



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN FÍSICA

**Efecto en células HeLa de las propiedades ferromagnéticas y
fototérmicas de nanotubos de carbono de pared múltiple
funcionalizados, radiados con láser y expuestos a campos magnéticos
giratorios.**

Para obtener el grado académico de:

MAESTRO EN CIENCIAS
(Física)

Presenta:

Q.B. ÁNGEL VITALI CÁRDENAS MUÑOZ

Director de tesis

DRA. JUDITH CELINA TÁNORI CÓRDOVA

Co-director

DR. SANTOS JESÚS CASTILLO

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Para la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo del Dr. Emilio Muñoz Sandoval, con quien de inicio se trabajó la idea. Los nanotubos de carbono fueron proporcionados por la Dra. Yadira Itzel Vega Cantú. Tomaron parte como asesores a lo largo del desarrollo del trabajo el Dr. Santos Jesús Castillo y el Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda. La dirección estuvo a cargo de la Dra. Judith Celina Tánori Córdova.

A lo largo del desarrollo de la tesis se contó con la colaboración para su realización de los siguientes laboratorios.

- Laboratorio de Polímeros y Compositos Nanoestructurados de la División de Materiales Avanzados del IPYCYT.**
- Laboratorios de Microscopía B5 LIDRA de CINVESTAV unidad Querétaro**
- Laboratorio de Propiedades Multifuncionales Nanométricas de CINVESTAV unidad Querétaro.**
- Laboratorio A2 de Difracción de Rayos X de CINVESTAV unidad Querétaro.**
- Laboratorios de Semiconductores del Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora.**
- Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad de Sonora.**
- Laboratorio de Investigación en Productos Naturales del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora.**

AGRADECIMIENTOS

La tarea de realizar este trabajo, solitaria en principio, pronto se vio enriquecido por la compañía de un gran número de personas de las que se recogieron valiosos e imprescindibles aportes, los cuales indudablemente se tradujeron en la culminación de este. Para todos ellos que se cruzaron en mi camino haciendo imposible que esto quedara por ahí estancado sin terminarse, gracias.

En particular a mis directores de tesis, la Dra. Judith Celina Tánori Córdova y el Dr. Santos Jesús Castillo, guías, asesores, consejeros, aportadores siempre. Al Dr. Emilio Muñoz Sandoval, por hacer esto posible. A la Dra. Yadira Itzel Vega Cantú, por los nanotubos de carbono. Al Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, por su entendimiento, su indispensable apoyo y tiempo. Al Dr. Emmanuel Robles Ávila, por su asesoría y consejos.

De la misma manera a la UNISON por permitirme realizar mis estudios de maestría y al CONACYT por el apoyo económico brindado a través del programa de becas de posgrado durante la realización de este proyecto. Gracias.

De forma muy especial. A Eleazar León Sarabia, por su incondicional apoyo en el procesamiento de las muestras para su caracterización e interpretación de resultados. A An Young Sarahí Taylor Castillo, por hacer posible con su intervención el comienzo del trabajo. A Lilian Arely Carrasco Cota, por su intervención y entrega, la cual permitió llegar a la etapa final. A Lirio Cristal Gaytán Ordaz, por estar en todo. A Heriberto Torres Moreno y a Raúl Díaz López por formar parte a lo largo de todo el desarrollo del trabajo. Gracias por servirse a compartir sus conocimientos y amistad.

DEDICATORIA

*A mi familia toda, de padre, de madre,
hermanos, amigos, por su cariño.*

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. NANOTUBOS DE CARBONO Y CÁNCER	6
I. Cáncer	6
1. Epidemiología	6
2. Descripción general.....	7
3. Clasificación.....	8
4. Causalidad	8
5. Terapias convencionales	9
II. Nanotubos de carbono	13
1. El carbono.....	13
2. Los nanotubos de carbono.....	18
3. Síntesis de nanotubos de carbono	25
III. Nanotubos de carbono en la terapia del cáncer.	31
1. Toxicidad de nanotubos de carbono	33
2. Terapias alternativa del cáncer mediante propiedades físicas de nanotubos de carbono.....	36
3. Destrucción por hipertermia a través de nanotubos de carbono y radiación NIR .	36
4. Destrucción mecánica a través de nanotubos de carbono y campos magnéticos giratorios.....	38
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	40
I. Desarrollo de los sistemas	40
1. Plataforma láser	40
2. Sistema inductor de campo magnético giratorio	40
II. Preparación de las soluciones coloidales de MWCNTs	43
1. Oxidación de MWCNTs	43
2. Dispersión de oxMWCNTs desnudos	44
3. Dispersión de oxMWCNTs por recubrimiento de polímero	44
III. SEM	44
IV. TEM	44
V. EDS	45
VI. AFM/MFM	45
VII. Rayos X	45

VIII. Comportamiento de la temperatura tras la radiación láser	45
IX. Cultivo celular	46
X. Citotoxicidad de MWCNTs	46
XI. Tratamiento láser	46
XII. Tratamiento magnético	47
XIII. Análisis estadístico	48
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	49
I. Desarrollo de los sistemas	49
1. Plataforma láser	49
2. Sistema inductor del campo magnético giratorio	51
II. Preparación de las soluciones coloidales de MWCNTs	54
III. SEM	57
IV. TEM	60
V. EDS	66
VI. AFM/MFM	66
VII. Rayos X	70
VIII. Comportamiento de la temperatura tras la radiación láser	71
IX. Citotoxicidad de MWCNTs	75
X. Tratamiento láser de las células HeLa en presencia de MWCNTs	82
XI. Tratamiento magnético de las células HeLa en presencia de MWCNTs	85
CONCLUSIONES	89
PERSPECTIVAS	90
BIBLIOGRAFÍA	91

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. a) Grafito, b) Diamante, c) Fullerenos C ₆₀ . Rocas en bruto.	15
Figura 2. a) Estructura del grafito, b) Láminas de grafeno.	16
Figura 3. Estructuras de moléculas de fullerenos.	17
Figura 4. Representación de la formación de fullerenos y CNTs a partir de hojas de grafeno.	19
Figura 5. Representación esquemática de: a) Enrollamiento de una lámina de grafeno, b) la elongación de un fullereno, c) del cierre espontáneo de la terminación de un SWCNT de diámetro estrecho por la formación de estructuras pentagonales en la terminación de la red y d) de un SWCNT.	20
Figura 6. a) Enrollamiento de hojas de grafeno, b) DWCNT, c) TWCNT d) distancia entre nanotubos, e) modelo de muñeca rusa, f) modelo de pergamino.	21
Figura 7. a) Esquematización del vector quiral (Ch) en una celosía de grafeno 2D, b) relación entre números enteros (n, m) y el carácter metálico o semiconductor de los CNTs, c) estructuras armchair, zigzag y quiral de los CNTs.	23
Figura 8. Imágenes de TEM del trabajo de Oberlin, Endo y Koyama en su artículo publicado en 1976 “Filamentous growth of carbon through benzene decomposition” ..	24
Figura 9. MWCNTs presentado por S. Lijima et al.	26
Figura 10. SWCNT presentado por S. Lijima et al.	27
Figura 11. SWCNT presentado por D.S. Bethune et al.	28
Figura 12. Cámara del diodo láser.	41
Figura 13. Imán de neodimio grado 35.	42
Figura 14. a) Plataforma láser diseño finalizado, b) El sistema después de mantenido encendido una hora sin mostrar calentamiento y c) Placa de cultivo de 96 pocillos de prueba sobre la plataforma láser, el haz de luz centrado en uno de los pocillos, con la totalidad del área del fondo del pozo radiado por el haz de luz láser.	50
Figura 15. a) Esquema del sistema de imanes giratorios, b) Sistema de imanes giratorios concluido.	52
Figura 16. Los imanes puestos a girar a 1000 rpm utilizando un tacómetro láser digital de no contacto.	53
Figura 17. Diluciones en serie 1:1 de oxMWCNTs a partir de 100 µg/mL, con concentraciones finales de 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL. (De izquierda a derecha).	55

Figura 18. Diluciones en serie 1:1 de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$, con concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 $\mu\text{g/mL}$. (De derecha a izquierda, respectivamente).	56
Figura 19. Micrografías por SEM de a) oxMWCNTs 1000x, b) oxMWCNTs 25000x. Se observa una buena dispersión de los oxMWCNTs por depósito de una película delgada de los nanotubos claramente distinguible en b).	58
Figura 20. Micrografías por SEM de a) oxMWCNTs/PF-127 recubiertos 1000x, b) oxMWCNTs/PF-127 recubiertos 25000x. Se observa a los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos dispersos en forma de pequeños paquetes de nanotubos claramente distinguible en b).	59
Figura 21. Micrografías por TEM de a) MWCNTs vírgenes de longitud fuera de campo; b) oxMWCNTs longitud 1 a 2 μm ; c) oxMWCNTs/PF-127 longitud 1 a 2 μm	61
Figura 22. Micrografías por TEM de, a) MWCNTs vírgenes y, b) oxMWCNTs desnudos.	62
Figura 23. Micrografías por TEM de, a) oxMWCNTs/PF-127 embebidos en polímero y, b) oxMWCNTs/PF-127 lavados (PF-127 recubiertos).	63
Figura 24. Micrografías por TEM de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos y lavados. Dimensiones aproximadas de diámetro interior de 11.20 nm, ancho de las paredes de 10.50 nm y 1.49 de recubrimiento polimérico.	64
Figura 25. Micrografía por TEM de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos y lavados. Se señala la región de las paredes de donde se origina el patrón de difracción a partir de la FFT de la imagen.	65
Figura 26. Micrografías TEM de MWCNTs. a) vírgenes, b) oxidados, c) PF-127 recubiertos. Se aprecia el alto grado de defectos en las paredes en cada etapa del tratamiento, con un espaciamiento mayor entre paredes con defectos.	67
Figura 27. Regiones de impurezas de a) MWCNTs vírgenes, b) de oxMWCNTs y c) EDS de la región de impureza de los MWCNTs.	68
Figura 28. Micrografías por AFM/MFM. 1) Topografía 3D, 2) Topografía 3) Detección de dominios magnéticos por cambio de frecuencia de trabajo. a1, 2) oxMWCNTs/PF-127 embebidos, a3) ningún cambio de frecuencia relacionados con propiedades magnéticas. b1, 2) oxMWCNTs/PF-127 recubiertos, b3) muy poca respuesta por cambio de frecuencia relacionados con propiedades magnéticas y c1, 2) oxMWCNTs desnudos, c3) considerable cambio en la frecuencia de trabajo relacionados con propiedades magnéticas.	69

Figura 29. DRX de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos. El patrón de difracción muestra picos en $2\theta = 19^\circ$, $2\theta = 23^\circ$ y $2\theta = 26^\circ$. En estudio.....	72
Figura 30. Efecto de la radiación láser sobre suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 para las concentraciones de: a) 12.5 $\mu\text{g/mL}$, b) 25 $\mu\text{g/mL}$, c) 50 $\mu\text{g/mL}$ y d) 100 $\mu\text{g/mL}$, e) 250 $\mu\text{g/mL}$ y c) 500 $\mu\text{g/mL}$ durante tiempo continuo de 2 min.	73
Figura 31. Efecto de la radiación láser sobre suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 para las concentraciones de: a) 1000 $\mu\text{g/mL}$, b) máximo de temperatura a todas las concentraciones usadas después de 2 minutos de radiación láser y c) representación lineal de comportamiento de la temperatura a todas las concentraciones usadas.....	74
Figura 32. Viabilidad celular después de la exposición de la línea celular HeLa a concentraciones de diluciones 1:1 de suspensiones de oxMWCNTs desnudos a partir de 3.14 $\mu\text{g/mL}$ hasta 100 $\mu\text{g/mL}$	76
Figura 33. Viabilidad celular después de la exposición de la línea celular HeLa a concentraciones de diluciones 1:1 de suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ hasta 3.14 $\mu\text{g/mL}$	77
Figura 34. Imágenes de células HeLa tratadas con oxMWCNTs/PF-127: a) control de células sin MWCNTs/PF-127, b) 12.5 $\mu\text{g/mL}$, c) 50 $\mu\text{g/mL}$, d) 100 $\mu\text{g/mL}$	79
Figura 35. Imagen de los cristales de formazan en células HeLa después de 48 horas de expuestas a MWCNTs a las concentraciones de a) 6.5 $\mu\text{g/mL}$, b) 12.5 $\mu\text{g/mL}$, c) 25 $\mu\text{g/mL}$ d) 50 $\mu\text{g/mL}$ e) 100 $\mu\text{g/mL}$ después de 4 horas de contacto con el reactivo MTT.....	80
Figura 36. Viabilidad celular después del tratamiento láser en presencia de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos frente a la línea celular HeLa.	84
Figura 37. Viabilidad celular en la línea tumoral HeLa a) control de células expuestas y no al campo magnético giratorio sin ningún tratamiento adicional, b) células después del tratamiento con el campo magnético en presencia de oxMWCNTs/PF-127.....	86
Figura 38. Viabilidad celular después del tratamiento con el campo magnético en presencia de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos. Los datos corresponden a la normalización de la viabilidad celular a partir del porcentaje de proliferación del grupo control con oxMWCNTs/PF-127 recubiertos sin campo magnético (porcentaje de células viables que resultan de la citotoxicidad intrínseca de MWCNTs).....	88

OBJETIVOS

Objetivo general

- Estudiar el efecto en células HeLa de las propiedades ferromagnéticas y fototérmicas de nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados, radiados con láser y expuestos a campos magnéticos giratorios.

Objetivos específicos

- Diseñar y construir una plataforma para placas de cultivo celular de 96 pozos que cuente con un haz láser de 808 nm y 1 W/cm^2 de potencia.
- Diseñar y construir un equipo capaz de generar campos magnéticos giratorios controlados sobre contenedores de cultivos de líneas celulares.
- Llevar a cabo una dispersión homogénea de MWCNTs vírgenes en medio acuoso a través de oxidación y recubrimiento con polímero biocompatible.
- Inducir muerte de la línea celular cancerígena HeLa en cultivo en presencia de MWCNTs utilizando los equipos construidos para explotar sus propiedades físicas.

INTRODUCCIÓN

En años recientes la física transita hacia horizontes donde los desafíos abiertos suponen en muchos aspectos nuevas revoluciones científicas en muy diversas áreas. La física, en su faceta multidisciplinaria se vale de innumerables recursos intelectuales al mismo tiempo que los impulsa para la exploración colectiva de los fenómenos. De esta forma la ciencia y la tecnología se han nutrido de la suma de los conocimientos y las herramientas modernas de cada disciplina científica guiadas por el entorno en el que se desenvuelven para empujar las fronteras del conocimiento hacia una comprensión cada vez más profunda, desde el origen hasta la evolución de los mecanismos que gobiernan la complejidad de los fenómenos. Hoy en día, el nivel de experimentación en los diferentes campos de la ciencia ha alcanzado grados de sofisticación en otros tiempos inimaginables precisamente por el entrelazo que ahora con más fuerza existe entre las diferentes áreas científicas con la física.

La aplicación de los principios de la física a la medicina es tan estrecha que la práctica médica de estos tiempos no podría prescindir de las técnicas básicas y específicas de la física. Los cambios en medicina a partir de los descubrimientos en física por ejemplo, permitieron conocer el interior del cuerpo humano de forma no invasiva. Hoy se encuentran en la batería de pruebas diagnósticas, técnicas de imagen no invasivas (radiografía, ultrasonido, resonancia magnética, tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones, etcétera.) que no tendrían lugar sin la conjunción, no sólo de la física en la medicina, sino que ha sido esencial para el desarrollo de estas técnicas la participación de las diferentes áreas de especialidad médico-biológicas con áreas de investigación como matemáticas, computación, ingenierías, etcétera.

Actualmente la participación de la física en medicina no se limita como anteriormente se hacía, a lo referente a diagnóstico por imágenes únicamente, ahora también juega un importante papel en el tratamiento de enfermedades. Además, se ha convertido en un elemento principal en programas de escrutinio para la detección temprana, así como en la planificación de tratamientos de enfermedades y, en la obtención de información sobre la respuesta al tratamiento.

Un área emergente de la ciencia, que no corresponde a una rama de la física, química, biología ni de alguna otra ciencia, pero, en donde todas estas se han visto

converger, es la nanociencia. La nanociencia se ha convertido en un importante campo científico con entidad propia, de la cual se desprenden otras ramas, entre ellas la nanomedicina, que comprende aquellas prácticas médicas basadas en interacciones con materiales, estructuras o dispositivos de propiedades que se manifiestan en la escala nanométrica. En esta nueva apertura de posibilidades de la medicina de ordinario juega un papel sumamente importante la física.

La investigación científica de materiales nanoestructurados en medicina ha generado gran variedad de potenciales aplicaciones en oncología. Se han propuesto diversos nanomateriales con características óptimas para ser utilizados en el desarrollo de nuevas herramientas en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Los nanotubos de carbono (CNTs por sus siglas en inglés) son una clase de nanomateriales que han generado un interés importante y se han sometido a constante investigación en torno a estas potenciales aplicaciones oncológicas dadas sus propiedades físico-químicas únicas. De entre sus propiedades, las que destacan para este propósito son: gran estabilidad química y térmica, facilidad de modificación química, farmacocinética maniobrable e interacciones celulares deseables.

En esta tesis se revisará la situación actual de la terapia convencional del cáncer, mencionando los avances que existen a la fecha, así como los pros y contras de cada tipo de terapia. A continuación, se subrayan los principales inconvenientes, de forma introductoria hacia la justificación de este tipo de investigación.

Como veremos en adelante la terapia convencional del cáncer se cimienta básicamente en la quimioterapia, la radioterapia, la cirugía y sus combinaciones. La cirugía después de la detección oportuna de los cánceres sólidos sigue desempeñando un papel decisivo en la supervivencia de los pacientes y supone en muchos casos la única vía de remisión total. Sin embargo, con el fin de evitar el desarrollo de tumores posquirúrgico a causa de recidivas de tejido tumoral, la cirugía oncológica se vale de la resección de la mayor cantidad de tejido potencialmente involucrado, incluyendo así parte del tejido normal adyacente al tumor. Por lo que en algunos casos trae consigo serio desfiguramiento, entumecimiento, pérdida de la locomoción, entre otros.

En etapas tempranas de algunos tipos de cáncer, los quimioterapéuticos radiosensibilizantes en combinación con la radioterapia suele preferirse antes que la cirugía, porque puede así conservarse la función del órgano (como laringe o ano). Sin

embargo, la mayoría de los tratamientos quimioterapéuticos modernos contra el cáncer aun cuando se han conseguido especificidad hacia células de características cancerígenas, muchas otras células sanas comparten esas características, por lo que siguen presentando efectos secundarios sistémicos considerables, además van encaminados a inducir a la célula cancerígena a su propia muerte, propiciando con esto la evolución de clones de la célula con fenotipos resistentes al tratamiento.

Por otra parte, la terapia con radiación se basa en la irradiación local del tumor sin excluir tejido sano adyacente, cuyo volumen a irradiar es normalmente comparable al volumen de escisión quirúrgico, fundamentado esto en que las células sanas presentan menor radiosensibilidad y son capaces de reparar las lesiones producidas por la radiación y por tanto ocurre mayor cantidad de muerte de células cancerígenas que afectación a células sanas. Entre los efectos adversos menos deseables que se pueden presentar en los tejidos sanos adyacentes al tumor tras la irradiación son los efectos tardíos, que pueden presentarse como nuevos cánceres producto de la irradiación misma.

De aquí que exista un interés creciente en la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas contra el cáncer que brinden alternativas a la cirugía con el mismo o mayor efecto y potencial terapéutico que está, pero que posean un perfil mínimamente invasivo. Entre estas investigaciones, algunas han sido orientadas a desarrollar técnicas terapéuticas que permitan superar las tolerancias físicas de las células cancerígenas, consiguiendo una respuesta citotóxica independientemente de su diversidad fenotípica.

Este enfoque alternativo de terapia del cáncer no es nuevo, se conoce por ejemplo, desde el siglo XVIII el tratamiento térmico local (70°C) y terapia térmica de cuerpo entero (41-47°C), que se sabe, provoca por hipertermia, muerte celular por daño irreversible debido a la desnaturalización proteica y alteración de la membrana celular. No obstante estos tratamientos térmicos dañan así mismo los tejidos sanos.

En este contexto, la evidencia que presenta la investigación científica en la corriente nanotecnológica con su carácter multidisciplinar ha generado gran variedad de aplicaciones potenciales. Hasta ahora, la literatura científica en este tema presenta un panorama aparentemente inagotable de posibilidades con el descubrimiento y/o estructuración de cada vez más materiales a nivel nanométrico y el develamiento de sus nuevas y variadas propiedades, así como la posibilidad de alterarlas o conjugarlas para

propósitos específicos por la gran posibilidad de modificaciones a los que son susceptibles. Donde han destacado por sus múltiples funcionalidades los CNTs.

Aprovechándose de las extraordinarias propiedades de la materia en escala nanométrica para fines terapéuticos, esta nueva rama de la ciencia abre las posibilidades de aplicación en la ciencia médica con lo cual es posible centrar la atención en la búsqueda de nuevas terapias que comprometan únicamente a las células cancerígenas minimizando con esto efectos no deseados postratamiento.

CAPÍTULO 1. NANOTUBOS DE CARBONO Y CÁNCER

I. Cáncer

1. Epidemiología

EL cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Un estimado del 2012 calcula que cada año se diagnostican alrededor de 14 millones de personas con cáncer en el mundo, una cifra que se prevé que aumente hasta los 22 millones anuales en los próximos dos decenios. En cuanto a las muertes por cáncer, se prevé aumenten desde los aproximadamente 8.2 millones de casos anuales en 2012 hasta los 13 millones de casos anuales en el mismo periodo.

En este mismo año, los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial fueron: cáncer de pulmón (1.8 millones de casos, 13.0%), de mama (1.7 millones, 11.9%) y cáncer colorrectal (1.4 millones, 9.7%). Los tipos de cáncer que provocaron un mayor número de muertes fueron: cáncer de pulmón (1.6 millones, 19.4%), hígado (0.8 millones, 9.1%) y estómago (0.7 millones, 8.8%).

Los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer. Las primeras causas de mortalidad en varones fueron los tumores de: próstata (15.6%), bronquios y pulmón (15.6%), estómago (9.4%), hígado (7.5%) y páncreas (4.8%); y en las mujeres fueron tumores de: mama (12.7%), hígado (8.3%), estómago (7.9%), cervicouterino (7.2%), y bronquios y pulmón (7%).

Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, representa la causa del 22% de las muertes mundiales por cáncer en general, y el 71% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón.

Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por virus del papiloma humanos (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios.

Importante en el incremento de la incidencia del cáncer es el envejecimiento de la población, que conduce a un proceso donde las enfermedades transmisibles son remplazadas por enfermedades crónico-degenerativas. Como consecuencia de esto, los países en desarrollo se ven afectados desproporcionadamente por el incremento de la incidencia del cáncer. Más del 60% de todos los casos del mundo se producen en África, Asia, América Central y América del Sur, y estas regiones registran aproximadamente el 70% de las defunciones por cáncer a nivel mundial, una situación que se agrava por la falta de mecanismos de detección precoz y de acceso a tratamientos.

El cáncer representa un problema de salud pública. Aunque es usualmente reconocido como un problema en los países desarrollados, más de la mitad de los casos de cáncer en el mundo se observan en las tres cuartas partes de la población que habita en los países en desarrollo. En el ámbito mundial ocupa el segundo lugar en mortalidad en estos países, ubicándose detrás de las enfermedades cardiovasculares.

Las cargas crecientes de cáncer ejercen sobre los sistemas de atención de salud una carga insostenible. En 2010, se calcula que el costo económico anual total del cáncer alcanzó aproximadamente los 1.16 billones US\$.

2. Descripción general

El cáncer es una enfermedad de presentación multifacética que comprende un grupo muy heterogéneo de enfermedades malignas que afectan a diferentes órganos. Hay por ejemplo, dentro del cáncer mamario (afectación cancerígena más común en la mujer adulta) y testicular (afectación cancerígena más común en varones jóvenes), por el tipo de célula y estructura involucrada, 4 tipos principales de cáncer en seno y 3 tipos principales de cáncer en testículo, los cuales comprenden a su vez varios subtipos. Como otro ejemplo, dentro de los cánceres hematológicos (cáncer de manifestación indistinta del sexo) se encuentran 3 diferentes grupos que encierran a distintos tipos y subtipos de variantes de cáncer.

Así, según su localización en el cuerpo, el tipo de estructura y célula involucrada, cáncer es un término genérico para designar tal vez unas 200 distintas entidades. Las llamamos cáncer porque comparten en común todas sus variantes un factor biológico fundamental: el crecimiento anormal de las células.

Desde el punto de vista biológico es un trastorno esencialmente genético, caracterizado por desregularización de la normalidad en el ciclo de vida celular. En la normalidad, las células como parte de su ciclo de vida crecen, se dividen y mueren en una forma controlada según sean los requerimientos de mantenimiento del cuerpo. Este ciclo es orquestado por complejos mecanismos genéticos que regulan un número limitado de replicaciones, después de las cuales la célula entra en un programa de muerte programada. Además, si se detecta un daño importante por un agente externo en la integridad de la célula por el que esta deje de actuar correctamente también se le induce ese programa y se le obliga a morir. Cuando este proceso ordenado se descontrola las células no mueren cuando deberían morir y células nuevas se forman cuando el cuerpo no las necesita.

El cáncer es el resultado del fallo acumulado de muchos de estos mecanismos desencadenados por mutaciones, cambios en el ADN que afectan específicamente a los genes encargados de mantener el equilibrio entre el nacimiento y muerte celular. En una célula cancerosa estos circuitos se rompen, por lo que ésta no puede dejar de dividirse y pierde la capacidad de morir.

Hoy sabemos que el cáncer es una enfermedad causada por el crecimiento sin control de una sola célula que conduce al desarrollo de clonas capaces de diseminarse e invadir otras partes del cuerpo a través del sistema sanguíneo y el sistema linfático, destruir tejidos adyacentes o distantes, que según su evolución natural conduce al deterioro de órganos vitales y por último a la muerte.

3. Clasificación

Los diferentes tejidos corporales dan lugar a diferentes tumores. El cáncer puede aparecer en cualquiera de los tejidos del cuerpo, siendo más vulnerables aquellos tejidos que derivan de células en constante división. Para fines prácticos y de este trabajo, los diferentes tipos de cáncer pueden agruparse como tumores sólidos, que corresponden a la presencia de una masa sólida formada por células neoplásicas ubicada en cualquier sitio anatómico y, cánceres líquidos que corresponden a la presencia de glóbulos blancos neoplásicos en sangre, son cánceres de la médula ósea.

4. Causalidad

Los agentes etiológicos, causa directa de la transformación maligna, son los responsables de alterar diversos mecanismos genéticos y bioquímicos. Estos agentes afectan los genes que participan en el control de la proliferación celular (protooncogenes

y genes supresores), sin embargo, una segunda clase de agentes no altera los genes, pero potencia selectivamente el crecimiento de las células neoplásicas. Los primeros agentes son iniciadores, y los segundos promotores. Los agentes iniciadores actúan a través de mutaciones. En cambio, los agentes promotores no inducen mutaciones, pero aceleran la proliferación de células mutadas como lo harían las células normales en ciertas condiciones, por ejemplo: los estrógenos en el endometrio, los andrógenos en el cáncer prostático o la hormona estimulante del tiroides en el cáncer tiroideo bien diferenciado. La presencia de estos agentes no es esencial para la transformación maligna, pero la consolida y promueve su desarrollo.

En esencia, para la iniciación, es necesario que la célula acumule y perpetúe varias mutaciones para superar los mecanismos de oposición a la proliferación y, de este modo permitir a la célula y sus descendientes ventajas proliferativas sobre las células normales. No obstante, se requiere para distinguirse como neoplasia maligna, otras mutaciones adicionales que posibiliten a las células a emigrar y diseminarse, produciendo metástasis para finalmente deteriorar los órganos vitales y producir la muerte del individuo.

A la fecha se han identificado varios agentes etiológicos individuales importantes, entre ellos el tabaco, aunque los detalles aún esperan dilucidarse. Otros factores relevantes incluyen los rayos ultravioleta de la luz solar en el desarrollo de cáncer de piel o las radiaciones ionizantes, capaces de influir en el proceso de muchos tipos de cáncer, y los virus, como el virus del papiloma humano (VPH) que se sabe es el principal responsable del desarrollo del carcinoma cervicouterino. Además el envejecimiento y otros procesos vitales también contribuyen, generando radicales libres y fragmentos de moléculas con reactividad química, que al reaccionar con el ADN dañan y mutan genes.

Otro factor importante es la herencia por mutaciones germinales, los cuales se estima que producen el desarrollo de <5% de los cánceres. No obstante, también rasgos generales como la piel clara, abundantes lunares y otros incrementan las posibilidades de desarrollar cáncer a través de la repetida exposición a agentes mutagénicos.

5. Terapias convencionales

5.1. Cirugía

La cirugía es el tipo más antiguo de terapia contra el cáncer y, en la actualidad, a pesar de los avances de la radioterapia, las quimioterapias sistémicas, incluyendo las

terapias dirigidas a blancos moleculares, la cirugía sigue siendo el proceso al que se le atribuye mayor grado de efectividad en el tratamiento del cáncer. Se estima que la resección quirúrgica produce alrededor del 62% de las curaciones, favoreciendo esto el hecho de que la resección en etapas tempranas evita la transformación maligna. Además, también participa en la prevención, diagnóstico, evaluación de la extensión, tratamiento paliativo, rehabilitación de las secuelas y en la atención de ciertas complicaciones debidas a la evolución de la enfermedad o a los tratamientos previos.

La cirugía además permite estudiar la pieza quirúrgica y obtener información pronóstica, que acompañada de la detección temprana junto con la correcta y sincronizada combinación de tratamientos complementarios suele representar una terapéutica aditiva o sinérgica traduciéndose en una terapéutica más efectiva. Cuando se han documentado metástasis, la curación es poco probable, pero la cirugía aún puede ser un importante elemento paliativo e incluso, en casos muy específicos, cuando se dispone complementariamente de un tratamiento sistémico efectivo podría asociarse a curación.

Sin embargo el tratamiento quirúrgico a menudo origina secuelas y complicaciones. La cirugía oncológica causa alteraciones funcionales y estéticas de consideración. No obstante, su constante evolución permite practicar resecciones menos extensas, más precisas, con la conservación de órganos, extremidades y funciones, con menor morbilidad, conservando su capacidad curativa y deteriorando menos la calidad de vida.

En sentido paradójico, ese mejor conocimiento de los patrones de diseminación, el conocimiento biológico y el tratamiento multimodal también han conducido a cirugías más extensas y de alta complejidad que exigen que el cirujano oncólogo desarrolle habilidades especiales, así como el acompañamiento de un equipo humano multidisciplinario.

5.2 Radioterapia

En la radioterapia se usan radiaciones ionizantes, estas, por su alta energía son capaces de disociar moléculas como el agua, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Por lo tanto, los efectos de las radiaciones ionizantes sobre tejidos resultan de una afectación directa de las moléculas celulares, sobre todo por la formación de radicales libres que afectan el material genético rompiendo las cadenas de ADN. Su aplicación a células en

periodo de división provoca en una fracción de ellas, la pérdida de su capacidad de reproducción deteniendo su proliferación.

En respuesta a esta agresión, las células poseen sistemas de reparación a lesiones radioinducidas, de eficacia y rapidez variable, según el tipo celular en cuestión. Los mecanismos diferenciales de reparación entre células tumorales y células sanas son la base de la aplicación de las radiaciones ionizantes en la terapéutica humana.

Actualmente, la radioterapia es un elemento indispensable del tratamiento del cáncer. Se estima que la radioterapia da cuenta de un cuarto del total de curaciones de cáncer por los diferentes tratamientos existentes. La cirugía explica un poco más de la mitad del total de curaciones y las restantes son debidas a combinaciones de estos 2 tratamientos con o sin quimioterapia. A la quimioterapia por sí sola sólo se le atribuye el 4% del total de curaciones de cáncer.

La afectación a células sanas tras el tratamiento con radioterapia recae en particular en aquellas que se dividen rápidamente. Su principal efecto tóxico incide sobre la médula ósea por destrucción de su función debido al reemplazo del tejido normal por tejido graso y fibroso. Estos efectos secundarios se pueden ver en todos los tejidos de los órganos expuestos a la radiación, se originan por reacción inflamatoria celular y su más grave escenario son los efectos tardíos que se presentan como fibrosis con potencial carcinogénico.

