



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE MATERIALES AVANZADOS, S.C.**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL**



TESIS

**ESTUDIO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE FUNCIONALIZACIÓN DE  
NANOTUBOS DE CARBONO CON MOLÉCULAS BIOLÓGICAS  
POR MÉTODO DE AMIDACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES  
ACTIVADORES**

Como requisito para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

M.C. Kathy A. Ramírez Balderrama

Directores de tesis:

Dra. Norma R. Flores Holguín

Dr. Erasmo Orrantia Borunda



## ÍNDICE

---

<b>I. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
3.1 Justificación.....	6
3.3 Hipótesis.....	7
3.4 Objetivo general .....	7
3.5 Objetivos particulares.....	7
<b>IV. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
4.1 Modelado molecular .....	8
4.2 Química computacional.....	8
4.2.1 Mecánica molecular .....	9
4.2.1.1 Acoplamiento molecular .....	9
4.2.2 Mecánica cuántica.....	11
4.2.2.1 Métodos de Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) .....	11
4.2.2.2 Conjunto base .....	11
4.2.3 Optimización.....	12
4.2.4 Frecuencia.....	12
4.2.5 Propiedades de reactividad.....	12
4.2.6 Energía de reacción .....	15
4.3 Nanotubos de carbono .....	15
4.3.1 Generalidades .....	15
4.3.2 Síntesis de nanotubos de carbono.....	16
4.3.3 Purificación de nanotubos de carbono.....	17
4.4.4 Funcionalización de nanotubos de carbono.....	17
4.4.4.1 Funcionalización no covalente .....	17
4.4.4.2 Funcionalización covalente .....	18
4.4.5 Caracterización de nanotubos de carbono .....	19
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>20</b>
5.1 Caracterización computacional .....	20
5.1.1 Equipo .....	20
5.1.2 Programas .....	20
5.1.3 Moléculas analizadas .....	21
5.1.4 Cálculos computacionales.....	24
5.1.5 Acoplamiento molecular .....	25
5.2 Desarrollo experimental .....	26
5.2.1 Síntesis de NTC .....	27
5.2.2 Purificación de NTC .....	27
5.2.3 Titulación de Bohem.....	28
5.2.4 Reacciones de amidación .....	29
5.2.4.1 EDC .....	29
5.2.4.2 DCC.....	30



5.2.4.3 T3P .....	30
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
6.1 Estudio teórico.....	31
6.1.1 Carbodiimidas.....	31
6.1.1.1 Optimización de geometría y frecuencias .....	31
6.1.1.2 Reactividad global y local.....	32
6.1.1.3 Energías de reacción .....	37
6.1.2 Anhídrido propilfosfonico (T3P).....	43
6.1.2.1 Energías de reacción .....	43
6.1.3 Acoplamiento molecular .....	45
6.2 Desarrollo experimental .....	50
6.2.1 Síntesis de NTC .....	50
6.2.2 Purificación de NTC .....	50
6.2.3 Caracterización.....	51
6.2.3.1 SEM.....	51
6.2.3.2 Raman.....	52
6.2.3.3 Titulación Bohem.....	54
6.2.3.4 Análisis simple de XPS .....	54
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>IX. DIVULGACIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>59</b>
<b>X. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS.....</b>	<b>60</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 Ligando uniéndose a sitio de interés. ....	10
Figura 2 Superficie de energía potencial. ....	12
Figura 3 NTC de pared simple y de pared múltiple.55.....	15
Figura 4 NTC con diferente quiralidad.57 .....	16
Figura 5 Grupos funcionales de oxígeno generados en el NTC por tratamiento ácido.....	18
Figura 6 Estructuras 2D de diferentes moléculas utilizadas en este estudio. ....	21
Figura 7 Estructuras 2D de ligasas C-N extraídas del Protein Data Bank.....	22
Figura 8 Metodología empleada para el NTC, Carbodiimidas, moléculas biológicas, T3P, DIEA y todos los productos resultantes de las reacciones. ....	24
Figura 9 Acoplamiento del NTC y péptido con las ligasas C-N. ....	25
Figura 10 Esquema general de la parte experimental en este estudio.....	26
Figura 11 Síntesis de NTC por el método de spray pirolisis.....	27
Figura 12 Purificación de NTC por tratamiento ácido y calentamiento.....	27
Figura 13 Titulación de Bohem para los NTC purificados. ....	28
Figura 14 Movimiento magnético para las reacciones de amidación. ....	29
Figura 15 Estructuras optimizadas de las diferentes carbodiimidas .....	31
Figura 16 $\Delta G$ de reacción de las diferentes reacciones donde intervienen las carbodiimidas como activadores. ....	40
Figura 17 Posiciones más estables del acoplamiento entre el NTC y el péptido. ....	45
Figura 18 Acoplamiento Enzima-NTC.....	46
Figura 19 Acoplamiento Enzima-Péptido.....	47
Figura 20 Acoplamiento Enzima-NTC.....	47
Figura 21 Acoplamiento Enzima-Péptido.....	48
Figura 22 Acoplamiento Enzima-NTC y Enzima-Péptido. ....	48
Figura 23 Acoplamiento Enzima-NTC y Enzima-Péptido. ....	48
Figura 24 Acoplamiento Enzima-NTC y Enzima-Péptido. ....	49
Figura 25 NTC prístinos morfología y composición a) y NTC purificados morfología y composición b).....	51
Figura 26 Espectros Raman de NTC prístinos a) y NTC purificados b). ....	52
Figura 27 Espectros XPS de NTC prístinos a); NTC purificados b); NTC amidados con EDC (CD4) c); NTC amidados con DCC (CD8); NTC amidados con T3P e); NTC amidados con T3P en condiciones inertes y temperatura de 150 0C.....	55

## LISTA DE TABLAS

---

Tabla 1	Descriptores de reactividad global y local derivados de los métodos de funcionales de la densidad (DFT).....	13
Tabla 2	Características de las ligasas C-N empleadas en este estudio.....	23
Tabla 3	Descriptores de reactividad calculados en fase gas y fase acuosa. Los valores se presentan en eV, con excepción de S la cual está definida en m (eV)-1. ....	32
Tabla 4	Poder electrodonador y poder electroceptor, índice neto de Electrofilicidad. Los valores se presentan en eV. ....	33
Tabla 5	Hiperblandura local condensada de las carbodiimidias en fase gas y fase acuosa las unidades se presentan en milli (eV)-1.....	34
Tabla 6	Reacción general de la funcionalización de nanotubos de carbono utilizando carbodiimidias como activadores. ....	37
Tabla 7	Energía de las diferentes carbodiimidias así como las N-acilurea productos de la reacción. ....	37
Tabla 8	Estructuras optimizadas y energías de reactivos y productos en agua utilizando la CD4 como activador. ....	41
Tabla 9	Estructuras optimizadas y energías de reactivos y productos en THF utilizando la CD8 como activador. ....	42
Tabla 10	Estructuras optimizadas de reactivos y productos empleadas en la reacción de amidación por medio del agente activante T3P. Unidades Hartrees. ....	43
Tabla 11	Reactivos y productos independientes en la reacción.....	44
Tabla 12	Energías de enlace de péptido con diferentes enzimas de tipo ligasa C-N. ....	49
Tabla 13	Índices de calidad obtenidos por espectrometría Raman.....	53

## I. RESUMEN

La funcionalización de nanotubos de carbono (NTC) se basa en la modificación de la estructura ya sea por medio de interacciones covalentes y no covalentes incluyendo ocasionalmente el llenado de la cavidad de los NTC. Las reacciones de amidación en NTC han sido ampliamente usadas ya que ofrecen alta estabilidad al complejo formado. Sin embargo, estas reacciones no son favorecidas termodinámicamente por lo que es necesario el uso de activadores como las carbodiimidias. En este trabajo se propone el estudio de otras carbodiimidias existentes así como el uso de nuevos activadores como ligasas C-N ya que estas actúan como catalizadores naturales. Además se propone el uso del anhídrido propilfosfónico (T3P), el cual es utilizado en la síntesis de péptidos al igual que las carbodiimidias, sin embargo, el T3P presenta mayores ventajas en comparación con las carbodiimidias, al ser un reactivo verde ya que no es tóxico, no alergénico y no sensible, además el subproducto se obtiene en forma de sal y completamente soluble en agua. La propuesta de trabajo consiste en un estudio teórico, el cual se llevó a cabo empleando Gaussian 09 con un visualizador gráfico Gauss View 5.0. Se utilizó DFT con el funcional B3LYP y el conjunto de base 6-31G (d). Se obtuvieron energías de formación de las reacciones de amidación utilizando las diferentes carbodiimidias, T3P, NTC, arginina y un péptido (estructura conservada de Lectina). Por otra parte se usó el programa AutoDock para identificar los acoplamientos tanto del NTC como del péptido propuestos con diferentes enzimas de tipo ligasa C-N. La parte experimental se llevó a cabo después de obtener los resultados teóricos. Se realizó la síntesis y purificación NTC y los activadores empleados para las reacciones de amidación fueron: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)-(CD4) y *N, N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC)-(CD8) y el anhídrido propilfosfónico (T3P), además del uso de arginina como molécula de interés biológico. Los resultados teóricos encontrados muestran que las diferentes carbodiimidias son buenos candidatos como activadores para llevar a cabo la reacción de amidación, sin embargo, las reacciones de amidación donde se utiliza el activador T3P son reacciones no espontáneas, por lo que será necesario administrar energía. La enzima se adsorberá sobre la superficie del NTC, mientras que el péptido propuesto no tiene afinidad de unirse a las enzimas. Los resultados experimentales muestran que todas las reacciones de amidación se llevaron a cabo, sin embargo, para la reacción donde interviene el T3P como activador presenta el mayor porcentaje de nitrógeno, lo que la hace la reacción más eficiente.

