

Calentamiento por Fotoactivación de NanoTubos de Carbono de pared simple Funcionalizados con Ácido Fólico (NTC-AF)

Fernando Martínez O.

Profesor Titular, Centro de Investigaciones en Catálisis, Cicat,
Escuela de Química Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Resumen

Se describe métodos para la funcionalización covalente y no covalente de nanotubos de carbono de pared simple (NTC) con ácido fólico, así como su caracterización espectroscópica. La irradiación de soluciones acuosas de NTC-AF con IR genera un efecto de calentamiento dependiente de la concentración, de la potencia del haz y del tipo de interacción ácido fólico-NTC; los experimentos de control indican que el aumento de la temperatura se debe solo al NTC. Los estudios biológicos preliminares indican una internalización del bioconjugado en células THP-1 y en las infectadas con parásitos de *Leishmania*, observándose que el efecto térmico generado por la iluminación con IR puede disminuir la población de las células infectadas.

Palabras clave: nanotubos de carbono, ácido fólico, foto-activación, calentamiento térmico.

Photo-activation Heating of Carbon Nanotubes Functionalized with Folic Acid (NTC-AF)

Abstract

Methods for covalent and non-covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes (CNTs) with folic acid and their spectroscopic characterization are described. The irradiation of NTC-AF aqueous solutions with IR generates a heating effect that it dependent on the concentration of solution, the beam power and the type of interaction between folic acid and NTC. The control experiments show that the increase in temperature is only due to NTC. Preliminary biological studies indicate an internalization of the bioconjugate in THP-1 and infected cells with *Leishmania* parasites, showing that the thermal effect generated by the IR illumination can reduce the population of infected cells.

Key words: Carbon nanotubes, folic acid, photo-activation, thermal heating.

Introducción

La síntesis controlada de materiales ha permitido la aplicación de nanomateriales bioconjugados para el desarrollo de terapias alternativas a los tratamientos tradicionales usados en medicina en su lucha contra el cáncer o en las células infectadas con parásitos (Tong R. et al, 2013). Por ejemplo, la ablación térmica se presenta cuando las células se calientan por encima de un umbral de temperatura, típicamente 55°C (Nikfarjam M. et al, 2005). Lo cual induce a una necrosis coagulativa, una forma de muerte celular que implica la desnaturalización de las proteínas y la lisis de la membrana (Hildebrandt B. et al, 2002). Este efecto térmico localizado se puede generar por la interacción de las nanopartículas con la radiación IR o de radiofrecuencia (Gannon et al., 2007; Manthe R. et al, 2010).

Se ha demostrado que cuando los nanotubos de carbono (NTC) son expuestos a luz del infrarrojo cercano (NIR) en el rango de 700 a 1100 nm, la cual es biológicamente transparente,

pueden inducir la destrucción térmica de las células cancerosas tanto in vitro como in vivo. (Levi-Polyachenko N., et al, 2009; Fisher J. et al, 2010; Burlaka A. et al, 2010; Moon H., et al, 2009). Los NTC tienen la ventaja sobre otros nanomateriales, ya que pueden lograr la destrucción térmica de tumores, usando dosis hasta 10 veces más bajas y con una potencia de radiación hasta 3 veces menores (Robinson J. et al, 2010).

Los NTC de pared simple, presentan propiedades físico-químicas únicas, emiten calor cuando absorben energía por radiación en el infrarrojo cercano (NIR). Los tejidos son relativamente transparentes a los rayos NIR, esto sugiere que la ablación térmica de un tumor se puede lograr con el ingreso de los NTC en las células tumorales y su exposición

Correspondencia:

Fernando Martínez O., fmartine@uis.edu.co

Recibido: 13 de marzo de 2014

Aceptado: 30 de julio de 2014

no invasiva a la luz NIR (**Chakravarty P. et al**, 2008). Los NTC liberan una apreciable cantidad de energía vibracional después de su exposición a la radiación NIR (**Robinson J. T. et al**, 2010), la cual dentro de un tejido produce un calentamiento localizado, que puede ser aprovechado para producir ablación térmica. (**Levi-Polyachenko N. et al**, 2009).

La propiedad de los NTC para convertir la luz del infrarrojo cercano (NIR) en calor, proporciona una oportunidad para preparar una nueva generación de materiales inmuno-conjugados contra el cáncer mediante una fototerapia con un alto rendimiento y eficiencia. Además, la hipertermia se ha usado clínicamente en el tratamiento de tumores, ya que puede aumentar la citotoxicidad sinérgicamente cuando se combina con la quimioterapia o la radioterapia (**Kosuge H. et al**, 2012; **Chou H.-T. et al**, 2013). La hipertermia puede aumentar selectivamente la permeabilidad de la vasculatura tumoral en comparación con la vasculatura normal, lo que puede mejorar el ingreso de medicamentos en los tumores (**Kosuge H., et al**, 2012).

En consecuencia los efectos térmicos generados por NTC pueden tener ventajas terapéuticas importantes, ya que estudios fármaco-cinéticos han observado que los NTC internalizados en ratones por diferentes procedimientos no generan efectos tóxicos (**Robinson J. T. et al**, 2010)

El uso de nanoestructuras como nanocápsulas de oro ó NTC (**Wang H. et al**, 2013), en las células cancerígenas con el objeto de destruirlas mediante la ablación térmica está siendo investigado por varios grupos (**Loo C. et al**, 2005; **Huang X. et al**, 2006; **Gannon et al**, 2007; **Y. Hashida**, 2014). El uso de la radiación IR (700 - 1100-nm) para la inducción de la hipertermia es particularmente atractiva porque los tejidos vivos no absorben fuertemente en este rango y la luz NIR externa puede penetrar el tejido normal sin problemas y permitir la ablación de las células en las cuales se hallan los NTC. Un aspecto que se debe considerar en la ablación térmica selectiva de células mediada por NTC es permitir su internalización selectiva mediante “anclas” que orienten su ingreso sin que interfieran con las propiedades ópticas de los NTC. El ingreso selectivo de los NTC en las células tumorales puede lograrse mediante el anclaje de los mismos con ligandos que faciliten el reconocimiento celular tales como péptidos y anticuerpos, entre otros (**Burkea A. et al**, 2008; **Zhao D. et al**, 2011; **Elhissi A. M. A. et al**, 2012).

Se ha observado que la química de la superficie de los nanotubos es crítica para su comportamiento in vivo, lo cual probablemente se aplica a la mayoría de los nanomateriales con fines biológicos. El carácter hidrófobo de los NTC no permite su unión a especies biológicas. Esta hidrofobicidad tiene que bloquearse mediante una funcionalización química adecuada tal como se ha propuesto el recubrimiento de NTC con PEG convirtiéndolos en inertes biológicamente

y así permitiendo su circulación prolongada en el torrente sanguíneo, baja captación y una liberación relativamente rápida de los órganos y excreción del cuerpo (**Liu Z.** 2008; **Robinson J.T. et al**, 2010; **Zhou F.F. et al**, 2011).

Uno de los requisitos fundamentales para lograr la aplicación biológica de los NTC es la posibilidad de modificar químicamente la superficie en un proceso conocido como funcionalización. La funcionalización de los NTC con biomoléculas (ADN, anticuerpos, proteínas, péptidos y enzimas) así como otras nanopartículas tales como oro y plata, polímeros, liposomas y nanotubos biológicos han permitido aumentar el número de aplicaciones biomédicas. Entre las más importantes se tienen: la entrega controlada de fármacos, diagnóstico y detección de enfermedades y la terapia fotodinámica (**Vardharajula S. et al**, 2012; **Chen H. et al**, 2014).

El ácido fólico (AF) es una de las biomoléculas más utilizadas en aplicaciones biomédicas, ha sido utilizada como blanco estratégico en la detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer (**Bandara N. A. et al**, 2014; **Boca-Farcau S. et al**, 2014), debido a la sobreexpresión de receptores de folato observadas en células cancerígenas y en algunos casos en la células infectadas con *Leishmania* (**Novoa L. V.**, 2012; **Castillo J. J. et al**, 2013). Son pocos los estudios relacionados con la utilización de NTC funcionalizados con AF para permitir el ingreso selectivo de las nanopartículas en células enfermas o infectadas con parásitos como la leishmania y menos común, estudios relacionados con la detección de células cancerígenas utilizando nanotubos biológicos funcionalizados con AF (**Castillo J. J.**, 2012; **Graham E. G. et al**, 2013; **Niu L. et al**, 2013; **Zhang Y L. X, et al**, 2013).

En el presente trabajo se describen algunos procedimientos que permiten la funcionalización de los nanotubos de carbono de pared simple (NTC) con ácido fólico (AF), su caracterización y evaluación del efecto térmico al ser irradiados con radiación IR, con el fin de destruir células cancerosas o infectadas con parásitos, por ablación térmica y por ingreso selectivo de los NTC-AF.

Parte experimental

Materiales

Los NTC, NTC-COOH de pared simple (pureza >90% (base de carbono), D×L 4-6 nm×0,7-1,0 μm) y el ácido fólico, AF, (pureza >97%) fueron adquiridos comercialmente (Sigma, Aldrich USA) y los otros reactivos usados fueron de grado analítico.

Funcionalización de Nanotubos de Carbono con Ácido Fólico: NTC-AF

Para realizar la funcionalización de los NTC con el AF se usaron métodos de preparación covalente y no covalente a

temperatura ambiente. En el caso de la unión no covalente del AF al nanotubo se hizo simplemente mediante la sonicación de los dos compuestos sin el uso de una molécula enlazante al NTC. Para la unión covalente NTC-AF se llevó a cabo usando como *linker* una carbodiimida. Adicionalmente, se usaron NTC carboxilados que activaron mediante la N,N'-diciclohexilcarbodiimida, facilitando la formación de un enlace amida que posteriormente permite la formación del enlace amida con la etilendiamina y luego con el AF.

Funcionalización no covalente de NTC con AF

En este caso se requiere realizar la dispersión del NTC, para tal efecto se tomó un recipiente de vidrio de 50 mL para depositar 5 mg de NTC y luego se agregó 5 mL de una solución ligeramente básica (pH 9) de AF, la cual se preparó previamente mezclando 6.5 mg de AF y 10 mL de NaOH 1 M, luego se aforó a un volumen de 25 mL con agua destilada [Castillo J. J. et al, 2012].