5.3 Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico contra el cáncer ha sido desde sus inicios uno de los retos más complicados de abordar. Un tratamiento eficiente con quimioterapia requiere comprender a profundidad los principios del crecimiento tumoral y, la búsqueda o diseño de un fármaco con mecanismos de acción entrelazados al comportamiento bioquímico tanto tumoral como el de la normalidad celular. Es por esto, que incluso en estos días de marcada evolución científica en este tema, al tratamiento quimioterapéutico solo se le adjudica un porcentaje mínimo de las curaciones del cáncer.

Desde el punto de vista histórico, la quimioterapia se ha utilizado principalmente como tratamiento después de vislumbrada la ineficacia de las terapéuticas locales en los cánceres metastásicos. Sin embargo, hoy, gracias al producto de la investigación en

biológica molecular de los últimos 20 años, la quimioterapia tiene un papel curativo importante en el tratamiento de algunas neoplasias, en particular las hematológicas.

No obstante, se ha reconocido su potencial curativo en la administración conjunta a las técnicas de ablación local. Por esto, los quimioterapéuticos ahora se usan en la mayoría de los pacientes durante el tratamiento oncológico. Los regímenes específicos quimioterapéuticos para uso clínico consideran factores como la sensibilidad de las células neoplásicas, la farmacocinética, la farmacodinamia, la tolerancia de los tejidos normales que condiciona toxicidad, sobre todo a niveles hematológicos y gastrointestinales. Incluso efectos adversos tardíos que afectan al corazón, pulmones o riñones.

Estos regímenes están dirigidos a la destrucción de la masa tumoral mediante la administración de fármacos que impiden la reproducción celular, paralizando su crecimiento lesionando los ácidos nucleicos e interfiriendo en funciones biológicas vitales para el crecimiento y desarrollo celular, obteniéndose pérdida de su capacidad de replicación y transcripción. Las implicaciones finales conducen a modificaciones irreversibles de los sistemas de reparación con descodificación de oncogenes implicados en la apoptosis.

La principal desventaja a lo largo de su aplicación viene dada por su propia citotoxicidad. Durante el tratamiento se intercalan pausas necesarias (determinadas por estudios clínicos y experimentales previos) de descanso entre las sucesivas aplicaciones, para permitir la recuperación de la toxicidad general. Esto propicia también el restablecimiento del tumor y resistencia al tratamiento secundaria.

A diferencia de la cirugía y de la radioterapia, la quimioterapia es capaz de destruir, no sólo el tumor primario, sino también las metástasis ya establecidas así como las micrometástasis en tránsito hacia órganos distantes, pero también, las células sanas con características similares a las células tumorales a las que son dirigidas.

Esta información concerniente al capítulo introductorio relacionado a lo general en el tema de cáncer fue tomada y conjugada alrededor de todos los párrafos que conforman todo el texto de las siguientes referencias [1], [2], [3].

II. Nanotubos de carbono

1. El carbono

El carbono, es un elemento químico que se puede unir de diferentes maneras para crear estructuras con propiedades enteramente diferentes debido a la diferente hibridación que los átomos de carbono pueden asumir (sp , sp^2 y sp^3). A la fecha se le conocen alrededor de 40 alotropías, de las cuales las más estables de mayor a menor son: el grafito, el diamante y el fullereno (Figura 1) [4], [5].

Como herramienta útil hacia la descripción de los CNTs se describe brevemente el grafito y el fullereno.

El grafito está formado por láminas separadas entre sí por 3.35 Å completamente deslocalizadas y compuestas únicamente por la unión de carbonos con hibridación sp^2 conformando una red de anillos bencénicos fusionados (Figura 2a). En esta estructura, sólo tres de los electrones de valencias son compartidos covalentemente entre átomos vecinos en un plano y el cuarto electrón de valencia está permitido para ser deslocalizado entre todos los átomos. El tipo de unión (sp^2) construye una estructura en capas con fuertes lazos en el plano, y débil unión fuera del plano (fuerzas de Van der Waals) [4], [5].

A una lámina individual de grafito se le denomina grafeno y se considera un alótropo aparte. Esta conformación de espesor de únicamente un átomo formada por este arreglo de átomos de carbono presente en las láminas de grafito es definido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como "una sola capa de carbono de la estructura de grafito, describiendo su naturaleza, por analogía, a un hidrocarburo aromático policíclico". Sin embargo, el número de capas de grafeno es a menudo más de uno. Tal "grafeno" puede consistir en simples, pocos (dos a nueve capas), o incluso múltiples capas (≥ 10 capas) (Figura 2b) [11].

El fullereno no es una sola especie de estructura, la denominación representa al conjunto de estructuras cerradas que conforman los únicos sólidos moleculares en el conjunto de los materiales de carbono. Presentan una estructura curva cerrada (moléculas de carbono) con siempre un número par de átomos. Para formar esta estructura convexa, ciertos defectos topológicos tienen que ser incluidos en atención al principio de mínima energía, por lo que tienen que ser introducidos pentágonos en el plano de la celosía de

hexágonos de carbono para que la forma curva de los fullerenos tenga cabida. Así, como consecuencia del principio de Euler, se necesitan exactamente 12 pentágonos para proporcionar la curvatura topológica necesaria para cerrar completamente la red hexagonal. Por lo tanto, todos los fullerenos (C_{2n} (n-10) hexágonos) tendrán 12 pentágonos independientemente del número de hexágonos. Su estado de hibridación es intermedio entre sp^3 y sp^2 (el carácter sp^3 deriva de la curvatura del poliedro). El representante arquetípico de esta estructura del carbono es la molécula de C_{60} formada por la unión de 60 átomos de carbono en un arreglo semejante a un balón de fútbol clásico, con 20 anillos de benceno fusionados combinándose sobre sí mismos hasta adoptar una disposición esférica con las valencias sobrantes definiendo 12 pentágonos: una especie de icosaedro truncado de 60 vértices equivalentes (Figura 3) [5], [12], [13].



Figura 1. a) Grafito, b) Diamante, c) Fullerenos C₆₀. Rocas en bruto.

Tomadas de [6], [7], [8].

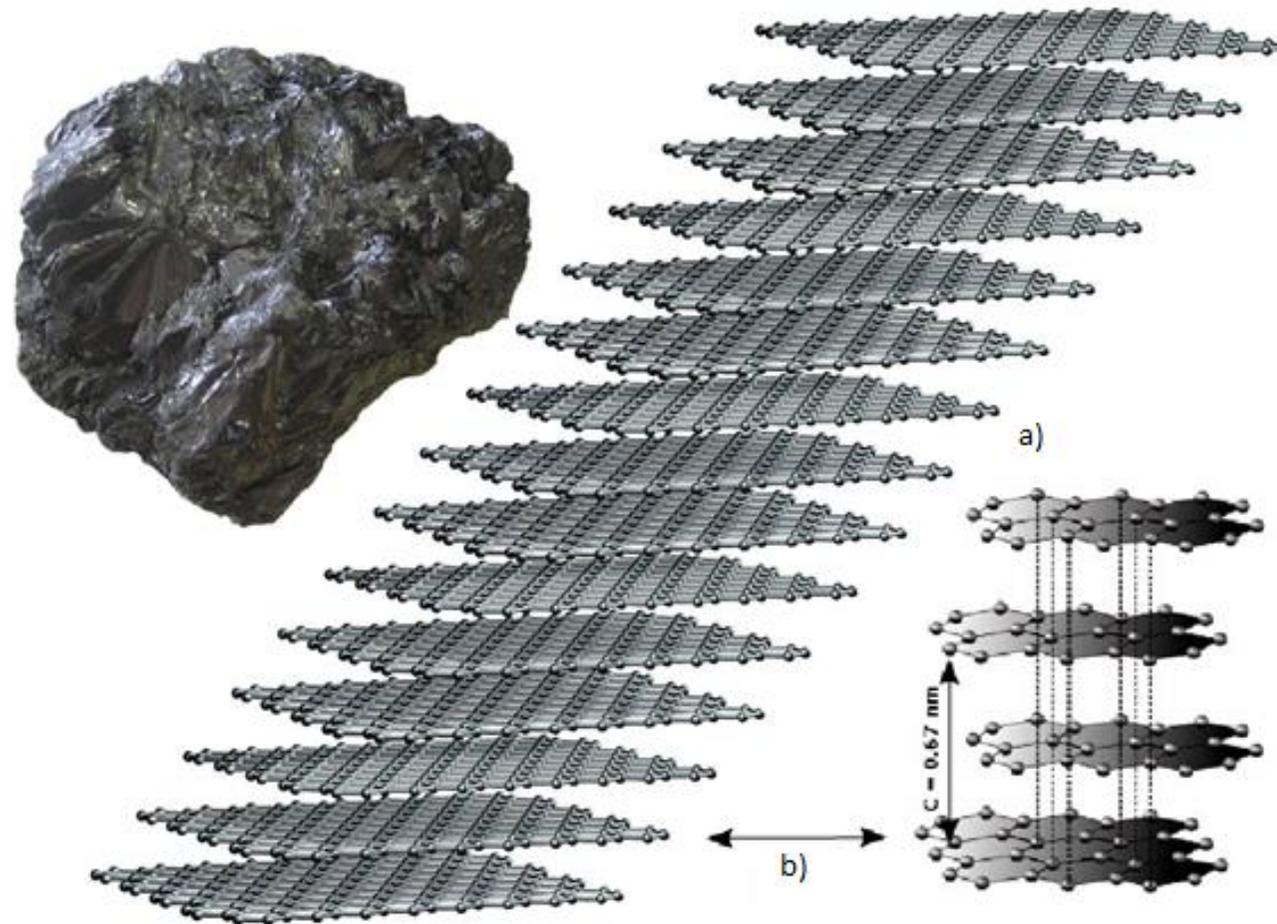


Figura 2. a) Estructura del grafito, b) Láminas de grafeno.

Modificada de [9], [10].

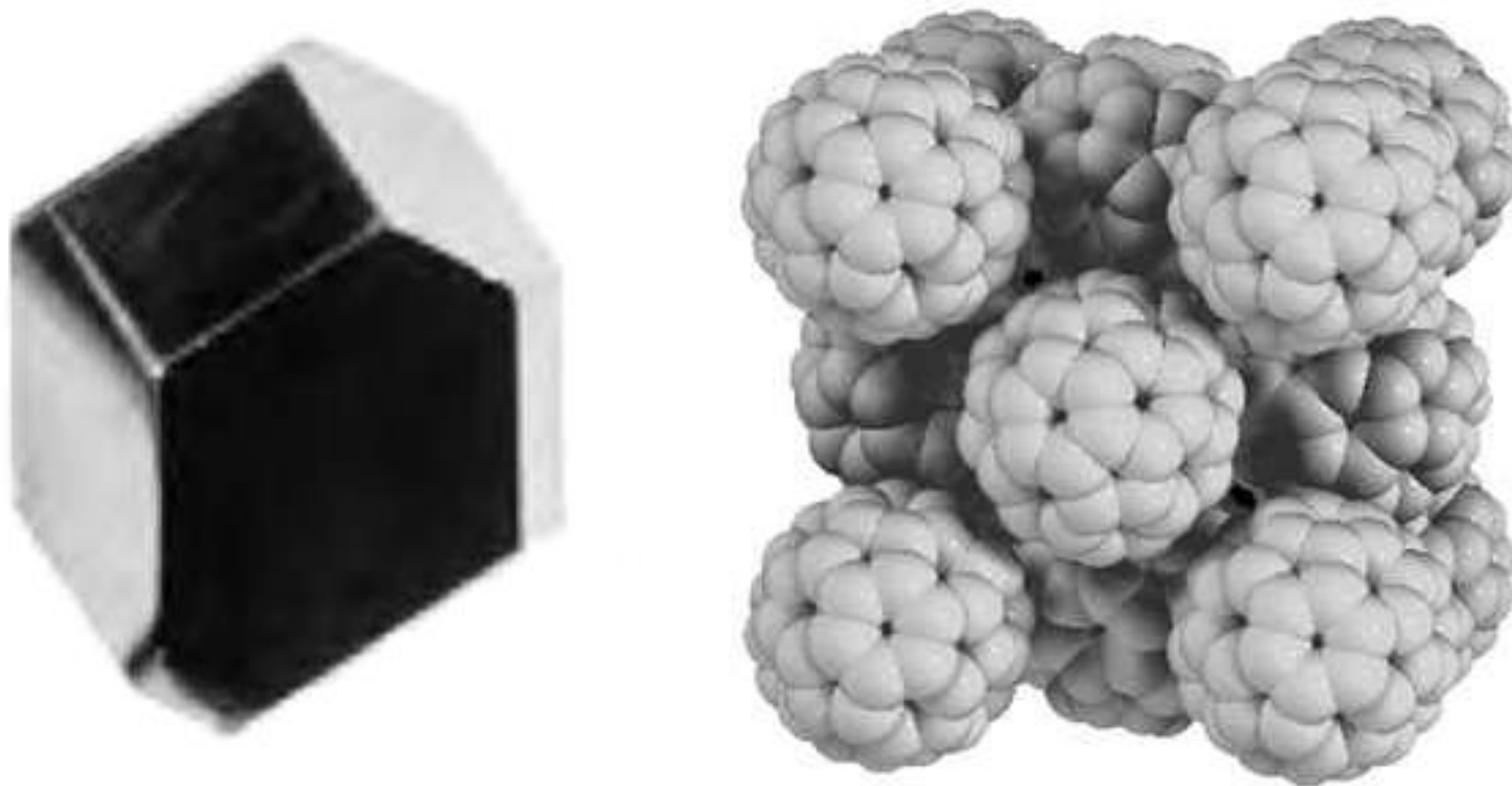


Figura 3. Estructuras de moléculas de fullereno.

Tomada de [14].

2. Los nanotubos de carbono

Los CNTs son una familia de materiales de carbono de diferentes estructuras tubulares con diámetro en el orden del nanómetro y longitudes que pueden ser impresionantemente largas en relación a su diámetro. En general se representan como arreglos tubulares de únicamente átomos de carbono dispuestos en una red policíclica de anillos bencénicos. Las propiedades de los diferentes tipos de CNTs dependen fuertemente de su diámetro y longitud, de las paredes de los mismos, así como de la quiralidad [4], [15], [16].

Puede concebirse tanto la formación de los fullerenos como de los CNTs a partir de hojas de grafeno (Figura 4) y del mismo modo, los CNTs teóricamente pueden construirse ya sea de la “elongación” (Figura 5a) de un fullereno o del enrollamiento de una lámina de grafeno (Figura 5b). Así, de la elongación de un fullereno se obtendría un nano tubo de una sola pared (SWCNT por sus siglas en inglés) con extremos cerrados, mientras que del enrollamiento de una lámina de grafeno se tendría un SWCNT extremos abiertos. Sin embargo se ha demostrado teóricamente que solo los SWCNTs con diámetros por encima de 3 nm siguen manteniendo una estructura hexagonal, mientras que los SWCNTs con diámetros por debajo de 3 nm forman en sus extremos curvaturas pentagonales espontaneas que conducen finalmente al cierre del SWCNT, lo mismo para los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs por sus siglas en inglés) (Figura 5c) [4], [17].

Los SWCNTs más estrechos tienen tal vez entre 10 y 40 átomos de carbono a lo largo de la circunferencia conformando un diámetro de alrededor de entre 0.5 y 1 nm y un arreglo de átomos a lo largo del eje del cilindro que puede ser muchos millones de veces más (longitud de micras) (Figura 5d) [16], [18]. Según el grado de enrollamiento de la lámina de grafeno se podrían obtener nanotubos de pared doble, triple o múltiple (DWCNTs, TWCNTs o MWCNTs) (Figura 6). Estos CNTs se describen según el modelo de muñeca rusa, es decir, láminas de grafeno dispuestas en cilindros concéntricos (SWCNTs dentro de SWCNTs más grandes) y, el modelo del pergamino, que es básicamente una sola lámina de grafeno enrollada en torno a sí mismo. La distancia entre capas en los nanotubos de pared múltiple está cerca de la distancia entre capas de grafeno en el grafito, aproximadamente 3.4 Å. La estructura de muñeca rusa se observa con mayor frecuencia [4].

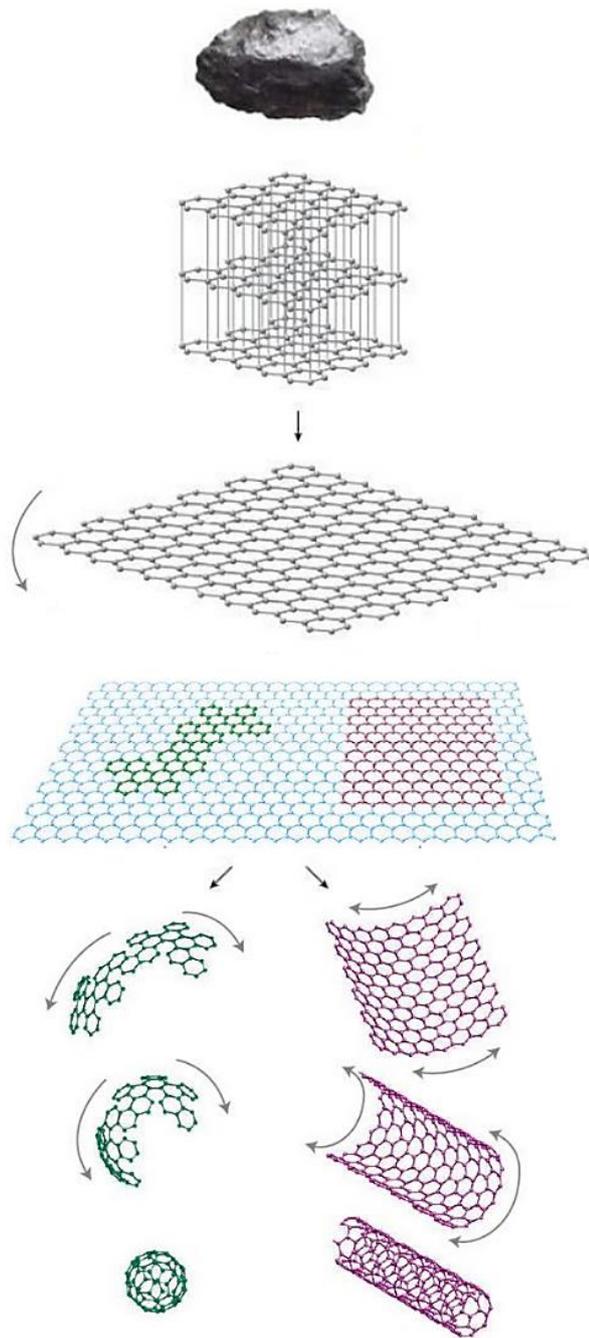


Figura 4. Representación de la formación de fullereno y CNTs a partir de hojas de grafeno.

Modificada de [19], [20].

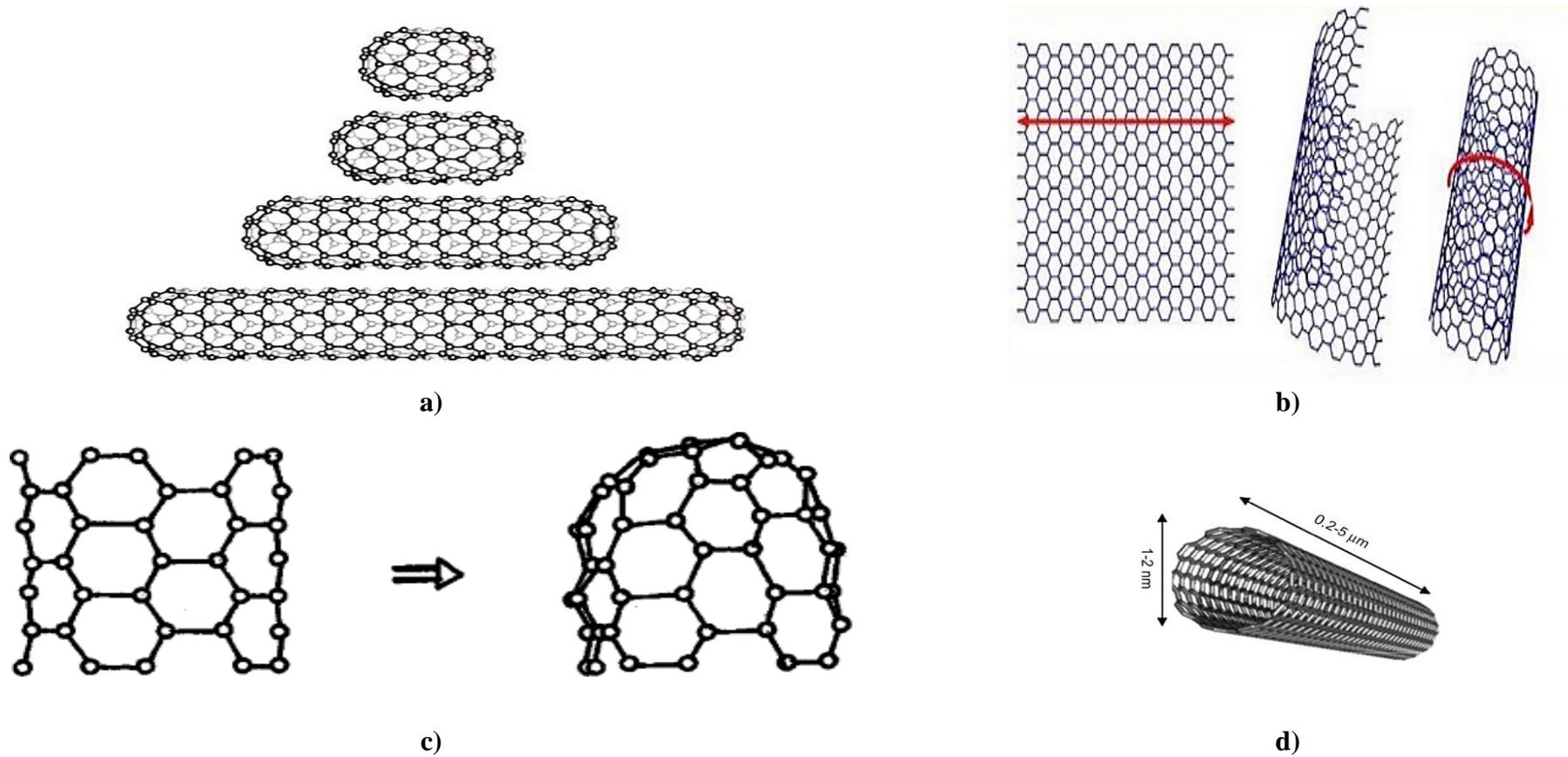


Figura 5. Representación esquemática de: a) Enrollamiento de una lámina de grafeno, b) la elongación de un fullereno, c) del cierre espontáneo de la terminación de un SWCNT de diámetro estrecho por la formación de estructuras pentagonales en la terminación de la red y d) de un SWCNT.

Tomadas y modificadas de [17], [21], [22], y [23].

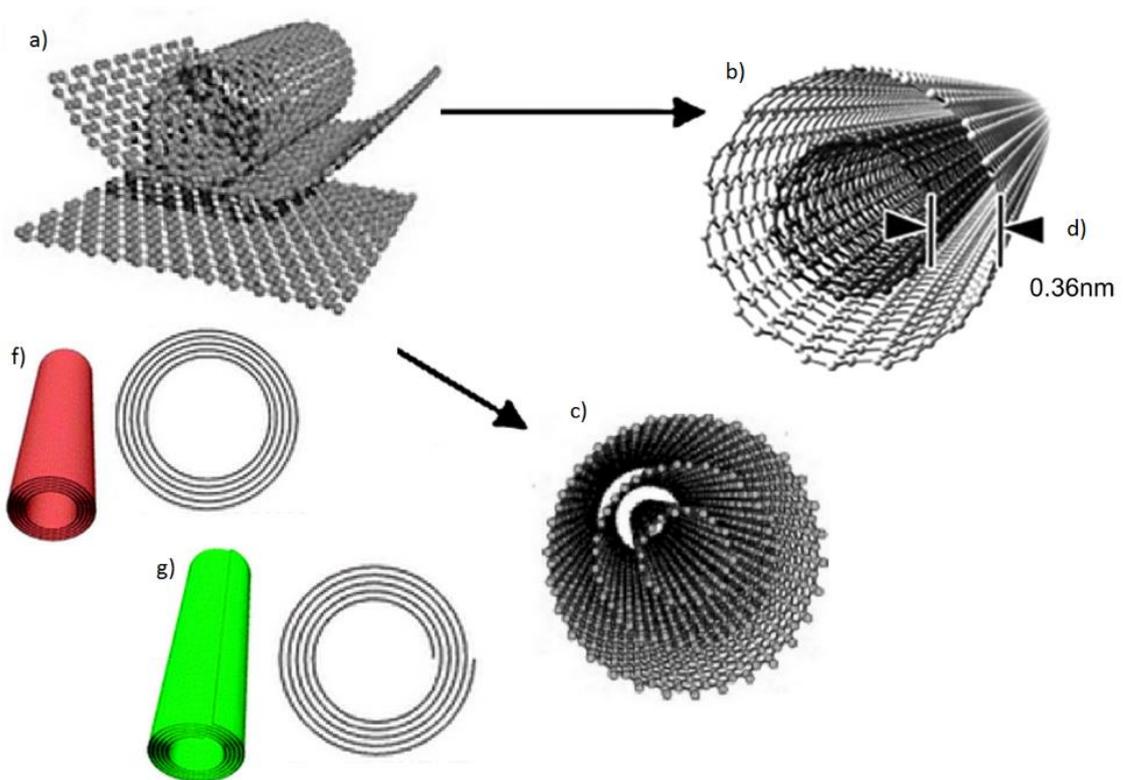


Figura 6. a) Enrollamiento de hojas de grafeno, b) DWCNT, c) TWCNT d) distancia entre nanotubos, e) modelo de muñeca rusa, f) modelo de pergamino.

Tomadas de [24], [25], [26].

Según la orientación del enrollado de la lámina de grafeno los CNTs pueden ser quirales y no quirales. Si los hexágonos localizados en los extremos del tubo están orientados en paralelo o perpendiculares al eje del tubo no son quirales y estas configuraciones se denominan “zigzag” y “armchair”, respectivamente. Todas las otras conformaciones, donde los enlaces C-C están en inclinación con el eje del tubo, se conocen como quirales o estructuras helicoidales. Los cálculos teóricos indican que todos los tubos del tipo armchair son metálicos, el resto son semiconductores (Figura 7) [27], [28].

Los primeros albores de la existencia de estas estructuras se presentaron en fotografía en 1976 por Oberlin, Endo y Koyama, quienes refieren en su trabajo el crecimiento por pirolisis a $\approx 1100^{\circ}\text{C}$ de una mezcla de $\text{C}_6\text{H}_6/\text{H}_2$ de lo que los autores llamaron filamentos o fibras de carbono (Figura 8). Sin embargo lo que mostraban sus fotografías por microscopia electrónica de alta resolución finalmente resultaron ser MWCNTs [29].

A este descubrimiento le preceden otros trabajos de diversos autores con numerosas descripciones de estructuras filamentosas de carbono, de pequeño diámetro y longitudes en una proporción a su diámetro gigantesca. Pero no fue posible su descripción en detalle debido a la baja resolución de la microscopia utilizada en años anteriores a la invención del microscopio electrónico de transmisión. Después de 1940, a la salida comercial del TEM y al afinamiento de su resolución, surgieron numerosos informes sobre la descripción de estas estructuras con las primeras evidencias de TEM de filamentos nanométricos de carbono de cavidad hueca [30].

A estos trabajos le siguió la descripción en 1985 de la molécula de fullereno por H. W. Kroto et al., en su trabajo titulado C_{60} buckminsterfullereno, llamada así la molécula en homenaje a Buckminster Fuller, el ingeniero inventor de la cúpula geodésica. Detalla la preparación intencionada de C_{60} por la técnica de ablación láser de grafito. El buckminsterfullereno fue la primera molécula de fullereno en ser descubierta y es la que se encuentra con mayor frecuencia en la naturaleza [5], [13].

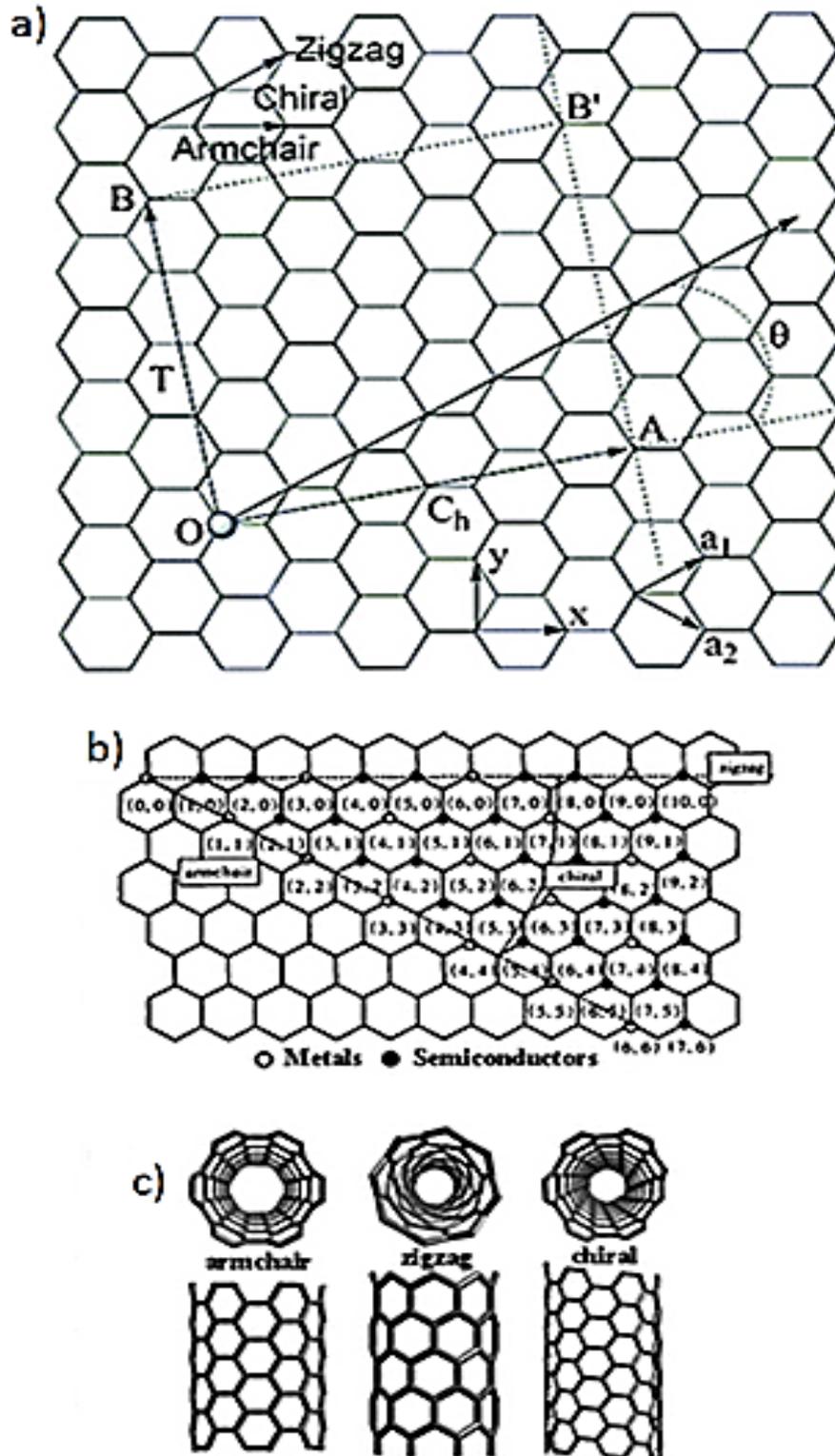


Figura 7. a) Esquematización del vector quiral (Ch) en una celosía de grafeno 2D, b) relación entre números enteros (n, m) y el carácter metálico o semiconductor de los CNTs, c) estructuras armchair, zigzag y quiral de los CNTs.

Tomada de [28].

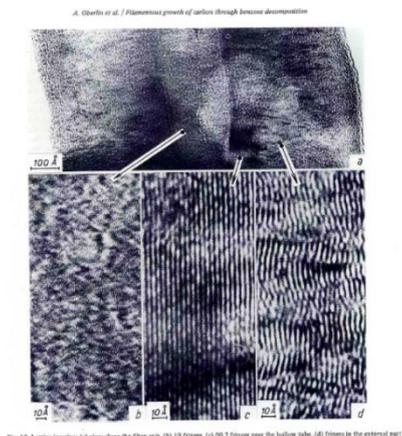


Fig. 10. Lattice images: (a) view along the fiber axis, (b) 00.2 fringes, (c) 00.2 fringes near the hollow tube, (d) fringes in the external part

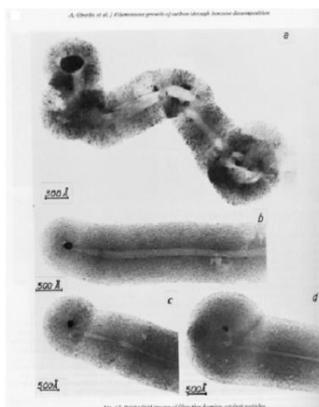


Fig. 13. Bright-field images of carbon fibers during oxidation particles. (a) shows the size and shape of the fibers, (b) shows the size of these particles widely varies as it can be seen in the figure in range.

