



DEGRADACION DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAPA DOPADOS CON NITROGENO MEDIANTE LA ENZIMA h-MPO: UN ESTUDIO TEORICO-EXPERIMENTAL.

Por:

Lic. Gabriella Azuara Tuexi

Tesis propuesta como cumplimiento
parcial de los requisitos para obtener
el grado de Maestra en:

Posgrado en Ciencias Aplicadas

Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP),
Coordinación para la Innovación y Aplicación de la
Ciencia y la Tecnología, CIACYT.

Aprobada por:

Asesor: Dr. Ricardo Alberto Guirado Lopez.

Co-Asesor: Dr. Emilio Muñoz Sandoval.

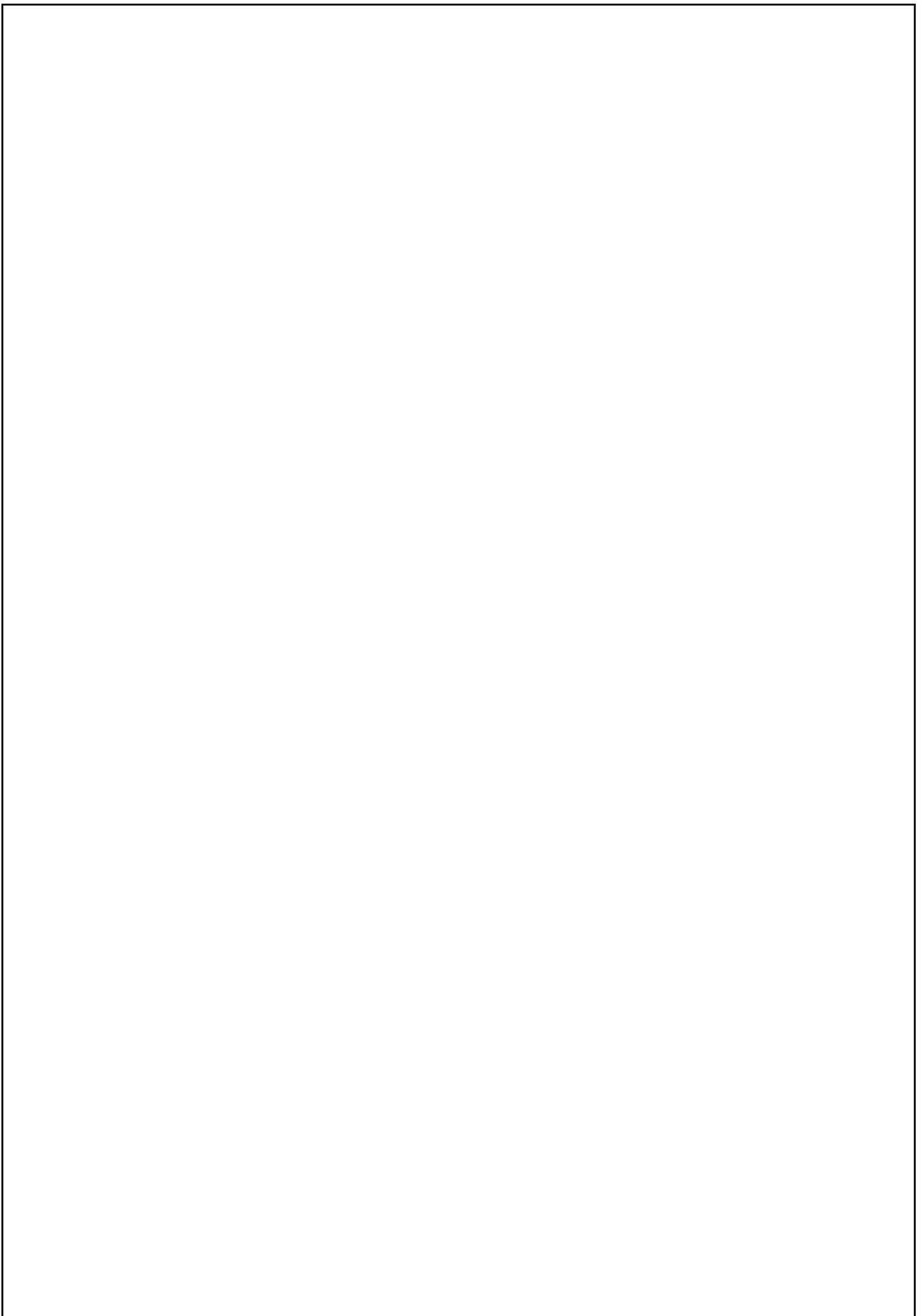
Co-Asesor: Dr. Alfredo Mendez Cavañas.

Sinodal 1: Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras

Sinodal 2: Dr. Ángel Gabriel Rodríguez Vázquez.

Sinodal 3: Dr. Samuel Eleazar Kolosovas Manchuca.

Agosto 2019



RESUMEN

DEGRADACION DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAPA DOPADOS CON NITROGENO MEDIANTE LA ENZIMA h-MPO: UN ESTUDIO TEORICO-EXPERIMENTAL.

Por:
Lic. Gabriella Azuara Tuexi.

Asesor: Dr. Ricardo Alberto Guirado Lopez
Instituto de Física, UASLP.
Co-asesor: Dr. Emilio Muñoz Sandoval
IPICYT.
Co-asesor: Dr. Alfredo Mendez Cabañas
Instituto de Física, UASLP.

Se ha reportado que nanomateriales de carbono presenta toxicidad a ciertas concentraciones, por tanto, en las aplicaciones de estos nanomateriales donde esté involucrada una interacción con los seres humanos, es necesario establecer medidas muy claras de seguridad e higiene para su uso. El transporte de fármacos usando nanomateriales de carbono para incrementar su efectividad es un campo de estudio con un desarrollo impresionante. En particular, los nanotubos de carbono se han usado para la destrucción de células cancerígenas y el transporte de fármacos.

En este trabajo se presenta una investigación sobre la degradación de Nanotubos de Carbono (NTC) y Nanotubos de Carbono dopados con Nitrógeno (NTCN) utilizando la enzima mieloperoxidasa (h-MPO), la cual es extraída de los neutrófilos (células encargadas de respuestas inmunológicas). Para tal efecto, primeramente se investiga la toxicidad de los NTCN usando diferentes concentraciones y tipos de dopaje. Posteriormente, se lleva a cabo un protocolo experimental de degradación y

un análisis teórico de los posibles mecanismos que se presentan. Los NTCN se fabricaron mediante deposición química de vapor asistida por nebulización. Se caracterizaron mediante microscopias electrónicas de transmisión y barrido, espectroscopía Raman, difracción de rayos X, análisis termogravimétricos y XPS para correlacionarlos con los hallazgos encontrados en los estudios de degradación y en los estudios teóricos.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras.....	ii
Agradecimientos.....	vi
Glosario	vii
Justificación.....	1
Capítulo I: INTRODUCCION.....	2
Capítulo II: NANOTUBOS DE CARBONO.....	8
Capítulo III: ENZIMA MIELOPEROXIDASA	16
Capítulo IV: SOFTWARE QUANTUM ESPRESSO	21
Capítulo V: METODOLOGIA EXPERIMENTAL	33
Síntesis por Método de Deposición Química de Vapor.....	33
Obtención del nanomaterial	37
Oxidación Química	38
Preparación de muestras	39
Cultivos Celulares	40
Incubación enzimática	50
Ensayo Citotoxico	52
Análisis por Quantum Espresso.....	53
Capítulo VI: RESULTADOS	55
Caracterización SEM y EDS	57
Caracterización TEM	63
Caracterización RAMAN	66
Caracterización RAYOS X	68
Caracterización TGA	70
Caracterización XPS	72
Incubación Enzimática	74
Caracterización SEM post enzima	78
Caracterización TEM post enzima	80
Caracterización RAMAN post enzima	82
Ensayo Citotoxico	82
Análisis Quantum Espresso	85
Capítulo VII: DISCUSION Y CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFIA.....	99

LISTA DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Figura 1: Clasificación de nanotubos de carbono	3
2. Tabla 1: Propiedades de los NTC.....	4
3. Figura 2: Modelo de degradación.....	6
4. Figura 3: Modelo de peroxidasas	6
5. Figura 4: Alotropías del Carbono	9
6. Figura 5: Clasificación de NTCs	10
7. Figura 6: Crecimiento CVD	11
8. Figura 7: Funcionalización.....	13
9. Figura 8: Estructura h-MPO	17
10. Figura 9: Efectos citotóxicos de los NTC.....	19
11. Figura 10: Sistema CDV	36
12. Figura 11: Flujo de gas.....	37
13. Tabla 2: Zonas del tubo de cuarzo analizadas.....	37
14. Figura 12: Método de oxidación	38
15. Tabla 3: Etiquetas de oxidación.....	38
16. Figura 13: Preparación muestra SEM	39
17. Figura 14: Preparación muestra TEM	39
18. Figura 15: Preparación muestra RAMAN	40
19. Figura 16: Preparación muestra TGA.....	40
20. Figura 17: Preparación muestra RAYOS X	41
21. Figura 18: Células HeLa.....	42
22. Figura 19: Cultivos Celulares	43
23. Figura 20: Flujo de CO ₂	44
24. Figura 21: Preparación de PBS	45
25. Figura 22: Cámara Neubauer	46
26. Figura 23: Conteo celular	47
27. Figura 24: Cultivos Celulares	47

28. Figura 25: Columna Magnética de separación celular	50
29. Tabla 4: Interacción de enzima con NTC	51
30. Figura 26: Solución Stock de NTC.....	52
31. Figura 27: Caja de Petri	53
32. Figura 28: Distribución del material	55
33. Tabla 5: Muestras obtenidas	56
34. Figura 29: Proceso de oxidación.....	57
35. Figura 30: SEM, previos a enzima nitrogenados.....	58
36. Figura 31: SEM, previos a enzima prístinos	59
37. Figura 32: SEM, previos a enzima nitrogenados oxidados	60
38. Figura 33: SEM, previos a enzima prístinos oxidados.....	60
39. Figura 34: EDS, previos a enzima nitrogenados.....	61
40. Figura 35: EDS, previos a enzima prístinos	62
41. Figura 36: TEM, previos a enzima	64
42. Figura 37: TEM, partícula de Fe.....	64
43. Figura 38: TEM, partícula de Fe	65
44. Figura 39: TEM, nitrogenados oxidados.....	65
45. Figura 40: RAMAN, previos a enzima nitrogenados	67
46. Figura 41: RAMAN, previos a enzima nitrogenados oxidados	67
47. Figura 42: RAMAN, previos a enzima prístinos	68
48. Figura 43: RAMAN, previos a enzima prístinos oxidados.....	68
49. Figura 44: RAYOS X, previos a enzima nitrogenados	69
50. Figura 45: RAYOS X, previos a enzima nitrogenados oxidados.....	69
51. Figura 46: RAYOS X, previos a enzima prístinos.....	70
52. Figura 47: RAYOS X, previos a enzima prístinos oxidados	70
53. Figura 48: TGA, previos a enzima nitrogenados	71
54. Figura 49: TGA, previos a enzima nitrogenados oxidados	71
55. Figura 50: TGA, previos a enzima prístinos	71
56. Figura 51: TGA, previos a enzima prístinos oxidados.....	72
57. Figura 52: XPS, porcentaje de dopaje por zona	72
58. Figura 53: Muestra para incubación	75

59. Tabla 6: Tiempo de interacción enzimática	76
60. Figura 54: Degradación de N-MWCNTs-ox	77
61. Figura 55: Controles de degradación	77
62. Figura 56: SEM, post degradación enzimática N-MWCNTs-ox	78
63. Figura 57: SEM, post degradación enzimática N-MWCNTs-ox	78
64. Figura 58: SEM, post degradación enzimática N-MWCNTs-ox.....	79
65. Figura 59: EDS, partícula de Cloro	79
66. Figura 60: TEM, post degradación enzimática N-MWCNTs-ox	80
67. Figura 61: TEM, post degradación enzimática N-MWCNTs-ox	81
68. Figura 62: TEM, post degradación enzimática N-MWCNTs-ox.....	82
69. Figura 63: RAMAN, post degradación enzimática N-MWCNTs-ox ..82	
70. Figura 64: Cultivos Celulares, degradación enzimática 6 horas.....	83
71. Figura 65: Cultivos Celulares, degradación enzimática 24 horas.....	84
72. Figura 66: Viabilidad Celular.....	84
73. Figura 67: Dopaje por Quantum Espresso.....	85
74. Figura 68: Densidad de Carga	85
75. Figura 69: Especies reactivas	86
76. Figura 70: Interacción de ClO, 2ClO, 3ClO y 6ClO	87
77. Figura 71: Interacción de 2ClO menor energía.....	88
78. Figura 72: Interacción de 2ClO molecular y disociativa.....	88
79. Figura 73: Interacción de 4ClO, efecto zíper.....	89
80. Figura 74: Interacción de dopaje quaternario con 2ClO.....	89
81. Figura 75: Interacción de dopaje pristino.....	90
82. Figura 76: Interacción MWCNTs con ClO	91
83. Figura 77: Interacción MWCNTs efecto zíper.....	91
84. Figura 78: SEM, discusión	94
85. Figura 79: SEM y EDS, partícula de Cl	95
86. Figura 80: TEM, previos a tratamiento de enzima	95
87. Figura 81: TEM, post enzima	96
88. Figura 82: RAMAN, comparativo previo y post	96
89. Figura 83: RAMAN y TEM, comparación.....	97

90. Figura 84: MWCNTs interacción con especie reactiva 97

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis tres asesores, por sus grandes y muy apreciadas enseñanzas, debo comentar que aparte de ser excelentes investigadores son grandes seres humanos. Debo agradecer infinitamente a mi gran padre educativo el Dr. Emilio Muñoz Sandoval, que no tengo palabras para describir todo lo que usted significa en este proceso de maestría, gracias por todo lo brindado, el apoyo de asesor llega hasta cierto punto, pero usted ha sobrepasado cualquier límite y debo agradecerle porque siempre en cada momento escolar y personal sé que cuento con usted. Al Dr. Alfredo Méndez, que en más de 6 años me ha guiado por buenos caminos gracias a sus consejos, gracias doctor por ser un excelente amigo, y por último y no menos importante el Dr. Ricardo Guirado, al cual tengo 6 meses de conocerlo y me he llevado grandes y muy buenas impresiones de él, excelente investigador y sobre todo excelente persona, una persona digna de admirar, que sin conocerme, acepto creer en mí y guiarme en este trayecto de investigación, por su paciencia, atenciones y amabilidad conmigo.

A mis padres, por todas las ilusiones puestas en mí, espero jamás defraudarlos, por su apoyo y amor incondicional. A todos mis amigos y compañeros, que son gran soporte en mi vida diaria y a Isaid mi apoyo diario, por aguantarme en este transcurso de este difícil proyecto de maestría, por estar conmigo en todos los momentos difíciles que se vivieron estos 4 años. A Yolanda por guiarme con mucha paciencia en los experimentos Biológicos.

A MI MADRE, SIEMPRE A ELLA

GLOSARIO

- i. **CNTs:** Carbon Nanotubes, por sus siglas en inglés; **NTCs,** nanotubos de carbono por sus siglas en español.
- ii. **CVD:** Chemical Vapor Deposition, por sus siglas en inglés; **DQV,** Deposición Química de Vapor, por sus siglas en español.
- iii. **Fullerenos:** en inglés, estructura alotrópica del carbono; **Fulerenos** en español, estructura alotrópica del carbono.
- iv. **HRP:** Horseradish Peroxidase, por sus siglas en inglés; **PRP,** Peroxidasa de Rábano Picante, por sus siglas en español.
- v. **h-MPO:** Mieloperoxidasa, enzima que se encuentra en los neutrófilos.
- vi. **Neutrofilos:** Células inmunológicas encargadas de responder a ataques externos infecciosos en los mamíferos.
- vii. **MWCNTs:** Multiwall Carbon Nanotubes, por sus siglas en inglés; **NTCMC,** Nanotubos de Carbono Multicapa, por sus siglas en español.
- viii. **n-MWCNTs:** Multiwall Carbon Nanotubes Dopados con Nitrógeno, por sus siglas en inglés; **NTCMCDN,** Nanotubos de Carbono de Multicapa Dopados con Nitrógeno por sus siglas en español.

- ix. o-MWCNTs:** Multiwall Carbon Nanotubes con tratamiento de oxidación, por sus siglas en inglés; **NTCMCDN-o**, Nanotubos de Carbono Multicapa Dopados con Nitrógeno con tratamiento de oxidación, por sus siglas en español.
- x. o-MWCNTs-e:** Multiwall Carbon Nanotubes con tratamiento de oxidación y acción catalítica enzimática, por sus siglas en inglés; **o-NTCMCDN-e**, Nanotubos de Carbono Multicapa Dopados con Nitrógeno bajo tratamiento de oxidación y acción catalítica enzimática.
- xi. p-MWCNTs:** Multiwall Carbon Nanotubes pristine, por sus siglas en inglés; **NTCMCDN-p**, Nanotubos de Carbono Multicapa Dopados con Nitrógeno pristine.
- xii. SWCNTs:** Singlewall Carbon Nanotubes, por sus siglas en inglés; **NTCCS**, Nanotubos de Carbono de Capa Simple.
- xiii. SEM:** Scanning Electron Microscope por sus siglas en inglés; **MEB**, Microscopia Electrónica de Barrido, por sus siglas en español.
- xiv. TEM:** Transmission Electron Microscopy por sus siglas en inglés; **MET**, Microscopia Electrónica de Transmisión, por sus siglas en español.
- xv. TGA:** Thermogravimetric analysis; **ATG**, Análisis termogravimétrico. Análisis que determina la estabilidad que tiene el material a determinadas temperaturas.
- xvi. XPS:** Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por Rayos X.

- xvii. RAMAN:** Espectroscopia que analiza los modos vibratorios, rotatorios, etc.

- xviii. RAYOS X:** Espectroscopia implementada para analizar muestras e identificar sus components.

JUSTIFICACIÓN

Estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año del 2012 en África, Asia, América Central y Sudamérica, atribuyó 8.2 millones de muertes a causa del cáncer [25]. El cáncer es un conjunto de enfermedades que aqueja a gran parte de la sociedad, estudios previos de la Dra. Natalia Gandur [64] muestra que la base de este padecimiento es cuando las células del cuerpo con deficiencias comienzan a dividirse y se diseminan a los tejidos, ocasionando en ellos e incluso en órganos, daños que en muchas ocasiones no son reversibles. Normalmente las células nacen, crecen, se reproducen y mueren, cuando el cáncer está presente esta actividad se ve interrumpida o en algunos casos se ve alterada y/o descontrolada [30].

Por ejemplo, es bien sabido que una célula normal presenta 24 repeticiones, es decir 24 particiones en un ciclo celular, para después inducir a apoptosis, cuando las células se ven dañadas por este padecimiento, siguen teniendo repeticiones aun teniendo un estado ya agotado. Estas células adicionales pueden seguir reproduciéndose sin interrupción, agruparse y formar lo que conocemos como tumores cancerígenos o carcinomas [25].

Caída de cabello, dolores estomacales, diarreas, fatigas, intensos dolores de cabeza, desgastamiento celular, incluso la muerte, entre otros son algunos de los efectos secundarios ocasionados por las terapias implementadas hoy en día para el control y/o curación de esta enfermedad [30].

Es por tal motivo que los nanotubos de carbono (NTC) presentan una amplia gama de posibilidades para tratar enfermedades emergentes. Este material es capaz de internalizarse en células de mamíferos, atravesando las membranas celulares sin provocar deformación en ella ni alterar la

composición celular. Esto permite el transporte dirigido y controlado de fármacos [25].

Los NTCs tiene gran semejanza química con el asbesto, es de conocimiento común que este material es sumamente toxico para los seres humanos, debido a su gran semejanza, los NTCs a ciertas concentraciones también presentan grado de toxicidad. Es de suma importancia investigar la manera más eficaz para lograr la degradación de los NTCs, para ello implementamos una enzima extraída de neutrófilos (células del sistema inmune encargadas de responder en defensa a agentes externos al cuerpo de los mamíferos), esta enzima es la mieloperoxidasa, h-MPO [10].

INTRODUCCION.

Los grandes avances de la humanidad han sido posibles debido al descubrimiento de nuevos materiales. Como ejemplo podemos citar algunos de los avances en cuestión de nanomateriales, uno de los materiales a escala nanométrica ($1 \times 10^{-9} \text{m}$) con mayor relevancia en la actualidad son los Nanotubos de Carbono (NTCs). Probablemente este material ha existido desde mucho tiempo antes, pero fue en 1991 que Sumio Iijima y colaboradores los descubrieron accidentalmente, quienes trabajando en un microscopio electrónico, observó la existencia de moléculas tubulares en el hollín formado a partir de las descargas de arco eléctrico, empleando grafito [65].

Dos tipos de NTCs son la base de este material, Nanotubos de Carbono de Capa Simple (NCCS) donde su precursor es el grafeno, mientras que para obtener Nanotubos de Carbono de Capa Múltiple (NCCM) su precursor es el grafito [65]. **(Figura 1)**. Estos presentan propiedades semejantes, pero también debido a sus diferentes diámetros y longitudes muchas propiedades varían **(Tabla 1)**.

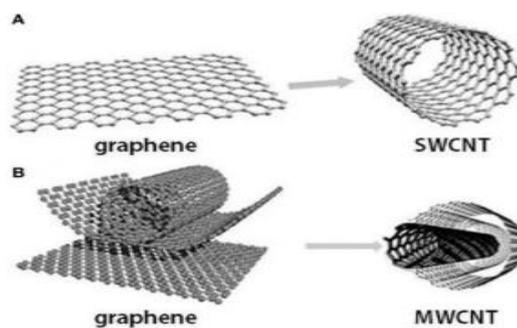


Fig. 1. Clasificación general de los NTCs. A) Nanotubos de carbono de Capa Simple (NCCS). B) Nanotubos de Carbono de Capa Múltiple (NCCM).

	NCCS	NCCM
Diámetros	10-15nm	60-90nm
Longitudes	100nm	100nm
Distancia entre capas	No aplica	0.20-0.40nm
Flexibilidad	Excelente	Excelente
Hidrofobicidad	Alta	Alta
Conductividad	Alta	Alta
Área superficial	Alta	Muy alta
Fuerza de Tensión	$45 \cdot 10^{12}$ Pa Las aleaciones de acero de alta resistencia se quiebran cuando se les aplica una fuerza de $\sim 2 \cdot 10^{12}$ Pa	
Resistencia a la temperatura.	Estable a $>2800^{\circ}\text{C}$ en vacío y a $>750^{\circ}\text{C}$ en aire. Los cables en microchips se derriten entre 600 y $1,000^{\circ}\text{C}$.	
Densidad	1,33-1,40g·cm ⁻³ El aluminio tiene una densidad de 2,7g·cm ⁻³ .	

Tabla 1. Propiedades generales de los nanotubos de carbono [56].

La amplia gama de aplicaciones y de propiedades que presentan los NTCs hace que este material sea de gran relevancia para avances tecnológicos en diferentes áreas, abriendo puertas a un sinfín de nuevas tecnologías, como por ejemplo en el área de la biología. Estos muestran una diversidad de aplicaciones potenciales que incluyen la terapia fototérmica, imagen fotoacústica, administración de fármacos y otras aplicaciones biomédicas. El principal problema que se ha suscitado en este tipo de nanomateriales para su aplicación es su pobre solubilidad en agua y su toxicidad, los que se ha resuelto parcialmente con la modificación de la superficie de NTC's, haciéndolos más dispersos en medios polares, lo que se encuentra directamente relacionado con su biocompatibilidad [66].

Otra aplicación muy prometedora es el transporte de fármacos, este material tiene la capacidad de internalizarse en las células, atravesar la membrana celular sin provocar alteraciones en la estructura, permitiendo que el material entre a la célula y deposite el fármaco adecuado [25].

Como ya se mencionó, el principal problema para que esta aplicación sea posible es el grado de toxicidad que presenta este material al igual que se dispersen en medios polares. Solucionando estos 2 problemas, este material será un gran avance en el área nanobiológica [52].

Para solucionar el problema de dispersión en medios polares, es necesario hacer modificaciones químicas estructurales por medio de oxidaciones con ácidos como: ácido nítrico y ácido sulfúrico, esto permite añadir en las paredes de los NTCs grupos carboxilos. Para solucionar el segundo problema, que es la toxicidad, una vez que este material sea implementado para el transporte de fármacos, incluso que por accidentes sean ingeridos, la degradación enzimática (**figura 2**) podría ser la respuesta [4].

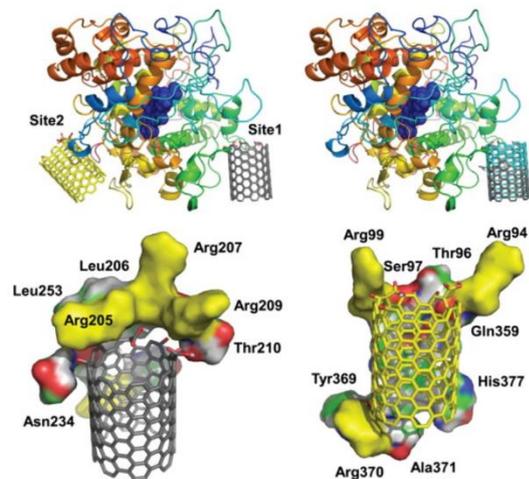


Figura 2. Degradación enzimática de los nanotubos de carbono. Modelado molecular que demuestra los posibles sitios de interacción SWCNT en la peroxidasa de eosinófilos, EPO [67].

Unas de las enzimas prometedoras para este método de degradación es la Mieloperoxidasa (h-MPO) y la eosinofilo peroxidasa (EPO) (**figura 3**). Ambas enzimas son correspondientes al sistema inmune y son las encargadas de responder en manera de defensa ante agentes externos [2]. Por ejemplo, cuando el ser humano presenta alguna cortadura, estas células debido al trabajo enzimático son las encargadas de responder en defensa, es por tal motivo que la piel cambia a color rojizo. O incluso cuando nos enfermamos del virus de la gripa, estas células actúan como pequeños soldados en defensa de nuestro sistema inmunológico.

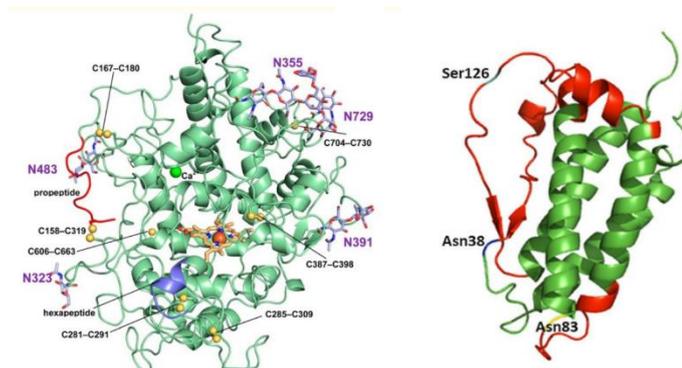


Figura 3. a) Estructura de la mieloperoxidasa (h-MPO) [68]. b) Estructura de la eosinifilo peroxidasa (EPO) [69].

Estudios previos sobre la degradación enzimática nos muestra que esta degradación es posible. Investigaciones elaboradas por el equipo de trabajo del Dr. Emilio Muñoz con la peroxidasa de rábano picante (HRP), demuestra que la peroxidasa es capaz de cambiar la estructura del nanomaterial y bajo ciertas condiciones de concentración y tiempo, lograr la degradación total del mismo [67].

Por tal motivo y por cuestiones innovadoras, para este trabajo de investigación se trabajó con la h-MPO, enzima altamente prometedora para lograr eficazmente la degradación de los nanotubos de carbono multicapa.

NANOTUBOS DE CARBONO.

De acuerdo con las tendencias actuales sobre la evolución de los materiales compuestos o materiales híbridos, donde se buscan mejores eficiencias en sus propiedades físicas y químicas, el área biológica es importante que participe en este desarrollo dado su impacto, económico, ambiental y de salud a nivel mundial. Por tal motivo la nanobiología ha logrado un gran impacto en la sociedad a nivel mundial y es de suma importancia estudiar los efectos que tendrían los nanomaterial al interactuar de manera directa con los humanos [72].

Hoy en día el tema de la salud y la regulación de las nanoestructuras desde su síntesis, manejo, distribución, uso y disposición final es un tema aún en desarrollo tanto por entidades gubernamentales y de salud en todo el mundo, como por grupos de investigadores también en todo el mundo, un ejemplo es la propuesta emitida por la Oficina de Evaluación de Riesgos para la Salud Ambiental (OEHHA) de California para la regulación que especifica las características del riesgo, criterios ambientales y toxicológicos de valoración y otros pertinentes en 2010 [72].

El carbono es un elemento sorprendente, gracias a su estructura molecular puede enlazarse con otros átomos y unirse entre sí en diversas formas alotrópicas [39]. El número atómico del carbono es seis, tiene seis protones y seis electrones distribuidos de tal manera que cuatro electrones pueden aparearse con otros átomos formando enlaces covalentes [43].

Hace algunos años solo se conocía y se podía explicar la existencia de 2 formas alotrópicas del carbono, como es el carbono amorfo y el diamante. Hoy en día conocemos formas alotrópicas (**Figura 4**) como: grafeno, grafito, fullerenos, diamante, carbono amorfo y no menos importantes, los nanotubos de carbono.

El termino *alotropías del carbono* nos indica que existen diferentes tipos de materiales a base de átomos de carbono, con diferentes enlaces, diferentes

acomodos estructurales y diferente cristalinidad, lo cual propicia a que estos tengan estructuras y propiedades totalmente distintas entre sí.

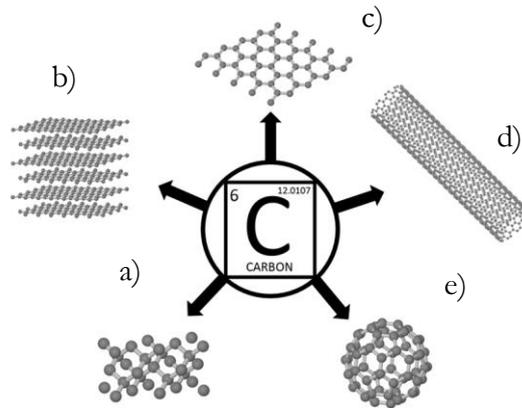


Figura 4. Formas alotrópicas del carbono, a) diamante, b) grafito, c) grafeno, d) nanotubos de carbono y e) fullereo (C60) [71].

En 1991 Sumio Iijima, trabajando con un microscopio electrónico, observó la existencia de moléculas tubulares en el hollín, formadas a partir de descargas de arco eléctrico en grafito. Estas moléculas tubulares son conocidas como nanotubos de carbono (NTC). Los NTC pueden pensarse como capas monoatómicas de carbono enrolladas en forma de cilindros. Estas capas pueden estar aisladas, formando NTC monocapa (SWCNTs, por sus siglas en inglés), o en arreglos concéntricos, formando NTC multicapa (MWCNTs, por sus siglas en inglés) con diámetros de dimensiones nanométricas [29] (**Figura 5**). Desde entonces los NTC han provocado gran revolución en la nanotecnología esto debido a sus propiedades mecánicas, como el elevado módulo de elasticidad longitudinal que es de 1250 GPa para tubos de pared sencilla [24] y de 1280 GPa para tubos de pared múltiple [18]. Estos valores son 6 veces mayor que el módulo del acero comercial (200 GPa para el A36) [72].