## II. ABSTRACT

Functionalization of carbon nanotubes (NTC) is based on the modification of the structure either by means of covalent and non-covalent interactions, occasionally including filling of the cavity of the NTC. The NTC amidation reactions have been widely used since they offer high stability to the complex formed. However, these reactions are not favored thermodynamically, so the use of activators such as carbodiimides is necessary. In this work we propose the study of other existing carbodiimides as well as the use of new activators as C-N ligases as these act as natural catalysts. In addition, the use of propylphosphonic anhydride (T3P), which is used in the synthesis of peptides as well as carbodiimides, is proposed, however, T3P presents greater advantages compared to carbodiimides, being a green reagent since it is not toxic, non-allergenic and non-sensitive, in addition the by-product is obtained in the form of salt and completely soluble in water. The work proposal consists of a theoretical study, which was carried out using Gaussian 09 with a Gauss View 5.0 graphical viewer. We used DFT with the functional B3LYP and the base set 6-31G (d). Formation energies of the amidation reactions were obtained using the different carbodiimides, T3P, NTC, arginine and a peptide (Lectin conserved structure). On the other hand the AutoDock program was used to identify the couplings of both the proposed NTC and the peptide with different enzymes of the ligase type. The experimental part was carried out after obtaining the theoretical results. NTC synthesis and purification were performed and the activators used for the amidation reactions were: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) - (CD4) and N, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) - (CD8) and propylphosphonic anhydride (T3P), in addition to the use of arginine as a molecule of biological interest. The theoretical results found show that the different carbodiimides are good candidates as activators to carry out the amidation reaction, however, the amidation reactions where the T3P activator is used are non-spontaneous reactions, so it will be necessary to administer energy. The enzyme will adsorb on the surface of the NTC, whereas the proposed peptide has no affinity for binding to the enzymes. The experimental results show that all the amidation reactions were carried out, however, for the reaction where T3P as the activator has the highest percentage of nitrogen, which makes the reaction more efficient.

### III. INTRODUCCIÓN

Los nanotubos de carbono desde su descubrimiento han despertado un gran interés en la comunidad científica dadas las excepcionales características mecánicas, térmicas y eléctricas<sup>1</sup>, lo que los hace excelentes candidatos para una gran gama de aplicaciones. Sin embargo, los NTC prístinos no se disuelven en la mayoría de los solventes por lo cual es necesario recurrir a la funcionalización.

La funcionalización se basa en la modificación de la estructura ya sea por medio de interacciones covalentes y no covalentes, estas interacciones dependerán de las características de la molécula a unir al nanotubo. Se ha visto que existen moléculas que dada su naturaleza pueden interactuar ya sea por enlaces covalentes o no covalentes<sup>2</sup>.

Los NTC funcionalizados han sido utilizados para el diagnóstico y análisis tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>3</sup>, así como para el transporte de moléculas de interés biológico logrando destruir células cancerosas o infectadas por virus<sup>4</sup>, mejorando la eficacia<sup>5</sup> y la reducción de efectos secundarios de los fármacos anticancerígenos.

Son usados como antimicrobianos ya que estos logran atravesar la membrana bacteriana y causar citotoxicidad, se ha observado que el diámetro de los NTC es un factor importante para alcanzar este objetivo. Entre los organismos estudiados se encuentran la *E. coli*<sup>6</sup>, que a su vez ha sido probada en el desarrollo de filtros que contienen NTC para su inactivación, un filtro electroquímico con una combinación de NTC<sup>7</sup> y la incorporación de nanopartículas de plata y cobre sobre la superficie del NTC<sup>8</sup>. Asimismo otros organismos han sido estudiados ejemplo de esto es *Staphylococcus*<sup>9</sup> y *S. aureus*<sup>10</sup>.

La generación de nanovacunas a través de la entrega de vectores con el uso de NTC como la poliamidoamina ha logrado generar menor toxicidad en líneas celulares como COs-7 y HeLa, que si se administra cada uno por separado<sup>11</sup>. Se ha observado que la adaptación de las propiedades físicas en la administración de vacunas a base de NTC pueden aumentar la eficacia con la inducción de células T y generar una potente respuesta inmune contra enfermedades infecciosas o cáncer<sup>12</sup>.

La inmovilización de proteínas y enzimas para generar biosensores y detectar ciertos metabolitos, como la glucosa oxidasa<sup>13</sup> ha resultado de gran utilidad ya que los NTC presentan afinidad natural por estas a través de interacciones hidrofóbicas o electrostáticas<sup>14</sup>. Conjuntamente otros biosensores han sido desarrollados utilizando ADN<sup>15</sup>.

La funcionalización de NTC por enlace covalente puede ser llevada a cabo por diferentes tipos de reacciones como son cicloadición, ataque nucleofílico, ataque electrofílico, ozonolisis, entre otros. Para esta investigación se ha elegido las reacciones de amidación ya que es de interés el acarreo de moléculas biológicas, las cuales comúnmente contienen en su estructura grupos amino. El NTC al ser sometido a tratamiento de oxidación contiene en las puntas y paredes grupos carboxilos, por lo cual se reúnen las características necesarias para que la reacción pueda llevarse a cabo, sin embargo, se sabe que estas reacciones son procesos endergónicos y es necesario administrarles energía, es por ello que se recurre al uso de activadores que faciliten la reacción.

Dentro de los activadores usados se encuentran las carbodiimidas, estas moléculas han sido ampliamente usadas por la comunidad científica ya que se reporta un vasto número de publicaciones en las cuales emplean este activador para la funcionalización de NTC. Fueron introducidas en 1955 por Sheehan y Hess y se caracterizan por tener dos enlaces carbono nitrógeno. La función de las carbodiimidas es activar ácidos carboxílicos para formar especies reactivas como la O-acilsourea el cual es un intermediario de la reacción. Esto es debido a que el oxígeno está cargado negativamente y actúa como un nucleófilo, atacando el átomo de carbono central de la carbodiimida, uniéndose temporalmente al ion carboxilato y formando un éster, causando así un ataque nucleofílico más efectivo por el grupo amino. Las carbodiimidas tiene como ventaja el producir baja toxicidad porque no se encuentran incorporadas al producto final.

Aunque hay diversas carbodiimidas desarrolladas las más comunes son principalmente tres, la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) obtenida frecuentemente como su clorohidrato. La carbodiimida que se usa generalmente es la EDC. En estudios realizados donde interviene este activador se ha logrado realizar enlaces de tipo amida entre el NTC como diversas moléculas como streptavidin para terapia contra cáncer<sup>16</sup>, enzimas como la acetilcolinesterasa<sup>17</sup>, la cual también fue trabajada por Cabral et al. en 2013 utilizando la misma metodología de funcionalización<sup>18</sup>, la hidrolasa BphD<sup>19</sup>, solo por mencionar algunas así como el uso de aminoácidos como la arginina para la generación de un sensor<sup>20</sup> <sup>19</sup>. Sin embargo, se pueden generar reacciones laterales que son evitadas usando la *N*-Hidroxisuccinimida (NHS) y también para aumentar el rendimiento de la reacción. A pesar de que se evita comúnmente el uso de la DCC, debido a que es un sólido ceroso, un potente alergénico y es difícil eliminar trazas de este, existen varias publicaciones donde se utiliza dando buenos resultados en el proceso de funcionalización<sup>21</sup>.

Por otra parte, también se han desarrollado otros activadores como el T3P que es un anhídrido cíclico altamente reactivo que se utiliza para acoplamiento. Este reactivo ofrece grandes ventajas ya que es fácil de usar, presenta baja epimerización en las reacciones con un alto grado de pureza en los productos, además de altos rendimientos. Debido a sus propiedades no es necesario implementar reactivos como el HOAt o HOBt que es explosivo, para que se lleve a cabo la reacción. El T3P es un reactivo verde ya que no es tóxico, no alergénico y no sensible, además el subproducto se obtiene en forma de sal. No es peligroso y completamente soluble en agua. Estas sales son removidas rápidamente por lavados al término de la reacción. Este reactivo se encuentra disponible en una gran variedad de solventes como: acetato de etilo, acetato de butilo, THF, 2-MeTHF, tolueno, N,N-dimetilformidamide, clorobenceno, cloruro de metileno, acetonitrilo, etc.

El T3P ofrece mayores ventajas en comparación con las carbodiimidas que son difíciles de purificar con bajos rendimientos, y alta epimerización que es controlada con reactivos como el HOBt, además presentan una alta toxicidad, sin embargo frente al T3P presenta un menor costo de adquisición.

En un estudio realizado en 2012 por Madhu et al. donde se emplea T3P para la síntesis de péptidos se analizaron rendimientos empleando diferentes solventes tal como: DCM, EtOAc, THF y CH<sub>3</sub>CN. Los resultados que se obtuvieron mostraron que los mejores rendimientos se lograron utilizando CH<sub>3</sub>CN además de un menor tiempo de reacción en comparación con los demás solventes<sup>22</sup>. En otro estudio desarrollado por Sharnabai et al., para la síntesis de péptidos, con DBU y CH<sub>3</sub>CN el mejor rendimiento que se alcanzó fue de 97% en un tiempo menor de 30 minutos<sup>23</sup>. Sin embargo, en un estudio realizado en 2010 por Burnham<sup>24</sup> se encontró que al llevar a cabo la amidación entre una amina Behera y un ácido Z-caproico las carbodiimidas frente al T3P ofrece mayores rendimientos del orden de 92% contra rendimientos del 10-21% variando las condiciones de reacción. Al parecer no en todas las reacciones el uso de T3P ofrece los mejores rendimientos, por lo que se analizará la reacción con este reactivo para definir si es factible que se lleve a cabo la amidación entre un nanotubo de carbono, un péptido de Lectina (estructura conservada) y arginina. Hasta el momento no se ha encontrado algún reporte donde se lleve a cabo la funcionalización de nanotubos de carbono con este reactivo.