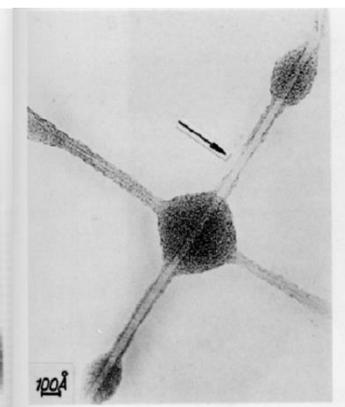


Fig. 11. Bright-field image of branched inhomogeneous fibres.

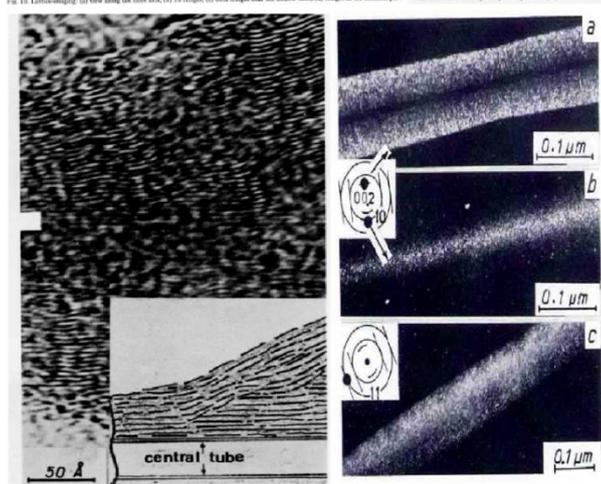


Fig. 7. Texture of a cylindrical fibre as shown by dark-field: (a) 00.2, (b) 10, (c) 11.

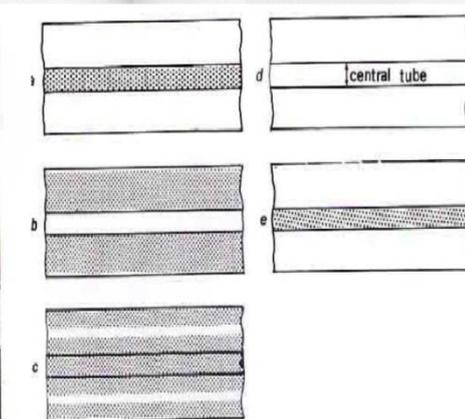


Fig. 6. Schematic representation of dark-field analysis of fig. 4.

Figura 8. Imágenes de TEM del trabajo de Oberlin, Endo y Koyama en su artículo publicado en 1976 “Filamentous growth of carbon through benzene decomposition”.

Tomadas de [29].

Finalmente la denominación de los CNTs se debe a las observaciones por S. Iijima de los MWCNTs en el año de 1991 (Figura 9), quien comparó las estructuras encontradas por él, con los fullerenos descritos 6 años atrás producidos por una ruta de síntesis similar. En su trabajo refiere el hallazgo de estructuras tubulares con diámetros en rangos de entre 4-30 nm y longitudes de hasta 1 μm , así mismo muestra fotografías de microscopía electrónica con nanotubos con diámetros que van desde los 5 hasta 7 nm compuestos por 2, 5 y 7 paredes de hojas de grafeno. Posteriormente, 2 años después, descubrimientos independientes hechos por el mismo S. Iijima en colaboración con T. Ichihashi de NEC (Figura 10) y por D.S. Bethune y un grupo de 6 colaboradores de IBM (Figura 11) mostraron las primeras fotografías de SWCNTs [31], [32], [33].

3. Síntesis de nanotubos de carbono

3.1. Descarga en arco eléctrico

Por este método fue reportado casi simultáneamente el crecimiento de SWCNTs en 1993 por Iijima et al., y Bethune et al., Iijima utilizó una cámara de arco de descarga lleno de una mezcla de gas de metano y argón. Dos electrodos delgados verticales en el centro de la cámara. El electrodo inferior, el cátodo, tenía un baño de hierro. La descarga de arco se generó mediante la ejecución de una corriente continua de 200 A a 20 V entre los electrodos. Por su parte Bethune utilizó como ánodos electrodos finos con agujeros taladrados que estaban llenos de una mezcla de metales puros en polvo (Fe, Ni o Co) y grafito. Los electrodos se vaporizan con una corriente de 95-105 A en atmósfera de He [17], [31], [33], [34].

En resumen, este método consiste en establecer una diferencia de potencial elevada a dos electrodos en un ambiente inerte, la diferencia de potencial produce un arco eléctrico entre ambos electrodos obteniéndose una temperatura local muy elevada con formación de plasma entre los electrodos. Al estar, el electrodo de grafito (ánodo) bajo la presencia del plasma, el carbono del grafito se sublima en átomos individuales que al auto ensamblarse en estas condiciones forman CNTs. Si el ánodo es de grafito puro, se obtienen MWCNTs, pero si contiene impurezas metálicas como en los experimentos de Iijima y Bethune se obtienen SWCNTs [35], [34].

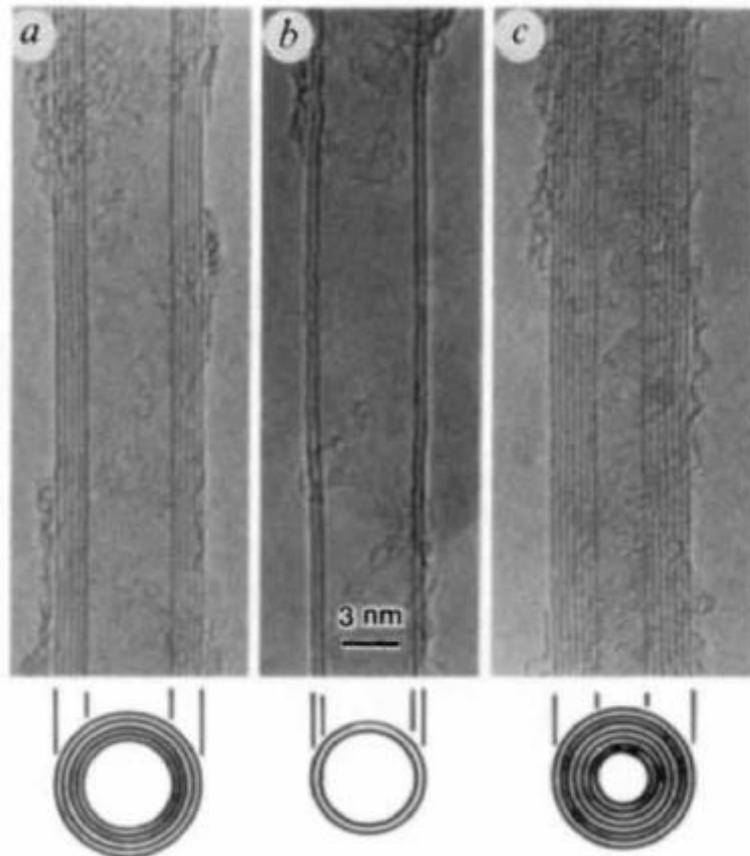


FIG. 1 Electron micrographs of microtubules of graphitic carbon. Parallel dark lines correspond to the (002) lattice images of graphite. A cross-section of each tubule is illustrated. *a*, Tube consisting of five graphitic sheets, diameter 6.7 nm. *b*, Two-sheet tube, diameter 5.5 nm. *c*, Seven-sheet tube, diameter 6.5 nm, which has the smallest hollow diameter (2.2 nm).

Figura 9. MWCNTs presentado por S. Lijima et al.

Tomada de [31].

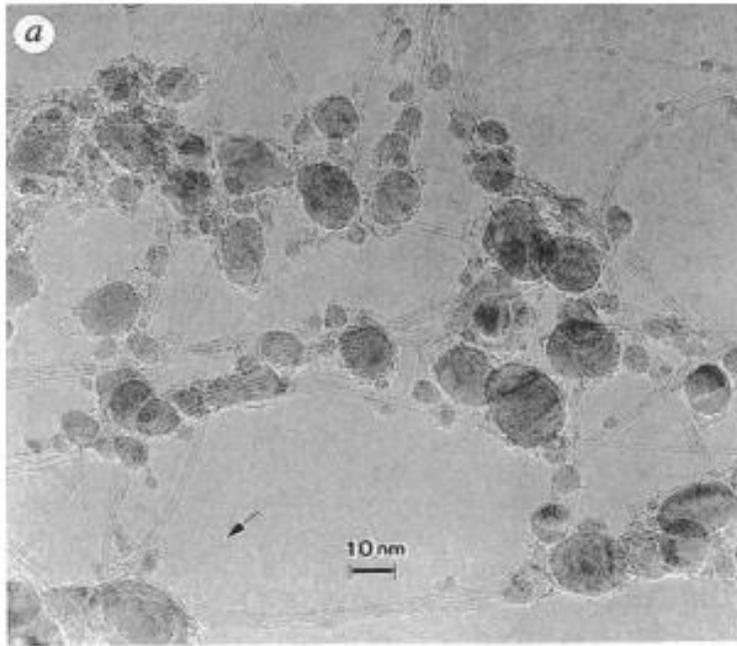


FIG. 1a. Electron micrograph showing bundles of single-shell carbon nanotubes which are curved and entangled. Dark blobs are cementite particles which assist in tubule growth. A terminated tubule is indicated by an arrow. *b*. Electron micrograph showing individual single-shell nanotubes. The tubule labelled 1 is 0.75 nm in diameter and tubule 2 is 1.37 nm in diameter. A straight tubule (3) and two terminated ones (4 and 5) can also be seen.

Figura 10. SWCNTs presentado por S. Lijima et al.

Tomada de [32].

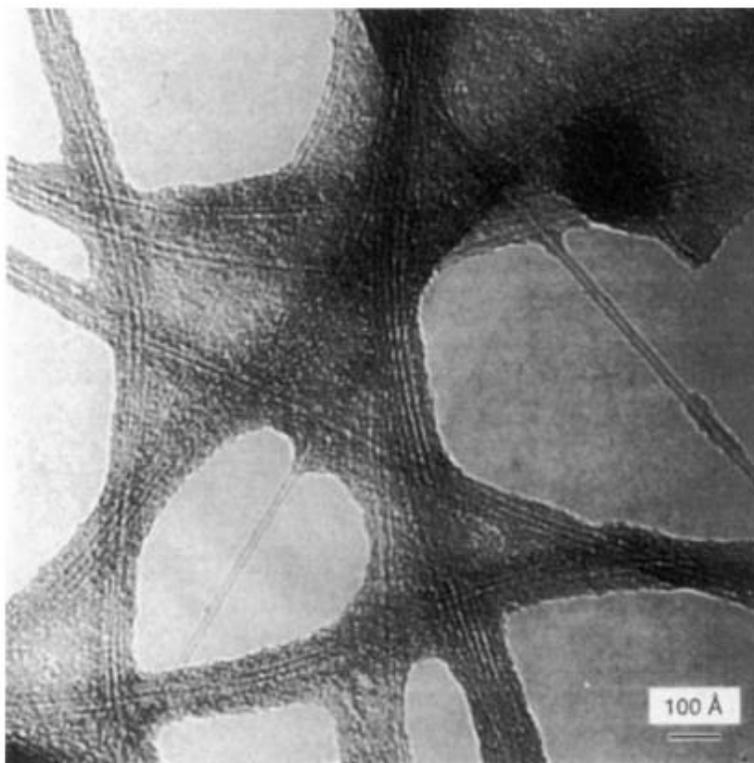


FIG. 2 TEM image at higher magnification showing details of the web-like material. Running through the deposited non-graphitic carbon are single-walled nanotubes about 1.2 nm in diameter. Bare portions of these nanotubes are also evident. The dark spot in the upper-right corner is a cobalt cluster.

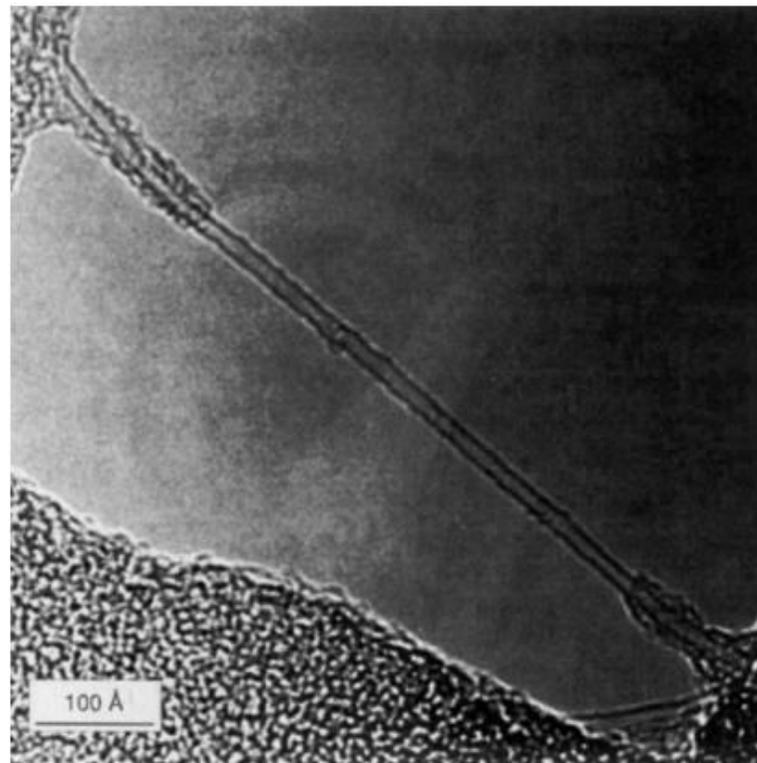


FIG. 3 TEM image of a bare section of a single-walled nanotube. The round objects adhering to the tube have diameters corresponding to fullerenes with 60–100 carbons.

Figura 11. SWCNTs presentado por D.S. Bethune et al.

Tomada de [33].

3.2. Ablación láser

Este método desarrollado por Smalley et al., en 1996 produce desde sus inicios altos rendimientos (<70%) de SWCNTs por ablación láser de barras de grafito con pequeñas cantidades de catalizadores metálicos (Ni y Co) a 1200°C. En este caso un haz de láser de alta intensidad vaporiza el objetivo, que es básicamente una mezcla de grafito y el catalizador de metal en un tubo horizontal en un flujo de gas inerte a presión controlada a $\approx 1200^\circ\text{C}$. Los nanotubos se forman al reorganizarse los átomos de carbono y son depositados en un colector refrigerado por agua fuera del horno. Por este método también se pueden producir MWCNTs en ausencia de catalizador metálico [17], [36], [37], [34].

3.3. CVD

La técnica de descomposición química de vapor CVD consiste en la descomposición de un catalizador en el interior de un reactor de tubo a 550-750°C con ayuda de gases hidrocarburos, por lo general de etileno o acetileno. Estos gases al estar en contacto con las nanopartículas catalíticas se descomponen en carbón elemental. El crecimiento de nanotubos de carbono sobre el catalizador viene después de enfriar el sistema por deposición de los átomos de carbono provenientes de la descomposición del gas hidrocarburo sobre el sustrato que contiene el catalizador. Los mejores resultados se obtuvieron con los mismos catalizadores que en las técnicas de descarga de arco y ablación por láser, Fe, Ni o Co en forma de nanopartículas [17], [34].

Existen 3 técnicas de CVD básicamente: el método del sustrato, donde el catalizador se deposita sobre un sustrato y a partir de éste crecen los nanotubos al hacer pasar por el reactor una fuente de carbono a temperaturas entre 300 y 1200°C (en una atmósfera inerte o con hidrógeno). El método de catalizador flotante, es un proceso que produce nanotubos de manera continua, aquí se introduce continuamente el catalizador en el reactor junto con el gas fuente de carbono. Por último, el método de reactor de lecho fluidizado, la ventaja de este método es que la transferencia del calor entre las partículas del lecho y los gases es excelente, por lo que el control de la temperatura es muy alto [17], [34].

3.4. Funcionalización de nanotubos de carbono

Los CNTs vírgenes se encuentran en paquetes poco solubles en disolventes orgánicos o acuosos debido a fuertes interacciones de Van der Waals entre tubos individuales. Dado que la mayoría de las propiedades únicas de los CNTs se manifiesta sólo cuando se encuentran individualizados, la introducción de entidades químicas en la superficie de los CNTs que puedan prevenir o disminuir las fuerzas de Van der Waals es crucial en muchas aplicaciones con el fin de aprovechar sus propiedades únicas [38].

Existen dos métodos principales para modificar CNTs: el método covalente y no covalente. El primero se basa en la unión covalente de grupos funcionales a los dobles enlaces C-C, mientras que el segundo se basa en las características de adsorción de moléculas capaces de sufrir apilamiento π - π [38].

La funcionalización covalente permite un alto grado de modificación química con especies químicas generalmente altamente reactivas. La reactividad del esqueleto poliaromático en los CNTs en comparación con grafeno planar se incrementa notablemente por la curvatura de la geometría cilíndrica, que genera la desalineación de los orbitales sp^2 . Por otra parte, la presencia de defectos y rugosidades en la periodicidad cristalográfica de la red hexagonal de los nanotubos dopados aumenta aún más la reactividad y ayudan a mejorar su funcionalización química para el anclaje de otras especies químicas o partículas [38], [39].

Hay una gama relativamente amplia de grupos funcionales que se pueden conectar ya sea a los extremos o las paredes laterales del CNT. Los extremos son más vulnerables por la curvatura más pronunciada por lo que tienden a reaccionar más rápidamente. Probablemente la reacción más empleada para funcionalización covalente de los CNTs es el tratamiento con ácidos fuertes oxidantes tales como HNO_3 (o mezclas de H_2SO_4/HNO_3) y H_2O_2 , que generalmente se combinan con sonicación o calentamiento. Este protocolo tiene la función de inserción de grupos carboxilo, carbonilo e hidroxilo que pueden servir como puentes útiles para anclar entidades más complejas, que abarca desde biomoléculas a derivados metálicos. Este tratamiento además se emplea para purificar los CNTs de los restos de catalizadores metálicos usados durante la fabricación. Además la oxidación deriva también en el acortamiento de los CNTs y en la apertura de las puntas. Por lo tanto, como los CNTs se abren, la cavidad interior queda accesible para la decoración interna de varias especies orgánicas o inorgánicas. Sin embargo para ciertas

aplicaciones, el daño producido en las paredes y extremos por el tratamiento con ácido no es deseado ya que puede modificar ciertas propiedades. Por fortuna actualmente existe un método por CVD de obtener MWCNTs funcionalizados con estos grupos, producto de la oxidación con ácidos fuertes pero sin daño al adicionar etanol directamente en la solución precursora de tolueno/ferroceno a utilizar para la síntesis de nanotubos mediante CVD [38], [40], [34].

La funcionalización covalente ofrece la ventaja de dejar la estructura poliaromática sin daño, como la adsorción de moléculas funcionales no se produce con la interrupción del sistema π conjugado extendido, sino a través de fuerzas de Van der Waals o de tipo interacciones electrostáticas, las propiedades electrónicas y ópticas originales de los CNTs están casi completamente preservados, que es un factor clave para las aplicaciones destinadas a la explotación de todo el potencial de los CNTs derivadas de tales propiedades. Sin embargo, el principal inconveniente es que debido a la naturaleza de las interacciones es inherentemente débil, situación que incluso se ha mostrado provechosa para ciertas aplicaciones. En general, las pequeñas moléculas aromáticas son los candidatos ideales para unirse a las paredes laterales CNTs y funcionan como sitios para la derivatización adicional [38], [34].

Un buen nivel de estabilidad de los CNTs funcionalizados de forma no covalente se puede lograr con el uso de tensioactivos. Estos contienen una cabeza hidrofóbica que se cree se auto ensamblan alrededor de las paredes laterales de los CNTs y mejoran en gran medida la solubilidad en medios acuosos por medio de las colas hidrófilas. Las dispersiones de los CNTs preparadas de este modo pueden ser estables durante tiempos relativamente largos, especialmente cuando las cadenas hidrófobas son aromáticas. A pesar de las dispersiones estables, esta estrategia sufre principalmente de la baja fracción de CNTs que se pueden dispersar, y por el hecho de que los tensioactivos no parecen ser capaces de individualizar los tubos, sino que más bien se auto-ensamblan alrededor de paquetes [38].

III. Nanotubos de carbono en la terapia del cáncer.

De entre los nanomateriales en investigación que han generado un interés significativo en aplicaciones médicas, se encuentran los CNTs debido a sus propiedades físico-químicas únicas, entre las que destacan: alta relación de aspecto, ultra alta área de superficie, alta resistencia mecánica, peso ultraligero, propiedades electrónicas únicas,

cavidad hueca, pequeño diámetro, gran estabilidad química y térmica, facilidad de modificación química, farmacocinética maniobrable e interacciones celulares deseables [41], [42].

Estos nanomateriales vírgenes presentan hidrofobicidad intrínseca, además, fuerzas de Van der Waals y fuertes interacciones $\pi - \pi$ entre tubos individuales provoca que se agreguen en haces o paquetes haciéndolos no biocompatibles y altamente tóxicos. Pese a esto, en torno al cáncer han demostrado que se acumulan en los tumores sólidos a través de los vasos sanguíneos del tumor, lo que permitió marcar como objetivo hacer que sean adecuados para labores de diagnóstico y terapia a escala celular en oncología [43], [44].

La exploración de su química superficial con el hito de desarrollar nanoplataformas avanzadas capaces de incorporarse en sistemas biológicos con diversos enfoques novedosos ha permitido modificarlos para obtener diversos compuestos conjugados biocompatibles, convirtiéndose en candidatos ideales para estas aplicaciones en biomedicina mediante la mejora de su capacidad de dispersión acuosa, mientras que la reducción de la agregación minimiza la toxicidad y mejora su capacidad de destino celular [45], [46].

Además, su cavidad hueca, diámetro y longitud, pueden, ya sea por el proceso de síntesis misma, o a través de diversos tratamientos posteriores a esta, manipularse para obtener las dimensiones deseadas adecuadas para una tarea concreta. Esto, junto con la gran área de superficie altamente sintonizable, en la cual es posible incorporar directamente diversos grupos funcionales además de numerosas nanopartículas, así como especies biológicas (ADN, ARN interferente pequeño, anticuerpos, enzimas, péptidos, proteínas, nuevos fármacos, etcétera.) y drogas ordinarias, dota a los CNTs de múltiples funciones en nanoescala [47], [48], [49].

Por lo tanto la funcionalización es crucial para el desarrollo de su potencial como sistemas para aplicaciones biomédicas. Actualmente se han desarrollado con éxito varios esquemas de funcionalización en este sentido, que han permitido dar cuenta del acoplamiento de estas especies de interés en medicina a los CNTs, pudiéndose modificar hasta permitir la focalización a sitios específicos con ligandos de dirección, incluyendo el reconocimiento selectivo de dianas moleculares, lo que resulta en una alta especificidad de acción. Incluso, ha sido posible marcarlos radiactivamente para actividades

específicas, o la entrega misma de radioisótopos. Además, y lo más importante, se ha demostrado que los CNTs tienen la capacidad de penetrar en las células de mamíferos y transportar diversas cargas dentro de las células. Lo que introduce la posibilidad de diseñar CNTs para aplicaciones específicas como sondas fluorescentes, agentes de contraste, de hipertermia y sistemas de administración dirigida en terapia contra cáncer [42], [43], [44], [45], [47], [49], [50], [51], [52], [53], [54], [55], [56].

1. Toxicidad de nanotubos de carbono

El descubrimiento de cada vez más nanomateriales ha añadido una nueva dimensión a la rápida evolución de la nanotecnología. En consecuencia, la exposición a los nanomateriales supone un aumento considerablemente en los próximos años. Dado que la nanotecnología es un campo emergente, existe incertidumbre sobre los riesgos de los nanomateriales sobre la salud, lo que ha atenuado el entusiasmo por su uso [57], [58].

Los nanomateriales tienen un área superficial por unidad de masa aumentada respecto a los mismos materiales de tamaño convencional, esto implica un mayor número de átomos disponibles en la superficie amplificando su interacción con el entorno y por ende su reactividad, presentando propiedades fisicoquímicas muy diferentes, por lo que la toxicidad de los nanomateriales no puede extrapolarse de los estudios toxicológicos de materiales equivalentes de mayor tamaño. Esto plantea riesgos desconocidos para la salud del humano y otras especies. Este hecho hace necesario profundizar en la investigación de los riesgos potenciales de efectos adversos para el ambiente y/o la salud. Por lo tanto, es primordial conocer los riesgos relacionados con la exposición [57].

Las nanopartículas pueden tener diferentes formas (esfera, fibra, tubo, anillo, hojas, etcetera.). Se ha comprobado que, en términos generales, la toxicidad es mayor para nanopartículas con forma tubular, seguida de formas irregulares siendo menor para nanopartículas esféricas, considerándose iguales los parámetros relacionados con su reactividad. La toxicidad parece, por tanto, estar agravada por la forma fibrosa o filamentosa de las nanopartículas [59].

Los nanomateriales de carbono se consideran actualmente como uno de los elementos clave de la nanotecnología. Específicamente, el creciente interés que existe por los CNTs debido a sus potenciales aplicaciones biomédicas, ha despertado, la inquietud por evaluar la respuesta biológica y los efectos adversos en la salud que pudiera ocasionar el uso de CNTs en medicina, así como el impacto derivados de la funcionalización,

oxidación química y demás tratamientos a los que son sometidos los nanotubos para lograr entre otros resultados, su solubilización [57], [60], [61], [62].

Los CNTs como vimos son una familia de nanomateriales con diversas y maniobrables longitudes, diámetros y número de paredes, (pared simple SWCNT, doble pared DWCNT o paredes múltiples MWCNT) y, muy a menudo impurezas metálicas procedentes del catalizador utilizado para su síntesis. Utilizando los criterios de los ensayos de toxicidad de las nanopartículas respecto a su forma se ha establecido una escala de toxicidad con el siguiente orden, de mayor a menor: SWCNTs > MWCNTs > C₆₀ (fullerenos). Y SWCNTs/MWCNTs largos > SWCNTs/MWCNTs cortos [59].

La mayor preocupación por la toxicidad de los CNTs es debido a su semejanza en algunos aspectos con el asbesto, como: las características estructurales, la alta relación de aspecto, la baja densidad específica y baja solubilidad, por lo que podría presentar toxicidad similar. La inhalación de fibras de asbesto induce la asbestosis, una enfermedad pulmonar progresiva, con desarrollo de fibrosis que finalmente desencadena en cáncer de pulmón y el mesotelioma maligno de la pleura. El papel del asbesto en el cáncer de pulmón sigue siendo objeto de debate. Sin embargo su forma fibrosa, el tamaño, la relación de aspecto y cargas de superficie han demostrado tener una fuerte influencia sobre su toxicidad. El cómo estos parámetros afecten la biotoxicidad de los CNTs es totalmente desconocida, aunque en general se espera que juegan un papel significativo. Sin embargo según estudios recientes, los CNTs no son nuevos, ni son producidos sólo por laboratorios de alta tecnología, también se encuentran en las partículas de la combustión ordinaria de gases combustibles y materia orgánica. Por lo tanto, probablemente son omnipresentes en nuestro entorno, estando fuertemente expuestos a CNTs en el medio ambiente [57], [62], [63].

Aun así, conocer específicamente la interacción de los CNTs con células vivas para determinar los efectos citotóxicos de los CNTs permitirá establecer las condiciones que lleven a un uso seguro de estas entidades en ambientes biológicos. Por lo que el perfil de bioseguridad es crucial para la traducción a una exitosa incursión en el área médica [60], [61].

Los CNTs vírgenes son químicamente inertes e insolubles en soluciones acuosas, interacciones de Van der Waals entre nanotubos individuales hacen que se forman grandes agregados, los cuales se han asociado con toxicidad. Se ha demostrado que

pueden acumularse en las células, órganos y tejidos con efectos peligrosos, por lo tanto son de uso limitado en aplicaciones biológicas o médicas [58], [62], [64].

Sin embargo, a estas alturas, para muchas aplicaciones los CNTs se han modificado a un grado tal que ha permitido vislumbrar su uso futuro en un sin fin de aplicaciones, incluyendo biológicas. La principal modificación a CNTs ha consistido en su oxidación. Este procedimiento que consiste en someterlos a un tratamiento con ácidos fuertes, crea grupos hidroxilo y grupos carboxilo tanto en sus extremos como en defectos en sus paredes, además de acortarlos. Estos CNTs oxidados permanecen individualizados y se dispersan mucho más fácilmente en soluciones acuosas. Adicionalmente, a partir de la oxidación, se han desarrollado una amplia variedad de métodos de inserción de grupos funcionales a la superficie de CNTs, además, se ha desarrollado otra amplia variedad de métodos no covalentes para funcionalización de CNTs, que hacen que su manipulación sea más fácil. Como consecuencia de ello, la biocompatibilidad de los CNTs funcionalizados se ha visto mejorada de forma tan evidente que ya se proponen como un nuevo tipo de sistemas de soporte aplicables en ciencias biológicas o médicas [62], [64], [65].

Aun así, los reportes con información relativa a los peligros potenciales relacionados con la exposición a CNTs es rara y aún objeto de debate, muy controversial y cuestionable debido a las diferencias en: el diseño experimental, los materiales, los ensayos de viabilidad celular y las concentraciones de nanotubos, lo que provoca que los datos se muestren a menudo contradictorios. Además, existe falta de acuerdo sobre los mejores métodos para la caracterización de la toxicidad [57], [60].

Por otro lado el destino de los CNTs en el organismo en los actuales estudios de toxicidad se cree vago debido principalmente a la falta de métodos adecuados para detectar y cuantificar en células vivas y tejidos. Uno de los retos en la caracterización de la suerte y los posibles efectos de toxicidad de los CNTs es el desarrollo de métodos de nanometrología que permitan la evaluación cuantitativa de la distribución y el comportamiento en el entorno biológico. Uno de los avances al respecto es el etiquetado de los CNTs con trazadores de imágenes que permite su detección, pero la disociación del trazador de los nanotubos una vez procesadas por las células puede conducir a un destino biológico distinto de estas sondas con respecto a la de CNTs [66].

2. Terapias alternativa del cáncer mediante propiedades físicas de nanotubos de carbono.

Entre todas las opciones de tratamiento del cáncer, la cirugía, ha tenido progresos notables y sigue desempeñando un papel decisivo en la supervivencia del cáncer, mediante la eliminación a través de la resección del tumor. Estos procedimientos han conseguido actualmente, mediante el desarrollo de métodos quirúrgicos de avanzada, disminuir la invasión de tejido sano al mismo tiempo que otorgan la posibilidad de llegar a más sitios de difícil acceso. Sin embargo, esta actividad, compleja, exige sea estudiada y adaptada caso por caso y, compromete la asistencia de un equipo humano donde intervienen varias sub especialidades médicas, por lo que sólo puede ser llevada a cabo válidamente en centros altamente especializados [53].

Por otro lado, la cirugía oncológica no ha conseguido eliminar por completo secuelas tales como serio desfiguramiento, así como pérdida de la función del órgano intervenido. Además, el afinamiento hasta ahora de las técnicas quirúrgicas ha traído consigo inseparables consecuencias como son entre otras, intervenciones alargadísimas que se convierten en extenuantes tanto para el paciente como para el cirujano [67], [68].

Por esto, el desarrollo de terapias alternativas a eludir la cirugía es muy importante. Hoy en día se encuentran en desarrollo un gran número de opciones de tratamiento del cáncer, encaminados a proporcionar técnicas terapéuticas con mecanismos de destrucción tumoral específicos, de mayor potencial curativo o equivalente a la cirugía pero no invasivos, altamente eficientes y de aplicación extensiva hacia aquellas regiones vitales que son inaccesibles a la cirugía [69], [70], [71].

Entre estas opciones, la nanotecnología ha proporcionado un enfoque que se explora ávidamente y figuran en la actualidad como una técnica terapéutica prometedora, la cual se vale de las propiedades inusuales de ciertas nanoestructuras para provocar destrucción a través de la inducción de factores físicos en márgenes superiores al del máximo tolerado por las células [72], [73], [74].

3. Destrucción por hipertermia a través de nanotubos de carbono y radiación NIR

Inspirado en la fiebre, reacción inmunológica para salvaguardar la integridad del organismo, donde se eleva la temperatura homeostática a un nivel por encima de 37°C con el fin de debilitar los agentes patógenos. La hipertermia terapéutica comprende el uso de agentes térmicos externos para elevar la temperatura con fines curativos de diferentes

enfermedades incluyendo el cáncer. En torno al cáncer, la terapia consiste en exponer artificialmente a temperaturas suficientemente altas el tejido tumoral carcinogénico [73], [75].