La mezcla NTC-AF se agitó durante 5 minutos y luego se sonicó durante 20 minutos en una bañera termostataada a 15°C. Posteriormente la solución se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min, el sobrenadante fue separado. Finalmente la solución fue dializada tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de AF que no reaccionó. El esquema de preparación usado se indica en la siguiente figura 1.

Adicionalmente, se realizó un estudio teórico de este sistema mediante un método híbrido de cálculo (N-Integrated Orbital Molecular y Molecular Mechanics (B3LYP (6-31G (d): UFF)). Los resultados confirmaron que la interacción se

produce a través de puentes de hidrógeno entre los protones del fragmento glutámico del AF y los electrones p del NTC (Roza C. et al, 2013).

Funcionalización covalente de NTC con AF

En una primera etapa se realizó la preparación del conjugado formado entre los nanotubos de pared simple de carbono, quitosán y ácido fólico, siguiendo el procedimiento descrito por Castillo (Castillo J. J., et al, 2012).

Preparación del conjugado nanotubo de carbono quitosán y ácido fólico: NTC-chitosán y NTC-AF

En un frasco de vidrio se sonicaron 5 mg de NTC con una solución acuosa de quitosán (pureza <75%) (30 % p/v) durante 1 hora. Luego, la solución fue centrifugada a 2800 rpm durante 20 minutos; el sobrenadante se recogió y se separó cuidadosamente del sólido remanente y la solución de NTC se almacenó a 4°C, la se usa luego en la funcionalización con el AF.

La adición del AF al sistema NTC-chitosán se realizó mediante una metodología similar a la propuesta por Kam (Kang B. et al. 2009), una mezcla de solución acuosa NTC-chitosán (5 mL) con una solución 3.5 mM de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) se agitó magnéticamente a temperatura ambiente (25°C) durante 12 horas, protegiendo la mezcla de la luz. Posteriormente, a la anterior mezcla se le adicionó 500 µL de una solución acuosa (2.5 mM) de AF ligeramente básica. La mezcla se dejó en agitación durante la noche y luego fue dializada tres veces

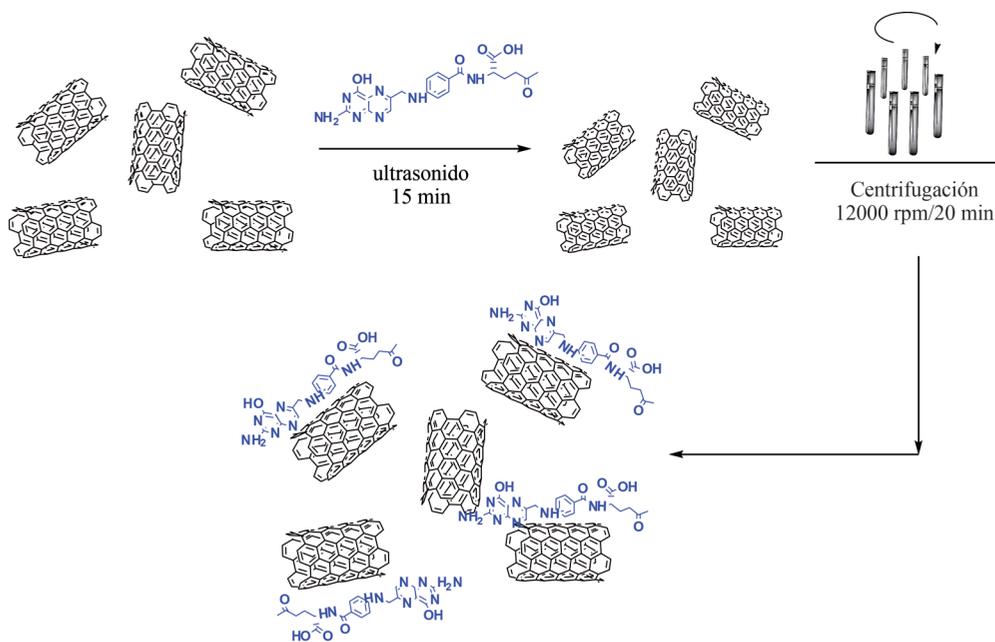


Figura 1. Esquema de la funcionalización no covalente de NTC-AF (Castillo J.J., et al 2011).

con una solución tampón de fosfato (pH 7.0) usando una membrana de diálisis (tamaño de poro 10000) para remover el exceso de AF y EDC. La estabilidad del conjugado se siguió mediante la medición del potencial zeta de la solución, la cual se almacenó a 4°C para su caracterización (Castillo J. J., et al, 2012).

Funcionalización covalente del nanotubo de carbono carboxilado (NTC-COOH) con ácido fólico

El anclaje del AF al NTC-COOH no se realizó directamente por el grupo amino presente en el ácido AF, debido a que este grupo tiene su par electrónico comprometido en la aromaticidad de la pterina, haciéndolo menos reactivo y dificultando el ataque nucleofílico por parte de este grupo. Se decidió realizar un procedimiento usado para la aminación de la lipasa B de la Candida antartica (Galvis, M., et al. 2012), usando la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (EDAC) como agente de activación de los grupos carboxílicos presentes en la superficie de los NTC-COOH, esta permite el ataque nucleofílico de uno de los grupos amino de la EDAC, formando un enlace amida y dejando libre un grupo amino primario que actúa como nucleófilo y facilita el ataque a uno de los grupos carboxilo del AF, permitiendo así la funcionalización covalente del AF al NTC (Ayala B. E. et al 2013). En la figura 2 se indica el esquema de reacción usado.

En un tubo de Falcon se mezclan 5 mg de NTC-COOH con 15 mL de acetonitrilo y se sonicaron durante 20 min a temperatura ambiente de (25 °C). Este procedimiento se

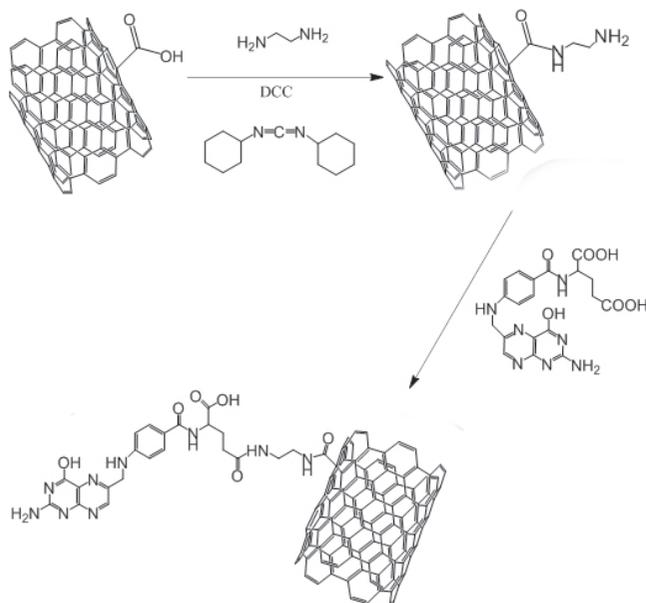


Figura 2. Esquema de la funcionalización covalente de NTC-AF (Ayala B. E. et al, 2013)

repetió modificando el solvente (DMF, agua-acetonitrilo). Además para cada funcionalización obtenida (NTC-EDA (Etilendiamina) y NTC-AF) se realizó una dispersión en cada uno de los solventes mencionados.

Funcionalización covalente de NTC-COOH con Etilendiamina (NTC-EDA).

En un vaso de vidrio se mezclaron 20 mg de NTC-COOH y una solución acuosa de EDA. La Solución de EDA se preparó previamente, tomando 1.3 mL de EDA (1M) y aforando a 20 mL (pH 4.75) y 2 mg de EDAC (10mM), en un baño de hielo con agitación magnética constante durante 1 hora. Luego, se centrifugó la mezcla a 14000 rpm, extrayendo el sobrenadante, lavando con agua destilada para eliminar el exceso de EDA que no reaccionó y finalmente el sólido obtenido se secó a temperatura ambiente (25 °C) (Ayala B. E. et al, 2013).

Funcionalización covalente de NTC-EDA con Ácido Fólico.

En un vaso de vidrio se preparó una solución de AF (10 mg) en 22 mL de una solución tampón de fosfato (25 mM; pH 4.75). Luego se adicionó 42 mg de EDAC y 10 mg de NTC-EDA, con agitación magnética constante durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 14000 rpm, extrayendo el sobrenadante y lavando con agua destilada para eliminar el exceso de AF que no reaccionó. El sólido obtenido se secó a temperatura ambiente (25 °C) (Ayala B. E. et al, 2013).

Resultados y discusión

Caracterización

Análisis del NTC-AF (no covalente)

Espectroscopia de UV-Vis

La funcionalización no covalente de los NTC con el AF se evidenció mediante el espectro UV-Vis, en el cual se observan tres bandas de absorción que corresponden respectivamente a la banda de absorción de la estructura tubular de los NTC (265 nm) y dos bandas adicionales asociadas al AF, 282 y 364 nm, ver figura 3.

Espectroscopia de Fluorescencia

La asociación AF-NTC se analizó por medio del espectro de fluorescencia al excitar la solución con una longitud de onda de 364 nm, en el espectro de emisión se observó una disminución de la emisión de fluorescencia del AF en alrededor de 475 nm, en la cual la intensidad de la fluorescencia del AF libre y su conjugado con los NTC es muy diferente, ver figura 4. Este efecto de apagamiento de una molécula en presencia de los NTC se atribuye a mecanismos de transferencia electrónica (Cho E. S. et al, 2008).

El efecto de apagamiento del AF por los NTC puede ser un indicio de la interacción AF-NTC para formar el respectivo conjugado.