### 3.1 Justificación

Los NTC han sido funcionalizados a través de diversas enzimas por medio de enlaces covalente utilizando un catalizador para que se lleve a cabo la reacción, sin embargo, no es de nuestro conocimiento que existan reportes donde se utilicen estas como catalizadores en la funcionalización de NTC, es por ello que se propone su uso ya que funcionan disminuyendo la energía de activación de una reacción, de forma que se acelera sustancialmente la tasa de reacción. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la reacción, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más de prisa que la correspondiente reacción no catalizada. Al igual que con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas.

Es necesario encontrar mejores métodos de funcionalización de nanotubos de carbono mediante la introducción de nuevos reactivos capaces de llevar a cabo una interacción entre un nanotubo de carbono y moléculas con actividad biológicas. Los métodos de modelado molecular y química computacional proveen una importante aplicación para minimizar el uso de reactivos de forma experimental obteniendo una aproximación de las reacciones que pueden darse de forma espontánea, así como generar nuevos caminos para una funcionalización más eficiente.

### **3.3 Hipótesis**

La funcionalización de nanotubos de carbono con moléculas biológicas puede ser generada utilizando diferentes activadores para llevar a cabo reacciones de amidación.

### **3.4 Objetivo general**

Determinar mediante química computacional energías de reacción dando una aproximación de las reacciones que pueden darse de forma espontánea entre nanotubos de carbono con moléculas biológicas y validar la información obtenida desarrollando la parte experimental.

### **3.5 Objetivos particulares**

- ✓ Examinar de forma teórica propiedades de reactividad de diferentes carbodiimidas empleadas como activadores.
- ✓ Determinar energía de reacción teórica empleando diferentes carbodiimidas, el anhídrido propilfosfónico (T3P) y ligasas específicas para la funcionalización de nanotubos de carbono.
- ✓ Evaluar experimentalmente las reacciones de amidación tomando como base los datos teóricos.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Modelado molecular

Se basa en métodos teóricos y técnicas computacionales para describir a nivel atómico los sistemas moleculares que van desde átomos individuales hasta sistemas más complejos; modelando, imitando y prediciendo su comportamiento.

Los métodos de modelado molecular son usados para investigar estructura, dinámica y termodinámica de sistemas inorgánicos, biológicos y poliméricos. Utilizando un amplio rango de campos como: termodinámica, mecánica clásica, mecánica estadística, mecánica cuántica, física matemática y ciencia de materiales, ayudándose del uso de computadoras para construir las estructuras.<sup>25</sup>

### 4.2 Química computacional

La química computacional está orientada al desarrollo y entendimiento de la química, se vale de computadoras y programas específicos para resolver problemas químicos de manera teórica. Sus resultados normalmente complementan la información obtenida en experimentos químicos, sin embargo, ha sido también de gran utilidad para trabajar en la modelación de nuevas moléculas que hasta la fecha son totalmente desconocidas. También se pueden explorar mecanismo de reacción que no son fáciles de visualizar mediante experimentos, así como equiparar correspondencias entre estructuras químicas y propiedades, diseño de moléculas que interactúen de forma específica con otras moléculas, encontrar puntos de ensilladura sobre la superficie de energía potencial, etc. Se requiere conocer la estructura de las moléculas a analizar, además si se cuentan con datos experimentales como: distancia de enlace, ángulos, UV, IR, etc.<sup>26</sup>, se pueden obtener mejores aproximaciones. Entre las propiedades que se pueden calcular están la energía absoluta y relativa, dipolo eléctrico y momentos multipolares superiores, frecuencias vibratorias, reactividad u otras. Los métodos empleados son variados y el tiempo de cálculo dependerá del tamaño del sistema estudiado, es decir, a mayor número de átomos mayor tiempo de cálculo. Estos métodos se basan en teorías que van desde la alta precisión, apropiadas para sistemas pequeños, a las buenas aproximaciones apropiadas para sistemas más grandes<sup>27</sup>.

La principal ventaja de hacer un estudio teórico es que no se generan desechos, por lo cual no se hace uso indiscriminado de materias primas no renovables, así como empleo de material peligroso, ahorrándose millones de dólares en investigación y creación de nuevos productos, problemas que antes tardaban 10

años en resolverse se han reducido considerablemente en tiempo , es por ello que industrias como la farmacéutica, alimentos, polímeros, materiales entre otras cuentan con laboratorios de modelado molecular.

Los métodos empleados se crean a partir de la combinación de principios matemáticos con las leyes fundamentales de la física. Los métodos computacionales desarrollados abarcan dos áreas: Mecánica molecular y mecánica cuántica.

#### **4.2.1 Mecánica molecular**

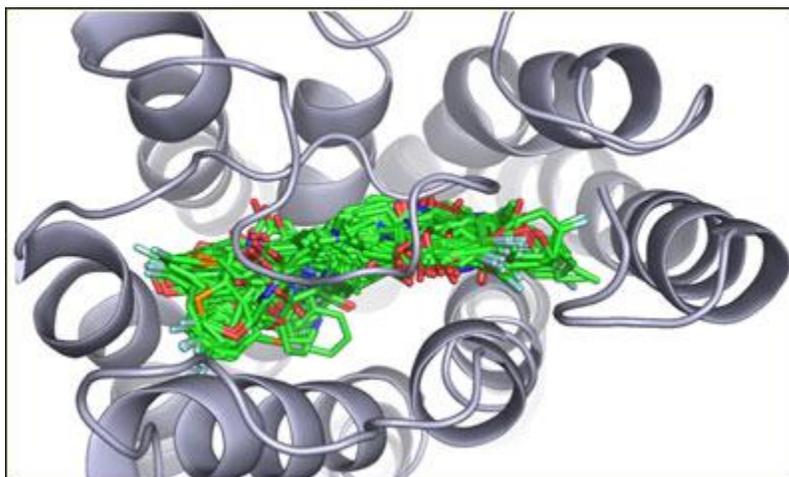
Tiene como base las leyes de la física clásica para predecir la estructura y propiedades de las moléculas, donde los átomos están unidos por enlaces que se pueden comparar con resortes<sup>26</sup>. Sin embargo, los métodos fundamentados en ella presentan la gran desventaja de no tratar el comportamiento electrónico<sup>28</sup> por lo cual estos métodos no son tan exactos como Hartree-Fock o DFT. Es usada para predecir geometrías en equilibrio y energías de sistemas de hasta 10,000 átomos.

##### **4.2.1.1 Acoplamiento molecular**

Es un método que predice si un ligando (molécula pequeña) podrá unirse a una macromolécula (generalmente proteínas) para formar un complejo estable (Figura 1), encontrando el mínimo global en la energía de interacción entre las moléculas explorando todos los grados de libertad disponibles (DOF) por sus siglas en inglés (degree of freedom) para el sistema, valiéndose de campos de fuerza. La información obtenida da como resultado la conformación más estable definiendo la afinidad de enlace entre las dos moléculas. El acoplamiento molecular puede ser visto como la optimización de un mecanismo, donde el ligando y la macromolécula ajustan su disposición para lograr la mejor y más estable conformación. Se basa en algoritmos que definen todas las conformaciones y orientaciones posibles que pueden haber en el conjunto macromolécula-ligando, tomando en cuenta o no la flexibilidad del ligando, así como de la macromolécula. Existen diferentes programas para realizar acoplamientos como Affinity, FlexX, Fred, Gold, Surflex, Glide, AutoDock, entre otros. Sin embargo, para esta investigación se utilizó el programa Autodock<sup>29</sup> por ser de libre acceso y se describe a continuación:

**AUTODOCK** combina dos métodos para lograrlo: evaluación rápida de energía basada en grid y una eficiente búsqueda de la libertad torsional. Generalmente se utiliza el algoritmo genético de Lamarck (método de búsqueda dirigida basado en probabilidad, dice que los cambios medioambientales a lo largo de toda la vida de los organismos causan cambios estructurales que son transmitidos a la descendencia) y la función de energía libre empírica.

Utiliza un campo de fuerza para evaluar conformaciones durante simulaciones de acoplamiento. El campo de fuerza se parametriza, mediante un gran número de complejos de proteína-inhibidor para el que tanto la estructura como constantes de inhibición o  $K_i$ , son conocidos. El proceso se evalúa en dos pasos, el ligando y la proteína se inician en una conformación no unida. En el primer paso, la energía intermolecular se estima para la transición desde estos estados no ligados a la conformación del ligando y proteína en el estado vinculado. El segundo paso, se evalúa la energía intermolecular al combinar el ligando y la proteína en su conformación unida. Se incluyen evaluaciones de dispersión/repulsión, puentes hidrogeno, electrostática y desolvatación.



**Figura 1** Ligando uniéndose a sitio de interés.

## 4.2.2 Mecánica cuántica

Dado que la mecánica clásica no puede describir de forma correcta la distribución y comportamiento de los electrones en las moléculas, se recurre a la mecánica cuántica en donde se busca resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema molecular, sin embargo, es imposible resolver de forma exacta esta ecuación para un sistema molecular y se deben buscar soluciones aproximadas. Se quiere comprender mejor la estructura y sus propiedades basado en la densidad electrónica. Para ellos se han desarrollado diferentes métodos como: semiempíricos, ab initio y teoría de los funcionales de la densidad (DFT)<sup>30</sup>.

