy (una mezcla de metanol y ácido acético en proporción 3:1). Consecutivamente, los

cultivos fueron homogenizados a través del vórtex y centrifugados a 1500 rpm durante 7 minutos. Nuevamente, se extrajo el sobrenadante hasta una distancia de 3 mm por encima del paquete celular.

El contenido de cada tubo fue resuspendido e inmediatamente se le agregó a cada uno 5 ml de fijador de carnoy. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados durante 10 minutos a 1500 rpm y seguido de esto, se extrajo el sobrenadante de la misma forma en que se realizó en los pasos anteriores, de este modo, las células fueran purgadas de partículas y desechos celulares. Finalmente, se agregaron 5 ml de fijador de carnoy a cada uno de los cultivos, los cuales fueron sellados correctamente y almacenados en refrigeración para posteriormente llevar a cabo la preparación de las muestras.

### 6.2.5. Elaboración de muestras para el microscopio óptico

Los porta objetos de vidrio fueron enjugados previamente con agua destilada para eliminar restos de cartón y polvo del empaque en el que venían, se secaron perfectamente, y se sumergieron en alcohol absoluto a temperatura ambiente para eliminar restos de grasa. Las laminillas fueron preparadas para cada cultivo de los dos diferentes tratamientos realizados por duplicado; tal como se mostró en la figura 5.

Las células cosechadas fueron retiradas de la refrigeración y agitadas con el vortex para posteriormente ser centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante fue extraído hasta una distancia de 1 cm por encima del paquete celular. El material fue resuspendido por medio de una pipeta Pasteur hasta obtener una suspensión muy homogénea y blanquecina.

Para realizar la preparación de cada una de las muestras se tomó una laminilla previamente sumergida en alcohol absoluto y se secó suavemente con una gasa. Con

ayuda de la pipeta pasteur se tomó una gota de cada tubo y se dejó caer sobre la laminilla desde una distancia aproximada de 10 cm y se dejó secar correctamente. Si al observar la laminilla al microscopio óptico la cantidad de linfocitos era mínima, entonces se repetía el procedimiento hasta incrementar el número de células dentro de la misma considerablemente. Las laminillas inmediatamente de ser preparadas fueron etiquetadas con la clave correspondiente al cultivo de donde se obtuvo la muestra, y se dejaron secar durante 24 horas.

#### 6.2.5.1. Tinción de las muestras a través inmunohistoquímica

Posteriormente, por medio de un plumón grueso se delimitó sobre cada laminilla, el área que contenía a las células, para poder realizar la técnica de tinción por inmunohistoquímica. Dicha técnica, se basa en el hecho de que al estimular por medio de la fitohemaglutinina (mitógeno) las células del cultivo, una proporción de éstas logran entrar a ciclo celular, y por lo tanto logran proliferar (Figura 6).

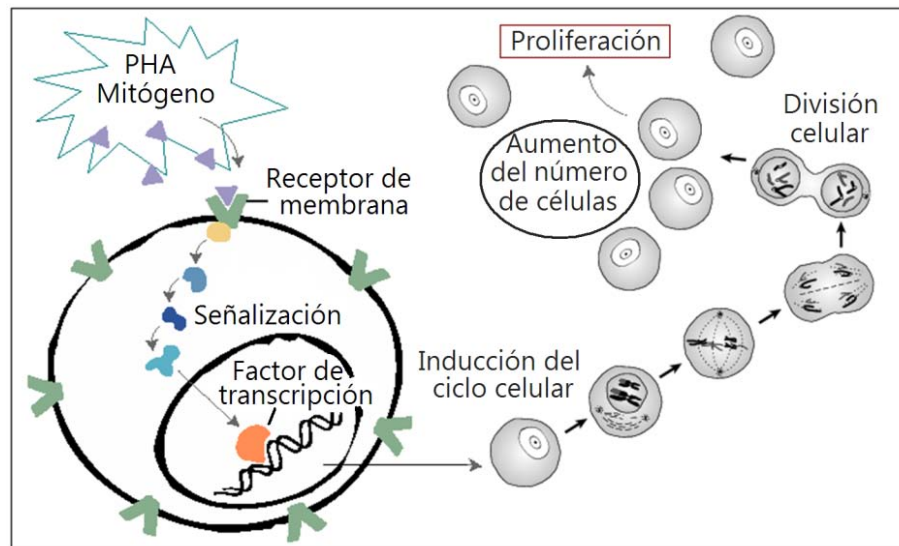


Figura 6. Inducción del ciclo celular a través de la PHA (<http://www.factmonster.com/cig/biology/cell-cycle-interphase-mitosis-cytokinesis.html> y de: <http://www.factmonster.com/images/cig/biology/02fig03.png>).

Durante la fase de síntesis, las células incorporarán la 5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU la cual es un análogo de timina "T") dentro de su material genético (Figura 7), mientras que aquellas células que no lograron proliferar seguramente no incorporaron la BrdU. Posteriormente la BrdU incorporada es reconocida por medio de anticuerpos que están asociados a una enzima que permite la tinción de las células. Sin embargo para facilitar el reconocimiento, es necesario primero abrir la doble hélice del DNA por medio de una sustancia llamada formamida [1,2].

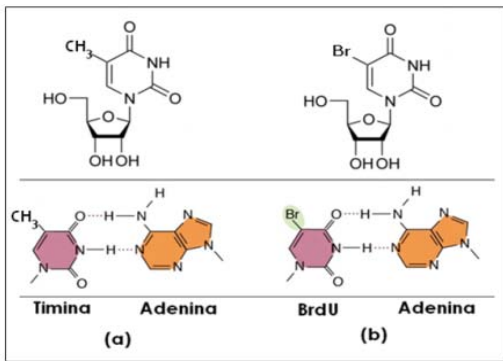


Figura 7. Apareamiento de bases durante la síntesis de DNA: a) timina y adenina; b) BrdU (análogo de la timina) y adenina. (<http://fig.cox.mia.mia.edu/Faculty/Dana/baseanalog.jpg>).

Se utilizó formamida al 40% previamente precalentada a 80°C en baño maría. Las laminillas fueron sumergidas dentro de la formamida durante 15 minutos, y posteriormente se realizaron lavados de 9 minutos con buffer PBS para eliminar posibles residuos de la misma.

El primer anticuerpo utilizado (Anti-BrdU) es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer a la BrdU (Figura 8). Este anticuerpo fue utilizado en una dilución (1:50) con buffer PBS que presentaba 1% de suero de ternera recién nacida. A cada laminilla se le colocaron 250 µl de tal solución sobre la superficie donde se encontraban las células en las laminillas lo más homogéneamente posible, y posteriormente se incubaron du-

rante 2 horas dentro de una cámara húmeda, permitiendo que aumentara la probabilidad de que la BrdU fuera reconocida por el anticuerpo. Una vez transcurridas las 2 horas de incubación del primer anticuerpo, se realizaron lavados de 3 minutos en buffer PBS, para que aquellos anticuerpos que no se unieron a la BrdU no interfirieran con las siguientes reacciones. A continuación, se realizó la incubación del segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón, Sigma), el cual reconocería al primer anticuerpo que ya se ha unido previamente a la BrdU (Figura 8), este segundo anticuerpo es un conjugado que contiene una enzima llamada peroxidasa. Se preparó una dilución (1:100) del anticuerpo en buffer PBS, agregando 250µl de tal solución a cada laminilla homogéneamente dentro del área limitada con el plumón grasoso durante 40 minutos. Posteriormente, se realizaron los lavados necesarios a las laminillas con buffer PBS, retirando aquellos anticuerpos que no se unieron al primero, y evitando así que interfirieran más adelante.

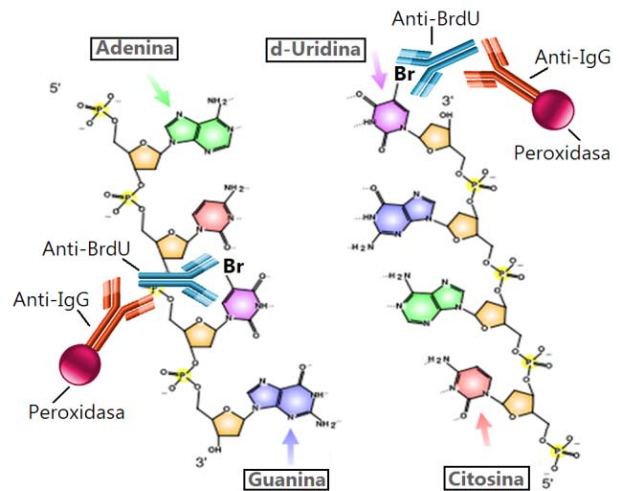


Figura 8. Esquema de detección de la BrdU a través de los anticuerpos anti-BrdU y anti-IgG + peroxidasa. (<http://upload.wikimedia.org>)

Se preparó una solución de diamino-benzidina (DAB) (0.5 mg/ml de PBS), y se agregaron 20µl de peróxido de hidrógeno en la misma (de una dilución previa de 20 µl de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 1 ml de H<sub>2</sub>O). A partir de la solución resultante, se agregaron 250 µl a cada laminilla, dejando actuar a la enzima durante 20 minutos. El peróxido tiende a oxidar a la DAB que es un cromógeno capaz de teñir las células en color marrón, la peroxidasa puede acelerar la reacción siguiente manera:



Después de observar tal coloración; las laminillas se enjuagaron con agua destilada y se observaron al óptico para verificar si se habían teñido correctamente. Si las células presentaban un color marrón muy tenue, se repetía el proceso hasta obtener un color oscuro (Figura 9). Posteriormente, para poder identificar qué células entraron a ciclo celular, fue necesario realizar una contraindicación con giemsa al 4 % (diluida en 10 ml de buffer PBS) (Figura 10). Se agregaron 500 µl de giemsa sobre las laminillas teñidas de color marrón, durante 2 minutos, y se enjuagaron con agua destilada. Las células que no proliferaron ahora se hicieron visibles.



Figura 9. Laminilla teñida de color marrón por técnica de inmunohistoquímica.

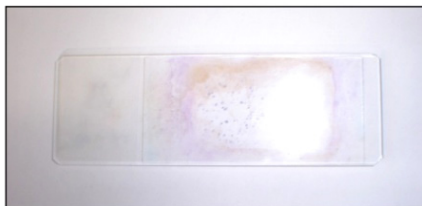


Figura 10. Laminilla teñida de color azul por técnica de inmunohistoquímica.

### 6.2.5.2. Montaje de las muestras

El montaje de las laminillas se realizó preservando las muestras con una resina y un cubreobjetos, agregando de 3 o 4 gotas de la resina sobre la laminilla con ayuda de una pipeta Pasteur. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos sobre la laminilla y se dejó reposar durante 2 horas. Con ayuda de la goma de un lápiz se presionó el cubreobjetos para eliminar burbujas de aire y evitar que interfirieran en la observación de las muestras, y se dejó secar durante 24 horas. Finalmente, la resina endurecida en algunos casos pudo adherirse a la superficie de las laminillas y con ayuda de una navaja se desprendió con suavidad, dejándola limpia y libre de obstáculos para su observación. Las laminillas fueron codificadas de tal manera que al evaluarlas no se supiera qué tratamiento se estaba analizando, para evitar un sesgo en los resultados obtenidos.

### 6.2.6. Observación y evaluación de las muestras al microscopio

Las muestras fueron observadas y evaluadas al microscopio óptico (Nikon E-600), utilizando reaumentos de 200X y 1000X, y haciendo uso de la iluminación “contraste de fases” y “campo claro”.

#### 6.2.6.1. Criterios de evaluación

Durante la evaluación de los diferentes bioindicadores empleados en la prueba de micronúcleos, fue necesario evitar los factores de confusión. La siguiente tabla (Tabla 11) incluye los principales criterios para la identificación de los diferentes bioindicadores empleados en la prueba de micronúcleos [2,3,4,5].



**Micronúcleos:**

- a) El diámetro del micronúcleo no debe ser mayor a 1/3 del diámetro del núcleo principal.
- b) Los micronúcleos deben presentar una textura y forma similar a la del núcleo principal, ya sea circular u ovalada; de otro modo no se considera como un micronúcleo verdadero.
- c) Deben presentar una intensidad de tinción similar a la de los núcleos principales.
- d) Deben encontrarse en el mismo plano focal que el núcleo al que están asociados.
- e) No deben encontrarse conectados a ningún núcleo principal ni solaparse con ellos.
- f) La distancia entre el micronúcleo y el núcleo principal no debe ser mayor a 3 veces el radio de este último y si lo sobre pasa no se toma en consideración para el análisis.
- g) Estos requerimientos deben cumplirse de la misma forma en caso de que una célula presente de 2 a más micronúcleos.

**Gemaciones de cromatina::**

- a) Las gemaciones de cromatina deben presentar una textura y forma similar a la del núcleo principal.
- b) El tamaño de las gemaciones debe ser muy similar a la que presentan los micronúcleos.
- c) Deben siempre estar conectadas al núcleo principal a través de una conexión en forma de “cuello”, el cual puede variar en longitud dependiendo del estadio en el que se encuentre.
- d) Las gemaciones deberán poseer la misma intensidad de tinción que el núcleo principal.
- f) Deben encontrarse en el mismo plano focal.
- g) Todos estos requerimientos deben cumplirse de igual manera en caso de que una célula presente 2 o más gemaciones de cromatina unidas al núcleo principal

**Puentes citoplasmáticos::**

- a) Los puentes nucleoplásmicos pueden conectar dos o más núcleos principales.
- b) Deben presentar una intensidad de tinción y textura similar a la que presenta el núcleo principal.
- c) Debe encontrarse en el mismo plano focal que los núcleos principales.
- d) Los puentes nucleoplásmicos deben poseer una forma alargada.

**Apoptosis:**

- a) Las células en apoptosis presentan sus núcleos fragmentados en forma de cuerpos circulares o semicirculares de diversos tamaños.
- b) Los cuerpos apoptóticos deben encontrarse reunidos en un espacio similar al diámetro ocupado normalmente por un núcleo entero.
- c) Los cuerpos apoptóticos deben poseer la misma intensidad de tinción y textura entre sí.

Tabla1. Criterios de selección e identificación de los bioindicadores empleados en la prueba de micronúcleos.

### 6.2.6.2. Análisis del Índice de proliferación o de marcaje

Para conocer el número de células que proliferaron después de haber sido estimuladas por la PHA, se utilizó el índice de marcaje o de proliferación. Este índice es calculado a partir de una población de linfocitos, determinando para la misma población, qué proporción de células se ha teñido en color marrón (células que proliferaron) y qué proporción de se ha teñido en color azul (células que no proliferaron) (Figura 11).

Se observaron aproximadamente 2000 células en cada muestra, y se utilizó la siguiente fórmula para obtener el índice de proliferación (I.P.) [1]:

$$I.P. = \frac{\text{Número de células teñidas en color marrón}}{\text{Total de células observadas (marrones + azules)}}$$

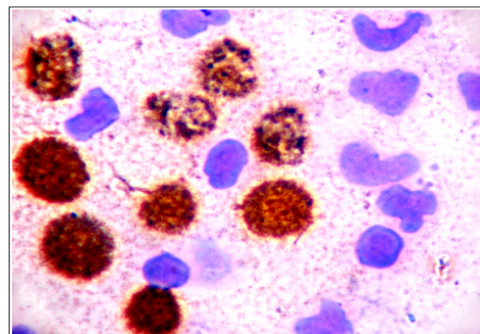


Figura 11 Ejemplo de grupo de células teñidas de color marrón y azul. Aumento 1000x.



### 6.2.6.3. Análisis de las frecuencias para cada bioindicador

La evaluación de los bioindicadores se realizó a través del microscopio óptico con aumentos de 1000X. Se evaluaron únicamente células teñidas de color marrón (aproximadamente 2000 células en cada muestra). Los siguientes bioindicadores fueron evaluados tomando en cuenta sus respectivos criterios de evaluación: la presencia de micronúcleos, gemaciones de cromatina, puentes nucleoplásmicos y apoptosis. Después de la evaluación de cada muestra, se calculó la frecuencia de aparición para cada uno de los bioindicadores (F.B.) empleando la siguiente fórmula [1]:

$$F.B. = \frac{\text{número de eventos observados}}{\text{total de células analizadas}} \times 1000$$

### 6.2.6.4. Obtención de imágenes

Las imágenes se obtuvieron a través del microscopio óptico con ayuda de una cámara digital. Posteriormente las imágenes fueron procesadas empleando el software *Adobe Photoshop CS2* (versión 8).

### 6.2.7. Análisis estadísticos

Las frecuencias obtenidas fueron analizadas a través de diferentes técnicas estadísticas, determinando el comportamiento de cada bioindicador dentro de los cultivos para cada tratamiento.

#### 6.2.7.1. Análisis de la varianza multivariable (MANOVA).

Las frecuencias obtenidas y los índices de marcaje obtenidos en los diferentes tratamientos fueron comparados entre sí y

contra su respectivo control, a través de un análisis multivariable de la varianza MANOVA (Figura 12) empleando el programa estadístico *Statgraphics* (plus 5.1). El análisis, permite determinar si existen diferencias significativas entre 2 factores y sus posibles interacciones. Si existen diferencias significativas, el análisis realiza una prueba de “contraste de rangos múltiples (LSD de Fisher)”, para determinar qué niveles dentro de un factor, es diferente estadísticamente hablando. El análisis de varianza puede realizar un gráfico de cajas y bigotes en caso de que sea necesario observar la tendencia de los datos cuando éstos no son muy claros, [6,7].

		Niveles del factor B (tratamiento)		
		Control	MWNT Prístinos	MWNT-N6
Niveles del factor A (concentración)	60µg/ml	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)
	40µg/ml	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)
	20µg/ml	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)
	10µg/ml	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)	Frecuencia del bioindicador (muestra duplicada)

Figura 12. Tabla MANOVA diseñada para realizar los análisis de las frecuencias de los bioindicadores e índice de marcaje en los dos tratamientos realizados con MWNTs.

#### 6.2.7.2. Análisis de regresión lineal

A través del programa Origin 6.1 se elaboraron los gráficos de barras para los índices de marcaje y frecuencias de los diferentes bioindicadores (variable y) obtenidos para cada una de las concentraciones (variable x) en los tratamientos con ambos tipos de MWNTs. El modelo lineal calcula los coeficientes de determinación  $r^2$  (porcentaje de variabilidad y cambios en “y” explicados y atribuidos a “x”) y los coeficientes de correlación  $r$  de Pearson (magnitud de la relación

entre “x” y “y” junto con la dirección ya sea positiva o negativa) [6,7]. Cuando los valores del coeficiente de correlación son cercanos a 1 o -1, la relación entre las variables es perfecta. Si el valor del coeficiente de correlación es cercano a 0 la relación entre las variables es inexistente. El coeficiente más importante y verosímil es el coeficiente  $r^2$ , ya que refleja de una manera mucho más realista, la relación entre las variables [7].

A través de estos análisis es posible determinar si existe una relación significativa entre el efecto de los dos tipos de MWNTs y las concentraciones empleadas de los mismos en cada tratamiento. El mismo análisis realiza un análisis de varianza (ANOVA) que determina qué modelo es el que mejor se ajusta al comportamiento de las variables “x” y “y”.

### 6.3. Resultados

A continuación se muestran los resultados obtenidos a través de la evaluación de cada una de las muestras en los dos tratamientos con MWNTs prístinos y con MWNTs-N6, así como los análisis realizados con las diferentes técnicas estadísticas que permitieron interpretar los resultados obtenidos en este estudio.

#### 6.3.1. Análisis del índice de proliferación

La siguiente tabla muestra los índices de proliferación obtenidos para cada una de las concentraciones utilizadas en ambos tratamientos con MWNTs (Tabla 2).

MUESTRA	CÉLULAS MARRÓN OBSERVADAS	CÉLULAS AZULES OBSERVADAS	TOTAL	ÍNDICE DE MARCAJE	ÍNDICE PROMEDIO	ERROR ESTÁNDAR
Control	1050	952	2002	0.5245	0.5175	0.0070
Control*	1023	981	2004	0.5105		
p60 µg/ml	1046	954	2001	0.5230	0.5218	0.0012
p60 µg/ml*	1048	965	2013	0.5206		
p40 µg/ml	1065	941	2008	0.5309	0.5472	0.0163
p40 µg/ml*	1130	875	2005	0.5636		
p20 µg/ml	1046	956	2005	0.5225	0.5518	0.0294
p20 µg/ml*	1170	843	2013	0.5812		
p10 µg/ml	987	1027	2018	0.4901	0.5344	0.0444
p10 µg/ml*	1164	847	2011	0.5788		
n60 µg/ml	1159	853	2017	0.5760	0.5180	0.0580
n60 µg/ml*	920	1080	2000	0.4600		
n40 µg/ml	1200	801	2007	0.5997	0.5877	0.0120
n40 µg/ml*	1153	850	2003	0.5756		
n20 µg/ml	1192	808	2007	0.5960	0.5726	0.0234
n20 µg/ml*	1104	906	2010	0.5493		
n10 µg/ml	1188	812	2008	0.5940	0.5848	0.0092
n10 µg/ml*	1151	849	2000	0.5755		

Tabla 2. Índice de marcaje (p= MWNTs prístinos; n= MWNTs-N6; muestra con \* representa el duplicado).