Las células cancerígenas no son inherentemente más susceptibles al calor. Sin embargo, dentro de los tumores se presenta una estructura irregular deficiente en oxígeno y nutrientes, por lo que las células cancerígenas en el ambiente tumoral presentan una tolerancia al calor muy inferior que las células sana en el tejido normal. Fundamentado en lo anterior, este enfoque ha demostrado causar apoptosis a las células cancerosas en respuesta directa a la aplicación de calor por encima de un umbral de temperatura, induciendo desnaturalización y coagulación de las proteínas celulares, daño en la membrana y finalmente la muerte, mientras que en los tejidos sanos, capaces de disipar el calor y mantener una temperatura normal, se produce un menor daño [55], [72].

Los avances en ingeniería de materiales nanotecnológicos en dirección al uso de nanopartículas en medicina, ha permitido encontrar diversas nanopartículas que se desempeñan en favor de su uso para este propósito. Estas nanopartículas han mostrado ser materiales convertidores fototérmicos eficientes en absorber radiaciones inofensivas produciendo calor [69], [76], [77], [78].

De esta forma, este enfoque, que ha demostrado su efectividad para tratar muchos tipos de cáncer de manera efectiva, se basa en la capacidad de estos nanomateriales (convertidores fototérmicos) de acumularse preferentemente en tejidos tumorales tras su administración, para luego radiar con luz el sitio para causar calentamiento localizado y la posterior muerte celular por citotoxicidad térmica, con un desenlace mínimamente invasivo hacia el tejido sano circundante, debido a que el material fototérmico sólo es activo en presencia de luz [69], [76], [55].

Estos materiales deben caracterizarse por tener especial afinidad hacia células o tejido cancerígeno. La radiación debe ser capaz de penetrar en los tejidos sanos sin dañarlos y luego ser absorbida a través del convertidor fototérmico implantado en los tumores transformando en calor la radiación para producir selectivamente la muerte de células cancerosas, dejando las células sanas sin afectar [69], [76].

Hay una ventana en la región del infrarrojo cercano (NIR) entre la absorción de agua y la sangre (principalmente a partir de la hemoglobina) en el que los tejidos son

máximamente transmisivos y la absorción, dispersión, y autofluorescencia por los tejidos, la sangre y el agua se reducen al mínimo, por lo que, los convertidores fototérmicos más eficientes en operan en este rango "ventana biológica" (650-900 nm), se consideran los mejores para utilizar en el tratamiento fototérmico [69], [76], [79].

De entre los materiales encontrados con estas características, las investigaciones han puesto en la mira como candidato ideal a los CNTs por su demostrada capacidad para absorber de forma natural la radiación de infrarrojo cercano (NIR) y liberar energía vibratoria sustancial después de la exposición a la radiación en esta región, por lo que recientemente, se han puesto a prueba como agentes liberadores de esta energía dentro de tejido para producir calentamiento localizado, con mira a ser explotada como una terapia térmica de tumores. Estas pruebas que exploran sus características eléctricas, ópticas y térmicas especiales debido a la disposición de los átomos de carbono confinados en volúmenes de tamaño nanométrico, dan cuenta de que, la radiación NIR es fuertemente absorbida y convertida en calor de manera eficiente en un dominio de tiempo óptimo, haciendo evidente su potencial uso en la terapia fototérmica de cáncer [54], [76], [70].

4. Destrucción mecánica a través de nanotubos de carbono y campos magnéticos giratorios.

Nanopartículas magnéticas conjugadas con otras nanoestructuras han sido recientemente muy estudiadas debido a su potencial aplicación en el direccionamiento mediante una fuente magnética hacia un blanco particular en el organismo. Esto permite el envío al blanco de quimioterapéuticos anclados a estas nanoestructuras, además de tener la ventaja de actuar como agentes de contraste MRI y generadores de calor en la hipertermia del cáncer [80], [81].

Los CNTs, por su peculiar cavidad hueca, son ideales para ser rellenados o decorados en su superficie con estas nanopartículas brindándoles protección a los agentes externos. Existen en la literatura varios esquemas de relleno o decorado de CNTs exitosos en este sentido. Sin embargo, los CNTs presentan naturalmente impurezas de nanopartículas metálicas encerradas en su cavidad hueca debido al proceso de síntesis con precursores de Fe, por lo que para algunas tareas concretas no se requiere un acoplamiento adicional de nanopartículas magnéticas para tener respuesta a la exposición a campos magnéticos [82], [83].

Un enfoque de tratamiento del cáncer completamente novedoso, se vale de las propiedades paramagnéticas de CNTs con impurezas metálicas provenientes del catalizador para producir daño mecánico a células cancerígenas. Estos CNTs son utilizados como nanoherramientas accionadas por la presencia de un campo magnético giratorio externo [84].

La estimulación mecánica externa con potencial traumático afecta la integridad celular, ocasionando la activación del mecanismo de muerte celular programada por daño irreversible a la membrana o produciendo directamente la necrosis celular por lisis de la membrana. Para la mayoría de las membranas, el máximo de tolerancia de tensión (energía por unidad de área) está en el orden de 0,004 hasta 0,006 J/m² [80], [84].

En respuesta al campo magnético, los CNTs son inducidos a girar en suspensiones de células cancerígenas con el objetivo de provocar daño a la membrana por trituración, obteniendo formación de poros en la membrana con fuga de componentes intracelulares esenciales o destrucción celular completa por lisis de la membrana, haciendo evidente su potencial uso en el tratamiento del cáncer por destrucción a través de la conversión de energía magnética en mecánica por CNTs inducidos a girar por la exposición de un campo magnético giratorio externo [84].

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Desarrollo de los sistemas

Para la realización de este trabajo, fue necesario el diseño y construcción/adecuación de un par de equipos. Para su construcción se utilizaron materiales obtenidos de ferreterías comunes a menos que se indique lo contrario. Éstos permitieron la realización de los tratamientos empleados en cada caso para provocar la muerte de las células cancerígenas.

1. Plataforma láser

Diodo láser de 1 W 808 nm obtenido de General Hardware México (Figura 12). Tubo de CPVC (Policloruro de vinilo clorado) de ½ pulgada, lámina de acrílico transparente de 1/8 de pulgada de grosor, lámina de acero, tubo PTR (Perfil Tubular Rectangular) de 1 ½ pulgada, pintura blanca, y laca transparente.

La lámina delgada de acero, la lámina de acrílico, los tubos y conectores (coples) de unión de CPVC se acoplaron de tal manera que formaran una plataforma para la placa de cultivo celular, la lámina de acrílico se montó en la base inferior de la estructura tubular de CPVC y la lámina de acero en la parte superior, se perforó en el centro de la lámina un hoyo del ancho exacto al orificio de la cámara que contiene al diodo láser y se fijó la cámara a la base con la ayuda de un soporte de PTR, la fuente de alimentación del diodo láser se sobrepuso en la base inferior, la lámina de acero se pintó de blanco, se trazó una cuadrícula sobre la pintura que permitiera centrar cada pocillo de la placa de cultivo con el haz de luz y, se pintó con laca transparente para proteger la pintura con la cuadrícula. Finalmente se puso un interruptor de encendido y apagado a la fuente de alimentación del diodo láser.

2. Sistema inductor de campo magnético giratorio

Tubos de CPVC de ½ pulgada, varilla roscada de ½ pulgada, lámina de MDF (Tableros de madera de fibra vulcanizada de densidad media), dado hexagonal de 1 pulgada, motor, reóstato, vernier digital, tornillos para madre, tuercas y rondanas de ½ pulgada, tacómetro digital de no contacto y 2 imanes fuertes de neodimio grado 35 obtenidos de MAGNÉTICA SAIFFE S.A de C.V. México (Figura 13).



Figura 12. Cámara del diodo láser.

Foto: Vitali Cárdenas.

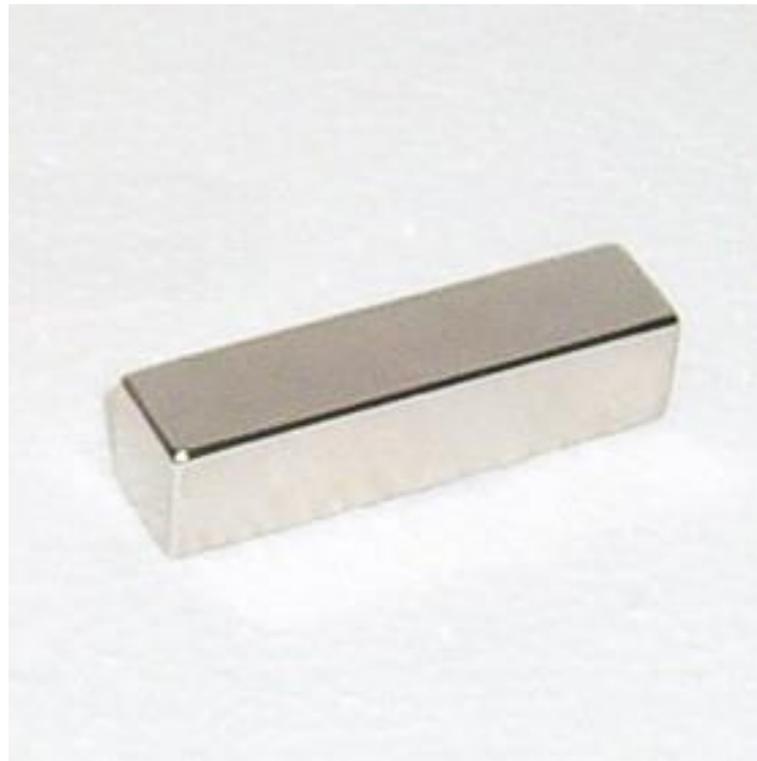


Figura 13. Imán de neodimio grado 35.

Foto: Vitali Cárdenas.

La lámina de MDF de ½ pulgada se dispuso de forma que hiciera las veces de base y soporte para el motor, a los cables de alimentación del motor se le conectó un reóstato con el fin de variar la tensión eléctrica para controlar la velocidad, a la flecha del motor se fijó un dado hexagonal de 1 pulgada, en el dado se colocaron a presión 2 imanes que miden de ancho ½ pulgada cada uno, con la ayuda de un tacómetro digital de no contacto se calibró la tensión necesaria para que los imanes giren a 1000 rpm a modo de equiparar el dispositivo utilizado en [84], 2 varillas roscadas en paralelo de aproximadamente medio metro de largo fueron colocadas con ayuda de tuercas y rondanas perpendicularmente a la base del MDF, se construyeron 2 brazos a modo de soporte para los viales, estos fueron integrados (perpendicularmente a las varillas roscadas y de forma paralela a los imanes que contiene el motor) a las varillas roscadas de modo que al girar una de ellas los brazos subieran y bajarán, a los brazos se afianzó un vernier digital con el propósito de medir con exactitud la distancia entre el vial y los imanes.

II. Preparación de las soluciones coloidales de MWCNTs

1. Oxidación de MWCNTs

Los MWCNTs fueron producidos en el Laboratorio de Polímeros y Compositos Nanoestructurados de la División de Materiales Avanzados del IPICYT. MWCNTs vírgenes fueron oxidados [74] y purificados [85] químicamente según el protocolo descrito en la literatura [86]. 100 mg de MWCNTs se sumergen en 100 mL de una mezcla ácida compuesta por H₂SO₄ y HNO₃ en una relación de volumen 3:1 bajo sonicación durante 24 horas. La solución resultante se sometió a un proceso de purificación física adicional por microfiltración [87] según el protocolo descrito por la literatura [86], se filtran a través de una membrana microporosa de Nylon (0.2 micras), después se lavó varias veces con agua deionizada en exceso hasta conseguir el pH del filtrado igual al del agua deionizada.

El sólido de MWCNTs oxidados (oxMWCNTs) se recogió del filtro según el protocolo descrito en la literatura [88]. Los nanotubos se obtienen de la membrana seca fácilmente, despegándolos mediante una navaja. En caso que se utilicen una cantidad menor, el filtro de membrana microporosa con los oxMWCNTs atrapados se transfiere a 200 mL de etanol y se desprenden por sonicación durante 10 min, después de lo cual la membrana se retira de la solución de oxMWCNTs en etanol. Después el etanol es cuidadosamente llevado a su punto de ebullición y evaporado.

2. Dispersión de oxMWCNTs desnudos

Las dispersiones acuosas de oxMWCNTs desnudos se realizaron mediante ciclos repetidos de sonicación estándar (sonicador BRANSONIC 8510) durante aproximadamente 7 horas hasta conseguir una dispersión homogénea sin tratamientos adicionales. En resumen 2mg de oxMWCNTs se disuelven en 2 mL de agua deionizada.

3. Dispersión de oxMWCNTs por recubrimiento de polímero

Las dispersiones acuosas de oxMWCNTs por recubrimiento de polímero se realizaron mediante el recubrimiento por adsorción en la superficie de oxMWCNTs con agente tensioactivo no iónico [89], según un protocolo modificado de la literatura [84]. Se utilizó el tensioactivo no iónico Pluronic F-127 (copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, PF-127 Sigma Aldrich). En resumen 2mg de oxMWCNTs se disuelven en 2 mL de una solución 1% PF-127 en agua deionizada. Esta solución se agita durante 5 horas a 70°C y después se sónica en condiciones estándar durante 2 horas hasta conseguir una dispersión homogénea, se filtra a través de una membrana microporosa de Nylon (0.2 micras), se lava en exceso con medio de Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) que contiene 5% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina/estreptomicina, para eliminar el exceso de PF-127 en solución. oxMWCNTs/PF-127 recubiertos se suspenden finalmente en DMEM para formar una solución madre de concentración igual a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos y almacenada a 4°C.

III. SEM

SEM de oxMWCNTs, oxMWCNTs/PF-127 embebidos y oxMWCNTs/PF-127 recubiertos se realizaron en el Laboratorio de Microscopia B5. LIDRA de CINVESTAV unidad Querétaro en un instrumento JEOL, JXA-8530F equipado con EDS y WDS de JEOL a cargo del A. José Eleazar Urbina. En resumen una gota de las muestras fue fijada y secada sobre Si por deshidratación a temperatura ambiente. La muestra se recubrió después por el método de bajo vacío utilizando electrodos de carbono para evaporarlo y obtener “films” de grafito que recubren las muestras y las hacen conductoras.

IV. TEM

TEM de MWCNTs vírgenes, oxMWCNTs y oxMWCNTs/PF-127 se realizaron en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad de Sonora, en un instrumento JEOL, JEM 2010F equipado con CCD Orius y espectrómetro

EDS Bruker. En resumen una gota de la suspensión de los diferentes MWCNTs se depositó sobre una rejilla de cobre recubierta, se sometió a secado en vacío antes de observación.

V. EDS

Se utilizó el espectrómetro EDS Bruker del TEM sobre las mismas muestras en las zonas de alto contraste.

VI. AFM/MFM

AFM/MFM de oxMWCNTs y oxMWCNTs/PF-127 recubiertos y oxMWCNTs/PF-127 embebidos, en suspensión se realizaron en el Laboratorio de Microscopia de CINVESTAV unidad Querétaro. En un AFM Dimension 3100 de Veeco. En resumen una gota de las suspensiones de MWCNTs se depositó sobre un portaobjetos de vidrio recubierto de lisina, se dejó secar en vacío antes de la observación. Se utilizó una punta magnética mediana con frecuencia en 68.7 KHz con drive amplitud de 1.93 V. Previo a la mediciones la punta fue expuesta a un campo magnético por un lapso de 12 h con el fin de aumentar su sensibilidad de medición.

VII. Rayos X

Rayos X de oxMWCNTs/PF-127 se realizaron en el Laboratorio A2 de difracción de Rayos X de CINVESTAV unidad Querétaro en un equipo RIGAKU Modelo Dmax2100. En resumen una gota de la muestra fue depositada sobre Si antes del análisis.

VIII. Comportamiento de la temperatura tras la radiación láser

Con el fin de determinar el tiempo de exposición de las células a la radiación láser en presencia de los MWCNTs y de determinar las concentraciones de los mismos para las cuales hay aumento de temperatura en el sistema, suspensiones de oxMWCNTs y oxMWCNTs/PF-127 recubiertos de concentración 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ fueron irradiadas por el láser de 808 nm a 1 W/cm^2 . Las suspensiones de MWCNTs fueron colocadas en una celda hecha a medida. Esta celda permitió mantener una mitad del volumen total en presencia del haz láser, mientras que en la otra mitad se colocó el termopar fuera de la trayectoria del haz láser para evitar error por calentamiento del termopar debido al láser. La temperatura se mide en intervalos de 10 segundos después de iniciada la irradiación y durante un total de 2 min. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Las diferentes concentraciones de las soluciones de MWCNTs

se atemperaron en baño a una constante para todas de 30°C antes del tratamiento con el láser.

IX. Cultivo celular

En estos estudios se utilizaron líneas de células de cáncer cérvico-uterino HeLa. Se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). El medio de cultivo fue suplementado con 5% de suero fetal bovino, L-glutamina y un conjugado antibiótico compuesto de penicilina/estreptomicina. Los cultivos se llevaron a cabo bajo condiciones de cultivo celular estándar en 5% de CO₂ a 37°C y 98% de humedad relativa, sin ningún tratamiento adicional.

X. Citotoxicidad de MWCNTs

Líneas de cáncer cérvicouterino HeLa fueron cultivadas durante 3 días, posteriormente se tripsinizaron y la suspensión de células se centrifugaron durante 7 min a 1800 rpm a 4°C, seguido a esto se re suspendieron en medio a una densidad de 10⁶ células/mL. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 15,000 células/pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37°C en 5% de CO₂. Después de la incubación de 24 horas los medios fueron remplazados por suspensiones de oxMWCNTs y oxMWCNTs/PF-127 en medio DMEM a una concentración de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL y se colocó el control de células sin MWCNTs. Posteriormente la placa de 96 pocillos se llevó a incubación adicional de 48 horas. Finalmente se utilizó el ensayo de proliferación celular MTT (3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) para determinar la viabilidad celular después de la incubación con MWCNTs por 48 horas. Este ensayo implica la conversión enzimática del sustrato MTT por las células metabólicamente activas. La pérdida de la actividad metabólica se utiliza como un indicador indirecto de la pérdida de la viabilidad celular. Después de la adición del reactivo MTT, las células se trataron con un tampón de lisis (alcohol isopropílico ácido) y se mantuvieron a temperatura ambiente bajo agitación manual con el fin de llevar a cabo la lisis y solubilización completa del producto MTT (cristales de formazan). La absorbancia de cada pocillo se midió usando un lector de placas BIO-RAD iMark™.

XI. Tratamiento láser

Líneas de cáncer cérvicouterino HeLa fueron cultivadas durante 3 días, posteriormente se tripsinizaron y la suspensión de células se centrifugaron durante 7 min a 1800 rpm a 4°C, seguido a esto se suspendieron en medio a una densidad de 10⁶

células/mL. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 20,000 células/pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37°C en 5% de CO₂.

A continuación los medios de la placa de 96 pocillos fueron reemplazados por 100 µL de oxMWCNTs/PF-127 en medio DMEM a una concentración de 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL dejando un control sin oxMWCNTs/PF-127. Seguido a esto la placa de 96 pocillos se llevó a incubación adicional de 2 horas y posteriormente a la plataforma para la radiación láser de 1 W/cm², 808 nm. Sobre la plataforma la placa se hace coincidir con los márgenes de la cuadrícula guía con el fin de hacer coincidir el pocillo No. 1 con el centro del haz de luz y así sucesivamente con los demás pocillos. Los pocillos se trataron con láser por 1 min a excepción de los controles (células sin oxMWCNTs/PF-127 y células con oxMWCNTs/PF-127 sin exposición al láser).

Durante todo el periodo de tratamiento, se colocó sobre la placa de cultivo agua a temperatura a 37°C contenida en una bolsa hermética, esta fue mantenida y cambiada cada cierto tiempo a fin de mantener invariante la temperatura de la placa de cultivo por condiciones ambientales. Inmediatamente después de todo el tratamiento láser la dispersión de oxMWCNTs/PF-127 fue removida y reemplazada por medio DMEM que contiene suero fresco. Por último la placa de 96 pocillos se cultiva adicionalmente por 24 h. Se utilizó el ensayo de proliferación celular MTT para determinar la viabilidad celular después de la hipertermia inducida por oxMWCNTs/PF-127 recubiertos y exposición láser 1 W/cm², 808 nm.

XII. Tratamiento magnético

Líneas de cáncer cérvicouterino HeLa fueron cultivadas durante 3 días. Posteriormente se tripsinizaron y la suspensión de células se centrifugó durante 7 minutos a 1800 rpm a 4°C, seguido a esto se suspendieron en medio a una densidad de 10⁶ células/mL. Esta suspensión de células fue depositada en viales de vidrio en ausencia o presencia de MWCNTs/PF-127 recubiertos a una concentración de 20 µg/mL. El vial de vidrio se coloca a las distancias de 11.7 mm, 16.8 mm y 24.1 mm de los imanes para ajustar las densidades de flujo magnético por polo de 20, 40 y 75 mT respectivamente. El sistema magnético se enciende durante 20 minutos para cada tratamiento. Después de la exposición la suspensión celular se diluyó 12 veces para minimizar la toxicidad inherente de MWCNTs/PF-127 recubiertos, con una concentración final después de la dilución de 1.67 µg/mL de MWCNTs/PF-127 recubiertos.

La suspensión celular después del tratamiento fueron sembradas en placa de 12 pocillos ajustada a una densidad de 250,000 células por pocillo para incubación adicional de 24 horas junto con los controles representados por suspensión de células libres o con MWCNTs sin tratamiento magnético. Las células incubadas después del periodo de tiempo de 24 horas fueron lavadas dos veces con PBS antes de la tripsinización, tras lo cual la suspensión celular se mezcló con un volumen de 0.4% de azul de tripano. Después, 10 μ L de las células teñidas se colocaron en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico y se contó el número de células viables. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Se realizó nuevamente el mismo experimento para realizar el ensayo celular MTT. Todo el procedimiento se repitió sin variación hasta el tratamiento magnético. Esta vez la suspensión celular después del tratamiento fue sembrada en placa de 96 pocillos ajustada a una densidad de 20,000 células por pocillo para incubación adicional de 24 horas junto con los controles representados por suspensión de células libres o con MWCNTs sin tratamiento magnético. Las células incubadas después del periodo de tiempo de 24 horas fueron analizadas por el ensayo de viabilidad MTT.

XIII. Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo mediante análisis de varianza (ANOVA), se llevó a cabo una prueba de comparación de medias utilizando la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

I. Desarrollo de los sistemas

1. Plataforma láser

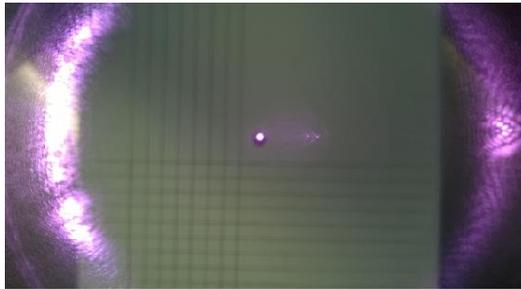
En la (Figura 14) se muestra el resultado final del diseño y la construcción de la plataforma láser terminado. El diseño permite mantener el láser encendido por un periodo considerable (prueba de ≈ 6 h) de tiempo sin calentamiento del sistema. (Figura 14a), importante para los largos tiempos que se requieren de encendido el láser para radiar cada pozo de la placa de 96 pozos uno por uno.

La cuadrícula de la mesa permite centrar cada pocillo de la placa de cultivo con el haz de luz de la cámara del diodo láser de la plataforma (Figura 14b). En la imagen se puede observar el haz láser cubrir toda el área del fondo del pozo de la placa. Esto permitió una radiación uniforme de la zona de crecimiento celular en cultivo en la placa de 96 pozos y de las suspensiones de MWCNTs presentes, con lo que se puede esperar no exista variación de temperaturas en regiones del pozo que propicien la supervivencia de células en presencia de la suspensión de MWCNTs no expuestas al láser.

En los experimentos de prueba, donde láminas delgadas de hules plásticos de diferentes colores fueron sometidos al haz de luz, se observó calentamiento de éstas por absorción de la radiación del haz de luz hasta derretirse. Por otro lado, y en contraste, la placa de cultivo celular sometida a largos tiempos de exposición al haz de luz presentó una absorción insignificante de la radiación observándose ningún calentamiento, por lo que el plástico del que está fabricada la placa de cultivo permitió realizar el experimental sin interferencia (Figura 14). La exposición de diferentes concentraciones de las soluciones coloidales de MWCNTs obtenidas depositadas en los pocillos de la placa, incrementaron su temperatura tras breves lapsos de la exposición láser. La prueba complementaria con agua pura colocada en uno de los pozos no mostró ningún calentamiento apreciable. Las temperaturas fueron tomadas inmediatamente después de la exposición láser con un termopar Klein Tools.



a)



b)



c)

Figura 14. a) Plataforma láser diseño finalizado, b) El sistema después de mantenido encendido una hora sin mostrar calentamiento y c) Placa de cultivo de 96 pocillos de prueba sobre la plataforma láser, el haz de luz centrado en uno de los pocillos, con la totalidad del área del fondo del pozo radiado por el haz de luz láser.

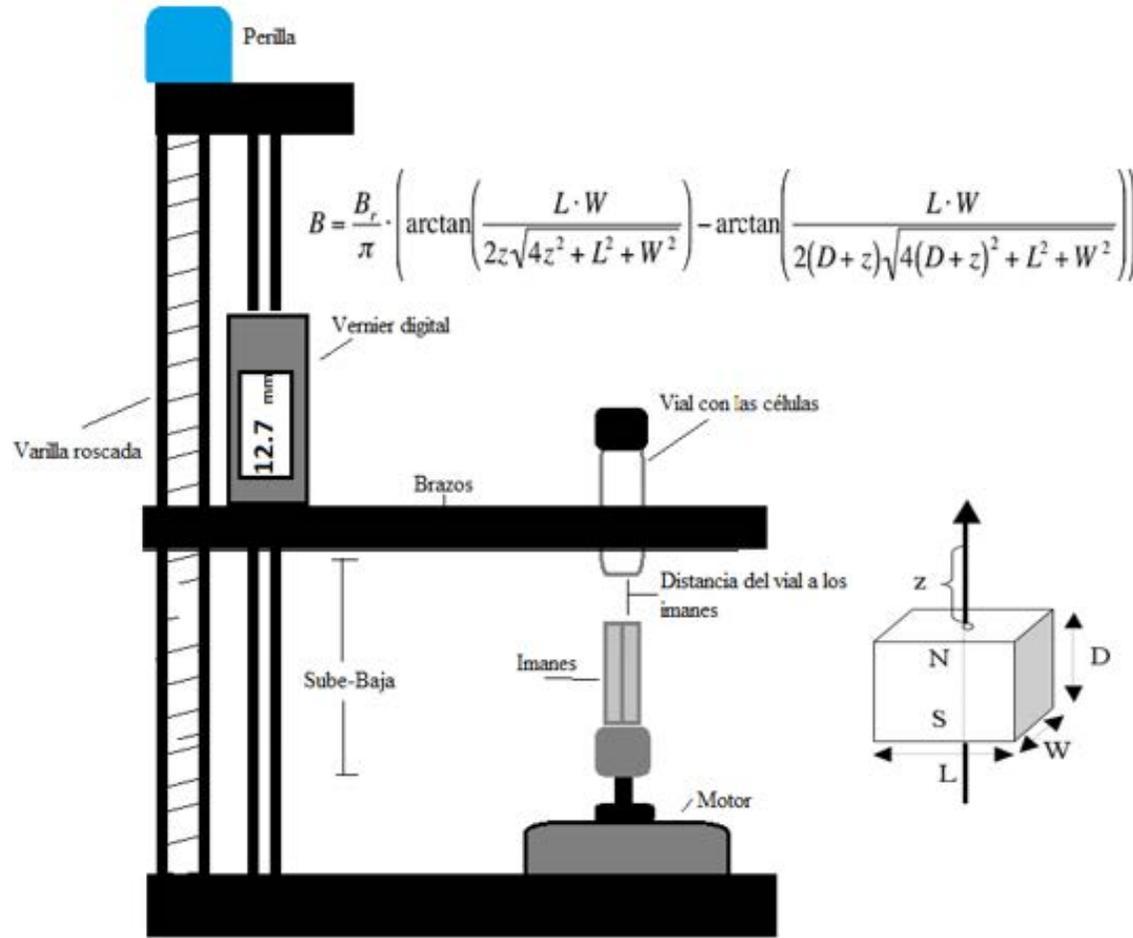
Foto: Vitali Cárdenas.

2. Sistema inductor del campo magnético giratorio

En la (Figura 15) se muestra el sistema inductor de campo magnético giratorio concluido. El diseño permite, al igual que con la plataforma láser, un uso indiscriminado del sistema sin presentarse calentamiento o algún otro deterioro en su funcionalidad a causa de largos periodos de uso, importante para los largos tiempos requeridos de encendido el sistema para someter cada vial con células cancerígenas por 20 min al campo magnético giratorio en el tratamiento.

Los brazos contenedores de los viales quedaron alineados en paralelo a los imanes y poseen una capacidad de ajuste para los viales óptima, lo que asegura mantener los viales (que pueden variar en diámetro según se requiera) en su posición sin cambio durante el tratamiento. El vernier digital se tara a cero con lo que es posible conocer la distancia exacta del vial a los imanes, el motor es puesto a girar a 1000 rpm (con la capacidad de aumentar o disminuir las revoluciones a voluntad para estudios posteriores) con la ayuda del tacómetro digital de no contacto variando la tensión suministrada con el reóstato (Figura 16).

En los experimentos de prueba, donde una pequeña cantidad de polvos finos de MWCNTs fueron sumergidos en agua sobre una placa Petri de vidrio y colocada la placa en los brazos del sistema a una distancia para tener una densidad de flujo magnético de 40 mT. Se observó, inmediatamente después de encendido el sistema a las partículas de polvos finos de MWCNTs dispuestos a girar individualmente a velocidad apreciable tras la exposición al campo magnético giratorio debido a las impurezas metálicas (predominantemente fierro) provenientes del catalizador utilizado para su síntesis. Estos polvos finos en rotación se agrupan formando agregados conforme pasa el tiempo de exposición al campo magnético giratorio.



a)



b)

Figura 15. a) Esquema del sistema de imanes giratorios, imán y Ec. para cálculo de intensidad de flujo magnético [90]. b) Sistema de imanes giratorios concluido.

Foto: Vitali Cárdenas.



Figura 16. Sistema de imanes giratorios. Los imanes puestos a girar a 1000 rpm utilizando un tacómetro láser digital de no contacto.

Foto: Vitali Cárdenas.

II. Preparación de las soluciones coloidales de MWCNTs

Los métodos desarrollados para la obtención de suspensiones coloidales estables de MWCNTs muestran en ambos casos alta eficacia en la dispersión de los MWCNTs en medios acuosos, ya que como producto finalmente se obtuvieron suspensiones coloidales bien dispersadas y homogéneas tanto de oxMWCNTs desnudos (Figura 17) como de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos (Figura 18). Estas suspensiones fueron estables aún al ser sometidas a centrifugación a 2000 rpm durante 5 min después de lo cual no se encontraron precipitados.

La estabilidad de las suspensiones de MWCNTs fue suficiente a lo largo del desarrollo de los experimentos en este estudio, sin embargo, se observó que la estabilidad de las suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos decayó en el tiempo formándose precipitados que eran fácilmente suspendidos mediante agitación. La estabilidad de la suspensión de oxMWCNTs desnudos fue más estable en el tiempo no observándose precipitados incluso después de meses de preparadas, como reportado por otros autores [91] y en sentido contrario con otros [54] quienes refieren es su trabajo, formación de agregados y precipitación de estos al solubilizar los oxMWCNTs en medio acuoso. Este resultado sugiere que la interacción del recubrimiento entre oxMWCNTs/PF-127 recubiertos cercanos en la suspensión eventualmente conduce a una agregación de los MWCNTs en este régimen de dispersión, suspendiéndose de nuevo fácilmente con agitación y leve calentamiento.

Lo contrastante con la suspensión de oxMWCNTs desnudos, la cual permanece estable a lo largo del tiempo, se debe a la presencia de los grupos funcionales carboxilo disponibles para interaccionar con el medio. Estos grupos funcionales se sabe son altamente disociables en medio acuoso, [74] por lo que la estabilidad de esta preparación está vinculada con la estabilidad del pH del medio, corroborado esto al acidificar abruptamente la preparación mediante la adición de pequeñas cantidades de H₂SO₄ diluido, tras lo cual se observó una agregación y precipitación de los oxMWCNTs desnudos inmediatamente después de acidificada la suspensión (datos no mostrados). Por otro lado la suspensión de oxMWCNTs desnudos se muestra en apariencia de mayor viscosidad que la suspensión de MWCNTs/PF-127 recubiertos. Esta apariencia es debida a las propiedades tensioactivas del recubrimiento de PF-127 [92] sobre las paredes del nanotubo, que provoca una disminución de la tensión superficial de la suspensión de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos.