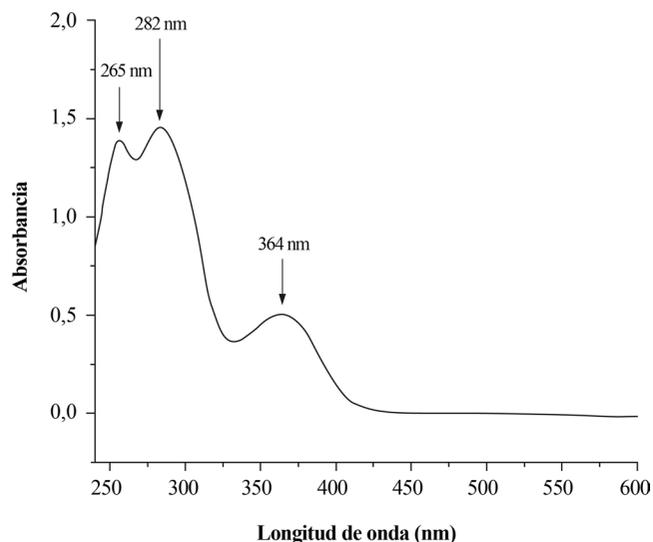


Figura 3. Espectro UV-Vis NTC-AF, el espectro se tomó después de lavar y centrifugar el conjugado con agua destilada, para eliminar el exceso de AF.

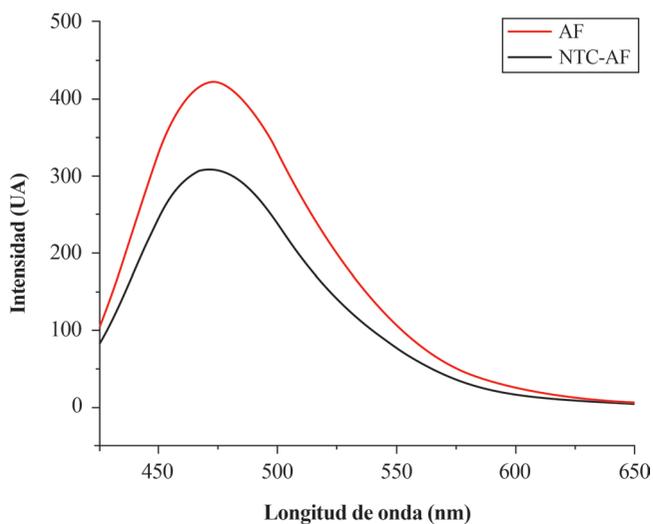


Figura 4. Espectros de emisión de AF libre y conjugado a los NTC ($\lambda_{exc} = 364 \text{ nm}$).

Espectroscopia Raman

El espectro Raman del NTC permite ver la modificación de los modos vibracionales por efecto de la funcionalización del NTC (Koh B., et al, 2011). Se identifica que la zona comprendida entre 200 y 300 cm^{-1} se presenta los modos de respiración radial conocidos como RBM (Radial Modes Breathing, siglas en inglés), los cuales presentan una relación inversa con el diámetro del nanotubo y son útiles para evidenciar la funcionalización de los NTC. Además, la presencia de una banda intensa en 1589 cm^{-1} , conocida como

la banda G, esta asociada a las vibraciones tangenciales de los NTC. Las otras dos bandas características son las bandas D (desorden inducido) y G' ubicadas a 1300 cm^{-1} y 2600 cm^{-1} respectivamente, bandas asociadas a la estructura electrónica y fonónica de los NTC (Dresselhauss M., et al, 2002; Jinno M., et al, 2006).

Se ha propuesto que para evidenciar el grado de funcionalización de los NTC con alcanos lineales se analice la intensidad de la banda RBM. En nuestro caso, en el NTC funcionalizado con AF se observó un cambio de la intensidad de la banda a 270 cm^{-1} . La figura 5 compara los espectros Raman del NTC y NTC-AF. Se observa una disminución en la intensidad de los NTC-AF, asociada a la presencia del AF en el NTC, la cual afecta los modos de vibración RBM, afectando principalmente vibración radial en la ("respiración" del NTC). Este fenómeno ha sido observado por otros autores y ha permitido realizar un seguimiento de la funcionalización de NTC (Kim U., et al, 2005).

Las bandas G y D, además se han usado para la caracterización de la funcionalización del NTC con AF, mediante la relación de intensidades de las bandas G y D. Cuando el valor de la relación de intensidades se aproxima a 1, significa que un gran número de defectos superficiales están en la superficie del nanotubo. La figura 6, se indica las bandas de los espectros Raman de los NTC ($I_D = 2219/I_G = 11900$) y NTC-AF ($I_D = 2220/I_G = 10121$), para estimar la relación de intensidades.

La leve diferencia de las relaciones de las intensidades observadas para NTC y NTC-AF, indica una interacción débil, asociada a la interacción no covalente entre el AF y el NTC. En el trabajo desarrollado por Castillo (Castillo J. J.,

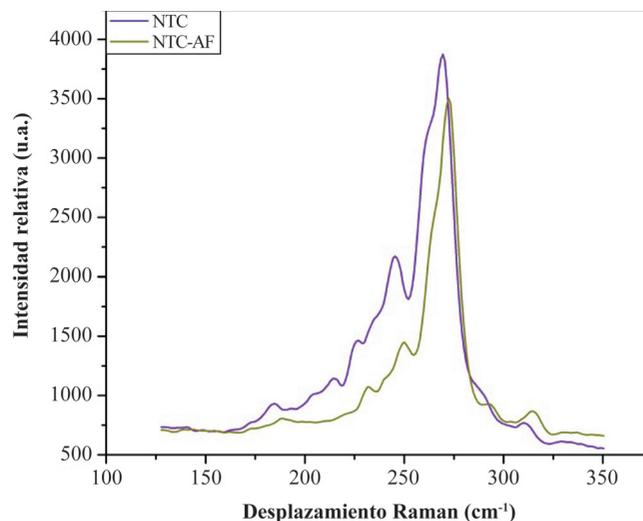


Figura 5. Comparación de los modos de vibración RBM del NTC y NTC-AF (no covalente).

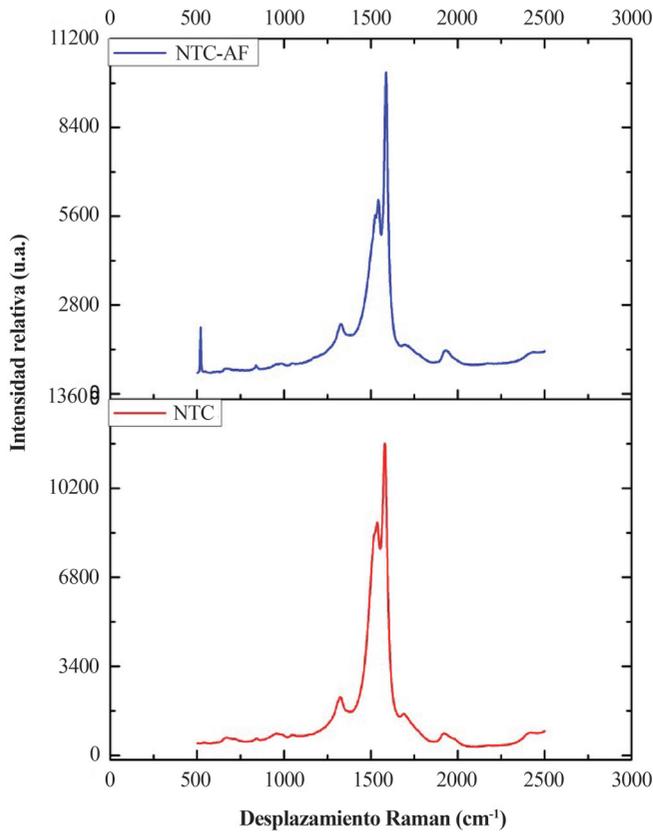


Figura 6. Espectros Raman de NTC y NTC-AF (no covalente).

2013) se ha realizado un estudio más detallado del sistema NTC-AF, incluyendo su excitación mediante dos láser (532 y 785 nm), observando que la excitación con el láser de 785 nm presentó una mejor resolución de sus picos.

Análisis del conjugado NTC-chitosan-AF

Espectroscopia UV-vis

El análisis por espectroscopia UV/Vis, indicó que los NTC se solubilizan en la solución acuosa de chitosan. En el espectro aparece una banda de absorción a 265 nm, característica de los fonones resonantes y de las transiciones electrónicas de los electrones p presentes en la estructura del NTC, ver figura 7, banda que ha sido observada por otros trabajos (Attal S., et al, 2006).

El espectro UV-vis no muestra ninguna señal relacionada con el chitosan. Adicionalmente, en la región de 500-800 nm, se aprecian varios picos asociados a las singularidades de van Hove pertenecientes a (750 nm) E_{11} de los NTC (Attal S. et al, 2006), indicio asociado a su dispersión.

Espectroscopia de Fluorescencia

En el espectro de fluorescencia del bioconjugado, se observó un apagamiento de la fluorescencia del chitosan dado a su

interacción con el NTC. La banda de 418 nm en el espectro de emisión del chitosan desaparece casi en su totalidad del sistema NTC-chitosan. Esto nos induce a indicar que ocurre una interacción molecular entre el chitosan y el NTC, la cual genera el efecto de apagamiento del chitosan (Ahmad A., et al. 2009), ver figura 8.

Espectroscopia Raman

El espectro Raman permite observar evidencias acerca de la interacción del chitosan al NTC. En la figura 9 se indican los espectros del NTC antes y después de su funcionalización con el chitosan. La presencia de algunas de las vibraciones características del NTC antes y después de su interacción con el chitosan (Castillo J. J., 2013), están en concordancia con los resultados de la literatura (Dresselhauss M. et al., 2002).

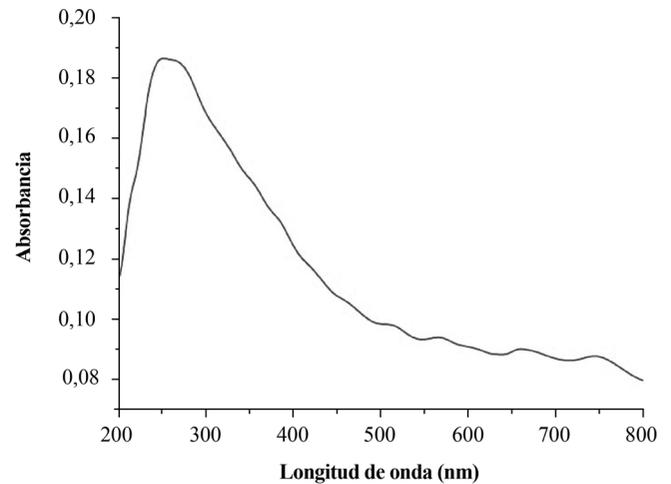


Figura 7. Espectro UV-vis de NTC-chitosan.