El análisis de varianza realizado para índice de marcaje (Anexo 1) indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos (MANOVA  $p \geq 0.05$ ) realizados con MWNTs. Las gráficas

de dispersión muestran el comportamiento del índice de proliferación en función de la concentración de los dos tratamientos con MWNTs, mostrando también el modelo lineal para cada uno (Gráfico 1).

Análisis de la Varianza para la variable: "Índice de Marcaje"					
FUENTE (EFECTOS PRINCIPALES)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE-F	P-VALOR
"Concentración" (A)	0.000217856	4	0.0000726186	0.19	0.9011
"Tratamientos" (B)	0.00247651	2	0.00123826	3.26	0.0606
RESIDUOS	0.00721677	15	0.00037983		

Anexo 1. Tabla MANOVA (95%) para "índice de marcaje o de proliferación".

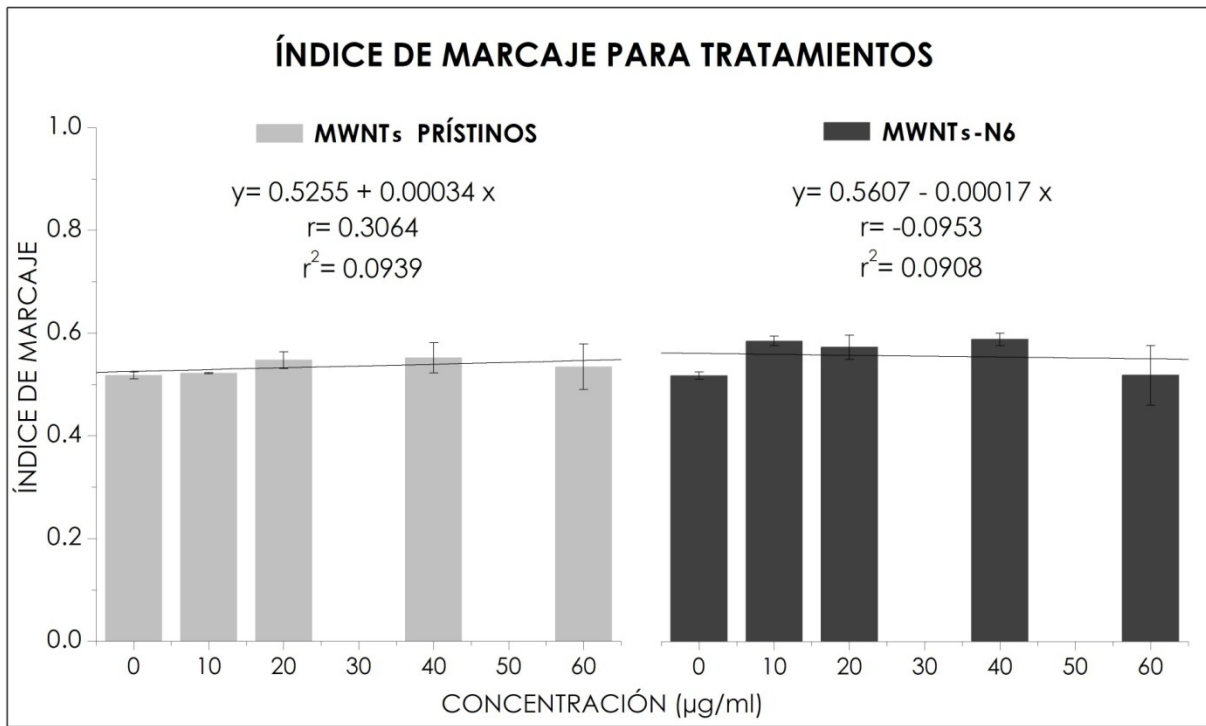


Gráfico 1. Gráfico de barras y regresión lineal para: "Índice de marcaje o de proliferación". A la derecha gráfico para tratamiento con MWNTs-N6; a la izquierda gráfico para tratamiento con MWNTs prístinos.

En el modelo lineal para el tratamiento con MWNTs prístinos, de acuerdo con el valor de  $r^2$ , el 0.93863% de la variabilidad del índice de marcaje es explicada en términos de la concentración. El coeficiente de correlación ( $r=0.3064$ ) indica una relación relativamente débil entre las variables. Por otro lado, el modelo lineal realizado para el tratamiento con MWNTs-N6 presenta una  $r^2$

que explica un 0.9080 % de la variabilidad del índice de marcaje en términos de las concentraciones. Mientras que el coeficiente de correlación ( $r=-0.0953$ ) indica una relación relativamente débil entre las variables. Para ambos tratamientos, los valores obtenidos por el análisis de varianza (Anexo 2) concluyen que no existe ninguna relación estadísticamente significativa entre las va-

riables concentración de los tratamientos y el índice de marcaje (ANOVA,  $p \geq 0.05$ ). Por tanto tampoco no existe relación dosis-dependiente. En conclusión, ningún tratamiento causó efectos estadísticamente signi-

ficativos sobre la proliferación de los linfocitos en medio cultivo, empleando concentraciones de un rango entre 10 y 60  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los MWNTs.

Análisis de la Varianza para: "Modelo Lineal" (MWNTs prístinos)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
"Modelo"	0.000848672	1	0.000848672	1.35	0.2667
RESIDUO	0.0081929	13	0.000630223		
Análisis de la Varianza para: "Modelo Lineal" (MWNTs-N6)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
"Modelo"	0.000213224	1	0.000213224	0.12	0.7355
RESIDUO	0.0232676	13	0.00178982		

Anexo 2. Tabla ANOVA (95%) para el modelo lineal de los tratamientos con MWNTs-prístinos y con MWNTs- N6.

### 6.3.2. Análisis de la frecuencia de micronúcleos

El análisis incluyó el conteo de células que presentaban de 1 a 2 micronúcleos. La si-

guiente tabla (Tabla 3) muestra el número de células analizadas en cada muestra, el número de micronúcleos observados y su frecuencia. Asimismo, se indica la media de las frecuencias y su error estándar.

MUESTRA	CÉLULAS OBSERVADAS	MICRONÚCLEOS ENCONTRADOS	FRECUENCIA	FRECUENCIA PROMEDIO	ERROR ESTÁNDAR
Control	2016	3	1.4881	2.2381	0.7500
Control*	2008	6	2.9880		
p60 $\mu\text{g/ml}$	2015	14	6.9479	7.1979	0.2500
p60 $\mu\text{g/ml}$ *	2014	15	7.4479		
p40 $\mu\text{g/ml}$	2012	12	5.9642	4.9662	0.9980
p40 $\mu\text{g/ml}$ *	2016	8	3.9683		
p20 $\mu\text{g/ml}$	2014	10	4.9652	4.9751	0.0099
p20 $\mu\text{g/ml}$ *	2006	10	4.9850		
p10 $\mu\text{g/ml}$	2007	5	2.4913	3.4900	0.9987
p10 $\mu\text{g/ml}$ *	2005	9	4.4888		
n60 $\mu\text{g/ml}$	2009	4	1.9910	2.9876	0.9965
n60 $\mu\text{g/ml}$ *	2008	8	3.9841		
n40 $\mu\text{g/ml}$	2011	7	3.4809	2.9892	0.4917
n40 $\mu\text{g/ml}$ *	2002	5	2.4975		
n20 $\mu\text{g/ml}$	2002	3	1.4985	2.2396	0.7411
n20 $\mu\text{g/ml}$ *	2013	6	2.9806		
n10 $\mu\text{g/ml}$	2003	3	1.4978	1.4974	0.0004
n10 $\mu\text{g/ml}$ *	2004	3	1.4970		

Tabla 3. Frecuencia de micronúcleos (p= MWNTs prístinos; n= MWNTs-N6; muestra con \* representa el duplicado).

De acuerdo con los resultados obtenidos a través del análisis de varianza (Anexo 3), existen diferencias significativas entre los tratamientos (MANOVA  $p < 0.05$ ). El tratamiento que mostró un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos según el contraste de rangos múltiples (según tratamientos) fue el tratamiento con MWNTs prístinos (LSD  $p < 0.05$ ) (Anexo 4).

Por otro lado, el tratamiento realizado con MWNTs-N6, parece no causar efectos significativos en la frecuencia de micronúcleos al mantenerse muy homogéneo respecto a su control. De acuerdo con el contraste de rangos múltiples (según concentración) se observó un efecto significativo (LSD,  $p < 0.05$ ) a partir de la última concentración empleada (60  $\mu\text{g/ml}$ ) para el mismo tratamiento (Anexo 4).

Análisis de la Varianza para la variable: "Frecuencia de Micronúcleos"					
FUENTE (EFECTOS PRINCIPALES)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE-F	P-VALOR
"Concentración" (A)	14.3465	4	3.58662	2.58	0.0643
"Tratamientos" (B)	34.1443	2	17.0722	12.28	<b>0.0002</b>
RESIDUOS	31.9873	15	1.03697		

Anexo 3. Tabla MANOVA (95%) para: "frecuencia de micronúcleos".

Contraste Múltiple de Rangos para: "Frecuencia de Micronúcleos" (Según Tratamiento)				
Tratamientos	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	10	2.23807	0.372928	XX
2	10	2.39035	0.372928	XX
1	10	4.57347	0.372928	XX
Contraste		Diferencias		+/- Límites
0 - 1		*-2.3354		1.09101
0 - 2		-0.152278		1.09101
1 - 2		*2.18312		1.09101
Contraste Múltiple de Rangos para: "Frecuencia de Micronúcleos" (Según Concentración)				
Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	6	2.23807	0.481448	XX
10	6	2.40849	0.481448	XX
20	6	3.15093	0.481448	XX
40	6	3.39783	0.481448	XX
60	6	4.14117	0.481448	XX
Contraste		Diferencias		+/- Límites
0 - 10		-0.170422		1.40849
0 - 20		-0.912855		1.40849
0 - 40		-1.15976		1.40849
0 - 60		*-1.9031		1.40849
10 - 20		-0.742433		1.40849
10 - 40		-0.989335		1.40849
10 - 60		*-1.73267		1.40849
20 - 40		-0.246902		1.40849
20 - 60		-0.990241		1.40849
40 - 60		-0.743339		1.40849

\* indica una diferencia significativa.

Anexo 4. Contraste de rangos múltiples (método LSD 95%) para: "frecuencia de micronúcleos". Tratamiento con MWNTs prístinos "1"; tratamiento con MWNTs-N6 "2"; Control "0".



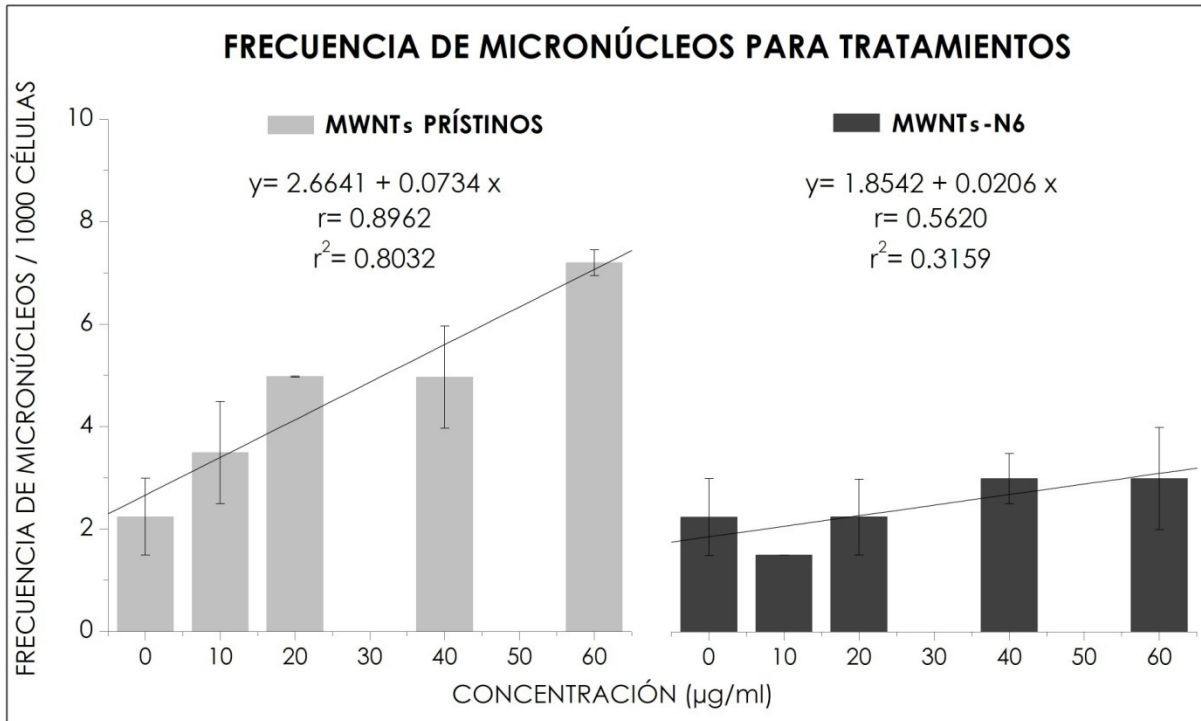


Gráfico 2. Gráfico de barras y regresión lineal para: “frecuencia de micronúcleos”; a la derecha gráfico para tratamiento con MWNTs-N6; a la izquierda gráfico para tratamiento con MWNTs prístinos.

De acuerdo con los valores obtenidos en el análisis de varianza para el modelo lineal ( $p < 0.05$ ), existe relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de los micronúcleos y las concentraciones empleadas para el tratamiento con MWNTs prístinos (Anexo 5). El estadístico  $r^2$  indica que el modelo lineal explica un 80.3234 % de la variabilidad de las frecuencias de micronúcleos en función de la concentración. El coeficiente de correlación ( $r = 0.8962$ ) indica una relación dosis-dependiente fuerte entre las variables (Gráfico 2).

El análisis de varianza para el modelo lineal del tratamiento realizado con MWNTs-N6 ( $p < 0.05$ ) indica que existe una relación significativa entre las variables “frecuencia de micronúcleos” y “concentración” (Anexo 5). A pesar de lo anterior, debido a que el estadístico  $r^2$  explica únicamente un 31.5895% de la variabilidad de la frecuencia de micronúcleos, y el coeficiente de correlación es igual a 0.5620, la relación dosis-dependiente entre las variables es relativamente muy débil; tal y como se observa en el gráfico 2.

Análisis de la Varianza para: “Modelo Lineal” (MWNTs prístinos)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
“Modelo”	37.5353	1	37.5353	53.07	0.0000
RESIDUO	9.19492	13	0.707302		
Análisis de la Varianza para: “Modelo Lineal” (MWNTs-N6)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
“Modelo”	2.95948	1	2.95948	6.00	0.0292
RESIDUO	6.40906	13	0.493005		

Anexo 5. Tabla ANOVA (95%) para el modelo lineal de los tratamientos con MWNTs-prístinos y con MWNTs- N6

### 6.3.3. Análisis de la frecuencia de gemaciones de cromatina

El análisis incluyó el conteo de células que presentaban tanto gemaciones sencillas como gemaciones dobles. La siguiente

tabla (Tabla 4) muestra el número de células analizadas en cada una de las muestras, la proporción de gemaciones observadas, así como su respectiva frecuencia. Se indica también la media de tales frecuencias y su error estándar.

MUESTRA	CÉLULAS OBSERVADAS	GEMACIONES ENCONTRADAS	FRECUENCIA	FRECUENCIA PROMEDIO	ERROR ESTÁNDAR
Control	2016	6	2.9762	3.9781	1.0019
Control*	2008	10	4.9801		
p60 µg/ml	2015	17	8.4367	9.6801	1.2434
p60 µg/ml*	2014	22	10.9235		
p40 µg/ml	2012	10	4.9702	6.7014	1.7312
p40 µg/ml*	2016	17	8.4325		
p20 µg/ml	2014	11	5.4618	4.7249	0.7369
p20 µg/ml*	2006	8	3.9880		
p10 µg/ml	2007	9	4.4843	3.9878	0.4965
p10 µg/ml*	2005	7	3.4913		
n60 µg/ml	2009	4	1.9910	3.4856	1.4945
n60 µg/ml*	2008	10	4.9801		
n40 µg/ml	2011	10	4.9726	5.2336	0.2609
n40 µg/ml*	2002	11	5.4945		
n20 µg/ml	2002	14	6.9930	7.2223	0.2293
n20 µg/ml*	2013	15	7.4516		
n10 µg/ml	2003	10	4.9925	3.9933	0.9992
n10 µg/ml*	2004	6	2.9940		

Tabla 4. Frecuencia de gemaciones de cromatina (p= MWNTs prístinos; n= MWNTs-N6; muestra con \* representa el duplicado).

Análisis de la Varianza para la variable: "Frecuencia de Gemaciones de Cromatina"					
FUENTE (EFECTOS PRINCIPALES)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE-F	P-VALOR
"Concentración" (A)	10.8137	4	2.70343	0.80	0.5371
"Tratamientos" (B)	20.172	2	10.086	2.99	0.0702
RESIDUOS	77.6486	15	3.37603		

Anexo 6. Tabla MANOVA (95%) para: "frecuencia de gemaciones de cromatina".

Según los resultados obtenidos en el análisis de varianza, ningún factor muestra diferencias significativas (MANOVA,  $p \geq 0.05$ ) (Anexo 6). A pesar de esto, el modelo de regresión lineal ( $p < 0.05$ ) el análisis MANOVA realizada para el modelo lineal del tratamiento con MWNTs prístinos indica que si existe relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de gemaciones y las con-

centraciones empleadas para el mismo. El estadístico  $r^2$  indica que un 80.0024% de la variabilidad de la frecuencia de las gemaciones es explicada en términos de las concentraciones del tratamiento, y su coeficiente de correlación ( $r=0.8944$ ) indica una relación dosis-dependiente relativamente fuerte entre las variables (Gráfico 3). Por tal motivo, lo más probable es que si las concentraciones

en el tratamiento se aumentarían, se observaría un incremento estadísticamente significativo en las frecuencias de las gemaciones debido al efecto de los MWNTs prístinos.

En el caso del análisis de varianza realizado para el modelo lineal del tratamiento con MWNTs-N6 ( $p \geq 0.05$ ), no existe relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de gemaciones y las concentraciones empleadas (Anexo 7).

Asimismo, el estadístico  $r^2$  indica que el modelo lineal explica únicamente el 1.2788 % de la variabilidad para la frecuencia de las gemaciones de cromatina. El coeficiente de correlación ( $r = -0.1131$ ) indica una relación muy débil entre las variables (Gráfico 3), y por lo tanto una existe relación dosis-dependiente muy baja.

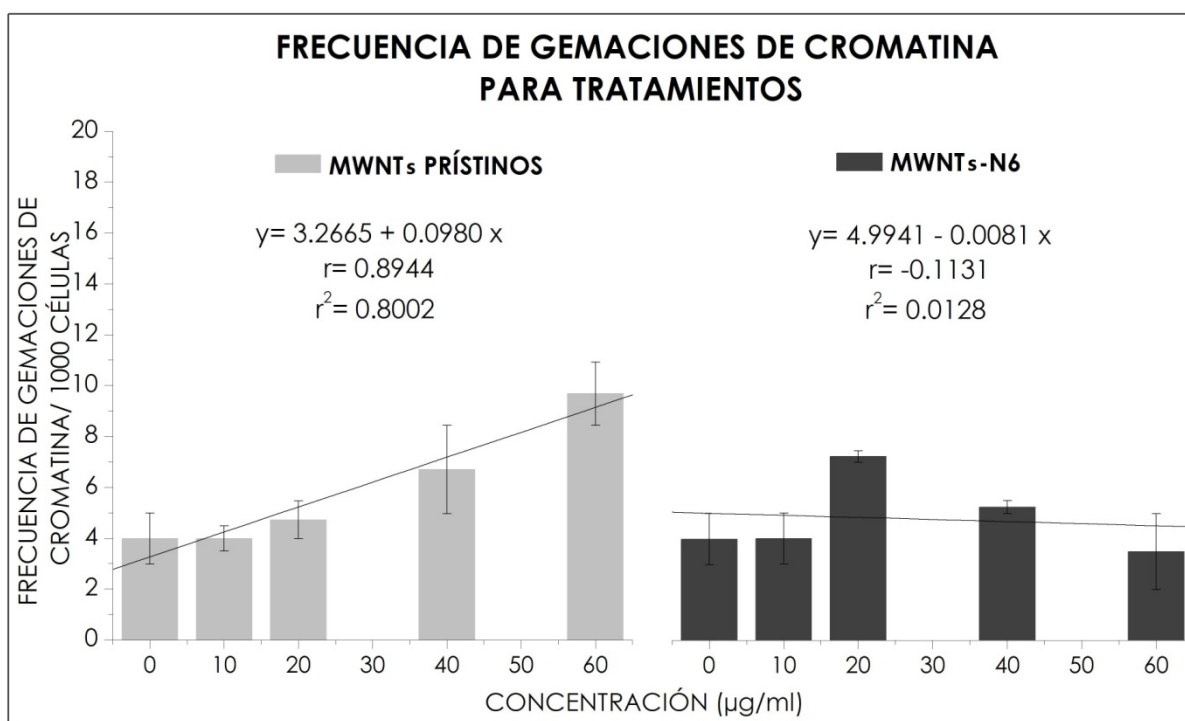


Gráfico 3. Gráfico de barras y regresión lineal para: "frecuencia de gemaciones de cromatina". A la derecha gráfico para tratamiento con MWNTs-N6; a la izquierda gráfico para tratamiento con MWNTs prístinos.