### 4.2.2.1 Métodos de Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT)

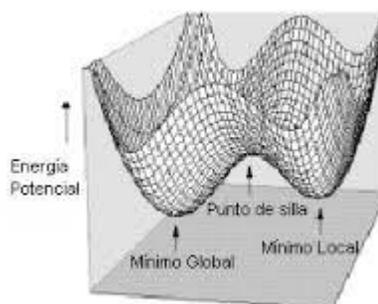
Las contribuciones de Pierre Hohenberg, Walter Khon y Lu Sham establecieron el formalismo teórico en el que se basa el método usado actualmente. Se aplican a sistemas electrónicos cuantificando la densidad electrónica total para definir la energía total. Es uno de los métodos más utilizados en los cálculos cuánticos de la estructura electrónica de la materia, tanto en la física de la materia condensada como en la química cuántica, por ello se pueden calcular sistemas complejos y representan una alternativa a la teoría de HF, o incluso para métodos post-HF más tradicionales. Ejemplos de estos son: Funcionales locales o de densidad local (LDA) como SVWN, funcionales de gradiente corregido (GGA) como LYP<sup>31</sup> y B-LYP, funcionales híbridos como B3P86, B3LYP<sup>32</sup> y PBE1PBE<sup>33</sup>., funcionales de intercambio meta-GGA como el M05 y M06L<sup>34</sup>, así como funcionales Hiper –GGA como M06 y M06-2X<sup>35</sup>

### 4.2.2.2 Conjunto base

Conjunto de funciones básicas que presentan matemáticamente la forma de los orbitales dentro de una molécula, y confinan a los electrones a una región específica del espacio, a partir de los cuales se calcula la energía de una molécula empleando la función de onda. Existen funciones de base que son empleadas para representar los orbitales: orbitales tipo Slater (STO)<sup>36</sup>, orbitales de tipo Gaussianos (GTO)<sup>37-38</sup> y orbitales de tipo Gaussianos con funciones contraídas

(CGTO). También existen bases extendidas denominadas polarizadas que introducen funciones representativas de orbitales que no se encuentran ocupados en el estado fundamental del átomo, y las difusas que incrementan grandemente el tamaño de orbitales S y P, estas son útiles para sistemas de electrones muy alejados del núcleo, electrones solos, aniones, estados excitados y para bajos potenciales de ionización<sup>39-40</sup>.

### 4.2.3 Optimización



**Figura 2** Superficie de energía potencial.

La optimización de geometría se basa en algoritmos que calculan el gradiente de energía, cuando se consiguen mínimos de energía en la superficie de energía potencial (gradiente de energía igual a cero) el cálculo converge, y se obtiene un estructura en equilibrio de un sistema molecular (Figura 2).

### 4.2.4 Frecuencia

La frecuencia considera el hecho de que los núcleos se mueven constantemente, por lo que se generan vibraciones que se pueden traducir en espectros característicos como son: IR y Raman. Considera la segunda derivada de la energía con respecto a las coordenadas de la estructura optimizada.

### 4.2.5 Propiedades de reactividad

Los conceptos de reactividad química teórica se han desarrollado bajo el marco conceptual de DFT, basados en la densidad electrónica de los sistemas. La reactividad química es determinada por la estructura de la molécula definiendo la

forma como los átomos se enlazan mutuamente. Existen diferentes propiedades que podemos determinar por medio de cálculos de energía. En la Tabla 1 se presenta un resumen de los mismos.

**Tabla 1** Descriptores de reactividad global y local derivados de los métodos de funcionales de la densidad (DFT).

Definición	Ecuación	Descripción	Referencia
<b>Potencial de ionización</b> Mide la energía requerida para remover un electrón del átomo	$I = E(N - 1) - E(N)$	Donde E(N-1) es la energía en el estado catiónico y E(N) es la energía en el estado neutro	Lewars,2003 <sup>26</sup>
<b>Afinidad electrónica</b> Mide la energía liberada cuando un átomo en su estado neutro (menor energía) capta un electrón y forma un anión	$A = E(N) - E(N + 1)$	Donde E(N) es la energía en estado neutro y E(N+1) es la energía en el estado aniónico	Lewars,2003 <sup>26</sup>
<b>Potencial químico</b> Mide la tendencia del electrón a escapar del sistema en equilibrio	$\mu = -\chi = \frac{(I + A)}{2}$	$\chi$ es la electronegatividad. Se define por la suma de potencial de ionización y afinidad electrónica dividido entre dos	Parr <i>et al.</i> ,1978 <sup>41</sup>
<b>Dureza química</b> Mide la Resistencia de una molécula a la transferencia de carga intramolecular	$\eta = I - A$	Diferencia del potencial de ionización y afinidad electrónica	Parr & Perason,1983 <sup>42</sup> <sup>43</sup>
<b>Blandura</b> Mide que tan propenso es un sistema a reaccionar	$S = \frac{1}{\eta}$	Es el recíproco de la dureza	Parr & Yang, 1989 <sup>44</sup> Chatarraj <i>et al.</i> 2004 <sup>45</sup>
<b>Índice de electrofilicidad</b> Mide la energía de estabilización cuando un sistema obtiene una transferencia de carga adicional (saturación con electrones) del medio externo	$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \approx \frac{(I + A)^2}{8(I - A)}$	Está definido en términos del cuadrado del potencial químico entre la dureza química	Parr <i>et al.</i> , 1999 <sup>46</sup>

<p><b>Poder electrodonador</b> Mide la capacidad de un sistema químico a donar una pequeña cantidad de carga</p>	$\omega^- = \frac{(3I + A)^2}{16(I - A)}$	<p>Está definido en términos del potencial de ionización y afinidad electrónica</p>	<p>Gazquez <i>et al.</i>, 2007<sup>47</sup> Gazquez, 2008<sup>48</sup>.</p>
<p><b>Poder electroceptor</b> Mide la capacidad de un sistema químico a aceptar una pequeña cantidad de carga</p>	$\omega^+ = \frac{(I + 3A)^2}{16(I - A)}$	<p>Está definido en términos del potencial de ionización y afinidad electrónica</p>	<p>Gazquez <i>et al.</i>, 2007<sup>47</sup> Gazquez, 2008<sup>48</sup></p>
<p><b>Electrofilicidad neta</b> Mide la electrofilicidad relativa</p>	$\Delta\omega^\pm = \omega^+ + \omega^-$	<p>Suma del poder electrodonador y poder electroceptor</p>	<p>Chatarraj 2009<sup>49</sup></p>
<p><b>Funciones condensadas de Fukui</b> Estas funciones miden el cambio de potencial químico de un sistema debido al cambio en el número de electrones en la molécula y por lo tanto determina la reactividad de cada átomo en la molécula</p>	<p><b>Ataque nucleofílico</b></p> $f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r)$ <p><b>Ataque electrofílico</b></p> $f^-(r) = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r)$ <p><b>Ataque por radical</b></p> $f^0(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_{N-1}(r)$	<p><math>\rho</math> densidad electrónica N es el número de electrones en el punto <math>r</math></p>	<p>Parr Yang, 1984<sup>50</sup> Parr Yang, 1989<sup>44</sup></p>
<p><b>Descriptor Dual descriptor</b> Función de Fukui de Segundo orden que define simultáneamente las regiones nucleofílicas y electrofílicas en la molécula</p>	$f_k^{(2)}(r) = f^+(r) - f^-(r)$	<p>Está definida por la diferencia entre las funciones de Fukui del ataque nucleofílico y electrofílico</p>	<p>Morell <i>et al.</i> 51-52</p>
<p><b>Hiperblandura local</b> Reactividad de sitios locales</p>	$S_k^{(2)}(r) = f_k^{(2)}(r) * S^2$	<p>Descriptor Dual multiplicado por el cuadrado de la blandura</p>	<p>Geerlings <i>et al.</i>, 2003<sup>30</sup></p>

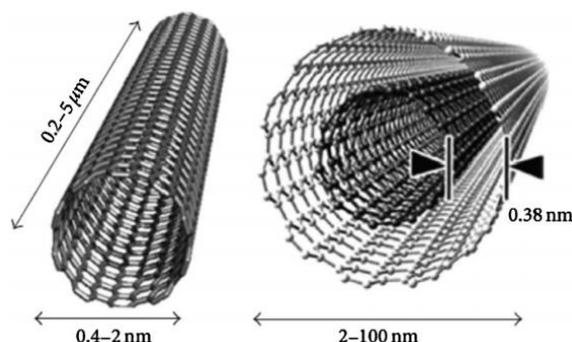
## 4.2.6 Energía de reacción

En toda reacción química se absorbe o desprende energía, en reacciones exotérmicas los enlaces que se rompen tiene mayor energía que los enlaces que se forman y se caracterizan por presentar signos negativos, por el contrario en las reacciones endotérmicas o endergónicas la energía de los enlaces que se forman es mayor que los que se rompen caracterizándose por presentar signo positivo por lo cual es necesario administrarles energía para que puedan llevarse a cabo. De forma teórica esta energía se reacción se calcula a partir de la diferencia de energías de formación de los reactivos y productos.