Emilio Muñoz *et al.* [41, 49, 66, 70, 72] Afirman que crear defectos en la red gráfrica de los nanotubos de carbono, tales como vacancias, dopajes, pentágonos y heptágonos, son una forma de crear nuevos nanoproduetos, es decir, los defectos afectan drásticamente las propiedades del nanotubo de carbono y por ende inducir éstos efectos puede dar paso a una nueva gama de productos, dando como resultado la integración de los nanotubos de carbono en las matrices de una mejor manera [72].

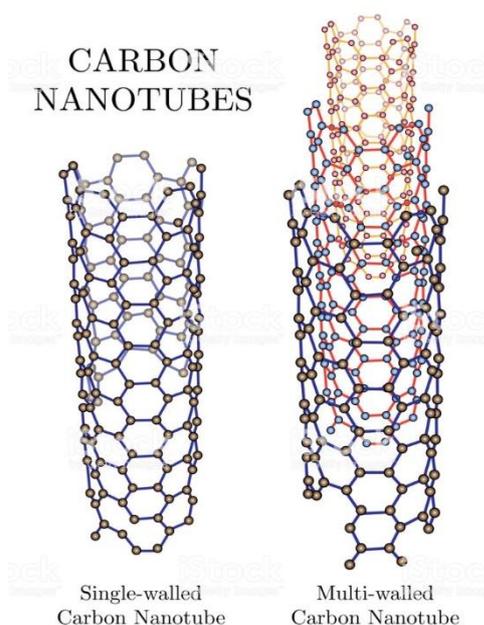


Figura 5. Nanotubos de Carbono de una Sola capa (SWCNTs) y Nanotubos de Carbono Multicapa (MWCNTs). Modelo, Dinamarca, Material, Nanopartícula, Nanotecnología.

Dentro de los nanotubos de carbono con defectos inducidos nos enfocamos en aquellos que se producen vía deposición química de vapores (CVD, por sus siglas en ingles), que es una técnica utilizada para la producción de nanotubos de carbono de diferentes tipos puesto que es fácil hacer la inclusión en la mezcla de reacción de un elemento dopante y una fuente de carbono con un catalizador [72]. El grupo del Dr. Emilio Muñoz-Sandoval [41, 49, 66, 70, 72] ha publicado la técnica para lograr una producción de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (N).

Existen diferentes métodos que permiten obtener NTC's, cada uno de los métodos presenta ventajas y desventajas asociadas. Entre los métodos más comunes se encuentran los siguientes:

- **Descarga por arco eléctrico:** consiste en generar una descarga eléctrica continua entre dos electrodos, produciendo luz y calor intensos, dentro de una atmósfera de gas inerte. Sujetos a una diferencia de potencial y presión aproximados de 50 V y 400 Torr, respectivamente [28]. Bajo estas condiciones, a través del electrodo de grafito se hace pasar una corriente intensa, lo cual evapora los átomos de carbono, generando un plasma alrededor de los electrodos; el electrodo positivo alcanza altas temperaturas, formando nanotubos de carbono, cuya longitud suele ser corta [43].
- **Ablación láser:** se basa en iluminar barras de grafito con pulsos intensos de luz láser, utilizando distintos tipos de catalizadores (Ni, Co, Fe) que permiten obtener nanotubos monocapa [43].
- **Deposición Química de Vapor:** esta técnica consiste en exponer un sustrato a uno o más precursores volátiles que reaccionan o se descomponen sobre su superficie para producir un depósito en particular, los precursores volátiles frecuentemente generan subproductos en su descomposición que son removidos por un flujo de gas inerte a través de la cámara de reacción hasta ser expulsados [72].

Permite obtener nanotubos de alta pureza y en gran cantidad. Básicamente, se induce la descomposición térmica de un vapor de hidrocarburos (por ejemplo, tolueno, benceno o acetileno), en presencia de un catalizador metálico, que se deposita en sustratos de silicio, grafito o sílice. La obtención de nanotubos de carbono mediante este proceso demora típicamente entre 10 y 60 minutos, a temperaturas que se encuentran entre los 600 y los 900 °C, bajo una atmósfera de gas inerte, que usualmente es de argón o nitrógeno [43].

El Principio básico de crecimiento para esta técnica de síntesis es la pirolisis de hidrocarburos, el vapor de hidrocarburos entra en contacto con la partícula metálica

caliente, primero se descompone en hidrógeno y carbono, el hidrógeno se evapora y el carbono se impregna al metal formando cilindros de carbono [43] (**Figura 6**).

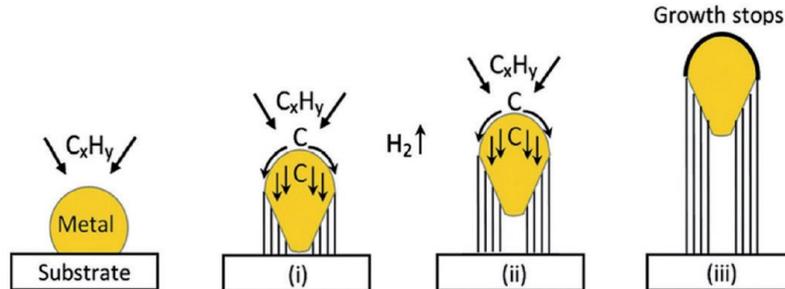


Figura 6. Modelo de crecimiento de los MWCNTs [43].

Este método, como cualquier otro, presenta ventajas y desventajas. Las ventajas pueden resumirse de la siguiente manera:

- No se limita a una deposición en una única dirección característica de los procesos PVD, evaporación y de pulverización catódica (sputtering). Debido a su alto poder de deposición, recovecos profundos, agujeros y otras configuraciones tridimensionales pueden ser recubiertas con relativa facilidad [52].
- La tasa de deposición es alta y se pueden obtener recubrimientos de gran espesor (de hasta centímetros de espesor). Este proceso es generalmente competitivo y, en algunos casos, mucho más económico que los procesos de PVD [52].
- Los equipos que se utilizan para ensayos de CVD no requieren de un vacío muy alto y, la mayoría de ellos, se pueden adaptar según las necesidades. Su flexibilidad es tal que permite muchos cambios en la composición durante la deposición y es factible la deposición de elementos y compuestos sobre una superficie en la que ya se ha realizado previamente una deposición [52].

Y como desventaja tenemos que:

- Es más versátil a temperaturas de 600°C y superiores; muchos substratos no son térmicamente estables a esas temperaturas [52].
- Los precursores químicos implementados con alta presión de vapor que a menudo son peligrosos y, a veces, extremadamente tóxicos y corrosivos al igual que los desechos, deben ser neutralizados, lo que puede conllevar una operación costosa [52].

Los tratamientos químicos (**Figura 7**) como funcionalización y oxidación de nanotubos de carbono son de suma importancia, ya que con estos podemos alterar las propiedades y la estructura del nanomaterial, por ejemplo, por medio de la oxidación es posible quitar “impurezas” en las paredes de los nanotubos, las cuales en su mayoría son metálicas y pueden hacer que los nanotubos presenten mayor toxicidad [70]. El proceso de *dopaje* consiste en cambiar un átomo de carbono por un átomo de otro elemento, generalmente se hace por átomos de nitrógeno, (C=N=C). Este proceso también cambia las propiedades básicas de los MWCNTs.

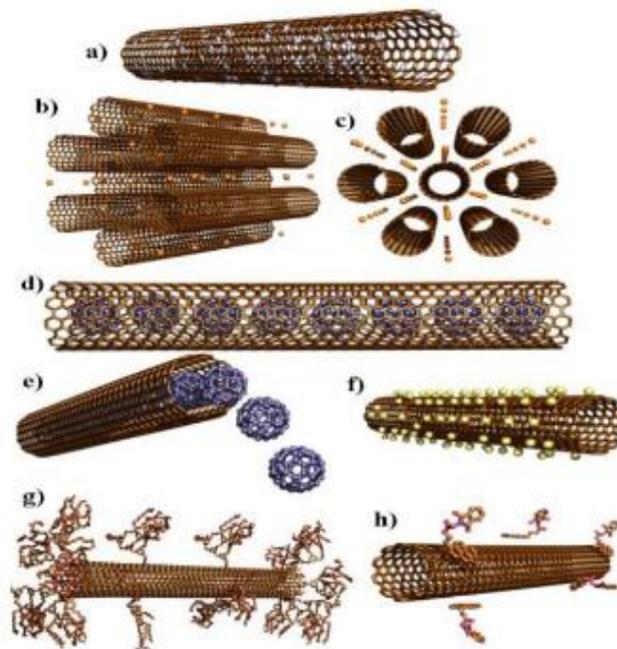


Figura 7. Diferentes modificaciones químicas de los NTCs. (a) dopaje, (b) y (c) nanotubos intercalados por átomos o iones, (d) y (e) nanotubos “reellenos” de fullerenos, (f) tubos fluorados, (g) tubos covalentemente funcionalizados y (h) nanotubos funcionalizados a través de π – apilamiento [70].

Las propiedades de los MWCNTs son de gran utilidad en muchas áreas, por ejemplo, pueden ser metálicos o semiconductores, esto se debe a que, si el diámetro del nanotubo aumenta, el ancho de banda (band gap; a nivel atómico es la diferencia de energía entre la parte superior de la banda de valencia de electrones y la parte inferior de la banda de conducción) disminuye, logrando así que cuando los electrones sean excitados y su desplazamiento entre los niveles energéticos sea simple.

La Emisión de Campo es un proceso cuántico, que ocurre cuando un campo eléctrico lo suficientemente grande es aplicado perpendicularmente a la superficie de un metal o semiconductor y los electrones son emitidos atravesando la barrera de potencial del material, por medio del efecto túnel.⁹ Los MWCNTs son buenos emisores porque los electrones pueden ser fácilmente extraídos desde las puntas de los CNT (de capa simple o de muchas capas) cuando se les aplica un potencial entre su superficie y un ánodo.

Una razón de la alta conductividad de los MWCNTs, es que poseen muy pocos defectos para dispersar los electrones y por lo tanto, presentan baja resistencia. Esta propiedad es de suma importancia ya que no se calienta de la misma manera que los alambres de cobre. Otra propiedad importante es que los nanotubos presentan una alta conductividad térmica (excelentes conductores de calor), por definición la conductividad térmica es aquella que describe el transporte de energía en forma de calor a través de un cuerpo con masa, esto tiene su base en la segunda ley de la termodinámica, la cual dice que el calor siempre fluye en la dirección de la temperatura más baja.

Es importante mencionar una de las propiedades que abre paso a las grandes y extensas aplicaciones de los NTCs, esta es un alto nivel de módulo de Young, a simple vista esto es contradictorio y aun no explicable del todo. Los NTCs presentan un alto módulo de Young, esto significa que debería de ser muy poco flexible, por ejemplo, el módulo de Young del acero es de unas 30 000 veces mayor que el de la goma, por lo que es sumamente flexible a diferencia que el acero.¹⁰ Los NTCs presentan módulos de Young que oscila entre 1.28 y 1.8 TPa. Un terapascal corresponde a una presión de casi 10⁷ veces de la presión atmosférica.

El módulo de Young del acero es de 0.21Tpa lo cual nos hace pensar que, si un acero es prácticamente inflexible, entonces los nanotubos con un módulo de Young 10 veces mayor al del acero, serían imposible doblarlos. Sin embargo, lo sorprendente de este tipo de materiales es que aun con un módulo de Young tan alto, los NTCs son altamente flexibles, como si dobláramos a un “popote” sin romperse y sin sufrir ninguna deformación, ya que, aunque doblemos a los nanotubos estos regresan a su estado normal [70].

Otra razón por la cual no se rompen es que al momento de doblarlos los anillos hexagonales de su estructura (enlaces de carbonos) en las paredes cambian de estructura sin romperse. Esto es único, por el hecho de que los enlaces carbono-carbono son híbridos sp^2 y estos enlaces se re-hibridizan cuando se doblan [70].

Tomando en cuenta todas las propiedades ya mencionadas de este nanomaterial, los NTC son altamente prometedores en el área biológica, es decir, los NTC's son nano materiales que muestran una diversidad de aplicaciones potenciales que incluyen la terapia fototérmica, imagen fotoacústica, administración de fármacos y otras aplicaciones biomédicas. El principal problema que se ha suscitado en este tipo de nanomateriales para su aplicación es su pobre solubilidad en agua y su toxicidad, los que se ha resuelto parcialmente con la modificación de la superficie de NTC's, haciéndolos más dispersos en agua, lo que se encuentra directamente relacionado con su biocompatibilidad [38].

Entre las aplicaciones biológicas encontradas en la literatura se encuentra que los NTCs pueden internalizar células sin provocar alteraciones en la membrana celular. Esto abre paso implementarlos como transporte localizado de fármacos. La actividad antimicrobiana y biosensores, entre otras aplicaciones [38].

Capítulo 3

MIELOPEROXIDASA (H-MPO) Y TOXICIDAD DE LOS NTC.

Las enzimas son sistemas biomoleculares encargadas de catalizar reacciones químicas de los seres vivos (biocatalizadores), las cuales aumentan la velocidad de reacción de 10^3 y 10^9 veces. Las peroxidadas, es una clase de enzimas con la función de catalizar la oxidación de substratos orgánicos e inorgánicos (donadores de hidrogeno) utilizando como substrato al peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Por ejemplo, la descomposición del peróxido de hidrogeno en agua y presencia de oxígeno ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) es una de las reacciones químicas más lentas, a menos que se coloque una peroxidada [70].

La mieloperoxidasa (h-MPO) es un hemo-enzima encontrada en neutrófilos de mamíferos, constituye del 2-5 % de las proteínas del neutrófilo con una concentración en sangre humana normal de alrededor del 1nM [11] y es aquí donde cataliza la peroxidación mediada por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de iones de haluro y el pseudohaluro de tiocianato. Los productos de estas reacciones y sus metabolitos secundarios son responsable de matar bacterias y virus fagocitarlos [3, 4].

La h-MPO es un miembro de una familia de genes de peroxidadas de mamíferos que también incluye eosinófilos peroxidada (EPO), lactoperoxidada (LPO), peroxidada tiroidea y prostaglandina H sintasa. La enzima madura es un dímero de 140 kDa de mitades idénticas, cada uno formado por dos cadenas polipeptídicas de 108 y 466 aminoácidos resultantes de la escisión postraducciona de 6 aminoácidos de un solo precursor de polipéptido [2, 4].

Esta enzima fue aislada por primera vez por Agner en 1941, denominándola verdoperoxidada [11]. La banda de Soret a 428 nm en el la enzima férrica se desplaza considerablemente al rojo en comparación con otras proteínas hemo y bandas de absorción relativamente fuertes en la región visible, lo cual es

responsable del color verde característico de la enzima. Esta enzima es una de las más grandes, consiste en 10,307 átomos no de hidrógeno, incluyendo 1140 aminoácidos, 2 hemos, 16 azúcares, 2 iones de calcio, 2 iones de cloruro, 4 sulfatos, 6 acetatos y 838 moléculas de agua [4] (**Figura 8**). El peso molecular de la enzima se estima entre 130-150 kDa y su pH óptimo es de 5 [11].

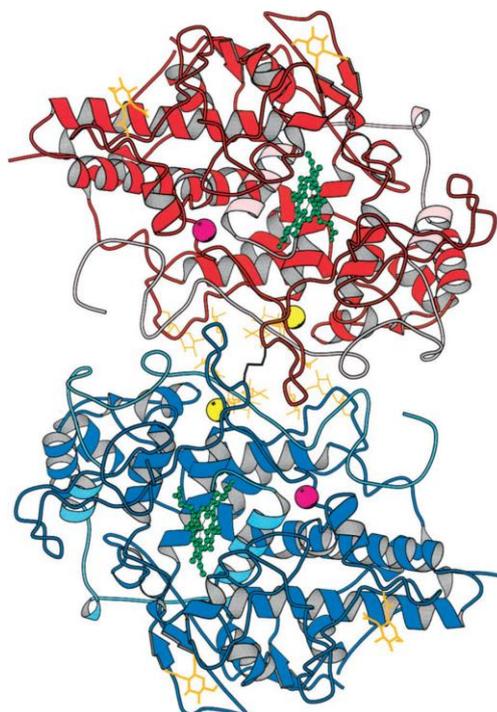


Figura 8. Los polipéptidos grandes de las dos mitades son de color rojo y azul, mientras que los polipéptidos pequeños están en tonos más claros de los mismos colores. Otras características codificadas por colores incluyen: hemos (verde), carbohidratos (anaranjado), calcio (púrpura) y cloruro (amarillo). En el centro de la molécula, el disulfuro que une las dos mitades se muestra en negro [4].

La defensa del organismo está mediada por las células del llamado sistema retículo endotelial, de las cuales los polimorfonucleares neutrófilos constituyen la primera línea de defensa inespecífica. La mieloperoxidasa es la proteína más abundante en los neutrófilos y es la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso. Este es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos [11]. El ácido hipocloroso es un mediador de daño hístico en numerosos procesos inflamatorios.

La MPO reacciona con el H₂O₂ proveniente de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa, Este complejo se combina con el haluro, generalmente cloruro, que se oxida para formar el ácido hipocloroso (HOCl). Otra investigación reportada en la literatura, demostro que las especies reactivas que genera la enzima en cuestiones de degradación de los nanotubos de carbono es acido hipocloroso (HCIO) y el monoxoclorato (ClO⁻) [9]. La generación de estas especies reactivas por la mieloperoxidasa determina una mayor efectividad de estas peroxidadas en la degradación de NTCs.

La toxicidad de CNT es una de las principales preocupaciones de su aplicación en áreas diagnósticas y/o terapéuticas. La citotoxicidad de los CNT está determinada por varios factores, incluida la pureza, la funcionalización fracciones, dimensión, así como concentración [54]. Es importante tomar en cuenta que los 2 tipos de NTCs actualmente estudiados, presentan propiedades y características diferentes entre sí, lo cual provoca que unos presentan mayores niveles de toxicidad en comparación con el otro. Todo esto depende de la concentración, tiempo de interacción y la aplicación que requiera. Por ejemplo, Fujita et al. reportó que los SWCNT provocan la inflamación pulmonar persistente, mientras que los MWCNT pueden causar inflamación transitoria en el pulmón [54].

Además, Jia et al. investigó la citotoxicidad in vitro de SWCNT y MWCNT en macrófagos, y observó una fagocitosis alterada a una dosis baja de SWCNT, mientras que MWCNT resultó presentar los mismos niveles de toxicidad incluso con dosis más altas, revelando una mayor toxicidad de SWCNTs que MWCNTs.

Como consecuencia a los niveles registrados de toxicidad de los NTCs, es necesario implementar vías alternas para su eficaz y rápida degradación y excreción una vez que se implementen en áreas biológicas.

Por ejemplo, Ali Mohammad Alizadeh et al. presenta interacciones de los nanotubos de carbono con tumores cancerígenos, los cuales lograron una disminución visible del mismo, pero al paso del tiempo los roedores no lograron excretar todos los NTCs internalizados provocando efectos secundarios dañinos para su salud (**Figura 9**).



Figura 9. Efectos de los NTC en las vistas macroscópicas de la extensión del tumor en los días 14, 21, 29 y 39 después de la inyección de NTC en un modelo animal de cáncer de mama [54]. Se observa una clara disminución del tumor cancerígeno con inyección a base de NTC.

El objetivo principal de este estudio fue desarrollar una estrategia novedosa para el tratamiento del cáncer mediante NCT, pero el principal problema es que los NCT son insolubles en soluciones acuosas y químicamente inertes, por lo que no son apropiados para su utilización en aplicaciones biológicas o médicas.

Para utilizar NCT en estas aplicaciones, generalmente se oxidan en ácidos fuertes para crear grupos carboxilo e hidroxilo en su superficie [49, 66. 70. 72]. En esta condición, los CNT se dispersan en la solución acuosa y otros nanomateriales o biomoléculas tales como oligonucleótidos, proteínas o péptidos. Así los NCT se pueden aplicar en aplicaciones biológicas o médicas, evaluando la caracterización de la toxicidad de los CNT porque puede causar efectos adversos para la salud humana y otros organismos [58].

Hasta ahora, se han informado algunos estudios sobre los efectos tóxicos de las CNT, ya sea in vivo o in vitro y los resultados suelen ser divergentes.

QUANTUM-ESSPRESO

4.1.- Ecuación de Schrödinger

Es realmente imposible encontrar la solución exacta de la ecuación de Schrödinger para sistemas de muchas partículas, a pesar de ello se han desarrollado varios métodos para encontrar solución al problema de muchos cuerpos, tomando en cuenta aproximaciones en el hamiltoniano para que este adquiriera una forma más simple. Los métodos más reconocidos para calcular propiedades tanto del estado base como, de forma menos exacta, de estados excitados de átomos, moléculas y sólidos son el método de Hartree-Fock y la teoría del funcional de la densidad con la aproximación LDA. A estos métodos se les llama comúnmente *ab initio* o de primeros principios porque en ellos no se utilizan parámetros de ajuste empíricos.

Una de las principales propiedades de las moléculas es su energía y la variación que tiene con respecto a su movimiento atómico, para definir el movimiento de un átomo necesitamos saber dónde se encuentran ubicados su núcleo y sus electrones. La ecuación de Schrödinger (Ec. 4.1) describe cómo cambia la energía respecto al movimiento de los electrones, donde el operador hamiltoniano (\hat{H}) relaciona el cambio de energía (E) con el movimiento de los electrones a través de la función de onda (ψ)(25); los electrones son mucho más ligeros que los núcleos y responden más rápido a los cambios que ocurren a sus alrededores, por lo que los núcleos perciben a los electrones como una nube con carga eléctrica y los electrones perciben a los núcleos como una carga puntual, esto permite separar la resolución del movimiento de los electrones y los núcleos (aproximación de Born-Oppenheimer).

$$\hat{H}\psi = E\psi \tag{4.1}$$

La definición del operador hamiltoniano depende de cada sistema y en algunos casos sencillos tiene solución exacta. Para el caso en que múltiples electrones interactúan con múltiples núcleos (Ec. 4.2), se constituye de la siguiente manera:

un primer término que corresponde a la energía cinética de los electrones, un segundo término para la interacción entre cada electrón con los núcleos y un tercer término para la interacción entre electrones.

$$\hat{H}\psi = \left[\frac{\hbar^2}{2\bar{A}m} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^N V(r_i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j<i}^N U(r_i, r_j) \right] \psi = E\psi \quad (4.2)$$

4.2.- Métodos *ab initio*

Para resolver los problemas que se abordaron en este trabajo fue necesario implementar técnicas para problemas de muchos cuerpos, ya que comprenden muchos electrones y núcleos cuyos movimientos están acoplados por interacciones coulombiana entre ellos. Sin embargo, aún con el poder computacional con el que se dispone actualmente, es imposible resolver un sistema de tales dimensiones. Afortunadamente existen técnicas y métodos capaces de solucionar dichos sistemas de manera muy satisfactoria, entre éstos se encuentran las métodos *ab-initio* o de primeros principios.

El hamiltoniano que describe un sistema de muchos cuerpos compuesto por N_e electrones y N_i núcleos está dado por:

$$\hat{H} = - \sum_{I=1}^{N_i} \frac{1}{2M_I} \nabla_I^2 - \sum_{i=1}^{N_e} \frac{1}{2} \nabla_i^2 + \sum_{I=1}^{N_i} \sum_{J>I}^{N_i} \frac{Z_I Z_J}{|\vec{R}_I - \vec{R}_J|} + \sum_{i=1}^{N_e} \sum_{J>I}^{N_e} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} - \sum_{I=1}^{N_i} \sum_{i=1}^{N_e} \frac{Z_I}{|\vec{R}_I - \vec{r}_i|} \quad (4.3)$$

donde: M_I es la masa y Z_I es el número atómico del núcleo I , r_i y R_I son las posiciones del electrón i y el núcleo I , respectivamente.

El primer y el segundo término se refiere a las energías cinéticas de los núcleos y los electrones, respectivamente. El tercer y cuarto término representa la repulsión coulombiana entre los núcleos y electrones, respectivamente. El último término

corresponde a la atracción coulombiana entre los núcleos y electrones. En todas las ecuaciones se emplearán unidades atómicas $\hbar = 1$, $m_e = 1$, $\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} = 1$.

El estado base del sistema de N_e electrones y N_i núcleos se puede determinar resolviendo la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo.

$$\hat{H}(\{r_i\}, \{R_I\}) = E\psi(\{r_i\}, \{R_I\}) \quad (4.4)$$

donde: $\psi(\{r_i\}, \{R_I\})$ es la función de onda del sistema de muchos cuerpos y E es la energía total del sistema.

La solución analítica de la ecuación (4.3) es desconocida, a excepción de sistemas monoeléctricos, por lo que es necesario reducir la complejidad de esta ecuación usando algunas aproximaciones.

4.2.1.- Aproximación de Born-Oppenheimer

La aproximación de Born-Oppenheimer (BO) permite simplificar el problema de resolver la ecuación (4.3) desacoplando los grados de libertad electrónicos y nucleares. Dicha expresión se basa en el hecho de que la masa de los electrones es menor que la de los núcleos, por lo que sus velocidades son mucho mayores, motivo por el cual se puede considerar que los electrones se ajustan instantáneamente a una posición determinada de los núcleos. De esta manera, se supone que los núcleos permanecen en un estado estacionario permitiendo estudiar el comportamiento electrónico de manera independiente y tomando como potencial externo, v_{ext} , el que resulta de la interacción coulombiana entre los electrones y los núcleos. Dentro de esta aproximación, la función de onda $\Psi(\{r_i\}, \{R_I\})$ se puede separar de la forma:

$$\Psi(\{r_i\}, \{R_I\}) = \psi_e(\{r_i\}, \{R_I\})X(\{R_I\}) \quad (4.5)$$

donde: $\psi_e(\{r_i\}, \{R_I\})$ es la función de onda electrónica y $X(\{R_I\})$ es la función de onda nuclear. La función de onda electrónica solo es función de $\{r_i\}$, tomando las coordenadas $\{R_I\}$ como parámetros.

Esta relación paramétrica refleja la hipótesis de que los electrones se mueven en el potencial generado por los núcleos estacionarios. De manera que la función de onda electrónica satisface la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo para una configuración estática de los núcleos, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\hat{H}_e \psi_e(\{r_i\}, \{R_I\}) = E_e \psi_e(\{r_i\}, \{R_I\}) \quad (4.6)$$

donde el hamiltoniano para el sistema electrónico se expresa como:

$$\hat{H}_e = -\sum_{i=1}^{N_e} \frac{1}{2} \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^{N_e} \sum_{j>i}^{N_e} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} - \sum_{I=1}^{N_i} \sum_{i=1}^{N_e} \frac{Z_I}{|\vec{R}_I - \vec{r}_i|} \quad (4.7)$$

Por otro lado, el hamiltoniano que describe el movimiento de los núcleos en el campo promedio generado por los electrones $\langle E_e(\{R_I\}) \rangle$ es:

$$\hat{H}_{nuc} = -\sum_{I=1}^{N_i} \frac{1}{2M_I} \nabla_I^2 + U(\{R_I\}) \quad (4.8)$$

donde:

$$U(\{R_I\}) = \sum_{I=1}^{N_i} \sum_{J>I}^{N_i} \frac{Z_I Z_J}{|\vec{R}_I - \vec{R}_J|} + \langle E_e(\{R_I\}) \rangle \quad (4.9)$$

La función $U(\{R_I\})$ representa la superficie de energía potencial. Es decir, en la aproximación Born-Oppenheimer los núcleos se mueven de forma independiente a los electrones, siguiendo la superficie de energía potencial que se obtiene al resolver el problema electrónico. Ahora, la dificultad se encuentra en resolver el problema electrónico, el cual involucra un elevado número de grados de libertad y una gran cantidad de interacciones entre electrones (26). Para solucionar dicho problema puede usarse la teoría del funcional de la densidad (DFT) el cual es uno de los métodos *ab-initio* más usados en la actualidad para el cálculo de la estructura electrónica de los átomos, moléculas, sólidos, superficies y sus interacciones.

4.3.- Teoría del Funcional de la Densidad

La teoría del funcional de la densidad es un procedimiento variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, donde el funcional de la energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica. La

densidad electrónica es la probabilidad de encontrar un electrón en un punto del espacio, en esta propiedad se basa la teoría del funcional de la densidad (DFT), y puede ser calculada a partir de la función de onda los electrones (ψ) que ocupan los orbitales moleculares (n_i) de un sistema (Ec. 4.10). A diferencia de la función de onda, la densidad electrónica es una cantidad medible y es función de tres variables espaciales (x, y, z), independientemente del tamaño del sistema, mientras la función de onda es una función de más de cuatro dimensiones por cada electrón (27,28). La DFT es uno de los métodos más usados en cálculos cuánticos de la estructura electrónica de la materia, tanto en la física de la materia condensada como en la química cuántica.

$$\rho = \sum_i^n n_i |\psi_i|^2 \quad (4.10)$$

Los cálculos de la teoría del funcional de la densidad están fundamentados en los teoremas de Hohenberg-Kohn (29) y el método de Kohn-Sham (30).

4.3.1.- Teoría de Thomas-Fermi

Paralelamente al desarrollo de esta línea en la teoría de la estructura electrónica, Thomas y Fermi realizaron un trabajo (1927) para construir la energía total en términos solamente de la densidad electrónica (31). Utilizaron la expresión para la energía cinética, de intercambio y correlación del gas de electrones homogéneo para construir las mismas cantidades para el sistema no homogéneo de la siguiente manera $E_\alpha = \int \varepsilon_\alpha[\rho(r)]dr$, donde $\varepsilon_\alpha[\rho(r)]$ es la densidad de energía del pedazo α , calculado localmente para el valor de la densidad en ese punto en el espacio. Esta fue la primera vez que fue utilizada *la aproximación de la densidad local* o LDA. Para el gas de electrones homogéneo, la densidad está relacionada con la energía de Fermi ε_F por:

$$\rho = \frac{1}{3\pi^2} \left(\frac{2m}{\hbar^2}\right)^{3/2} \varepsilon_F^{3/2} \quad (4.11)$$

La energía cinética se escribe como $T = 3\rho\varepsilon_F/5$ así que la densidad de energía cinética es:

$$t[\rho] = \frac{3}{5} \frac{\hbar^2}{2m} (3\pi^2)^{2/3} \rho^{5/3} \quad (4.12)$$

Luego, la energía cinética se escribe como $T_{TF} = C_K \int \rho(r)^{5/3} dr$, con $C_K = 3(3\pi^2)^{2/3}/10 = 2.87$ unidades atómicas. El sistema inhomogéneo es concebido como localmente homogéneo. A diferencia de los enfoques habituales modernos en DFT, aquí LDA se aplica también a la energía cinética. Si se desprecian los potenciales de intercambio y correlación de la ecuación de energía del sistema electrónico de muchos cuerpos, llegamos a la teoría de Thomas-Fermi:

$$E_{TF} = C_K \int \rho(r)^{5/3} dr + \int v(r)\rho(r)dr + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} drdr' \quad (4.13)$$

Se puede ver que la E_{TF} depende solamente de la densidad electrónica; es una funcional de la densidad. Suponiendo intuitivamente algún principio variacional, se puede buscar la densidad $\rho(r)$, que minimiza la $E_{TF}[\rho]$, sometida a la restricción de que la carga integrada total sea igual al número de electrones: $\int \rho(r)dr = N$. Esto puede ser puesto en términos de derivadas funcionales:

$$\frac{\delta}{\delta\rho(r)} (E_{TF}[\rho] - \mu \int \rho(r)dr) = 0 \quad . \quad (4.14)$$

Esto es:

$$\mu = \frac{5}{3} C_K \rho(r)^{2/3} + v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' \quad , \quad (4.15)$$

donde: μ es el potencial químico. Esta ecuación puede invertirse para obtener la densidad como una función única del potencial externo.