Análisis de la Varianza para: "Modelo Lineal" (MWNTs Prístinos)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
"Modelo"	66.8426	1	66.8426	52.01	0.0000
RESIDUO	16.7081	13	0.707302		
Análisis de la Varianza para: "Modelo lineal" (MWNTs-N6)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
"Modelo"	0.460849	1	0.460849	0.17	0.6882
RESIDUO	35.5764	13	2.73664		

Anexo 7. Tabla ANOVA (95%) para el modelo lineal de los tratamientos con MWNTs.

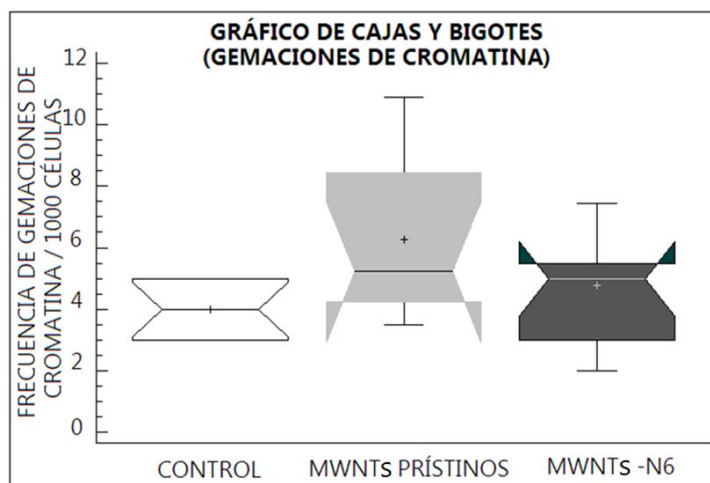


Gráfico 4. Gráfico de cajas y bigotes; muestra la media (muesca), la mediana (línea horizontal), tendencia de los datos (cajas) y los errores estándar para las frecuencias de gemaciones en los diferentes tratamientos.

El gráfico de cajas y bigotes (Gráfico 4) apoya los resultados obtenidos por el modelo de regresión lineal. Es evidente la tendencia al aumento en la frecuencia de gemaciones inducidas por el tratamiento con MWNTs prístinos. Mientras que el tratamiento realizado con MWNTs-N6 se comporta mucho más semejante al control.

### 6.3.4. Análisis de la frecuencia de puentes nucleoplásmicos nucleoplásmicos

La siguiente tabla (Tabla 5), muestra el número de células analizadas en cada muestra y la proporción de puentes nucleoplásmicos encontrados conectando a dos núcleos.

MUESTRA	CÉLULAS OBSERVADAS	PUENTES NUCLEOPLÁSMICOS ENCONTRADOS	FRECUENCIA	FRECUENCIA PROMEDIO	ERROR ESTÁNDAR
Control	2016	1	0.496031746	0.248015873	0.248015873
Control*	2008	0	0		
p60 µg/ml	2015	2	0.992555831	1.24106441	0.248508579
p60 µg/ml*	2014	3	1.489572989		
p40 µg/ml	2012	4	1.988071571	1.738083404	0.249988166
p40 µg/ml*	2016	3	1.488095238		
p20 µg/ml	2014	2	0.993048659	0.745776573	0.247272086
p20 µg/ml*	2006	1	0.498504487		
p10 µg/ml	2007	1	0.498256104	0.49850461	0.000248507
p10 µg/ml*	2005	1	0.498753117		
n60 µg/ml	2009	2	0.995520159	0.746764064	0.248756096
n60 µg/ml*	2008	1	0.498007968		
n40 µg/ml	2011	0	0	0.24975025	0.24975025
n40 µg/ml*	2002	1	0.4995005		
n20 µg/ml	2002	0	0	0.248385494	0.248385494
n20 µg/ml*	2013	1	0.496770989		
n10 µg/ml	2003	1	0.499251123	0.49912656	0.000124564
n10 µg/ml*	2004	1	0.499001996		

Tabla 5. Frecuencia de puentes nucleoplásmicos (p= MWNTs prístinos; n= MWNTs-N6; muestra con \* representa el duplicado).

El análisis de varianza indicó que uno de los factores presenta diferencias significativas (MANOVA,  $p < 0.05$ ) (Anexo 8). El contraste de rangos múltiples indica que el efecto es causado por el tratamiento realizado con MWNTs prístinos (LSD,  $p < 0.05$ )

(Anexo 9). De acuerdo con el análisis de contraste de rangos múltiples (según la concentración), el tratamiento con MWNTs prístinos presenta un incremento significativo a partir de la concentración correspondiente a 40  $\mu\text{g/ml}$  (LSD,  $p < 0.5$ ).

Análisis de la Varianza para la variable: "Frecuencia de Micronúcleos"					
FUENTE (EFECTOS PRINCIPALES)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE-F	P-VALOR
"Concentración" (A)	1.18486	4	0.296214	1.85	0.1528
"Tratamientos" (B)	2.28728	2	1.14364	7.16	<b>0.0038</b>
RESIDUOS	3.67366	23	0.159724		

Anexo 8. Tabla MANOVA (95%) para: "frecuencia de puentes nucleoplásmicos".

Contraste Múltiple de Rangos para: "Frecuencia de Puentes Nucleoplásmicos" (Según Tratamiento)				
Tratamientos	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	10	0.248016	0.126382	XX
2	10	0.398408	0.126382	XX
1	10	0.894289	0.126382	XX
Contraste		Diferencias		+/- Límites
0 - 1		*-0.646273		0.369735
0 - 2		-0.150393		0.369735
1 - 2		*0.495881		0.369735
Contraste Múltiple de Rangos para: "Frecuencia de Puentes Nucleoplásmicos" (Según Concentración)				
Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	6	0.248016	0.163159	XX
10	6	0.414059	0.163159	XX
20	6	0.415216	0.163159	XX
40	6	0.745281	0.163159	XX
60	6	0.745283	0.163159	XX
Contraste		Diferencias		+/- Límites
0 - 10		-0.1672		0.477325
0 - 20		-0.166043		0.477325
0 - 40		*-0.497267		0.477325
0 - 60		*-0.497266		0.477325
10 - 20		0.00115637		0.477325
10 - 40		-0.330067		0.477325
10 - 60		-0.330066		0.477325
20 - 40		-0.331224		0.477325
20 - 60		-0.331222		0.477325
40 - 60		-0.000001727		0.477325

\* indica una diferencia significativa.

Anexo 9. Contraste de rangos múltiples (método LSD 95%) para: "frecuencia de puentes nucleoplásmicos". Tratamiento con MWNTs prístinos "1"; tratamiento con MWNTs-N6 "2"; Control "0".



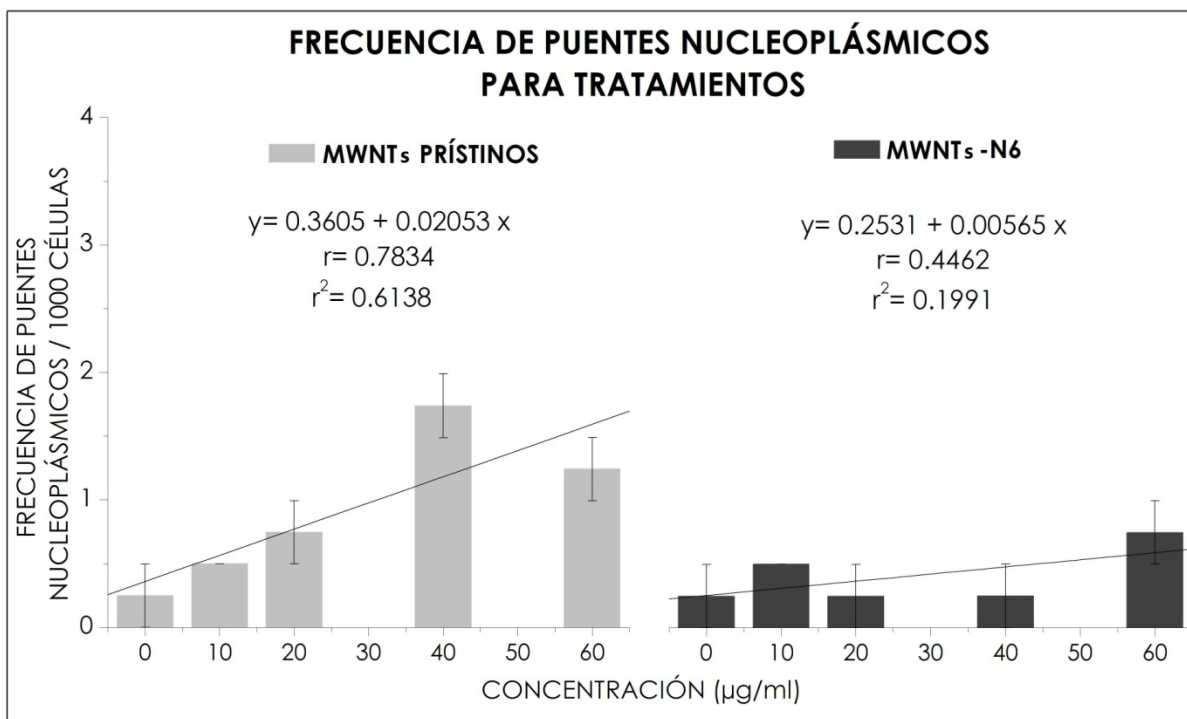


Gráfico 5. Gráfico de barras y regresión lineal para frecuencia de puentes nucleoplásmicos; a la derecha gráfico para tratamiento con MWNTs-N6; a la izquierda gráfico para tratamiento con MWNTs prístinos.

Dado que  $p < 0.05$  para el análisis de varianza para el modelo lineal, existe una relación significativa entre la frecuencia de los puentes nucleoplásmicos y las concentraciones empleadas en el tratamiento con MWNTs prístinos (Anexo 10). El estadístico  $r^2$  indica que un 61.3765% de la variabilidad en la frecuencia de los puentes nucleoplásmicos se explica en función a la concentración. El coeficiente de correlación ( $r = 0.7834$ ) indica una relación dosis-dependiente relativamente fuerte entre las variables (Gráfico 5).

En contraste, el análisis de varianza realizado para el tratamiento con MWNTs-N6 ( $p \geq 0.05$ ) indica que no existe relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de puentes nucleoplásmicos y las concentraciones del tratamiento (Anexo 10). El estadístico  $r^2$ , indica que el modelo explica un 19.9114% de la variabilidad de la frecuencia de los puentes nucleoplásmicos. El coeficiente de correlación ( $r = 0.4462$ ) indica una relación dosis-dependiente relativamente débil (Gráfico 5).

Análisis de la Varianza para: "Modelo Lineal" (MWNTs Prístinos)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
"Modelo"	2.93358	1	2.93358	20.66	0.0005
RESIDUO	1.84607	13	0.142005		
Análisis de la Varianza para: "Modelo lineal" (MWNTs-N6)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
"Modelo"	0.21725	1	0.21725	3.23	0.0955
RESIDUO	0.873834	13	0.067218		

Anexo 10. Tabla ANOVA (95%) para el modelo lineal de los tratamientos con MWNTs.

### 6.3.5. Análisis de la frecuencia de apoptosis

La siguiente tabla (Tabla 6) muestra el número de células analizadas en cada

muestra, y la proporción de éstas en proceso de apoptosis, y también muestra su respectiva frecuencia. Asimismo, se muestra la media para cada frecuencia y su error estándar.

MUESTRA	CÉLULAS OBSERVADAS	APOPTOSIS ENCONTRADAS	FRECUENCIA	FRECUENCIA PROMEDIO	ERROR ESTÁNDAR
Control	2016	3	1.4881	1.2420	0.2460
Control*	2008	2	0.9960		
p60 µg/ml	2015	3	1.4888	2.7305	1.2417
p60 µg/ml*	2014	8	3.9722		
p40 µg/ml	2012	2	0.9940	0.7450	0.2490
p40 µg/ml*	2016	1	0.4960		
p20 µg/ml	2014	4	1.9861	1.9900	0.0040
p20 µg/ml*	2006	4	1.9940		
p10 µg/ml	2007	11	5.4808	3.9873	1.4935
p10 µg/ml*	2005	5	2.4938		
n60 µg/ml	2009	7	3.4843	2.9872	0.4971
n60 µg/ml*	2008	5	2.4900		
n40 µg/ml	2011	7	3.4808	2.4897	0.9912
n40 µg/ml*	2002	3	1.4985		
n20 µg/ml	2002	11	5.4945	5.4795	0.0150
n20 µg/ml*	2013	11	5.4645		
n10 µg/ml	2003	8	3.9940	2.7455	1.2485
n10 µg/ml*	2004	3	1.4970		

Tabla 6. Frecuencia de apoptosis (p= MWNTs prístinos; n= MWNTs-N6; muestra con \* representa el duplicado).

De acuerdo con el análisis de varianza, existen diferencias significativas entre ambos tratamientos (MANOVA,  $p < 0.05$ ) (Anexo 11). El contraste de rangos múltiples muestra que el tratamiento realizado con MWNTs-N6 presenta diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de apoptosis (LSD,  $p < 0.05$ ) respecto al control

control (Anexo 12). La única concentración que presentó efectos estadísticamente significativos en el tratamiento con MWNTs prístinos es la correspondiente a 20 µg/ml (LSD,  $p < 0.05$ ). Las concentraciones restantes son mucho más homogéneas entre sí y mucho más parecidas a las del control (Anexo 15).

Análisis de la Varianza para la variable: "Frecuencia de Apoptosis"					
FUENTE (EFECTOS PRINCIPALES)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE-F	P-VALOR
"Concentración" (A)	12.6538	4	3.16344	2.16	0.1053
"Tratamientos" (B)	15.259	2	7.62949	5.22	<b>0.0135</b>
RESIDUOS	33.6374	23	1.4625		

Anexo 11. Tabla MANOVA (95%) para: "frecuencia de apoptosis".

Contraste Múltiple de Rangos para: "Frecuencia de Apoptosis" (Según Tratamiento)				
Tratamientos	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	10	1.24206	0.382426	XX
2	10	2.13899	0.382426	XX
1	10	2.98878	0.382426	XX
Contraste		Diferencias		+/- Límites
0 - 1		-0.896935		1.1188
0 - 2		*-1.74673		1.1188
1 - 2		-0.849792		1.1188
Contraste Múltiple de Rangos para: "Frecuencia de Apoptosis" (Según Concentración)				
Concentraciones (µg/ml)	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	6	1.24206	0.49371	XX
10	6	1.49226	0.49371	XX
20	6	2.31992	0.49371	XX
40	6	2.65828	0.49371	XX
60	6	2.90387	0.49371	XX
Contraste		Diferencias		+/- Límites
0 - 10		-1.41623		1.44436
0 - 20		*-1.66181		1.44436
0 - 40		-0.2502		1.44436
0 - 60		-1.07786		1.44436
10 - 20		-0.245584		1.44436
10 - 40		1.16603		1.44436
10 - 60		0.338368		1.44436
20 - 40		1.41161		1.44436
20 - 60		0.583952		1.44436
40 - 60		-0.827661		1.44436

\* indica una diferencia significativa.

Anexo 12. Contraste de rangos múltiples (método LSD 95%) para: "frecuencia de apoptosis". Tratamiento con MWNTs prístinos "1"; tratamiento con MWNTs-N6 "2"; Control "0".

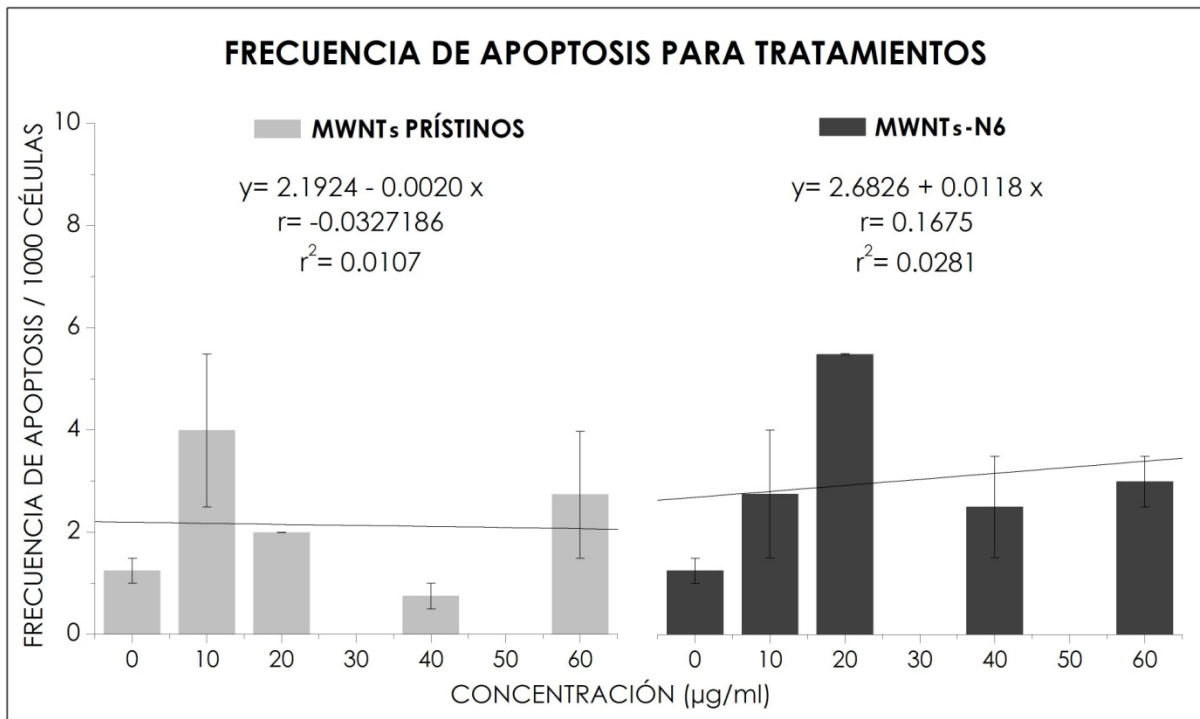


Gráfico 6. Gráfico de barras y regresión lineal para frecuencia de apoptosis; a la derecha gráfico para tratamiento con MWNTs-N6; a la izquierda gráfico para tratamiento con MWNTs prístinos.

Análisis de la Varianza para: "Modelo Lineal" (MWNTs Prístinos)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
"Modelo"	0.0293294	1	0.0293294	0.01	0.9078
RESIDUO	27.3683	13	2.10525		
Análisis de la Varianza para: "Modelo lineal" (MWNTs-N6)					
FUENTE (MODELO)	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE- F	P-VALOR
"Modelo"	0.965227	1	0.965227	0.38	0.5506
RESIDUO	33.4219	13	2.57092		

Anexo 13. Tabla ANOVA (95%) para el modelo lineal de los tratamientos con MWNTs.

Dado que  $p \geq 0.05$  en el análisis de varianza del modelo lineal, no existe relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de apoptosis y las concentraciones del tratamiento realizado con MWNTs prístinos. El estadístico  $r^2$  indica que el modelo explica un 0.107051% de la variabilidad en la frecuencia de apoptosis en función de la concentración. El coeficiente de correlación ( $r=-0.0327$ ) indica una relación dosis-dependiente relativamente débil entre las variables (Anexo 13).

El análisis de varianza realizado para el modelo lineal del tratamiento con MWNTs-N6 ( $p \geq 0.05$ ) indica que no existe relación

significativa entre la frecuencia de apoptosis y las concentraciones. Su estadístico  $r^2$  indica que el modelo sólo explica un 2.8069% de la variabilidad de la frecuencia. Mientras que el coeficiente de correlación  $r=0.1675$  indica una relación dosis-dependiente débil (Anexo 13).

De acuerdo el análisis de MANOVA, el efecto causado en la frecuencia de apoptosis por el tratamiento con MWNTs-N6 no es aparentemente dependiente de la concentración, y parece ser estar en función de otros factores, los cuales se discutirán más adelante. Por su parte, el gráfico de cajas y bigotes (Gráfico 7) muestra la tendencia de los datos en ambos tratamientos.