## 4.3 Nanotubos de carbono

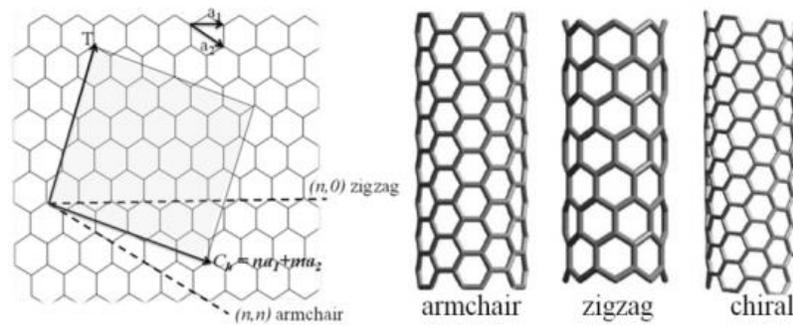
### 4.3.1 Generalidades

Los NTC son pertenecientes a la familia alotrópica del carbono, los otros miembros son el grafito, diamante, fullerenos y grafeno. Los NTC consisten exclusivamente de átomos de carbono, estos átomos de carbono se encuentran unidos entre sí formando una serie de anillos de benceno con hibridación  $sp^2$  formando tubos moleculares de tamaño nanométrico, es decir, millonésimas de milímetro y con longitudes de varios micrómetros. Basado en el número de capas los NTC están clasificados en dos tipos: como nanotubos de pared simple (SWCNT)<sup>53</sup> por tener una mono capa de grafito (grafeno) y de pared múltiple (MWCNT)<sup>54</sup> por contar con dos o más capas (Figura 3). Generalmente se encuentran rematados en sus extremos por semiesferas de fullerenos.



**Figura 3** NTC de pared simple y de pared múltiple.<sup>55</sup>

Dependiendo de la relación angular entre el eje del tubo y los vectores unitarios de la red cristalina. La forma se define de acuerdo a los índices de Hamada, se obtienen dos componentes ( $n, m$ ) y la relación entre  $n$  y  $m$  indica la quiralidad del NTC (Figura 4). Cuanto mayor sean  $n$  y  $m$  más grande serán los diámetros de los NTC. A partir de la síntesis se pueden obtener tubos de tipo zigzag ( $n, 0$ ), silla ( $n, n$ ) y quiral ( $n, m$ )<sup>56</sup>.



**Figura 4** NTC con diferente quiralidad.<sup>57</sup>

#### 4.3.2 Síntesis de nanotubos de carbono

Los métodos de síntesis tradicionales; descarga por arco eléctrico<sup>58</sup>, Ablación laser<sup>59</sup> y deposición química en fase vapor<sup>60</sup> se han enfrentado a la problemática de obtener una mezcla de NTC con diferentes longitudes, muchos defectos en la estructura y variedad de torsiones. Se ha estado en continua investigación para el desarrollo de nuevos métodos de síntesis y modificación de los ya existentes que permitan obtener NTC con mejores características, obteniendo a su vez un menor contenido de impurezas como son restos de catalizador y carbón amorfo. Los métodos de síntesis requieren una fuente de carbono, catalizador y la energía necesaria para liberar a los átomos para que posteriormente se recombinen. En un estudio realizado por Bhatia & Prasad en 2010<sup>61</sup> se llevó a cabo la síntesis de NTC utilizando solo ferroceno como fuente de carbono y catalizador. Incluso se han hecho esfuerzos por sintetizar NTC en ausencia de catalizadores metálicos.<sup>62</sup> Se ha observado que la síntesis de NTC se ve favorecida usando concentraciones bajas de carbono.<sup>63</sup>

Por otra parte, para llevar a cabo la síntesis catalítica se han apoyado en el uso de sustratos como silica alúmina y sobre zeolitas. Otro método desarrollado es el llamado HiPCO, que consiste en la descomposición de monóxido de carbono en altas presiones y altas temperaturas. Se han desarrollado variantes de los

métodos ya existentes como por ejemplo el método de síntesis de flama el cual es una modificación del método tradicional CVD, donde se utiliza combustibles como fuente de carbono en forma de aerosol.<sup>64</sup>

### 4.3.3 Purificación de nanotubos de carbono

Los NTC al ser sintetizados contienen restos de catalizador y carbón amorfo sobre su superficie, estas partículas indeseables pueden ser eliminada siguiendo diferentes estrategias que a veces conlleva el uso de más de un paso<sup>65 66 67 68 69 70 71 72</sup>. Existen numerosas investigaciones que abordan el tema de la purificación de NTC antes de la funcionalización, empleando diferentes métodos como son: oxidación, centrifugación, tratamiento térmico entre otros.<sup>73 74 75 76 77 78 21 79 80-81</sup>

### 4.4.4 Funcionalización de nanotubos de carbono

La funcionalización de NTC se define como la unión de diferentes especies químicas a la superficie y extremos del NTC, ya sea por una funcionalización de tipo no covalente o covalente la cual modifica las propiedades intrínsecas del NTC, además, incluyendo ocasionalmente el llenado de la cavidad del NTC como otra vía de funcionalización.<sup>82</sup> Sin embargo, existen moléculas que por sus características estructurales pueden ser usadas tanto en un enlace no covalente como en un enlace covalente, ejemplo de ellos son el antraceno<sup>83</sup>, aminas, ADN, proteínas<sup>2</sup>, etc. La funcionalización modifica tanto las propiedades del NTC como las de la molécula adosada.

#### 4.4.4.1 Funcionalización no covalente

La funcionalización no covalente presenta una baja estabilidad química, sin embargo, ofrece la ventaja de ser un método no destructivo que permite conservar intactas las propiedades del NTC. Las moléculas se adsorben sobre la superficie por interacciones de tipo Van der Waals, puentes de hidrogeno, interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  o hidrofóbicas<sup>84-85 85 86 87 88</sup>. El ADN por su estructura helicoidal puede envolverse alrededor del NTC<sup>89 90 91</sup>. El uso de proteínas adsorbidas sobre la

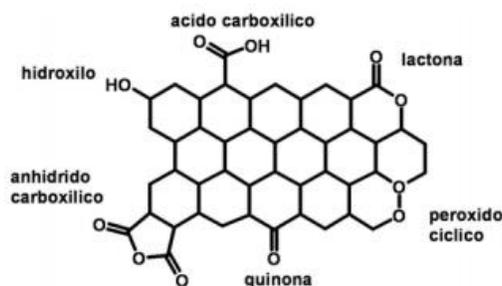
superficie ha sido abordado por diferentes investigadores usando una gran variedad de proteínas con diferentes estructuras y tamaños.

#### 4.4.4.2 Funcionalización covalente

La funcionalización covalente ofrece alta estabilidad química en comparación con la anterior, esta modificación puede llevarse a cabo de forma directa sobre la estructura o generando defectos sobre la superficie del NTC, lo que conlleva la modificación en las propiedades del mismo. A pesar de la modificación de las propiedades los defectos generados han sido aprovechados para adosar grupos químicos que son susceptibles de reaccionar por posteriores reacciones químicas. Entre las moléculas adosadas se encuentran aminoácidos<sup>20 19</sup>, péptidos<sup>16</sup>, proteínas<sup>2</sup>, ácido fólico<sup>92</sup>, aminas<sup>93 94</sup> y amidas<sup>95</sup>, ADN<sup>15</sup>, carbohidratos, entre otras.

En la modificación directa se describe el uso de sales de diazonio para la introducción de disulfuro de difenilo en el NTC<sup>96</sup> y aminas.<sup>97</sup> Halogenación como la fluorinación<sup>98 99 100 101 102 103</sup> entre otras, además de la cicloadición<sup>104 105 106 77</sup>. Otros métodos alternativos para la funcionalización son plasma<sup>107</sup> o microondas<sup>108</sup> reduciendo las barreras energéticas al modificar las energías de configuración permitiendo reducir los tiempos de reacción. Trabajando las reacciones en fase gas dejando de lado el uso de solventes orgánicos<sup>109</sup>, ni agentes químicos intermedios.

En la funcionalización por medio de defectos se describe el rompimiento de enlaces C-C de la superficie de los NTC dando paso a la generación de diferentes grupos como se describe en la Figura 5, esto debido al uso de tratamientos ácidos descrito en la sección anterior.



**Figura 5** Grupos funcionales de oxígeno generados en el NTC por tratamiento ácido.

Dentro de los grupos funcionales de oxígeno generados en las puntas y superficie del NTC destaca el uso del grupo carboxilo (-COOH) el cual puede ser convertido en amida (-CO-NH), éster (-CO-OCH) o tiol (-CH-SH), esto se lleva a cabo por medio de activadores. Al mismo tiempo, se propone el uso de otros potenciales activadores que podrían funcionar para este fin dadas sus características.

En este trabajo se aborda el uso de nuevos reactivos que puedan generar la unión entre el NTC de carbono y moléculas de interés biológico. Se sabe de forma general que las enzimas son catalizadores naturales de diversas reacciones disminuyendo la energía de activación de una reacción, de forma que se acelera sustancialmente la tasa de reacción acelerando el proceso incluso millones de veces, alcanzando el equilibrio mucho más rápido que en una reacción no catalizada. Las ligasas también llamadas sintetasas o carboxilasas, son enzimas capaces de llevar a cabo la catálisis que no es termodinámicamente posible. También se sugiere el uso de otro catalizador Anhídrido propilfosfonico (T3P), el cual es altamente reactivo que se utiliza para diversos acoplamientos, es considerado un reactivo verde. Ya que al igual que las carbodiimidias se usa como activador se propone el uso de este para la funcionalización de NTC ya que no se ha encontrado referencia hasta el momento que este haya sido utilizado para este fin.

#### **4.4.5 Caracterización de nanotubos de carbono**

La caracterización ha sido parte fundamental en el estudio de NTC, es por ello que diferentes técnicas han sido utilizadas para este fin. De las técnicas empleadas destacan UV-visible, infrarrojo, Raman, TGA, TEM, SEM, XPS y RMN, las cuales resultan de gran utilidad para medir diferentes propiedades.