Esta forma integral en el espacio real es inconveniente, pero puede ser fácilmente invertida por transformada de Fourier de la ecuación para obtener $\rho(g)$. El intercambio se puede añadir directamente a la expresión anterior considerando la expresión de Slater para el gas de electrones homogéneo: $\epsilon_X[\rho] = -C_X \int \rho^{4/3}(r)dr$, con $C_X = 3(3/\pi)^{1/3}/4$. La ecuación (4.15) se modifica sumándole el término $-(4/3)C_X\rho(r)^{1/3}$. Este nivel de aproximación es conocido como la teoría de *Thomas-Fermi-Dirac* (TFD). La correlación se puede añadir fácilmente usando una aproximación para el gas de electrones homogéneo, por ejemplo, la propuesta por Wigner:

$$\varepsilon_c[\rho] = -0.056\rho^{4/3}[0.079 + \rho^{1/3}] \quad (4.16)$$

Esto es lo mejor que se puede hacer a nivel local. Debido a la no localidad, se han postulado correcciones a las energías de intercambio y correlación en forma de gradiente, por ejemplo la dada por la funcional de von Weiszäcker:

$$T_{vW} = \frac{1}{8} \int \frac{|\nabla\rho|^2}{\rho} dr \quad (4.17)$$

También se han propuesto términos que corrigen las propiedades de respuesta lineal de la funcional e incluso se han incorporado a este enfoque las funciones respuesta de segundo orden. Esto se ha desarrollado con la expectativa de que realmente exista una expresión explícita para la energía en términos de la densidad electrónica porque un esquema de densidad explícita que requiera solo la solución del problema inverso es computacionalmente mucho más eficiente.

4.3.2.- Los Teoremas de Hohenberg-Kohn

En la mecánica cuántica estándar, los observables son calculados a partir de la función de onda de muchos cuerpos. El método de la DFT fue sometido a un tratamiento riguroso por Hohenberg y Kohn en 1964, quienes formularon y demostraron dos teoremas que pusieron en bases matemáticas sólidas las ideas anteriores, que fueron propuestas por Thomas y Fermi.

Primer teorema: *Existe una correspondencia uno a uno entre el estado base de la densidad $\rho(\vec{r})$ de un sistema de muchos electrones y el potencial externo ($V_{ext}(\vec{r})$) que se genera al suponer la aproximación de Born-Oppenheimer. Una consecuencia inmediata es que el valor esperado del estado base de cualquier observable \hat{O} es un único funcional de la densidad electrónica exacta del estado base:*

$$\langle \psi | \hat{O} | \psi \rangle = O[\rho(r)] \quad (4.18)$$

Esto garantiza que las propiedades del estado base de un sistema de muchos electrones en presencia de un potencial externo sean funciones únicamente de la densidad electrónica.

Segundo teorema: Sea \hat{O} el operador hamiltoniano \hat{H} , el estado base de la funcional de energía total $\hat{H}[\rho(r)] \equiv E_{v_{ext}}[\rho(r)]$ tiene la forma:

$$\begin{aligned} E_{v_{ext}}[\rho(r)] &= \langle \psi | \hat{H} | \psi \rangle = \underbrace{\langle \psi | \hat{T} + \hat{V} | \psi \rangle}_{F_{HK}[\rho(r)]} + \langle \psi | \hat{V}_{ext} | \psi \rangle \\ &= F_{HK}[\rho(r)] + \int \rho(\vec{r}) V_{ext}(\vec{r}) d\vec{r} \end{aligned} \quad (4.19)$$

donde el funcional de densidad de Hohenberg-Kohn, $F_{HK}[\rho]$, es universal para todo sistema de muchos electrones. El valor mínimo del funcional $E_{v_{ext}}[\rho(r)]$ corresponde a la energía total del estado base y la densidad que conlleva a este valor mínimo de la energía es la densidad del estado base correspondiente al potencial externo $V_{ext}[\rho(r)]$.

En estos teoremas se muestra la posibilidad de determinar exactamente el estado estacionario de un sistema si se conoce la densidad electrónica del estado base de dicho sistema asociada a un potencial externo particular. Esto lleva posteriormente a Kohn y Sham a idear un método práctico para calcular la energía total del sistema a partir de la densidad electrónica del estado base.

4.3.3.- El Método de Kohn-Sham

Con estos teoremas, Kohn y Sham publicaron en 1965 (32) una ecuación parecida a la ecuación de Hartree-Fock, donde proponen la idea de reemplazar la energía cinética de los electrones interactuantes por la de un sistema equivalente no interactuante. El funcional de Hohenberg-Kohn se obtiene a partir del funcional de la energía total del sistema y de Hartree-Fock:

$$F_{HK} = T_0 + V_H + \underbrace{V_x + V_c}_{V_{xc}} \quad (4.20)$$

donde:

$$V_x = V - V_H$$

$$V_c = T - T_0$$

Así, el funcional de la energía (4.19) se escribe como:

$$E_{V_{ext}}[\rho(r)] = E_{KS}[\rho(r)] = T_0[\rho(r)] + E_H[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] + E_{ext}[\rho(r)] \quad (4.21)$$

Y se interpreta como el funcional de energía de un gas de electrones clásico sin interacciones sujeto a dos potenciales externos, uno debido a la presencia de los núcleos y otro generado por los efectos de correlación e intercambio. Dichos efectos contienen información extra de la interacción electrón-electrón.

El valor mínimo del funcional de energía total de Kohn-Sham, $E_{KS}[\rho(r)]$, corresponde a la energía total del sistema del estado base. Los orbitales de Kohn-Sham $\psi_i(r)$ que minimizan el funcional de energía total están dados por las soluciones de las ecuaciones de Kohn-Sham:

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{eff}(r) \right] \psi_i(\rho) = \varepsilon_i \psi_i(\rho) \quad (4.22)$$

$$v_{eff}(r) = V_H(r) + V_{xc}(r) + V_{ext}(r) \quad (4.23)$$

Las cuales brindan un procedimiento práctico para obtener la densidad electrónica del estado base mediante el siguiente teorema:

Tercer teorema: *la densidad exacta del estado base $\rho(r)$ de un sistema de N electrones es:*

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N \psi_i^*(r) \psi_i(r) \quad (4.24)$$

donde las funciones de onda electrónicas $\psi_i(r)$ son las N soluciones de menor energía de la ecuación de Kohn-Sham

$$E_{KS} \psi_i = \varepsilon_i \psi_i \quad (4.25)$$

Con esto, el problema de muchos electrones interactuantes, se convierte ahora en un problema de electrones no interactuantes moviéndose en un potencial efectivo debido a los iones y a los otros electrones, es decir, en lugar de resolver una ecuación acoplada de muchos electrones, se deben resolver N ecuaciones desacopladas. Además, nuestro problema se puede resolver de manera autoconsistente (33). Hasta este punto la teoría del funcional de la densidad es exacta, sin embargo, la forma del potencial de intercambio y correlación, v_{xc} , no se conoce y por lo tanto es necesario usar potenciales aproximados para representar

este término. El objetivo es encontrar una expresión para la energía de intercambio y correlación, $E_{xc}(\rho(r))$, en términos de la densidad electrónica y sus variaciones, lo cual no es fácil para nada, por lo que es un tema de debate dentro de los desarrollos teóricos del DFT. Sin embargo, existen muy buenas aproximaciones que permiten que el DFT se encuentre dentro de los métodos más usados en la materia condensada y la química cuántica.

4.3.4.- Aproximaciones para el Potencial de Intercambio y Correlación: LDA y GGA

La primer aproximación para el funcional de intercambio y correlación, $E_{xc}(\rho)$, fue formulada en los primeros trabajos de DFT (34) y asume que la distribución espacial de la densidad de carga electrónica de un sólido varía suavemente, de tal manera que se puede considerar que en cada punto, la energía de intercambio y correlación depende solo de la densidad de ese punto; por lo que es conocida como la aproximación de densidad local (LDA) y cuya expresión para el funcional de correlación e intercambio es:

$$E_{xc}^{LDA}[\rho(r)] = \int \rho(r) \varepsilon_{xc}[\rho(r)] dr \quad (4.26)$$

donde $\varepsilon_{xc}[\rho(r)]$ es la energía de intercambio y correlación por electrón de un gas homogéneo de electrones de densidad uniforme $\rho(r)$.

El esquema LDA utilizado comúnmente contiene la expresión exacta para la energía de intercambio del gas de electrones deducida por Dirac, mientras que la energía de correlación emplea la parametrización de Perdew y Zunger para el gas homogéneo (35). A pesar de ser una aproximación bastante fuerte, teniendo en cuenta las grandes fluctuaciones locales de la densidad electrónica que hay en los sistemas moleculares y fases condensadas, se obtienen resultados asombrosamente precisos para algunas propiedades, y en algunos casos los resultados concuerdan relativamente bien con los experimentos.

Una manera de mejorar la descripción de la energía de intercambio y correlación en la aproximación LDA, es considerar que la contribución de esta energía no depende solo de la densidad en un punto, sino además de la variación de la densidad alrededor de este punto, sus gradientes. Se trata en este sentido de una aproximación

semilocal, la cual se conoce como aproximación de gradiente generalizado (GGA). De forma que, el funcional de intercambio y correlación se puede expresar como:

$$E_{xc}^{GGA}[\rho, |\nabla\rho|] = \int \rho(r) F_{xc}[\rho(r), \nabla\rho(r)] dr \quad (4.27)$$

La introducción de los efectos de gradiente conduce a una mejora en las geometrías calculadas, las frecuencias y las densidades de carga, en comparación con la aproximación LDA. No obstante, el principal argumento a favor del método GGA es la mejora en las energías de enlace calculadas para varios sólidos y moléculas (36). Algunos de los funcionales $F_{xc}[\rho(r), \nabla\rho(r)]$ mas usados son los propuestos por (37): Perdew y Wang (PW86), Becke y Perdew (BP), Lee-Yang-Parr (LYP), Perdew y Wang (PW91) o Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE). Este último funcional es el implementado en el presente trabajo, una descripción más a fondo sobre el mismo se hace en la referencia (38).

4.4.- Implementación de la Teoría del Funcional de la Densidad.

4.4.1.- Conjunto de Bases Gaussianas.

Otra forma de resolver la ecuación de Kohn-Sham es a través del uso de ondas Gaussianas. En 1950, Boys y colaboradores, se llevó a cabo la primer introducción de orbitales tipo gaussian, (GTO, por sus siglas en inglés) (39), las cuales juegan un papel importante para la ejecución de cálculos *ab initio*. Estos orbitales se descomponen en:

$$\Phi_{\mu}(r) = N x^l y^m z^n e^{-\alpha r^2} \quad (4.28)$$

En esta ecuación los superíndices l, n, m representan los números cuánticos de momento angular para las coordenadas cartesianas asociadas, α es el exponente orbital y N es la constante de normalización la cual está dada por:

$$N = \left(\frac{2\alpha}{\pi}\right)^{\frac{3}{4}} \left[\frac{(8\alpha)^{l+n+m} l! m! n!}{(2l)!(2m)!(2n)!} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4.29)$$

Se pueden realizar combinaciones lineales de estas funciones generando así contracciones de GTO, estas contracciones fueron llevadas a cabo por Dunning (40).

$$\Psi_{\mu}(r) = \sum_i^{n_G} C_i \Phi_{\mu}(r) \quad (4.30)$$

donde n_G es el número de funciones elementales gaussianas primitivas (originales) incluidas en la contracción.

En la práctica, para resolver las ecuaciones de Hartree-Fock (HF) de manera numérica es necesario introducir un conjunto de funciones base, (3.30), de esta manera las ecuaciones de HF se vuelven algebraicas, y así se pueden transformar en forma matricial:

$$FC = SCE \quad (4.31)$$

donde $C = \{C_{i\mu}\}$ es la matriz de expansión de coeficientes, es decir, la matriz de vectores propios, $E = \epsilon_i$ simboliza la matriz de valores propios (la matriz diagonal de las energías correspondientes de orbitales ϵ_i) y S es la matriz traslapada

$$S_{\mu\nu} = \int \Phi_{\mu}(r)\Phi_{\nu}(r)dr \quad (4.32)$$

La matriz de Fock (F), consiste en la matriz de elementos cinéticos y potencial de intercambio y correlación coulombiano

$$F_{\mu\nu} = t_{\mu\nu} + v_{\mu\nu}^c + v_{\mu\nu}^{xc} \quad (4.33)$$

donde:

$$t_{\mu\nu} = -\frac{1}{2} \int \Phi_{\mu}(r)\nabla^2\Phi_{\nu}(r)dr \quad (4.34)$$

$$v_{\mu\nu}^c = \int \Phi_{\mu}(r)v^c(r)\Phi_{\nu}(r)dr \quad (4.35)$$

$$v_{\mu\nu}^{xc} = \iint \Phi_{\mu}(r)v^{xc}(r,r')\Phi_{\nu}(r')drdr' \quad (4.36)$$

La generalización de la ecuación no lineal 2.31 de eigenvalores se resuelve implementando un procedimiento autoconsistente (SCF). Los dos pasos

computacionales principales involucran la construcción de la matriz de Fock y su diagonalización.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1.- Síntesis de Nanotubos de Carbono Multicapa dopados con Nitrógeno, por el método de Deposición Química de Vapor (DQV).

- Material de trabajo e instrumentación.
 1. Dos hornos tubulares (Termo Scientific Tube Furnace 21100), de 40cm de largo aproximadamente.
 2. Tubo de cuarzo de una pulgada de diámetro y aproximadamente 1.20m de largo.
 3. Contenedor-nebulizador de líquidos a partículas trabajando con señales PWM sincronizadas a piezoeléctrico con sistema de refrigeración e interfaz al generador de frecuencia externo.
 4. Medidor de flujo (gas).
 5. Tanque de argón 95% y H₂ 5%.
 6. Válvula de presión para tanques de gas.
 7. Refrigerante tubular de vapores.
 8. Tubo cuello de ganso con Angulo de 90°.
 9. Conectores externos para poder conectar el tubo cuello de ganso a la boca de nebulizador.
 10. Trampa para gases residuales.
 11. Generador-modulador de frecuencias en corriente directa.
 12. Equipo de seguridad personal para el manejo de sustancias altamente corrosivas.
 13. Bencilamina Sigma Aldrich CAS (100-46-9) 99%.
 14. Ferroceno Sigam Aldrich CAS (102-54-5) 98%.
 15. Equipo de ultrasonido.
 16. Acetona.
 17. Etanol.
 18. Propano.

19. Ácido muriático.
20. Agua destilada.
21. Canales de conexión (mangueras de hule) anticorrosivas.
22. Campana de extracción.

Se preparó dos soluciones precursoras usando los reactivos a concentraciones de 97.5% de bencelamina/tolueno y 2.5% de ferroceno mezcladas bajo sonicación por 60 min, logrando así la homogeneidad de la mezcla. La mezcla que contiene bencelamina permite obtener Nanotubos de Carbono Multicapa Dopados con Nitrógeno (NTCMCDN) en cambio de aquella con Tolueno, obtenemos Nanotubos de Carbono Multicapa (NTCMC). Posteriormente se lava el tubo de cuarzo de aproximadamente 1.20 m. En una primera etapa el tubo es expuesto por 24h en ácido muriático. Al término de este tiempo, el ácido muriático se extrae cuidadosamente y se deposita en un contenedor de residuos. El tubo de cuarzo es bien lavado con agua y abundante jabón, y nuevamente con agua corriente para quitar residuos de jabón. Posteriormente se le hace un lavado de tres pasos:

- i.- Lavado con acetona,
- ii.- Lavado con etanol
- iii.- Finalmente, lavado con isopropanol.

Dejándolo secar a temperatura ambiente durante un día. Se trata de que el tubo no presente ningún tipo de residuos de síntesis anteriores. Una vez seco se coloca dentro del horno (1 o 2 hornos) este tubo se usará como sustrato. La trampa de residuos de gas (burbujeador) es llenada con acetona (hasta la marca asignada) aproximadamente con 320 ml. Al vaso contenedor ya montado al piezoeléctrico, se le añade 300ml de la solución precursora (bencelamina con ferroceno), conectándolo al tanque de gas. Entre la salida del gas acarreador y el vaso se coloca un medidor de flujo. Se ajustar el tubo cuello de ganso a los conectores del tubo de cuarzo. Conectar el generador de energía (pulsos) al nebulizador y sincronizar a una frecuencia de 4.1 y potencia de 9, esto observando el flujo del gas, si tenemos una nube de gas perceptible y que camine sobre el tubo de cuarzo.

Fijar la posición de los hornos; si son los dos hornos, que estén a misma altura. Los hornos se deben de colocar a una distancia de 10 cm con respecto al tubo de cuarzo, posterior a la unión con el cuello de ganso. Conectar con condensador Leibig con el burbujeador. Ajustar la temperatura de los hornos o del horno a 850°C. Se abre el flujo del gas a 2.5litros/minutos, esto con la finalidad de tener una atmosfera libre de oxígeno y evitar posibles oxidaciones. Abrir el paso de agua, para que esta actúe como refrigerante del sistema.

El sistema ya montado (**Figura 10**) con las temperaturas establecidas, el flujo de gas y el generador de energía tal como se indica, se deja actuar por 30 minutos, es el tiempo establecido anteriormente por protocolos elaborados por el Dr. Emilio Muñoz, donde las reacciones se llevan a cabo, para después apagar el generador de energía, bajar la temperatura de los hornos a 0°C.

Una vez que los o el horno indique una temperatura menor a los 150°C es permitido cerrar la fuente de flujo de gas y el refrigerante, ya que a estas temperaturas los nanotubos crecidos no sufren cambios.

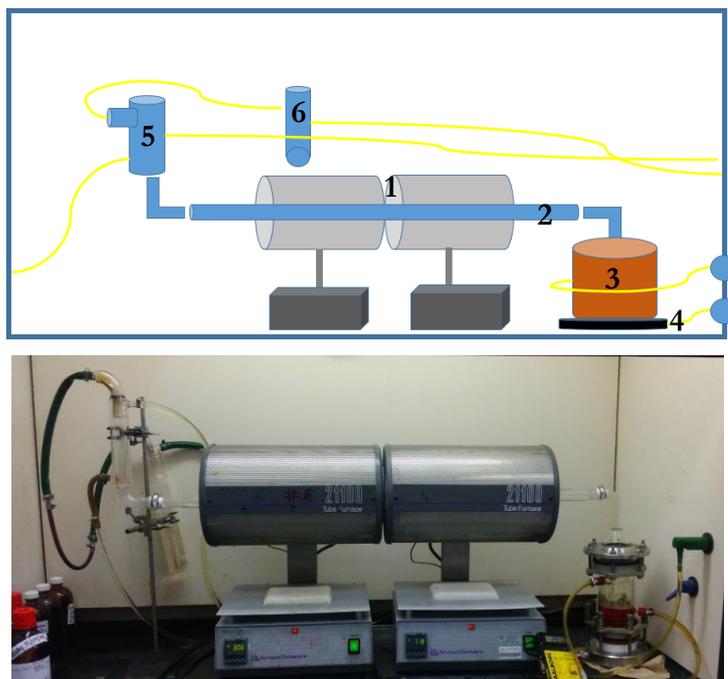


Figura 10. Modelo esquematizado del sistema CVD. 1) Hornos de crecimiento, 2) tubo de cuarzo, 3) sprayer, 4) material piezoeléctrico, 5) sistema de refrigeración, 6) trampa de acetona.

5.2.- Obtención del Nanomaterial.

Una vez que el equipo de síntesis está completamente frío podemos extraer el tubo de cuarzo para extraer el nanomaterial de su interior. Este se marca de acuerdo a las zonas deseadas a estudiar.

Estudios previos del equipo de trabajo del Dr. Emilio Muñoz, han demostrado que las propiedades de los NTCs como longitud y diámetros e incluso cuando este material es sintetizado con dopaje, estos varían de acuerdo a la zona. Esto probablemente es debido a la densidad de flujo de gases involucrados (**Figura 11**) y la temperatura del horno. La temperatura de 850°C que es la más propicia para una buena síntesis por el método de DQV se encuentra justo en el centro de los hornos.

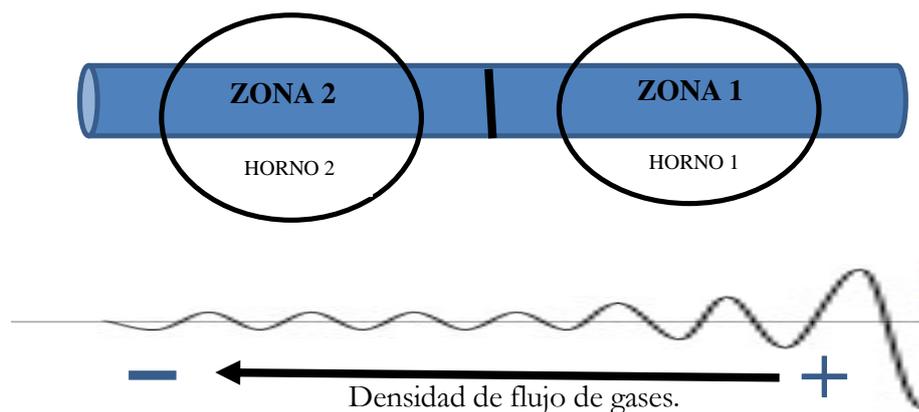


Figura 11. Esquema de la densidad de flujo de los gases argón y nitrógeno para la síntesis de NTCs por el método de DQV.

Se marcó el tubo de cuarzo de la siguiente manera para proceder a su raspado; es en estas zonas, donde los hornos alcanzan su temperatura máxima, donde se obtiene mayor masa del material.

Zona 1	15-24 cm	Horno 1
Zona 2	48-58cm	Horno 2

Tabla 2. Zonas marcadas en el tubo de cuarzo.

El raspado consiste en introducir cuidadosamente una vez que el tubo de cuarzo está marcado con las zonas indicadas, un tubo de cuarzo de menor diámetro, raspar

con las debidas precauciones de no pasarnos de las zonas ya establecida evitando lo más posible la mezcla de nanotubos de diferentes zonas.

5.3.- Oxidación Química de los NTCs.

Como es bien sabido una de las propiedades de los NTCs es que tienen tendencias hidrofóbicas es decir, no pueden dispersarse en agua. Pero, debido a tratamientos químicos es posible añadir en sus paredes grupos carboxilos los cuales permiten una buena dispersión en medios polares.

La mezcla precursora está elaborada a base de 300ml de ácido sulfúrico y 100ml de ácido nítrico, dando un total de 400 ml de mezcla homogénea. Dependiendo de la cantidad en miligramos que se tome de los centímetros elegidos es la cantidad de la mezcla precursora a colocar en un matraz Erlenmeyer. Por ejemplo, si se toman del centímetro 10, 12 mg de material, este se coloca con 12ml de la mezcla precursora.

Posteriormente se colocan los matraces en sonicación por aproximadamente 15 minutos ya que solo nos interesa hacer una limpieza de impurezas metálicas del material (**Figura 12**). Después de esto se hace un intenso lavado de las muestras con agua destilada hasta que el pH sea aproximadamente 7. Como resultado tenemos nanotubos de carbono multicapa dopados con nitrógeno y oxidados, los cuales denotamos como NTCMCDN-o.



Figura 12. Podemos observar las 4 zonas de la síntesis de NTCMCDN y NTCMC en proceso de oxidación. Sonificados por 15 minutos, logrando disminuir considerablemente la cantidad de imperfecciones (partículas de Fe) y obteniendo NTC hidrófilos.

5.4.- Preparación de muestras para caracterizaciones correspondientes.

5.4.1.- Microscopia Electrónica de Barrido, SEM.



Figura 13. Cinta, pines y pinza. Utensilios requeridos para montar la muestra para analizar por caracterización SEM.

Para todas las caracterizaciones se tomaron 8 muestras diferentes. La cinta de carbono doble cara es colocada en un pin, debido a que en ambos lados presenta pegamento es fácil que el nanomaterial se añada a ella.

Tomamos un poco de material con la pinza y se coloca en la cinta de carbono evitando tener cúmulos y/o exceso de material.

NTCMC zona 1	NTCMCDN zona 1
NTCMC zona 1 oxidados	NTCMCDN zona 1 oxidados
NTCMC zona 2	NTCMCDN zona 2
NTCMC zona 2 oxidados	NTCMCDN zona 2 oxidados

Tabla 3. Etiquetado de zonas

5.4.2.- Microscopia Electrónica de Transmisión, TEM

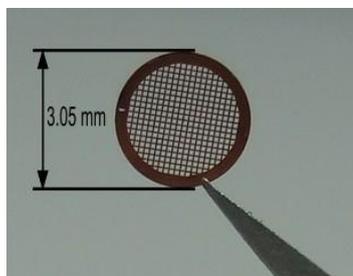


Figura 14. Rejilla de carbono, para montar el nanomaterial y caracterizarlo por microscopia electrónica de transmisión.

Los NTCs se dispersan de acuerdo al medio correspondiente, agua destilada o isopropanol de acuerdo a si están o no oxidados, una vez dispersos la rejilla se sumerge en la dispersión para que se impregne del nanomaterial.

5.4.3.- RAMAN.



Figura 15. Portaobjetos y cubreobjetos para montar la muestra a analizar por caracterización RAMAN.

Poca cantidad de nanotubos de carbono en estado sólido (polvo) son colados en los portaobjetos para después cubrir con los cubreobjetos.

5.4.4.- Análisis Termogavimétrico, TGA



Figura 16. Copa de cerámica para colocar la muestra y caracterizar por medio de TGA.

Se pesaron en la báscula 10mg de NTC de las 8 muestras ya mencionadas. Para después ser colocadas una por una en la copa de cerámica y proceder con el análisis termogavimétrico.

5.4.5.- RAYOS X.

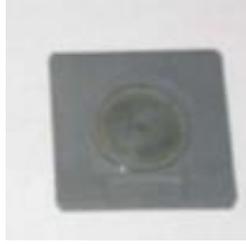


Figura 17. Portaobjetos especial para caracterización de RAYOS X, el cual presenta un pequeño desnivel (cóncavo) en el cual se coloca la muestra en estado sólido (polvo).

La muestra es colocada en estado sólido en el portaobjetos ya mencionado, justo en el desnivel cóncavo. Por lo general, este tipo de caracterización es para muestras en estado sólido, eso no implica que no se puedan analizar muestras en estado líquido.

5.5.- Cultivos Celulares.

5.5.1.- Descongelar Células HeLa.

La criopreservación permite mantener una línea celular por mucho tiempo en condiciones óptimas, utilizándola solo cuando sea necesario y guardándola congelada cuando no. También permite guardar células de pacientes o de muestras importantes que no se puedan analizar en el momento de su obtención.

La congelación impide todo movimiento molecular en la muestra. Sin embargo, existe un problema que constituye el proceso de congelación previo y la descongelación posterior que es lo que afecta gravemente a las muestras, debido a ello hay que tener mucho cuidado al momento de realizar la descongelación celular. Para realizar la descongelación se debe eliminar rápidamente la presencia intra y extracelular de los crioprotectores que suelen ser tóxicos a las elevadas concentraciones utilizadas y se debe atemperar de manera correcta las muestras hasta su temperatura de cultivo.

Para que las células tengan los nutrientes requeridos y tengan estabilidad, estas se colocan en medio completo (DMEM) el cual es una mezcla de 5ml de Suero Bobino

Fetal (SBF), 0.5ml de antibióticos, esto es aforado con el DMEM a 50ml. Se coloca a refrigeración de 4°C.

Es de suma importancia que la incubadora este en su totalidad limpio, es necesario limpiarla en exceso con etanol al 70%, llenar la tina con H₂O destilada y previamente esterilizada aproximadamente 1 litro, para proceder a encender la luz ultravioleta por 1 hora consecutiva. Esto evitara que la incubadora esté contaminada, eliminando cualquier tipo de bacteria y/o microorganismos que alteren a las células. De manera semejante, es necesario limpiar la campana de trabajo, con etanol 70% mas 1 hora de luz ultravioleta.

El material que se utilizara para llevar acabo el experimento de “*Descongelación Celular*” se esteriliza en la campana con luz ultravioleta por 15 min de un lado y 15 min del otro lado, antes de introducir todo el material a la campana se limpian con etanol 70%.

- Material requerido para esterilizar:

- 1.- Caja de Petri
- 2.- Papel parafilm
- 3.- Gradillas
- 4.- Tubos de 50ml
- 5.- Pipeta serológicas
- 6.- Puntas para pipeta milimétrica de 1ml
- 7.- Marcador
- 8.- Vaso de precipitado para desechos.

- i. La cepa celular Hela, se coloca a 37°C a baño maría por aproximadamente 10min para ser descongeladas, es necesario observar las células a cada momento y si es necesario sacarlas antes de los 10 minutos. Lo único que pretendemos en este paso es su descongelación. **(Figura 18)**.
- ii. Estas fueron colocadas en un tubo cónico para centrifuga de 50ml gota a gota extremando precauciones, evitando así una descompensación osmótica celular y estas puedan romperse. El medio completo, DMEM, es goteado a las células hasta tener 7ml.



Figura 18. Células HeLa en proceso de descongelación.

- iii. Teniendo ya la mezcla celular, esta es colocada en las pajas de Petri, con 7ml la caja de Petri no se cubre en su totalidad, necesitamos cubrirla ya que se dejaran incubando y no queremos que las células se queden sin medio y pierdan nutrientes, se añadieron 8ml mas para tener un volumen de 15ml totales. **(Figura 19)**

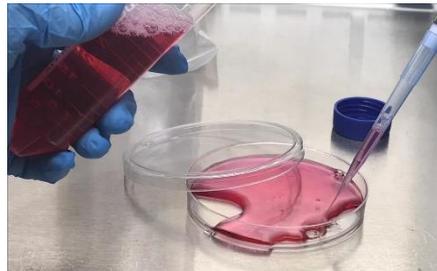


Figura 19. Cultivo celular en caja de Petri.

- iv. La caja de Petri con el medio celular es colocada en la incubadora ya esterilizada por 24horas

Al momento de realizar cultivos celulares, la incubadora requiere un flujo de gas CO_2 que tiene que estar a una presión de 0.5 l/min en la válvula y 40% en el marcador de la incubadora y 95% de humedad. Cumpliendo las 24horas establecidas, cambiar el medio completo DMEM para retirar el glicerol **(Figura 20)**.



Figura 20. Flujo del gas CO₂ en la incubadora.

5.5.2.- Manejo de la línea celular HeLa.

Las células HeLa son un tipo particular de células de cultivo usadas en investigación científica. Es el linaje celular humano más antiguo ya que se consideran la primera línea de células humanas inmortales. El linaje al cual pertenecen estas células deriva de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida de una paciente llamada Henrietta Lacks (de allí el acrónimo He{rrietta} La{cks}). El linaje HeLa lleva más de 50 años sirviendo de fuente de investigación en el campo médico y ha mostrado ser particularmente duradero y prolífico.

Las HeLa, además de poseer la característica de multiplicarse eternamente, también presentan una resistencia inusual. Se dividen en 24 horas y doblan su número tan rápidamente que sorprenden. Son tan agresivas que pueden contaminar un cultivo cualquiera con una sola célula HeLa.