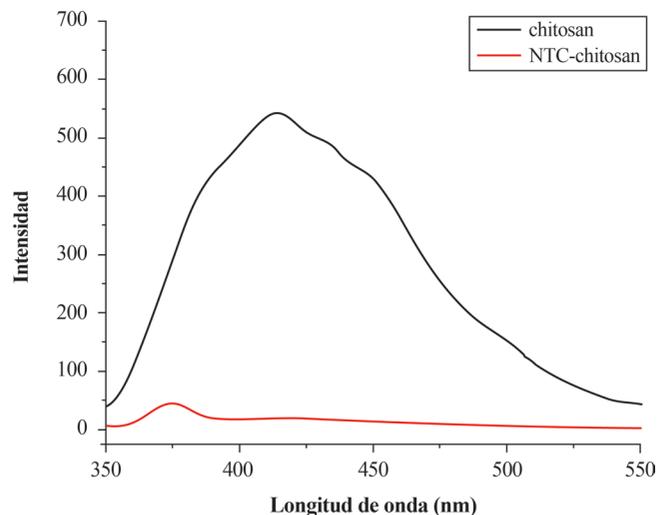


Figura 8. Espectro de emisión del chitosan y del chitosan conjugado a NTC.

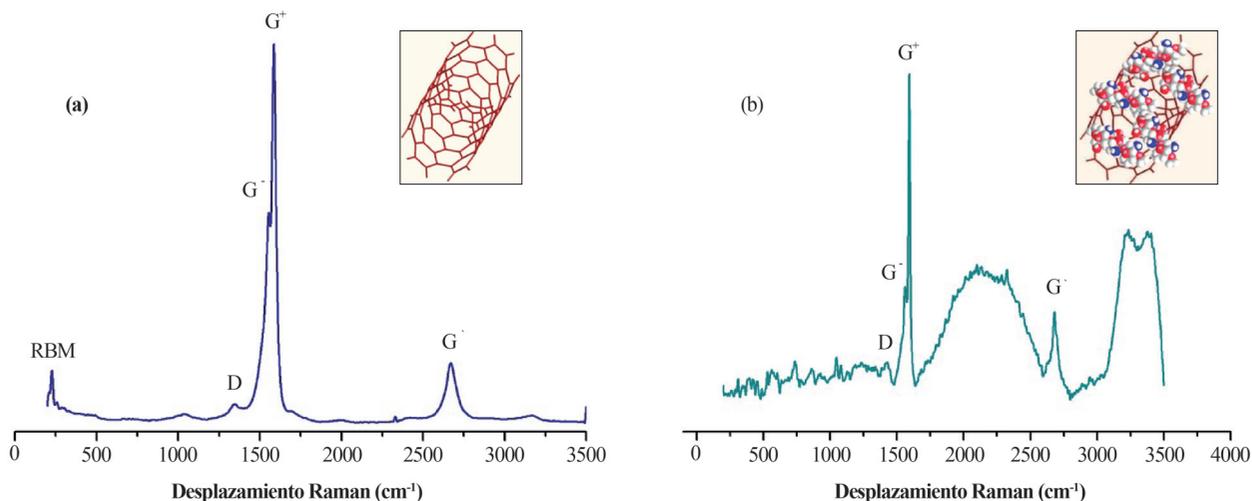


Figura 9. Espectro Raman de (a) nanotubos de carbono y (b) nanotubos de carbono-chitosan (Castillo, John, 2013).

Se aprecia una modificación de las bandas G y G' (asociadas a la hibridación sp^2 del doble enlace) que corresponden a la vibración fundamental (primer orden) de elongación tangencial y un sobretono de segundo orden ubicados a 1500 y 1650 cm^{-1} respectivamente. Igualmente, se observa la banda D en ambos espectros, ubicada entre 1250 y 1400 cm^{-1} , banda conocida de desorden inducido y se asocia a la presencia de defectos en el NTC por interacción, que en este caso es extremadamente débil.

Se estimó adicionalmente un cambio en la relación de intensidades de la banda D y G de 0.0637 a 0.096 para el NTC sin y con chitosan respectivamente, evidenciando una interacción del chitosan con el NTC. (Castillo et al., 2012).

Espectroscopia Resonancia Magnética Nuclear

Para evidenciar la funcionalización de los NTC con el AF mediante la preparación del conjugado NTC-chitosan-AF, se realizó un análisis de RMN bidimensional (DOSY), técnica llamada *cromatografía de RMN*, usada para separar los componentes de una mezcla compleja (Marega R et al., 2010). El espectro se midió disolviendo $400\text{ }\mu\text{L}$ de la muestra en $100\text{ }\mu\text{L}$ de agua deuterada (D_2O) y en el experimento DOSY se utilizó un gradiente pulsado por medio de una secuencia programada (pulso *ledbpgp2s*, Bruker), por cada gradiente se utilizaron 32 barridos y un tiempo de difusión 0.05 s . Todos los experimentos fueron realizados a 298 K . Los espectros se midieron en un espectrómetro de 400 MHz (Bruker Avance III) y se analizaron con el software Topspin 2.1.

Los respectivos espectros ^1H -RMN de la carbodiimida, AF libre, chitosan y conjugado NTC-chitosan-AF se indican en la figura 10. Se evidencia en los espectros las señales correspondientes del chitosan, AF y el conjugado.

En el espectro la señal intensa a 1.90 ppm se asigna a los protones metílicos de la isourea, formada como producto secundario de la reacción chitosan y AF. Las otras señales protónicas a 6.37 (d, $J=8.7\text{ Hz}$, 2H), 7.21 (d, $J=1.7\text{ Hz}$, 2H) corresponden a desplazamientos químicos de los protones de la región del ácido p-amino benzoico del AF y la señal a 8.61 (s, 1H) pertenece al protón de la parte pteridina del folato.

Adicionalmente, se observa un desplazamiento a campo alto de los protones aromáticos del AF conjugado comparado con las señales del AF libre, señales en 6.12 (d, $J=8.3\text{ Hz}$, 2H), 7.06 (d, $J=8.3\text{ Hz}$, 2H) y 7.93 (s, 1H). Este desplazamiento probablemente está asociado al efecto protector de los electrones π de los NTC, los cuales inducen una corriente y un campo magnético opuesta a la dirección del campo aplicado, generando un efecto protector y así desplaza las señales del AF hacia campo alto.

La determinación del coeficiente de difusión mediante un experimento de RMN-DOSY de NTC y NTC-AF, permite evidencias acerca de la interacción del AF al NTC (Marega R., 2010). A partir del espectro medido por el 2D DOSY-RMN, se calcula el log natural de los coeficientes de difusión, cuyos detalles son indicados en el trabajo doctoral de John Castillo (Castillo J. J., 2013). El valor estimado de los coeficientes de difusión evidencian que la difusión del AF cambia notoriamente, observando una difusión muy rápida para el AF libre, asociado a su menor tamaño, que cuando el AF está conjugado al NTC, donde por su mayor tamaño, se difunde a una menor velocidad, estos resultados evidencian la formación del sistema bioconjugado: NTC-AF. Este análisis DOSY permite sugerir que puede ser utilizado como una herramienta para la obtención de información acerca de la funcionalización de nanoestructuras de diferente origen. (Cohen Y., et al., 2005).

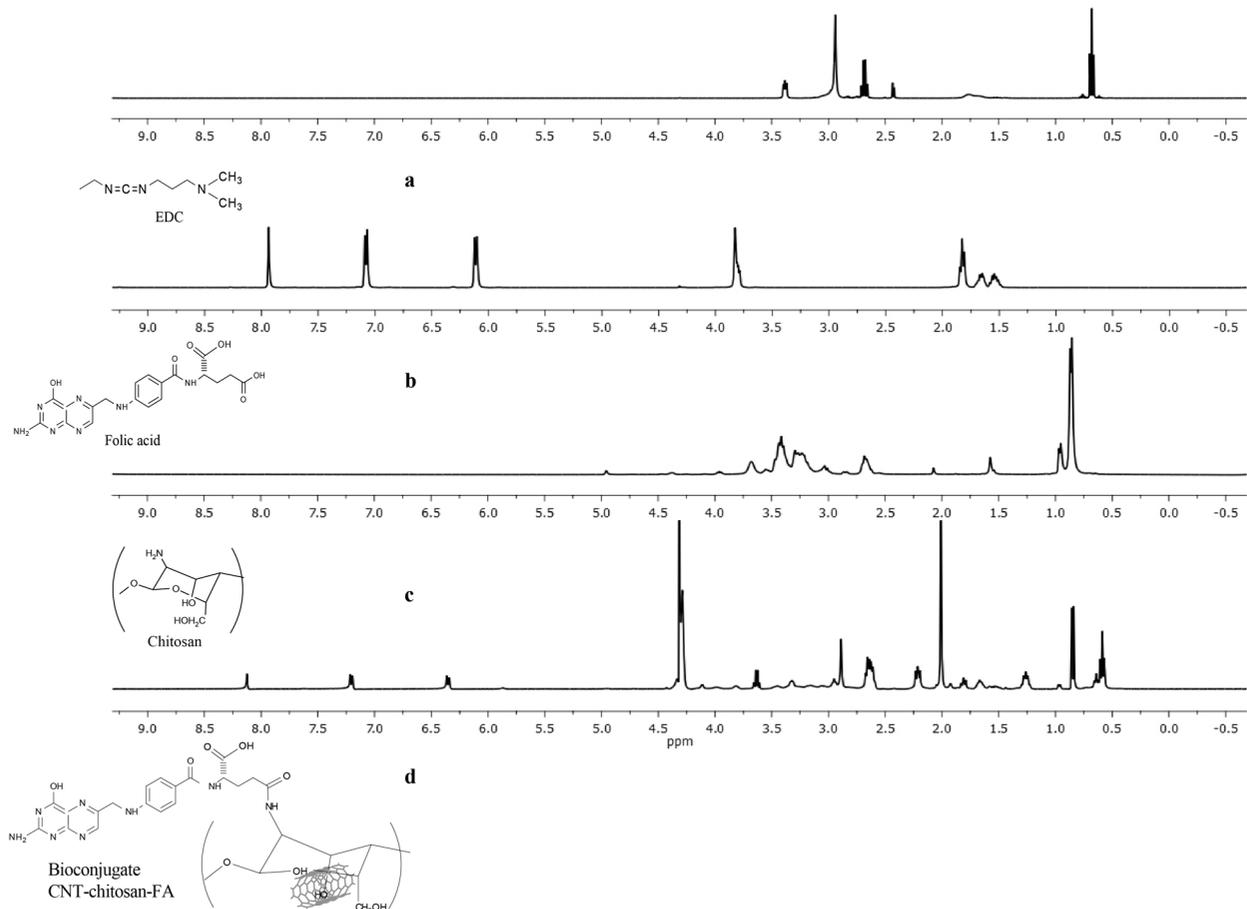


Figura 10. Espectros de RMN: a) carbodiimida (EDC), b) AF, c) chitosan and d) NTC-AF, (Castillo et al., 2012).