La espectroscopia Raman provee mucha información general, así como información sobre las imperfecciones en la muestra denominados defectos<sup>62 73 77 80</sup>, los cuales son parte de interés de este estudio. Otra técnica para el análisis y caracterización de NTC es la microscopia electrónica de barrido (MEB), esta es utilizada para analizar tanto la morfología como la composición en NTC<sup>110</sup>. Una vez que los NTC han sido funcionalizados con grupos de oxígeno la técnica de titulación de Bohem<sup>111</sup>. Cuando estos grupos son convertidos en otros grupos (amidas, éster, etc.) por posteriores reacciones, técnicas como XPS<sup>112</sup> resultan de gran importancia ya que esta técnica es la única que podrá definir si se logró obtener funcionalizaciones de tipo covalente o iónica.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Caracterización computacional

#### 5.1.1 Equipo

La caracterización computacional se llevó a cabo en el laboratorio de NANOCOSMOS, empleando diferentes equipos con las siguientes características:

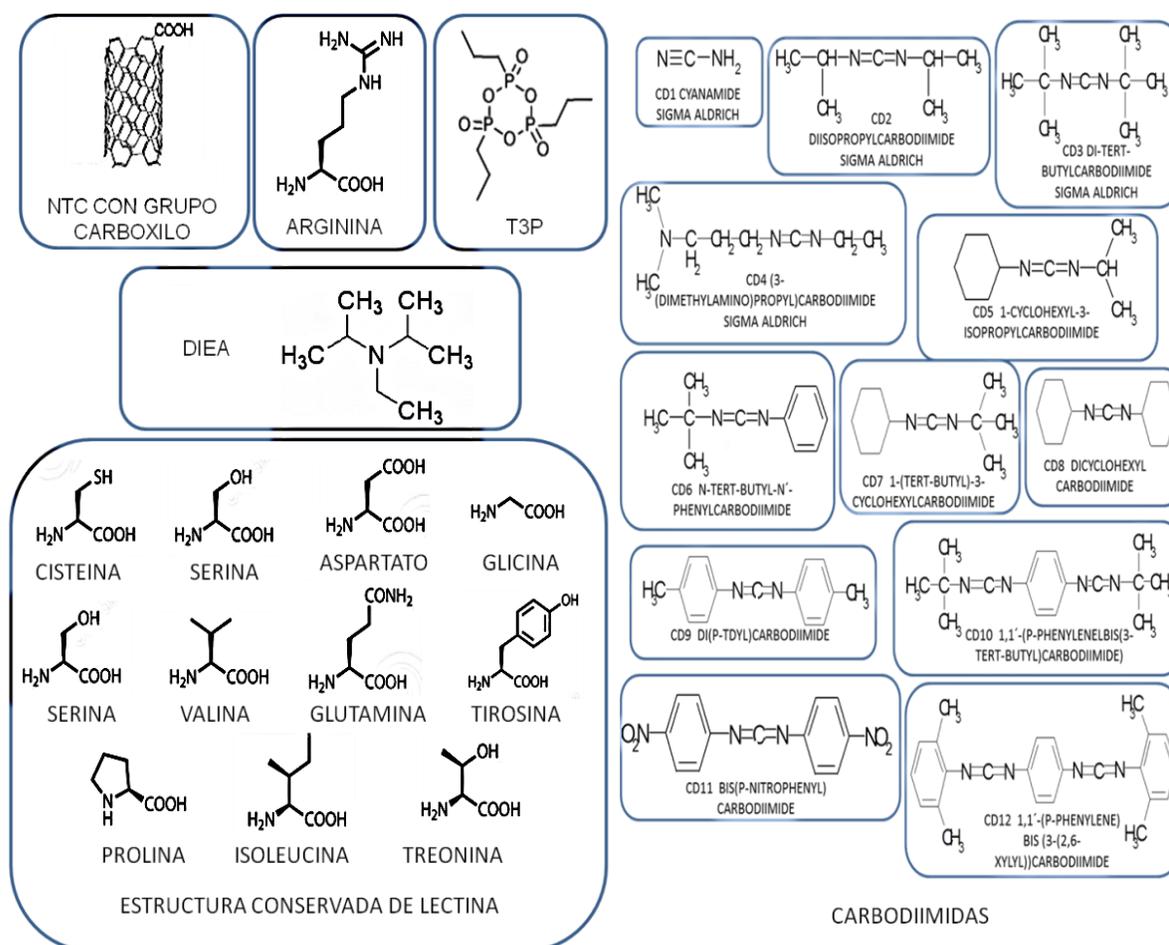
- ✓ DELL Precision Intel® Xeon® 2 CPU E5345 @ 2.33 GHz 4 G RAM 64 bits
- ✓ Samsung Intel® Core™ i7-3537U CPU @ 2 GHz 8 GB RAM 64 bits
- ✓ Cluster PROMETEO con dos cuentas : 48 G memoria 16 procesadores y 46 G memoria 16 procesadores

#### 5.1.2 Programas

- ✓ Materials Studio 5.0
- ✓ Gaussian 09W
- ✓ Gauss View 5.0
- ✓ Autodock 4.2
- ✓ ADT ( AutoDock tools)

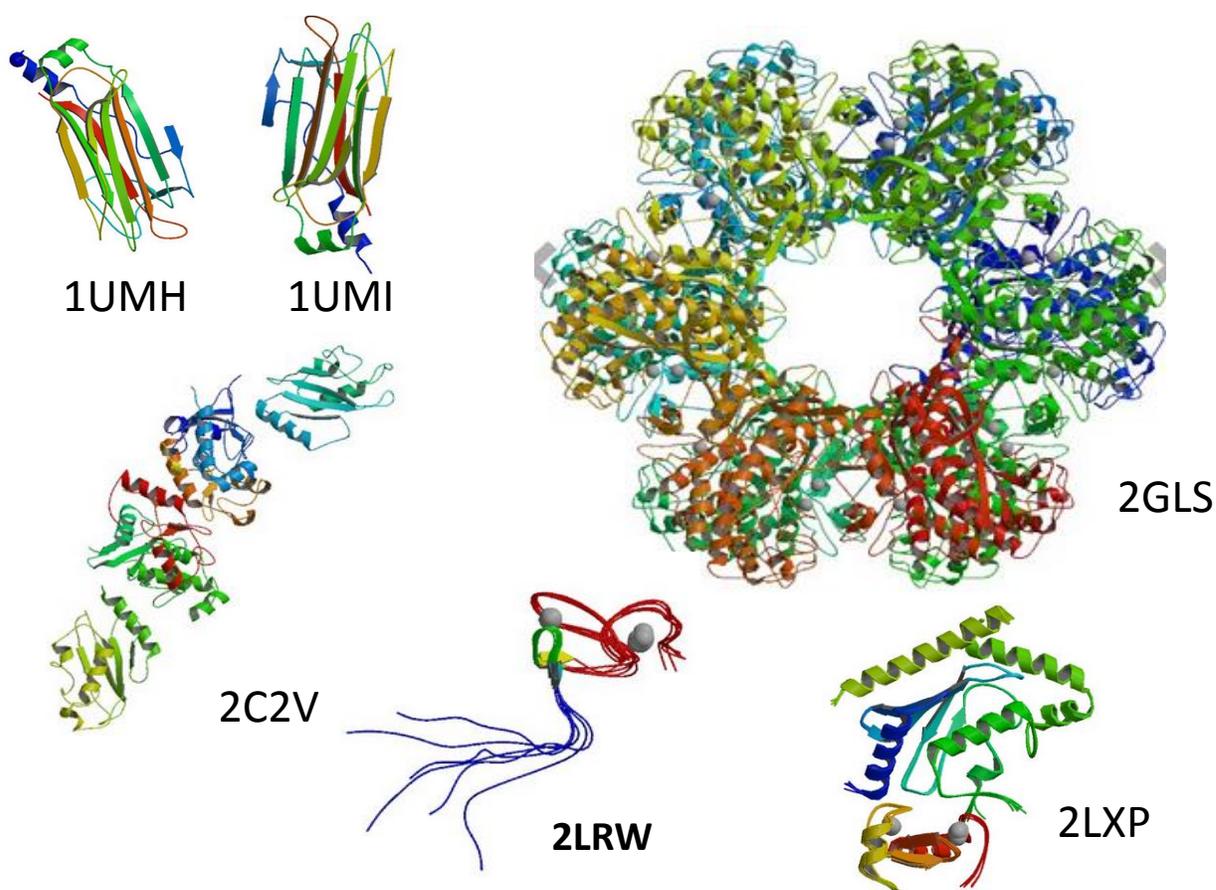
### 5.1.3 Moléculas analizadas

Para llevar a cabo el estudio teórico de la funcionalización de NTC con moléculas biológicas se utilizaron: un NTC de tipo silla con índices de Hamada (6,6) y dos unidades repetitivas. Un péptido de estructura conservada de Lectina y arginina, así como 12 diferentes carbodiimidas utilizadas como activadores de los grupos carboxilo; las más utilizadas son la CD2, CD4 y CD8. Además, se consideraron las moléculas de T3P (activador) y DIEA (base necesaria para desprotonar tanto el ácido carboxílico como el grupo amino de las moléculas biológicas) necesarias para el nuevo procedimiento de amidación. Las moléculas en 2D se muestran en la Figura 6.



**Figura 6** Estructuras 2D de diferentes moléculas utilizadas en este estudio.

Por otra parte se analizaron diferentes ligasas de C-N procedentes de la base de datos Protein Data Bank (PDB) obtenidas a partir de estudios de rayos x y resonancia magnética nuclear. En la Figura 5 se muestran solo algunas de las estructuras en 3D y en la Tabla 2 se muestran las características de todas las ligasas empleadas en este estudio.