Previo a los experimentos se limpia la incubadora y la campana como se mencionó en los experimentos anteriores. De igual manera se esterilizan los materiales necesarios en la campana con luz ultravioleta.

- **Material a esterilizar:**

- 1.- Pipetas serológicas.
- 2.- Tubos cónicos para centrifuga de 15ml y 50ml
- 3.- Puntas para pipetas milimétricas de 10, 200 y 1000ul.
- 4.- Flasks chicos
- 5.- Flasks grandes (75ml).

- Reactivos:

- 1.- Medio Completo (experimento anterior) DMEM.
- 2.- PBS (Tampón fosfato salino)
- 3.- Tripsina 0.25%
- 4.- EDTA 0.53mM
- 5.- Azul de tripano
- 6.- NaCl
- 7.- KCl
- 8.- Na₂HPO₄
- 9.- KH₂PO₄

- Equipo:

- 1.- Cámara de Neubauer
- 2.- Incubadora con flujo de gas CO₂
- 3.- Centrifuga
- 4.- Microscopio invertido.
- 5.- Balanza
- 6.- Medidor de PH
- 7.- Microscopio Óptico.

- i. Preparamos PBS un pH de 7.4 en un litro de agua destilada. Una vez que la mezcla está elaborada con agitación magnética, es necesario medir el pH y si no está en el establecido, ser ajustado. Se esteriliza y se filtra 50ml con la jeringa de 10ml y si filtro (**Figura 21**).

- 8g de NaCl
- 0.2g KCl
- 1.44g Na₂HPO₄
- 0.24g KH₂PO₄



Figura 21. PBS en agitación magnética.

- ii. Preparar solución de tripsina con EDTA en agua destilada para evitar aglomeraciones celulares ya que la tripsina rompe enlaces. (Tripsina 0.25% + EDTA 0.53mM). Esta solución se esteriliza filtrando por medio de jeringas.
- iii. Al día siguiente de la descongelación celular se hace un cambio de medio para eliminar el glicerol, de la siguiente manera: inclinar el tubo y retirar el medio con una pipeta serológica.
- iv. Lavar con PBS estéril y retirar de la misma manera que se retiró el medio.
- v. Agregar Tripsina (500ul para Flask chico y 1ml para Flask grande).
- vi. Incubar de 5-10min a 37°C hasta que se observe la suspensión de las células.
- vii. Agregar medio completo para inactivar la tripsina y así las células puedan reproducirse.
- viii. Transferir las células a un tubo cónico de 15ml y centrifugar a 1500rpm/10min o 2000rpm/5min.
- ix. Resuspender en medio completo y evaluar viabilidad con azul de tripano (conteo celular).

Para realizar el conteo celular es necesario tomar 10ul de la suspensión celular y diluirla en 90ul de azul de tripano, homogenizar la mezcla. Colocar 10ul de esta mezcla en la cámara Neubauer (**Figura 22**) y realizar el conteo en el microscopio óptico.



Figura 22. Camara Neubauer.

La cámara Neubauer, en la zona donde se coloca la mezcla celular, tiene 4 segmentos los cuales están divididos por unas líneas verticales y horizontales que arrojan una cuadrícula la cual podemos tomar como punto de partida (**Figura 23**).

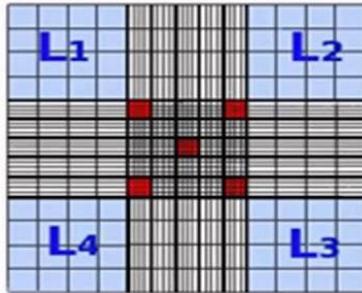


Figura 23. Imagen de como se observa la cámara Neubauer en el microscopio óptico.

Por cada zona (L₁, L₂, L₃ y L₄) se realiza conteo celular, el total de células contadas en las 4 zonas se divide entre el total de zonas, para después ser multiplicada por 10, esto es por los 10ul que se tomaron de la mezcla celular con azul de tripano, el resultado de esto es multiplicado por 10, 000 el cual es el factor de cámara (estandarizado), el resultado de estas operaciones básicas es la cantidad de células que tenemos en 1ml de solución.

- x. Agregar medio completo a las células y dejarlas a una concentración de 5×10^5 células /ml.
- xi. Colocar las células en una caja de Petri y colocarlas en la incubadora (**Figura 24**).



Figura 24. Cultivos células en la incubadora.

- xii. Permitir que las células se expandan, cambiando el medio cada 3 días o antes si es necesario, cada día observar en el microscopio invertido la

confluencia celular y si estas no presentan bacterias o alguna contaminación.

- xiii. Cuando la caja de Petri este totalmente saturada de células, hay que despegarlas siguiendo los pasos 2-8 y repartir las células en varias cajas Petri hasta obtener el número suficiente de células para los experimentos requeridos.

5.5.3. Extracción y Cultivos de Monocitos.

- **Material.**

- 1.- Tubos cónicos de 15 y 50ml.
- 2.- Tubos a vacío de 6ml para extracción de sangre
- 3.- Jeringas
- 4.- Puntas para pipetas milimétricas.
- 5.- Pipetas milimétricas.

- **Soluciones.**

- 1.- PBS
- 2.- Ficoll-Paque
- 3.- Pan Monocyte Isolation Kit
- 4.- BSA
- 5.- EDTA

- **Equipo.**

- 1.- Centrifuga
- 2.- Columna Magnética de separación celular.

Para la obtención de células mononucleares es necesario extraer 60ml de sangre humana intravenosa. Una vez que se extrajo la sangre en tubos de 6ml, se colocan 20ml en tubos cónicos de 50ml (total de 3 tubos cónicos) para mejor manejo, es de suma importancia mantener la sangre en movimiento continuo y lento para evitar la coagulación.

- i. Se toman los tubos con 20ml de sangre y se aforan a 30ml con PBS previamente estéril.
- ii. En otro tubo cónico de 50ml se colocan 3ml de Ficoll-Paque. Esta solución permite separar por medio de densidad las células mononucleares.
- iii. Trasferir las células al tubo que contiene el Ficoll con demasiado cuidado, inclinando el tubo y de manera lenta y suave, es de suma importancia evitar que la sangre se mezcle con el Ficoll.
- iv. Centrifugar a 2,500 rpm por 20 minutos a 4°C.
- v. Observar cuidadosamente y tratar de no mover de manera brusca el tubo, se observa claramente entre la zona del suero y los glóbulos rojos y eritrocitos una pequeña “tela” delgada de color beige, estas son las células mononucleares que requerimos. Esta “tela” es extraída cuidadosamente con pipetas milimétricas tratando de no tomar muestra de suero o de glóbulos rojos. Las células mononucleares son colocadas en un tubo cónico de 15ml, se requiere extremo cuidado y tratar de extraer lo más posible.
- vi. Una vez que las células estén extraídas, se coloca PBS para realizar un lavado y así retirar cualquier célula que no sean las requeridas. Se colocan los mililitros necesarios para aforar a 15ml con PBS y se centrifuga por 10 minutos a 2,500rpm a 4°C.
- vii. Procedemos a implementar el *Pan Monocyte Isolation Kit*.
- viii. Se prepara buffer MACS, con PBS previamente estéril, 0.5% de BSA y 2mM de EDTA y dejarlo a 4°C hasta que se ocupe.
- ix. Es necesario trabajar de manera rápida pero cuidadosa con las células y con las soluciones del kit, las cuales deben de estar frías a temperaturas de 2-8°C.
- x. Resuspender el pellet celular en 40ml de buffer por 10^7 células.
- xi. Añadir 10ul de FcR Blocking-Antobody Cocktail (sustancia del kit) por 10^7 células.
- xii. Añadir 10ul de Biotin-Antibody Cocktail por 10^7 células.
- xiii. Mezclar bien y con mucho cuidado e incubar por 5 minutos en el refrigerado de 2-8°C.
- xiv. Añadir 30ul de buffer MACS por 10^7 células.
- xv. Añadir 20ul de anti-Biotin MicroBeads por cada 10^7 células.

- xvi. Mezclar bien esta lograr homogeneidad e incubar por 10 minutos en el refrigerador 2-8°C.
- xvii. La solución final, es colocada gota a gota en la columna magnética. Las soluciones añadidas colocan bioagentes a las células mononucleares y otros bioagentes a aquellas que no son mononucleares, es por ello que la cámara lleva a cabo la separación celular. Unas células quedan atrapadas en ella y las mononucleares pasan la columna y son recopiladas en un tubo cónico de 15ml (**Figura 25**).

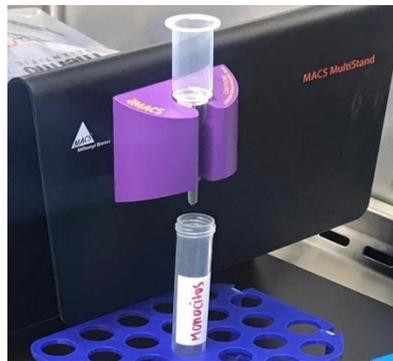


Figura 25. Columna de separación celular Magnética.

- xviii. Enjuagar la columna magnética con 3 ml de buffer MACS y recolectar las células sobrantes.
- xix. Los monocitos son resuspendidos en 5ml de medio completo DMEM.
- xx. Se extraen 10ul de esta suspensión para realizar conteo celular, el cual ya se explicó anteriormente.

5.6- Incubación Enzimática.

Este experimento es el crucial para la tesis propuesta. Los nanotubos de carbono, en esta investigación, se proponen como posible terapia alternativa para enfermedades emergentes, pero debido a que este nanomaterial presenta grados de citotoxicidad es necesario evaluar bajo qué condiciones su degradación biológica es factible, rápida y eficaz.

- Material.

1.- Eppendorf (1ml)

- 2.- Pipeta milimétrica
- 3.- Puntas para pipetas milimétricas.

- Soluciones.

- 1.- Enzima Mieloperoxidasa (h-MPO)
- 2.- Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂)
- 3.- Cloruro de sodio (NaCl)
- 4.- PBS
- 5.- Agua destilada.

- Equipo.

1.- Balanza

2.- Agitador

- i. Los Nanotubos de Carbono Multicapada dopados con Nitrógeno y no dopados con Nitrógeno previamente oxidados, son sonicados por 1 hora en PBS para adaptar el pH y tener una solución homogénea.
- ii. Preparar el H₂O₂ a 80uM.
- iii. La peroxidasa es dispersada en PBS (0.8mg/ml)
- iv. Se realizaron los incubamietos de la siguiente manera:

Control 1: MWCNTs + PBS

Control 2: MWCNTs + H₂O₂

Control 3: MWCNTs + h-MPO

MWCNTs-p (ox) Zona 1 (10mg/ml) (1:4 dilución)	MWCNTs-p (ox) Zona 2 (10mg/ml) (1:4 dilución)
1.- Hora 0	1.1.- Hora 0
2.- 15 minutos	2.1.- 15 minutos
3.- 30 minutos	3.1.- 30 minutos
4.- 1 hora	4.1.- 1 hora
5.- 6 horas	5.1.- 6 horas
MWCNTs-n (ox) Zona 1 (10mg/ml) (1:4 dilución)	MWCNTs-n (ox) Zona 2 (10mg/ml) (1:4 dilución)
1.2.- Hora 0	1.3.- Hora 0
2.2.- 15 minutos	2.3.- 15 minutos
3.2.- 30 minutos	3.3.- 30 minutos
4.2.- 1 hora	4.3.- 1 hora
5.2.- 6 horas	5.3.- 6 horas

Tabla 4. Tiempo de interacción enzima- NTC.

5.7.- Ensayo de Citotoxicidad.

Una vez que se sabe cuál de los nanotubos de carbono logro mayor degradación y con mayor eficacia, este es sometido a ensayos citotoxicos para evaluar la viabilidad celular.

- Material.

- 1.- Caja de incubamiento de 24 pozos.
- 2.- Pipetas milimétricas
- 3.- Puntas para pipetas milimétricas

- Soluciones.

- 1.- PBS
- 2.- Medio completo DMEM.

- Equipo.

- 1.- Incubadora

- i. Una vez que tenemos el conteo celular de los monocitos estos son repartidos en 2 concentraciones diferentes de NTC (**Figura 26**).

1. 6ug/ul	2. 0.6ug/ul	3. Control
-----------	-------------	------------



Figura 26. Soluciones Stock de NTC en PBS.

- ii. Cada concentración se realizara un conteo celular para evaluar viabilidad a las horas 6 y 24. Marcar con estas condiciones la caja de 24 pozos (Figura 27).



Figura 27. Caja para incubación celular de 24 pozos.

- iii. Se coloca en la incubadora por las horas mencionadas.
- iv. Una vez cumplidas las horas mencionadas, se realiza el ultimo conteo celular y se hace comparación de antes del incubación con el nanomaterial, a la hora 6 y a la hora 24.

5.8.- Quantum Espresso.

1 &control

2 calculation='relax'

3 prefix='NOMBRE DEL ARCHIVO DE SALIDA'

4 nstep= XXX (número de repeticiones hasta llegar a la estructura optimizada)

5 outdir = 'home/guizado/outdir_diana',

6 pseudo_dir='/opt/intel/espresso-4.1.2/pseudo' (pseudo potenciales)

7 /

8 &system

9 ibrav=0, (tipo de celda) nat=XXX, (nóm. de átomos) ntyp=X, (especie de átomos)

tot_charge=0

10 ecutwfc=35.0, ecutrho= 200.0

11 occupations='smearing', smearing='methfessel-paxton', degauss= 0.05

12 /

13 &electrons

14 conv_thr= 1.0d-6 (*energía*)
15 mixing_beta = 0.6 (*mezcla de cargas*)
16 mixing_mode='local-TF'
17 diagonalization='cg'
18 /

19 &ions

20 upscale=10
21 /

22 ATOMIC_SPECIES (*ejemplo*)

23 C 12.0107 C.pbe-rrkjus.UPF
24 H 1.00794 H.pbe-rrkjus.UPF
25 N 14.00 N.pbe-rrkjus.UPF

26 ATOMIC_POSITIONS {angstrom}

27 *Es en este apartado donde se colocan las coordenadas de la estructura que se desea optimizar.*

.
. .
.

160 CELL_PARAMETERS {cubic}

161 35.0 0.0 0.0
162 0.0 35.0 0.0
163 0.0 0.0 35.0



L=35.0

164 K_POINTS {Gamma}

165
166

RESULTADOS

6.- Síntesis por CVD y oxidación química con ácidos.

Se realizaron 6 síntesis de MWCNTs por el método de Deposición química de vapor (mencionado en el capítulo de Metodología Experimental), en tres de ellas se obtuvieron nanomateriales dopados con átomos de nitrógeno, mientras que en las otras tres síntesis MWCNTs sin dopaje. Estudios previos del grupo del Dr. Emilio Muñoz [66] han reportado los diferentes tipos de dopaje que se obtienen por este método de síntesis, como son: dopaje piridinico, pirrolico, quaternario, entre otros. Una vez que se realizó el raspado de los tubos de cuarzo, él tuvo fue marcado a diferentes zonas para llevar mayor control de la síntesis del material (**Figura 28**). Las muestras se pesaron para obtener la siguiente distribución de masas, de las 6 síntesis.

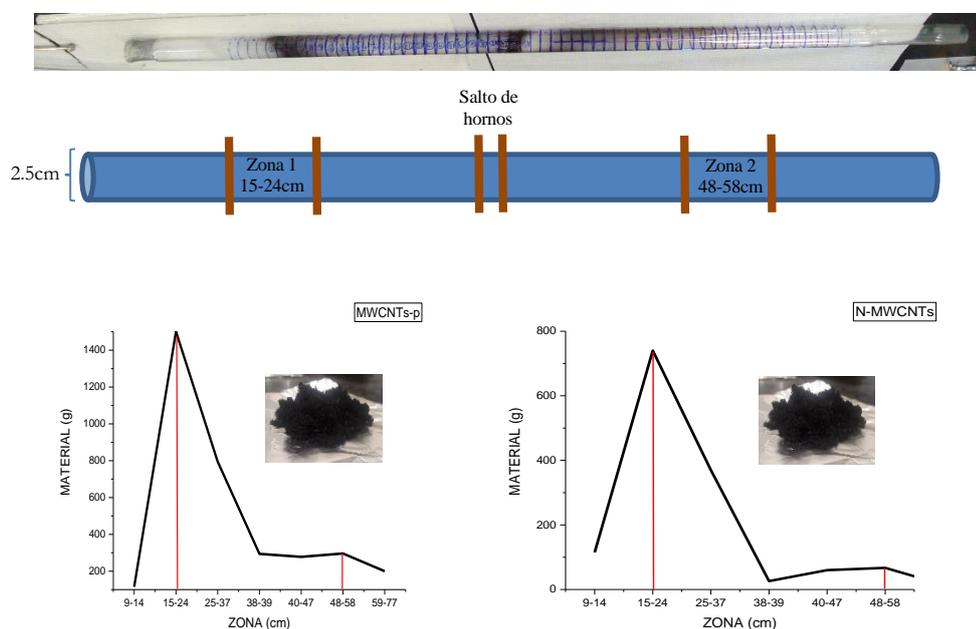


Figura 28. La grafica de la izquierda es respecto a las 3 síntesis para obtener MWCNTs-p (sin dopaje), se observan dos picos de crecimiento, estos dos picos coinciden con el centro de los hornos, es aquí donde se encuentra la mayor temperatura. De igual manera en la gráfica de la derecha arroja la cantidad de material obtenido en 3 síntesis, estos con dopaje de nitrógeno, con 2 picos de crecimiento en las zonas centrales de los hornos.

Tomando en cuenta la distribución de masa, en ambas graficas se presentan dos picos de crecimiento por lo general estos se encuentran en las zonas centrales de los hornos, esto puede indicar que la temperatura tiene correlación directa con el crecimiento (la cantidad) de masa de los MWCNTs. Por tal motivo, se seleccionaron estas 2 zonas para los experimentos siguientes.

Etiquetaremos de la siguiente manera estas zonas:

Nanotubos de Carbono Multicapa prístinos, de los centímetros 15 a 24cm.	MWCNTs-p zona 1
Nanotubos de Carbono Multicapa prístinos, de los centímetros 48 a 58cm.	MWCNTs-p zona 2
Nanotubos de Carbono Multicapa dopados con Nitrogeno, de los centímetros 15 a 24cm.	N-MWCNTs zona 1
Nanotubos de Carbono Multicapa dopados con Nitrógeno, de los centímetros 48 a 58cm.	N-MWCNTs zona 2

Tabla 5. Etiquetas de las muestras obtenidas.

Cada zona fuera dividida en dos partes (mitad y mitad) para que a una de ellas se le aplicaran modificaciones químicas por medio de oxidación con ácidos. A los NTC por tratamiento químico lo nombraremos como N-MWCNTs-ox y MWCNTs-ox (**Figura 29**). La oxidación de los nanotubos de carbono permite que estos sean solubles en medios polares como el agua, PBS, entre otros, también logramos que el material tuviera cierto grado de limpieza perdiendo impurezas como, partículas de Fe, estas partículas de Fe se forman dentro de ellos en el bambú cuando son sintetizados debido a sus precursores como es el ferroceno ($C_{10}H_{10}Fe$).



Figura 29. Proceso de oxidación química por medio de ácido nítrico y sulfúrico durante 15 min con sonicación. Este tiempo es necesario para que los nanotubos adquieran propiedades hidrofílicas y pierdan cantidad considerable de imperfecciones.

Estas muestras fueron caracterizadas por microscopía TEM, SEM, RAMAN, RAYOS X, TGA, caracterizaciones básicas para determinar si tenemos materiales en buenas condiciones.

6.1.- Análisis de los MWCNTs por Microscopía de Barrido (SEM).

El fundamento de la microscopía electrónica de barrido, SEM, radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío alrededor de 10^{-7} Torr. En ella el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas que producen una disminución de su diámetro hasta hacerse casi puntual (hasta unos 10nm). Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye desde unos 10^{-14} A hasta unos 10^{-10} A. Esta disminución en la intensidad implica una menor cantidad de electrones primarios. El haz de electrones con estas últimas características, es decir en forma puntual, es desplazado sobre toda la superficie de la muestra a modo de un pincel que va barriendo la muestra con continuas idas y venidas [74].

Uno de los objetivos principales, es conocer la morfología de los N-MWCNTs crecidos en el tubo de cuarzo en diferentes centímetros, para así poder observar a detalle su degradación. Por tal motivo estas muestras fueron caracterizadas por

microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual utiliza un haz de electrones para formar una imagen ampliada de la superficie del objeto. Las zonas analizadas por medio de esta técnica de caracterización son zona 1 y 2 de cada síntesis, las dos ubicadas en el área central de los hornos de la síntesis de CVD. Con microscopía SEM podemos observar estructuras cilíndricas huecas tipo bambú con estructuras aparentemente sanas, con pocas imperfecciones.

En la **Figura 30** se observa la imagen de caracterización SEM de N-MWCNTs de la zona 1 (15-24cm) y zona 2 (48-48cm) previos al tratamiento oxidativo. Se obtuvieron NTCs de aproximadamente 200 μ m. Estos están agrupados en bloques grandes de aproximadamente 200-300 μ m y aparentemente cohesionados. Sin embargo estos bloques son disueltos en cuanto el material sea sometido a sonicado. Este material aun presenta imperfecciones, partículas de Fe, podemos observar con detalle en la imagen de la derecha que presenta pequeñas perturbaciones en la superficie.

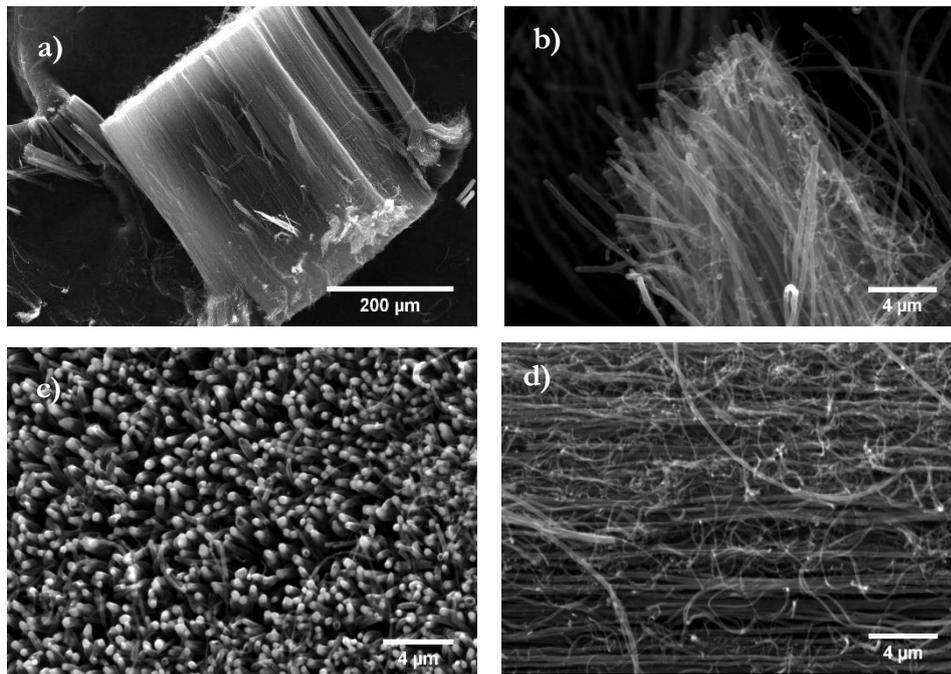


Figura 30. N-MWCNTs previos a tratamientos oxidativos con ácidos. Los incisos a) y b) pertenecen a la zona 1 (primer horno, 15-24cm) del horno implementado para la síntesis por CVD, se obtuvieron NTCs de longitudes aproximadamente de 200 μ m y diámetros de 80-90nm. Se observa que el nanomaterial aparentemente esta sin daños estructurales. Las imágenes c) y d) muestran NTCs de la zona 2 (segundo horno, 48-58cm) los diámetros y las longitudes no varían de manera exorbitante con respecto a las obtenidas en la primera zona.

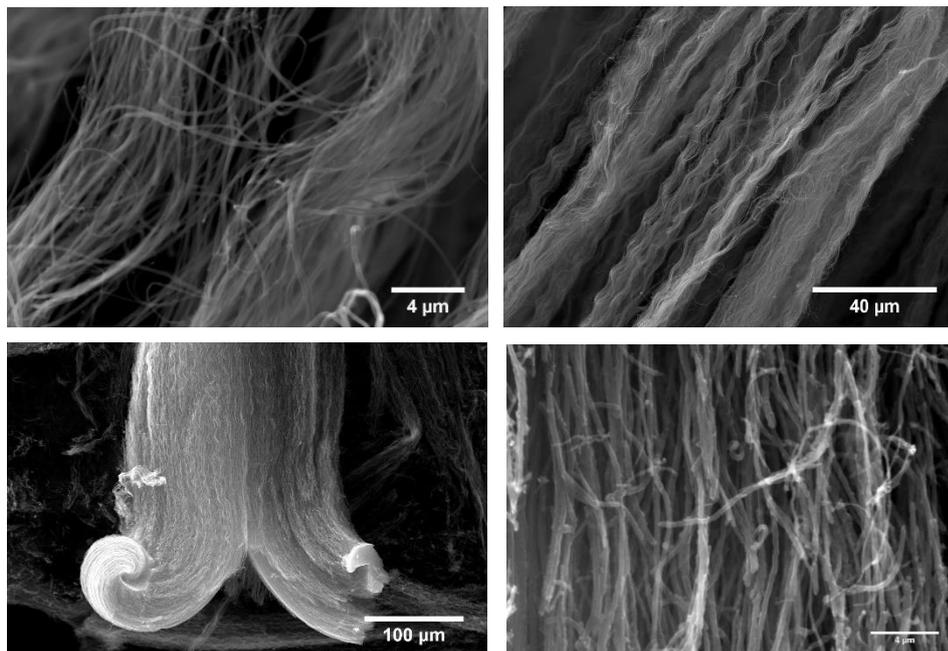


Figura 31. MWCNTs-p previos a tratamientos oxidativos con ácidos. Los incisos a) y b) pertenecen a la zona 1 (primer horno, 15-24cm) del horno implementado para la síntesis por CVD, se obtuvieron NTCs de longitudes aproximadamente de 200-300 μ m y diámetros de 80-90nm. Se observa que el nanomaterial aparentemente está sin daños estructurales. Las imágenes c) y d) muestran NTCs de la zona 2 (segundo horno, 48-58cm) los diámetros y las longitudes no varían de manera exorbitante con respecto a las obtenidas en la primera zona.

Las 4 muestras fueron sometidas a tratamiento oxidativo con ácidos a temperatura ambiente por un tiempo mínimo de 15 minutos, esto con la finalidad de lograr dispersión en medios polares los cuales son de suma importancia en áreas biológicas y de igual manera limpiar un poco los MWCNTs quitando partículas de Fe presentes durante el método de síntesis. Los 15 minutos no fueron suficientes para erradicar en su totalidad todas las partículas de Fe, pero si fueron eliminadas unas pocas, los ácidos interactuaron con las nanoestructuras por 15 minutos debido a que si este se prolongaba a más tiempo de interacción, existía la posibilidad que la morfología del material se viese dañada (**Figuras 32 y 33**).

Estas muestras también fueron caracterizadas por microscopía de barrido (SEM) para corroborar que la estructura no sufriera daños superficiales ni morfológicos.

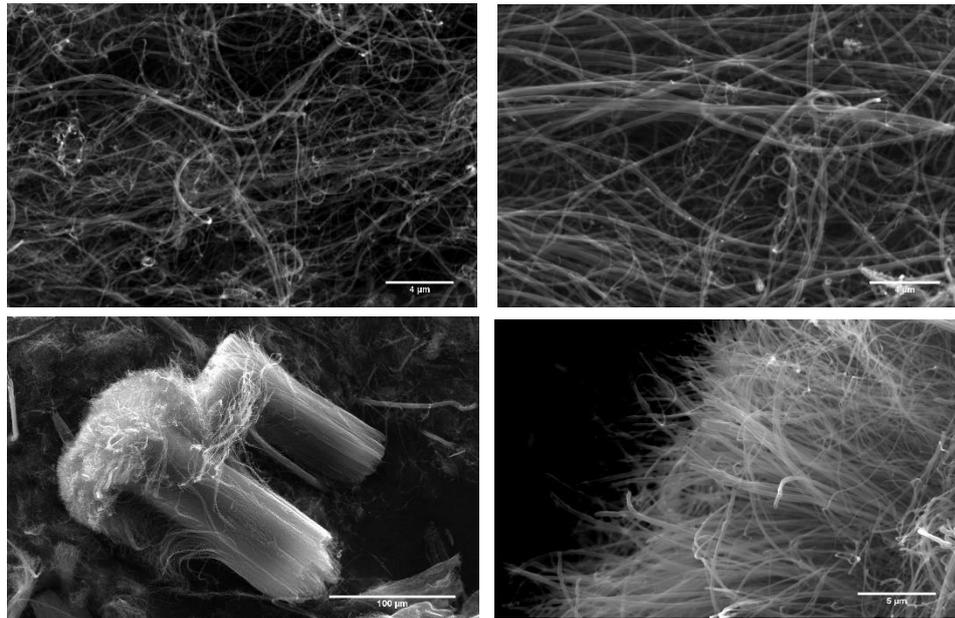


Figura 32. N-MWCNTs (ox), zona 1 (a y b) y zona 2 (c y d). No se observa daño aparente en la morfología ni en diámetros. En el inciso d) se observan las puntas de los N-MWCNTs y la mayoría de ellas carecen de partícula de Fe, lo cual nos hace suponer que el proceso de oxidación retiró cantidad considerable de estas. Los nanotubos tienen mejor dispersión en medios polares, las longitudes y diámetros prevalecieron.

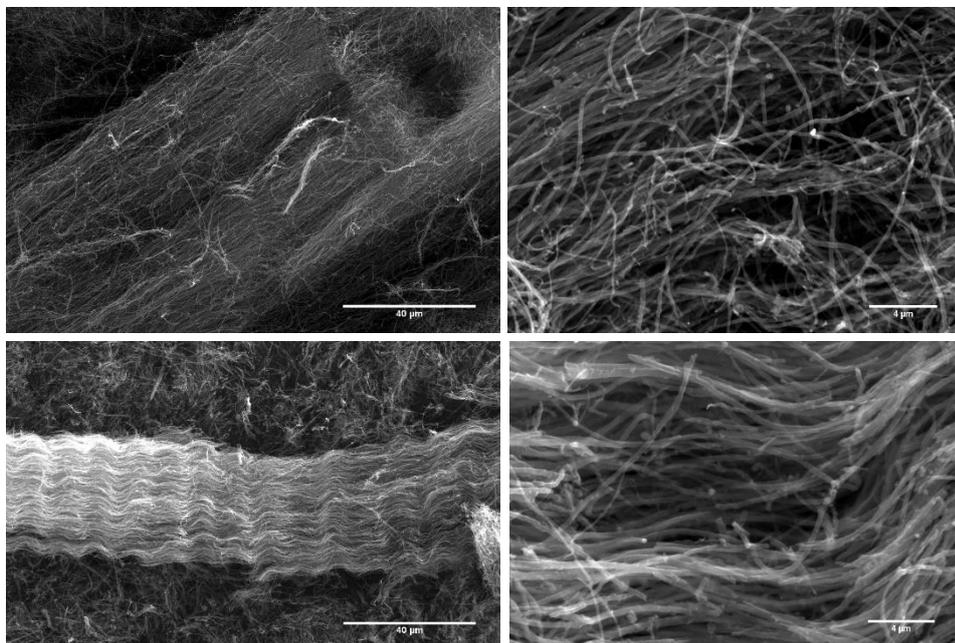


Figura 33. MWCNTs-p (ox), zona 1 (a y b) y zona 2 (c y d). No se observa daño aparente en la morfología ni en diámetros. En el inciso d) se observan las puntas de los MWCNTs-p (ox) y la mayoría de ellas carecen de partícula de Fe, lo cual nos hace suponer que el proceso de oxidación retiró cantidad considerable de estas. Los nanotubos tienen mejor dispersión en medios polares, las longitudes y diámetros prevalecieron.