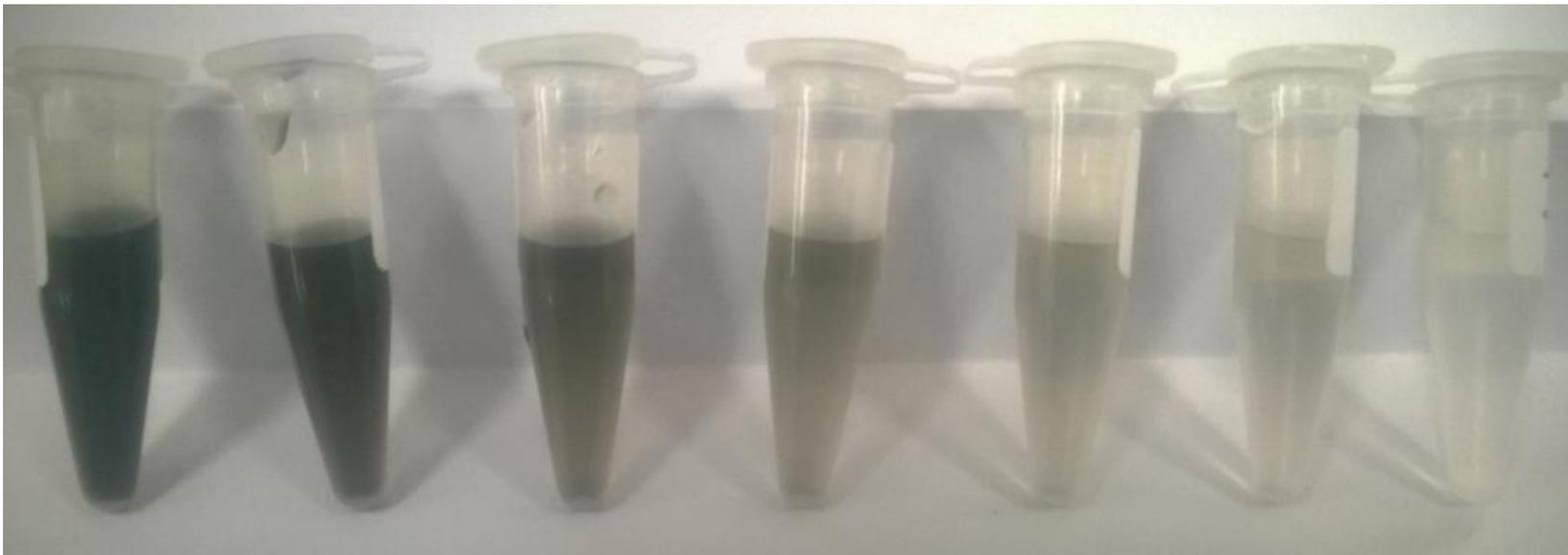


Figura 17. Diluciones en serie 1:1 de oxMWCNTs en agua a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con concentraciones finales de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 0.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (De izquierda a derecha).

Foto: Vitali Cárdenas.



Figura 18. Diluciones en serie 1:1 de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (De derecha a izquierda, respectivamente).

Foto: Vitali Cárdenas.

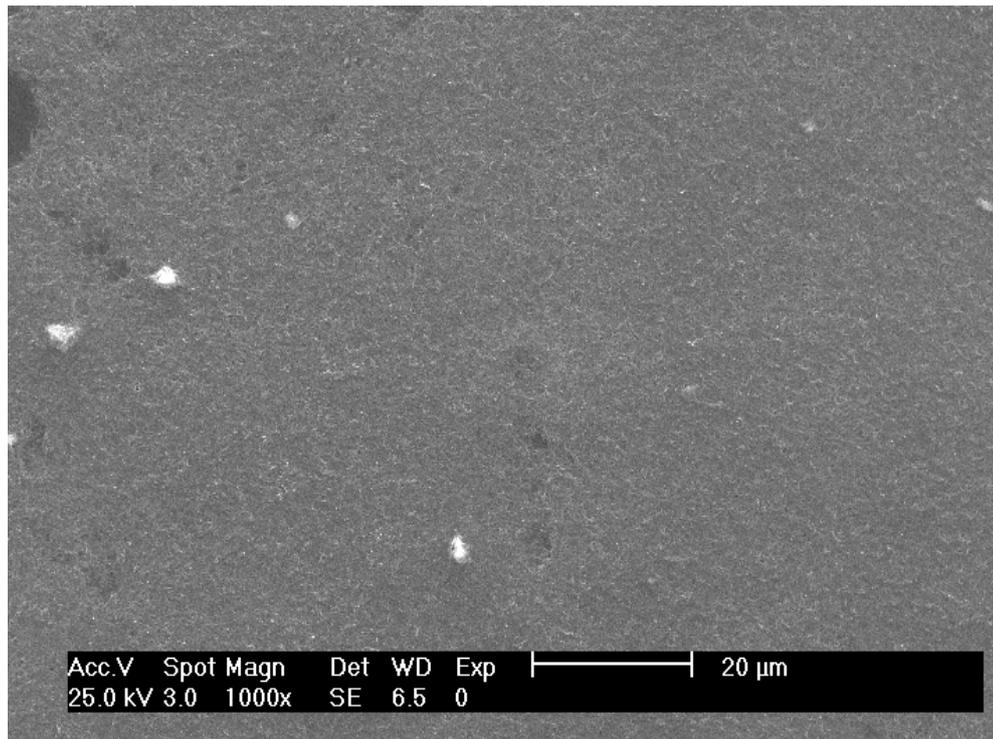
Un dato importante a considerar es que las suspensiones de MWCNTs así preparadas no permite obtener MWCNTs purificados en cuanto a sus dimensiones, [87] por lo que estas suspensiones se espera, contengan una mezcla de MWCNTs con alta polidispersidad en tamaño. Esta mezcla de longitudes se espera, juegue un papel importante en cuanto a su citotoxicidad en este estudio, dados los reportes existentes sobre toxicidad de CNTs largos [59].

III. SEM

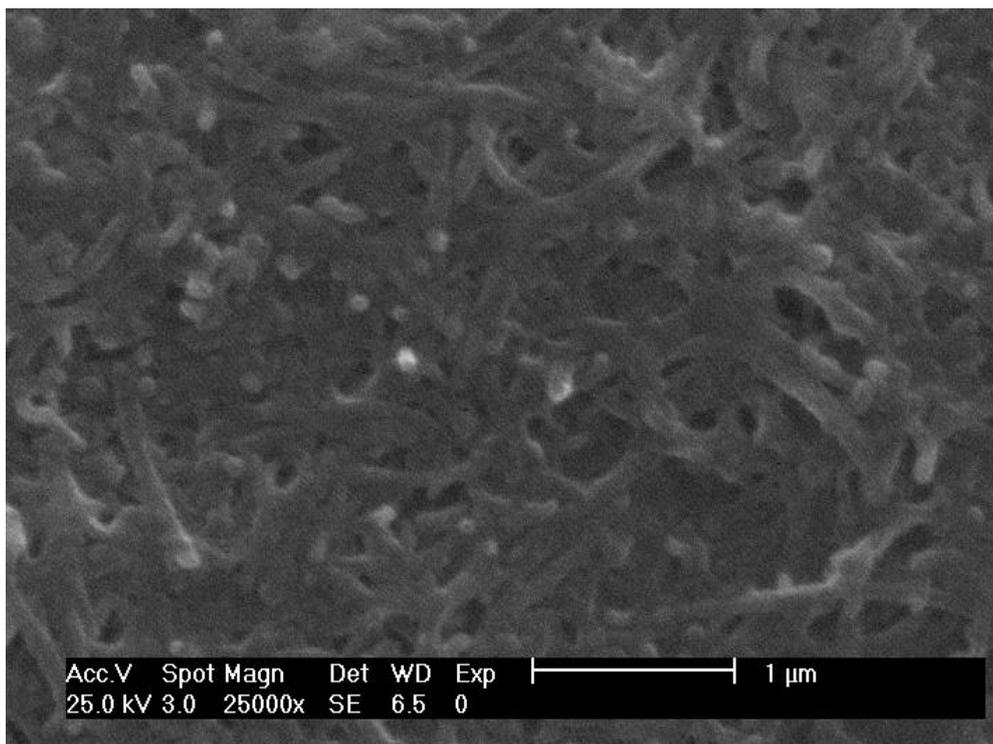
Las micrografías SEM de las suspensiones de MWCNTs preparadas revelan una película delgada formada por los oxMWCNTs desnudos (Figura 19), indicativo de una dispersión de oxMWCNTs en medio acuoso homogénea. Mientras que es fácil apreciar en la (Figura 20) que para oxMWCNTs/PF-127 recubiertos la dispersión consta de nanotubos en pequeños paquetes. Estos resultados están en concordancia con lo observado en el comportamiento macroscópico de las suspensiones descrito en la sección II de este mismo capítulo, donde se observa que la suspensión de oxMWCNTs desnudos es más estable en el tiempo que la suspensión de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos que presenta precipitación de los MWCNTs al paso de un par de semanas.

Este comportamiento a la vista de estos resultados por SEM, explica la paulatina acumulación al paso del tiempo de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos individuales formando pequeños agregados que eventualmente tienden a crecer hasta su precipitación, ya que la metodología de preparación de la suspensión en este estudio involucra centrifugación a 2000 rpm inmediatamente después de preparada la muestra, no observándose precipitados a simple vista después de este tratamiento.

Dado que la precipitación se manifiesta con el paso del tiempo (entre una y dos semanas de preparada la suspensión) revela que las propiedades del PF-127 se combinan, dando por un lado la formación de micelas, además del recubrimiento parcial de paquetes de nanotubos en vez de nanotubos individualizados, mientras que por otro lado muestra la interacción de los bloques hidrófobos con la superficie del nanotubo, donde los bloques hidrófilos que tienen una alta afinidad por el disolvente quedan expuestos formando una configuración de cepillos sobre la superficie del nanotubo brindándole una dispersión estable en medio acuoso.

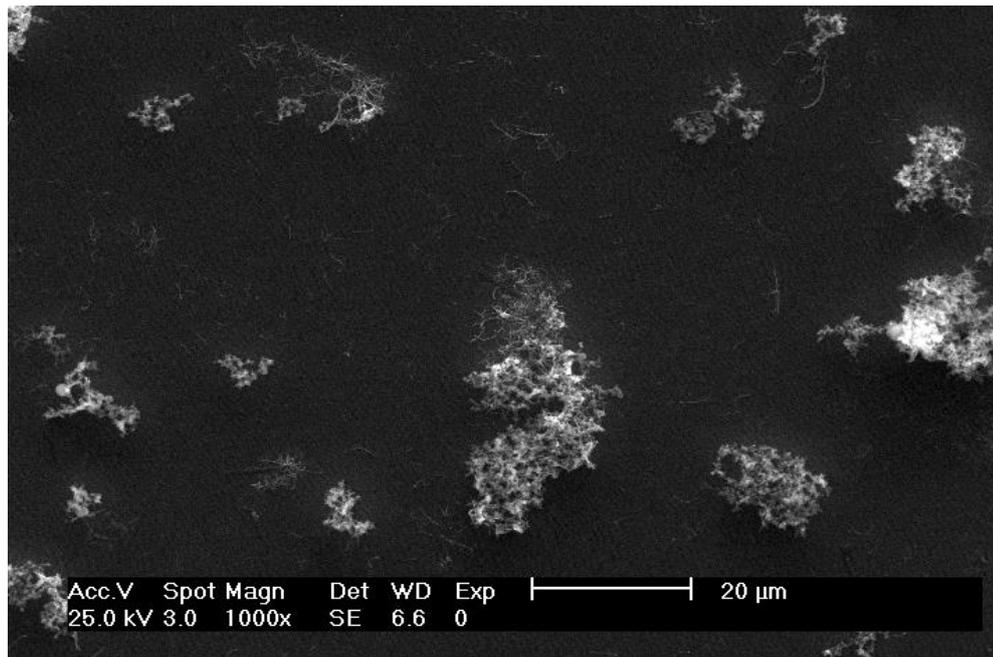


a)

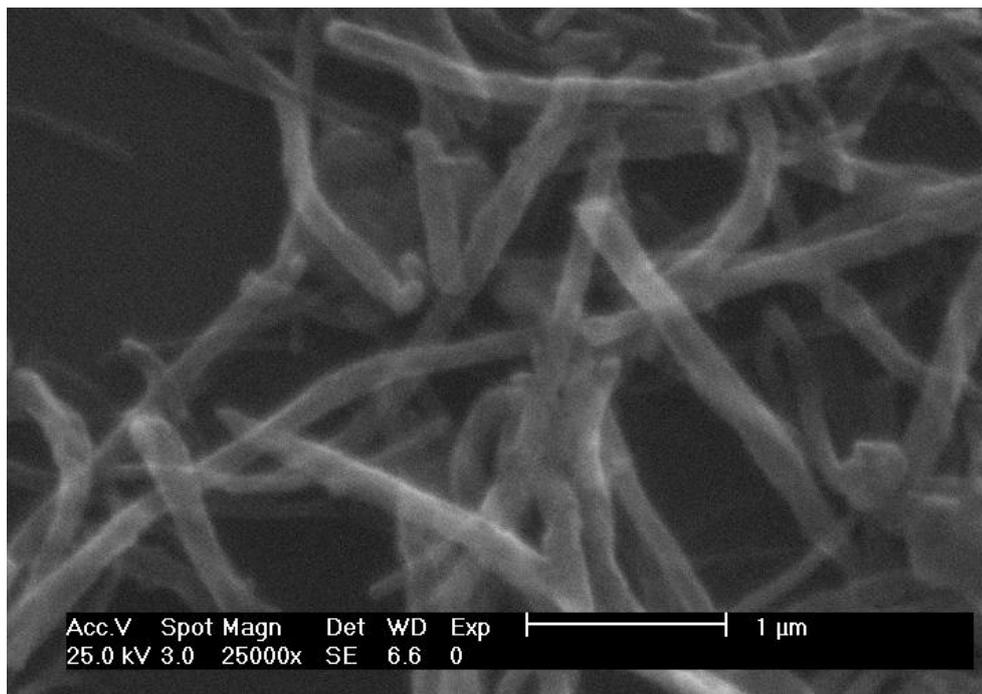


b)

Figura 19. Micrografías por SEM de a) oxMWCNTs 1000x, b) oxMWCNTs 25000x. Se observa una buena dispersión de los oxMWCNTs por depósito de una película delgada de los nanotubos claramente distinguible en b).



a)



b)

Figura 20. Micrografías por SEM de a) oxMWCNTs/PF-127 recubiertos 1000x, b) oxMWCNTs/PF-127 recubiertos 25000x. Se observa a los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos dispersos en forma de pequeños paquetes de nanotubos claramente distinguible en b).

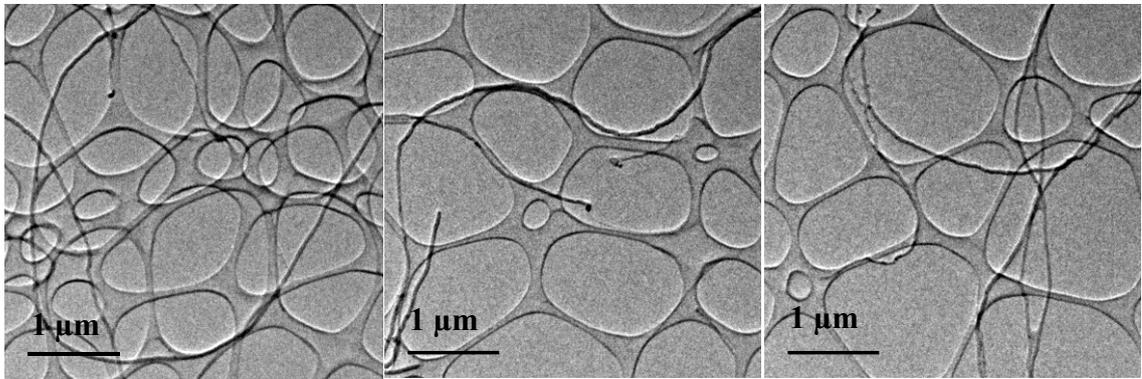
Este comportamiento muestra como el recubrimiento así desarrollado puede verse afectado bien por la formación de micelas entre las moléculas de PF-127, un recubrimiento parcial de las paredes del nanotubo con las moléculas de PF-127, o bien, por el recubrimiento de racimos de nanotubos con PF-127, lo cual conduce tanto a una dispersión completamente homogénea de los nanotubos individuales bien recubiertos, como al mantenimiento de pequeños agregados de nanotubos que se recubren de PF-127 quedando dispersos en la suspensión como grupos de CNTs en racimos, así como al aglomeramiento de micelas en las paredes de nanotubos conduciendo a un recubrimiento denso de PF-127 [93].

IV. TEM

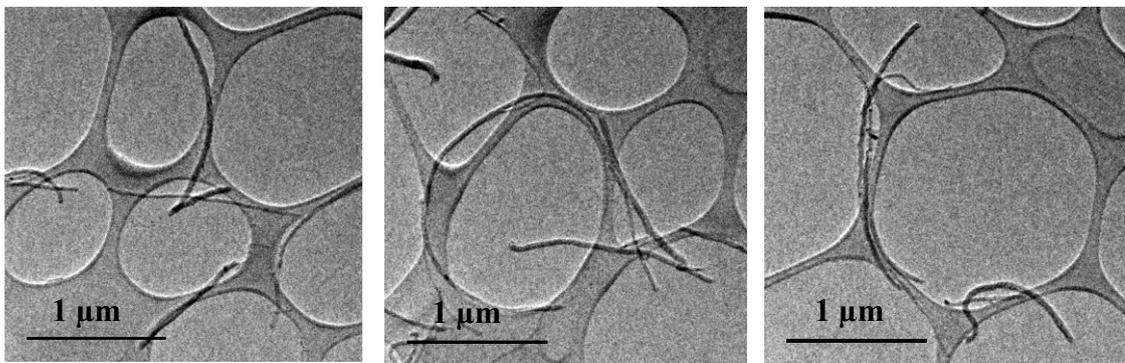
El estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión de las diferentes muestras revela MWCNTs. Los MWCNTs vírgenes presentan un diámetro de alrededor de 60 nm, con una longitud que no fue posible determinar mediante TEM por estar en un orden de magnitud fuera de campo (Figura 21) Presentan también abundantes impurezas metálicas (Figura 22).

Los oxMWCNTs desnudos presentan una reducción en su diámetro de entre 20 y 30 nm, con una disminución considerable de sus paredes, así mismo, las paredes se observan con mayor proporción de defectos debido al tratamiento ácido, el cual contribuye también a una menor proporción de impurezas metálicas presentes después del tratamiento (Figura 22).

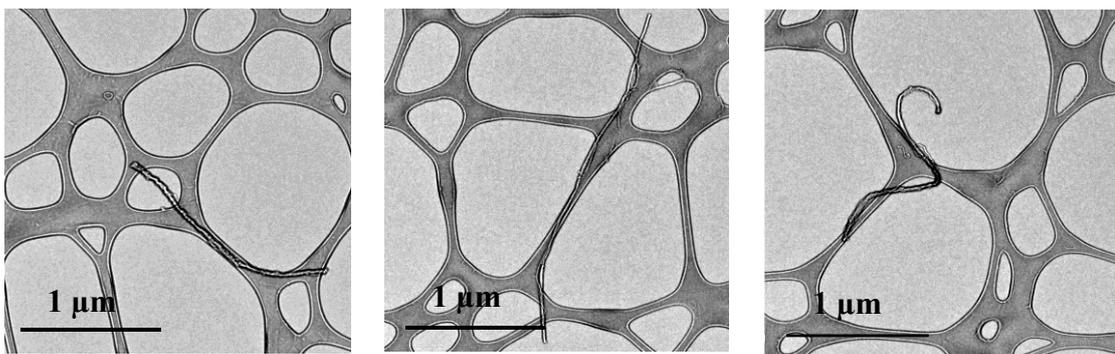
Por otro lado, en la (Figura 23a) se presentan micrografías de los nanotubos completamente embebidos en el polímero PF-127 mediante el tratamiento dado, se observa la presencia de polímero aún en el sustrato rodeando a los nanotubos. De la misma forma, en la (Figura 23b) se presentan las micrografías obtenidas para los oxMWCNTs/PF-127 sometidos a lavados, puede observarse que el recubrimiento polimérico persiste aún después de los lavados. En cuanto a las dimensiones de la película del polímero (Figura 24) los resultados arrojaron un recubrimiento uniforme en toda la pared del nanotubo de aproximadamente 2 nm. En la (Figura 25) se observa la Transformada Rápida de Fourier (FFT por sus siglas en inglés) generado por el software Digital Micrograph, Gatan, a partir de la cual se revela la organización de las paredes de los MWCNTs que presentan un espaciamiento periódico.



a)

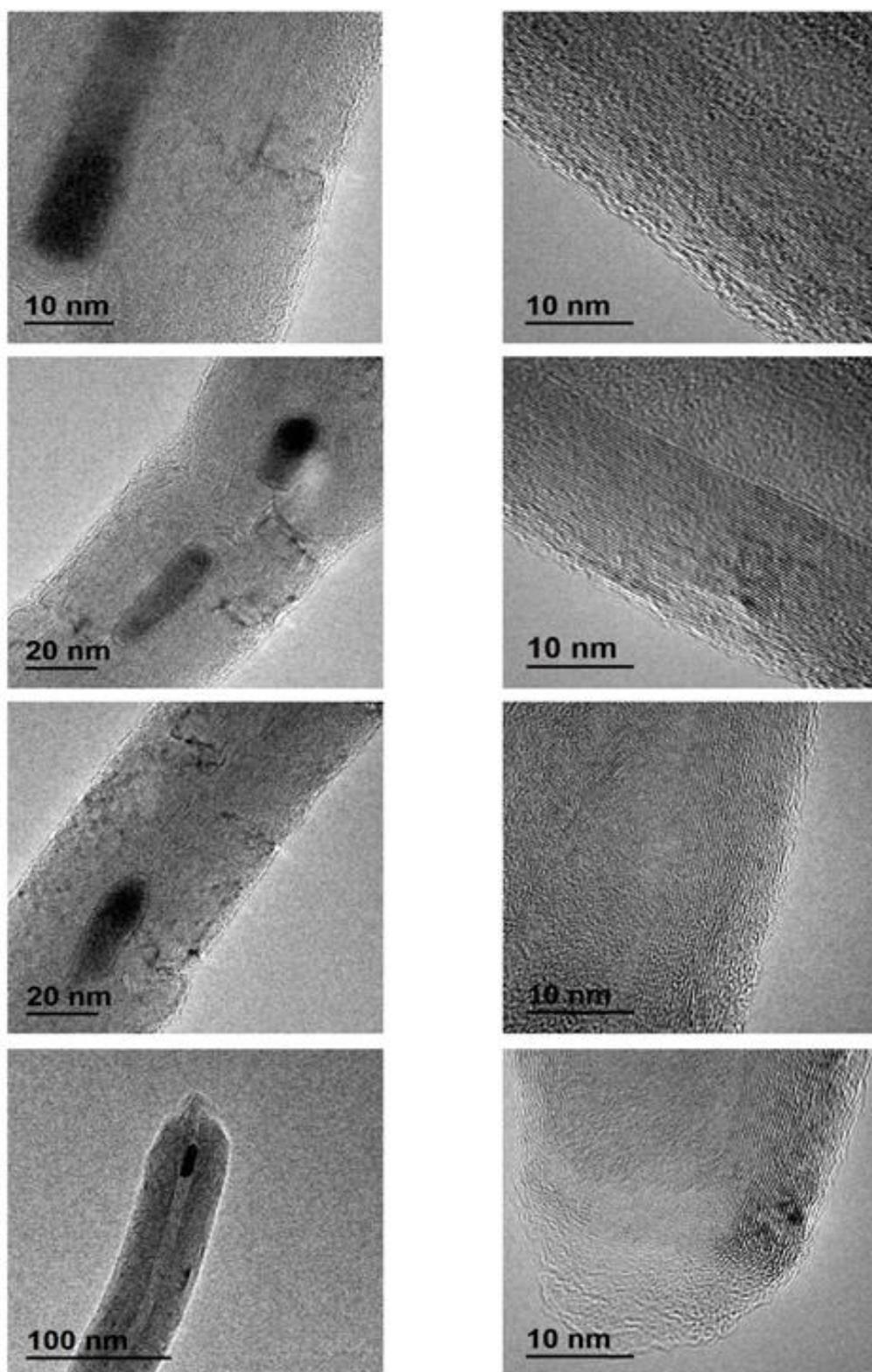


b)



c)

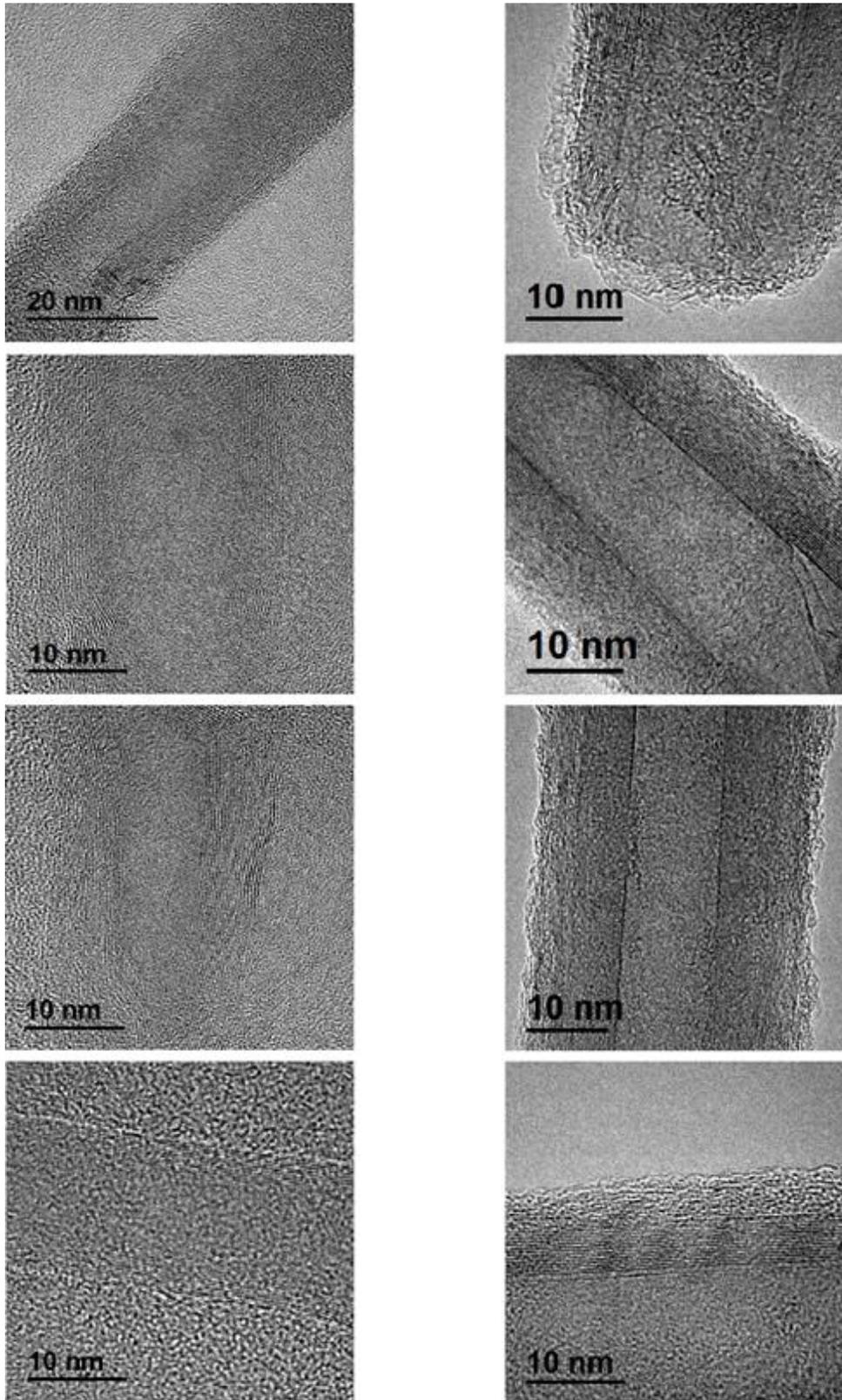
Figura 21. Micrografías por TEM de a) MWCNTs vírgenes de longitud fuera de campo; b) oxMWCNTs longitud 1 a 2 μm ; c) oxMWCNTs/PF-127 longitud 1 a 2 μm .



a)

b)

Figura 22. Micrografías por TEM de, a) MWCNTs vírgenes y, b) oxMWCNTs desnudos.



a)

b)

Figura 23. Micrografías por TEM de, a) oxMWCNTs/PF-127 embebidos en polímero y, b) oxMWCNTs/PF-127 lavados (PF-127 recubiertos).

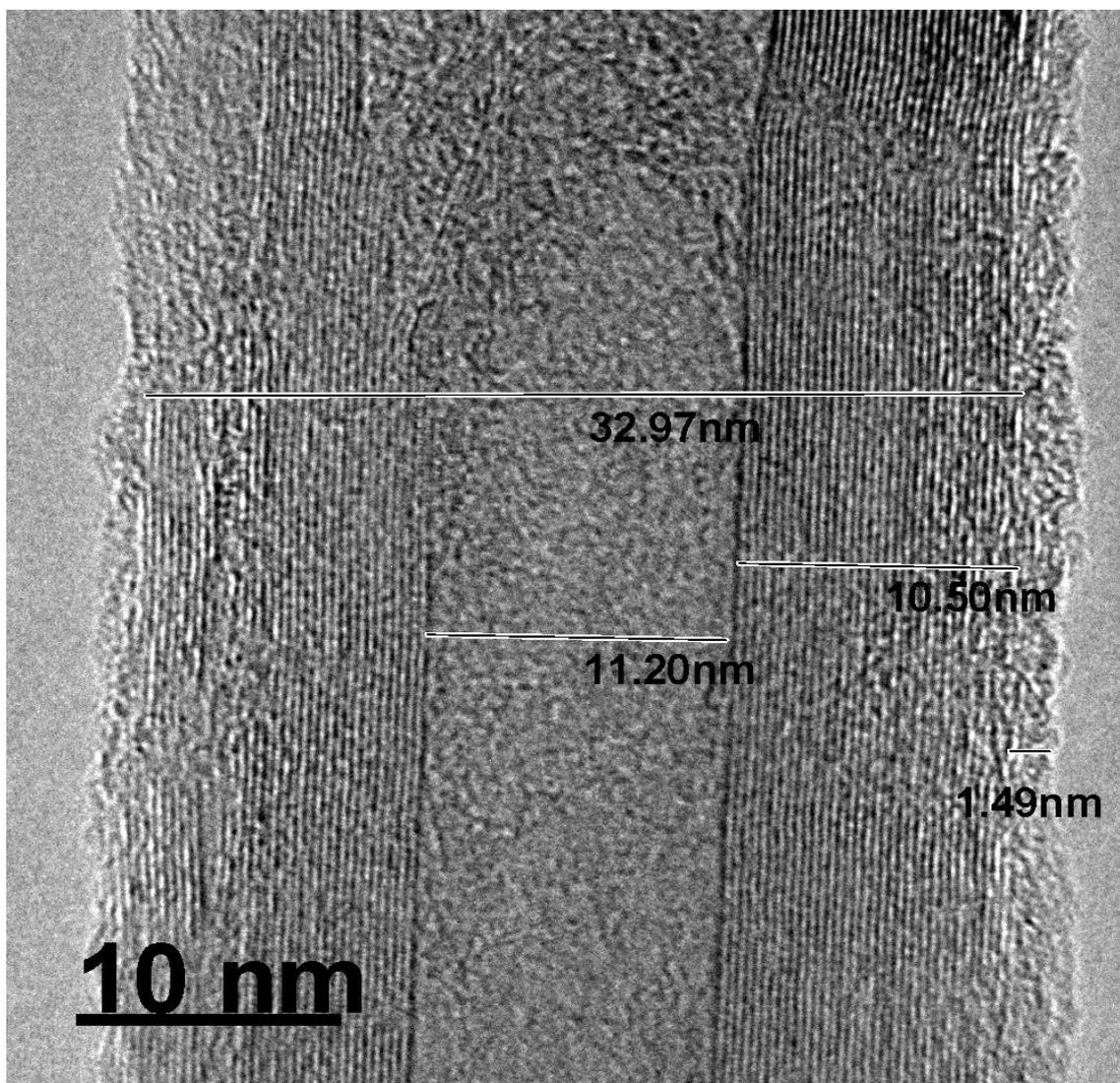


Figura 24. Micrografías por TEM de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos y lavados. Dimensiones aproximadas de diámetro interior de 11.20 nm, ancho de las paredes de 10.50 nm y 1.49 de recubrimiento polimérico.