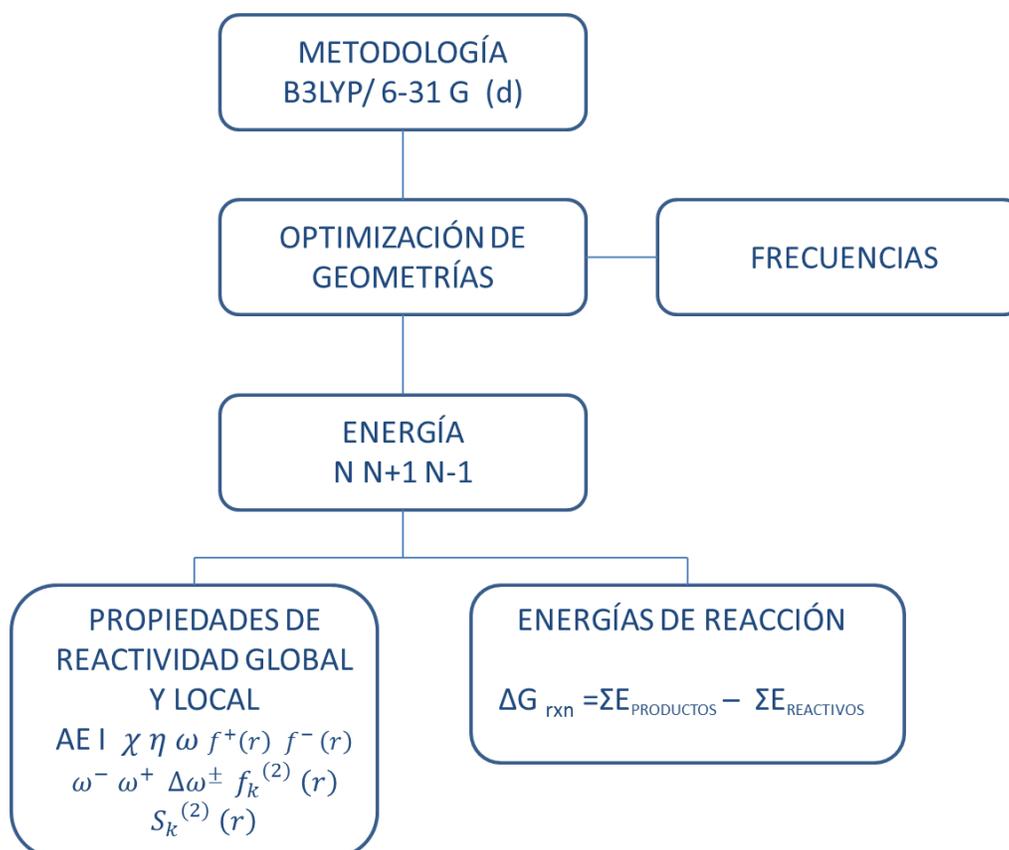
**Figura 7** Estructuras 2D de ligasas C-N extraídas del Protein Data Bank.

**Tabla 2** Características de las ligasas C-N empleadas en este estudio.

PDB ID	METODO	RESOLUCIÓN	ORGANISMO	CLASIFICACIÓN
1UMH	D. RAYOS X	2.0 Å <sup>0</sup>	MUS MUSCULUS	LIGASA
1UMI	D. RAYOS X	2.4 Å <sup>0</sup>	MUS MUSCULUS	LIGASA
2C2V	D. RAYOS X	2.9 Å <sup>0</sup>	HOMO SAPIENS / MUS MUSCULUS	LIGASA
2GLS	D. RAYOS X	3.5 Å <sup>0</sup>	SALMONELLA ENTERICA	LIGASA
2LWR	NMR	---	DROSOPHILA MELANOGASTER	LIGASA
2LXP	NMR	---	HOMO SAPIENS	LIGASA
2M48	NMR	---	DROSOPHILA MELANOGASTER	LIGASA
2OXQ	D. RAYOS X	2.9 Å <sup>0</sup>	DANIO RERIO	LIGASA
2RJ2	D. RAYOS X	1.7 Å <sup>0</sup>	MUS MUSCULUS	LIGASA
3FSH	D. RAYOS X	2.76 Å <sup>0</sup>	HOMO SAPIENS / MUS MUSCULUS	LIGASA
3RKY	D. RAYOS X	3.23 Å <sup>0</sup>	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	LIGASA
3ZNI	D. RAYOS X	2.21 Å <sup>0</sup>	HOMO SAPIENS	LIGASA
4B8E	D. RAYOS X	1.78 Å <sup>0</sup>	MUS MUSCULUS	LIGASA
4BVU	D. RAYOS X	2.7 Å <sup>0</sup>	SHILLEGA FLEXNERI / HOMO SAPIENS	LIGASA
4BWF	D. RAYOS X	3.23 Å <sup>0</sup>	SACCHAROMYCES CEREVIESAE	LIGASA
4CCG	D. RAYOS X	2.4 Å <sup>0</sup>	HOMO SAPIENS	LIGASA
4FH1	D. RAYOS X	2.61 Å <sup>0</sup>	SACCHAROMYCES CEREVIESAE	LIGASA
4II2	D. RAYOS X	2.2 Å <sup>0</sup>	SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE	LIGASA
4II3	D. RAYOS X	2.2 Å <sup>0</sup>	SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE	LIGASA
4IP3	D. RAYOS X	2.3 Å <sup>0</sup>	SHILLEGA FLEXNERI / HOMO SAPIENS	LIGASA
4JQU	D. RAYOS X	1.81 Å <sup>0</sup>	SACCHAROMYCES CEREVIESAE	LIGASA
4K7U	D. RAYOS X	1.71 Å <sup>0</sup>	HOMO SAPIENS	LIGASA
4K7W	D. RAYOS X	1.76 Å <sup>0</sup>	HOMO SAPIENS	LIGASA
4LAD	D. RAYOS X	2.3 Å <sup>0</sup>	HOMO SAPIENS	LIGASA
4ORH	D. RAYOS X	4.8 Å <sup>0</sup>	HOMO SAPIENS	LIGASA

### 5.1.4 Cálculos computacionales

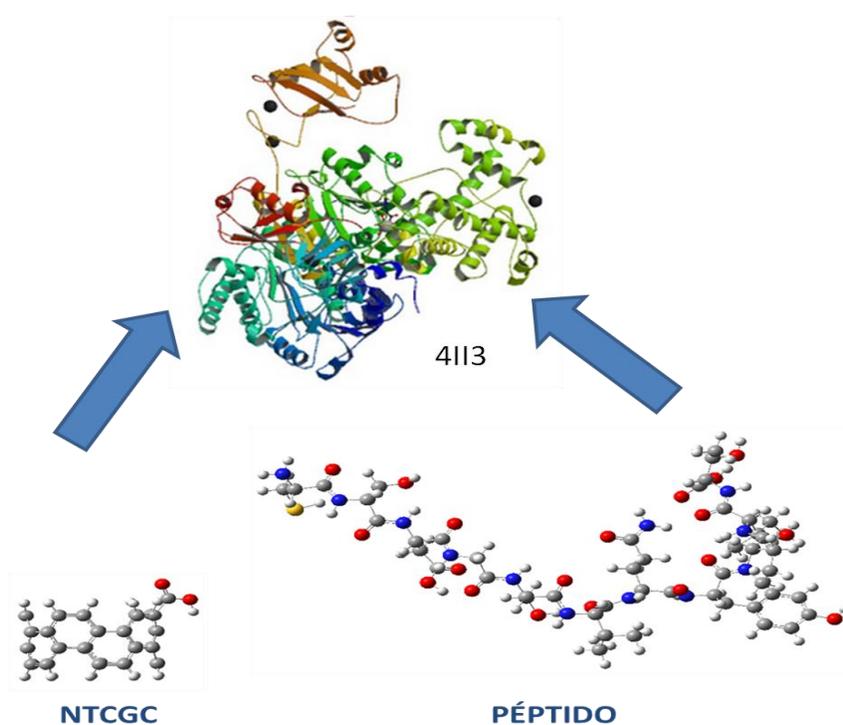
Se recurrió a Materials Studio 5.0 para construir el NTC tipo silla con índices de Hamada de (6,6) utilizando dos unidades repetitivas. Posteriormente se analizó en el programa Gaussian 09W siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 8. La metodología empleada se basó en DFT seleccionando al funcional B3LYP y el conjunto base 6-31 G (d) tanto en fase gas y fase acuosa con el método de solvatación IEFPCM. Los cálculos realizados son: optimización de geometría, cálculo de frecuencias, cálculo de energía para todas las moléculas para la obtención de energías de reacción. Cálculos de las especies neutras, aniónicas y catiónicas de las diferentes carbodiimidadas para obtener propiedades de reactividad química global y local. Las energías de reacción se calculan a partir de las energías de formación de los productos y reactivos.



**Figura 8** Metodología empleada para el NTC, Carbodiimidadas, moléculas biológicas, T3P, DIEA y todos los productos resultantes de las reacciones.