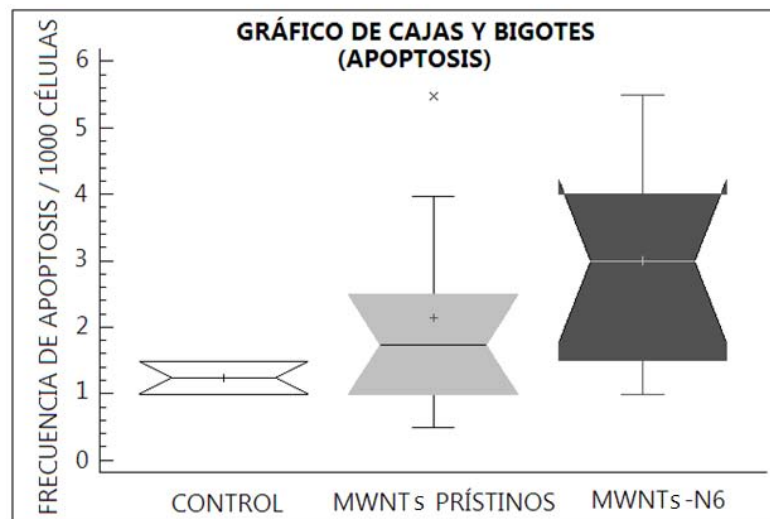


Gráfico 7. Gráfico de cajas y bigotes; muestra la media (muesca), la mediana (línea horizontal), tendencia de los datos (cajas) y los errores estándar para las frecuencias de apoptosis en los diferentes tratamientos.

## 6.4. Discusión de resultados

En la actualidad, la exposición a nanomateriales como los nanotubos de carbono está restringida únicamente a personas que trabajan en laboratorios y lugares relacionados con la síntesis e investigación de para los mismos [8]. Los efectos nocivos que provocan estos nanomateriales, en la salud de los seres vivos como el humano, aún es un problema sin resolver. Por tal motivo, realizar estudios de biocompatibilidad que permitan determinar si estos nanomateriales pueden ser empleados con seguridad es imprescindible.

Diversos estudios toxicológicos realizados, han determinado que el tamaño de estos nanomateriales [9,10,11], la longitud [12], el tipo de agregación, su grado de dispersión y solubilidad [11,14], así como el grado de pureza que poseen, están estrechamente relacionados con sus propiedades tóxicas [11,13]. Incluso, se ha propuesto que los MWNTs podrían ser mucho más biocompatibles que los SWNTs.

Los resultados obtenidos en el presente estudio a través de la prueba de micronúcleos, pueden complementar el conocimiento que se tiene por investigaciones previas en relación con el grado de biocompatibilidad para los MWNTs y sus derivados.

### 6.4.1. Proliferación celular

Se sabe que los SWNTs prístinos son productores de ROS (especies reactivas de oxígeno) durante la inducción de estrés oxidante. Esto conlleva a la disminución en la proliferación y viabilidad celular [13,15]. De acuerdo con el análisis del índice de proliferación (sección 6.5.1), no se observaron efectos antiproliferativos significativos (MANOVA,  $p \geq 0.05$ ) por parte de ninguno de los tratamientos realizados, dentro de los inter-

valos de concentración y tiempo empleados (10- 60  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 horas).

Existen evidencias experimentales que indican que los MWNTs prístinos con niveles altos de pureza no están involucrados en la producción de ROS, ni mucho menos involucrados en la inducción de estrés oxidante [11]. Algunos estudios han demostrado que los MWNTs prístinos presentan una notable actividad como “scavengers de ROS”, absorbiendo y atrapando principalmente iones  $\text{HO}^*$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [16,17], lo cual disminuye la cantidad de ROS presentes en solución y evita la inducción del estrés oxidante. Lo que propicia las condiciones óptimas para que las células proliferen eficazmente. Los MWNTs empleados en este estudio presentan un nivel de pureza alto del 95%. Por tal motivo, es muy probable que los MWNTs prístinos a pesar de estar en contacto con los linfocitos, no afectaran la proliferación a través de estrés oxidante.

Los estudios realizados por Muller y colaboradores, empleando células epiteliales de pulmón expuestas a MWNTs [16], y junto con otros estudios realizados por otros autores con células nerviosas, han demostrado que los MWNTs sirven como sustrato para la regeneración y el crecimiento celular [41, 42,43]. Tales hechos pueden explicar los resultados obtenidos en el presente estudio.

Por otro lado, estudios relacionados con la actividad tóxica de nylon-6 han revelado que tal actividad podría ser nula o inexistente [18, 34]. Sólo algunos estudios han reportado que durante la pirólisis de nylon-6 (a partir de los 200°C) se pueden formar gases tóxicos como HCN, HCl, CO y  $\text{NH}_3$  [19,20]. Otros estudios han demostrado que los materiales empleados durante la síntesis de nylon-6 son relativamente tóxicos, y una vez que el polímero es sintetizado, tal actividad desaparece [18], por lo que es considerado un material relativamente seguro.



En otro estudio realizado por Salvador-Morales y colaboradores, utilizando la prueba del sistema de complemento y empleando un tratamiento con MWNTs-N6, se observó que la activación del sistema era no era significativa [21]. Estos estudios corroboran los resultados obtenidos en el presente estudio acerca de la inexistente actividad antiproliferativa por parte de los MWNTs-N6.

#### 6.4.2. Eventos genotóxicos

Recientemente en los trabajos realizados por Muller y colaboradores, a través de la prueba de micronúcleos y empleando células epiteliales de pulmón, se ha descrito por primera vez las propiedades clastogénicas y aneuploidogénicas de los MWNTs

prístinos. En tal estudio se encontró una relación dosis-dependiente entre la frecuencia de micronúcleos y la concentración de MWNTs prístinos, mientras que los efectos se manifestaron a partir de concentraciones por arriba de los 50  $\mu\text{g/ml}$  [16].

Los resultados obtenidos en la prueba de micronúcleos (Figura 13) del presente estudio (sección 6.5.2) corroboran los resultados obtenidos por Muller. Los análisis realizados para la frecuencia de micronúcleos revelaron que existen efectos dosis-dependientes estadísticamente significativos (MANOVA,  $p < 0.05$ ) inducidos por el efecto de los MWNTs prístinos, y tales efectos se manifiestan a partir de la última concentración empleada correspondiente a 60  $\mu\text{g/ml}$  (LSD,  $p < 0.05$ ).

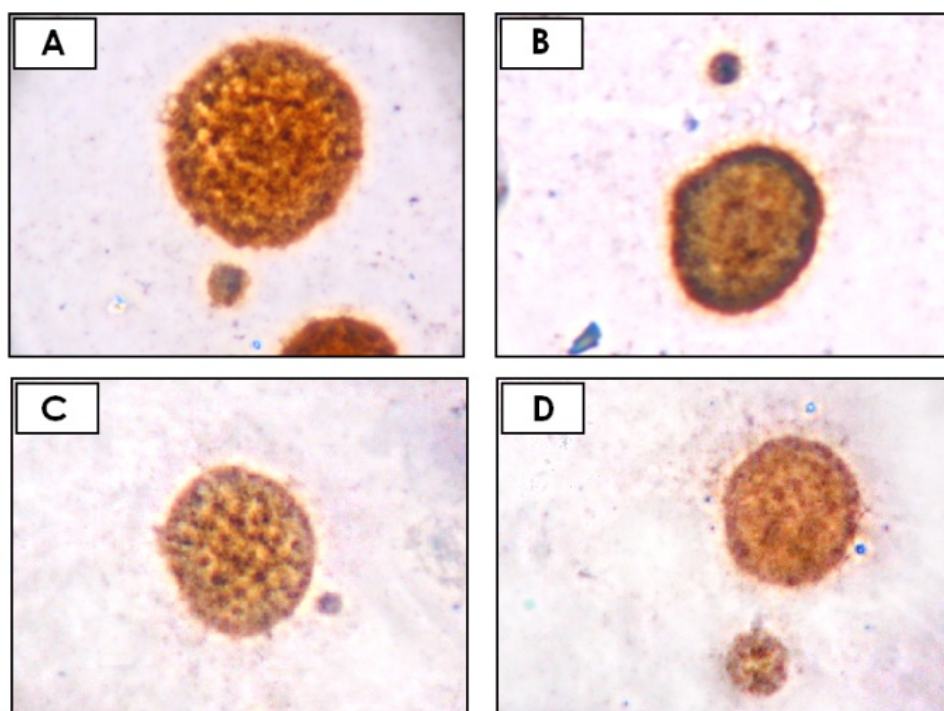


Figura 13. Imágenes obtenidas de micronúcleos encontrados en el presente estudio. Se muestran micronúcleos no mayores a  $\frac{1}{4}$  del tamaño del núcleo principal. (Muestras obtenidas de los tratamiento con MWNTs prístinos: A=40  $\mu\text{g/ml}$  y B=20  $\mu\text{g/ml}$ ; muestras obtenidas de tratamiento con MWNTs-N6: C y D: 60  $\mu\text{g/ml}$ ). Aumento 1000X.

No existen estudios recientes que reporten un aumento en la frecuencia de las gemaciones de cromatina o en puentes nucleoplásmicos debido a los efectos producidos por MWNTs prístinos en cultivos celulares. Por lo que este trabajo es el primer reporte existente que describe la aparición de eventos genotóxicos de esta índole.

Estos dos eventos de genotoxicidad al igual que la formación de micronúcleos están estrechamente relacionados. Durante la formación de puentes nucleoplásmicos, el rompimiento de un cromosoma dicéntrico puede dar origen a eventos de amplificación génica, promoviendo así la formación de gemaciones de cromatina que más tarde podrían convertirse en micronúcleos al ser

expulsadas por completo del núcleo principal (Capítulo 5).

El análisis realizado para la frecuencia de puentes nucleoplásmicos (sección 7.5.4) indica que existen efectos dosis-dependientes estadísticamente significativos (MANOVA,  $p < 0.05$ ) a partir de la concentración correspondiente a 40  $\mu\text{g/ml}$  de MWNTs prístinos (LSD,  $p < 0.05$ ) en el cultivo con linfocitos (Figura 14).

El análisis realizado para gemaciones de cromatina bajo el mismo tratamiento (sección 6.5.3) con MWNTs prístinos indicó que no existen efectos estadísticamente significativos en la frecuencia de gemaciones ( $p > 0.05$ ) inducidos por los MWNTs prístinos (Figura 15).

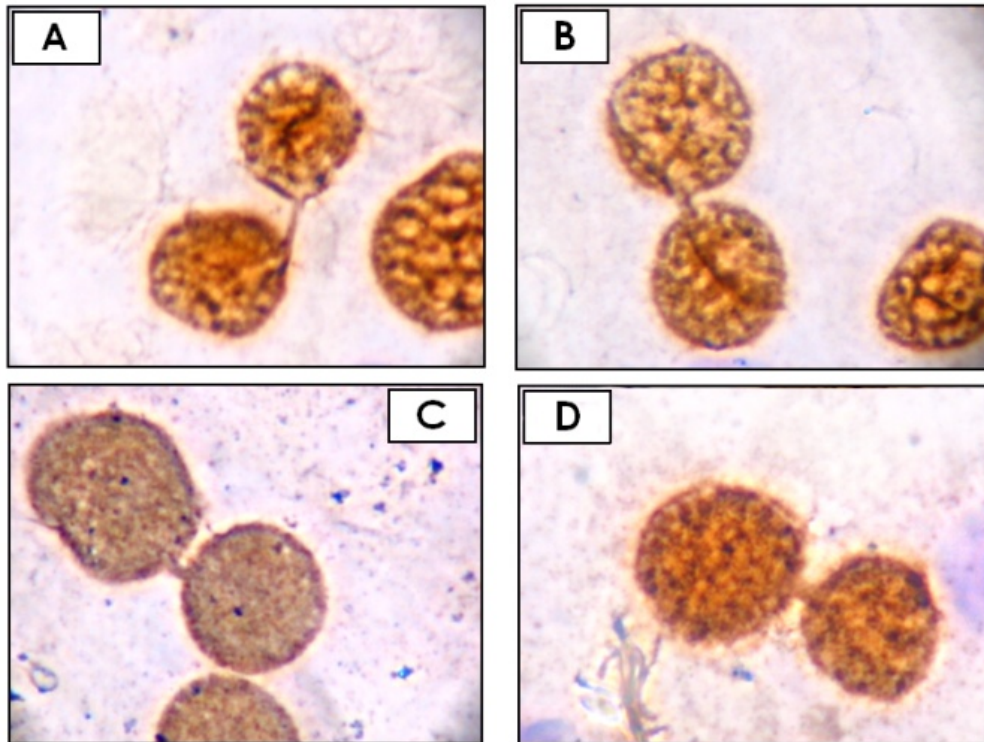


Figura 14. Imágenes de puentes nucleoplásmicos conectando dos núcleos dentro de un mismo citoplasma, el largo y el ancho del puente puede variar, tal y como se observa en las imágenes. (Muestras obtenidas del tratamiento con MWNTs prístinos: A y B= 40  $\mu\text{g/ml}$ ; muestras obtenidas del tratamiento con MWNTs-N6: C= 10  $\mu\text{g/ml}$ , D= 60  $\mu\text{g/ml}$ ). Aumento 1000X.

No obstante, es importante considerar que una proporción de las gemaciones de cromatina pudo haber dado origen a varios micronúcleos por “vía gemación” al separarse por completo de sus núcleos principales [4] (Figura 15-d). Por otro lado una proporción de “minutas dobles” con genes amplificados (dobles minutas) pudo no haber sido eliminada por la misma vía, o en su defecto debido al estadio en que se encontraba la gemación fue imposible detectarlas. A través de los métodos citogenéticos convencionales empleados en este estudio es imposible identificar qué proporción de los micronúcleos habían sido o no gemaciones de cromatina originadas por amplificación génica, así como la proporción de células que aún presentaban minutas dobles y no fueron expulsadas del núcleo principal vía gemación. Probablemente estas sean las razones por las cuales aparentemente no

existe un aumento significativo en la frecuencia de gemaciones inducido por MWNTs prístinos. Tales aseveraciones podrían explicarse a través del modelo lineal realizado, el cual indica una relación dosis-efecto considerablemente fuerte entre la concentración de MWNTs prístinos y la frecuencia de gemaciones de cromatina (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Mientras que el gráfico de cajas y bigotes también corrobora dicha tendencia en la frecuencia para este bioindicador (Gráfico 4). Por tal motivo, si se aumentarían las concentraciones de MWNTs prístinos por arriba de la concentración más alta empleada (60  $\mu\text{g/ml}$ ), probablemente se manifestarían efectos significativos y aumentaría el número de gemaciones visibles y detectables. Incluso otro factor importante sin duda alguna es el tiempo de exposición de los cultivos con linfocitos a los MWNTs prístinos.

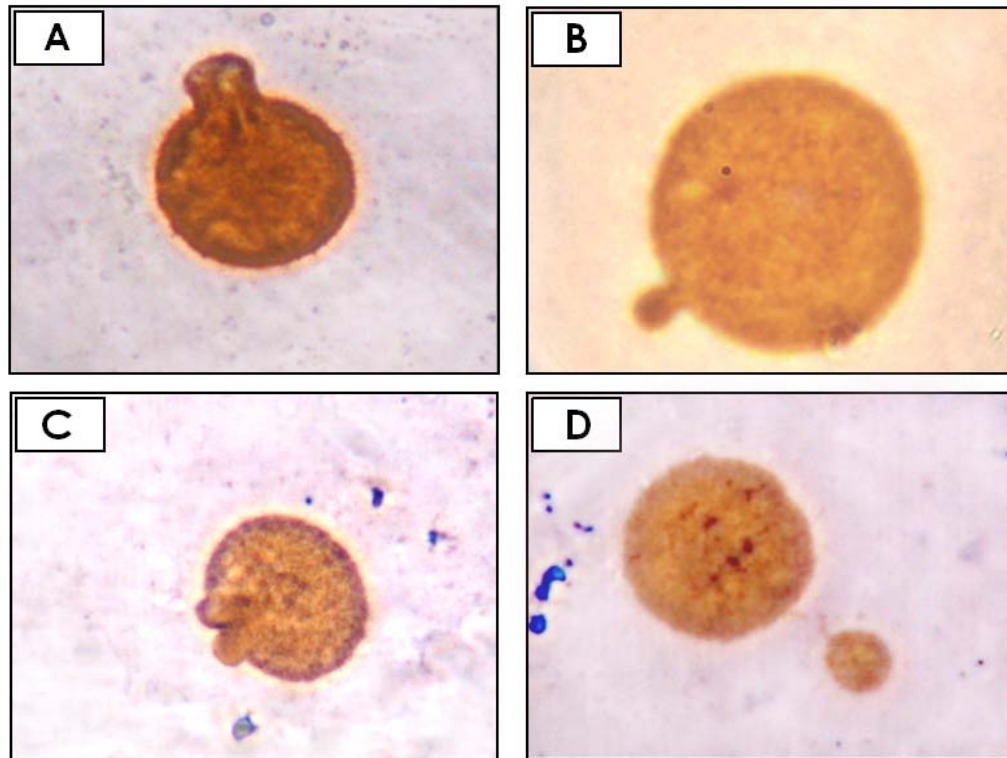


Figura 15. Imágenes de gemaciones de cromatina obtenidas en el presente estudio. La figura “a” y “b” muestran 2 gemaciones sencillas, mientras que la figura “c” muestra una gemación doble; la figura “d” muestra una gemación con “cuello” muy largo y roto, tal gemación por lo tanto se ha convertido en micronúcleo. (Muestras obtenidas del tratamiento con MWNTs prístinos: b, c y d= 60  $\mu\text{g/ml}$ ; a= 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Aumento 1000X.



De acuerdo con las hipótesis de los trabajos de Muller y colaboradores, debido a que los MWNTs no están relacionados con la inducción de estrés oxidante a través de la producción de ROS, existen alternativas previamente reportadas para poder explicar la inducción de los eventos genotóxicos [16]. La vía clastogénica es una vía de inducción de daño al DNA, originada por rompimientos por la interacción directa de los MWNTs prístinos con el material genético, con la posibilidad de formar aductos. La vía aneuploidogénica está relacionada con la interacción de los MWNTs prístinos y los componentes del huso mitótico durante la división celular, e incluso por una posible interacción con las proteínas implicadas en la segregación de los cromosomas (tubulina, actina, etc.) [3,4,16]. Estos mecanismos son de

gran importancia, ya que proveen información trascendente acerca de las propiedades genotóxicas de los MWNTs, por lo que la posibilidad de que los éstos atraviesen la membrana celular y nuclear para posteriormente interactuar directamente con el DNA, no debe ser descartada. De acuerdo con algunos estudios, este hecho no es imposible al revelar que los nanotubos de carbono tienen la capacidad de atravesar la membrana celular [22, 44, 45, 46]. Monteiro y colaboradores, a través de microscopía TEM, observaron que los MWNTs pueden atravesar la membrana por mecanismos de endocitosis, al encontrarlos dentro de vacuolas dentro de la célula, y en algunos casos se les encontró perforando la membrana nuclear (Figura 16) [22].

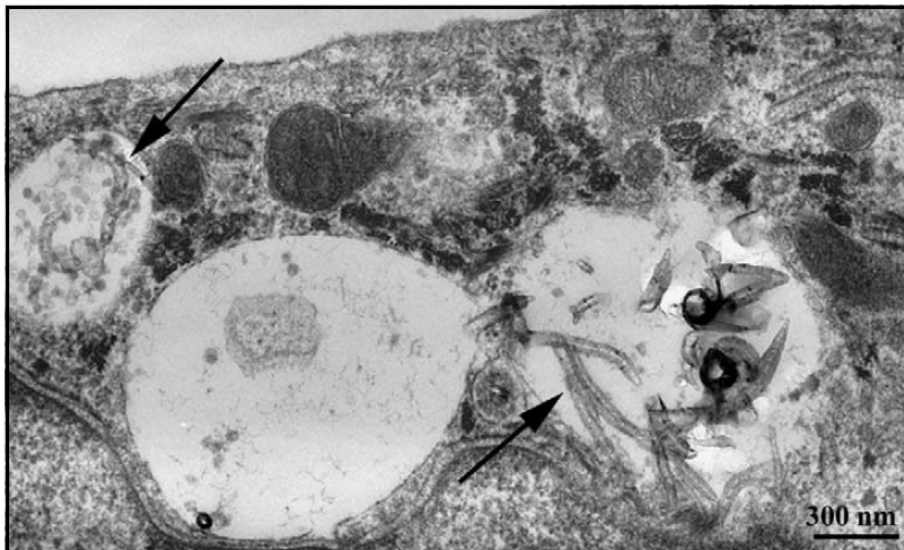


Figura 16. Micrografías TEM obtenidas por Monteiro-Riviere. Se pueden observar MWNTs (señalados por las flechas) dentro de las diferentes vacuolas localizadas dentro del queratinocito [22].

Por otro lado, la interacción que tienen los nanotubos con el DNA ha sido también reportada. Dovbeshko y colaboradores, propusieron a través de los análisis de SEIRA (espectroscopia de absorción por infrarrojo sobre superficies) al hacer interactuar SWNTs con DNA, que éste último sufría una

transición de su estructura B (la más común) a una estructura tipo A. También propusieron por primera vez el modelo de la “envoltura” (Figura 17-b, d), el cual explica la forma en que el DNA se enrolla sobre la superficie de un nanotubo a través de interacciones no covalentes, tal y como sucede

cuando el DNA se enrolla alrededor de las histonas [23]. Por su parte, Li y colaboradores reportaron a través de microscopía AFM, que el autoensamblaje del DNA sobre la superficie de SWNTs y MWNTs puede llevarse a cabo en solución [24]. Cui y colaboradores, al estudiar la interacción de MWNTs con DNA en solución, demostraron que tal interacción también puede darse dentro de la estructura de los nanotubos, al encapsularlo dentro de su cilindro (Figura 17-a,c) [25]. Takahashi y colaboradores, reportaron a través de pruebas con AFM, que la curvatura de los MWNTs juega un papel importante

durante la interacción con el DNA, y que cuando esta interacción se da, el DNA permanece inmóvil sobre la superficie de los MWNTs a través de fuerzas Van der Waals [26]. Posteriormente, el equipo de Li comprobó que la interacción del DNA con SWNTs promovía la desestabilización del mismo, a través de la transición B-A en solución, así mismo observaron que la unión de DNA de doble cadena a los SWNTs, se daba preferentemente en secuencias ricas en G-C pertenecientes al surco mayor del DNA, apoyando así el modelo de la “envoltura” [27].