Análisis del NTC-AF (covalente)

Espectroscopia UV-VIS

El análisis por UV-Vis, permitió realizar un seguimiento de los intermediarios formados durante el proceso de la funcionalización covalente. En la figura 11a, se indican los espectros medidos, la etilendiamina presenta un pico de máxima absorción en 275 nm, característica de los pares electrónicos de los átomos dadores del nitrógeno y una transición $n-\sigma^*$ propia de los compuestos que contienen heteroátomos. En el caso del AF se presentan dos bandas de absorción en 281 nm ($n-\pi^*$) y 345 nm (efecto batocromico asociado a las transiciones $n-\pi^*$ y $\pi-\pi^*$).

En el caso de los espectros del NTC-COOH (negro) y las respectivas modificaciones del grupo carboxílico: NTC-EDA (rojo) y NTC-AF (azul), ver figura 11b, en estos últimos se evidencian pequeños corrimientos de las posiciones de las bandas asociadas a los precursores, debido a la presencia del grupo carbonilo en NTC, y se aprecia además, las señales muy débiles (500 - 800 nm) asociadas al NTC.

Espectroscopia de Fluorescencia

El análisis de fluorescencia UV-Vis realizado a NTC y NTC-EDA, dispersos en agua, se observa una disminución de la intensidad de la banda en el intervalo de 360-550 nm cuando la EDA se asocia al NTC, este apagamiento se debe al efecto desactivante del NTC (Wadzanai, C., Tebello, N., 2010). Adicionalmente, se mantiene la banda de absorción en 310 nm debido a la insaturación del grupo carbonilo (C=O) y formación del grupo amida con la etilendiamina, ver figura 12.

En el caso de la fluorescencia del sistema NTC-AF, se observa un cambio en el espectro, se da un aumento de la intensidad de la banda del AF cuando interacciona con el NTC. En este caso el AF no se encuentra unido directamente al NTC, lo cual podría explicar la ausencia del efecto de apagamiento asociada a la interacción directa con el NTC, ver figura 13.

Dado a la ausencia de un efecto de apagamiento de la fluorescencia, evidencia que el método de preparación conduce a una interacción diferente, quizás covalente, del AF con los

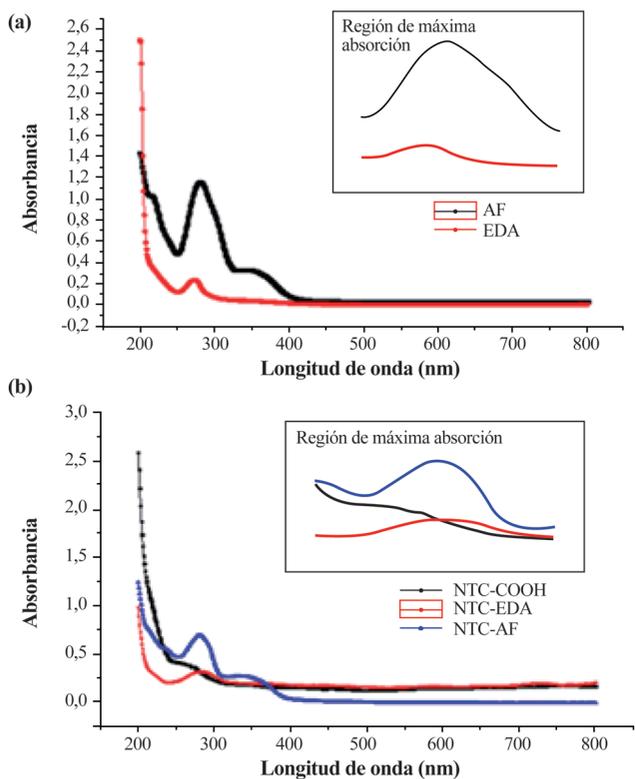


Figura 11. Espectros UV-Vis del NTC modificado. a) Precursores EDA (disuelto en agua) y AF (disuelto en acetonitrilo) b) Los sistema NTC-COOH, NTC-EDA y NTC-AF, dispersos en acetonitrilo.

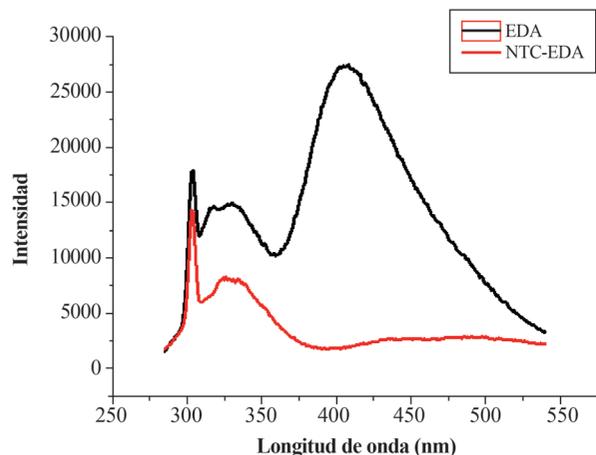


Figura 12. Espectros de Fluorescencia de la etilendiamina y el NTC-EDA dispersos en agua, para una longitud de onda de excitación de 281 nm.

NTC, que cuando se realiza la sonicación directa entre el AF y NTC que conduce a una funcionalización no covalente y donde se observa un apagamiento de la intensidad. La literatura lo explica mediante un mecanismo de desactivación

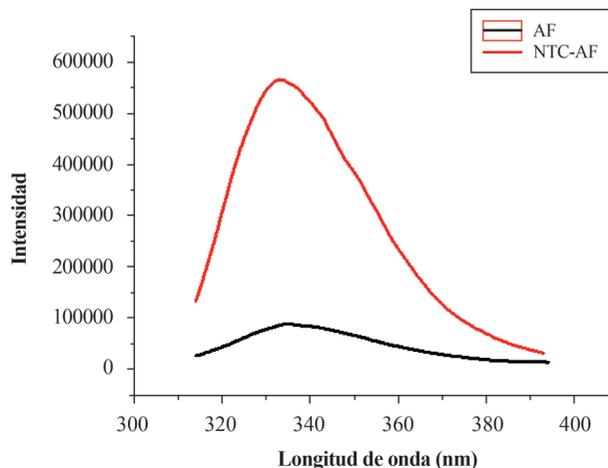


Figura 13. Espectros de Fluorescencia del AF y el NTC-AF dispersos en acetonitrilo.

de la energía colisional o transferencia Dexter, fenómeno de muy corto alcance, disminuye con la distancia de separación (e^{-R}) y depende del solapamiento entre los orbitales moleculares de las dos especies (NTC y AF).

Espectroscopia Infrarroja

Al realizar un análisis por espectroscopia IR/ATR de cada uno de los productos CNT-EDA y CNT-AF, ver figura 14, se observa la presencia de las bandas vibracionales asociadas a cada uno de los grupos funcionales (EDA y AF) de las moléculas que funcionalizan el NTC. En la tabla 1 se resumen las bandas más características de los sistemas mencionados (Ayala B. E. et al., 2013).

Al modificar los grupos superficiales COOH con la EDA, se observa las vibraciones correspondientes a la amida primaria (3321 , 2921.17 y 2846.34 cm^{-1}) que se correlacionan con las bandas I (C=O, 1620.16 cm^{-1}) y II (1568.39 cm^{-1}) de una amida, lo cual evidencia la modificación de los grupos carboxílicos del NTC. En el caso de la preparación del sistema NTC-AF, se observa en la región (1700 – 1110 cm^{-1}) la presencia de las vibraciones asociadas al ácido fólico, que evidencia su interacción con el anillo. Las investigaciones realizadas acerca de la funcionalización de los NTC, resalta el hecho de aportar evidencias experimentales acerca de la funcionalización de los NTC (Nelson D. J. and Kumar R., 2013).