Las imágenes que se obtienen en el microscopio electrónico de barrido corresponden a electrones secundarios o electrones retrodispersados emitidos tras la interacción con la muestra del haz incidente [74].

La emisión de electrones retrodispersados depende fuertemente del número atómico de la muestra. Esto implica que dos partes de la muestra que tengan distinta composición se revelan con distinta intensidad aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas. Es así como los rayos X que se generan en una muestra sometida a bombardeo electrónico permiten identificar los elementos presentes y establecer su concentración [74] (**Figura 34 y 35**).

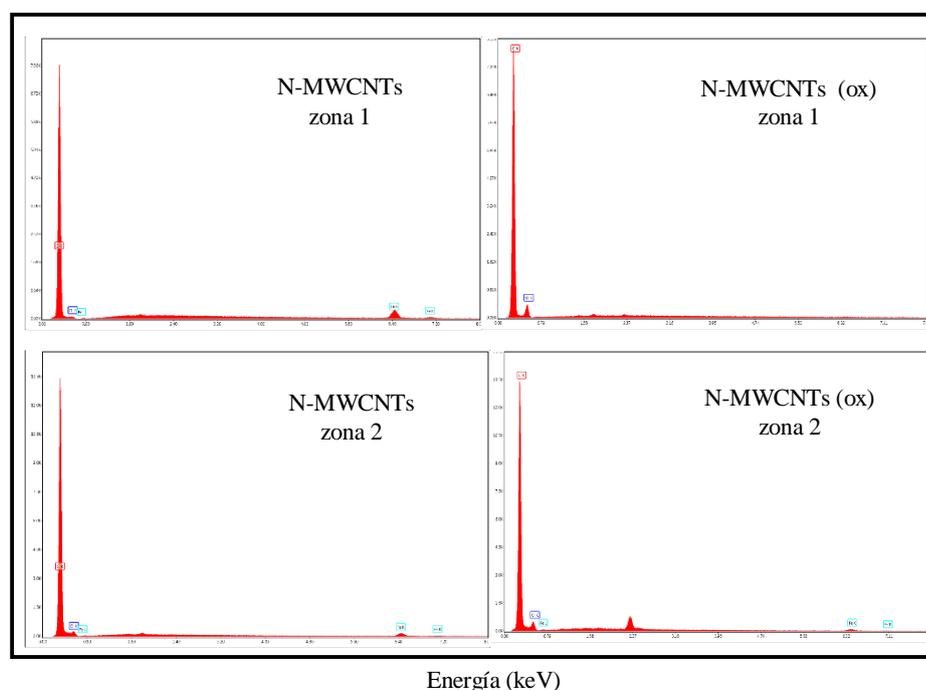


Figura 34. Comparación de EDS de N-MWCNTs previos y después a tratamiento oxidativo. Se puede observar que el pico representante del Fe en los N-MWCNTs zona 1 desaparece, mientras que en los N-MWCNTs zona 2 disminuye.

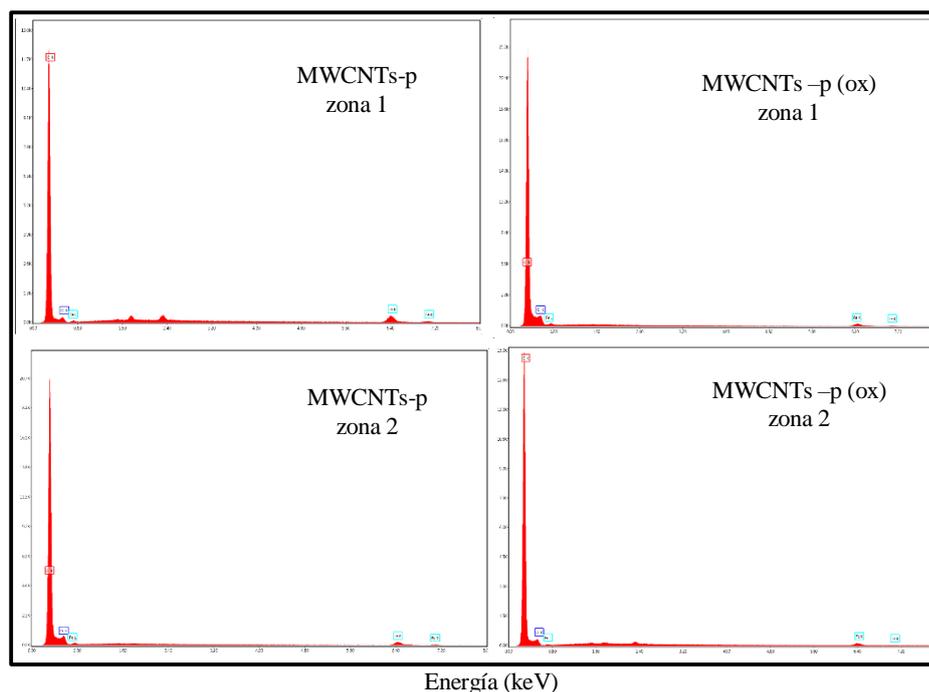


Figura 35. Comparación de EDS de MWCNTs-p previos y después a tratamiento oxidativo. Se puede observar que el pico representante del Fe en ambas zonas disminuyo.

Con esta caracterización corroboramos que las partículas presentes durante la síntesis son de Fe y estas disminuyen su concentración después de tratamientos oxidativos.

Se obtuvieron por medio de la síntesis de CVD nanomateriales de forma cilíndrica y huecos, debido a que el método de deposición química de vapor presenta una partícula metálica para que el tubo inicie su crecimiento, en el hueco se observan partículas metálicas que por medio de caracterización EDS comprobamos que son de Fe.

La morfología de los N-MWCNTs (ox) y MWCNTs-p (ox) no presento alteraciones, por lo cual este material es apto para evaluación pre y pos al tratamiento enzimático. Los diámetros y longitudes prevalecieron intactos después de la oxidación y también este proceso favoreció la solubilidad del nanomaterial en medios polares.

6.2.- Análisis de los MWCNTs por Microscopia de Transmisión de electrones (TEM).

La técnica de microscopia electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) se ocupa de la información contenida en aquellos electrones que traspasan una muestra sólida sobre la que se ha hecho incidir un haz electrónico coherente y a gran velocidad. La heterogénea distribución de densidad electrónica presente en la muestra provoca en la radiación transmitida la formación de imágenes de interferencia, que adecuadamente interpretadas, revelan sus características morfológicas y estructurales [75].

Los electrones que se transmiten a través de una muestra sobre la que se ha hecho incidir un haz electrónico coherente se catalogan en tres tipos: a) *Electrones no desviados con cinética idéntica a la de los incidentes*, b) *Electrones desviados elásticamente* y c) *Electrones inelásticos, que son desviados cediendo parte de su energía a la muestra*. Los electrones no desviados y los elásticos son los únicos que contribuyen constructivamente a la formación de la imagen. La fracción inelástica es por otra parte la responsable del ruido de fondo presente en toda imagen de microscopia electrónica [75].

Analizando estas estructuras de manera más detallada con microscopia de transmisión de electrones (TEM), podemos determinar que nuestros NTCs presentan estructuras sanas, que son NTCs multicapa con distancias interplanares de 0.32nm. También se observan pequeñas imperfecciones internalizadas, las cuales confirmamos que son de Fe principalmente de estructuras elípticas.

En la literatura se ha reportado que son estas imperfecciones las que provocan altos grados de toxicidad en este material. Podríamos pensar que con más tiempo de oxidación eliminaríamos mayor cantidad de estas partículas, pero para finalidad de este trabajo de investigación, eso impediría la comparación con la estructura una vez que fue degradada por la mieloperoxidasa. Es por ello que el proceso de oxidación solo se hizo por tiempo mínimo de 15 minutos, reduciendo así un poco la toxicidad y logrando que los NTCs ahora tengan propiedades hidrofílicas.

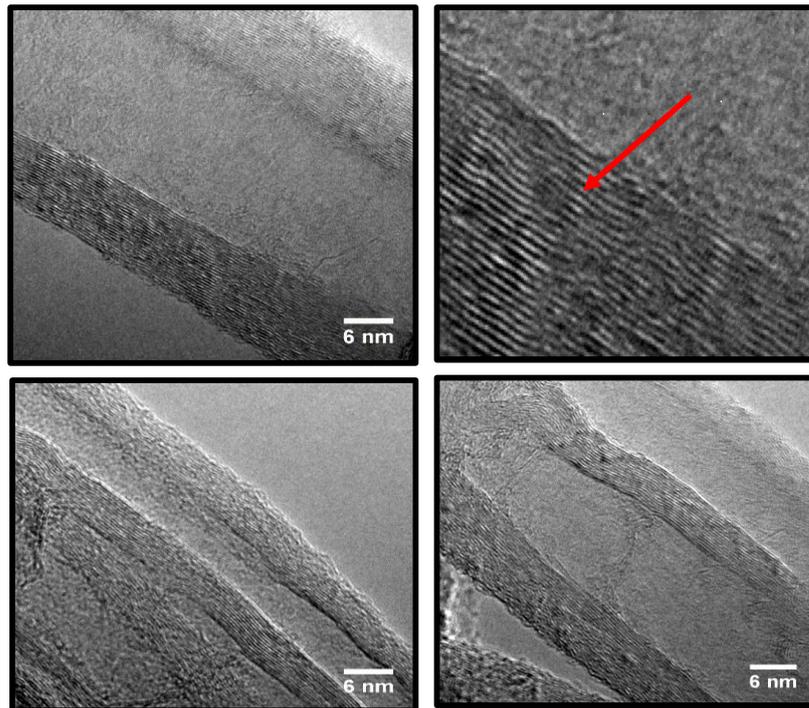


Figura 36. Imagen de microscopia de transmisión de electrones en la cual se aprecia con gran detalle las capas de los NTC a distancias interplanares de 0.32nm, la estructura del material se aprecia “sana” y sin imperfecciones. Claramente el bambu está presente y sin daños.

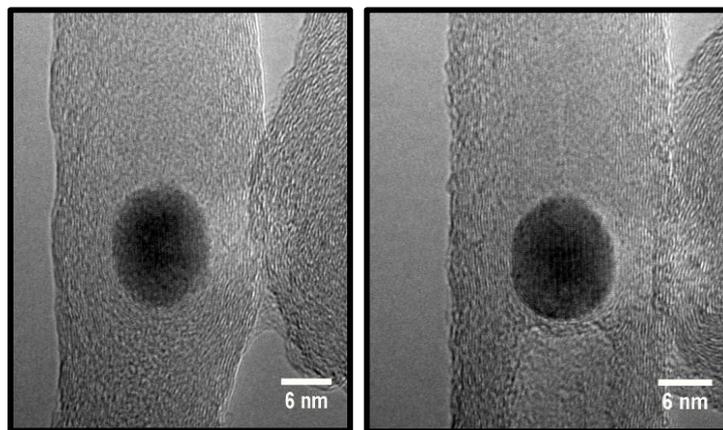


Figura 37. Debido a que fue muy poco tiempo el proceso de oxidación, no todas las imperfecciones fueron eliminadas, analizando estas partículas por EDS se determinó que contenían Fe principalmente, muy posiblemente estas aparecen en la síntesis debido a que una de las sustancias precursoras para la síntesis de este material es ferroceno.

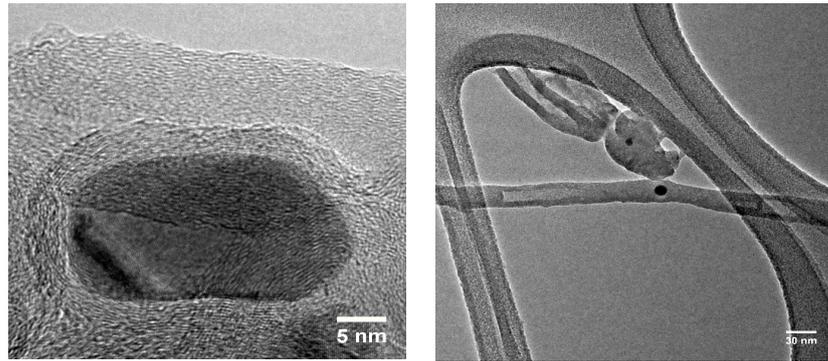


Figura 38. Presentan longitudes aproximadamente de 28x15nm

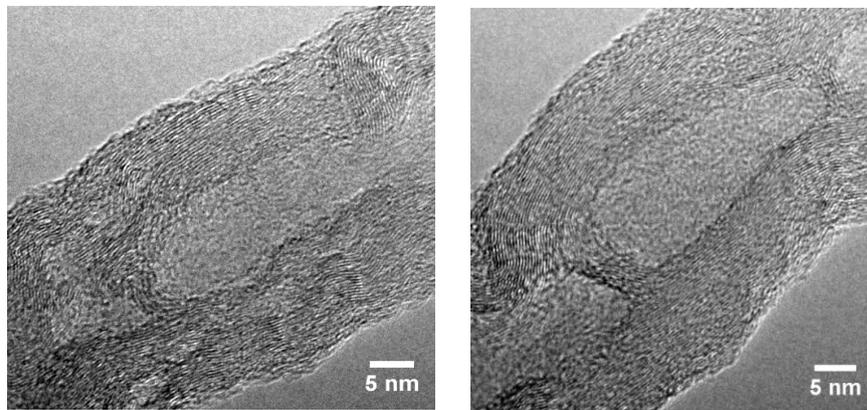


Figura 39. NTCMCDN-o de la zona 1, la imagen presenta NTCMCDN-o con diámetro aproximado 35nm.

El problema principal de este trabajo de investigación es determinar bajo qué condiciones la degradación enzimática es favorable. Con esta caracterización se hará una comparación estructural y morfológica para determinar si se logró o no daño estructural en las paredes o internamente.

6.3.- Análisis de MWCNTs por caracterización RAMAN.

Se procedió a caracterizar por RAMAN, esta caracterización permite estudiar el grado de defectos y de cristalinidad que tiene el material. En esta caracterización 2 bandas son de suma importancia en los análisis de MWCNTs.

La banda más prominente G' (algunas veces llamada 2D) de la región de segundo orden se encuentra cerca de los $2660/2700\text{cm}^{-1}$, es causada por el proceso de la doble resonancia de fonones inelásticos difractados y es así de intensa porque corresponde a grafeno pristino. Esta banda es indicadora de ausencia de defectos en el material ya que para su desdoblamiento es necesario que esté libre de defectos la red donde difracta el material, además, ha sido observada en materiales grafíticos de alta calidad [66]. Mientras que las líneas D y D' están relacionadas con los defectos, tienen diferentes orígenes. En el caso de $D+D'$ se produce cuando se altera el apilamiento regular de capa de grafito debido a la presencia de un defecto; mientras que D está relacionada con desorden en el parámetro de red o por los efectos de tamaño de partículas finitas [66].

Varios investigadores hablan sobre la relación de las bandas características del espectro Raman para los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno, debido a que esta espectroscopía ha sido usada para estudiar los defectos en los materiales de carbón sp^2 [66].

En el año 2008 Bulusheva et al. [74] encontraron que la banda G es sensible al dopaje tipo n en el caso del nitrógeno. Este trabajo dice que el corrimiento de la banda G' y la relación IG'/IG están vinculados con el efecto del nitrógeno en los N-CNTs. Esto debido a que estas dos bandas, aunque tengan diferente origen, ninguna de ellas está directamente relacionada con los defectos estructurales. Esto a su vez significa que su corrimiento puede ser atribuido al cambio de su configuración electrónica motivado por el dopaje de los nanotubos de pared simple o multicapa [66].

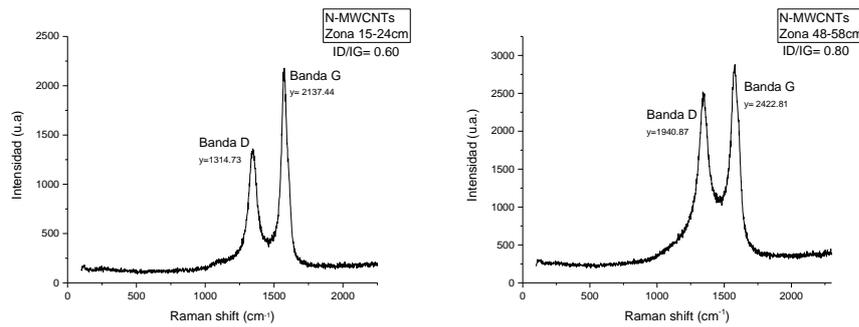


Figura 40. Gráficos de RAMAN de N-MWCNTs sin tratamiento oxidativo, esto indica que tiene alto grado de imperfecciones. Podemos observar que en la zona 1 para esta síntesis, los NTCs presentan menor grado de defectos en comparación con la zona 2 de la misma síntesis. La banda G nos indica la cristalinidad de los NTCs, como ya se mencionó anteriormente este tipo de material en especial los multicapa no presentan altos niveles de cristalización ya que el acomodo de las capas no es del todo simétrico.

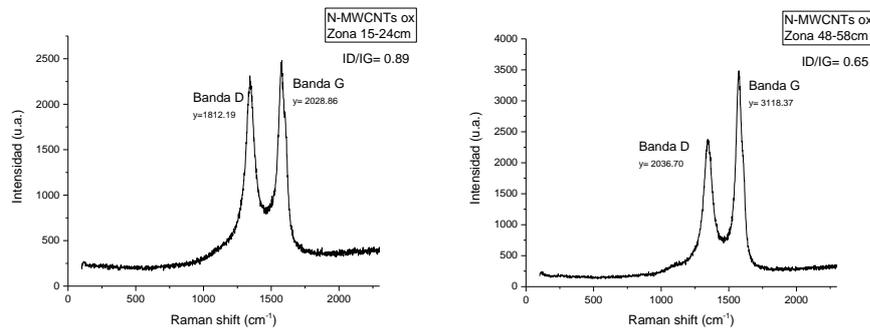


Figura 41. La misma muestra de las gráficas anteriores pero ahora con tratamiento oxidativo con ácidos a temperatura ambiente. Podemos observar que la zona 1 la banda D y G están relativamente al mismo nivel de intensidad. Es de suma importancia recordar que con el proceso de oxidación química se añaden grupos carboxilos, lo cual nos hace deducir que la banda D tuvo crecimiento como consecuencia de la funcionalización de estos grupos. En la zona 2 la banda D al igual que la banda G tuvieron un ligero incremento.

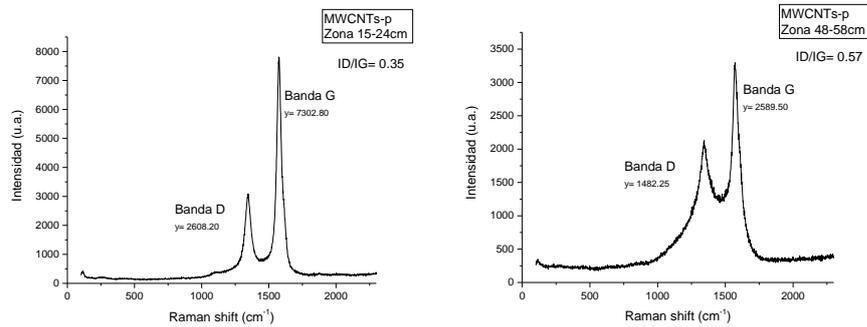


Figura 42. Gráficos RAMAN de las síntesis de MWCNTs-p sin tratamiento oxidativo. Tomando en cuenta las síntesis anteriores dopados con nitrógeno la zona 1 tiene una banda D de menos intensidad que la banda G, ese comportamiento se presenta de igual manera en esta síntesis de NTCs prístinos.

En la zona 2, la banda D se aprecia más ancha pero con una intensidad menor, incluso en comparación con los CNTs dopados con átomos de nitrógeno.

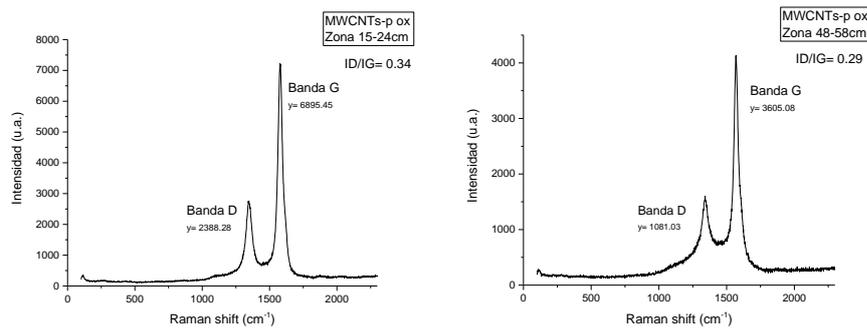


Figura 43. La muestra de MWCNTs-p ahora con la funcionalización química con ácidos, arroja en ambas zonas banda D reducida en comparación con la banda G. El cociente de dividir la intensidad de la banda D entre la intensidad de la banda G, este nos arroja valores mucho menores que 1, esto nos indica que los nanotubos de carbono analizados son de gran pureza.

6.4.- Análisis de MWCNTs por caracterización de RAYOS X.

Otra de las caracterizaciones básicas de este nanomaterial es la de RAYOS X, esta técnica nos sirve para determinar la composición de la muestra analizada.

La caracterización difracción de rayos X por el método de polvos, se analizaron las muestras correspondientes a los distintos segmentos de las diferentes síntesis descritas anteriormente, (zona 1 y 2).

DRX es una de las técnicas más usadas para la determinación de fases cristalinas que pueden presentar los nanotubos de carbono. DRX es un método no destructivo y una técnica eficaz para caracterización estructural de muestras. Para la obtención de los difractogramas se usó un Difractómetro de Rayos X, *SmartLab RIGAKU* en un barrido de 10° a 90° [41]. La difracción de rayos X es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. La difracción de rayos X se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia (se mantiene la longitud de onda de la radiación) y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio [76].

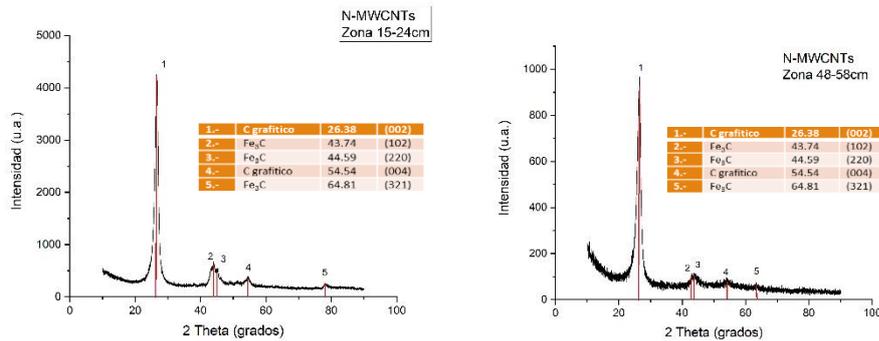


Figura 44. Caracterización RAYOS X de N-MWCNTs zona 1 y 2.

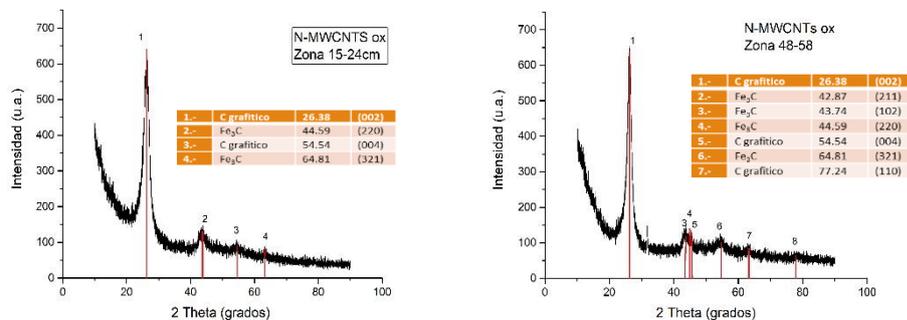


Figura 45. Caracterización RAYOS X de N-MWCNTs-ox zona 1 y 2.

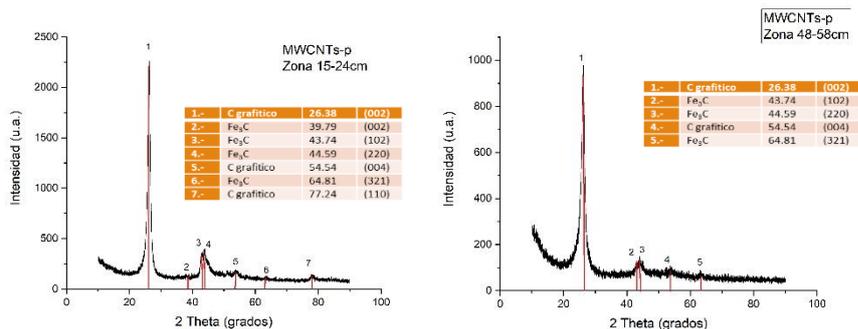


Figura 46. Caracterización por RAYOS X de MWCNT-p de las zona 1 y 2.

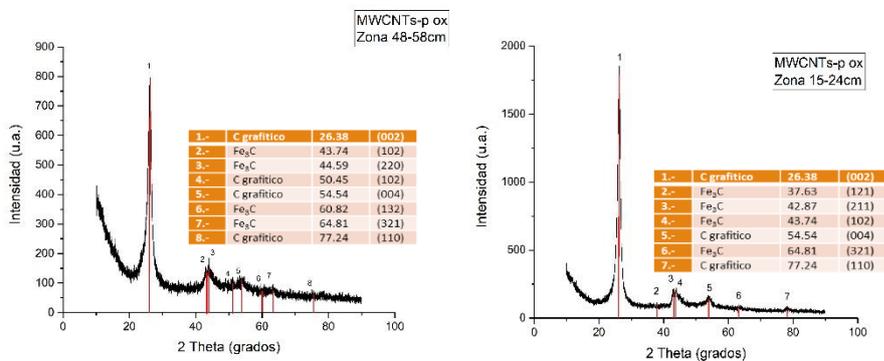


Figura 47. Carcterización RAYOS X de MWCNTs-p de zona 1 y 2.

6.5.- Análisis de MWCNTs por técnica de TGA.

El análisis termogravimétrico (TGA) se usa para caracterizar las propiedades físicas y químicas de los materiales, en función de la temperatura en una atmósfera controlada de forma precisa. Este método proporciona información valiosa para el control de calidad, el desarrollo y la investigación. También el análisis de TGA nos ayuda a determinar a qué temperaturas comienza a desintegrarse y no conserva las propiedades de su naturaleza. Por lo general los NTCs comienzan a perder sus propiedades básicas y a desintegrarse a 500°C, es aquí donde observamos un decrecimiento.

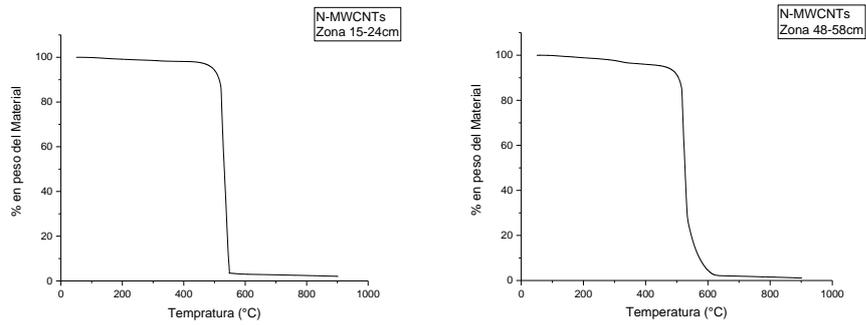


Figura 48. Caracterización TGA de N-MWCNTs zona 1 y 2. La imagen de la izquierda es la zona 1, la temperatura de descomposición para esta tipo de material es de aproximadamente 550°C y la zona 2 su decaimiento es 580°C.

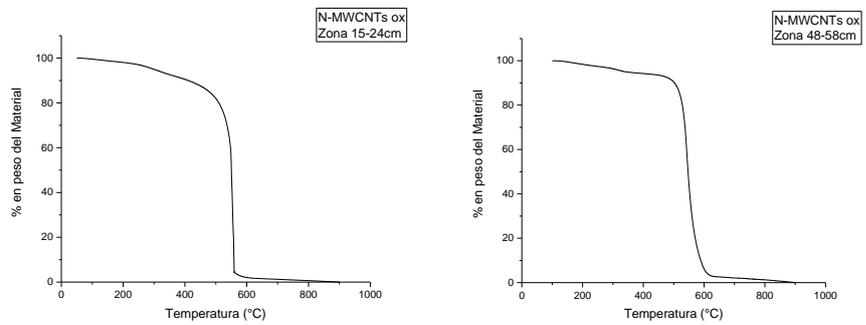


Figura 49. Caracterización TGA de N-MWCNTs-ox zona 1 y 2. La imagen de la izquierda es la zona 1, la temperatura de descomposición para esta tipo de material es de aproximadamente 580°C y la zona 2 su decaimiento es 590°C.

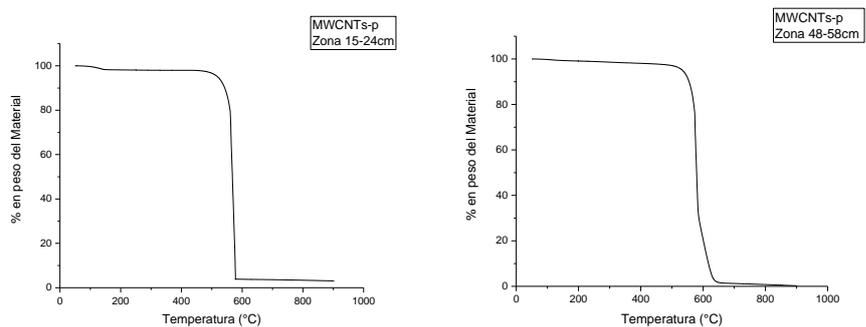


Figura 50. Caracterización TGA de MWCNTs-p zona 1 y 2. La imagen de la izquierda es la zona 1, la temperatura de descomposición para esta tipo de material es de aproximadamente 590°C y la zona 2 su decaimiento es 610°C.

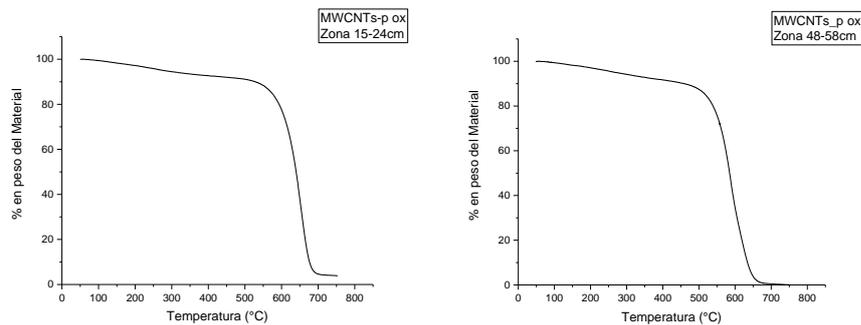


Figura 51. Caracterización TGA de MWCNTs-p-ox zona 1 y 2. La imagen de la izquierda es la zona 1, la temperatura de descomposición para esta tipo de material es de aproximadamente 680°C y la zona 2 su decaimiento es 630°C.