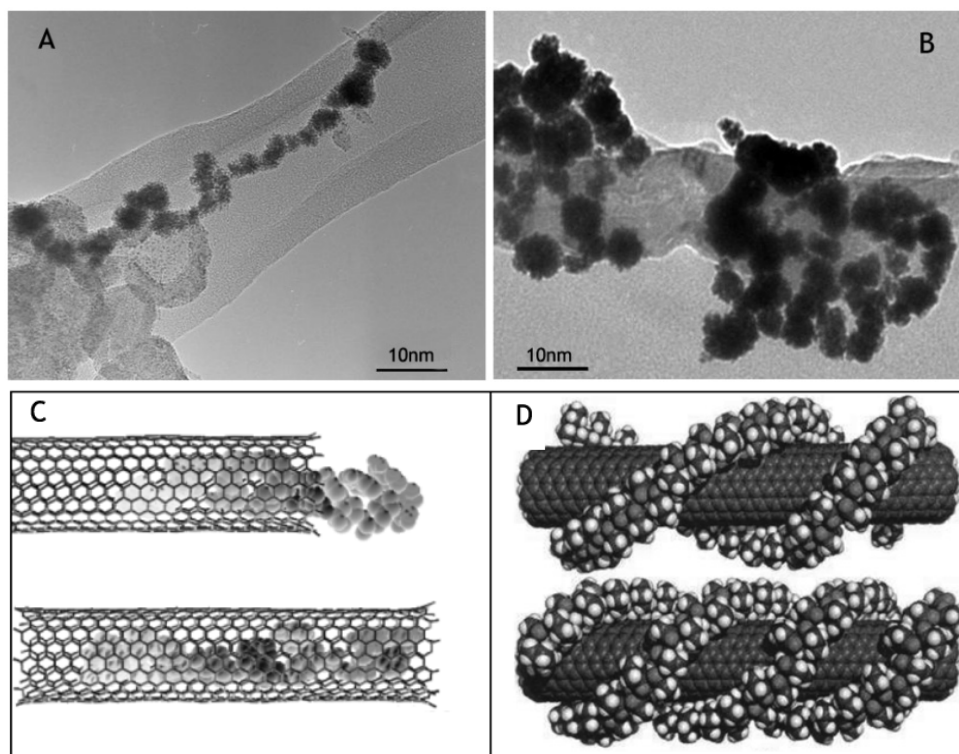


Figura 17. Interacción de MWNTs con DNA: las figuras A (obtenida a través de HRTEM) y C (modelo digital) representan la encapsulación del DNA dentro de un MWNT; las figuras B (obtenida a través de HRTEM) y C (modelo digital), representa el modelo de la “envoltura”, donde el DNA se enrolla alrededor del nanotubo por fuerzas Van der Waals [23,25].

En cuanto a los MWNTs-N6, los resultados obtenidos en este trabajo, parecen indicar que estos nanocompuestos no po-

seen propiedades genotóxicas considerables, dentro del intervalo de concentración de 10 a 60 µg/ml en medio de cultivo con linfocitos

(MANOVA,  $p \geq 0.05$ ). Los análisis estadísticos del efecto de los MWNTs-N6, no fueron significativos en relación con las frecuencias para micronúcleos, gemaciones de cromatina y puentes nucleoplásmicos.

Los MWNTs-N6 empleados para el tratamiento fueron obtenidos a partir de la muestra 1 (relación estequiométrica 1:1) (Capítulo 4). De acuerdo con el modelo de funcionalización en fase de gas propuesto por el equipo de investigación de Basiuk, el la poliamida nylon-6 que ha sido sintetizada a partir de  $\epsilon$ -caprolactam y 1,8-diaminooctano (previamente adherido a la superficie de MWNTs) se une covalentemente a zonas reactivas (principalmente pentágonos y enlaces 6,6 en los extremos) encontradas en la superficie de los MWNTs, produciendo una disminución de las mismas. Al mismo tiempo, durante la formación de nylon-6, éste se enrolla alrededor de los MWNTs y los conglomerados de los mismos [28], provocando que las zonas reactivas que aún no habían reaccionado con la poliamida ahora se encuentran aisladas, evitando así su interacción directa con el DNA. Por lo anterior, se concluye que la funcionalización con nylon-6 disminuye significativamente cualquier propiedad genotóxica presente en los MWNTs prístinos.

Es importante recordar que el tamaño de los MWNTs-N6 es aproximadamente 20 veces mayor que el tamaño para MWNTs prístinos [29]. De acuerdo con las imágenes obtenidas a través de microscopía óptica, SEM y TEM (Capítulo 4), los MWNTs-N6 se encuentran organizados en conglomerados de MWNTs cubiertos por espesas capas de nylon-6, y a pesar de que se realizara el desmantelamiento de los mismos, en general es difícil realizarlo minuciosamente. Cabe destacar que por lo anteriormente, durante la dispersión de los nanotubos en medio de cultivo RPMI, los MWNTs prístinos mostraron una mejor dispersión que los MWNTs-N6

(Figura 4-c). La formación de estos conglomerados y el tamaño de las partículas juegan un papel importante para determinar las propiedades tóxicas en los MWNTs-N6, así como la de los MWNTs prístinos [14,16].

### 6.4.3. Muerte celular

Los resultados obtenidos por el análisis para la apoptosis inducida por el tratamiento con MWNTs prístinos (sección 6.5.5.), indican que no existen efectos significativos (MANOVA,  $p \geq 0.05$ ) ni una relación dosis-respuesta considerable, lo cual indica que los MWNTs no promueven la muerte celular en un rango de concentración de 10-60  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, en los estudios realizados por Bottini y colaboradores, la frecuencia de apoptosis parece incrementar significativamente entre los rangos de concentración de 40-400  $\mu\text{g/ml}$  empleando cultivos con células epiteliales [30]. En los estudios realizados por Muller, la frecuencia de apoptosis incrementa significativamente a partir de los 50  $\mu\text{g/ml}$ , siendo la frecuencia dependiente de la concentración. Es por eso que posiblemente dentro del rango de concentraciones empleadas en el presente estudio (10-60  $\mu\text{g/ml}$ ), aún no es posible observar incrementos significativos en la frecuencia de apoptosis, ni una respuesta dosis-dependiente clara [16].

Se sabe que las células que presentan micronúcleos y han sufrido eventos aneugénicos y clastogénicos, son preferentemente eliminadas a través de la activación de la apoptosis. La inhibición de este tipo de muerte puede deberse a daños irreparables en el material genético, provocando la desregulación de los mecanismos de reparación del mismo, promoviendo la supervivencia de células con micronúcleos, gemaciones de cromatina y puentes nucleoplásmicos [16]. Tales aseveraciones concuerdan con los datos obtenidos en este trabajo, al observar un



incremento significativo en la frecuencia de eventos genotóxicos, y una disminución en la frecuencia apoptosis. Es bien conocido que el aumento en la frecuencia de los bio-indicadores de genotoxicidad se encuentra muy relacionado la inestabilidad genómica y

la inhibición de la muerte celular por apoptosis. Los cuales, provocan una desregulación en la proliferación celular promoviendo la neoplasia que culmina en la aparición de tumores durante el proceso de carcinogénesis [31,32,33].

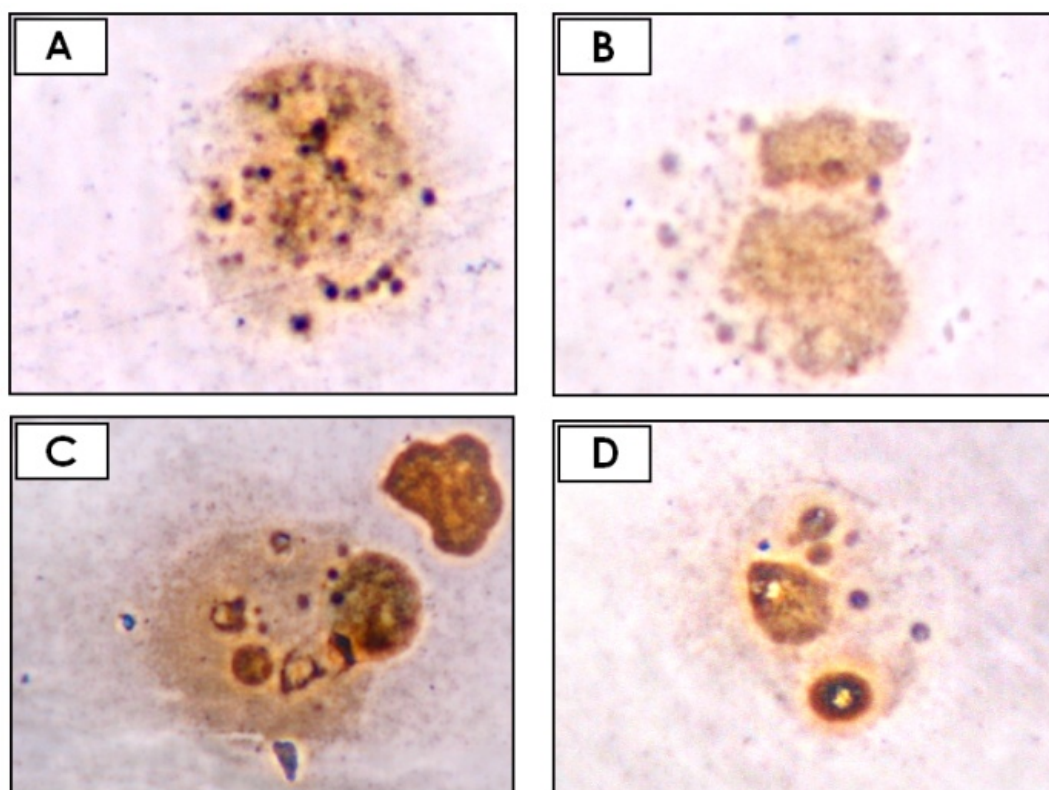


Figura18. Imágenes de algunas células en proceso de apoptosis, se puede apreciar en cada una de las células la formación de cuerpos apoptóticos de diferentes tamaños. (Muestras obtenidas del tratamiento con MWNTs prístinos: a= 20  $\mu\text{g/ml}$ , b= 40  $\mu\text{g/ml}$  y C= 10  $\mu\text{g/ml}$ ; muestra obtenida del tratamiento con MWNTs-N6: d=20  $\mu\text{g/ml}$ ). Aumento 1000X.

Respecto a los resultados obtenidos para el análisis de apoptosis, el tratamiento realizado con MWNTsN6 (Figura 18) mostró efectos significativos (MANOVA,  $p < 0.05$ ) debido a un aumento en la frecuencia de apoptosis. El análisis de regresión lineal indica que tal efecto no es dependiente de la concentración (ANOVA,  $p > 0.05$ ), ya que las frecuencias obtenidas en las diferentes concentraciones empleadas son muy semejantes entre sí y parecen no mostrar efectos

significativos; sin embargo, la única concentración que posee diferencias significativas es la correspondiente a 20  $\mu\text{g/ml}$  (LSD,  $p < 0.05$ ). El mecanismo por el cual se podría estar induciendo la apoptosis en este tratamiento aún desconocido, debido a que el aumento en la frecuencia de apoptosis no es dependiente de la concentración. Parece ser que cualquier efecto genotóxico o citotóxico es eficazmente eliminado por la célula vía apoptosis, ya que en general los MWNTs-N6

no muestran incrementos significativos en las frecuencias de ninguno de los diferentes bioindicadores de genotoxicidad (micronúcleos, gemaciones de cromatina y puentes nucleoplásmicos), del mismo modo, tampoco se observaron efectos adversos en la proliferación de los linfocitos.

Otra posible razón por la cual, se podría explicar el aumento en la frecuencia de apoptosis para este tratamiento, es a través de los resultados obtenidos en los análisis de espectroscopia de IR y análisis de TGA realizados para la caracterización de MWNTs-N6 (Capítulo 4). Tales análisis indican que existe una proporción de  $\epsilon$ -caprolactam dentro de las muestras de MWNTs-N6 que no reaccionó para formar nylon-6 durante la funcionalización, quedando atrapada dentro de los conglomerados de MWNTs, y durante la desgasificación al vacío fue imposible eliminarla por completo. En el momento en que se tomó una muestra pequeña de MWNTs-N6 para tratar a los cultivos con linfocitos, probablemente se removieron al azar zonas que contenían residuos de  $\epsilon$ -caprolactam distribuidos heterogéneamente y en diferente concentración. Posteriormente, fue necesario macerar los nanotubos hasta obtener un polvo negro muy fino, desmantelando así los conglomerados. Al introducir los nanotubos dentro del medio de cultivo con linfocitos, se promovió la liberación de  $\epsilon$ -caprolactam encontrado en los conglomerados, y debido a su alta solubilidad [40] se dispersó para entrar en contacto con las células y promoviendo su muerte.

Todo lo anterior podría explicar el porqué se obtuvieron frecuencias para apoptosis muy heterogéneas en las diferentes concentraciones empleadas para el tratamiento con MWNTs-N6. No obstante, es necesario realizar un estudio mucho más profundo para obtener información acerca de las propiedades citotóxicas y genotóxicas

para  $\epsilon$ -caprolactam que permitan determinar si este compuesto es el causante de la inducción de apoptosis. También es importante determinar si la concentración del mismo dentro de los cultivos es realmente heterogénea e independiente de la concentración de nylon-6 presente en las muestras de MWNTs-N6.

Existen reportes que indican que  $\epsilon$ -caprolactam ha demostrado ser un compuesto citotóxico, el cual es capaz de promover irritación en ojos, garganta y piel. Otros reportes que se han realizado *in vivo* empleando conejos y ratas también han demostrado la notoria actividad citotóxica de este compuesto; sin embargo aún se ha clasificado como un compuesto carcinogénico [35,36, 37]. Por otro lado, estudios mutagénicos realizados en *Drosophila melanogaster* y en levaduras, parecen indicar que  $\epsilon$ -caprolactam no posee una actividad genotóxica significativa [38,39].

## 6.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos a través de la prueba de micronúcleos empleada para determinar la biocompatibilidad de MWNTs prístinos y MWNTs-N6 en el presente estudio, proveen información relevante acerca del comportamiento de estas nanoestructuras dentro de cultivos con linfocitos humanos. Es importante considerar diferentes factores que podrían determinar la actividad genotóxica y citotóxica de los mismos. Tales factores son: la pureza de los MWNTs, el grado de dispersión dentro de los cultivos con linfocitos, la formación de conglomerados, la notoria diferencia de tamaño entre los MWNTs prístinos y los MWNTs-N6, el tiempo de exposición empleado, así como la concentración de los nanotubos dentro de los cultivos.

En comparación con los MWNTs prístinos, los MWNTs-N6 presentaron una mayor biocompatibilidad al estar en contacto con los linfocitos humanos dentro de las concentraciones de entre 10 y 60 µg/ml. Por lo anterior, es posible concluir que la funcionalización de MWNTs con nylon-6, disminuye considerablemente la actividad genotóxica de los MWNTs, lo que concuerda con los estudios realizados por Salvador-Morales [21].

Por su parte, el incremento en la frecuencia de apoptosis no dependiente de la concentración debe ser estudiado con mayor detenimiento para determinar si pudo ser inducida únicamente por la actividad citotóxica que aparentemente presentan las moléculas de ε-caprolactam, ya que los análisis de espectroscopia de IR y los análisis de TGA indican que estos residuos aún se encuentran presentes dentro de la muestra de MWNTs-N6. Alternativamente, es necesario comprobar tal inducción podría deberse más bien a las cadenas de nylon-6, lo cual podría ser descartado debido a que este polímero se ha considerado como un material seguro y no tóxico.

Por todo lo anterior se recomienda emplear los MWNTs-N6 en concentraciones cercanas a los 60 µg/ml como base para futuros estudios de biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*, los cuales podrían determinar con mayor precisión qué concentraciones son las más óptimas para futuras aplicaciones bio-

médicas. Asimismo, para evitar eventos de apoptosis se recomienda emplear MWNTs-N6 con una estequiometría menor a la empleada para preparar las soluciones stock (1:1), donde la concentración de ε-caprolactam que no reaccionó para formar nylon-6 sea mínima o nula (ej. 1:0.4 -1:08), y la concentración de nylon-6 sea considerablemente alta (Capítulo 4).

Existe evidencia suficiente para confirmar que los MWNTs prístinos presentan una notoria actividad genotóxica, debido a que éstos indujeron el aumento en la frecuencia de los diferentes eventos de genotoxicidad, actuando principalmente como agentes clastogénicos y aneuploidogénicos. Por lo que se aconseja emplearlos a concentraciones por debajo de los 60 µg/ml en futuros estudios *in vivo* e *in vitro*. Debido a la gran cantidad de daño inducido al DNA encontrado en este tratamiento es posible que la apoptosis y los mecanismos que la regulan se encuentren inhibidos, lo cual promueve que células con micronúcleos, gemaciones de cromatina y puentes nucleoplásmicos sobrevivan en el medio de cultivo. A pesar de eso, diversos estudios han determinado que los MWNTs prístinos inducen apoptosis en cultivos celulares a partir de los 40 y 50 µg/ml. Por lo tanto, es posible que dentro de los intervalos de concentración empleados en este estudio, aún no se observen con claridad incrementos significativos en la frecuencia de apoptosis.

---

## Referencias

[1] Montero, R.; Serrano, L.; Araujo, A.; Dávila, V.; Ponce, J.; Camacho, R.; Morales, E.; Méndez, A. (2006): Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*; 21:335–342.

[2] Montero, R.; Serrano, L. (1997): Micronuclei and Chromatid Buds Are the Result of Related Genotoxic Events. *Mutagenesis*; 38:38-45.

[3] Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L.; Patiño, A. (2005): The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents, *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; 28:227-236.

- [4] Fenech, M. (2002): Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today*; 7:1128-1137.
- [5] Albertini S.; Miller B.; Chetelat A.-A.; Locher F. (1997): Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*; 392:187-208.
- [6] Pagano, R. R. (2006): *Estadística en las ciencias del comportamiento*. (ed.) Thomson Learning Ibero, 7ª edición. Pensilvania; 561 pp.
- [7] *Statgraphics Plus 5.1*, (2002).
- [8] Maynard, A. D.; Baron, P. A.; Foley, M.; Shvedova, A. A.; Kisin, E. R.; Castranova, V. (2004): Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*; 67: 87-107.
- [9] Jia, G.; Wang, H.; Yan, L.; Wang, X.; Pei, R.; Yan, T.; Zhao, Y.; Guo, X. (2005): Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene. *Environmental Science & Technology*; 39:1378-1383.
- [10] M. V. Raja, P.; Connolley, J.; Ganesan, G. P.; Ci, L.; Ajayan, P. M.; Nalamasu, O.; Thompson, D. M. (2007): Impact of carbon nanotube exposure, dosage and aggregation on smooth muscle cells. *Toxicology Letters*; 169:51-63.
- [11] Tian, T.; Cui, D.; Schwarz, H.; Gomez Estrada, G.; Kobayashi, H. (2006): Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicology in Vitro*; 20:1202-1212.
- [12] Sato, Y.; Yokoyama, A.; Shibata, K. Akimoto, Y.; Ogino, S.; Nodasaka, Y.; Kogo, T.; Tamura, K.; Akasaka, T.; Uo, M.; Motomiya, K.; Jeyadevan, B.; Ishiguro, M.; Hatakeyama, R.; o Watari F.; Tojia, K. (2005): Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Molecular Biosystems*; 1:176-182.
- [13] Shvedova, A. A.; Castranova, V.; Kisin, E.R.; Schwegler-Berry, D.; Murray, A.R.; Gandelsman, V.Z.; Maynard, A.; Baron, P. (2003): Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*; 66: 1909-1926.
- [14] Wick, P.; Manser, P.; Limbach, L. K.; Dettlaff-Weglikowska, U.; Krumeich, F.; Roth, S.; Stark, W. J.; Bruinink A. (2007): The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters*; 168:121-131
- [15] Manna, S. K.; Sarkar, S.; Barr, J.; Wise, K.; Barrera, E. V.; Jejelowo, O.; Rice-Ficht, A. C.; Ramesh, G. T. (2005): Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor-KB in Human Keratinocytes. *Nano Letters*; 5:1676-1684.
- [16] Muller, J.; Decordier, I.; Hoet, P.; Lombaert, N.; Thomassen, L.; Huaux, F.; Lison, D.; Kirsch-Volders, M. (2008): Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis*; 29:427-433.
- [17] Fenoglio, I.; Tomatis, M.; Lison, D.; Muller, J.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Fubini B. (2006): Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity?. *Free Radical Biology & Medicine*; 40:227-1233.
- [18] *Hands-on Science (H-Sci) Project: Chemical Safety Database*: ([http://ptcl.chem.ox.ac.uk/~hmc/hsci/chemicals/Nylon\\_6,6.html](http://ptcl.chem.ox.ac.uk/~hmc/hsci/chemicals/Nylon_6,6.html)).
- [19] Nielsen M.; Jurasek P.; Hayashi J.; Furimsky E. (1995): Formation of toxic gases during pyrolysis of polyacrylonitrile and nylons. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* ; 35:43-51.
- [20] Hull, T. R.; Stec, A. A.; Lebek, K.; Price, D. (2007): Factors affecting the combustion toxicity of polymeric materials. *Polymer Degradation and Stability*; 92:2239-2246
- [21] C. Salvador-Morales, E. V. Basiuk, V. A. Basiuk, M. L. H. Green, and R. B. Sim, (2008): Effects of chemical modification on the complement-activating and protein-binding characteristics of carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*; in press.
- [22] Monteiro-Riviere, N.A.; Nemanich, R.J.; Inman, A.O.; Wang, Y.Y.; Riviere, J.E. (2005): Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters*; 155: 377-384.
- [23] Dovbeshko, G. I.; Repnytska, O. P.; Obraztova, E. D.; Shtogun, Ya. V.; Andreev, E. O. (2003): Study of DNA interaction with carbon nanotubes. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics*; 6:105- 108.
- [24] Li, S.; He, P.; Dong, J.; Guo, Z.; Dai, L. (2004): DNA-Directed Self-Assembling of Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* ; 127:14-15.
- [25] Cui, D.; Ozkan, C. S.; Ravindran, S.; Kong, Y.; Gao, H. (2004): Encapsulation of Pt-labelled



DNA Molecules inside Carbon Nanotubes. *Molecular and Cellular Biosciences* 11, 113-121

[26] Takahashi, H.; Numao, S.; Bandow S.; Iijima S. (2005): AFM imaging of wrapped multiwall carbon nanotube in DNA. *Chemical Physics Letters*; 418: 535 -539.