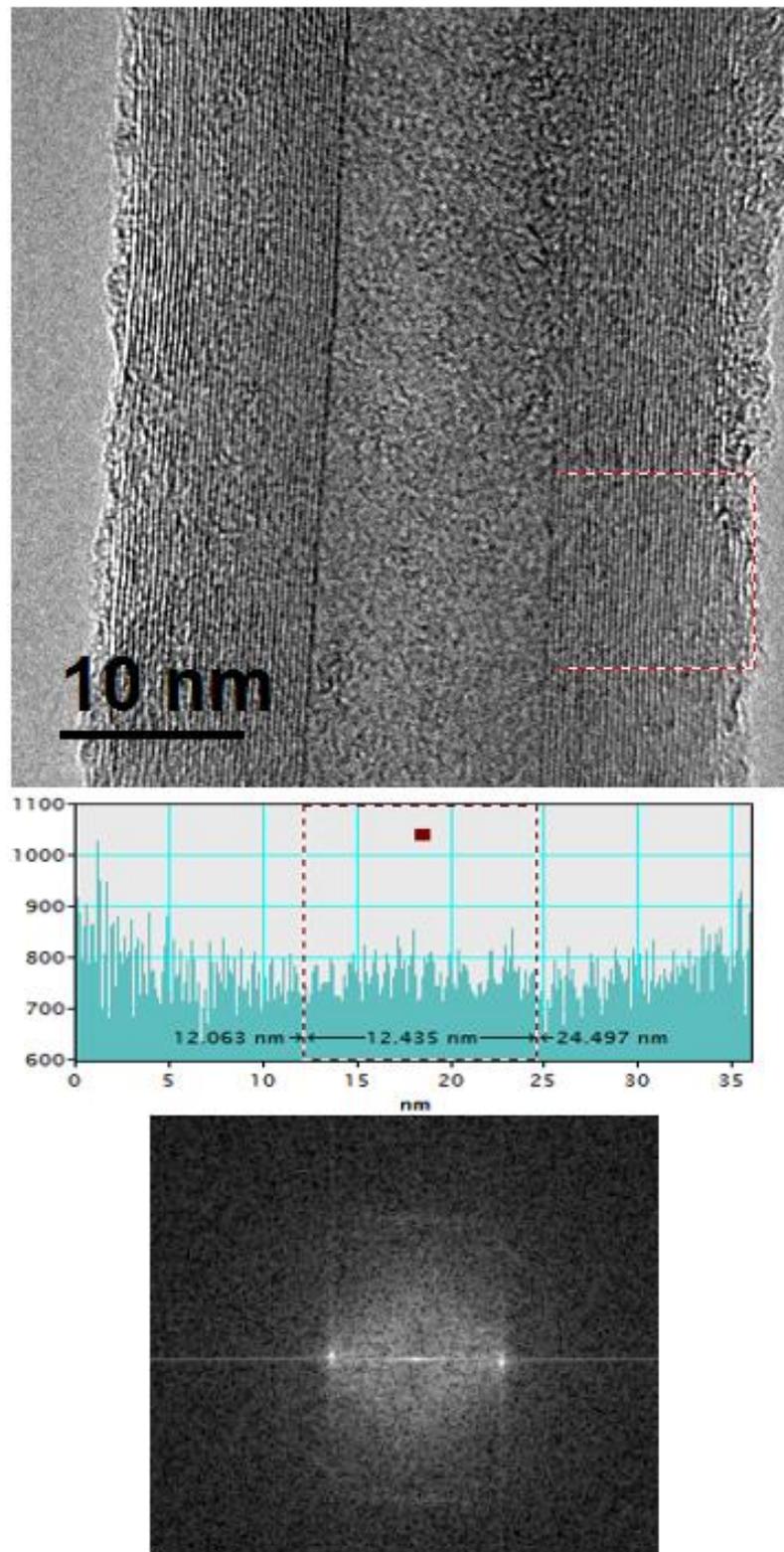


Figura 25. Micrografía TEM de oxMWCNTs/PF-127. Se señala la región de las paredes de donde se origina la FFT a partir de la cual se observa un espaciamiento de nm entre las paredes el patrón de difracción a partir de la FFT de la imagen.

Importante a considerar son los defectos en las paredes observados que se muestran a ser considerables. Al analizar las micrografías por TEM de los MWCNTs vírgenes, oxidados y PF-127 recubiertos se encontró un desplazamiento en la distancia entre paredes de los MWCNTs de magnitud de $\approx 1 \text{ \AA}$ (Figura 26). El espaciamiento más común encontrado entre paredes en los CNTs es de entre 0.32-0.35 nm [94], en buen acuerdo con la distancia entre paredes obtenidas para los MWCNTs vírgenes en este estudio, mientras que para los MWCNTs oxidados y PF-127 recubiertos se encontraron espaciamientos en promedio por arriba de 0.4nm. Este hallazgo puede involucrar apertura de las paredes por destrucción a través del tratamiento dado.

V. EDS

Los MWCNTs estudiados por TEM fueron analizados también por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X, principalmente en las zonas con impurezas provenientes del catalizador utilizado para la síntesis de los MWCNTs como las observadas en la (Figura 27). En el espectro de EDS de la (Figura 27c) se observa que las nanopartículas encerradas en el interior de los nanotubos es fierro, se muestran las señales provenientes del carbono de las paredes del nanotubo y de fierro provenientes del catalizador utilizado para su síntesis, además se puede ver un pico relativo a oxígeno que correspondería a nanopartículas de óxido de fierro. El pico de cobre es debido a la rejilla utilizada para depositar la muestra.

VI. AFM/MFM

En la (Figura 28) se observan micrografías por microscopia de fuerza atómica (AFM) de muestras de oxMWCNTs oxMWCNTs/PF-127 embebidos y oxMWCNTs/PF-127 recubiertos en modo de no contacto para la adquisición de imágenes de altura de las muestras. Se presentan los resultados obtenidos para las 3 muestras con formación de imagen en 3D de topografía. En la figura, se muestran además micrografías de AFM obtenidas en fase magnética (MFM) del mismo campo con el fin de evidenciar las propiedades ferromagnéticas de las muestras.

Para este propósito una punta magnética fue expuesta a un campo magnético por un lapso de 12 h con el fin de aumentar su magnetización y sensibilidad de medición. La punta magnetizada escanea el perfil de topografía del mismo campo analizado para la adquisición de imágenes de altura. La interacción de la fuerza magnética de la punta con

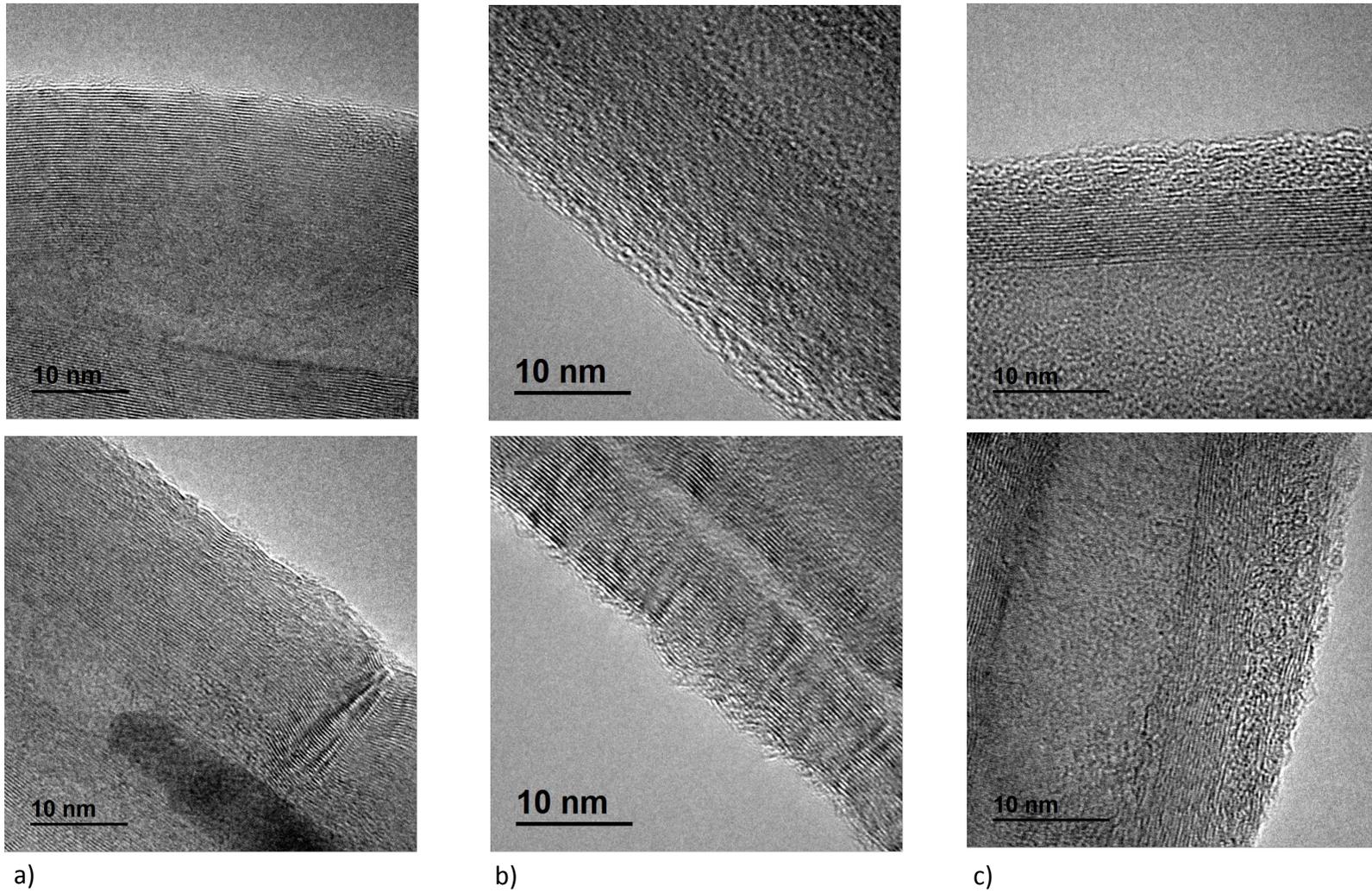
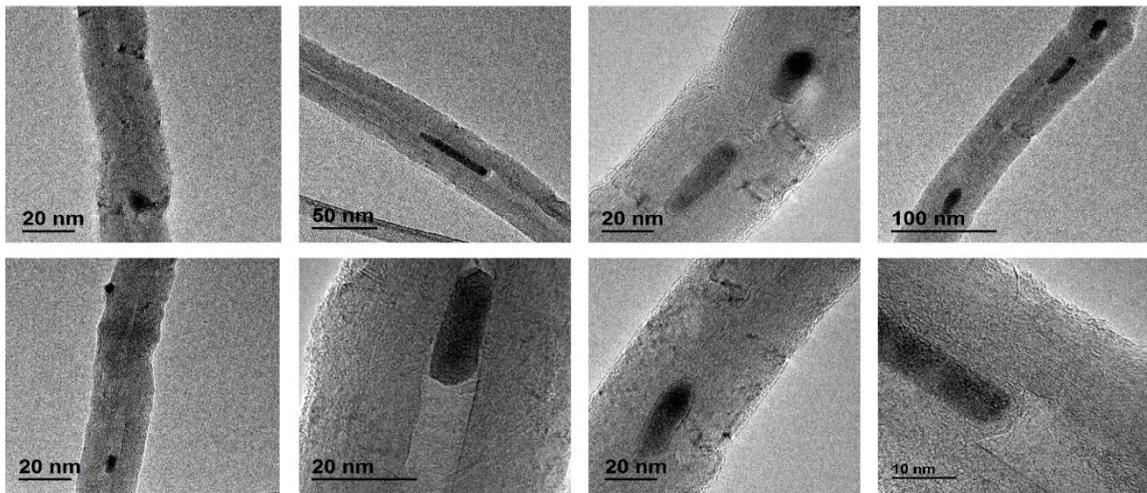
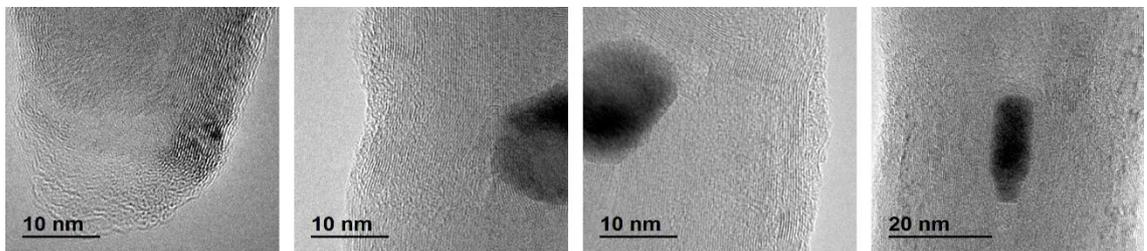


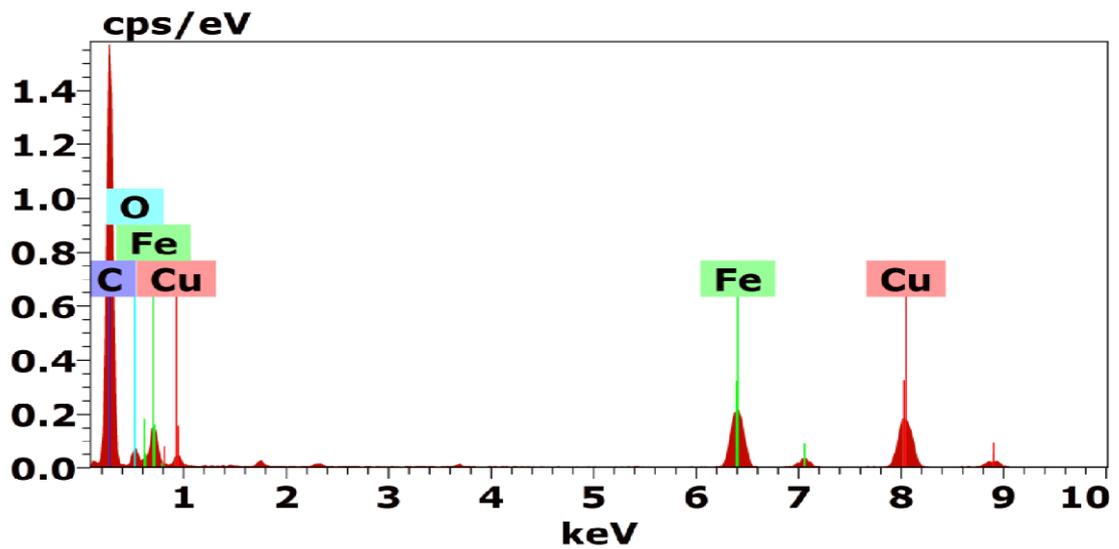
Figura 26. Micrografías TEM de MWCNTs. a) vírgenes, b) oxidados, c) PF-127 recubiertos. Se aprecia el alto grado de defectos en las paredes en cada etapa del tratamiento, con un espaciamiento mayor entre paredes con defectos.



a)



b)



c)

Figura 27. Regiones de impurezas de a) MWCNTs vírgenes, b) de oxMWCNTs y c) EDS de la región de impureza de los MWCNTs.

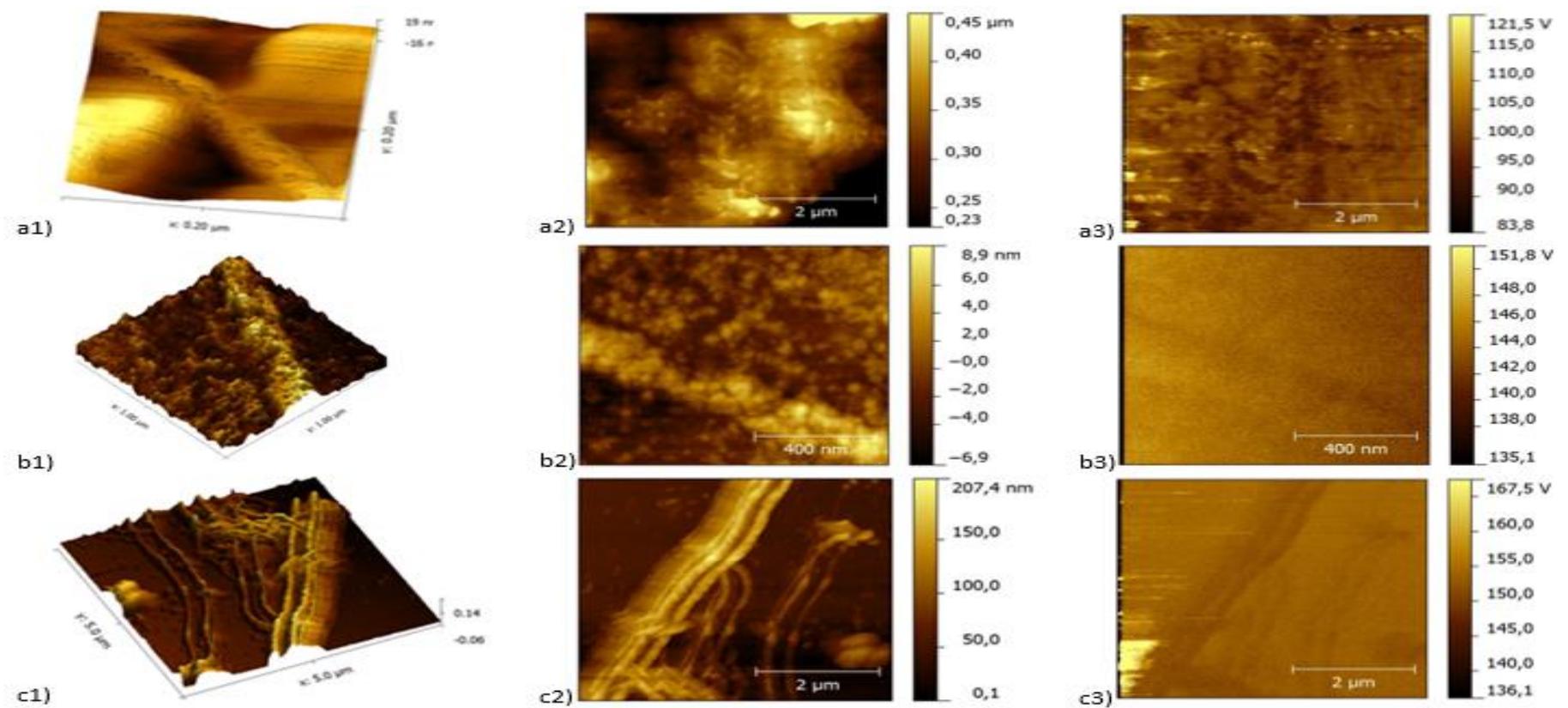


Figura 28. Micrografías por AFM/MFM. 1) Topografía 3D, 2) Topografía 3) Detección de dominios magnéticos por cambio de frecuencia de trabajo. a1, 2) oxMWCNTs/PF-127 embebidos, a3) ningún cambio de frecuencia relacionados con propiedades magnéticas. b1, 2) oxMWCNTs/PF-127 recubiertos, b3) muy poca respuesta por cambio de frecuencia relacionados con propiedades magnéticas y c1, 2) oxMWCNTs desnudos, c3) considerable cambio en la frecuencia de trabajo relacionados con propiedades magnéticas.

la muestra se correlaciona con propiedades ferromagnéticas de la muestra con lo que se obtendría, tras la detección de dominios magnéticos una señal en cambio de frecuencia de trabajo similar a la imagen de altura correspondiente.

Las imágenes de MFM de las diferentes suspensiones de MWCNTs revelan para oxMWCNTs/PF-127 embebidos, ninguna señal de identificación correspondiente a la señal obtenida en la imagen de altura, para oxMWCNTs/PF-127 recubiertos una señal de identificación apenas apreciable y para oxMWCNTs desnudos una señal de identificación considerable, apreciándose una señal que dibuja una silueta equivalente a la señal obtenida en la imagen de altura.

Estos resultados corroboran lo observado en la sección I(2), donde polvos finos de oxMWCNTs son puestos a girar en presencia del campo magnético giratorio generado por el sistema construido.

Sin embargo, los resultados de este estudio revelan que los oxMWCNTs así preparados presentan débil interacción con el campo magnético, consecuencia de la pérdida de impurezas metálicas por el tratamiento oxidativo, que posiblemente reduce en más de lo requerido, el porcentaje de impurezas metálicas para una interacción adecuada con el campo magnético giratorio, la cual se ve aún más disminuida por el recibimiento con PF-127.

A razón de lo observado por MFM puede esperarse que el resultado del tratamiento magnético de las células en presencia de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos no tenga un efecto tan marcado como el deseado.

VII. Rayos X

El patrón de difracción de rayos X de oxMWCNTs/PF-127 muestra picos claramente marcados en: $2\theta = 19^\circ$, $2\theta = 23^\circ$ y, $2\theta = 26^\circ$. Ningún pico se hizo coincidir con el patrón de difracción de las estructuras cristalinas presentes en la muestra.

Los picos correspondiente a $2\theta = 23^\circ$ y $2\theta = 26^\circ$ se espera corresponda a la estructura atómica de las paredes de los MWCNTs destruidos derivada del extenso tratamiento de funcionalización (sonicación en mezcla de ácidos por 24 h) más el proceso de recubrimiento por PF-127 (agitación magnética por 4 h seguido de sonicación por 3 h en solución al 1% de PF-127) las cuales se observan en TEM con un desplazamiento entre

capas de aproximadamente 1 Å en comparación a la distancia entre paredes de los MWCNTs no sometidos al tratamiento.

Sin embargo, para esto, es necesario repetir el proceso de preparación de la muestra, considerar el patrón de difracción de PF-127, de MWCNTs vírgenes y oxMWCNTs por separado ya que la falta del patrón de difracción de las diferentes etapas en la preparación de la suspensión de oxMWCNTs/PF-127 hacen difícil concluir a que se deba el patrón de difracción obtenido (Figura 29).

VIII. Comportamiento de la temperatura tras la radiación láser

En el estudio del efecto de la radiación láser sobre las suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos a concentraciones de 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL (Figura 30) y (Figura 31) radiadas con un láser de 808 nm y 1 W/cm² de potencia. Estos resultados arrojaron que la radiación láser provocó un incremento en la temperatura a todas las concentraciones estudiadas.

Se observó un aumento considerable de la temperatura incluso para la concentración más baja probada de 12.5 µg/mL (Figura 30a). Estos resultados muestran la alta capacidad de MWCNTs para liberar calor después de la exposición a radiación láser con longitud de onda de 808 nm como reportado por otros autores [69], [95], con densidad de potencia de 1 W/cm², una potencia inferior a los tratamientos empleados en otros estudios con láseres de longitud de onda diferente [54], [69], [70], [95], obteniéndose de igual forma el calor requerido para generar temperaturas factibles para la ablación térmica, con tiempos cortos de exposición a la radiación láser.

Las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL mostraron un comportamiento dependiente de la concentración, incrementando su temperatura conforme aumenta la concentración en los mismos tiempos de exposición a la radiación láser (Figura 30a, b, c, d). El mayor aumento de temperatura observado corresponde a la suspensión de concentración 100 µg/mL (Figura 30d). En contraste, no se observó un incremento de temperatura más allá del observado para esta concentración, por el contrario, las suspensiones de concentraciones superiores a 100 µg/mL muestran un estancamiento en su capacidad para aumentar su temperatura al ser expuestos al láser, no alcanzando temperaturas por encima de la temperatura alcanzada por la concentración de 50 µg/mL.

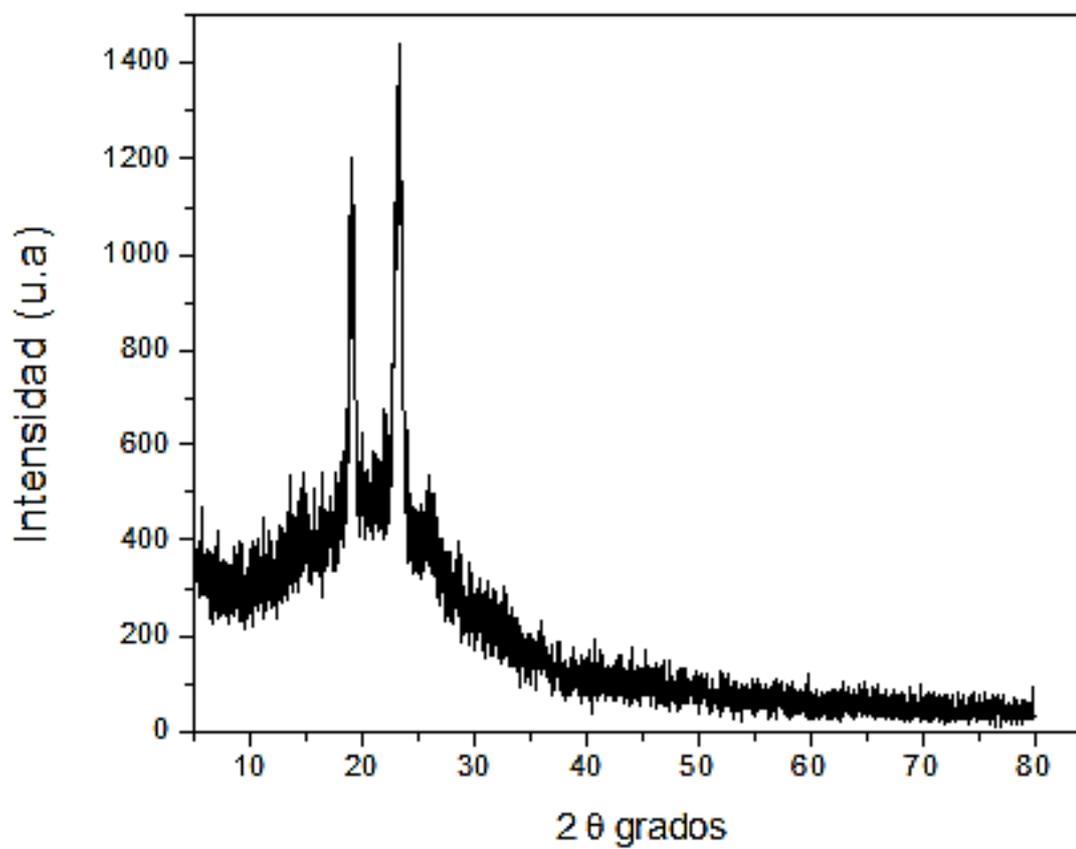
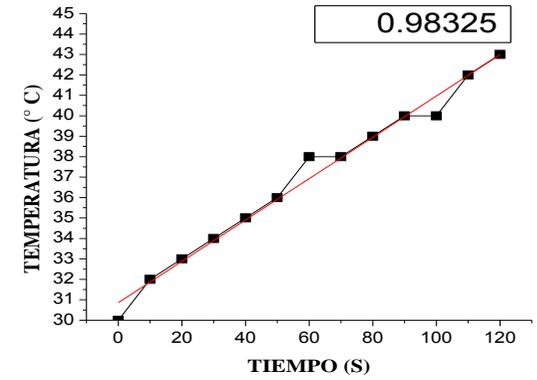
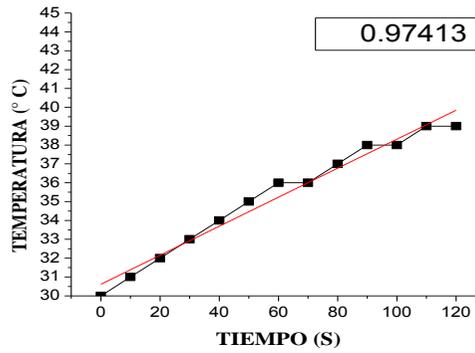
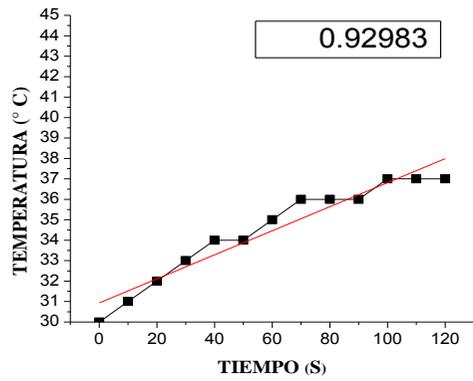


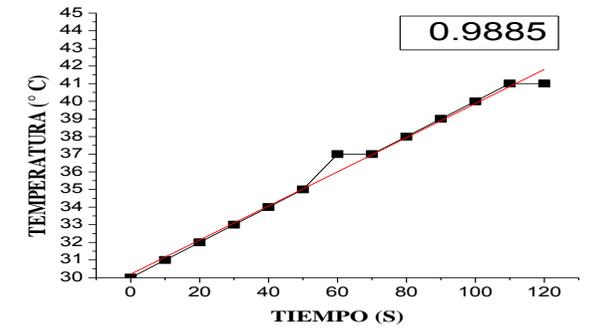
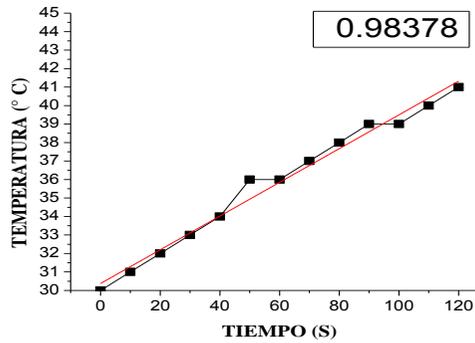
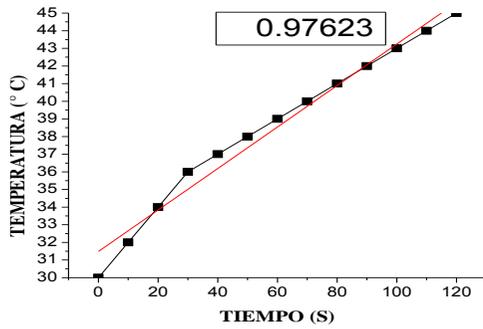
Figura 29. DRX de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos. El patrón de difracción muestra picos en $2\theta = 19^\circ$, $2\theta = 23^\circ$ y $2\theta = 26^\circ$.



a)

b)

c)



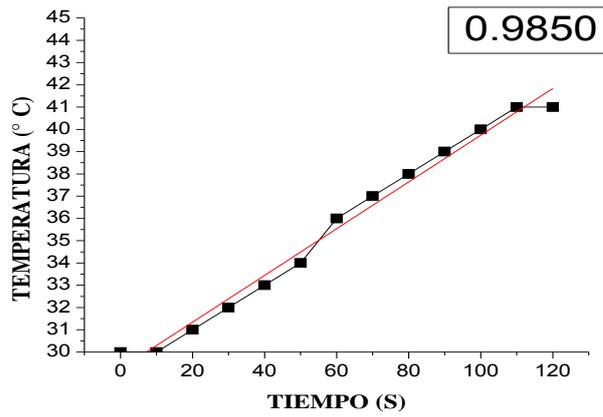
d)

e)

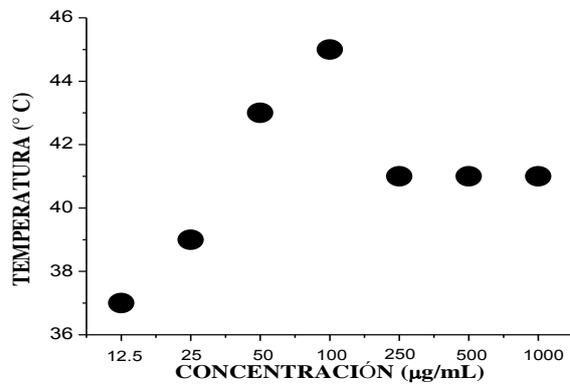
f)

Figura 30. Efecto de la radiación láser sobre suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 para las concentraciones de: a) 12.5 µg/mL, b) 25 µg/mL, c) 50 µg/mL y d) 100 µg/mL, e) 250 µg/mL y f) 500 µg/mL durante tiempo continuo de 2 min.

a)



b)



c)

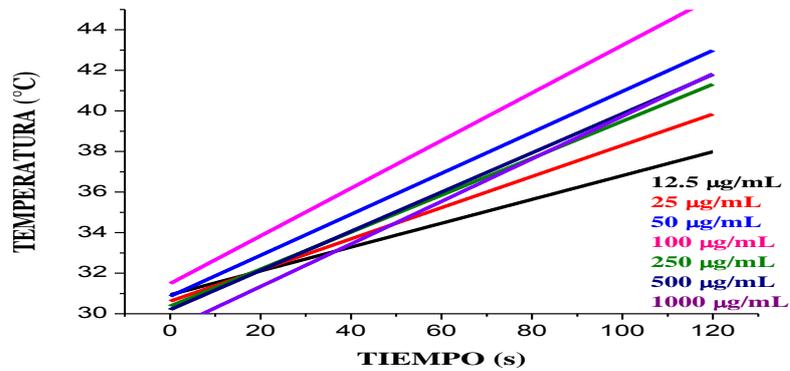


Figura 31. Efecto de la radiación láser sobre suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 para las concentraciones de: a) 1000 µg/mL, b) máximo de temperatura a todas las concentraciones usadas después de 2 minutos de radiación láser y c) representación lineal de comportamiento de la temperatura a todas las concentraciones usadas.