Estudio de la distribución del tamaño de partícula

Se puede observar un cambio en el tamaño medio de las partículas tanto de los intermediarios como del producto final al realizar una medición del potencial Z de las soluciones. Se evidencia un aumento del tamaño a medida que se adicionan los grupos al NTC, resultando un mayor tamaño medio para

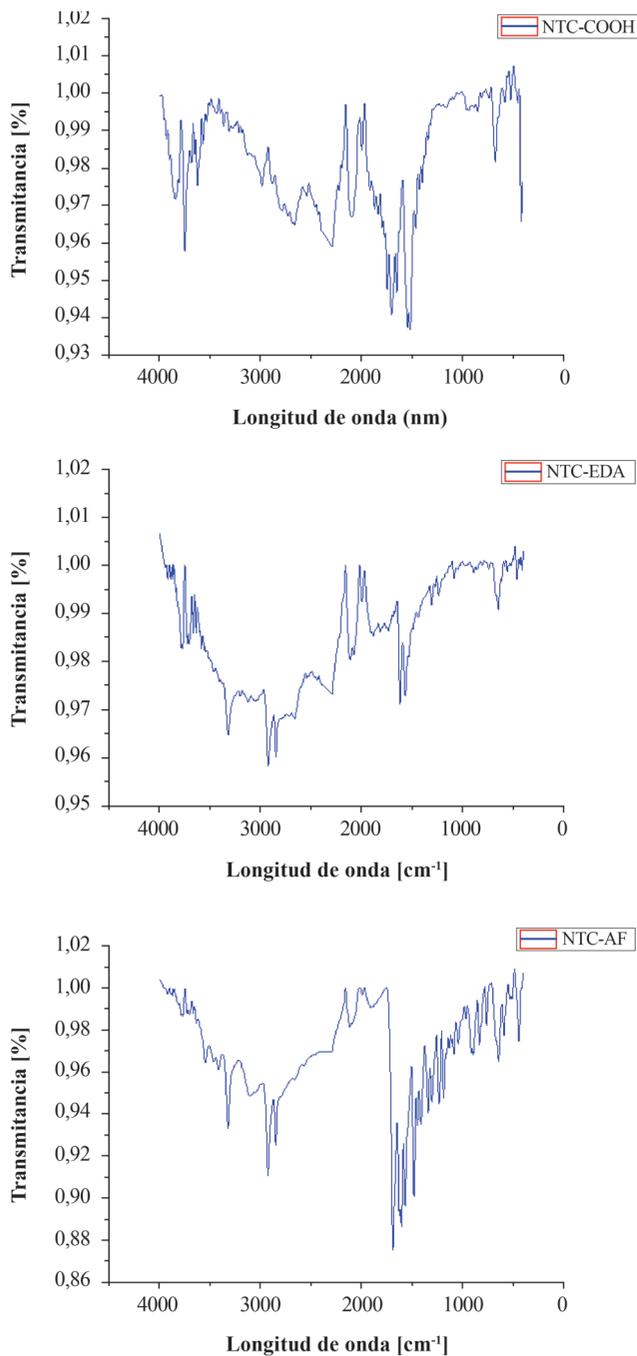


Figura 14. Espectro IR de (a) NTC-COOH, (b) NTC-EDA y (c) NTC-AF.

las partículas de NTC-AF. Este crecimiento puede estar asociado al tamaño del AF, el cual es mayor con respecto al EDA ó al COOH, como se indica en la tabla 2.

Teniendo en cuenta que la técnica supone que las partículas son esféricas, aquí se asume que el diámetro indicado para la esfera, corresponde a la longitud del NTC.

Mediante la microscopia de fuerza atómica, se evidencio una modificación del tamaño del tubo, debido a la interacción (covalente y no covalente) del AF con el NTC, observándose que las moléculas de AF envuelven la estructura del NTC, resultados que se indican en la investigación de Castillo et al. (Castillo J. J., 2013).

Evaluación del efecto térmico del sistema NTC-AF (no covalente)

Se ha indicado que la funcionalización de los NTC con AF podría mejorar su internalización celular, facilitando el transporte de fármacos o como agente generador de calor local. Luego al irradiar las células enfermas con radiación IRC se generará un efecto térmico letal. Son pocos los estudios publicados acerca de la preparación del sistema NTC-AF. Aquí se indicarán algunos de los resultados obtenidos al irradiar el NTC-AF (covalente y no covalente).

Se prepararon soluciones acuosas de NTC-AF (0.125–0.500 mg/mL) bajo condiciones de esterilidad, las cuales se irradiaron durante 10 minutos mediante un laser (ThorLabs, 808 nm) controlando la temperatura y la potencia (200, 400 y 600 mW).

Calentamiento de los NTC-AF en sistemas acuosos

Se realizaron curvas de calentamiento para cada concentración y potencia, se determinó la velocidad de calentamiento en °C/s en la solución mediante un termómetro electrónico de sonda metálica. Además, se hizo un experimento control usando únicamente agua, con una potencia de 600 mW. Se observó que el calentamiento de la solución se debe a los NTC, ya que en el agua no se presentó aumento de la temperatura en ausencia de NTC.

En la figura 15 se indican las curvas de calentamiento medidas durante 10 min de irradiación para tres soluciones con diferente concentración de NTC-AF y modificando la potencia del diodo láser. Se determinó que 10 min era suficiente para alcanzar los valores más altos de temperatura, para tiempos superiores de irradiación se observaba una disminución de la misma

La irradiación de las soluciones de NTC-AF produce un incremento de la temperatura y se observa un incremento significativo de la misma durante los 5 primeros minutos. Adicionalmente, se observa un aumento de la temperatura al modificar la concentración de la solución así como la potencia de irradiación. Se alcanzó un valor de 43.8°C con una potencia de 600 mW (0.5 mg/mL). Valores similares han sido indicados por Hussain. [Hussain S., et al, 2011], con valores de 44°C durante 4 minutos de irradiación usando un láser con una potencia de 4.5 W. Las diferencias de temperatura se han atribuido a las condiciones usadas y al tipo de NTC empleado en ese caso (Madani S., et al., 2012).

Tabla 1. Bandas características del espectro IR* del sistema NTC-X.

Tipo de vibración	Número de onda (cm ⁻¹)		
	NTC-COOH	NTC-EDA	NTC-AF
Alargamiento del O-H	3743	3778 y 3711	3543 y 3416
Alargamiento N-H		3321	3220
Alargamiento C-H aromático	3010		
Alargamiento C-H alifático		2921 y 2840	2923 y 2848
Alargamiento C=O	1700	1620	1689
Alargamiento C=C aromático	1541 y 1517	1620 y 1563	1612 y 1570
Alargamiento C=N aromático			1482
alargamiento asimétrico COO-			1412
alargamiento simétrico			1340
flexión en el plano C-O-H	1426.27		1481 y 1339
alargamiento C-N		1236 y 1086	
Flexión fuera del plano C-H aromaticos	675	646	648

* Los sólidos se midieron en el equipo Bruker Tensor 27, usando 32 barridos, con una resolución 2.0% de transmitancia y los espectros se analizaron con OriginLab versión 8.0.

Tabla 2. Tamaño promedio de las partículas de los sistemas funcionalizados covalentemente.

Compuesto	Tamaño medio (nm)	PDI*
NTC-COOH	120.8	0.318
NTC-EDA	122.0	0.255
NTC-AF	162.5	0.591

*PDI: índices de polidispersión, los valores menores a 1, indica que partículas están monodispersas.

El aumento de la temperatura esta asociado a la absorción de luz por NTC que libera su energía mediante una disipación de calor que conduce al aumento local de la temperatura en la solución de NTC-AF (Burlaka A., et al, 2010).

Evaluación del efecto térmico del sistema NTC-AF (covalente)

Se realizaron ensayos para medir el efecto de la radiación infrarroja en las soluciones acuosas de NTC-AF y teniendo en cuenta los dos métodos de preparación (covalente y no covalente). Para ello se utilizó una bombilla incandescente comercial (60 W), la cual emite (75% I:R, un 15% visible y el 10% UV), se evaluó el tiempo de irradiación de soluciones acuosas de NTC-AF (100 y 1000 ppm), teniendo en cuenta como blanco el agua (Ayala B. E. et al, 2013).

Se observó un aumento de la temperatura con el cambio de la concentración así como con el tiempo de irradiación, ver la figura 16. El incremento de la temperatura es mayor para aquella solución que contiene el sistema NTC-AF preparados covalentemente y es proporcional a la concentración de la solución.

Se ha indicado un aumento de la temperatura de 60°C al usar soluciones de NTC de pared múltiple e irradiadas con una lámpara IRC (780-1400 nm) (Hussain S. et al, 2011), resultados que están en concordancia con lo observado y permite deducir que el calentamiento de la solución es debido a la absorción de la radiación por el sistema NTC-AF.

Experimentos biológicos preliminares.

Se han realizado algunos ensayos biológicos observándose que soluciones de NTC-AF (no covalente) no presentan toxicidad en células de mamíferos THP-1 y forma dispersiones estables a pH fisiológico (Castillo et al, 2011). Además, los experimentos de internalización, THP-1 infectadas con *L. panamensis* y no infectadas (8×10^5 células/mL) fueron cultivadas en placas de 24 pozos con laminillas circulares y tratadas con diferentes concentraciones de NTC-AF (no covalente) (0.03 - 0.125 mg/mL) de 2 a 72 horas a 37°C, 5% CO₂, 95% de mezcla aire, indicaron el ingreso de los NTC-AF en células THP-1 y se observó una dependencia del tiempo de internalización con la concentración de nanotubos internalizados, seguido mediante microscopia óptica por conteo directo de 300 células (Novoa V.L., 2012). Los NTC-AF se ubicaron en el citoplasma y con el aumento en el tiempo de internalización ocuparon más del 50% de la célula. Además por medio de microscopia óptica se observó la formación de aglomerados de los NTC-AF los cuales se ubicaron en especies de vacuolas. El mecanismo de ingreso de los NTC funcionalizados con AF es probablemente mediado la expresión de receptores de folato (Castillo J. J. et al, 2013).