[27] Li, X.; Peng Y.; Qu, X. (2006): Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing B–A transition in solution. *Nucleic Acids Research*; 34:3670–3676.

[28] Basiuk, V.A.; Salvador-Morales C., Basiuk, E. V.; Jacobs, R.; Ward M.; Chu, B.; Sim, R.B.; Green, M. L. H. (2006): “Green” derivatization of carbon nanotubes with Nylon 6 and L-alanine. *Journal of Materials Chemistry*; 16:4420-4426.

[29] Simonetti, V.; Park, J. Y.; Panaro N. J.; Kricka, L. J. (2008): Nylon and nylon blend nanotubes and nanorods. *Journal of Nanoparticle Research*; 10:365-368

[30] Bottini, M.; Bruckner, S.; Nika, K.; Bottini, N.; Bellucci, S.; Magrini, A.; Bergamaschi, A.; Mustelin, T.(2006): Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology Letters*; 160: 121–126

[31] El-Zein, R. A.; Schabath, M. B.; Etzel C. J.; Lopez M. S.; Franklin J. D.; Spitz M. R. (2006): Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk. *Cancer Research*; 66: 6449-6456.

[32] Hagmar, L.; Bonassi, S.; Stromberg, U.; Brogger, A.; Knudsen, L. E.; Norppa, H.; Reuterwall, C.(1998): Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH), *Cancer Research*; 58:4117-4121.

[33] Evan, G.I.; Vousden, K.H. (2001): Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*; 411: 342-348.

[34] Warheit, D. B.; Webb, T. R.; Reed, K. L.; Hansen J. F.; Kennedy, J. R. (2003): Four-week inhalation toxicity study in rats with nylon respirable fibers: rapid lung clearance. *Toxicology*; 192:189-210.

[35] Hazard Summary: “Caprolactam”. *Technology Transfer Network Air Toxics Web Site*: (<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/caprolac.html#ref4>).

[36] Reinhold R.W.; Hoffman G.M.; Bolte H.F.; Rinehart W.E.; Rusch G.M.; Parod R.J.; Kayser M. (1998): Subchronic Inhalation Toxicity Study of Caprolactam (with a 4-Week Recovery) in the Rat via Whole-Body Exposures. *Toxicological Sciences*; 44:197-205.

[37] Gad, S. C.; D.A.B.T., Ph. D.; Robinson, K.; Serota, D. G.; Colpean, B. R. (2006): Developmental toxicity studies of caprolactam in the rat and rabbit. *Journal of Applied Toxicology*; 7:317-326.

[38] Vogel, E. W. (1989): Caprolactam induces genetic alterations in early germ cell stages and in somatic tissue of *D. melanogaster*. *Mutation Research*; 224: 339-342.

[39] Roberts, K. J.; Hastwell, P. W.; Harvey, J. S.; Billinton, N.; Walmsley, R. M.; Rees, R. W. (2005): Inter-laboratory validation of the Gentronix Green-Screen GC assay. *Mutagenesis*; 20: 469-488.

[40] National Research Council of National Academies (2007): *Spacecraft Water Exposure Guidelines for Selected Contaminants*. (ed.) The National Academies Press, Washington; 2: 513 pp.

[41] Mattson, M. P., Haddon, R. C.; Rao, A. M. (2000): Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *Journal of Molecular Neuroscience*; 6: 175-182.

[42] Hu H, Ni YC, Montana V, Haddon RC, Pappas V (2004): Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth. *Nano Letters*; 4:507-511.

[43] Lovat, V.; Pantarotto, D.; Lagostena, L.; Cacciari, B.; Grandolfo, M.; Righi, M.; Spalluto, G.; Prato, M.; Ballerini, L. (2005): Carbon Nanotube Substrates Boost Neuronal Electrical Signaling. *Nano Letters*; 5:1107 -1110.

[44] Bianco, A.(2004): Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules. *Expert opinion on drug delivery*; 1:57-65.

[45] Bianco, A.(2004): Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules. *Expert opinion on drug delivery*; 1:57-65.

[46] Klumpp C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. (2006): Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica et biophysica acta*; 1758:404-412.



# APÉNDICE

## A

### Aplicaciones generales de los nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono presentan extraordinarias propiedades electrónicas, ópticas, mecánicas, térmicas, etc., las cuales pueden ser explotadas en diferentes áreas para el desarrollo de diversas aplicaciones. Los nanotubos de carbono, pueden ser modificados y manipulados químicamente, de

modo es posible obtener extraordinarias e innovadoras propiedades, optimizando su solubilidad y dispersión [1]. La siguiente tabla muestra en resumen algunas de las aplicaciones vigentes y futuras de estos nanomateriales en áreas como la electrónica, mecánica, industria, entre otras.

#### A.1. Dispositivos electroquímicos

El tamaño que presentan los nanotubos y su gran capacidad para el almacenar energía de diferentes fuentes por capilaridad, permitiría el desarrollo de electrodos para la creación de baterías y celdas de combustible mucho más duraderas y eficientes. La creación de estos electrodos permitiría también el desarrollo de dispositivos supercapacitores de doble membrana de mayor capacidad que los capacitadores dieléctricos convencionales, así como la creación de accionadores neumáticos e hidráulicos con un sinfín de aplicaciones en el área de la robótica y la mecánica. Estos dispositivos pueden ser empleados cuando se requiere mucho más energía y acelerar procesos mecánicos, así como de almacenamiento [1,2,3].

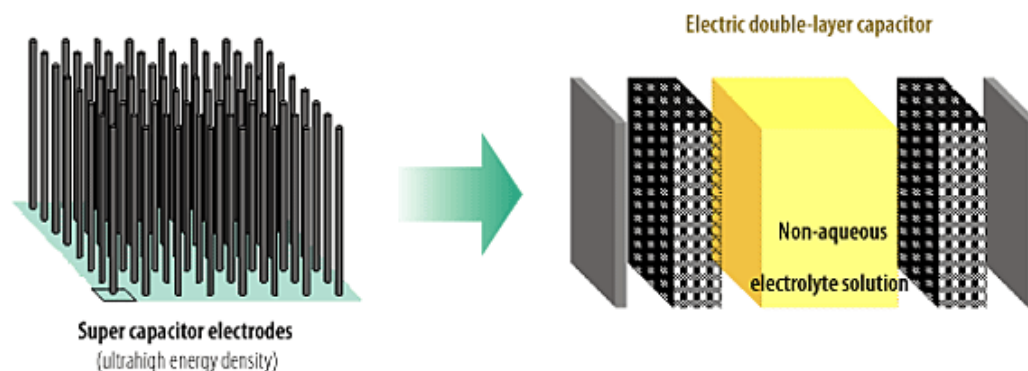


Figura 1. Supercapacitores basados en nanotubos de carbono (<http://www.nedo.go.jp/english/activities-portal/gaiyou/p06028/p06028.gif>)

- Almacenamiento de hidrógeno:** El hidrógeno es una fuente de energía que a través de su combustión produce agua y energía en grandes cantidades. Puede ser fácilmente regenerado, y se ha propuesto que los nanotubos de carbono sean potenciales almacenes para este elemento. De este modo, se proveería de energía a poderosos vehículos eléctricos, computadoras y otros sistemas que lo requieran. Existen dos maneras para almacenar hidrógeno dentro de un nanotubo: a) en fase gaseosa por adsorción de hidrógeno molecular y b) por almacenamiento electroquímico con hidrógeno atómico [2,3].

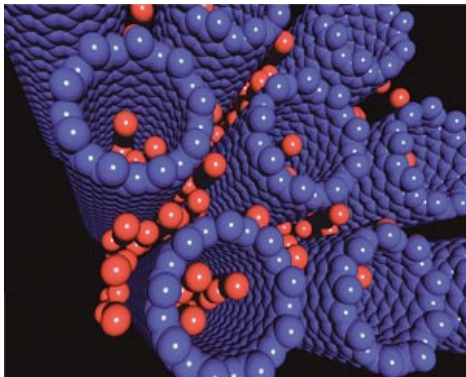


Figura 2. Almacenaje de hidrógeno ([http://www.rsc.org/images/smith%20main%20main%20\\_tcm18104506.jpg](http://www.rsc.org/images/smith%20main%20main%20_tcm18104506.jpg)).

- Pilas recargables de litio:** Una pila recargable de litio trabaja a través de inserciones electroquímicas del mismo en ambos electrodos dentro de la pila. La capacidad para almacenar energía y el tiempo de vida de la pila, dependen de la saturación de litio en sus electrodos. Dentro de las zonas intersticiales (en la parte interna de un nanotubo, entre las capas de un MWNT, etc.) de un nanotubo, es posible insertar grandes concentraciones de litio y mantener por mas tiempo almacenada la energía que en una pila convencional [2].

## A.2. Dispositivos para la creación de imagen y video

Debido a su alta conductividad, los SWNTs pueden emplearse como campos de emisión de electrones. Sin embargo se ha visto empleando MWNTs, que también éstos también son capaces de emitir fotones a diferentes longitudes de onda en el espectro de la luz visible. Entre más afiladas se encuentren sus terminaciones, mucho mayor será el comportamiento como emisores y tendrán mucho mayor capacidad de conducción [1, 5].

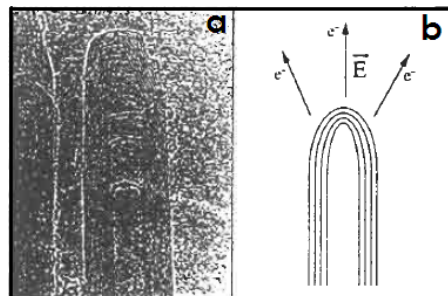


Figura 3. a) Micrografía TEM, b) esquema para la emisión de electrones por MWNTs [6].

- Pantallas a color e impresión de imágenes:** Una aplicación directa es la construcción de pantallas que eviten el uso de un sólo tubo de rayos catódicos tradicional. Entonces cada nanotubo funcionaría como un emisor de electrones en cada píxel, obteniendo imágenes con mejor resolución y mucho más definidas [1,4,7]. En la actualidad, la compañía SAMSUNG ya ha producido pantallas a colores basadas en nanotubos de carbono [8]. Por otro lado, se ha logrado realizar la impresión de imágenes a partir de tinta construida con solución de nanotubos de carbono conductores. Las imágenes se forman a través de patrones eléctricos, lo que podría revolucionar el mundo de la fotografía y la impresión [24].

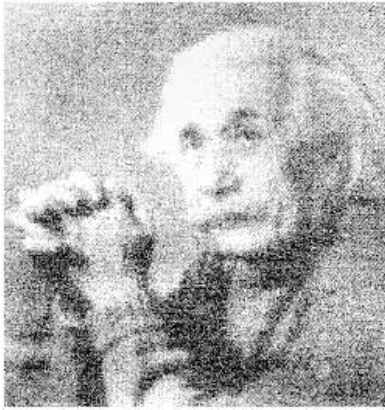


Figura 4. Imágenes obtenidas empleando tinta a base de nanotubos de carbono [24].

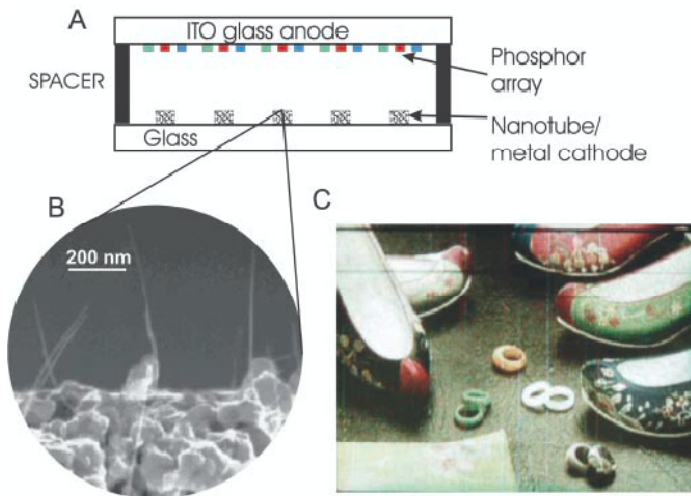
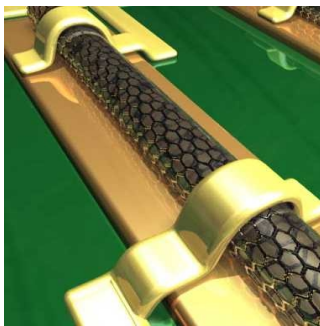


Figura 5. a, b) ilustración sistemática de un panel empleado para la construcción de pantallas basadas en nanotubos de carbono; c) imagen obtenida por pantalla de SAMSUNG con una dimensión de 5 pulgadas[8].

### A.3. Dispositivos electrónicos



Los nanotubos de carbono son candidatos para la construcción de dispositivos electrónicos de alto rendimiento, de tamaño nanométrico y de fácil fabricación. Para el desarrollo de estos dispositivos, es un reto llevar a cabo el alineamiento de estos nanomateriales entre dos electrodos, permitiendo que el nanotubo pueda conducir casi instantáneamente los electrones a través de la superficie de su cilindro [9].

Figura 6. SWNT conductor alineado entre dos electrodos [9].

- Transistores y circuitos eléctricos:** Un transistor es un dispositivo electrónico semiconductor que cumple con funciones de amplificador, oscilador, conmutador o rectificador. Haciendo uso de la alta conductividad que poseen los nanotubos, es posible desarrollar transistores mucho más pequeños, capaces de operar hasta 1000 veces mejor que los transistores convencionales, para implementarlos en la construcción de circuitos eléctricos para el diseño de novedosos y eficientes dispositivos electrónicos [10,11].

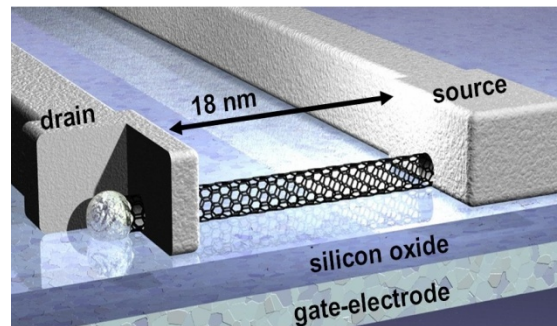


Figura 7. Esquema del transistor más pequeño del mundo basado en SWNTs ([http://www.nanotechnow.com/news.cgi?story\\_id=06788](http://www.nanotechnow.com/news.cgi?story_id=06788)).

- **Sintonizadores y amplificadores de radio:** El nanotubo es colocado entre dos electrodos y se le aplica un campo electromagnético, éste a su vez actúa tanto como sintonizador y como amplificador, sin necesidad de otros componentes que realicen tales funciones como en los equipos convencionales. El nanotubo atrapa las señales electromagnéticas mecánicamente y no eléctricamente como lo haría una antena común. Cuando las señales llegan al nanotubo, éste comienza a vibrar en diferentes frecuencias, las cuales son convertidas posteriormente en señales eléctricas, sintonizando perfectamente diferentes señales de radio. Este principio puede servir para la construcción de equipos de sonido, dispositivos inalámbricos, teléfonos celulares, etc. [12].

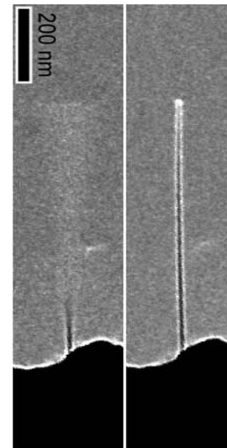


Figura 8. Nanotubo de carbono como sintonizador y amplificador de radio; vibra a diferentes frecuencias después de recibir las señales de radio [12].

- **Microprocesadores y microchips:** Actualmente, realizar circuitos eléctricos mucho más pequeños y veloces es imprescindible en áreas como la robótica y la computación. En los sistemas convencionales se emplean metales como el silicio, que al ser reducidos en tamaño pierden muchas de sus propiedades conductoras. Por lo que emplear nanotubos de carbono para lograr tal objetivo sería de gran ayuda, debido al tamaño nanométrico y la gran capacidad conductora que poseen. Actualmente ya han sido desarrollados por la empresa IBM [3,13].

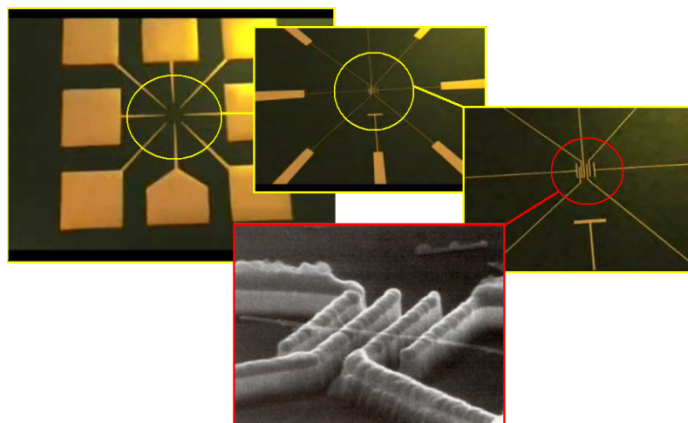


Figura 9. Microchip basado en SWNTs (<http://mx.youtube.com/watch?v=74YkJYT7Uj4>).

#### A.4. Dispositivos mecánicos y de escaneo

Los fuertes enlaces formados entre los átomos de carbono que conforman las paredes de los nanotubos de carbono, permiten que estas estructuras posean extraordinaria resistencia, dureza y elasticidad. Lo que los protege a deformaciones físicas y al daño mecánico [1].

- **Nanopuntas y nanoescáneres:** Por su alta flexibilidad, los nanotubos de carbono se han propuesto como puntas de escaneo para microscopios AFM y STM. Lo que aumentaría la resolución de las imágenes obtenidas en comparación de las puntas convencionales metálicas. Empleando el método de desprendimiento por “peeling”, es posible obtener puntas de diferentes diámetros a partir de MWNTs [14,15].



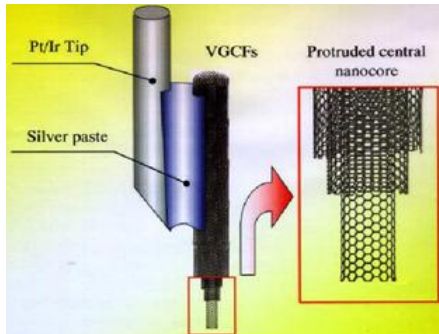


Figura 10. Punta basada en MWNTs para AFM [14].

- Nanopinzas:** Dos nanotubos de carbono de unas cuantas micras de largo y con aproximadamente 50 nm de diámetro son adheridos a superficies de oro o de vidrio. A través de un cambio de voltaje, éstos pueden abrirse o cerrarse como verdaderas pinzas, las cuales son capaces de atrapar objetos con tamaños aproximados de 500 nm [13,16]. El desarrollo de nanopinzas permitiría la manipulación de moléculas y más tarde el de átomos individuales, convirtiéndose en importantes herramientas que permiten el desarrollo y la manipulación de dispositivos electrónicos a nanoescala [16].