6.6.- Análisis de MWCNTs por XPS.

Se ha reportado en la literatura que la toxicidad de los MWCNTs puede verse reducida si estos se funcionalizan y/o dopan, para reducir un poco los niveles de toxicidad se doparon con átomos de nitrógeno.

La investigación elaborada por el M. en C. Roque Sánchez-Salas, muestra la distribución, cantidad y tipo de dopaje respectivamente a la zona del horno.

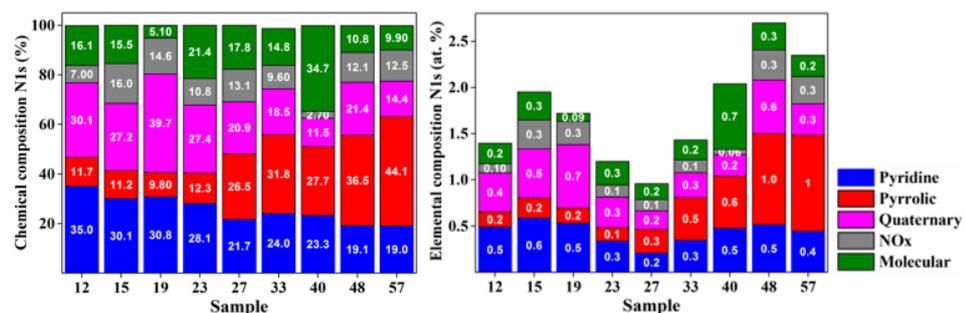


Figura 52. Izquierda) porcentajes de las diferentes especies de enlace dentro de la composición química del N1s, derecha) porcentajes totales de las diferentes especies de enlace en la composición elemental del nitrógeno [66].

Tomando en cuenta la distribución de los tipos de dopaje, es que se tomaron las 2 zonas del tubo de cuarzo (sustrato) para los experimentos biológicos y así determinar qué tipo de dopaje es más conveniente para una degradación enzimática rápida y eficaz. La zona 1 presenta en su mayoría dopaje tipo piridinico mientras que la zona 2 dopajes pirrolico.

Tenemos también altos porcentajes de dopaje cuaternario, para el análisis teórico se analizaron los 3 casos.

La composición química del nitrógeno 1s tipo piridinico ronda ~ 20 – 35 %, por ello, las variaciones del contenido de este tipo de enlace rondan aproximadamente el 40 % dependiendo de la posición donde se encuentre la muestra. En las primeras posiciones de las muestras tiene valores mayores, pero conforme se aleja en el reactor disminuye la incorporación depende de la posición, ello concuerda con la temperatura de pirólisis de la bencilamina que ronda los 700 °C. Hacia el final del horno, llegan moléculas en menos proporción que no se hayan pirolizado y depositado previamente. En contraste, la tendencia de la composición química del nitrógeno piridinico respecto a su total contribución en la composición elemental del nitrógeno dentro del sistema, se observa, que la proporción difiere hasta ~ 3 veces más y tiene comportamiento similar a la temperatura del horno, además de la posición, las temperaturas por encima de los 850 °C provocan que disminuya la incorporación de nitrógeno tipo piridinico dentro del reactor [66].

En el caso del nitrógeno pirrólico tiene una composición química ~ 11 – 44 %, ésto significa una variación hasta de ~ 75 % dependiendo de la posición de las muestras a lo largo del reactor. En los primeros centímetros del reactor la proporción tipo pirrólico es menor, pero a medida que se adentra tiende a incrementarse hasta llegar a las últimas posiciones dentro del reactor donde se da la mayor proporción; además, cuando se compara la composición química con respecto a la composición elemental del nitrógeno en las últimas posiciones al interior del reactor se nota una tendencia a aumentar hasta ~ 5 veces dependiendo de la posición, ello significa que la proporción de incorporación de este tipo de dopaje depende directamente de la posición dentro del reactor, pues tiene la misma tendencia en composición elemental y química [66].

Después encontramos el nitrógeno tipo cuaternario o sustitucional con composición química entre ~ 14 – 35 %, porcentaje que representa una variación hasta en un ~ 60 % dependiendo de la posición de las muestras al interior del reactor. En los primeros centímetros del reactor la proporción de enlace tipo sustitucional es mayor en comparación con los últimos centímetros, en ellos la proporción de incorporación es menor a excepción de la posición del centímetro 48, donde parece que hay nuevamente un incremento de incorporación de dopaje sustitucional. Cuando se compara la porción del nitrógeno sustitucional con respecto a la contribución de composición elemental del nitrógeno, se observan variaciones hasta ~ 3 veces más en la incorporación del dopaje sustitucional en las primeras posiciones dentro del reactor, allí se encuentra la mayor proporcionalidad de incorporación con respecto a las últimas muestras contenidas al interior del reactor [66].

Las muestras fueron almacenadas a vacío para evitar que estas se contaminaran con residuos y/o polvo.

6.7.- Incubación Enzimática.

Una vez que las muestras se analizaron una por una, procedimos a la incubación enzimática y así poder estudiar cuál de estas muestras a diferentes niveles de dopaje, oxidados y no oxidados, prístinos y con nitrógeno eran más favorables para la degradación enzimática.

Se hicieron dos repeticiones de este experimento para comprobar que no fuera la degradación por algún agente externo, si no meramente de la acción enzimática.

Las 8 muestras de los MWCNTs se sonicaron por 1 hora en PBS (1:2) esto con la finalidad de regular el pH del material, tener una mezcla homogénea y no provocar alteraciones en la actividad enzimática. Las muestras sin oxidación no presentaron dispersión en este medio, por lo tanto no son aptas para tal experimento, así que solo se trabajó con las 4 muestras que sí tienen tratamiento oxidativo.

Debido a que a simple vista las mezclas de MWCNTs con PBS se observaban altamente concentradas, se realizó otra dilución 1:2 con PBS (**Figura 53**).

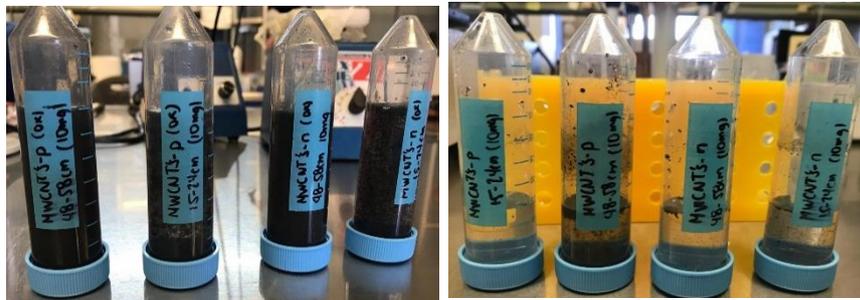


Figura 53. La imagen de la izquierda se observa la dispersión de los MWCNTs prístinos y dopados ambos con tratamiento oxidativo a una concentración 1:2, la mezcla se observa altamente concentrada por lo que decidimos hacer otra dilución 1:2 lo cual resulta que la mezcla incubada con la enzima presentaba una concentración final de 1:4 en PBS.

Para que la enzima tenga las condiciones óptimas y tenga una mayor eficacia, en la naturaleza como tal es necesario un complejo denominado “enzima-sustrato”, es decir, aquella mancuerna que por sí sola no funciona. El sustrato es aquella molécula biológica que mantiene activa a la enzima y provoca en ella una mejor actividad. En el caso de las peroxidasas, la actividad base de ellas es la oxidación de diferentes agentes, por lo que el sustrato para ellas por lo general son los peróxidos, de ahí su nombre. Para la mieloperoxidasa se implementa el peróxido de hidrogeno a una concentración de 80uM.

Es bien sabido que el peróxido de hidrogeno es implementado para diversas actividades diarias, teñirse el cabello por ejemplo, no es algo oculto que este a grandes cantidades resulta toxico para los seres vivos, pero a concentraciones clave, este resulta ser de gran relevancia en los humanos.

Debido a que la enzima se encontraba liofilizada esta se preparó a una concentración de 5U/ml de agua desionizada fría (2°C). La mieloperoxidasa (h-MPO) se preparó con la solución de H₂O₂ para formar el complejo antes mencionado a 60x10U (1 Katal; 1U= u/mg o u/ml).

Las muestras se etiquetaron de la siguiente manera; recordemos que el experimento se repitió dos veces, llamando a los experimentos como análisis 1 y análisis 2.

MWCNTs-p (ox) zona 1	MWCNTs-p (ox) zona 2
1 ... hora 0	1.1 ... hora 0
2 ... 15 minutos	2.1 ... 15 minutos
3 ... 30 minutos	3.1 ... 30 minutos
4 ... 1 hora	4.1 ... 1 hora
5 ... 6 horas	5.1 ... 6 horas
N-MWCNTs (ox) zona 1	N-MWCNTs (ox) zona 2
1.2 ... hora 0	1.3 ... hora 0
2.2 ... 15 minutos	2.3 ... 15 minutos
3.2 ... 30 minutos	3.3 ... 30 minutos
4.2 ... 1 hora	4.3 ... 1 hora
5.2 ... 6 horas	5.3 ... 6 horas

Tabla 6. Muestras analizadas y tiempos definidos para la interacción enzimática.

Y tres controles:

- Control 1: NTCs con PBS.
- Control 2: NTCs con H₂O₂.
- Control 3: NTCs con h-MPO.

Las muestras fueron retiradas a los tiempos establecidos, se tomo como hora maxima 6 horas, debido a que la mieloperoxidasa en la naturaleza es su tiempo de vida maximo. Una ves transcurridos cada uno de los tiempos, se colocaron a baño mario de 100°C, esto para desnaturalizar a la enzima y parar su actividad enzimatica en el tiempo requerido. Posteriormnete a esto, se dieron tres lavados con isopropanol.

La reduccion de material fue significativa y obcervable a simple vista. De las cuatro muestras incubadas con enzima, se aprecia mayor degradacion en aquellas dos donde los nanotubos estan dopados con nitrogeno, en especial de la zona 1, donde el dopaje es piridinico y a un tiempo de 6 horas (**Figura 54**).

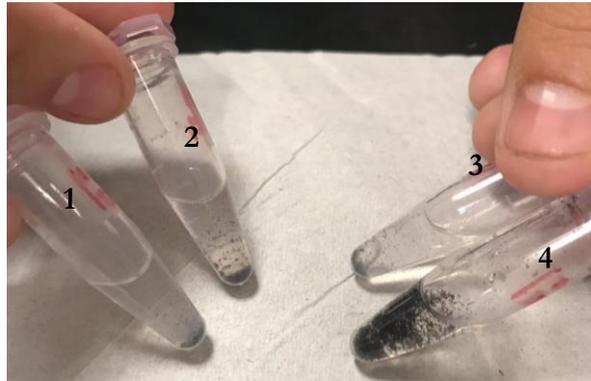


Figura 54. En la imagen se puede observar a simple vista que el eppendorf 1 (N-MWCNTs-ox, zona 1) con menor cantidad de material en comparación del eppendorf 4 (MWCNTs-p-ox zona 2). También se observa reducción de material en los otros 2 eppendorf (Eppendorf 2; N-MWCNTs-ox, zona 2 y Eppendorf 3; MWCNTs-p-ox, zona 1).

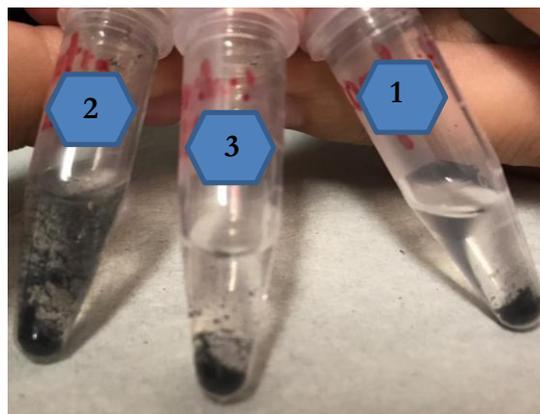


Figura 55. Controles del incubamiento MWCNTs y enzima. Control 1 es aquel que tiene una mezcla entre MWCNTs y PBS. Control 2, contiene MWCNTs y H_2O_2 . Mientras que el Control 3, contiene MWCNTs y h-MPO.

Los N-MWCNTs zona 1 a 6 horas de interacción enzimática favoreció la degradación de estos, en las imágenes anteriores se aprecia a simple vista que el nanomaterial con estas características redujo su cantidad en masa considerablemente. Es de suma importancia recordar que en esta zona (15-24cm) se encuentra en el área central del horno uno y tomando en cuenta la caracterización por XPS, esta zona tiene mayor concentración de nitrógeno dopado con estructura piridinica.

6.8.- Análisis de MWCNTs-ox con incubación enzimática por Microscopia de Barrido (SEM).

La caracterización SEM pos tratamiento enzimático solo se implementó a aquellas muestras en las cuales se observó mayor degradación enzimática y/o reducción considerable en cantidad de masa, N-MWCNTs zona 1 a diferentes tiempos: 15 y 30 minutos y por ultimo 6 horas. A esta muestra pos tratamiento enzimático la llamaremos *residuos pos tratamiento enzimático*.

Las imágenes muestran estructuras que, en comparación con los NTCs se aprecian de gran tamaño. Estas partículas tienen altos niveles de KCl (cloruro de potasio).

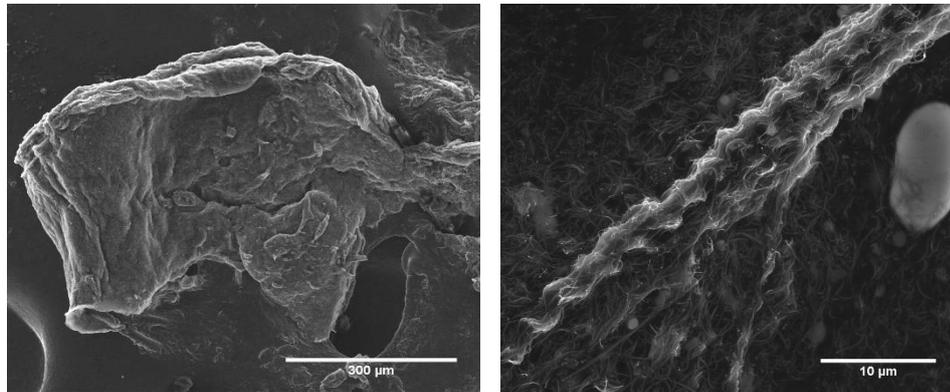


Figura 56. Imágenes de caracterización SEM de N-MWCNTs zona 1 a 15 minutos de tratamiento enzimático. Se observa en la imagen de la izquierda una masa de aproximadamente 300µm, es una masa de material biológico que provoco un conglomerado de NTCs.

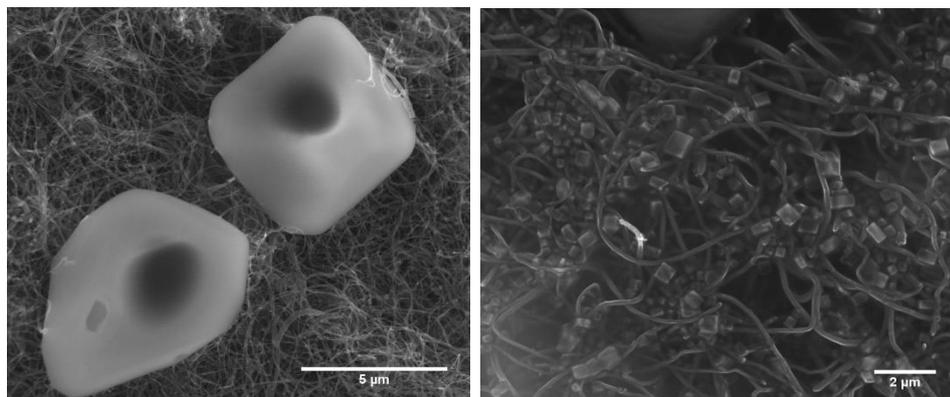


Figura 57. A 30 minutos de interacción enzimática, estos son los residuos pos tratamiento enzimático. En la imagen de la izquierda se observan 2 partículas de KCl. En la imagen de la derecha los cubos que se observan son las partículas ya mencionadas.

Las partículas presente se caracterizaron por EDS (**Figura 58**) para determinar su composición.

Se observa que el principal compuesto de estas, es el Cloruro de Potasio (KCl) y una aleación de Na y K (NaK) estos compuestos podría desarrollarse de la interacción enzimática. Es bien conocido que moléculas biológicas tienen como componentes principales Calcio, Cloro, Sodio, Potasio, Hierro, Hidrogeno, Carbono, Nitrógeno entre otros.

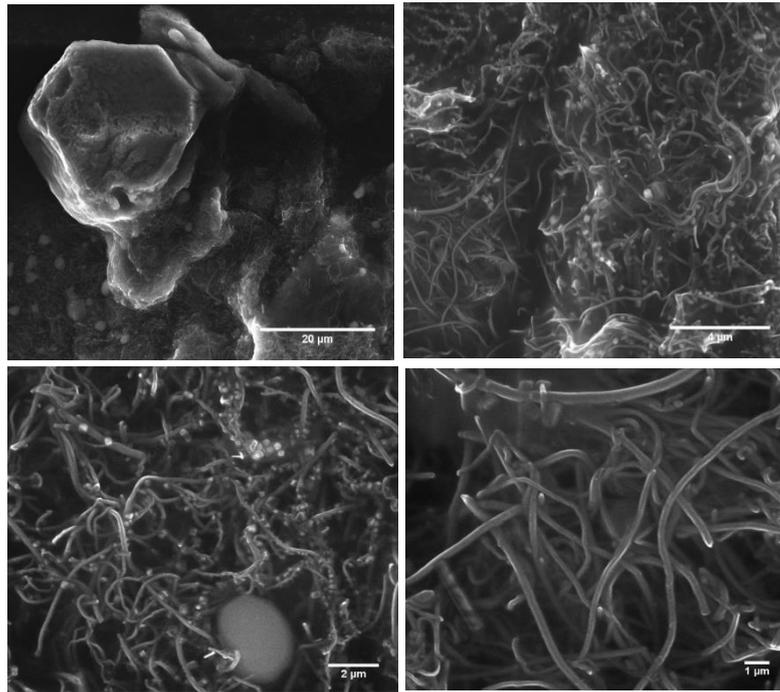


Figura 58. Imágenes de Microscopia SEM de residuos pos tratamiento enzimático a 6 horas de interacción. Se observa una masa que conglera a los residuos, mientras en las imágenes siguientes también se observa la presencia de las partículas de KCl y NaK. Estas partículas, a simple vista se aprecian que están embebidas en la masa al igual que los residuos.

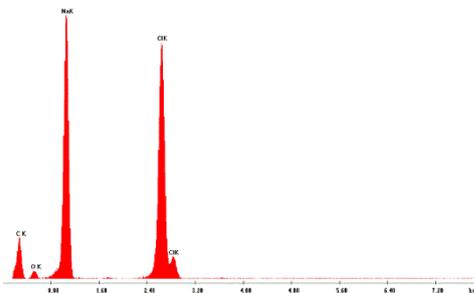


Figura 59. EDS de las partículas que se encuentran en la masa formando conglomerados con los residuos pos tratamiento enzimático. Los principales compuestos de estas partículas son NaK y KCl.

6.9.- Análisis de MWCNTs-ox con incubación enzimática por Microscopía de Transmisión de electrones (TEM).

Los diámetros de los residuos pos tratamiento enzimático se redujeron de manera considerable, tenemos diámetros de 15-30nm, en comparación con los N-MWCNTs zona 1 que tenían diámetros de 80-90nm.

La morfología de los residuos se ve alterada, las capas de los MWCNTs ya no son apreciables, el bambú (hueco interior) desapareció en su mayoría.

Por lo tanto la enzima h-MPO favorece el desgaste morfológico y degradación de capas gráficas de los MWCNTs.

Las imágenes obtenidas con caracterización de trasmisión de electrones, podemos apreciar la estructura desgastada de los residuos, estos a su vez son muy volátiles y ligeros.

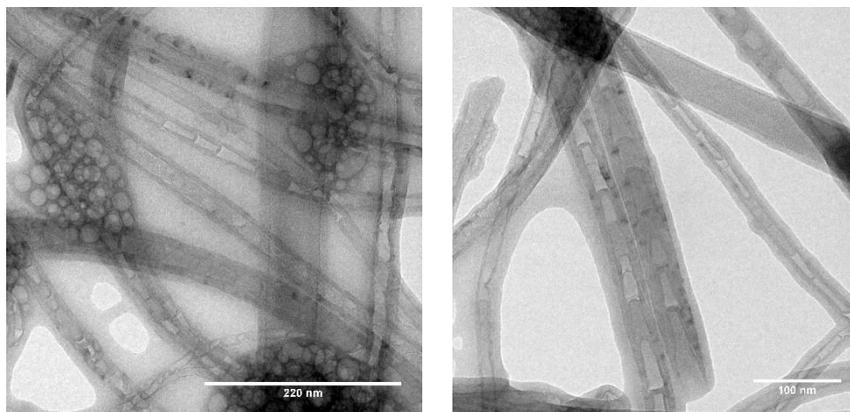


Figura 60. Imágenes de TEM de los residuos pos tratamiento enzimático a un tiempo de 0 horas. La aparición de partículas de KCl ya se hace presente, lo cual podría indicar que la degradación comenzaba a originarse o que la interacción enzima-N-MWCNTs en inmediata. La imagen de la derecha muestra residuos pos tratamiento enzimático aun con estructura de N-MWCNTs y hueco tipo bambú. Los diámetros aún no se ven reducidos.

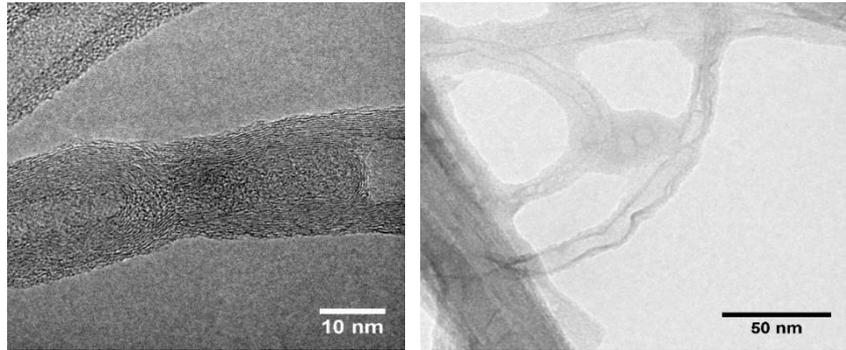


Figura 61. Imágenes TEM, de residuos pos tratamiento enzimático a 1 hora de interacción. En ambas imágenes se aprecia la deformación morfológica y estructural de nanomateriales. Las capas se aprecian dañadas y con diámetros claramente reducidos (15-20nm), zonas comprimidas y el hueco tipo bambú desaparecido en su mayoría.

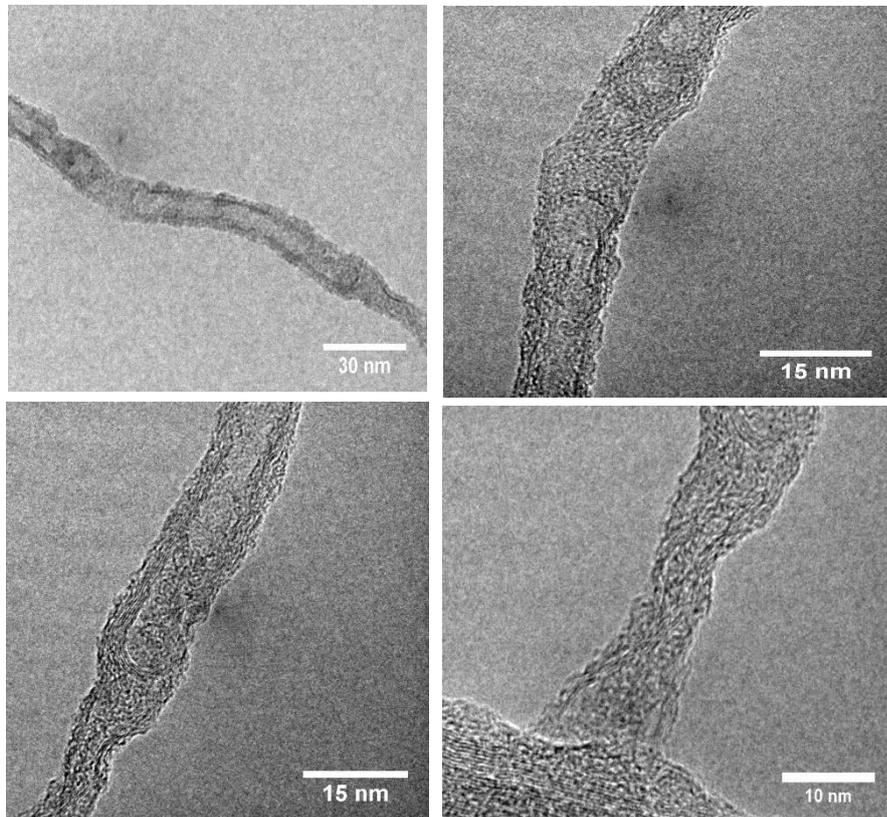


Figura 62. Imágenes TEM de residuos pos tratamiento enzimático a 6 horas de interacción. Se aprecia los diámetros reducidos (10-15nm), capas gráficas totalmente desalineadas, no se aprecie el hueco tipo bambú. Podemos observar morfología total mente dañada.

6.10.- Análisis de MWCNTs-ox con incubación enzimática por RAMAN.

El espectro RAMAN nos arroja un estimado de los niveles de defectos y cristalización que tiene la muestra. Las muestras pos tratamiento enzimático arrojan la banda D con mayor intensidad en comparación con el espectro pre tratamiento enzimático, mientras que la banda G disminuye su intensidad. Esto nos indica que los defectos aumentaron y la cristalinidad del material disminuyo, esto podría deberse a que la enzima rompe enlaces y destruye paredes gráficas.

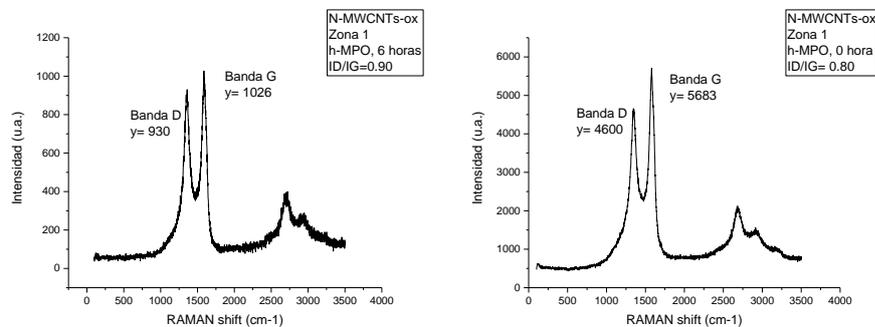


Figura 63. El espectro RAMAN de las muestras N-MWCNTs-ox presenta banda D con alta intensidad después de 6 horas (imagen de la izquierda) de incubación enzimática, arrojando un cociente de ID/IG= 0.90, lo cual indica que este material tiene altos grados de defectos e imperfecciones. Mientras que en comparación con la hora 0 de incubación enzimática, el cociente queda de 0.80 (imagen de la derecha), menor a la hora 6, pero no es un valor aceptable para decir que el material este sin defectos, este valor es alto. Podemos observar entre las dos bandas (D y G) la diferencia de intensidades es mínima.

6.11.- Ensayo Citotóxico.

Entre los métodos que más se utilizan para evaluar la viabilidad celular destacan técnicas que permiten identificar las alteraciones de la membrana celular por medio de tinción (MTT) y del estado metabólico de las células. El tinte implementado para este ensayo es el Azul de Tripano, las células son impermeables a este siempre y cuando no tengan alteraciones. Cuando las células se encuentran expuestas a estrés o incluso agentes externos que alteren la membrana celular, la membrana cambia

sus propiedades y se vuelve permeable a este tinte. Cuando observamos en el microscopio óptico células teñidas de azul es indicativo de muerte celular.

Las células mononucleares son células del sistema inmune, este es el encargado de responder a agentes externos y estrés del cuerpo humano. Esta actividad es proporcionada ya que dentro de las células se encuentran enzimas encargadas de esta respuesta y una de las más importantes es la h-MPO. Por tal motivo se eligió este tipo de células, ya que contienen la enzima con la cual se realiza esta investigación y determinar si su actividad persiste en condiciones in-vitro.

Para el ensayo citotóxico primeramente realizamos la extracción de células mononucleares de sangre humana, (véase protocolo en el Capítulo 5: Metodología Experimental). La muestra que se implementó para el incubación con las células mononucleares, fue aquella que presento mayor degradación enzimática (N-MWCNTs-ox zona 1).

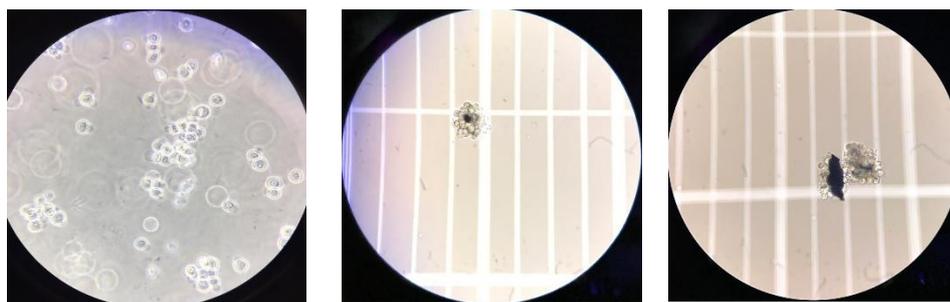


Figura 64. En la imagen de la izquierda se observa células mononucleares sanas dando un total de 6,625,000 células /ml. La imagen del centro (0.6 $\mu\text{m}/\text{ml}$) y la de la derecha (6 $\mu\text{m}/\text{ml}$) fueron tomadas transcurridas 6 horas de interacción N-MWCNTs-ox zona 1 con células mononucleares.

Las células sanguíneas extraídas al ser contabilizadas arrojaron una cantidad de 6,625,000 células /ml de medio. Las células fueron incubadas para analizar la interacción de ellas con los NTCs. La primera interacción analizada fue a la hora 6 a diferentes concentraciones (0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 6 $\mu\text{m}/\text{ml}$) y el segundo análisis se contabilizo a 24 horas de interacción, igual a las condiciones ya mencionadas (**Tabla 7**).

A simple vista, se puede determinar que este material resulta ser toxico a células mononucleares ya que se observa claramente una disminución en la cantidad de células. En ambas imágenes pos ensayo citotóxico se aprecia conglomeraciones

celulares e incluso manchas negras, esto podría deberse a la internalización de los MWCNTs.