Al realizar un experimento con células THP-1 infectadas con amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis*, se observó la internalización de los NTC-AF (no covalente)

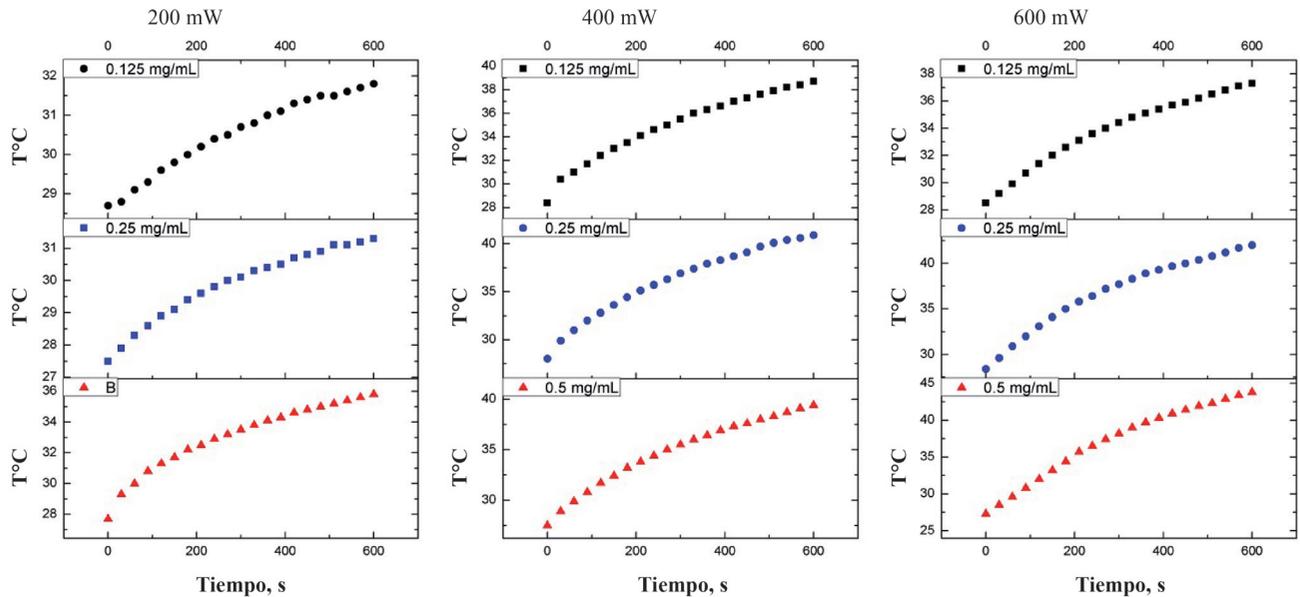


Figura 15. Curvas de calentamiento de soluciones acuosas de NTC-AF (no covalente), utilizando un diodo laser de 808 nm y modificación de la potencia (200, 400 y 600 mW) (Castillo, John, 2013).

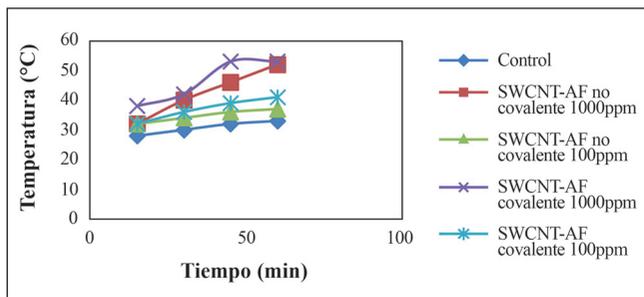


Figura 16. Efecto térmico sobre los NTC-AF funcionalizados covalente y no covalentemente (Ayala B. E. et al, 2013).

(0.060 – 0.500 mg/mL). Células THP-1 transformadas con PMA en cámaras de vidrio con sistema deslizante (labteck de NUNC) e infectadas con promastigotes de *L. panamensis* (fase estacionaria de crecimiento) utilizando una relación de infección de 1:5 célula: parásito por 48 horas a 32°C, 5% CO₂ 95% mezcla-aire. Después fueron tratadas con diluciones seriadas 1:2 de NTC-AF (no covalente) (0.25 a 0.016 mg/mL) por 24 horas. Posteriormente se irradiaron con IRC (808 nm) por 10 minutos. Células infectadas controles tratadas y no tratadas con NTC-AF (no covalente) fueron mantenidas sin irradiación, así como células infectadas no tratadas fueron irradiadas en las mismas condiciones. Luego, las células fueron fijadas con metanol por 10 minutos y coloreadas utilizando la tinción de Giemsa; cada experimento fue repetido tres veces. El porcentaje de infección fue determinado microscópicamente por conteo directo de 300 células infectadas. Se

observó una inhibición de los amastigotes intracelulares, lo cual probablemente este asociado al efecto térmico local generado por la irradiación sobre las células infectadas (Novoa L. V., 2012). Esto nos ha orientado que en la investigación debemos estudiar los efectos asociados a la longitud de onda incidente, el tiempo de irradiación, la potencia del haz de radiación, la concentración de NTC, la naturaleza de la interacción NTC y AF (covalente y no covalente) entre otros. En consecuencia, el conjugado NTC-AF es un buen candidato para generar la ablación térmica en sistemas biológicos.

Conclusiones

Se ha indicado que los métodos usados para la funcionalización de los nanotubos de carbono de pared simple con ácido fólico, permiten una interacción covalente y no covalente entre las dos moléculas.

La caracterización espectroscópica de los sistemas NTC-AF ha permitido evidenciar la interacción entre el AF y el NTC.

La irradiación de soluciones acuosas NTC-AF con IRC (laser y lámpara) genera un efecto de calentamiento que depende de la concentración, de la potencia del haz de iluminación así como del tipo de interacción ácido fólico y NTC, ya que se observa un cambio en la temperatura de la solución. Además, los experimentos de control evidencian que los NTC son los responsables del aumento de la temperatura.

Los estudios biológicos preliminares realizados indicaron que el bioconjugado NTC-AF (no covalente) se puede internalizar en células tipo THP-1, así como aquellas células

infectadas con la *Leishmania* y su mecanismo de ingreso celular probablemente esta mediado por la expresión de receptores de folato. Además, el efecto térmico generado por la iluminación con el IR puede eliminar la población de células infectadas, esto nos alienta a continuar evaluando el sistema conjugado preparado, teniendo en cuenta que se debe estudiar con más detalle factores como la longitud de onda incidente, el tiempo de irradiación, la potencia del haz de radiación, la concentración de NTC, la naturaleza de la interacción NTC y AF entre otros.

Finalmente, la síntesis y la utilización de estos sistemas conjugados abren nuevas posibilidades para el tratamiento de enfermedades infecciosas y las células cancerosas mediante la generación de un efecto térmico localizado que permita la ablación térmica de células enfermas y el conjugado NTC-AF es un buen candidato para generar la ablación térmica en sistemas biológicos.

Agradecimientos

Agradecimientos muy especiales a los Profesores Patricia Escobar y Edgar A. Páez por las amplias discusiones sobre el tema y a los investigadores que permitieron realizar los procedimientos experimentales y la continuidad de este trabajo: Doctor en Química John J. Castillo y a los Químicos Linda G. Bertel, Elizabeth Ayala B, Yeison G. Peña y la Magister en Ciencias Básicas Leidy V. Novoa L. Además, se agradece a COLCIENCIAS (Proyecto 110245921468) por la financiación del trabajo experimental.

Conflicto de interés

El autor declara que el artículo no tiene ningún conflicto de interés.

Bibliografía

- Ahmad A., Kurkina T., Kern K. and Balasubramanian K.**, 2009. Applications of the Static Quenching of Rhodamine B by Carbon Nanotubes. *Chem. Phys. Chem.* 10:2251–2255.
- Atthal S., Thiruvengadathan R., Regev O.**, 2006. Determination of the concentration of single walled carbon nanotubes in aqueous dispersion using UV-Vis absorption spectroscopy. *Anal. Chem.* 78 (23):8098-8104.
- Ayala B. E., Peña B.Y. G.**, 2013. Funcionalización covalente de nanotubos de carbono de pared simple con ácido fólico y evaluación de su efecto térmico, Trabajo de grado, Director Fernando Martínez O., Escuela de Química, Facultad de Ciencias, UIS.
- Ayala B. E., Peña Y. G., Barbosa O., Torres R., Martínez O. F.**, 2013. Evaluación del efecto térmico de nanotubos de carbono de pared simple funcionalizados con ácido fólico. *Rev. Invest. Univ. Quindío.* 1 (24): 107-111.
- Bandara N. A., Hansen M. J., and Low P. S.**, 2014. Effect of Receptor Occupancy on Folate Receptor Internalization. *Molecular. Pharmaceutics* 11 (3): 1007–1013.
- Boca-Farcau S., Potara M., Simon T., Juhem A., Baldeck P., and Astilean S.**, 2014. Folic Acid-Conjugated, SERS-Labeled Silver Nanotriangles for Multimodal Detection and Targeted Photothermal Treatment on Human Ovarian Cancer Cells. *Molecular. Pharmaceutics* 11 (2): 391–399.
- Burkea A., Ding X., Singh R., Kraft R. A., Levi-Polyachenko N., Rylander M. N., Szot C., Buchanan C., Whitney J., Fisher J., Hatcher H. C., D'Agostino R., Jr., Kock N. D., Ajayan P. M., Carroll D. L., Akman S., Torti F. M., and Torti S. V.**, 2009. Long-term survival following a single treatment of kidney tumors with multiwalled carbon nanotubes and near-infrared radiation. *PNAS* 106 (31): 12897–12902.
- Burlaka A., Lukin S., Prylutska S., Remeniak O., Prylutsky Y., Shuba M., Maksimenko S., Ritter U., Scharff P.**, 2010. Hyperthermic effect of multi-walled carbon nanotubes stimulated with near infrared irradiation for anticancer therapy: in vitro studies. *Exp. Oncol.* 32 (1): 48-50.
- Castillo J. J., Torres M. H., Molina D. R., Castillo-León J., Svendsen W. E., Escobar P., Martínez O. F.**, 2012. Monitoring the functionalization of single-walled carbon nanotubes with chitosan and folic acid by two-dimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Carbon* 50 (8): 2691–2697.
- Castillo J.J., Novoa L.V., Martínez F., Escobar P.**, 2011. Carbon nanotubes-chitosan in HOS and THP-1 cells. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud* 43 (1): 21–6.
- Castillo, J. J., Rindzevicius T., Novoa L. V., Svendsen W. E., Rozlosnik N., Boisen A., Escobar P., Martínez F. and Castillo-Léon J.**, 2013. Non-covalent conjugates of single-walled carbon nanotubes and folic acid for interaction with cells over-expressing folate receptors. *J. Mater. Chem. B.* 1: 1475-1481.
- Castillo J. J., Roza C. E., Castillo-León J., Rindzevicius T., Svendsen W. E., Rozlosnik N., Boisen A., Martínez O. F.**, 2013. Computational and experimental studies of the interaction between single-walled carbon nanotubes and folic acid. *Chemical Physics Letters* 564: 60–64.
- Castillo, John**, 2013. Diseño y Preparación de Nanocompuestos Funcionalizados con Ácido Fólico y sus Aplicaciones Biomédicas, tesis doctoral en química, escuela de Química, dirigida por Patricia Escobar R. y Fernando Martínez O., UIS, enero.
- Chakravarty P., Marches R., Zimmerman N. S., Swafford A. D.-E., Bajaj P., I. H. Musselman, P. Pantano, Draper R. K., and Vitetta E. S.**, 2008. Thermal ablation of tumor cells with antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes. *PNAS* 105 (25): 8697– 8702.
- Cohen Y., Avram L., and Frish L.**, 2005. Diffusion NMR Spectroscopy in Supramolecular and Combinatorial Chemistry: An Old Parameter—New Insights, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (4): 520– 554.