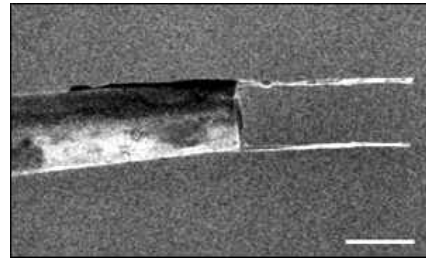


Figura 11. Imagen TEM de nanopinzas construidas con SWNTs sobre superficie de oro.

- Nanoengranajes y nanomáquinas:** Es posible construir nanoengranajes por medio de la adición de diferentes moléculas como las de fullereno, que actúen como dientes del engranaje sobre la superficie del nanotubo, y construir nanomáquinas o nano-motores a través del ensamblaje de SWNTs y MWNTs usando polímeros como el nylon, capaces de hacerlos girar y provocando un movimiento mecánico [17, 21].

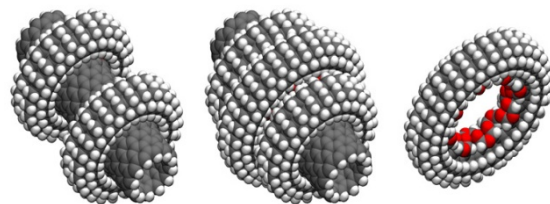


Figura 12. Nano engranajes y nanomáquinas (<http://www.nanotech-now.com>)

## A.5. Materiales de máxima resistencia

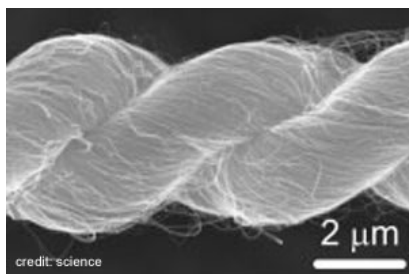


Figura 13. Nanofibras de carbono.  
[http://www.livescience.com/images/h\\_carbon-nanofiber\\_03.jpg](http://www.livescience.com/images/h_carbon-nanofiber_03.jpg)

A partir de nanotubos de carbono y sus conglomerados, es posible llevar a cabo la construcción de fibras y polímeros de mayor resistencia y conductividad. Con los cuales, se sustituirían materiales cables como la fibra óptica, algunos metales y telas de gran resistencia. Se puede emplear a los nanotubos de carbono como aditivos para el reforzamiento de fibras a través de su funcionalización con diversos polímeros (ej. nylon-6, DNA) [1, 18,19].



- **Chalecos antibalas:** También es posible construir fibras de uso textil mucho más resistentes, elásticas y duraderas. Ejemplo de esto es la idea de construir chalecos antibalas capaces de soportar grandes impactos a través del uso de SWNTs; sin embargo se ha planteado que un MWNT puede transmitir a través de cada una de sus capas la fuerza del impacto evitando que las balas pueda perforar el chaleco más que un SWNT [20].

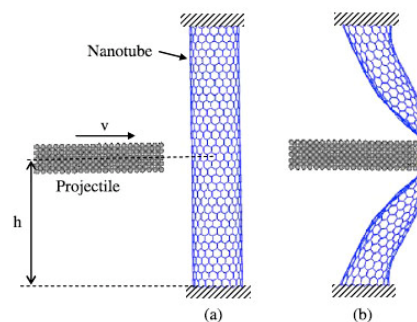


Figura 13. SWNT es capacidad de resistir a deformaciones debido a impactos (<http://www.nanowerk.com/spotlight/id3134.jpg>).

## A.6. Soportes catalíticos y dispositivos térmicos

Los nanotubos de carbono pueden ser buenos conductores de temperatura y mantener sus propiedades intrínsecas muy estables en rangos amplios de temperatura. Se han propuesto como posibles candidatos para la construcción de dispositivos de emisión de calor, enfriamiento, sensores y catalizadores químicos, entre otros [5, 22].

- **Dispersadores de calor:** Se han propuesto la construcción de disipadores de calor que permitan mantener trabajando a temperaturas bajas dispositivos electrónicos como microprocesadores, circuitos electrónicos, dispositivos de audio y video y teléfonos celulares. Estos dispersadores están formados por una serie de conjuntos de MWNTs, alineados de forma vertical y colocados por encima de los dispositivos que se desean mantener a bajas temperaturas acoplados a un ventilador [23].

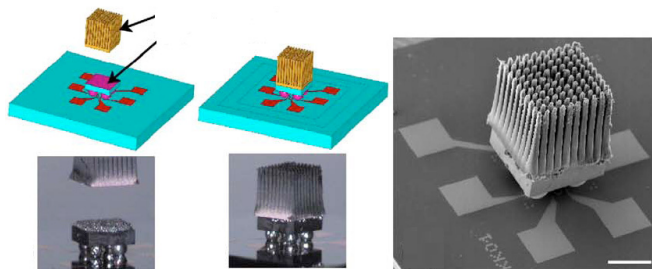


Figura 14. Dispersador de calor formado por MWNTs y colocado sobre microchip [23].

- **Soportes catalíticos:** Es relativamente fácil adherir diversas moléculas a la superficie de un nanotubo a través diferentes métodos de funcionalización (covalente o no covalente), llevando a cabo diferentes reacciones químicas (ej. polimerización), por lo que se han propuestos como soportes catalíticos para acelerar y llevar a cabo diversas reacciones químicas a diferentes rangos de temperatura sin ser dañados por sobrecalentamiento [5].

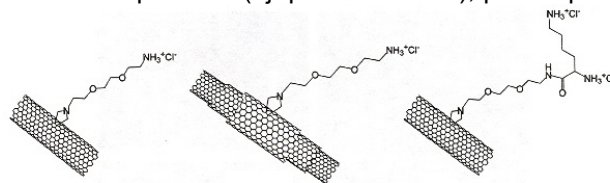


Figura 15. Reacción química sobre nanotubos de carbono (<http://www.emergentcomputation.com/Images/RaviSing.jpg>).

---

## Referencias

- [1] **Carbon Nanotubes – Applications of Carbon Nanotubes (Buckytubes):** ([http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=980#\\_Other\\_Applications](http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=980#_Other_Applications)).
- [2] **Daenen, M.J.M.; Fouw, R.; Hamers, B.; Jansen, P.G.A.; Schouteden, K.; Veld. M.A.J. (2003):** *Multi Disciplinair Project: Wondrous World of Carbon Nanotubes*: (<http://students.chem.tue.nl/ifp03>).
- [3] **Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. (2002):** Carbon Nanotubes—the Route Toward Applications. *Science*; 297:787-792
- [4] **Wei, B. Q.; Vajtai, R.T.; Ajayan, P. M. (2001):** Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes. *Applied Physics Letters*; 79:1172
- [5] **Properties and applications of carbon nanotubes:**([http://www.cheaptubesinc.com/applications.htm#Biomedical\\_Applications](http://www.cheaptubesinc.com/applications.htm#Biomedical_Applications)).
- [6] **Tanaka, K.; Yamabe T.; Fukui K. (1999):** *The science and technology of carbon nanotubes*. (ed.) Elsevier, Londres; 191pp
- [7] **Q. H. Wang, A. A. Setlur, J. M. Lauerhaas, J. Y. Dai, E. W. Seelig, and R. P. H. Changa (1998):** A nanotube-based field-emission flat panel display. *Applied Physics Letters*; 72:2912–2913
- [8] **Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer W. A. (2002):** Carbon Nanotubes—the Route Toward Applications. *Science*; 297: 787-792.
- [9] **Self-assembled nanowire devices:** (<http://www.ati.surrey.ac.uk/phd/projects/compiled>).
- [10] **Appenzeller, J.; Knoch, J; Martel, R.; Derycke, V.; Wind S. J.; Avouris, P. (2002):** Carbon Nanotube Electronics. *IEEE Transactions on Nanotechnology*; 1:78-85
- [11] **Raychowdhury, A.; Mukhopadhyay, S.; Roy, K. (2003):** Modeling of Ballistic Carbon Nanotube Field Effect Transistors for Efficient Circuit Simulation. In: *International Conference on Computer Aided Design, IEEE Computer Society*; 487 – 490
- [12] **Jensen, K.; Weldon, J.; Garcia, H.; Zettl, A. (2007):** Nanotube radio. *Nano letters*; 7:3508 - 3511
- [13] **Alcaa Quispe, F. (2005):** *Estructura y síntesis de nanotubos de carbono*. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 37pp.
- [14] **Wong, S. S.; Woolley, A. T.; Odom, T. W.; Huang, J.-L.; Kim, P.; Vezenov, D. V.; Liebera, C. M. (1998):** Single-walled carbon nanotube probes for high-resolution nanostructure imaging. *Applied Physics Letters*; 73:3465-3467.
- [15] **Cummings, J.; Collins P. G.; Zettl, A. (2000):** Peeling and sharpening multiwall nanotubes. *Nature*; 406:586
- [16] **Kim, P.; Lieber, C. M. (1999):** Nanotube Nanotweezers. *Science*; 286:2148 - 2150
- [17] **Lozovik, Y. E.; Minogin, A. V.; Popov, A. M. (2003):** Nanomachines Based on Carbon Nanotubes. *Physics Letters A*; 313:112-121.
- [18] **Baughman, R. H. (2000):** Putting a New Spin on Carbon Nanotubes, *Science*; 290:1310-1311.
- [19] **Basiuk, V.A.; Salvador-Morales C., Basiuk, E. V.; Jacobs, R.; Ward M.; Chu, B.; Sim, R.B.; Green, M. L. H. (2006):** “Green” derivatization of carbon nanotubes with Nylon 6 and L-alanine. *Journal of Materials Chemistry*; 16:4420-4426.
- [20] **Liangchi Zhang (2006):** Energy absorption capacity of carbon nanotubes under ballistic impact. *Applied Physics Letters*; 89:123-127
- [21] **Endo, M.; Hayashi, T.; Kim, Y. A.; Terrones, M.; Dresselhaus, M. S. (2004):** Applications of carbon nanotubes in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. A*; 362:2223–2238
- [22] **Lukes, J.; Zhong, H. (2007):** Thermal Conductivity of Individual Single-Wall Carbon Nanotubes *Journal of Heat Transfer*; 129:705-716
- [23] **Kordás, K.; Tóth, G.; Moilanen, P.; Kumpumäki, M.; Vähäkangas, J.; Uusimäki, A. (2007):** Chip cooling with integrated carbon nanotube microfin architectures. *Applied Physics Letters*; 90: 123105/1-123105/3
- [24] **Kordás, K.; Mustonen, T.; Tóth, G.; Jantunen, H.; Lajunen, M.; Soldano, C.; Talapatra, S.; Kar, S.; Vajtai, R.; Ajayan, P. M. (2006):** Inkjet Printing of Electrically Conductive Patterns of Carbon Nanotubes. *Small*; 2:1021-1025.

# APÉNDICE

## B

### Aplicaciones biológicas de los nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono son novedosos materiales de tamaño nanométrico que poseen únicas e inigualables propiedades físico-químicas. Debido a esto, éstos han sido considerados y empleados para numerosas aplicaciones principalmente en el área de la tecnología. Recientemente, también se ha prestado atención a las propiedades biológicas que parecen poseer, y no sólo eso, la capacidad de funcionalizarlos

para aumentar su solubilidad y la posibilidad de obtener nuevos materiales híbridos con nuevas propiedades, abre paso al desarrollo de potenciales aplicaciones dentro de áreas de interés biológico y biomédico [1, 2].

La siguiente tabla muestra algunas de las aplicaciones más importantes en el área biológica y biomédica.

#### B.1. Ingeniería de tejidos

Algunos estudios realizados han considerado que los nanotubos de carbono podrían emplearse como soportes para el crecimiento de diferentes tipos celulares, por lo que se busca que éstos puedan mimetizar y asemejar las funciones de una verdadera matriz extracelular, permitiendo la implantación de las células dentro de los cultivos y sirviendo como soportes, promoviendo la proliferación celular, la reorganización celular en tercera dimensión y la diferenciación celular [1].

- **Soporte para la proliferación celular:** El polietileno, el ácido glicólico, el ácido láctico y el fosfato de calcio son ejemplos de soportes convencionales empleado para la ingeniería de tejidos; sin embargo, los nanotubos de carbono parecen proveer más ventajas que éstos, ya que pueden formar largas y amplias redes entre si mismos, lo cual confiere a las células de un mecanismo de soporte y adherencia durante su crecimiento. En adición los nanotubo tiene una gran porosidad que permite la difusión de gases y nutrientes, proporcionando las condiciones adecuadas para el crecimiento de tejidos *in vitro* [1].

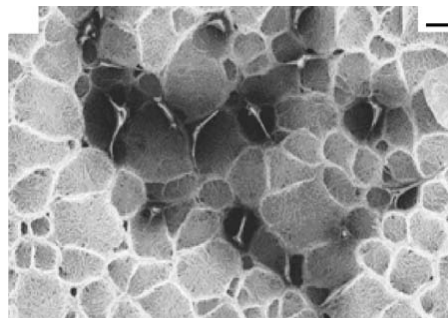


Figura 1. Fibroblastos de ratón crecidos en redes hechas con MWNT [1].

- **Regeneración de células:** Se ha observado que empleando MWNTs funcionalizados con 4-hidroxinonenal, neuronas de embriones de ratón con múltiples daños mostraron un aumento significativo en la regeneración de sus axones [3]. Otros estudios han revelado que MWNTs funcionalizados con moléculas que les proveen cargas positivas (etilendiamina) promueven la regeneración y la proliferación de tejidos neuronales a diferencia de MWNTs funcionalizados con moléculas de cargas negativas (R-COOH) [4]. Por otro lado se ha demostrado que la presencia de MWNTs con alta pureza puede ayudar en la formación de conexiones sinápticas y en la migración celular que promueve el incremento de la actividad eléctrica entre células, lo que se ve reflejado en una mejoría de la transmisión de las señales sinápticas [5].

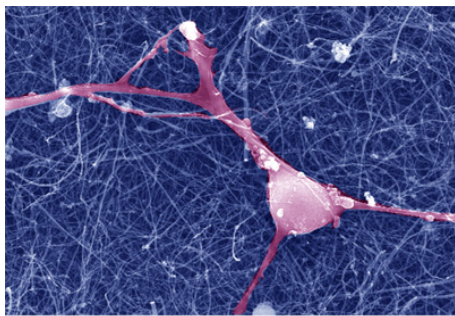


Figura 2. Neurona creciendo sobre soporte de MWNTs [4].

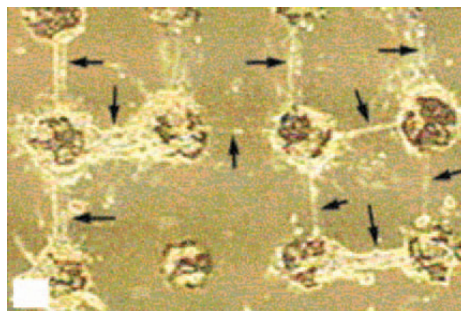


Figura 3. Regeneración de neuronas y formación de conexiones entre ellas [1].

## B.2. Biosensores

La posibilidad de conjugar biomoléculas como proteínas y DNA con nanotubos de carbono, así como la capacidad de inmovilizarlas sobre la superficie de los mismos, abre la posibilidad al desarrollo de biosensores basados en tales interacciones [2]. Estos métodos emplean dispositivos electrónicos basados en nanotubos de carbono, los cuales al ser muy sensibles a cambios de voltaje, pueden detectar la presencia de diversas biomoléculas inmersas una solución buffer conductora o al aire libre. El desarrollo de tales metodologías, podría sustituir los métodos convencionales por detección óptica (espectrofotometría, detección por UV en geles, etc.) [6].

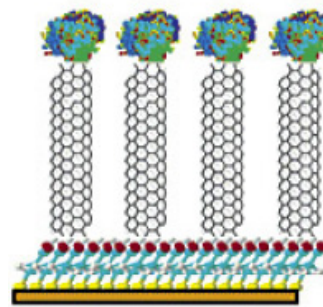


Figura 4. Biosensor basado en SWNTs alineados sobre un electrodo para reconocimiento de biomoléculas [6].

- **Biosensores por inmovilización enzimática:** Se han empleado MWNTs de superficies oxidadas, los cuales son alineados sobre un sustrato de platino. Los agujeros causados sobre la superficie del nanotubo después de la oxidación son empleados para la inmovilización de enzimas capaces de reconocer moléculas como la glucosa y galactosa. Mientras que la base de platino monitorea cambios de voltaje provenientes de las reacciones enzimáticas después de la interacción enzima-sustrato [6].

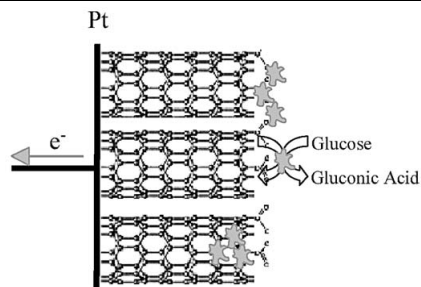


Figura 5. Biosensor (SWNT/enzima) para el reconocimiento de glucosa.

- Biosensores específicos por interacción no covalente:** A través de la interacción no covalente entre nanotubos de carbono y biomoléculas que funcionan normalmente dentro de la célula como moléculas de reconocimiento (anticuerpos, receptores de membrana, enzimas, etc.), es posible obtener biosensores capaces de detectar sustratos como: proteínas séricas, ligandos, epítomos, etc. La ventaja de estos métodos no covalentes, es que son relativamente fáciles de llevar a cabo, se evita la modificación química de los nanotubos de carbono, además de que el reconocimiento es mucho más específico y eficiente en cada caso. [7].

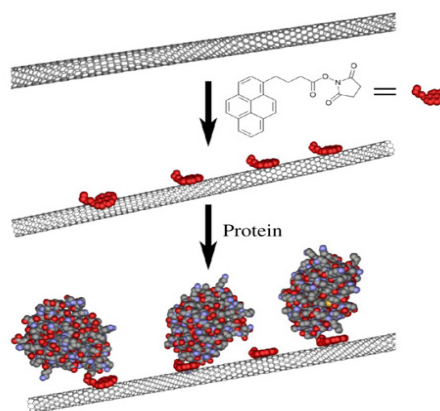


Figura 6. Reconocimiento de proteínas específicas a través de híbridos de pireno unidos y residuos de lisina unidos no covalentemente sobre superficie de un SWNT [2].

- Biosensores basados en la interacción no covalente nanotubo-DNA:** La funcionalización de nanotubos de carbono con DNA es una de las proezas más grandes en la actualidad, para el desarrollo de biosensores encargados del reconocimiento de secuencias de genes alterados durante la diagnosis y el tratamiento de enfermedades como el cáncer [8,9]. Se han hecho experimentos para detectar secuencias específicas de genes a través de transistores construidos con nanotubos de carbono. Las secuencias específicas de DNA de cadena sencilla son inmovilizadas a través de interacciones no covalentes sobre los SWNTs, las cuales hibridan con sus respectivas secuencias complementarias, causando la transferencia de electrones a través del nanotubo hacia el transistor [10,11].



Figura 7. Transistor hecho a base de SWNTs capaces de reconocer secuencias específicas de genes a través de su hibridación [11].



- Biosensores basados en la interacción covalente nanotubo-DNA:** También existe la posibilidad de adherir moléculas de DNA de cadena simple o únicamente nucleótidos unidos por enlaces peptídicos en secuencia, sobre la superficie de un nanotubo de carbono a través de interacciones covalentes empleando grupos carbonilos. Las cuales pueden hibridar con moléculas de DNA de cadena simple que sean complementarias entre sí [12, 13].

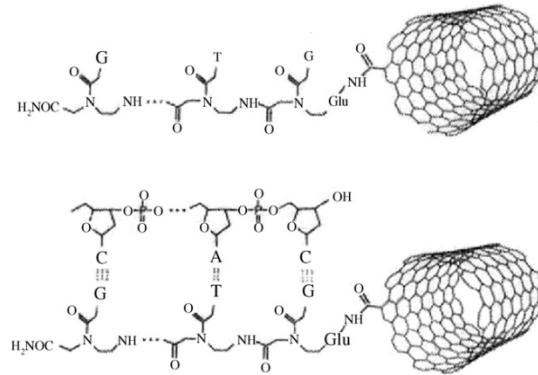


Figura 8. Secuencia de nucleótidos unidos por enlaces peptídicos, la secuencia se adhiere covalentemente sobre la superficie de un SWNT, y posteriormente hibrida con una secuencia complementaria de DNA de cadena simple [12].

- Sensores y escáneres para información basados en nanotubos/DNA:** Es posible almacenar grandes cantidades de información a través de secuencias específicas de DNA, las cuales pueden ser enrolladas alrededor de nanotubo de carbono. Cada nucleótido presenta relieves y densidades de carga específicos que son reconocidas a través de una punta que es capaz de reconocerlos. El nanotubo comienza a girar, de modo que la punta va recorriendo la cadena de DNA y al mismo tiempo leyéndola. Este principio es el mismo que se emplea en las cajitas musicales. La técnica puede revolucionar de manera impresionante la secuenciación y detección de largas secuencias de DNA, en menor tiempo, de manera mucho más eficiente y más exacta [14].