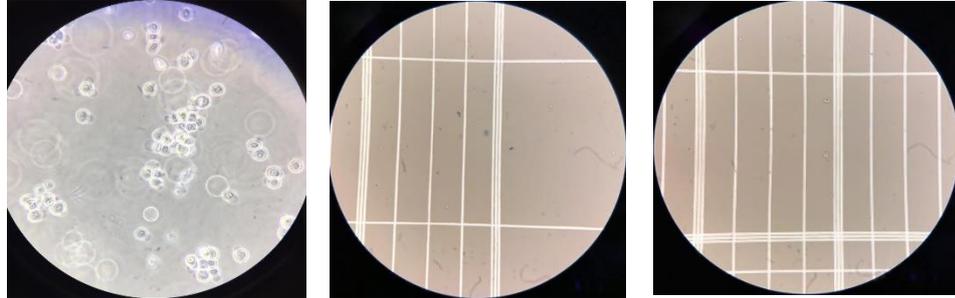


Figura 65. En la imagen de la izquierda se observa células mononucleares sanas dando un total de 6,625,000 células /ml. La imagen del centro (0.6 $\mu\text{m}/\text{ml}$) y la de la derecha (6 $\mu\text{m}/\text{ml}$) fueron tomadas transcurridas 24 horas de interacción N-MWCNTs-ox zona 1 con células mononucleares.

Se observa una disminución sumamente alta como se registra en la **tabla 7** de conteo.

Concentración Vs Tiempo	6 horas	24 horas
0.6 $\mu\text{m}/\text{ml}$	<ul style="list-style-type: none"> 600, 000 cell/ml vivas 300, 000 cell/ml muertas 	<ul style="list-style-type: none"> 150, 000 cell/ml vivas. 400, 000 cell/ml muertas.
6 $\mu\text{m}/\text{ml}$	<ul style="list-style-type: none"> 400, 000 cell/ml vivas 225, 000 cell/ml muertas 	<ul style="list-style-type: none"> 0 cell/ml vivas 125, 000 cell/ml muertas.
Control	<ul style="list-style-type: none"> 3, 625, 000 cell/ml vivas 850, 000 cell/ml muertas 	<ul style="list-style-type: none"> 775, 000 cell/ml vivas 375, 000 cell/ml muertas.

Tabla 7. Conteo celular a las concentraciones y tiempos establecidos.

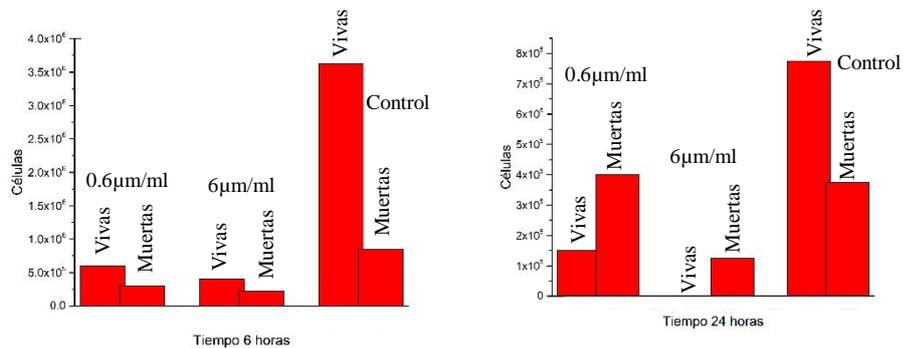


Figura 66. Graficas de la viabilidad celular. A las 24 horas de interacción celular con los N-MWCNTs es donde se aprecia incremento de células muertas. Las células al tener mayor tiempo de exposición con el nanomaterial presentan niveles de estrés altos e incluso la muerte. Tomando en cuenta las concentraciones analizadas a la hora 24, la concentración de 6 $\mu\text{m}/\text{ml}$ no se pudieron observar células vivas. Podemos concluir que la concentración de NTCs y el tiempo de interacción con las células, son factores importantes en la citotoxicidad.

6.12.- Estudio Teórico (Quantum Espresso).

Para comprender el mecanismo de degradación enzimática de los N-MWCNTs y MWCNTs se estudiaron diversos escenarios. La enzima al comenzar su actividad degradativa desprende 2 moléculas reactivas oxidativas: ClO^- y HClO . Estas son las encargadas de la degradación por medio de la mieloperoxidasa.

A continuación se presentaran diversos escenarios sobre una posible explicación del mecanismo de degradación enzimática a los MWCNTs.

Estudiamos los MWCNTs son diferentes tipos de dopaje: piridinico, pirrolico y quaternario (**Figura 67**).

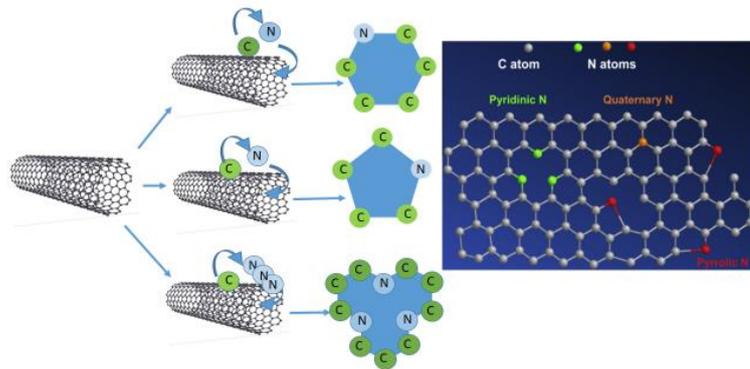


Figura 67. Tipos de dopaje analizados por el programa Quantum Espresso.

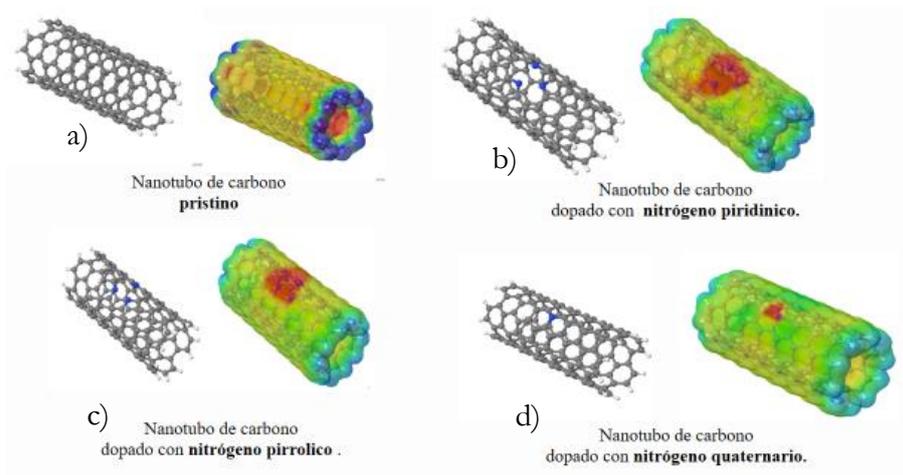


Figura 68. Los cambios en la densidad de cargas que adoptan los NTCs cuando estos son dopados se muestran en la imagen, a) NTCs son dopaje (pristino) no presenta cambio en la densidad de carga, b) NTCs con dopaje quaternario si hay alteraciones en la carga del sistema, se muestra de color rojizo la zona del dopaje con carga negativa, c) NTCs dopados con nitrógeno piridinico, la zona

rojiza muestra carga negativa esta, a simple vista se observa más pequeña en comparación del dopaje quaternario y d) NTCs con nitrógeno pirrolico la zona con cambio de carga (negativa) es de menor dimensión que los 2 dopajes anteriores.

Cuando los MWCNTs son dopados la densidad de carga en el área donde está el dopaje se ve alterada. Es decir, presenta cargas negativas y resulta ser así con mayor capacidad de atracción para átomos externos y/o moléculas.

La interacción de las moléculas activas con la superficie de los NTCs se muestra en las siguientes figuras. Las especies reactivas (HClO y ClO^-) se estudiaron con interacción molecular e interacción disociativa. En la **figura 69** se muestra la interacción molecular de las especies, no se aprecia alguna deformación estructural en los NTCs, mientras que la interacción disociativa, provoca deformaciones en los diámetros de los NTCs.

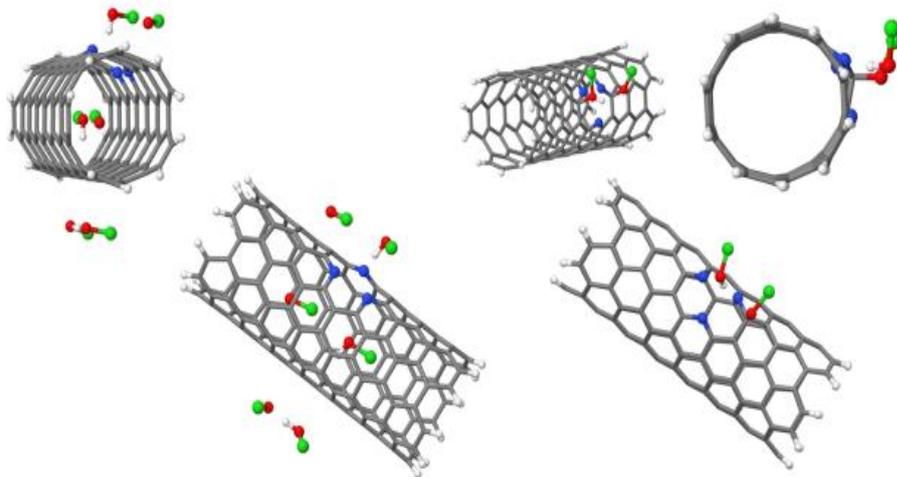


Figura 69. Interacción entre las especies reactivas ácido hipocloroso (HClO) y el ion hipoclorito o también llamado monoxoclorato (ClO^-) con la superficie de los NTCs. La especie reactiva que mejor se ancla a la estructura del NTCs es la ClO^- ya que cuando el ácido hipocloroso entra en contacto este se desprende ya que sus enlaces con los átomos de carbono y/o nitrógeno son demasiado débiles, el átomo de Oxígeno no se encuentra libre si no que forma enlace con el Hidrogeno lo que no favorece en anclaje con la nanoestructura. En la imagen de la izquierda la interacción de estas especies reactivas es tipo molecular y en la imagen de la derecha se dice que es disociativa.

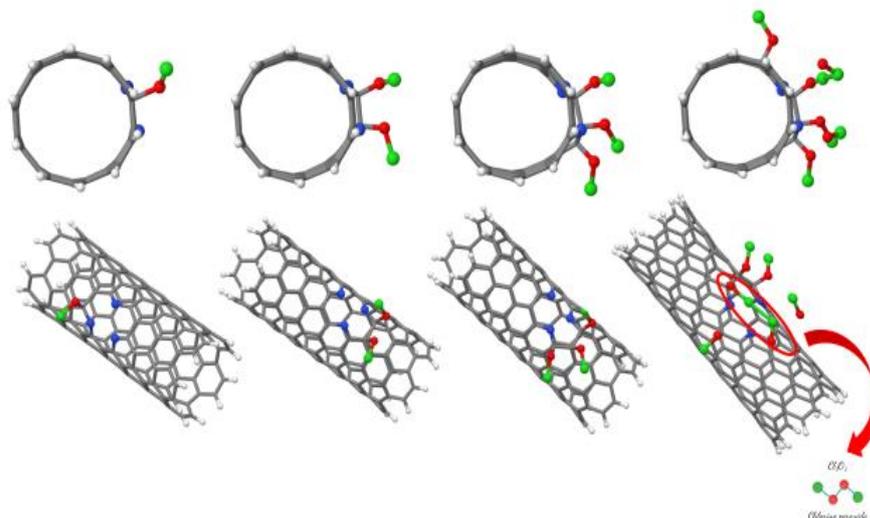


Figura 70. La especie reactiva con los estudios teóricos moleculares que arroja ser la responsable del rompimiento de los enlaces, ClO^- se estudió en diferentes escenarios. En la primera interacción a) los nanotubos de carbono con dopaje piridinico interactúan con una sola molécula de monoxoclorato y no se apreció daño aparente en la estructura del mismo, b) se colocan 2 especies reactivas de monoxoclorato en la superficie del NTC con dopaje piridinico y con similitud en la primera interacción, no presenta daño, c) 3 moléculas de ClO^- y no hay daño aparente estructural y d) se colocan 6 especies de ClO^- las cuales no provocan alteraciones estructurales ni rompimiento de enlaces, pero se observa un comportamiento peculiar al interactuar de manera molecular entre ellas, otra nueva especie surge denominada peróxido de cloro.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se colocaron en la superficie del material 2 especies reactivas monoxoclorato juntas, en ambos extremos y separadas en la misma área, no se observaron deformaciones en la estructura por lo cual pudimos concluir que si esta especie permanece de manera molecular no altera la estructura del nanomaterial. Por lo que procedimos a colocar ClO^- de manera disociativa y observar el comportamiento de esta (**Figura 71**).

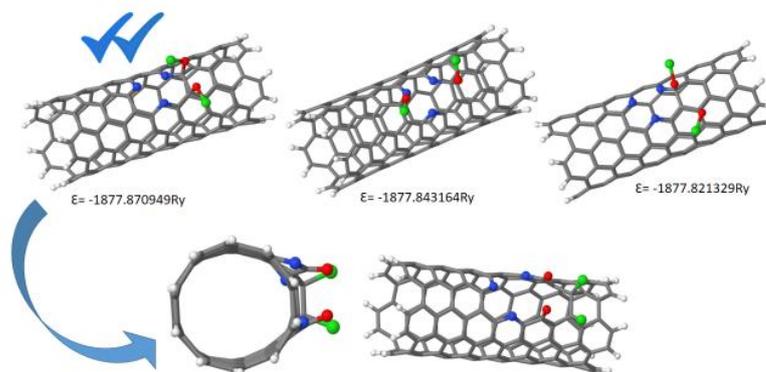


Figura 71. Interacción molecular de 2 especies reactivas de ClO⁻. a) Interacción de 2ClO⁻ juntos cerca de una zona con dopaje piridinico, presenta energía con valores de -1877.870949Ry, b) 2 monoxloratos ambos en extremos de la zona de dopaje con nitrógeno tipo piridinico, no presenta alteraciones estructurales, esta interacción tiene una energía de -18877.843164Ry, c) en la interacción donde los 2 monoxloratos están separados de igual manera no hay deformación estructural. Esto nos permite concluir que mientras las especies reactivas permanezcan de manera molecular no permitirá rompiendo de enlaces ni deformaciones estructurales. En la imagen d) las especies fueron estudiadas de manera disociativa y como se observa, si hay rompimiento de enlaces y deformación del diámetro de los NTCs, no es del todo circular si no que presenta una especie de elipse.

Con estos estudios de las interacciones de esta especie reactiva con la estructura nanometrica llegamos a la conclusión que el ClO⁻ favorece el rompimiento de enlaces y deformaciones estructurales en los NTC de manera disociativa.

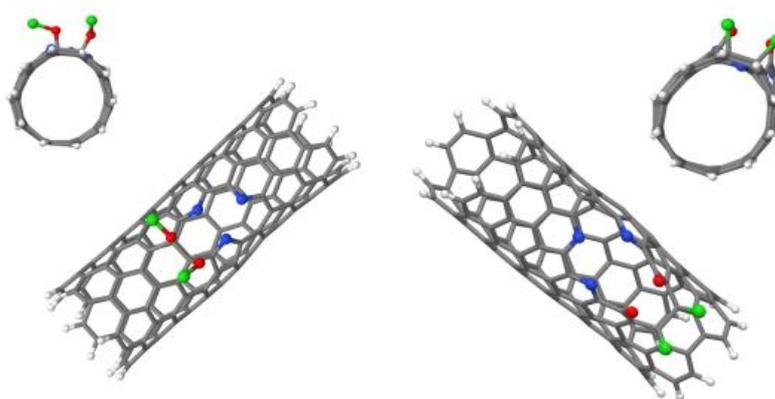


Figura 72. N-MWCNTs con dopaje tipo pirrolico. Se muestra una comparación de las 2 interacciones (molecular y disociativa) de la especie reactiva del monoxlorato, la imagen de la izquierda 2 moléculas interaccionan molecularmente y no hay alguna deformación, en comparación

con el comportamiento disociativo de las 2 mismas especies reactivas favorece el rompimiento de enlaces C-C y deformación estructural.

La interacción disociada de 2 o más moléculas reactivas de monoxoclorato favorecen el rompimiento de enlaces C-C y la deformación estructural del material. Al interaccionar más de 2 moléculas de monoxoclorato y de manera disociada, la deformación estructural del nanomaterial y el rompimiento de enlaces C-C se ve favorecida (**Figura 73**). En la imagen se observa el rompimiento tipo *ziper*, llamamos *ziper* al proceso de rompimiento de los enlaces que provoca la interacción de 2 o más monoxocloratos disociados. El diámetro de los N-NTCs se deforma y forma una elipse. Este comportamiento podría ser una explicación de cómo actúa la enzima y sus especies reactivas en este nanomaterial.

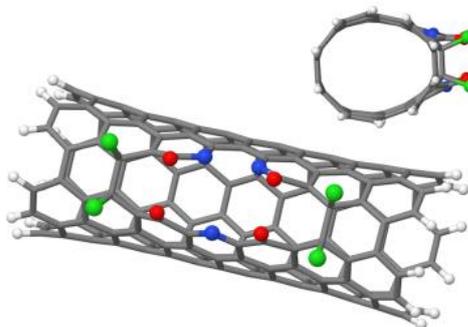


Figura 73. Interacción de especies reactivas 4ClO^- disociados en la superficie de NTCs dopados piridínicamente con nitrógeno.

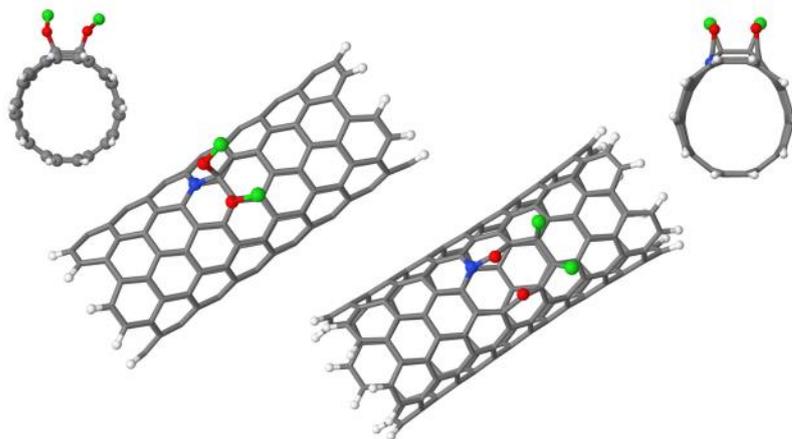


Figura 74. NTCs dopado con nitrógeno cuaternario en interacción con 2 moléculas reactivas de ClO^- . La imagen de la izquierda se observa la interacción de manera molecular de esta especie sin presentar alguna deformación o alteración en la estructura, en comparación con la imagen de la

derecha, la misma especie pero de manera disociativa el rompimiento de enlaces y la deformación del diámetro se ven favorecidas.

El comportamiento *ziper* solo se presenta en NTCs con dopaje, ya que el dopaje favorece el cambio en la densidad de cargas como ya se mencionó al principio de esta sección y ejerce una fuerza de atracción por diferencia de cargas ante las especies reactivas.

Se analizó las mismas interacciones con NTCs sin dopaje (prístinos) y no presento ningún tipo de deformación estructural ni rompimiento de los enlaces.

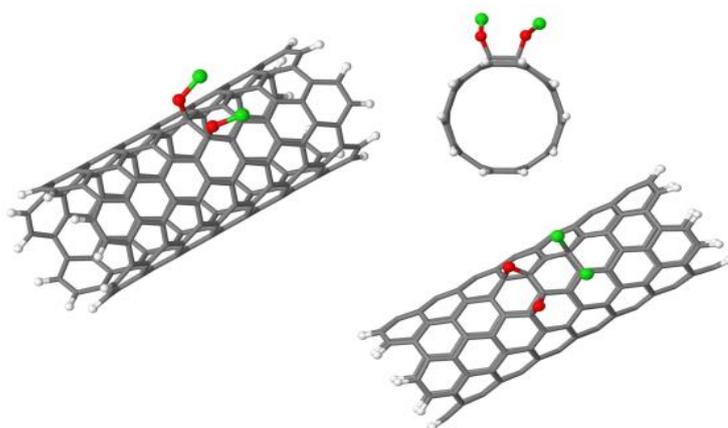


Figura 75. Es de suma importancia que la superficie del NTCs presente diferencia de carga otorgada por el dopaje, en este caso con nitrógeno para que las moléculas reactivas rompan enlaces C-C.

Las interacciones analizadas previamente, todas ellas fueron con nanotubos de carbono de una sola capa dopados con nitrógeno (piridinico, pirrolico y cuaternario), para estudiar un sistema con mayor aproximación a los experimentos mencionados en este trabajo de investigación, se realizaron cálculos teóricos de las interacciones moleculares y disociadas de la especie reactiva ClO^- (monoclorato) con las capas de nanotubos de carbono multicapa dopados con nitrógeno (piridinico, pirrolico y cuaternario).

En estas interacciones, tuvimos resultados semejantes a los anteriores, una vez que el monoclorato disociado favorece el rompimiento de enlaces C-C, estas moléculas se internalizan a las capas profundas, provocando rompimiento de enlace y así consecutivamente hasta lograr el rompimiento de la nanoestructura.

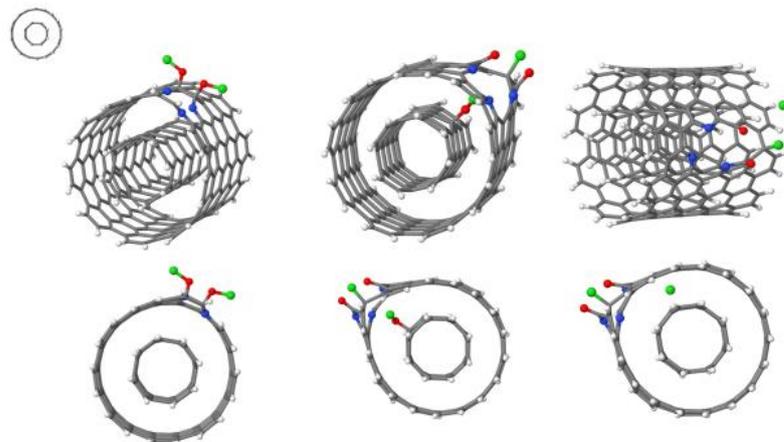


Figura 76. N-MWCNTs con dopaje piridinico, en la imagen de la izquierda se observa la interacción molecular del monoxoclorato, no existe deformación de diámetro ni rompimiento de enlaces covalentes del carbono. La imagen central, muestra interacción disociada de la misma especie reactiva y en comparación con la interacción molecular, en esta si hay deformación de diámetro y rompimiento de los enlaces de la capa más superficial de MWCNTs, lo cual tiene como consecuencia, que los monoxocloratos se internalicen provocando rompimiento de enlaces en sus capas interiores y por último la imagen de la derecha presenta un escenario donde hay interacción disociativa y provoca desprendimiento de átomos de cloro.

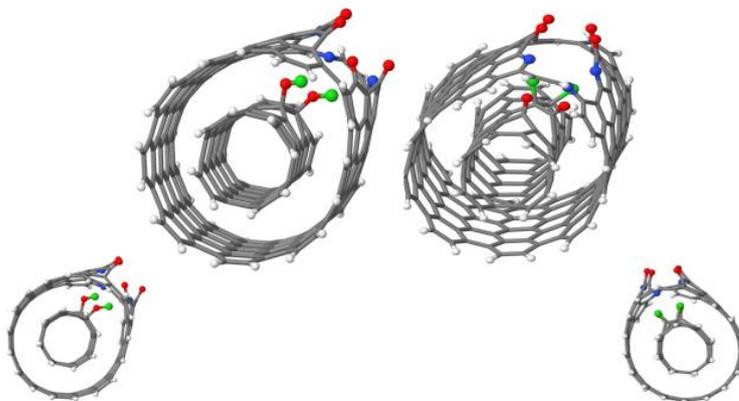


Figura 77. Los modelos anteriores nos indican que la interacción disociativa de la especie reactiva ClO⁻ favorece la degradación y rompimiento de enlaces C-C, provoca orificios en las capas lo cual permite que los monoxocloratos se internalicen abriendo paso y seguir con el proceso de rompimiento de enlaces. Esto es posible apreciarlo en comparación con los cortes transversales de la imagen de la izquierda y la derecha. En la imagen de la izquierda el diámetro interno al tener interacción molecular no presenta deformación y la imagen de la derecha, el diámetro interno al presentar interacción disociativa el diámetro si presenta deformación.

De la figura anterior, podemos concluir que el escenario posible de la imagen de la derecha podría darnos la respuesta del porque cuando los residuos pos tratamiento enzimático fueron caracterizados con microscopia de barrido y de transmisión se apreciaron partículas de NaK y KCl. Altos niveles de Cl podría ser la explicación.

Capítulo 7

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los Nanotubos de carbono multicapa dopados con nitrógeno, podrían dar origen a terapias alternativas y/o híbridas para diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer. Se ha reportado en la literatura que estos son capaces de atravesar la membrana celular sin provocar alteraciones estructurales ni deformaciones.

Una vez que el material se internalizo en la célula, este puede ser excretado por 2 procesos: exocitosis y degradación enzimática. El proceso de exocitosis no resulta del todo eficaz, debido a que este consiste en expulsar los NTCs tal cual como entraron, esto implica que al momento de salir de una célula podría internalizarse en otro sin problemas.

Por tal motivo nos enfocamos en estudiar el proceso de degradación enzimática de los NTCs por medio de la enzima Mieloperoxidasa (h-MPO), esta célula es extraída de células mononucleares como monocitos y neutrófilos. Estas peroxidases tienen un tiempo de vida aproximado de 6 horas en condiciones óptimas.

Para demostrar la degradación de la enzima, las muestras tratadas se caracterizaron por microscopia TEM y SEM y caracterización RAMAN. Esto para lograr una comparación pre y pos a los tratamientos enzimáticos. De igual manera para estudiar el método de degradación, se realizaron cálculos teóricos en el software Quantum Espresso, con este estudiamos un posible proceso de actividad enzimática sobre la nanoestructura.

En ambas cuestiones, experimental y teóricamente, los resultados fueron altamente satisfactorias y coinciden en su totalidad. El material que resulto con mayor degradación o desgaste estructural fue aquellos nanotubos de carbono dopados con nitrógeno piridinico (zona 1) con tratamientos oxidativos.



Figura 78. A simple vista se observa que el nanomaterial con las características de: dopado con nitrógeno tipo piridinico, multicapa, tratamiento oxidativo a un tiempo de interacción enzimática de 6 horas, resultado más eficaz para su degradación.

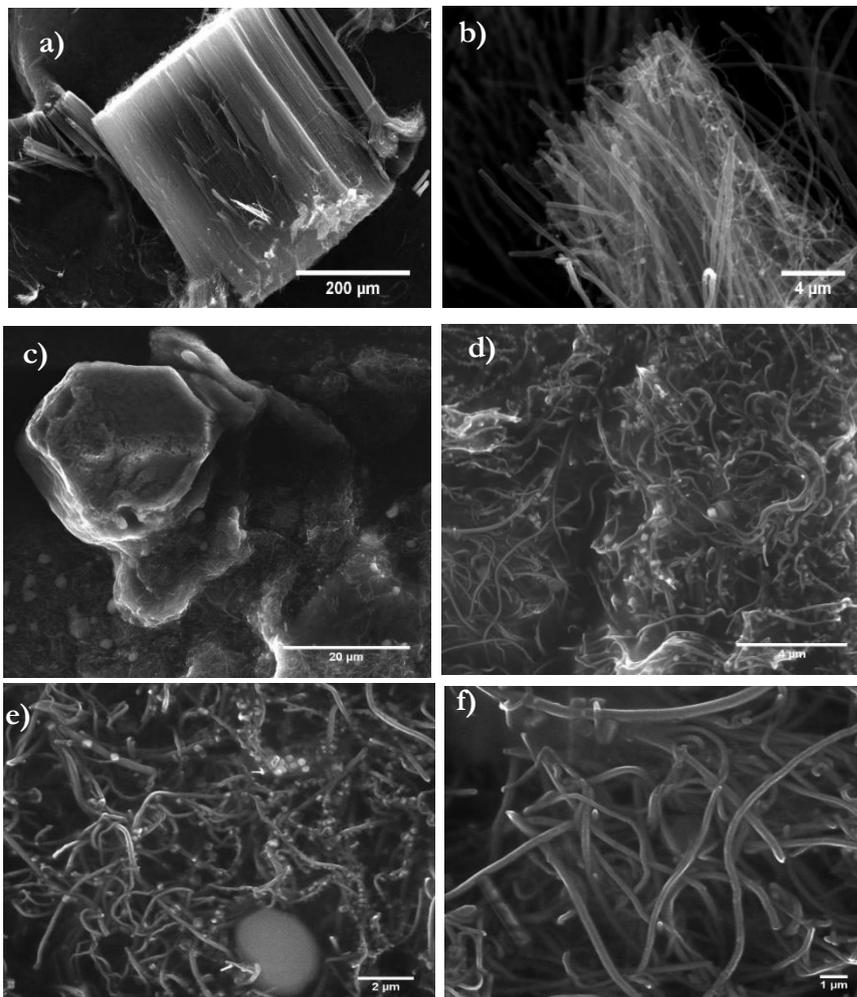


Figura 78. Caracterización SEM. Con esta caracterización no se aprecia un desgaste o degradación específica ni localizada, pero es importante debido a que en comparación con el material previo al tratamiento degradativo, se observan partículas embebidas en una masa biológica que al igual

contiene a los NTCs. Estas partículas al caracterizar con EDS, arrojan que son básicamente de NaK y KCl, esto coincide con los cálculos analizados en Quantum Espresso, debido que al interactuar las especies reactivas de la enzima y al romper enlaces C-C, hay desprendimiento de átomos de Cl, lo cual sería una posible respuesta a la aparición de estas nuevas partículas.

No es propio como tal adjudicarle que el desorden observado en las imágenes SEM pos al tratamiento enzimático sea consecuencia de esta, pero si se observa claramente N-MWCNTs-ox zona 1 altamente desordenados.

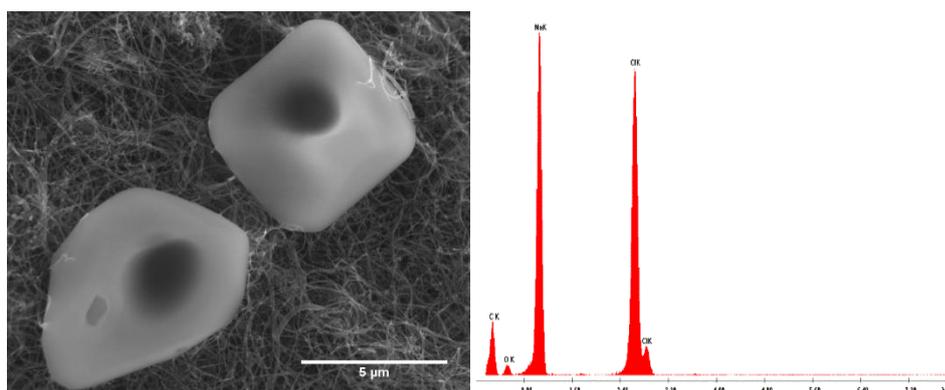


Figura 79. Partícula arrojada después del tratamiento enzimático. El análisis por EDS arroja que tiene NaK y KCl.

Para obtener detalles sobre la degradación enzimática, las muestras se caracterizaron por microscopía TEM, la cual nos ayudó a observar a detalle el desgaste estructural que provoco la enzima en los N-MWCNTs-ox zona 1.