- Cho E. S., S. Hong W. and Jo W. H.**, 2008. A New pH Sensor Using the Fluorescence Quenching of Carbon Nanotubes. *Macromol. Rapid Commun.* **29** (22): 1798–1803.
- Chen H., Chi X., Li B., Zhang M., Ma Y., Achilefu S. and Gu Y.**, 2014. Drug loaded multilayered gold nanorods for combined photothermal and chemotherapy. *Biomater. Sci.*, **2**: 996–1006.
- Chou H.-T., Wang T.-P., Lee Y., Taia N.-H., Chang H.-Y.**, 2013. Photothermal effects of multi-walled carbon nanotubes on the viability of BT-474 cancer cells. *Materials Science and Engineering C* **33** (2): 989–995.
- Dresselhaus M., Dresselhaus G., Jorio A., Filho A., Pimenta A., Saito R.**, 2002. Single Nanotube Raman Spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **35** (12): 1070-1078.
- Elhissi A. M. A., Ahmed W., Hassan I. U., Dhanak V. R., and D'Emanuele A.**, 2012. Carbon Nanotubes in Cancer Therapy and Drug Delivery. *J. of Drug Delivery* Volume 2012, Article ID **837327**, doi:10.1155/2012/837327
- Fisher J., Sarkar S., Buchanan C.**, 2010. Photothermal Response of Human and Murine Cancer Cells to Multiwalled Carbon Nanotubes after Laser Irradiation. *Cancer Research*, **70** (23): 9855-9864.
- Galvis, M., Barbosa, O., Ruiz, M., Cruz, J., Ortiz, C., Torres R.**, 2012. Chemical amination of lipase B from *Candida Antarctica* is an efficient solution for the preparation of cross linked enzyme aggregates. *Process Biochemistry* **47** (12): 2373-2378.
- Gannon C. J., Cherukuri P., Yakobson B. I., Cognet L., Kanzius J. S., Kittrell C., Weisman R. B., Pasquali M., Schmidt H. K., Smalley R. E., Curley S. A.**, 2007. Carbon Nanotube-enhanced Thermal Destruction of Cancer Cells in a Noninvasive Radiofrequency Field. *CANCER*, Volume **110** (12): 2654-2665.
- Graham E. G., MacNeill C. M., Levi-Polyachenko N. H.**, 2013. Quantifying folic acid-functionalized multi-walled carbon nanotubes bound to colorectal cancer cells for improved photothermal ablation. *J. Nanopart. Res.* **15**: 1649-1662.
- Hashida Y., Tanaka H, Zhou S., Kawakami S. , Yamashita F., Murakami T., Umeyama T., Imahori H., Hashida M.**, 2014. Photothermal ablation of tumor cells using a single-walled carbon nanotube-peptide composite. *Journal of Controlled Release* **173**: 59-66.
- Hildebrandt B., Wust P, Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G, Kerner T, Felix R., Riess H.**, 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **43** (1): 33–56.
- Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed M.A.**, 2006. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (6): 2115–2120.
- Hussain S., Dosser L., Payne S., Stacy B., Schrandt A.**, 2011. Fundamental Examination of Nanoparticle Heating Kinetics Upon Near Infrared (NIR) Irradiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3**: 3971–3980.
- Jinno M., Ando Y., Bandow S., Fan J., Yudasaka M., Ijima S.**, 2006. Raman scattering study for heat-treated carbon nanotubes: The origin of $\approx 1855\text{ cm}^{-1}$ Raman band. *Chemical Physics Letters* **418** (1-3): 109-114.
- Kang B, Yu D. C, Dai Y.D., Chang S.Q., Chen D., Ding Y.T.**, 2009. Cancer-cell targeting and photoacoustic therapy using carbon nanotubes as “Bomb” agents. *Small* **5** (11): 1292–301.
- Kim U., Furtado C., Liu X., Chen G., Eklund P.** 2005. Raman and IR Spectroscopy of Chemically Processed Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Am Chem Soc.* **127** (44): 15437-15445.
- Koh B., Park J. B., Hou X. M. and Cheng W.**, 2011. Comparative Dispersion Studies of Single-Walled Carbon Nanotubes in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B*, **115** (11): 2627–2633.
- Kosuge H., Sherlock S. P., Kitagawa T., Dash R., Robinson J. T., Dai H.; McConnell M. V.**, 2012. Near Infrared Imaging and Photothermal Ablation of Vascular Inflammation Using Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Am. Heart Assoc.* 2012: doi: 10.1161/JAHA.112.002568
- Levi-Polyachenko N., Merkel E., Jones B., Carroll D., Stewart J. H.**, 2009. Rapid Photothermal Intracellular Drug Delivery Using Multiwalled Carbon Nanotubes. *Molecular. Pharmaceutics* **6** (4): 1092-1099.
- Liu Z., Davis C., Cai W., He L., Chen X., and Dai H.**, 2008. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *PNAS* **105** (5): 1410–1415.
- Loo C., Lowery A, Halas N, West J, Drezek R.**, 2005. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett.* **5** (4): 709–711.
- Madani S., Tan A., Dwek M., Seifalian A.**, 2012. Functionalization of single-walled carbon nanotubes and their binding to cancer cells. *Int J Nanomedicine* **7**: 905-914.
- Manthe R., Foy S., Krishnamurthy N., Sharma B., Labhasetwar V.**, 2010. Tumor Ablation and Nanotechnology. *Molecular Pharmaceutics* **7** (6): 1880-1898.
- Marega R, Aroulmoji V, Bergamin M, Feruglio L, Dinon F, Bianco A.**, 2010. Two-Dimensional Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy as a Tool for Monitoring Functionalized Carbon Nanotube Purification and Composition. *ACS Nano.* **4** (4): 2051-8.
- Marega R., Aroulmoji V., Dinon F., Vaccari L., Giordani S., Bianco A., Murano E. and Prato M.**, 2009. Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy in the Structural Characterization of Functionalized Carbon Nanotubes. *J. Am Chem Soc* **131** (25): 9086–9093.

- Moon H., Lee S., Choi H.**, 2009. *In Vivo* Near-Infrared Mediated Tumor Destruction by Photothermal Effect of Carbon Nanotubes. *ACS Nano* **3** (11): 3707-3713.
- Nelson D. J. and Kumar R.**, 2013. Characterizing Covalently Sidewall-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes by Using ^1H NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **117**: 14812-14823.
- Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C.**, 2005. Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors. *J. Surg. Res.* **127**: 208-223.
- Niu L., Meng L., Lu Q.**, 2013. Folate-Conjugated PEG on Single Walled Carbon Nanotubes for Targeting Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells, *Macromol Biosci* **13** (6): 735-744.
- Novoa, L. V.**, 2012. Actividad de nanotubos de carbono acoplados a ácido fólico contra *Leishmania panamensis* después de irradiación con luz infrarroja cercana, Trabajo de Maestría en Ciencias básicas de la Escuela de Medicina, dirigida por Patricia Escobar R. UIS.
- Pavitra Chakravarty, Radu Marches, Neil S. Zimmerman, Austin D.-E. Swafford, Pooja Bajaj, Inga H. Musselman, Paul Pantano, Rockford K. Draper, and Ellen S. Vitetta**, 2008. Thermal ablation of tumor cells with antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes, *PNAS* **105** (25): 8697- 8702.
- Robinson J., Welsher K., Tabakman S., Sherlock S., Wang h., Luong R., Dai H.**, 2010. High Performance *In Vivo* Near-IR ($>1 \mu\text{m}$) Imaging and Photothermal Cancer Therapy with Carbon Nanotubes. *Nano Res.* **3** (11): 779-793.
- Tong R., Chiang H. H., and Kohane D. S.**, 2013. Photoswitchable nanoparticles for in vivo cancer chemotherapy. *PNAS* **110** (47): 19048-19053.
- Vardharajula S., Ali SZ, Tiwari PM, Eroğlu E, Vig K, Dennis V.A, Singh S.R.**, 2012. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *Int J Nanomedicine* (7): 5361-74.
- WANG H., ZHAO Y-L., and NIE G-J.**, 2013. Multifunctional nanoparticle systems for combined chemo-and photothermal cancer therapy. *Front. Mater. Sci.* **7** (2): 118-128.
- Zhang Y L. X, Tang HM. D, Xie Q. T. L, Yao S**, 2013. Biocompatible multi-walled carbon nanotube-chitosan-folic acid nanoparticle hybrids as GFP gene delivery materials. *Colloids Surf B Biointerfaces* **111C**: 224-231.
- Wadzanai, C., y Tebello, N.**, 2010. Characterization of amine-functionalized single-walled carbon nanotube-low symmetry phthalocyanine conjugates. *Carbon* **48** (10): 2831-2838.
- Zhao D., Alizadeh D., Zhang L., W. Liu, Farrukh O., Manuel E., Diamond D. J. and Badie B.**, 2011. Carbon Nanotubes Enhance CpG Uptake and Potentiate Antiglioma Immunity. *Clin Cancer Res* **17** (4): 771-782.
- Zhou F.F., Wu S.N., Wu B.Y., Chen W.R., Xing D.**, 2011. Mitochondria-Targeting Single-Walled Carbon Nanotubes for Cancer Photothermal Therapy, *Small* **7** (19): 2727-2735.
- Zhuang L., Corrine D., Weibo C., Lina H., Xiaoyuan C., and Hongjie D.**, 2008. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *PNAS* **105** (5): 1410-1415.