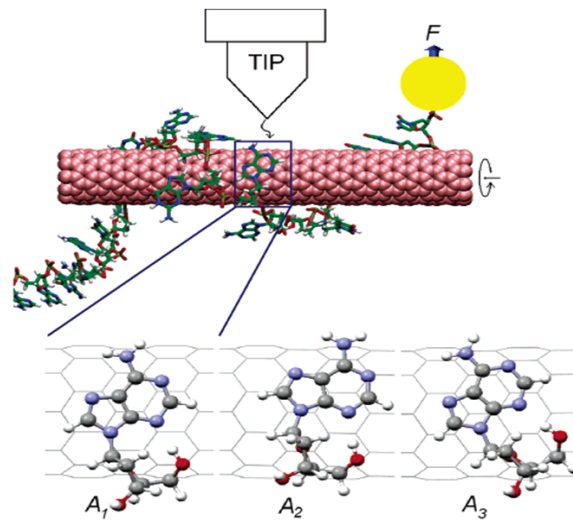


Figura 9. Lectura de DNA a través de nanopuntas escaneadoras y rodillo basados en nanotubos de carbono [14].

- Biosensores fotosensibles:** Los nanotubos de carbono poseen propiedades fluorescentes que pueden ser empleadas para el desarrollo de biosensores y dispositivos ópticos muy poderosos. Para tal propósito, los nanotubos son funcionalizados con enzimas capaces de interactuar con un sustrato específico, tal interacción se realiza únicamente sobre la superficie del nanotubo de carbono. Las enzimas son capaces de modular la entrada y salida de electrones a través del nanotubo, cambiando su intensidad de fluorescencia. Tales cambios en la intensidad son detectados como espectros, de los cuales se puede obtener información precisa acerca de la presencia o ausencia de una proteína o enzima y sus niveles de concentración [15].

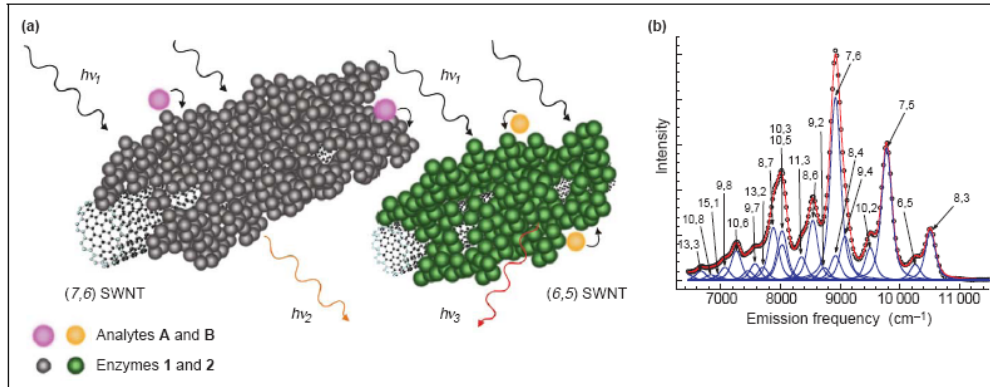


Figura 10. Nanotubos con propiedades fluorescentes que permiten determinar la presencia o ausencia de biomoléculas específicas, así como su concentración [15].

### B.3. Bioamoteres y biovectores

En algunos experimentos se ha visto que los nanotubos de carbono son capaces de transportar diversas biomoléculas (oligonúcleotidos, proteínas, medicamento, etc.) a través de membranas celulares por endocitosis, y en muchos casos logran pasar desapercibidos no sólo por su tamaño, sino por el tipo de funcionalización, de este modo se mimetizan con moléculas comúnmente presentes dentro de la célula. Por lo que se han propuesto como novedosos bioacarreadores celulares dirigidos, que podrían emplearse dentro de la ingeniería genética para el desarrollo de eficientes terapias génicas, tratamientos de enfermedades como el cáncer, vacunas, entrega de medicamentos dentro del cuerpo, etc. [16].

- Bioacarreadores motores:** Se han empleado SWNT funcionalizados con una proteína llamada streptavidina, la cual se une estrechamente a microtúbulos dentro de la célula a través de moléculas de biotina. Por otro lado, se adhieren a una superficie de oro, proteínas acarreadoras conocidas como “kinesinas”, cuya función en la célula es la de transportar a través del citoesqueleto diferentes moléculas hacia diferentes destinos. Las kinesinas comienzan a “caminar” sobre los microtúbulos que tienen asociado el complejo nanotubo/streptavidina, y como estas proteínas están estrechamente unidas a la superficie de oro, el microtúbulo junto con el nanotubo comienza a deslizarse en dirección contraria. Estos complejos permitirían el transporte controlado y específico de diferentes moléculas (medicamentos, proteínas etc.) [17].

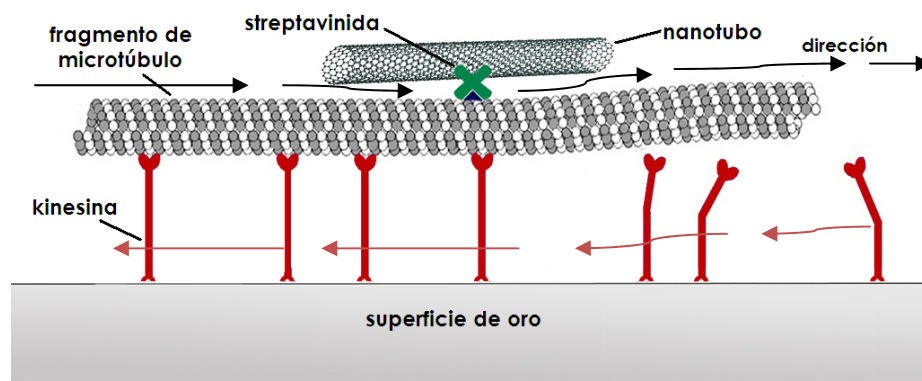


Figura 11. Esquema del complejo nanotubo/microtúbulo cuyo movimiento es debido a proteínas kinesinas.

- Vectores y liberadores de medicamento:** Investigaciones han demostrado que los nanotubos de carbono tienen la capacidad de atravesar la membrana celular, y en algunos casos pueden llegar hasta el núcleo a través de mecanismos como endocitosis [18,19,20]. De esta manera es posible emplear a los nanotubos como vectores de medicamentos para su posterior liberación dentro de diferentes tejidos y zonas específicas dentro de la célula. Se han empleado nanotubos de carbono funcionalizados con trietilenoglicol (TEG), ya que tal funcionalización permite el ingreso inmediato de los nanotubos hacia el interior de células de fibroblastos humanos. Como consecuencia es posible enviar al interior de la célula un rango amplio de moléculas adheridas al nanotubo, especialmente medicamentos para realizar terapias mucho más específicas y eficaces [19,20].

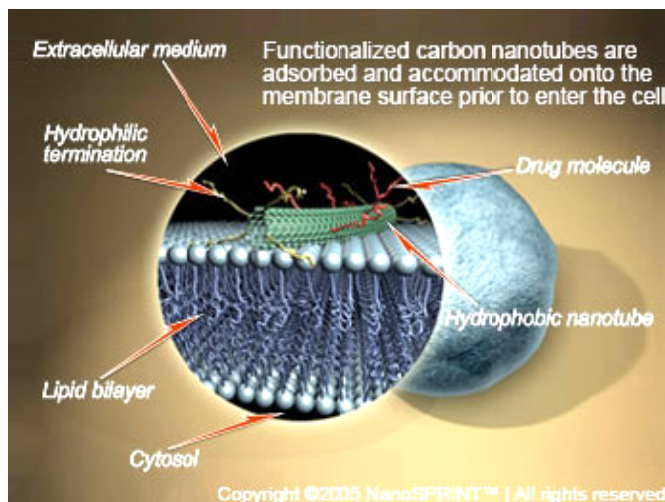


Figura 12. Esquema de entrega de medicamento a través de nanotubo de carbono ([http://www.nanosprint.com/uploads/pics/drug\\_delivery.jpg](http://www.nanosprint.com/uploads/pics/drug_delivery.jpg)).

- Moldes para la creación de vectores de DNA:** Se han obtenido anillos formados por ácidos grasos empleando nanotubos de carbono como moldes para los mismos. La polimerización de estos anillos toma lugar alrededor de los nanotubos de carbono tras un estímulo de luz UV, los anillos obtenidos tienen el mismo diámetro que los nanotubos y son separados del mismo a través de procesos de electroforesis. La cavidad que se forma por dentro de cada anillo es empleada para albergar moléculas hidrofóbicas (medicamentos, proteínas, etc.). Estos anillos pueden ser empleados como vectores que pueden atravesar la membrana celular fácilmente [21].

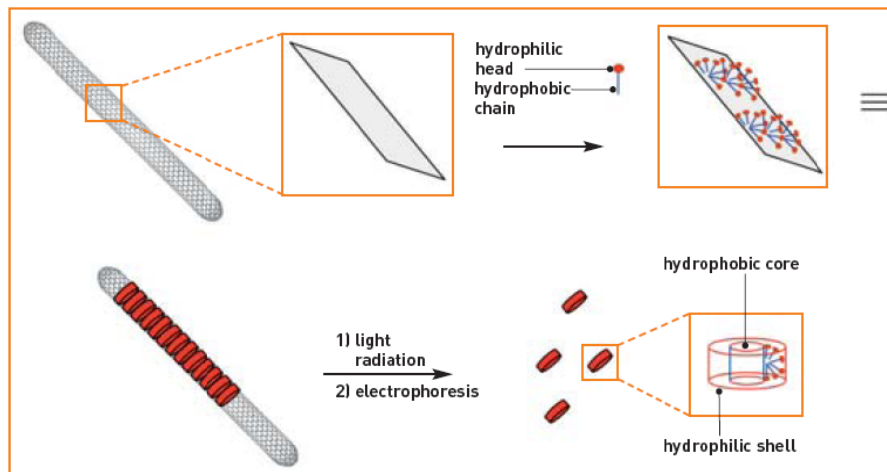


Figura 13. SWNTs empleados como moldes para la creación de anillos formados por ácidos grasos en la fabricación de nuevos vectores [21].

- **Vectores de DNA:** Empleando nanotubos de carbono funcionalizados con amonio ( $\text{NH}_3$ ), se ha logrado llevar a cabo la interacción no covalente de éstos, con secuencias de DNA a través del uso de plásmidos. Debido al tipo de funcionalización empleada, los nanotubos se introducen rápidamente al interior de diferentes tipos celulares en medio de cultivo, depositando los plásmidos al interior de sus núcleos, y aumentando la expresión de diversos genes empleados como referencia [22]. Por otro lado, existen reportes donde se emplean nanotubos de carbono como auténticas agujas para la inyección directa de moléculas de DNA y otras biomoléculas al interior de la célula y del núcleo [23]. El desarrollo de estos vectores basados en nanotubos de carbono reduciría el riesgo que implica el uso de virus y bacterias, convirtiéndose en una herramienta muy útil en la ingeniería genética [2].

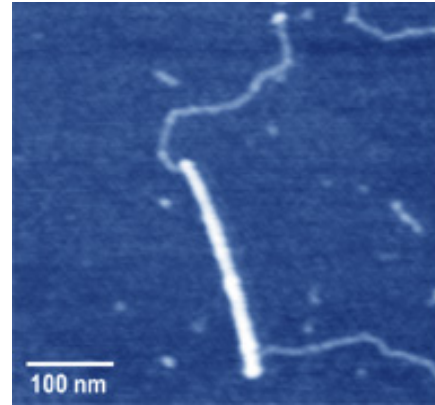


Figura 14. Vector de DNA: imagen por AFM de una molécula de DNA unida a un nanotubo de carbono (<http://www.biophysics.yorku.ca/images/PNADNASWNT.jpg>).

#### B.4. Diagnósis y tratamiento.

A través del desarrollo de biosensores, vectores de DNA, y otras herramientas bionanotecnológicas, es posible desarrollar metodologías mucho más eficientes y precisas para la diagnóstico de muchas enfermedades como el cáncer y enfermedades hereditarias. Asimismo es posible emplear tales metodologías para el tratamiento de las mismas.

- **Muerte selectiva de células cancerígenas:** A través de diferentes biomarcadores (ej. receptores de folatos RF sobre expresados), es posible internalizar únicamente dentro de células cancerígenas SWNTs funcionalizados con ligandos conjugados con folatos fluorescentes, capaces de reconocer a los mismos. A través de la fotoestimulación de los nanotubos por medio de luz, es posible promover y aumentar la muerte celular únicamente de células malignas sin dañar las células normales [24]. Otro ejemplo muy semejante es la llamada “terapia hipertérmica”, donde MWNTs llenados con hierro, son introducidos al tejido tumoral y aplicándoles campos magnéticos funcionan como controladores de temperatura para la manipulación y eliminación del mismo del tejido [25].

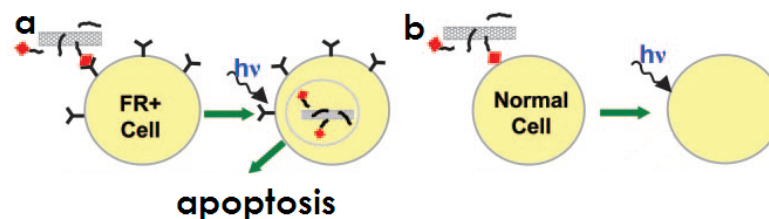


Figura 15. Muerte de células cancerígenas a través de fotoestimulación con luz IR.

- **Reconocimiento de células cancerígenas:** Diversos anticuerpos adheridos a la superficie de nanotubos de carbono son empleados para el reconocimiento de células cancerígenas durante su diagnóstico. Estos anticuerpos pueden reconocer proteínas específicas de células cancerígenas encontradas sobre la superficie de sus membranas [26].

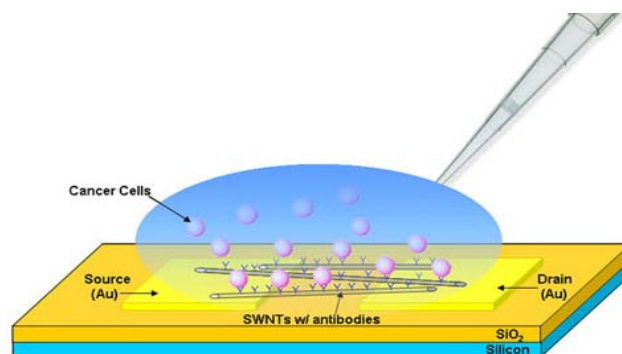


Figura 16. Reconocimiento de células cancerígenas a través de anticuerpos acoplados nanotubos de carbono [26].

- **Nanovacunas:** Es posible desarrollar vacunas, adhiriendo epítopes de diferentes organismos patógenos y virus, covalentemente sobre la superficie de un nanotubo. Al ser introducido por el torrente sanguíneo, el nanotubo es capaz de reconocer y aumentar la respuesta inmune contra éstos agentes, y en algunos casos unirse a los mismos evitando su entrada a las células. Esa nueva generación de vacunas podrían ser de gran ayuda para tratar enfermedades autoinmunes o enfermedades como el VIH [2].

#### A.5. Filtras de agua y aire.

Se han empleado fibras basadas en nanotubos capaces de atraer diferentes componentes que se encuentran en aguas contaminadas y en el aire; incluso se ha visto que poseen propiedades antibacteriales. El filtrado también puede realizarse a través de la funcionalización de los nanotubos con enzimas degradadoras de materia orgánica; incluso se ha visto que cuando se acumulan materiales de desechos sobre estas fibras sirven de sustrato para muchos organismos que degradan a las mismas. Estas características permiten las filtraciones de aguas tratadas y residuales de una manera rápida y eficiente [27].

#### Referencias

[1] Wei, W.; Sethuraman, A.; Jin, C.; Monteiro-Riviere, N. A.; Narayan, R. J. (2007): Biological Properties of Carbon Nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*; 7:1-14.

[2] Yang, W.; Thordarson, P.; Gooding, J. J.; Ringer, S. P.; Braet, F. (2007): Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*; 18:412001/1 - 412001/12.

[3] Mattson, M. P., Haddon, R. C.; Rao, A. M. (2000): Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *Journal of Molecular Neuroscience*; 6: 175-182.

[4] Hu H, Ni YC, Montana V, Haddon RC, Parpura V (2004): Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth. *Nano Letters*; 4:507-511.



- [5] Lovat, V.; Pantarotto, D.; Lagostena, L.; Cacciari, B.; Grandolfo, M.; Righi, M.; Spalluto, G.; Prato, M.; Ballerini, L. (2005): Carbon Nanotube Substrates Boost Neuronal Electrical Signaling. *Nano Letters*; 5:1107-1110.
- [6] Sotiropoulou, S; Chaniotakis, N. A. (2003): Carbon nanotube array-based biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 375:103–105.
- [7] Chen, R. J.; Bangsaruntip, S.; Drouvalakis, K. A.; Shi-Kam, N. W.; Shim, M.; Li, Y.; Kim, W.; Utz, P. j.; Da, H. (2003): Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 100:4984-4989.
- [8] Nguyen;C. V.; Delzeit, L.; Cassell, A. M.; Li, J.; Han, J.; Meyyappan, M. (2002): Preparation of Nucleic Acid Functionalized Carbon Nanotube Arrays. *Nano Letters*; 2:1079-1081.
- [9] Cui, D.; Ozkan, C. S.; Ravindran, S.; Kong, Y.; Gao, H. (2004): Encapsulation of Pt-labelled DNA Molecules inside Carbon Nanotubes. *Molecular and Cellular Biosciences*; 11:113-121.
- [10] Li, S.; He, P.; Dong, J.; Guo, Z.; Dai, L. (2004): DNA-Directed Self-Assembling of Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*; 127:14-15.
- [11] Star, A.; Tu, E.; Niemann, J.; Gabriel, J.-C. P. ; Joiner, C. S.; Valcke, C. (2005): Label-free detection of DNA hybridization using carbon nanotube network field-effect transistors;103,921-926.
- [12] Daniel, S.; Raoa, T. P.; Raob,K. S.; Rani, S. U.; Naidu, G. R. K.; Lee, H.-Y.; Kawai, T.(2007): A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization *Sensors and Actuators B*; 122:672–682.
- [13] Cai, H.; Cao, X.; Jiang, Y.; He, P.; Fang, Y. (2003): Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 375:287.
- [14] Meng, S.; Maragakis, P.; Papaloukas, C.; Kaxiras, E. (2007): DNA Nucleoside Interaction and Identification with Carbon Nanotubes. *Nano Letters*; 7:45-50.
- [15] Ziegler, K. J. (2005): Developing implantable optical biosensors. *Trends in Biotechnology*; 23: 440-444.
- [16] Bianco, A.; Kostarelos, K.; Partidos, C. D.; Prato, M. (2005): Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical Communications*; 5:571-577.
- [17] Bunker, B. C.; Spoerke, E. D.; Hendricks, J.; Bachand, G. D. Haddon, R. (2006): Active Transport of Carbon Nanotubes Using Motor Proteins. In: *Physical, Chemical, & Nano Sciences Center Research Briefs*; (ed.) Sandia National Laboratories, Nuevo México. 22-23.
- [18] Monteiro-Riviere, N.A.; Nemanich, R.J.; Inman, A.O.; Wang, Y. Y.; Riviere, J. E. (2005): Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters*; 155: 377-384.
- [19] Bianco, A.(2004): Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules. *Expert opinion on drug delivery*; 1:57-65.
- [20] Klumpp C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. (2006): Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica et biophysica acta*; 1758:404-412.
- [21] Functionalizing carbon nanotubes for nanobiotechnology: ([http://www.cea.fr/var/cea/storage/static/gb/library/Clefs52/pdf-gb/075\\_82p\\_gb52.pdf](http://www.cea.fr/var/cea/storage/static/gb/library/Clefs52/pdf-gb/075_82p_gb52.pdf)).
- [22] Singh, R.; Pantarotto,D.; McCarthy, D.; Chaloin, O.; Hoebeke,J.; Partidos, C. D.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K.(2005): Binding and Condensation of Plasmid DNA onto Functionalized Carbon Nanotubes: Toward the Construction of Nanotube-Based Gene Delivery Vectors. *Journal of the American Chemical Society*; 127: 4388-4396.
- [23] Chen, X.; Kist, A.; Zettl, A.; Bertozzi, C. R. (2007): A cell nanoinjector based on carbon nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 104:8218-8222.
- [24] Kam, W. S.; O'Connell, M.; Wisdom, J. A.; Dai, H. (2005): Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 102:11600–1160.
- [25] Costa, S.; Borowiak-Palen, E.; Bachmatiuk, A.; Rummeli, M. H.; Gemming, T.; Kalęńczuk, R. J.(2007): Filling of carbon nanotubes for bio-applications. *Physica Statatus Solidi (b)*; 244:4315–4318
- [26] Nano Science and Technology Institute: (<http://www.nsti.org/news/item.html?id=50>).
- [27] **Biomedical Applications:** ([http://www.cheaptubesinc.com/applications.htm#Biomedical\\_Applications](http://www.cheaptubesinc.com/applications.htm#Biomedical_Applications)).