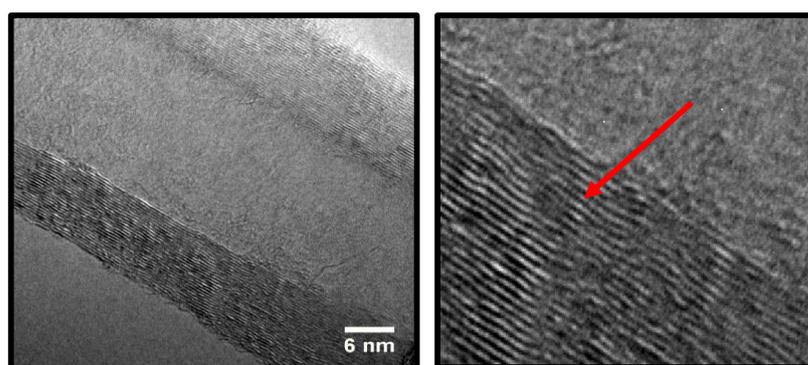


Figura 80. Caracterización TEM de N-MWCNTs previos al tratamiento enzimático, se observan las multicapas en perfectas condiciones, diámetros de 80-90nm. Y no presentan deformaciones en la superficie ni en su interior.

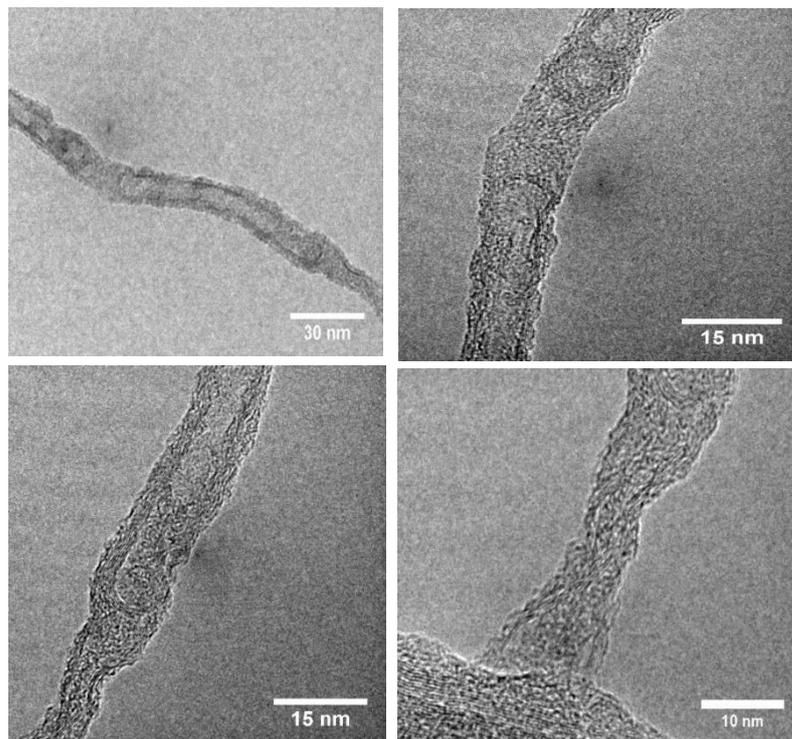


Figura 81. Caracterización TEM. En comparación con la figura 80, el material pos tratamiento enzimático. Se observan diámetros reducidos de aproximadamente 15-20nm, la zona tipo bambú no se aprecia en su totalidad, la superficie se ve deformada y en zonas altamente reducida.

La caracterización RAMAN nos permite analizar el grado de defectos que presenta el material, se espera una vez observando las imágenes TEM, que los análisis por RAMAN estén altamente llenos de defectos y el coeficiente de interacción de la intensidad de la banda D con la banda G arroje valores altos, esto indica que nuestro nuevo material pos tratamiento enzimático presente más defectos que el previo al tratamiento.

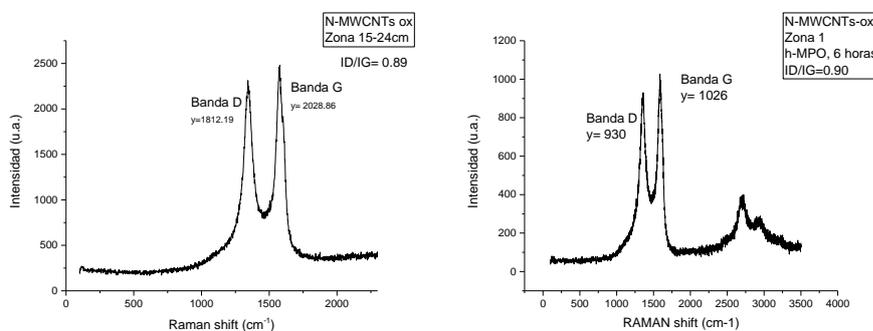


Figura 82. Caracterización RAMAN pre y pos tratamiento enzimático. Se observa la aparición de la banda 2D la cual nos indica que en la muestra existen materiales de pocas capas. Esto nos hace

indagar que los N-MWCNTs-ox zona 1 presentaron desgaste en las capas, perdiendo varias de ellas lo cual ahora tenemos NTCs con pocas capas en comparación.

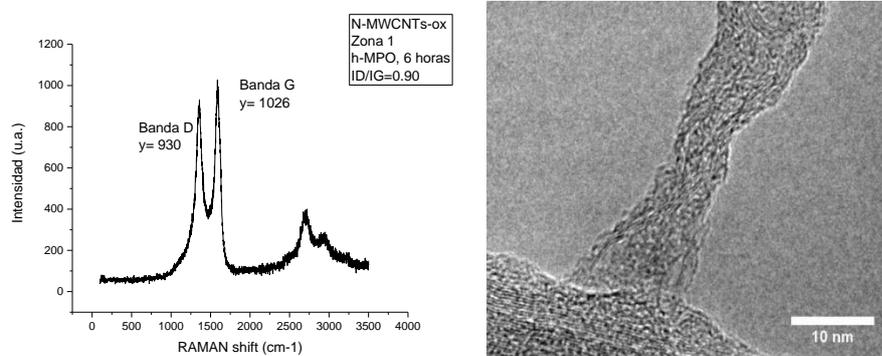


Figura 83. Comparación de Caracterización por TEM y RAMAN. Estas a su vez coinciden ya que el nanomaterial presenta más deformidades. La banda 2D aparece. Y las bandas están a una diferencia de intensidades menor que antes del tratamiento enzimático.

Los estudios experimentales coinciden en su mayoría con los estudios teóricos. Hay liberación de cloro y estrés en la superficie, deformando diámetros, rompiendo enlaces C-C en la superficie lo cual abre orificios permitiendo así la internalización de más especies reactivas a las capas siguientes y así provocar una reacción en cadena entre las capas.

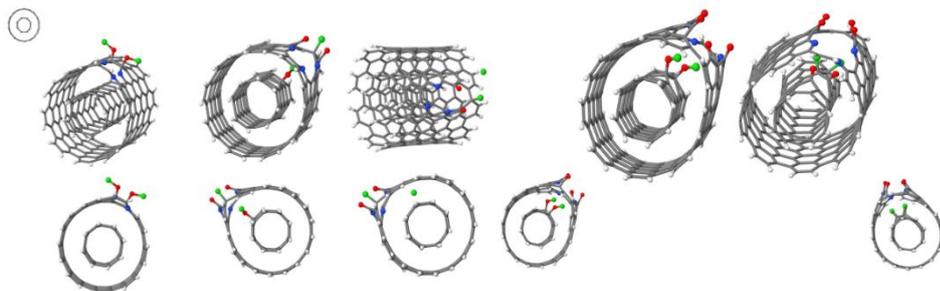


Figura 84. Estudios teóricos de la interacción de la especie reactiva de monoxoclorato, en la cual se observa desprendimiento de átomos de cloro y el efecto zipper como rompimiento de enlaces. La internalización de más ClO^- al provocar orificios entre las capas gráficas. Deformación en los diámetros y todo esto provocado en condiciones ya mencionadas de los N-MWCNTs-oz zona 1.

El proceso de degradación que mejor se adapta es que las especies reactivas de monoxoclorato interactúen con la superficie del material de manera disociativa, esto favorece el rompimiento de enlaces covalentes C-C. El nanomaterial si no presenta dopaje no provoca interacción con estas especies, lo cual nos indica que para mayor degradación los NTC tiene que tener diferencias en la densidad de cargas otorgada por el dopaje, en este caso de degradación, piridinico.

Tomando en cuenta todas estas características, llamamos al proceso de degradación “Zipper”, ya que el comportamiento de rompimiento de enlaces es favorecido en este sentido “tipo zipper”.

BIBLIOGRAFÍA

[1] CARBON NANOTUBES DEGRADED BY NEUTROPHIL MYELOPEROXIDASE INDUCE LESS PULMONARY INFLAMMATION. Valerian E. Kagan^{1*}, Nagarjun V. Konduru¹, Weihong Feng¹, Brett L. Allen², Jennifer Conroy³, Yuri Volkov³, Irina I. Vlasova¹, Natalia A. Belikova¹, Naveena Yanamala⁴, Alexander Kapralov¹, Yulia Y. Tyurina¹, Jingwen Shi⁵, Elena R. Kisin⁶, Ashley R. Murray⁶, Jonathan Franks⁷, Donna Stolz⁷, Pingping Gou², Judith Klein-Seetharaman⁴, Bengt Fadeel⁵, Alexander Star² and Anna A. Shvedova⁶ (DOI: 10.1038/NNANO.2010.44)

[2] A PREDICTIVE KINETIC MODEL FOR INHIBITORY EFFECT OF NITRITE ON MYELOPEROXIDASE CATALYTIC ACTIVITY TOWARDS OXIDATION OF CHLORIDE. Yahya R. Tahboub^{1,2} and Mohammad M. Fares¹. (DOI:10.4236/jbpc.2011.23024)

[3] BIOSYNTHESIS, PROCESSING, AND SORTING OF HUMAN MYELOPEROXIDASE. Markus Hansson^a, Inge Olsson^a and William M. Nauseef^b. (DOI:10.1016/j.abb.2005.08.009)

[4] X-RAY CRYSTAL STRUCTURE AND CHARACTERIZATION OF HALIDE-BINDING SITES OF HUMAN MYELOPEROXIDASE AT 1.8 Å RESOLUTION. Tristan J. Fiedler, Curt A. Davey, and Roger E. Fenna. (Vol. 275, No. 16, Issue of April 21, pp. 11964–11971, 2000)

[5] EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON ENZYME-CATALYSED BIODEGRADATION OF CARBON NANOTUBES. Gregg P. Kotchey^a, James A. Gaugler^a, Alexander A. Kapralov^b, Valerian E. Kagan^{a,b}, and Alexander Star^a (DOI:10.1039/C2TB00047D)

[6] PEROXIDASE-MEDIATED BIODEGRADATION OF CARBON NANOTUBES IN VITRO AND IN VIVO. Gregg P. Kotchey^a, Yong Zhao^a, Valerian E. Kagan^{a,b}, and Alexander Star^a (DOI:10.1016/j.addr.2013.07.007)

[7] MECHANISMS OF CARBON NANOTUBE-INDUCED TOXICITY: FOCUS ON OXIDATIVE STRESS. Anna A. Shvedovaa,b,*, Antonio Pietroiusti, Bengt Fadeel,d,e, and Valerian E. Kagane. (DOI:10.1016/j.taap.2012.03.023.)

[8] ENZYMATIC DEGRADATION OF CARBON NANOTUBES AND MECHANICAL SEPARATION OF CARBON NANOCUPS. Submitted to the Graduate Faculty of the Kenneth P. Dietrich School of Arts and

Science in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science, James A. Gaugler II.

[9] MYELOPEROXIDASE-INDUCED BIODEGRADATION OF SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES IS MEDIATED BY HYPOCHLORITE. I. I. Vlasova^{a,1}, A. V. Sokolov^{a,b}, A. V. Chekanov^a, V. A. Kostevich^{a,b}, V. B. Vasilyev^b (DOI: 10.1134/S1068162011040157)

[10] A THEORETICAL THREE-DIMENSIONAL MODEL FOR LACTOPEROXIDASE AND EOSINOPHIL PEROXIDASE, BUILT ON THE SCAFFOLD OF THE MYELOPEROXIDASE X-RAY STRUCTURE. Luca De Gioia, Elena M. Ghibaudi, Enzo Laurenti, Mario Salmona y Rosa Pia Ferrari. (JBIC (1996) 1:476–485)

[11] ENZIMAS GENERADORAS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO: MIELOPEROXIDASA. Lic. Onel H. García Morales, Dra. Nayade Pereira Roche y Dra. Rosa M. Flores Sánchez. (Rev Cubana Invest Biomed 1998; 17 (3):190-7)

[12] ESSENTIAL ROLE OF PROXIMAL HISTIDINE ASPARAGINE INTERACTION IN MAMMALIAN PEROXIDASES. Xavier Carpena, Pietro Vidossich, Klarissa Schroettner, Barbara M. Calisto, Srijib Banerjee, Johanna Stampfer, Monika Soudi, Paul G. Furtmuller, Carme Rovira, Ignacio Fita and Christian Obinger. (DOI:10.1074/jbc.M109.002154)

[13] PHOSPHATIDYLSERINE TARGETS SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES TO PROFESSIONAL PHAGOCYTES IN VITRO AND IN VIVO. Nagarjun V. Konduru¹, Yulia Y. Tyurina¹, Weihong Feng¹, Liana V. Basova¹, Natalia A. Belikova¹, Hu "lya Bayir¹, Katherine Clark², Marc Rubin², Donna Stolz², Helen Vallhov⁵, Annika Scheynius⁵, Erika Witasz⁶, Bengt Fadeel⁶, Padmakar D. Kichambare³, Alexander Star³, Elena R. Kisin⁴, Ashley R. Murray⁴, Anna A. Shvedova⁴, Valerian E. Kagan^{1,6*} (DOI:10.1371/journal.pone.000439)

[14] LENGTH-DEPENDENT RETENTION OF CARBON NANOTUBES IN THE PLEURAL SPACE OF MICE INITIATES SUSTAINED INFLAMMATION AND PROGRESSIVE FIBROSIS ON THE PARIETAL PLEURA. Fiona A. Murphy, Craig A. Poland, Rodger Duffin, Khuloud T. Al-Jamal, Hanene Ali-Boucetta, Antonio Nunes, Fiona Byrne, Adriele Prina-Mello, Yuri Volkov, Shouping Li, Stephen J. Mather, Alberto Bianco, Maurizio Prato, William MacNee, William A. Wallace, Kostas Kostarelos and Ken Donaldson. (DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.02.040)

[15] BIODISTRIBUTION AND CLEARANCE OF INSTILLED CARBÓN NANOTUBES IN RAT LUNG. Dan Elgrabli¹, Magali Floriani², Steve Abella-Gallart¹, Laurent Meunier¹, Christelle Gamez¹, Patrice Delalain¹, Françoise Rogerieux¹, Jorge Boczkowski^{3,4} and Ghislaine Lacroix¹ (DOI:10.1186/1743-8977-5-20)

[16] THE PHYLOGENY OF THE MAMMALIAN HEME PEROXIDASES AND THE EVOLUTION OF THEIR DIVERSE FUNCTIONS. Noleen B Loughran¹, Brendan O'Connor², Ciarán Ó'Fágáin² and Mary J O'Connell^{1,2} (DOI:10.1186/1471-2148-8-101)

[17] CYTOTOXICITY INDUCED BY CARBON NANOTUBES IN EXPERIMENTAL MALIGNANT GLIOMA. Samuel Romano-Feinholz^{1,*}, Alelí Salazar-Ramiro^{2,*}, Emilio Muñoz-Sandoval³, Roxana Magaña-Maldonado², Norma Hernández Pedro⁴, Edgar Rangel López⁵, Alberto González Aguilar¹, Aurora Sánchez García⁶, Julio Sotelo², Verónica Pérez de la Cruz⁷, and Benjamín Pineda². (International Journal of Nanomedicine 2017:12 6005–6026)

[18] EFFECTS OF NITROGEN-DOPED MULTIWALL CARBON NANOTUBES ON MURINE FIBROBLASTS. J. G. Munguía-Lopez,¹ E. Muñoz-Sandoval,² J. Ortiz-Medina,^{2,3} F. J. Rodriguez-Macias,⁴ and A. De Leon-Rodriguez¹. (Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials Article ID 801606).

[19] STRUCTURE, FUNCTION, AND STABILITY OF ENZYMES COVALENTLY ATTACHED TO SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES. Prashanth Asuri, Shyam Sundhar Bale, Ravindra C. Pangule, Dhiral A. Shah, Ravi S. Kane and Jonathan S. Dordick. (DOI: 10.1021/la702091c)

[20] A NEW ERA OF CANCER TREATMENT: CARBON NANOTUBES AS DRUG DELIVERY TOOLS. Seyed Yazdan Madani¹, Naghmeh Naderi¹, Oshani Dissanayake¹, Aaron Tan¹, Alexander M Seifalian^{1,2}. (International Journal of Nanomedicine 2011:6 2963–2979)

[21] *NITROGEN DOPING IN CARBON NANOTUBES*. Ewels, M. Glerup J. Nanosci. Nanotech. (Journal of Nanoscience and Nanotechnology Vol.5, Number 9, 1345-1363, 2005)

[22] ADVERSE EFFECTS OF INDUSTRIAL MULTIWALLED CARBON NANOTUBES ON HUMAN PULMONARY CELLS. Lyes Tabet, Cyrill Bussy, Nadia Amara, Ari Setyan, Alain Grodet, Michel J. Rossi, Jean-Claude Pairon, Jorge Boczkowski and Sophie Lanone. (DOI: 10.1080/15287390802476991)

[23] ANALYSIS OF FUNCTIONAL GROUP SITED ON MULTI-WALL CARBON NANOTUBE SURFACE. Rike Yudianti^{1,*}, Holia Onggo¹, Sudirman², Yukie Saito³, Tadahisa Iwata⁴ and Jun-ichi Azuma⁵ (The Open Materials Science Journal, 2011, 5, 242-247)

[24] HIGH RESOLUTION XPS CHARACTERIZATION OF CHEMICAL FUNCTIONALISED MWCNTS AND SWCNTS. T.I.T. Okpalugo^{*}, P. Papakonstantinou, H. Murphy, J. McLaughlin, N.M.D. Brown. (DOI:10.1016/j.carbon.2004.08.03)

[25] APPLICATIONS OF CARBON NANOTUBES IN DRUG DELIVERY. Alberto Bianco¹, Kostas Kostarelos² and Maurizio Prato³ (DOI 10.1016/j.cbpa.2005.10.005)

[26] BIOCOMPATIBILITY AND TOXICOLOGICAL STUDIES OF CARBON NANOTUBES DOPED WITH NITROGEN. J. C. Carrero-Sánchez, A. L. Elías, R. Mancilla, G. Arrellín, H. Terrones*, J. P. Laclette, and M. Terrones*. (DOI: 10.1021/nl060548p)

[27] CANCER STEM CELLS AND DRUG RESISTANCE: THE POTENTIAL OF NANOMEDICINE. reprints@futuremedicine.com. (Department of Pharmaceutical Sciences & Center for Drug Delivery & Nanomedicine, College of Pharmacy, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-6025, USA)

[28] CHEMICAL VAPOR DEPOSITION OF CARBON NANOTUBES: A REVIEW ON GROWTH MECHANISM AND MASS PRODUCTION. Mukul Kumar and Yoshinori Ando. (DOI:10.1166/jnn.2010.2939)

[29] CYTOTOXICITY OF DOXRUBICIN LOADED SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES. Ayhan Ünlü¹, Mehdi Meran², Bircan Dinc³, Nilgün Karatepe⁴, Muhammet Bektaş⁵, F. Seniha Güner².

[30] DUAL TARGETED DELIVERY OF DOXORUBICIN TO CANCER CELLS USING FOLATE CONJUGATED MAGNETIC MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES. Yu-Jen Lu^{a,b}, Kuo-Chen Wei^b, Chen-Chi M. Ma^c, Shin-Yi Yang^c, Jyh-Ping Chen^{a,*}

[31] EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN EXPOSURE TO CARBON NANOTUBES AND PULMONARY FIBROSIS: SYSTEMATIC REVIEW. Bautista Cartusciello, M.J*; Delgadillo Rodríguez, O. S*; Rodríguez Reyes, C.A* and Carlos Orduz. Md**.

[32] EVALUACIÓN *IN VITRO*, DE LA TOXICIDAD Y EFECTO CITOPROTECTOR DE LOS NANOTUBOS DE CARBÓN Y ÓXIDO DE GRAFENO CON SUPERFICIES MODIFICADAS, EN LAS CÉLULAS GLIALES EXPUESTAS A ESTRÉS OXIDATIVO A.M. Solano-Sánchez; J.J. Otero-Negrete; F. Tristán y C. Sámano-Salazar.

[33] FUNCTIONALIZED CARBON NANOTUBES ARE NON-CYTOTOXIC AND PRESERVE THE FUNCTIONALITY OF PRIMARY IMMUNE CELLS. Helene Dumortier*, Stephanie Lacotte, Giorgia Pastorin, Riccardo Marega, Wei Wu, Davide Bonifazi, Jean-Paul Briand, Maurizio Prato*, Sylviane Muller, and Alberto Bianco*.

[34] INTERNALIZATION OF MWCNTS BY MICROGLIA: POSSIBLE APPLICATION IN IMMUNOTHERAPY OF BRAIN TUMORS. Babak Kateb,^{a,*} Michelle Van Handel,^a Leying Zhang,^a Michael J. Bronikowski,^b Harish Manohara,^b and Behnam Badie^{a,*}.

[35] MULTI-WALLED CARBON NANOTUBE INTERACTIONS WITH HUMAN EPIDERMAL KERATINOCYTES. Nancy A. Monteiro-Riviere^{a,*}, Robert J. Nemanich^b, Alfred O. Inman^a, Yunyu Y. Wang^b, Jim E. Riviere^a

[36] NANOTUBE MOLECULAR TRANSPORTERS: INTERNALIZATION OF CARBON NANOTUBE-PROTEIN CONJUGATES INTO MAMMALIAN CELLS. Nadine Wong Shi Kam, Theodore C. Jessop, Paul A. Wender,^{*} and Hongjie Dai^{*}.

[37] CARBON NANOTUBES: FUNCIONALIZATION AND BIOLOGICAL APPLICATIONS. Marlene Lariza Andrade Cuel, Lluvia Itzel López López, Aidé Sáenz Calindo.

[38] NANOVECTORIZATION OF TRAIL WITH SINGLE WALL CARBON NANOTUBES ENHANCES TUMOR CELL KILLING. Ai Batoul Zakaria, Fabien Picaut, Thibault Rattier, Marc Pudlo, Lucien Saviot, Rémi Chassagnon, Jeannine Lherminier, Tijani Gharbi, Olivier Micheau,^{*} and Guillaume Herlem^{*}.

[49] EFFECT OF OXIDATION TREATMENT OF MULTIWALLED CARBON NANOTUBES ON THE MECHANICAL AND ELECTRICAL PROPERTIES OF THEIR EPOXY COMPOSITES. Zdenko Špitalsky^{a,1}, Christoforos A. Krontiras^b, Stavroula N. Georga^b, Costas Galiotis^{a,c,*}.

[40] SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAPA SOBRE SUSTRATOS METÁLICOS POR EL MÉTODO DE DEPÓSITO QUÍMICO DE VAPORES: NO TODOS LOS NANOTUBOS SON IGUALES. José Alfredo Jiménez-Rodríguez,^{1,2} Vanesa Arana-Sosa,² Alfredo Franco²

[41] THE BIOCOMPATIBILITY OF CARBON NANOTUBES. S.K. Smart^a, A.I. Cassady^b, G.Q. Lu^a, D.J. Martin^{a,*}

[42] THE DEGREE AND KIND OF AGGLOMERATION AFFECT CARBON NANOTUBE CYTOTOXICITY. Peter Wick^{a,*}, Pius Manser^a, Ludwig K. Limbach^d, Ursula Dettlaff-Weglikowska^b, Frank Krumeich^c, Siegmund Roth^b, Wendelin J. Stark^d, Arie Bruinink^a

[43] TRANSLOCATION AND FATE OF MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES IN VIVO. X. Deng^{a,c}, G. Jia^b, H. Wang^{a,*}, H. Sun^a, X. Wang^b, S. Yang^a, T. Wang^b, Y. Liu^{a,c}

[44] ENCAPSULATION INTO CARBON NANOTUBES AND RELEASE OF ANTICANCER CISPLATIN DRUG MOLECULE. Alia Mejri, Delphine Vardanega, Bahoueddine Tangour, Tijani Gharbi and Fabien Picaut^{*}.

[45] ESTUDIO EXPERIMENTAL DE NANOTUBOS DE CARBONO DOPADOS CON NITRÓGENO Y DE OXIDO DE GRAFENO. Tesis para obtener el grado de Maestro en Nanociencias y Materiales, Division de materiales, IPICYT. Roque Sanchez Salas.

[46] MYELOPEROXIDASE: ITS ROLE FOR HOST DEFENSE, INFLAMMATION, AND NEUTROPHIL FUNCTION. Yasuaki Aratani.

[47] THE TOXICITY AND THERAPEUTIC EFFECTS OF SINGLE-AND MULTI-WALL CARBON NANOTUBES ON MICE BREAST CÁNCER. Arghavan Kavosi¹, Saeideh Hosseini Ghale Noei¹, Samaneh Madani¹, Solmaz Khalighfard^{2,3}, Saeed Khodayari³, Hamid Khodayari^{3,4}, Malihe Mirzaei⁵, Mohammad Reza Kalhori³, Majid Yavarian⁶, Ali Mohammad Alizadeh^{3,4} & Mojtaba Falahati⁷

[48] DRUG DELIVERY WITH CARBON NANOTUBES FOR IN VIVO CANCER TREATMENT. Zhuang Liu,¹ Kai Chen,² Corrine Davis³ Sarah Sherlock,¹ Qizhen Cao,² Xiaoyuan Chen,² and Hongjie Dai¹

[49] Estudio experimental "Síntesis de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno": un estudio experimental y de óxido de grafeno", T E S I S PARA OBTENER EL TÍTULO DE: Maestría en Nanociencias y Materiales.

[50] Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function Yasuaki Aratani Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Seto 22-2, Kanazawa, Yokohama 236-0027, Japan. DOI.org/10.1016/j.abb.2018.01.004

[51] ENZIMAS GENERADORAS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO: MIELOPEROXIDASA Lic. Onel H. García Morales, Dra. Nayade Pereira Roche y Dra. Rosa M. Flores Sánchez.

[52] USO DE LA TECNOLOGÍA CVD (CHEMICAL VAPOR DEPOSITION) EN LA OBTENCIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE COMPUESTOS DE CARBONO. Borja Berlanga de la Mata Director: Joaquín Darío Tutor Sánchez.

[53] NITROGEN-DOPED CARBON NANOMATERIALS AS HIGHLY ACTIVE AND SPECIFIC PEROXIDASE MIMICS. Yihui Hu. DOI:10.1021/acs.chemmater.8b02726.

[54] THE TOXICITY AND THERAPEUTIC EFFECTS OF SINGLE-AND MULTI-WALL CARBON NANOTUBES ON MICE BREAST CÁNCER. Arghavan Kavosi. DOI:10.1038/s41598-018-26790-x.

[55] DRUG DELIVERY WITH CARBON NANOTUBES FOR IN VIVO CANCER TREATMENT. Zhuang Liu. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-08-1468.

[56] STRUCTURE AND FUNCTION OF ENZYMES ADSORBED ONTO SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES, Sandeep S. Karajanagi. DOI: 10.1021/la047994h.

[57] CELLULAR AND EXTRACELLULAR MYELOPEROXIDASE IN PYOGENIC INFLAMMATION. Peter P. Bradley, Robert D. and Gerald Rothstein. DOI: 0006- 4971/82/6003-001.

[58] MYELOPEROXIDASE IS REQUIRED FOR NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRANSFORMATION: IMPLICATIONS FOR INNATE IMMUNITY. Kathleen D. Metzler. ;DOI10.1182/blood-2010-06-290171.

[59] MYELOPEROXIDASE: MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION AND THEIR RELEVANCE TO HUMAN HEALTH AND DISEASE. Betty S. van der Veen. DOI: 10.1089=ars.2009.2538.

[60] TECHNOTES | Myeloperoxidase (MPO)

[61] FUNCTIONALISED CARBON NANOTUBES: FROM INTRACELLULAR UPTAKE AND CELL-RELATED TOXICITY TO SYSTEMIC BRAIN DELIVERY. Pedro M. Costa. DOI.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.033.

[62] CARBON NANOTUBES: AN EMERGING DRUG CARRIER FOR TARGETING CANCER CELLS. VAIBHAV RASTOGI. Received 23 October 2013; Revised 26 January 2014; Accepted 12 March 2014; Published 24 April 2014. Academic Editor: Hans E. Junginger.

[63] RAMAN SPECTROSCOPY AS A VERSATILE TOOL FOR STUDYING THE PROPERTIES OF GRAPHENE. Andrea C. Ferrari and Denis M. Basko. DOI: 10.1038/NNANO.2013.46.

[64] ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO. Alca Quispe Fernando.

[65] NANOTUBOS DE CARBONO – LA ERA DE LA NANOTECNOLOGÍA. Marisela Maubert F. Av. San Pablo 180, Reynosa Tamaulipas, Azcapotzalco. C.P. 022000 *amf@correo.azc.uam.mx.

[66] Tesis de Maestría: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE NANOTUBOS DE CARBONO DOPADOS CON NITRÓGENO. Roque Sánchez Salas.

[67] RECENT ADVANCES IN CARBON NANOTUBE-BASED ENZYMATIC FUEL CELLS. DOI: 10.3389/fbioe.2014.00045. Serge Cosnier, Michael Holzinger and Alan Le Goff.

[68] HYDROGEN DEUTERIUM EXCHANGE REVEALS CHANGES TO PROTEIN DYNAMICS OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN UPON N- AND O- DESIALYLATION. DOI:10.1016/j.jpba.2018.02.060 Andrea Wang, Ying Zhou, Michael J. Palmieri y Gang Gary Hao.

[69] STRUCTURE OF HUMAN PROMYELOPEROXIDASE (PROMPO) AND THE ROLE OF THE PROPEPTIDE IN PROCESSING AND

MATURATION. Irina Grishkovskaya, Martina Paumann-Page, Rupert Tscheliessnig, Johanna stampler, Stefan Hofbauer, Monika Soudi, Benjamin Sevcnikar, Chris Oostenbrink, Paul G. Furtmuller, Kristina Djinovic-Carugo, William M. Nauseed and Christian Obinger.

[70] Tesis para obtener el grado de licenciada en Biofísica: DEGRADACION ENZIMÁTICA DE NANOTUBOS DE CARBONO CON LA ENZIMA HRP. Gabriella Azuara Tuexi.

[71] FABRICATION AND CHARACTERISATION OF CARBON NANOTUBE ARRAY THERMAL INTERFACE MATERIALS. Andreas Nylander.

[72] CONCRETO REFORZADO CON NANOTUBOS DE CARBONO DOPADOS CON OXÍGENO Y DOPADOS CON NITRÓGENO. Mauricio Martínez Alanis.

[73] MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y DIFRACCION DE ELECTRONES DE POLIMEROS, S. Munoz Guerra Etsiib. Universidad Politecnica de Catalunya.

[74] CARACTERIZACIÓN POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE ETEROESTRUCTURAS DE SEMICONDUCTORES APLICACIÓN AL DISEÑO DE SUPERREDES TENSADAS PARA EPITAXIAS DE GAAS/SI. Ángel Mazuelas Esteban.