Estos resultados concuerdan, parcialmente con lo reportado en el estudio de la referencia [70], quienes describen un límite de saturación para la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de la cual, suspensiones de concentraciones superiores no presentan un aumento significativo de temperatura respecto a esta concentración. Esta diferencia, en parte, puede deberse a que el espectro de absorción del agua presenta un pico de absorción considerable a la longitud de onda de 1064 nm del láser utilizado en su estudio. En este trabajo el agua pura mostró ser completamente transparente a la longitud de onda del láser utilizado de 808 nm.

El incremento de la temperatura para la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ está en una relación aproximada de 1°C por cada 10 segundos de radiación láser (Figura 30d), este incremento de $\approx 0.1^\circ\text{C}/\text{s}$ refleja el aumento de temperatura en un volumen igual al doble del volumen expuesto al láser, tomando esto en consideración, junto con el comportamiento visto para concentraciones arriba de esta, se decidió un tiempo de exposición de un minuto para los ensayos celulares con suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos a las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

IX. Citotoxicidad de MWCNTs

Se realizaron ensayos de la actividad citotóxica intrínseca de oxMWCNTs desnudos frente a la línea celular cancerosa HeLa en concentraciones de 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 48 h (Figura 32), obteniéndose una proliferación de 87, 81, 77, 72, 71, 61%, respectivamente). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los oxMWCNTs frente al control celular con una $p \leq 0.05$, excepto a la concentración de 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, donde no se encontró diferencia estadística respecto al control.

Los resultados obtenidos para los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos sobre la línea celular HeLa a 48 h fue de 72, 65, 60, 59, 55, 49% a las concentraciones de 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Figura 33), dichos resultados muestran que la citotoxicidad fue considerablemente alta a estas condiciones. Existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de proliferación para todas las concentraciones usadas con respecto al control con una $p \leq 0.05$.

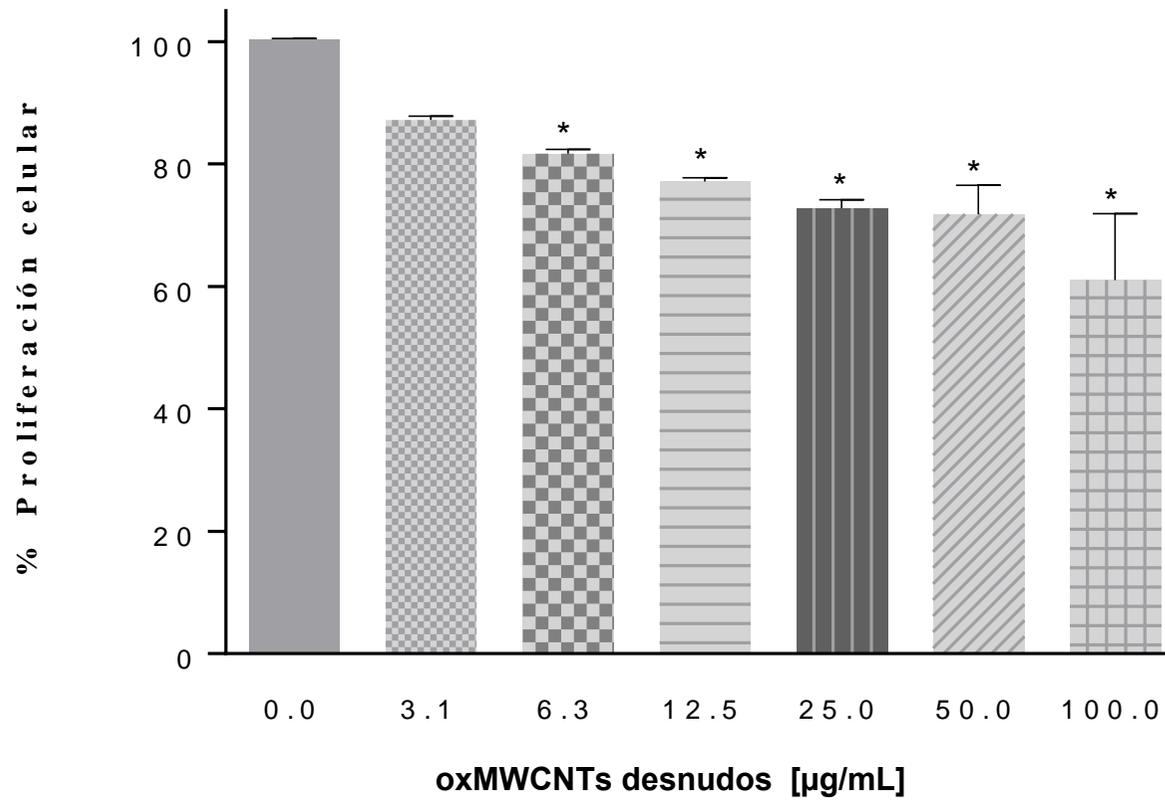


Figura 32. Viabilidad celular después de la exposición de la línea celular HeLa a concentraciones de diluciones 1:1 de suspensiones de oxMWCNTs desnudos a partir de 3.14 µg/mL hasta 100 µg/mL.

Los resultados representan dos ensayos por triplicado ± DS. *Diferencia estadísticamente significativa con $p \leq 0.05$ respecto al control de acuerdo al análisis de Tukey.

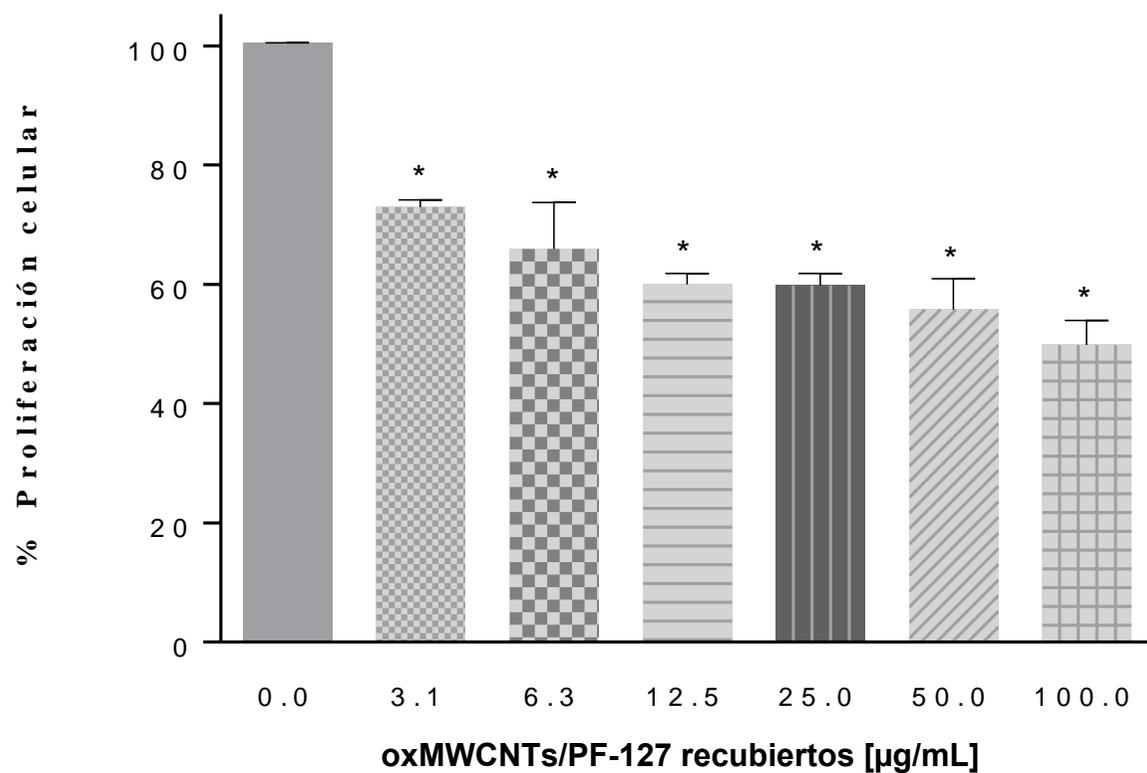


Figura 33. Viabilidad celular después de la exposición de la línea celular HeLa a concentraciones de diluciones 1:1 de suspensiones de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos a partir de 100 µg/mL hasta 3.14 µg/mL.

Los resultados representan dos ensayos por triplicado ± DS. *Diferencia estadísticamente significativa con $p \leq 0.05$ respecto al control, de acuerdo al análisis de Tukey.

El comportamiento de la citotoxicidad muestra ser dependiente de la concentración, revelando un mayor efecto para los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos que para oxMWCNTs desnudos (Figura 32) y (Figura 33) respectivamente.

En la (Figura 34) se muestran las imágenes de los cultivos después de las 48 horas con las diferentes concentraciones de los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos, se observan aglomeraciones celulares inusuales con marcada coloración negra, posiblemente debida a los nanotubos. En contraparte con los controles que muestran células íntegras en su morfología. Por otro lado la (Figura 35) muestra la presencia de una gran cantidad de cristales de formazan que van disminuyendo conforme aumentamos la concentración de los nanotubos recubiertos.

La toxicidad de CNTs se ha relacionado fuertemente con el grado de aglomeración y la solubilidad en agua [96]. A partir de la información obtenida de los resultados de la evaluación de la citotoxicidad de las suspensiones de oxMWCNTs desnudos y oxMWCNTs/PF127 recubiertos, donde los oxMWCNTs/PF127 recubiertos exhiben mayor citotoxicidad, junto con los datos derivados de las micrografías por SEM, que revelan que la dispersión de los oxMWCNTs/PF127 recubiertos en suspensión consta de pequeños paquetes de nanotubos y, la observación macroscópica de la estabilidad de las 2 suspensiones de nanotubos, en donde se observa a la suspensión de oxMWCNTs/PF127 recubiertos formar precipitados al paso de unos cuantos días de preparada la suspensión, puede fácilmente atribuirse esta citotoxicidad observada a estos factores ampliamente reportados como influyentes en la toxicidad de CNTs.

Por otro lado, el grado de toxicidad de los CNTs se ha identificado a estar en relación a sus dimensiones (distribución de diámetros y longitudes), densidad de defectos en las paredes (huecos, dobleces), subproductos en el proceso de síntesis (residuos de catalizador, carbono amorfo, fullerenos) y al proceso de funcionalización (grafeno oxidado, óxidos metálicos) [97]. Así, la longitud y diámetro de los CNTs, impurezas y densidad de funcionalización juegan un papel igualmente importante en cuanto a su toxicidad [91]

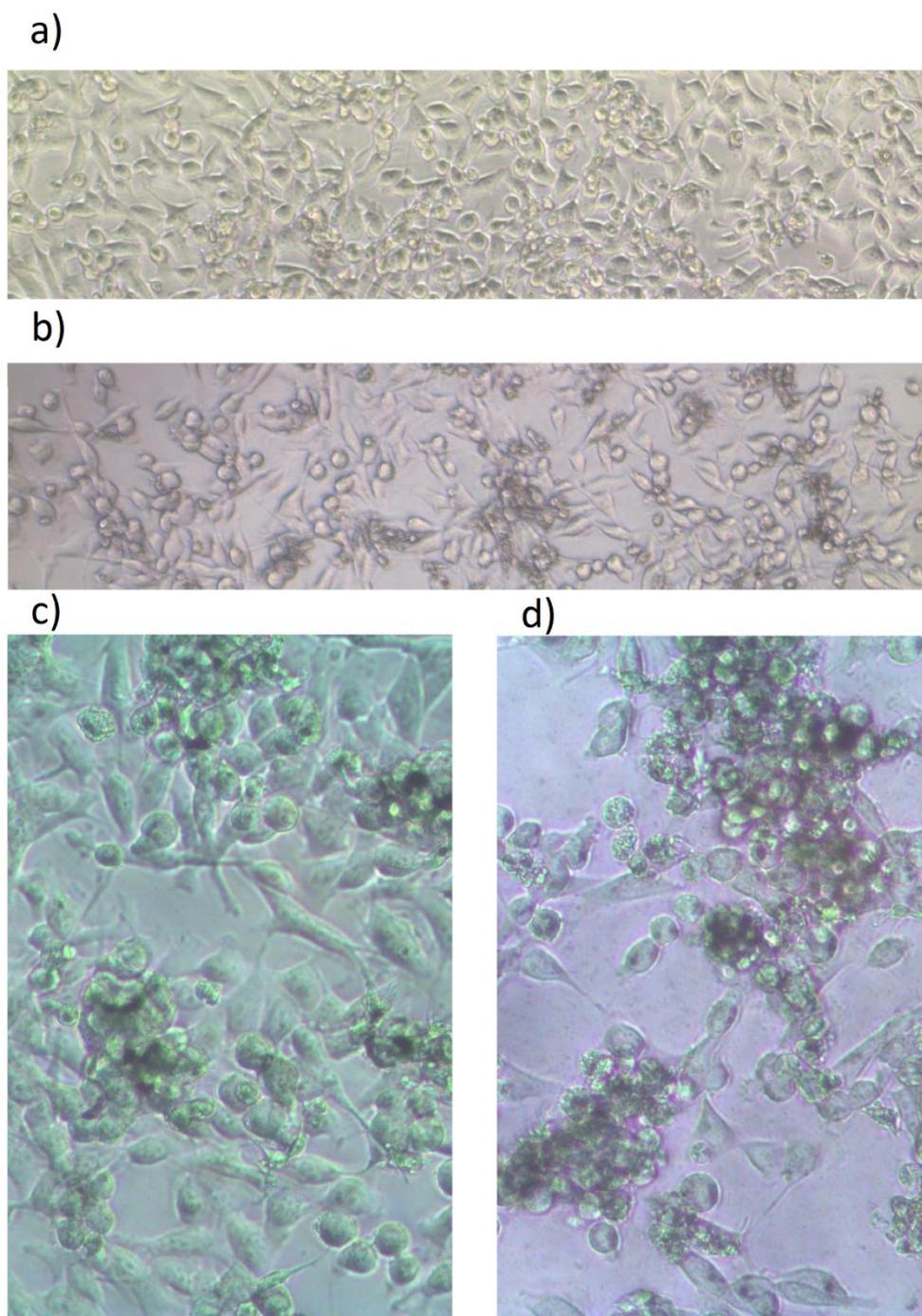


Figura 34. Imágenes de células HeLa tratadas con oxMWCNTs/PF-127: a) control de células sin MWCNTs/PF-127, b) 12.5 µg/mL, c) 50 µg/mL, d) 100 µg/mL.

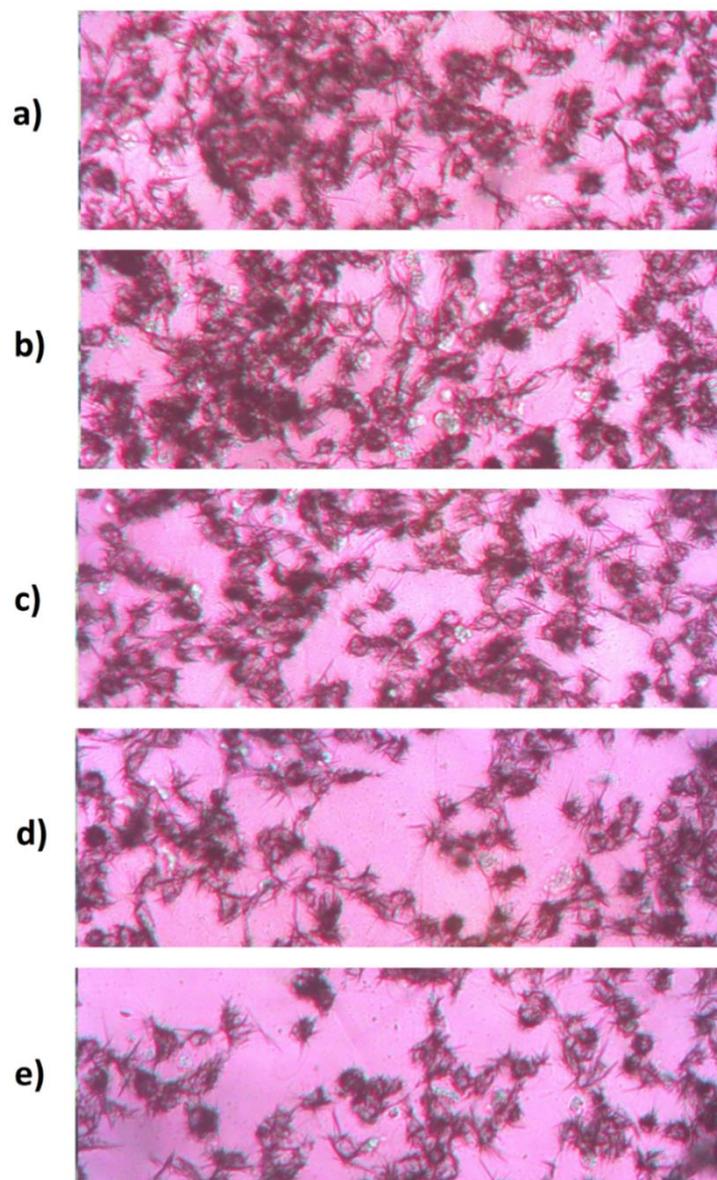


Figura 35. Imagen de los cristales de formazan en células HeLa después de 48 horas de expuestas a MWCNTs a las concentraciones de a) 6.5 $\mu\text{g/mL}$, b) 12.5 $\mu\text{g/mL}$, c) 25 $\mu\text{g/mL}$ d) 50 $\mu\text{g/mL}$ e) 100 $\mu\text{g/mL}$ después de 4 horas de contacto con el reactivo MTT.

Por otro lado, el grado de toxicidad de los CNTs se ha identificado a estar relacionada con sus dimensiones (distribución de diámetros y longitudes), densidad de defectos en las paredes (huecos, dobleces), subproductos en el proceso de síntesis (residuos de catalizador, carbono amorfo, fullerenos) y al proceso de funcionalización (grafeno oxidado, óxidos metálicos) [97]. Así, la longitud y diámetro de los CNTs, impurezas y densidad de funcionalización juegan un papel igualmente importante en cuanto a su toxicidad [91].

Dado que las suspensiones de MWCNTs preparadas en este estudio constan de nanotubos en un rango de dimensión muy amplio tanto de diámetro como de longitud, esto evidenciado por TEM, donde además se observa un grado alto de defectos en las paredes de los nanotubos, causa del prolongado tratamiento bajo sonicación en mezcla de ácidos, ambos factores reconocidos como críticos en el grado de toxicidad de nanotubos, se correlacionan y explican los resultados obtenidos.

Estos resultados pueden verse contrastar con otros reportes, por ejemplo, en un reporte de reciente publicación [98], se demostró que la exposición de 20 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs oxidados (aquí denotados como oxMWCNTs desnudos) causan citotoxicidad mínima en células HaCaT, la cual es estadísticamente no significativa con respecto a su control de células sin tratamiento a las 0.5 y 24 h. Comparando este estudio con los resultados aquí obtenidos para oxMWCNTs desnudos donde incluso a la concentración más baja probada (3.1 $\mu\text{g/mL}$) se observa citotoxicidad estadísticamente significativa respecto al control, es clara la discrepancia en la citotoxicidad.

Esta diferencia en los resultados puede ser atribuida al tipo de línea celular empleada y al tiempo de exposición al tratamiento, sin embargo, en el artículo no se mencionan las dimensiones de los nanotubos, condiciones de oxidación, ni hacen referencia a si se llevó a cabo o no caracterización fisicoquímica de la muestra, lo que hace difícil discutir si existe la posibilidad de que ambos nanotubos puedan comportarse de manera similar en la interacción con las células.

Por otro lado, en sentido contrario, estos resultados pueden verse confirmar con otros reportes, por ejemplo, en un reporte en el que evalúan citotoxicidad de MWCNTs simplemente oxidados por ensayo MTT [62] se demostró que la exposición de 40 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs oxidados causan citotoxicidad en células de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) comparable a los resultados obtenidos en este estudio sobre células

HeLa, en los mismos tiempos de exposición. La concordancia de este estudio con los resultados aquí obtenidos para oxMWCNTs desnudos independientemente de la línea celular empleada tiene relación a las similitudes de los procesos para la obtención de la suspensión de los nanotubos, en las que, las técnicas empleadas para su caracterización, aun siendo diferentes, denotan ciertas características fisicoquímicas en similitud para las preparaciones de MWCNTs oxidados en cada estudio.

X. Tratamiento láser de las células HeLa en presencia de MWCNTs

En este estudio se puede apreciar clara toxicidad inherente de los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos al observar el decaimiento de la viabilidad de las células HeLa en el grupo control con oxMWCNTs/PF-127 recubiertos sin exposición láser, la cual disminuyó significativamente respecto al control de forma dependiente a la concentración de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos tras solo 2 h de incubación. Estos resultados en comparación con lo observado en el estudio de citotoxicidad de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos, que comprende una exposición a oxMWCNTs/PF-127 recubiertos por 48 h en cultivo, revela que la toxicidad producida a causa de la presencia de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos ocurre en las primeras horas y no depende del tiempo, ya que se puede observar una toxicidad equivalente. Sin embargo un estudio más detallado no se realizó.

No obstante, lo obtenido en este estudio para el grupo control de células HeLa con nanotubos sin exposición al láser, contrasta con los resultados obtenidos contenidos en la referencia [62] que reporta, citotoxicidad dependiente del tiempo en cuatro diferentes grupos, que comprenden, células NHDF y exposición a MWCNTs oxidados por 24, 48, 72, 96 h, revelando mayor citotoxicidad a mayor tiempo de exposición a los MWCNTs oxidados. Esta diferencia puede atribuirse tanto al tipo de célula en estudio, como a la diferencia en los nanotubos, además del recubrimiento de polímero de los MWCNTs aquí estudiados. Estos datos, junto con los datos encontrados en la referencia [98] con MWCNTs oxidados sobre células HaCaT, que revela una recuperación de las células después de perturbada su normalidad por la presencia de nanotubos, refuerza esta hipótesis e indica que el daño producido es reversible y no trasciende más allá del provocado inicialmente por su presencia para ciertas células tolerantes, sin embargo, a razón de nuestro conocimiento no existe un estudio confirmatorio en detalle.

Por otro lado, aunque el daño producido solo por los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos puede considerarse apreciable, trabajos recientes han mostrado que una purificación más estricta de los nanotubos en cuanto a su forma, junto con una adecuada funcionalización y enriquecimiento del medio de cultivo (para compensar el secuestro de nutrientes por los CNTs) se traduce en una mayor biocompatibilidad y una reducción sustancial de su toxicidad haciéndola apenas apreciable [99], [100].

En este estudio es muy notorio y completamente contrastante el daño producido al sumarse la exposición a la fuente láser en las células en presencia de los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos. Por lo que estos resultados muestran un efecto citotóxico contundente atribuible a la combinación de los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos y exposición al láser, observándose incluso inhibición total para el grupo de células con 100 $\mu\text{g/mL}$ de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos con un minuto de exposición al láser. Esto demuestra que el efecto toxico conjunto de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos + Láser permite producir un aumento localizado de temperatura sobre las células con potencial destructivo que se traduce en la ablación térmica de las células cancerígenas.

Además, ya que el grupo control (exposición de los cultivos al haz de luz láser en ausencia de MWCNTs) no muestra ningún deterioro ni pérdida de la viabilidad celular, demuestra que, si bien no se puso a prueba un tejido biológico de forma íntegra, las células junto con el medio de cultivo, suero bovino y nutrientes son altamente transparentes en la región NIR. Esto, con los resultados de ablación térmica total de las células tras el tratamiento hace evidente el potencial uso de este enfoque terapéutico en la terapia de tumores sólidos (Figura 36).

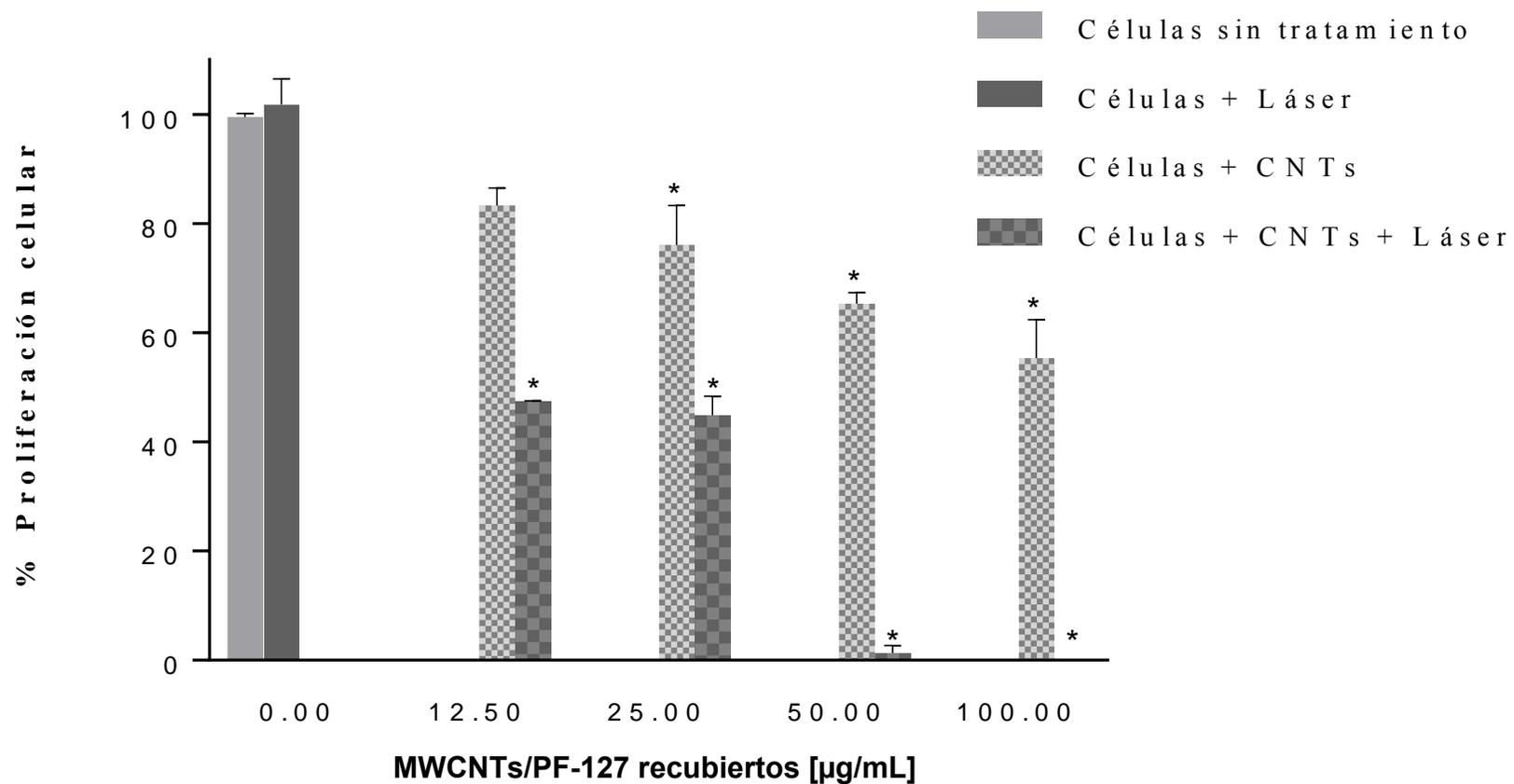


Figura 36. Viabilidad celular después del tratamiento láser en presencia de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos frente a la línea celular HeLa. Los resultados representan dos ensayos por triplicado \pm DS. * Diferencia estadísticamente significativa con $p \leq 0.05$ respecto a los controles, de acuerdo al análisis de Tukey.

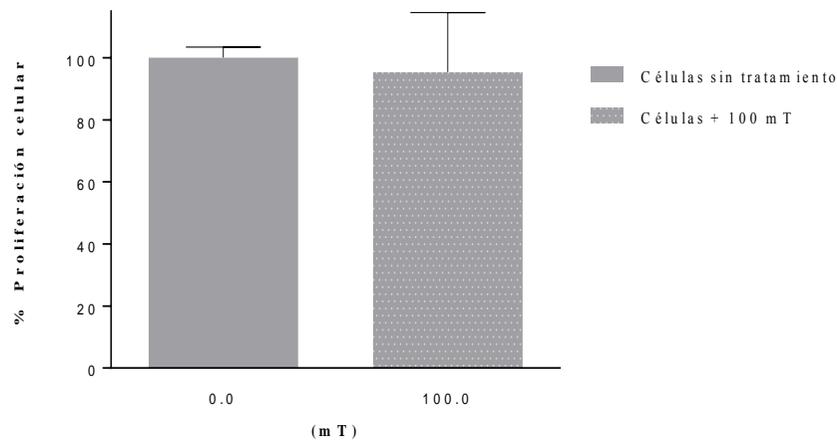
XI. Tratamiento magnético de las células HeLa en presencia de MWCNTs

Después de este tratamiento la viabilidad de las células HeLa en el grupo control con oxMWCNTs/PF-127 recubiertos sin campo magnético aplicado disminuyó significativamente después de 24 h de cultivo (Figura 37a). Sin embargo, el estudio de citotoxicidad de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos evaluada en el apartado IX, no revela una citotoxicidad tan drástica para ninguna de las concentraciones de las diferentes suspensiones de MWCNTs con 48 horas de cultivo. Estos resultados sugieren que las células son mucho más sensibles en suspensión que cuando están adheridas a la placa de cultivo, posiblemente debido a que la estirpe utilizada de células HeLa no se adapte bien a las condiciones de suspensión, siendo la fase de adhesión la más óptima para su supervivencia, por lo que la presencia de los nanotubos en la suspensión desmejora su supervivencia en suspensión.

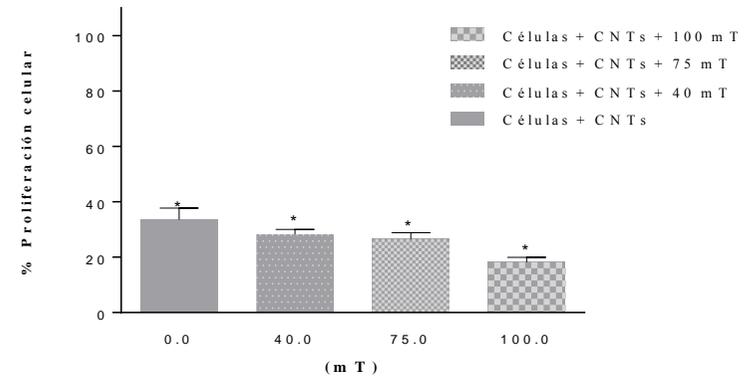
Así, la toxicidad apreciada es debida más que nada a la excesiva manipulación de las células durante el tratamiento. Esta manipulación deteriora la viabilidad celular debido posiblemente al choque entre nanotubos y células en el evento de homogenización de la suspensión celular, ya que en el grupo control sin nanotubos no se presentó deterioro alguno en la viabilidad haciendo uso del mismo procedimiento en la manipulación.

Sin embargo, a pesar de la toxicidad mostrada a causa de la sola presencia de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos, es posible observar cierto efecto en cuanto a la destrucción celular promovida por los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos inducidos a girar en respuesta a la presencia del campo magnético giratorio externo. Por otro lado, el grupo control de células HeLa (exposición de los cultivos a la intensidad de campo magnético más alta probada en ausencia de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos) no muestra ningún deterioro considerable del crecimiento celular y la viabilidad (Figura 37b).

Para los grupos en los que se determinó la viabilidad celular después del tratamiento magnético a 40, 75 y 100 mT en las suspensiones celulares en presencia de los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos se observó que la combinación de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos y las diferentes intensidades de campo magnético giratorio produce en todos los casos un mínimo efecto perjudicial sobre las células. Aun así es evidente un efecto dependiente de la intensidad del flujo del campo magnético, siendo el único tratamiento a considerarse significativo el correspondiente a 100 mT.



a)



b)

Figura 37. Viabilidad celular en la línea tumoral HeLa a) control de células expuestas y no al campo magnético giratorio sin ningún tratamiento adicional, b) células después del tratamiento con el campo magnético en presencia de oxMWCNTs/PF-127.

Los resultados representan un ensayo por triplicado \pm DS. *Diferencia estadísticamente significativa con $p \leq 0.05$ respecto a los controles en a), de acuerdo al análisis de Tukey.

Este resultado tan débil en cuanto a la afectación de la viabilidad celular es debido a una pobre interacción de los MWCNTs/PF-127 recubiertos al campo magnético giratorio debido a una reducción de impurezas metálicas en los MWCNTs vírgenes a causa del tratamiento para la obtención de oxMWCNTs. Esta reducción de impurezas metálicas a causa del extenso tratamiento oxidativo, como era de esperar, y evidenciado por TEM (Figura 22) redujo por mucho el % de impurezas metálicas requerido para obtener una respuesta uniforme de todos los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos individuales en suspensión, quedándose muchos nanotubos sin impurezas metálicas, volviéndolos incapaces de reaccionar al campo magnético giratorio.

Además, la respuesta de los oxMWCNTs fue aún menos al estar recubiertos del polímero PF-127. Esta aún más débil respuesta al campo magnético de los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos fue revelada por AFM/MFM en comparación con la respuesta obtenida por los oxMWCNTs. No obstante el estudio permite mostrar la capacidad de los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos a girar individualmente en presencia del campo magnético giratorio y el daño mecánico producido en presencia de las células HeLa.

Este efecto es más notorios al tomar como control (+) el correspondiente porcentaje de células viables que resultaron de la citotoxicidad inherente de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos. Estos resultados indican que el campo magnético juega un papel en la viabilidad celular al producir giros de los oxMWCNTs/PF-127 recubiertos en cultivo provocando que la membrana celular falle debido al daño mecánico producido por los oxMWCNTs/PF-127 inducidos a girar por el campo magnético giratorio, haciendo evidente su potencial uso en la ablación mecánica de tumores sólidos (Figura 38).

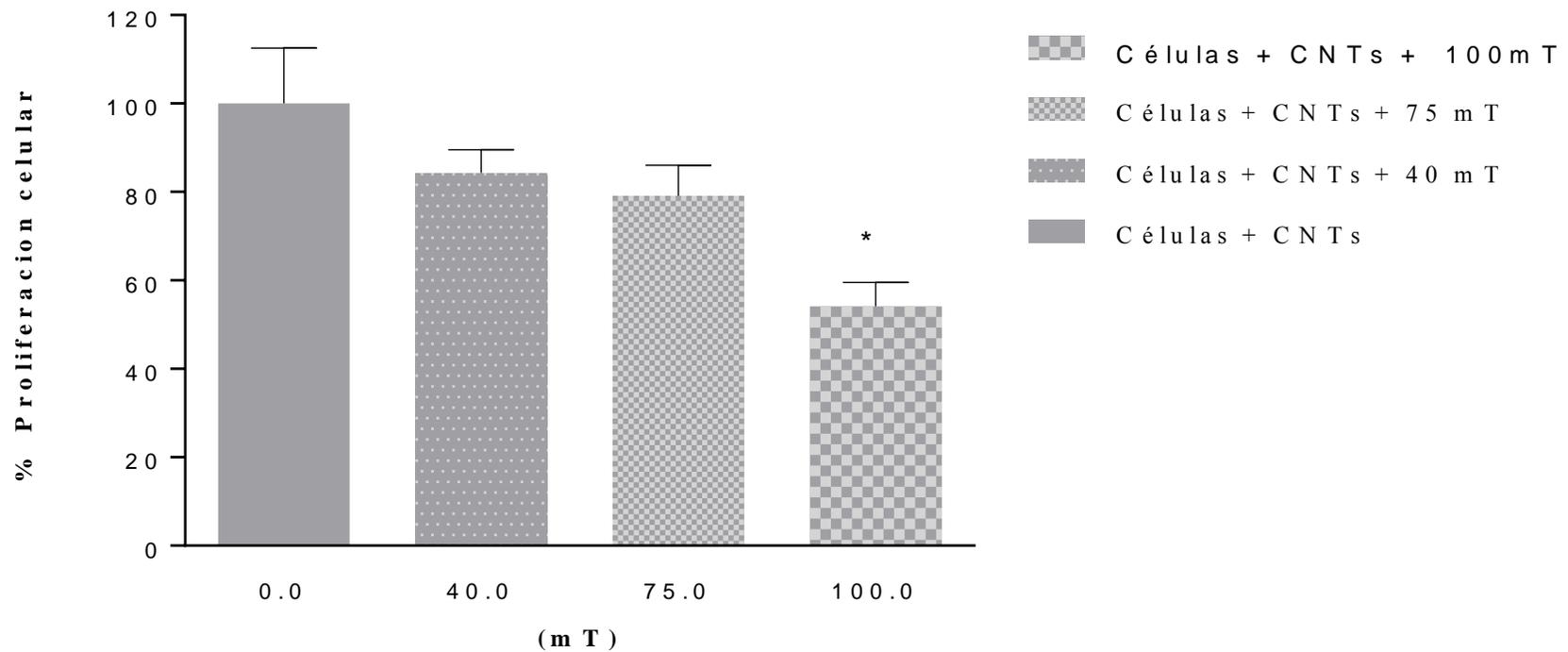


Figura 38. Viabilidad celular después del tratamiento con el campo magnético en presencia de oxMWCNTs/PF-127 recubiertos. Los datos corresponden a la normalización de la viabilidad celular a partir del porcentaje de proliferación del grupo control con oxMWCNTs/PF-127 recubiertos sin campo magnético (porcentaje de células viables que resultan de la citotoxicidad intrínseca de MWCNTs).

Los resultados representan un ensayo por triplicado \pm DS. * Diferencia estadísticamente significativa con $p \leq 0.05$ respecto a las células con CNTs a 0.0 mT.

CONCLUSIONES

- A partir del estudio del efecto de MWCNTs funcionalizados sobre células HeLa se observó la citotoxicidad intrínseca de los MWCNTs permitiendo solo un 57 % de proliferación celular para concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs.
- En el caso de los MWCNTs funcionalizados y radiados por láser, las propiedades fototérmicas permitieron la inhibición total de la proliferación celular para la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de los MWCNTs radiados.
- En la utilización de las propiedades ferromagnéticas de los MWCNTs sobre células HeLa, se observa que solo en el caso de la utilización de un campo de 100 mT sobre células con 20 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs se obtuvo una proliferación celular del 50%.
- Así, se consiguió inducir la muerte de la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa en cultivo, a través de las propiedades ferromagnéticas y fototérmicas de MWCNTs gracias también al tratamiento químico de oxidación y funcionalización con polímero para inducir una dispersión duradera y conferirle propiedades de biocompatibilidad con el polímero de recubrimiento.
- El diseño y fabricación de la plataforma láser para placas de cultivo celular (96 pozos) y del dispositivo generador de campos magnéticos giratorios controlados sobre cultivos celulares permitió un buen funcionamiento que posibilitaron el estudio realizado y los resultados obtenidos.
- Con esto se mostró haciendo uso de dos enfoques diferentes a través de sus propiedades físicas las potenciales aplicaciones que brindan los CNTs en terapia contra el cáncer.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la estabilidad de la dispersión de las suspensiones de MWCNTs preparadas y determinar cuantitativamente la concentración mediante espectrofotometría (UV-vis).
- Llevar a cabo tratamientos de purificación en cuanto a dimensiones de los MWCNTs que permitan obtener nanotubos cortos en un rango estrecho de longitudes para evaluar citotoxicidad en los márgenes de este estudio.
- Realizar otros estudios de citotoxicidad comparativos para evaluar confiabilidad del ensayo MTT en este estudio.
- Estudiar otras líneas de células cancerígenas además de la HeLa, así como un control con células sanas.
- Para el estudio del tratamiento magnético: evaluar la posibilidad de enriquecer el % de impurezas metalizas en los nanotubos para aumentar su respuesta a los campos magnéticos giratorios.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Granados García, O. Arrieta Rodríguez y D. Cantú de León, *Oncología y Cirugía. Bases y principios.*, 1 ed., Manual Moderno, 2013.
- [2] OMS, «<http://www.who.int/gho/es/>,» [En línea].
- [3] *Anestesiología oncológica y paciente terminal*, 8 ed., CTO.
- [4] P. M. Ajayan, «Nanotubes from Carbon,» *Chem. Rev.*, vol. 99, nº 7, p. 1787–1800, 1999.
- [5] R. B. Heimann, S. E. Evsyukov y Y. Koga, «Carbon allotropes: a suggested classification scheme based on valence orbital hybridization,» *Carbon*, vol. 35, pp. 1654-1658, 1997.
- [6] [En línea]. Available: <http://nordicminerals.com/focus-graphite-files-esia-lac-knife-graphite-project/#prettyPhoto>,. [Último acceso: 02 Enero 2015].
- [7] [En línea]. Available: <http://www.starzdiamonds.com/raw-diamond-jewelry-diamond-rough/raw-diamond-rough-67-carat>, . [Último acceso: 03 Enero 2015].
- [8] [En línea]. Available: <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/File:C60-Fulleren-kristallin.JPG>. [Último acceso: 4 Enero 2015].
- [9] [En línea]. Available: <http://www.taringa.net/posts/ciencia-educacion/15121405/Grafeno---El-material-del-futuro.html>. [Último acceso: 07 Enero 2015].
- [10] [En línea]. Available: <http://evolution.skf.com/es/soportando-el-calor-con-grafito>.. [Último acceso: 08 Enero 2015].
- [11] [En línea]. Available: <http://www.graphene.manchester.ac.uk/explore/the-applications/>. [Último acceso: 9 Enero 2015].

- [12] R. C. Haddon, R. E. Palmer, H. W. Kroto y P. A. Ser, «The fullerenes: powerful carbon-based electron acceptors,» *Philos. T. Roy. Soc. A*, vol. 343, pp. 53-62, 1993.
- [13] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien y R. F. Cur, «C60: Buckminsterfullerene,» *Nature*, vol. 318, nº 6042, pp. 162-163, 1985.
- [14] [En línea]. Available: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/18234/title/Harold-Kroto-Contemplates-Applications-of-Nobel-Winning-Fullerenes/>. [Último acceso: 09 Enero 2015].
- [15] M. S. Dresselhaus, A. Jorio, M. Hofmann y G. Dresse, «Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy,» *Nano Letters*, vol. 10, nº 3, pp. 751-758, 2010.
- [16] H. Kataura, Y. Kumazawa, Y. Maniwa, Y. Ohtsuka, R. Sen, S. Suzuki y Y. Achiba, «Diameter control of single-walled carbon nanotubes,» *Carbon*, vol. 38, nº 11-12, p. 1691-1697, 2000.
- [17] V. N. Popov, «Carbon nanotubes: properties and application,» *Materials Science and Engineering: R: Reports*, vol. 43, nº 3, p. 61-102, 2004.
- [18] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito y A. Jor, «Raman spectroscopy of carbon nanotubes,» *Physics Reports*, vol. 409, nº 2, p. 47-99, 2005.
- [19] [En línea]. Available: <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/10/101005085507.htm>. [Último acceso: 22 Enero 2015].
- [20] [En línea]. Available: <https://www.itp.tu-berlin.de/fileadmin/a3233/upload/AGKnorr/ermin/carbon.png>. [Último acceso: 23 Enero 2015].
- [21] [En línea]. Available: http://www.slideshare.net/sumit_kumar/growth-of-carbon-nanotubes. [Último acceso: 24 Enero 2015].

- [22] [En línea]. Available: <http://redsocialeducativa.euroinnova.edu.es/pg/blog/read/735155/nanotubos-de-carbono-nuevonbsp>. [Último acceso: 27 Enero 2015].
- [23] [En línea]. Available: <http://jnm.snmjournals.org/content/48/7/1039/F1.expansion.html>. [Último acceso: 28 Enero 2015].
- [24] [En línea]. Available: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/cp/c3cp51026c>. [Último acceso: 29 Enero 2015].
- [25] [En línea]. Available: http://www.frontiersin.org/files/Articles/89051/fnsys-08-00091-HTML/image_m/fnsys-08-00091-g002.jpg. [Último acceso: 1 Febrero 2015].
- [26] [En línea]. Available: <http://jnm.snmjournals.org/content/48/7/1039/F1.large.jpg>. [Último acceso: 2 Febrero 2015].
- [27] M. Terrones, , «Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and other emerging applications,» *International Material Reviews*, vol. 6, pp. 325-377, 2004.
- [28] H. Zhang, B. Wu, W. Hu y Y. Liu , «Separation and/or selective enrichment of single-walled carbon nanotubes based on their electronic properties,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, p. 1324–1336, 2011.
- [29] A. Oberlin, M. Endo y T. Koyama, «Filamentous growth of carbon through benzene decomposition,» *J. Cryst Growth*, vol. 32, pp. 335-349, 1976.
- [30] M. Marc y V. L. Kuznetsov , «Who should be given the credit for the Discovery of carbon nanotubes?,» *Carbon*, vol. 44, n° 9, pp. 1621-1623, 2006.
- [31] S. Iijima, «Helical microtubules of graphitic carbon,» *Nature*, vol. 354, n° 6348, pp. 56-58, 1991.

- [32] S. Iijima y T. Ichihashi, «Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter,» *Nature*, vol. 363, pp. 603-605, 1993.
- [33] E. Hernández,, C. Goze, , P. Bernier y A. Rubio, «Elastic properties of C and BxCyNz composite nanotubes,» *Physical Review Letters*, vol. 20, n° 80, pp. 4502-4505, 1998.
- [34] G.-G. Carlos, *Sistemas Híbridos de Polialinina y Nanoestructuras de Carbono para su Aplicación en Músculos Artificiales y Supercondensadores*, Alicante, 2012.
- [35] A. M. Benito, W. K. Maser y M. T. Martínez, «Carbon nanotubes: From production to functional composites,» *International Journal of Nanotechnology*, vol. 2, n° 1-2, pp. 71-89, 2005.
- [36] A. Thess , R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y. H. Lee, G. Kim y A. G. Rinzler, «Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes,» *Science*, vol. 273, n° 5274, pp. 483-487, 1996.
- [37] C. Journet y P. Bernier, «Production of carbon nanotubes,» *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, vol. 67, n° 1, pp. 1-9, 1998.
- [38] M. Melchionna y M. Prato, «Functionalizing Carbon Nanotubes: An Indispensible Step towards Applications,» *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, vol. 2, n° 10, pp. 3040-3045, 2013.
- [39] E. Cruz-Silva, D. A. Cullen, L. Gu, J. M. Romo-Herrera, E. Muñoz-Sandoval, F. López-Urías, G. B. Sumpter, V. Meunier, J. Christophe-Charlier, D. J. Smith, H. Terrones y M. Terrones, «Heterodoped Nanotubes: Theory, synthesis, and characterization of phosphorus-nitrogen doped multiwalled carbon nanotubes,» *ACS Nano*, vol. 2, n° 3, pp. 441-448, 2008.
- [40] A. Botello-Méndez, J. Campos-Delgado, A. Morelos-Gómez, J. M. Romo-Herrera, A. G. Rodríguez, H. Navarro, M. A. Vidal, H. Terrones y M. Terrones, «Controlling the dimensions, reactivity and crystallinity of multiwalled carbon nanotubes using low ethanol concentrations,» *Chemical Physics Letters*, vol. 453, n° 1, pp. 55-61, 2008.

- [41] X. Shi, S. H. Wang, M. Shen, M. E. Antwerp, X. Chen, C. Li, E. J. Petersen, Q. Huang, W. J. Weber Jr. y J. R. Baker Jr., «Multifunctional dendrimer-modified multiwalled carbon nanotubes: Synthesis, characterization, and in vitro cancer cell targeting and imaging,» *Biomacromolecules*, vol. 10, n° 7, pp. 1744-1750, 2009.
- [42] C. H. Villa, M. R. McDevitt, F. E. Escorcia, D. A. Rey, M. Bergkvist, C. A. Batt y D. A. Scheinberg, «Synthesis and biodistribution of oligonucleotide-functionalized, tumor-targetable carbon nanotubes,» *Nano Letters*, vol. 8, n° 12, pp. 4221-4228, 2008.
- [43] S. R. Datir, M. Das, R. P. Singh y S. Jain, «Hyaluronate Tethered, “Smart” Multiwalled Carbon Nanotubes for Tumor-Targeted Delivery of Doxorubicin,» *Bioconjugate Chem.*, vol. 23, n° 11, p. 2201–2213, 2012.
- [44] C.-H. Wu, C. Cao, J. H. Kim, C.-H. Hsu, H. J. Wanebo, W. D. Bowen, J. Xu y J. Marshall, «Trojan-Horse Nanotube On-Command Intracellular Drug Delivery,» *Nano Letters*, vol. 12, n° 11, p. 5475–5480, 2012.
- [45] M. Swierczewska, K. Y. Choi, E. L. Mertz, X. Huang, F. Zhang, L. Zhu, H. Y. Yoon, J. H. Park, A. Bhirde, S. Lee y X. Chen, «A Facile, One-Step Nanocarbon Functionalization for Biomedical Applications,» *Nano Letters*, vol. 12, n° 7, pp. 3612-3620, 2012.
- [46] R. El-Sayed, M. Eita, Å. Y. F. Barrefelt, H. Jain, M. Fares, A. Lundin, M. Crona, K. Abu-Salah, M. Muhammed y M. Hassan, «Thermostable luciferase from *Luciola cruciate* for imaging of carbon nanotubes and carbon nanotubes and carbon nanotubes carrying doxorubicin using in vivo Imaging system,» *Nano Letters*, vol. 13, n° 4, pp. 1393-1398, 2013.
- [47] L. Minati, V. Antonini, M. Dalla Serra y G. Speranza, «Multifunctional Branched Gold–Carbon Nanotube Hybrid for Cell Imaging and Drug Delivery,» *Langmuir*, vol. 28, n° 45, p. 15900–15906, 2012.

- [48] C. Mei-Ling, H. Ye-Ju, C. Xu-Wei y W. Jian-Hua, «Quantum Dots Conjugated with Fe₃O₄ Filled Carbon Nanotubes for Cancer-Targeted Imaging and Magnetically Guided Drug Delivery,» *Langmuir*, vol. 28, n° 47, p. 16469–16476, 2012.
- [49] F. Zhou, D. Xing, B. Wu, S. Wu, Z. Ou y W. R. Chen, «New Insights of Transmembranal Mechanism and Subcellular Localization of Noncovalently Modified Single-Walled Carbon Nanotubes,» *Nano Letters*, vol. 10 , n° 5, p. 1677–1681, 2010.
- [50] R. Crinelli, E. Carloni, M. Menotta, E. Giacomini, M. Bianchi, G. Ambrosi, L. Giorgi y M. Magnani, «Oxidized Ultrashort Nanotubes as Carbon Scaffolds for the Construction of Cell-Penetrating NF-κB Decoy Molecules,» *ACSnano*, vol. 4, n° 5, pp. 2791-2803, 2010.
- [51] A. A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A. A. Sousa, A. Masedunskas, R. D. Leapman, R. Weigert, J. S. J. Gutkind y a. F. Rusling, «Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube based drug delivery,» *ACSnano*, vol. 3, n° 2, pp. 307-316, 2009.
- [52] K. Yang, S. Zhang, G. Zhang, X. Sun, S.-T. Lee y Z. Liu, «Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy,» *Nano Letters*, vol. 10 , n° 9, p. 3318–3323 , 2010.
- [53] H. K. Moon, S. H. Lee y H. C. Choi., «In Vivo Near-Infrared Mediated Tumor Destruction by Photothermal Effect of Carbon Nanotubes,» *ACS Nano*, vol. 3, n° 11, p. 3707–3713, 2009.
- [54] A. Burke, X. Ding, R. Singh, R. Kraft, N. Levi-Polyachenko, M. Rylander, C. Szot, C. Buchanan, J. Whitney, J. Fisher, H. Hatcher, R. D'Agostino Jr., N. Kock, P. Ajayan, D. L. Carroll, S. Akman, F. Tortia y S. V. Torti, «Long-term survival following single treatment of kindey tumor with multiwalled crbon nanotubes and near infrared radiation,» *PNAS*, vol. 106, n° 31, pp. 12897-12902, 2009.

- [55] C. J. Gannon, P. Cherukuri, B. I. Yakobson, L. Cognet, J. S. Kanzius, C. Kittrell, R. B. Weisman, M. Pasquali, H. K. Schmidt, R. E. Smalley y S. A. Curley, «Carbon Nanotube-enhanced Thermal Destruction of Cancer Cells in a Noninvasive Radiofrequency Field,» *CANCER*, vol. 110, nº 12, pp. 2654-2665, 2007.
- [56] F. Zhou, D. Xing, Z. Ou, B. Wu, D. E. Resasco y W. R. Chen, «Cancer photothermal therapy in the near-infrared region by using single-walled carbon nanotubes,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14, nº 2, pp. 021009/1-7/ , 2009.
- [57] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J. W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller y L. Forró, «Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials,» *Nano Letters*, vol. 6 , nº 6, pp. 1121-1125, 2006.
- [58] G. M. Mutlu, G. R. Scott Budinger, A. A. Green, D. Urich, S. Soberanes, S. E. Chiarella, G. F. Alheid, D. R. McCrimmon, I. Szleifer y M. C. Hersam, «“Biocompatible nanoscale dispersion of single-walled carbon nanotubes minimizes in vivo pulmonary toxicity,» *Nano Letters*, vol. 10, nº 5, pp. 1664-1670, 2010.
- [59] C. Bussy, E. Paineau, J. Cambedouzou, N. Brun, C. Mory, B. Fayard, M. Salomé, M. Pinault, M. Huard, E. Belade, L. Armand, J. Boczkowski, P. Launois y S. Lanone, «Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: pH-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles,» *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 10, nº 24, pp. 1-12, 2013.
- [60] D. Liu, L. Wang, Z. Wang y A. Cuschieri, «Different cellular response mechanisms contribute to the length-dependent cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes,» *Nanoscale Research Letters*, vol. 7 , nº 361, pp. 1-10, 2012.
- [61] E. González, E. Gil, C. de Castro, N. Téllez y T. G. F. Riberos, «Ensayos de toxicidad celular con nanotubos de carbono funcionalizados con ácido polisulfónico m-aminobenceno,» *Scientia et Technica* , vol. 40 , nº XIV, 2008.

- [62] A. Patlolla, B. Knighten y P. Tchounwou, «Multi-Walled Carbon Nanotubes Induce Cytotoxicity, Genotoxicity And Apoptosis In Normal Human Dermal Fibroblast Cells,» *Ethn Dis.* , vol. 20 , n° S1, pp. 65-72, 2010.
- [63] L. L. S. Wang, V. Castranova, W. Tse, Y. Lu, V. Pongrakhananon y Y. Rojanasakul, «Carbon Nanotubes Induce Malignant Transformation and Tumorigenesis of Human Lung Epithelial Cells,» *Nano Letters* , , vol. 11 , n° 7, p. 2796–2803, 2011.
- [64] H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J.-P. Briand, M. Prato, S. Muller y A. Bianco, «Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the Functionality of Preserve the functionality of primary immune cells,» *Nano Letters*, vol. 6, n° 7, pp. 1522-1528, 2006.
- [65] C. Gea, J. Dua, L. Zhaoa, L. Wanga, Y. Liua, D. Lia, Y. Yanga, R. Zhoub, Y. Zhaoa, Z. Chaid y C. Chen, «Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity,» *PNAS*, vol. 108 , n° 41, p. 16968–16973 , 2011.
- [66] I. Marangon, N. Boggetto, C. Ménard-Moyon, E. Venturelli, M.-L. Béoutis, C. Péchoux, N. Luciani, C. Wilhelm, A. Bianco y F. Gazeau, «Intercellular carbon nanotube translocation assessed by flow cytometry imaging,» *Nano Letters*, vol. 12, n° 9, pp. 4830-4837, 2012.
- [67] D. G. N. M. Boldor, W. T. Monroe, J. H. Palmer, Z. Li y A. S. Biris, «Temperature Measurement of Carbon Nanotubes Using Infrared Thermography,» *Chem. Mater.*, vol. 20 , n° 12, p. 4011–4016, 2008.
- [68] Q. Zhu, A. Zhang, P. Liu y L. X. Xu, «Study of Tumor Growth under Hyperthermia Condition,» *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, vol. 2012, pp. 1-9, 2012.
- [69] L. Meng, L. Niu, L. Li, Q. Lu, Z. Fei y P. J. Dyson, «Gold Nanoparticles Grown on Ionic Liquid-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes: New Materials for Photothermal Therapy,» *Chemistry a European Journal* , , vol. 18, p. 13314 – 13319, 2012.

- [70] N. H. Levi-Polyachenko, E. J. Merkel, B. T. Jones, D. L. Carroll y J. H. Stewart IV, «Rapid Photothermal Intracellular Drug Delivery Using Multiwalled Carbon Nanotubes,» *Molecular Pharmaceutics*, vol. 6, n° 4, p. 1092–1099, 2009.
- [71] S. H. Beachy y E. A. Repasky, «Toward establishment of temperature thresholds for immunological impact of heat exposure in humans,» *Int. J. Hyperthermia*, vol. 27, n° 4, p. 344–352, 2011.
- [72] S. Ghosh, S. Dutta, E. Gomes, D. Carroll, R. D'Agostino Jr., J. Olson, M. Guthold y W. H. Gmeiner, «Increased Heating Efficiency and Selective Thermal Ablation of Malignant Tissue with DNA-Encased Multiwalled Carbon Nanotubes,» *ACS Nano*, vol. 3, n° 9, pp. 2667-2673, 2009.
- [73] «NCI at the National institutes of Health,» [En línea]. Available: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/hyperthermia>. [Último acceso: 02 Febrero 2015].
- [74] V. Datsyuk, M. Kalyva, K. Papagelis, J. Parthenios, D. Tasis, A. Siokou, I. Kallitsis y C. Galiotis, «Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes,» *Carbon*, vol. 46, n° 6, p. 833–840, 2008.
- [75] W. I. Choi, J.-Y. Kim, C. Kang, C. C. Byeon, Y. H. Kim y G. Tae, «Tumor Regression In Vivo by Photothermal Therapy Based on Gold-Nanorod-Loaded, Functional Nanocarriers,» *ACS Nano*, vol. 5, n° 3, p. 1995–2003, 2011.
- [76] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian y M. A. El-Sayed, «Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, n° 6, pp. 2115-2120, 2006.
- [77] G. Hegyi, G. P. Szigeti y A. Szász, «Hyperthermia versus Oncothermia: Cellular Effects in Complementary Cancer Therapy,» *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, vol. 2013, pp. 1-12, 2013.
- [78] R. L. Manthe, S. P. Foy, N. Krishnamurthy, B. Sharma y V. Labhasetwar, «Tumor Ablation and Nanotechnology,» *Molecular Pharmaceutics*, vol. 7, n° 6, p. 1880–1898, 2010.

- [79] J. H. Choi, F. T. Nguyen, P. W. Barone, D. A. Heller, A. E. Moll, D. Patel, S. A. Boppart y M. S. Strano, «Multimodal Biomedical Imaging with Asymmetric Single-Walled Carbon Nanotube/Iron Oxide Nanoparticle Complexes,» *Nano Letters*, vol. 7 , n° 4, pp. 861-867 , 2007.
- [80] J. Xie, Y. Zhang, C. Yan, L. Song, S. Wen, F. Zang, G. Chen, Q. Ding, C. Yan y N. Gu, «High-performance PEGylated MneZn ferrite nanocrystals as a passive-targeted agent for magnetically induced cancer theranostics,» *Biomaterials*, vol. 35, n° 33, pp. 9126-9136, 2014.
- [81] R. D. Corato, G. Béalle, J. Kolosnjaj-Tabi, A. Espinosa, O. Clément, A. K. A. Silva, C. Ménager y C. Wilhelm, «Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes,» *ACS Nano*, vol. 9, n° 3, pp. 2904-2916, 2015.
- [82] A. Nagata, H. Sato, Y. Matsui, T. Kaneko y Y. Fujiwara, «Magnetic properties of carbon nanotubes filled with ferromagnetic metals,» *Vacuum*, vol. 87, pp. 182-186, 2013.
- [83] S. D. Ali, S. T. Hussaina y S. R. Gilani, «Synthesis, characterization and magnetic properties of carbon nanotubes decorated with magnetic MIIFe₂O₄ nanoparticles,» *Applied Surface Science*, vol. 271, pp. 118-124, 2013.
- [84] D. Liu, L. Wang, Z. Wang y A. Cuschieri, «Magnetoporation and Magnetolysis of Cancer Cells via Carbon Nanotubes Induced by Rotating Magnetic Fields,» *Nano Letters*, vol. 12 , n° 10, p. 5117–5121, 2012.
- [85] P.-X. Hou, C. Liu y H.-M. Cheng, «Purification of carbon nanotubes,» *Carbon* , vol. 46, n° 15, p. 2003–2025 , 2008.
- [86] T. Saito, V. Matsushige y K. Tanaka, «Chemical treatment and modification of multi-walled carbon nanotubes,» *Physica B* , vol. 323 , n° 1-4, p. 280–283 , 2002.
- [87] S. Bandow, A. M. Rao, K. A. Williams, A. Thess, R. E. Smalley y P. C. Eklund, «Purification of Single-Wall Carbon Nanotubes by Microfiltration,» *J. Phys. Chem. B*, vol. 101 , n° 44, p. 8839–8842, 1997.

- [88] C. Pan, S. Xu, L. Hu, X. Su, J. Ou, H. Zou, Z. Guo, Y. Zhang y B. Guo, «Using Oxidized Carbon Nanotubes as Matrix for Analysis of Small Molecules by MALDI-TOF MS,» *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 16 , n° 6, p. 883–892 , 2005.
- [89] D. A. Britz y A. N. Khlobystov, «Noncovalent interactions of molecules with single walled carbon nanotubes,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, p. 637–659, 2006.
- [90] «<http://www.supermagnete.com/faq/flux>,» [En línea].
- [91] S. Jain, V. S. Thakare, M. Das, C. Godugu, A. K. Jain, R. Mathur, K. Chuttani y A. K. Mishra, «Toxicity of Multiwalled Carbon Nanotubes with End Defects Critically Depends on Their Functionalization Density,» *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 24, n° 11, pp. 2028-2039, 2011.
- [92] J. R. Alves da Cunha, C. Fantini, N. F. Andrade, P. Alcantara, J. G. D. Saraiva, A. G. Souza Filho, M. Terrones y M. C. dos Santos, «Enhanced Solubilization of Carbon Nanotubes in Aqueous Suspensions of Anionic–Nonionic Surfactant Mixtures,» *J. Phys. C*, vol. 117, n° 47, pp. 25138-25145, 2013.
- [93] M. Granite, A. Radulescu, W. Pyckhout-Hintzen y Y. Cohen, «Interactions between Block Copolymers and Single-Walled Carbon Nanotubes in Aqueous Solutions: A Small-Angle Neutron Scattering Study,» *Langmuir*, vol. 27 , n° 2, p. 751–759, 2011.
- [94] O. V. Kharissova y B. I. Kharisov, «Variations of interlayer spacing in carbon nanotubes,» *RSC Advances*, vol. 4, n° 58, pp. 30807-30815, 2014.
- [95] N. W. Shi Kam, M. O’Connell, J. A. Wisdom y H. Dai, «Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction,» *PNAS*, vol. 102 , n° 33, p. 11600–11605, 2005.
- [96] J.-E. Kim, S.-H. Kang, Y. Moon, J.-J. Chae, A. Y. Lee, J.-H. Lee, K.-N. Yu, D. H. Jeong, M. Choi y M.-H. Cho, «Physicochemical Determinants of Multiwalled Carbon Nanotubes on Cellular Toxicity: Influence of a Synthetic Method and Post-treatment,» *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, n° 2, pp. 290-303, 2014.

- [97] L. P. Franchi, R. A. Santos, E. Y. Matsubara, J. C. de Lima, J. M. Rosolen y C. S. Takahashi, «Citotoxicidade e Genotoxicidade de Nanotubos de Carbono,» *Quim. Nova*, vol. 35, nº 3, pp. 571-580 , 2012.
- [98] D. McShand y H. Yu, «DNA Damage in human skin keratinocytes caused by multi-walled carbon nanotubes with carboxilate functionalization.,» *Toxicol Ind Health*, vol. 30, nº 6, p. 489–498, 2014.
- [99] S. Laurent, C. Burtea, C. Thirifays, U. Häfeli y M. Mahmoudi, «Crucial Ignored Parameters on Nanotoxicology: The Importance of Toxicity Assay Modifications and “Cell Vision”,» *PLoS ONE*, vol. 7, nº 1, p. e29997, 2012.
- [100] S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton y L. Tang, «Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent,» *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 7, nº 22, 2010.