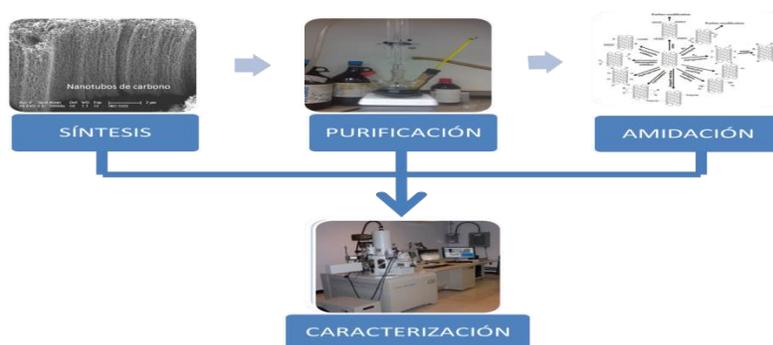
### 5.1.5 Acoplamiento molecular

Los acoplamientos moleculares (Figura 9) se llevaron a cabo en el programa Autodock 4.2 con un visualizador gráfico ADT. Las ligasas C-N se obtienen en su estructura tridimensional, por lo cual no es necesaria su optimización, tanto el NTC como el péptido fueron optimizados para ser utilizados en el acoplamiento. La estrategia se basa en definir a la proteína de forma rígida y los ligandos como moléculas rígidas o flexibles, definiendo una caja con coordenadas características para realizar el grid, cuando no se conoce específicamente el sitio activo se realiza un acoplamiento ciego. Se elige generalmente el algoritmo de Lamarckian optando por los diferentes evaluación de la energía máximo, medio o bajo. Después del acoplamiento se generan las mejores posiciones siendo la primera la de energía más negativa y por lo tanto la posición más estable. Se pueden analizar los aminoácidos de la macromolécula que interactúan con el ligando, para definir qué tipo de interacción se da entre ellas.



**Figura 9** Acoplamiento del NTC y péptido con las ligasas C-N.

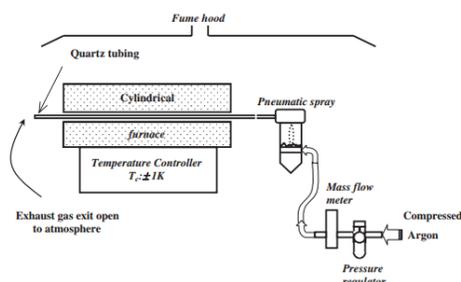
## 5.2 Desarrollo experimental



**Figura 10** Esquema general de la parte experimental en este estudio.

En base a los datos teóricos obtenidos se procedió a realizar la parte experimental, la cual contempla el uso de las carbodiimidas 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y *N, N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), así como el uso del anhídrido propilfosfonico (T3P) como activadores. La funcionalización de NTC conlleva una serie de pasos (Figura 10) que va desde la síntesis por el método de spray pirolisis, como la purificación por tratamiento ácido, y las reacciones de amidación valiéndose de los diferentes activadores que de acuerdo al estudio teórico pueden ser usadas de forma experimental. La caracterización se realizó utilizando diferentes técnicas para el análisis como el método de titulación de Bohem, SEM, Raman y XPS. Por medio de SEM se hicieron análisis de morfología por electrones secundarios (alta resolución) y mapeo elemental (EDS) de los NTC prístinos y los NTC purificados. Además, tanto los NTC prístinos y purificados se analizaron por medio de Raman. Se utilizó la titulación de Bohem para determinar el porcentaje de grupos carboxilo en los NTC. Se realizó la caracterización por medio de XPS en usando un análisis simple de XPS, para la cual se evaluaron NTC prístinos, purificados y funcionalizados por medio de los diferentes activadores. A continuación se describe de forma más detallada la metodología.

## 5.2.1 Síntesis de NTC



**Figura 11** Síntesis de NTC por el método de spray pirolisis.

La síntesis de NTC (Figura 11) se realizó de acuerdo con Aguilar- Elguézabal et al.<sup>114</sup>, para ello se preparó una solución de 0.25 g de ferroceno y 25 mL de tolueno, esta solución se inyectó a un flujo de 2 mL/min, a su vez se suministró argón como gas de arrastre a 360 mL/min, este se hizo pasar a través de un termopar que se encuentra a una temperatura de 180 °C. Tanto la solución como el argón son guiados hacia un tubo de cuarzo que será el sustrato donde se forman los NTC, este se encuentra dentro de un horno tubular a 800 °C. Al finalizar el tiempo de síntesis se apagó el termopar y el horno para permitir que el tubo de cuarzo se enfríe y pueda ser retirado del soporte para extraer los NTC.

## 5.2.2 Purificación de NTC

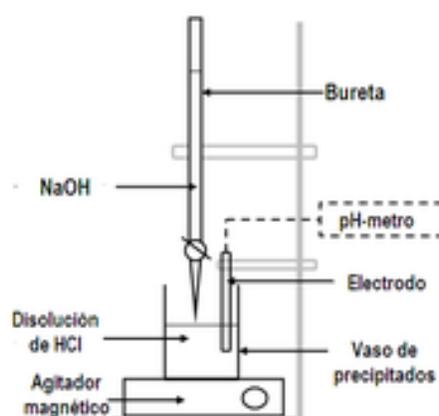


**Figura 12** Purificación de NTC por tratamiento ácido y calentamiento.

La purificación de NTC (Figura 12) se llevó a cabo de acuerdo a Chen et al.<sup>116</sup>, en la cual se utiliza una solución ácida de HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3:1, a esta solución se le agregaron NTC y se mezclaron para homogenizar, la mezcla se calentó en un

rango de temperatura de 90-100 °C, el tiempo de reacción fue de 100 minutos. Una vez terminado el tiempo de purificación la mezcla se dejó enfriar y se procedió a diluir con agua destilada para posteriormente filtrar, los NTC filtrados se siguieron lavando con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro, se dejaron secar a temperatura ambiente y se retiraron del filtro.

### 5.2.3 Titulación de Bohem



**Figura 13** Titulación de Bohem para los NTC purificados.

El procedimiento de titulación se realiza de acuerdo a Hu et al.<sup>117</sup>, para ello se tomaron 0.0892 g de NTC purificados, estos fueron movidos por agitación magnética en una solución de  $\text{NaHCO}_3$  0.01 M bajo un atmosfera inerte de argón por 48 horas. Después la mezcla fue filtrada, los NTC que quedaron en el filtro fueron lavados con agua destilada para remover cualquier residuo de  $\text{NaHCO}_3$ . La combinación del filtrado y lavado fue adicionada a una solución de 50 ml de 0.01 M de HCl, fue calentada por 20 minutos para degasificar el  $\text{CO}_2$  presente. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente, el exceso de HCl en la solución fue titulado con NaOH 0.01M, este fue monitoreado con un pH metro hasta alcanzar un pH neutro (Figura 13). También se realizó una retro titulación para ello se colectaron 0.0658 g de  $\text{NTC-COO}^- \text{Na}^+$ , los cuales fueron adicionados a HCl 0.01M, se pusieron bajo una atmosfera inerte de argón por 48 horas para re acidificar los NTC. La mezcla fue filtrada y lavada para remover algún residuo de HCl. la combinación del filtrado y lavado se neutralizó con NaOH 0.01M.

## 5.2.4 Reacciones de amidación



**Figura 14** Movimiento magnético para las reacciones de amidación.

Las reacciones de amidación se llevaron a cabo por medio de tres diferentes activadores: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y el anhídrido propilfosfónico (T3P). Las carbodiimidas han sido utilizadas y se encuentran ampliamente reportadas en la literatura, sin embargo, en el caso del T3P solo se encuentra referencia de su uso para la síntesis de péptidos. A continuación se describe de forma detallada las condiciones de reacción para el uso de cada activador. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y por medio de agitación magnética (Figura 14).

### 5.2.4.1 EDC

El procedimiento de amidación se siguió de acuerdo a Fu *et al*<sup>20</sup>, para ello se pesaron 0.1059 g de NTC-COOH, se disolvieron en una solución de 0.8689 mmol/L N-Hidroxisuccinimida (NHS) para incrementar la eficiencia en el acoplamiento de la reacción, se dejó sonicar la mezcla por 30 minutos. Después se adicionó una solución de 0.5216 mmol/L de carbodiimida EDC y se dejaron reaccionar por 3 horas. Una vez pasado el tiempo los NTC se filtraron y lavaron para quitar el exceso de reactivos que no reaccionaron y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los sólidos recuperados del filtro se adicionaron a una solución de 0.574 mmol/L de arginina y se dejaron reaccionar por otras tres horas. La mezcla se filtró y lavo nuevamente para eliminar el exceso de reactivos que no reaccionaron y se dejaron secar a temperatura ambiente.

#### **5.2.4.2 DCC**

Para la reacción de amidación se siguió la metodología propuesta por Jeong et al.<sup>113</sup>, se pesaron 0.0652 g de NTC-COOH, se disolvieron en una solución de 0.968 mmol/L de la carbodiimida DCC y fueron sonicados por 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada y lavada con tetrahidrofurfano (THF) y metanol y se dejó secar a temperatura ambiente. Los sólidos se dispersaron nuevamente en THF y sonicados por 20 minutos para homogenizar. Después se adicionaron a una solución de 1.148 mmol/L de arginina y se dejó reaccionar por 1 hora. La mezcla se filtró y lavo y se dejó secar a temperatura ambiente.

#### **5.2.4.3 T3P**

Se pesaron 0.1162 g de NTC-COOH y se adicionaron 1.5 M de T3P, se agregó una solución 5.7 M de N, N-Diisopropiletilamina (DIEA) y se dejaron reaccionar por 5 horas a temperatura ambiente. Se filtraron y lavaron. Los sólidos y una solución de 0.0038 M de arginina se adicionaron a 5.7 M de DIEA y se dejaron reaccionar por otras 5 horas, después se filtraron, lavaron y dejaron secar a temperatura ambiente. La reacción también se llevó a cabo empleando una temperatura de 150 °C y bajo una atmósfera inerte empleando las mismas condiciones de reacción por el mismo periodo de tiempo.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Estudio teórico

#### 6.1.1 Carbodiimidas

##### 6.1.1.1 Optimización de geometría y frecuencias

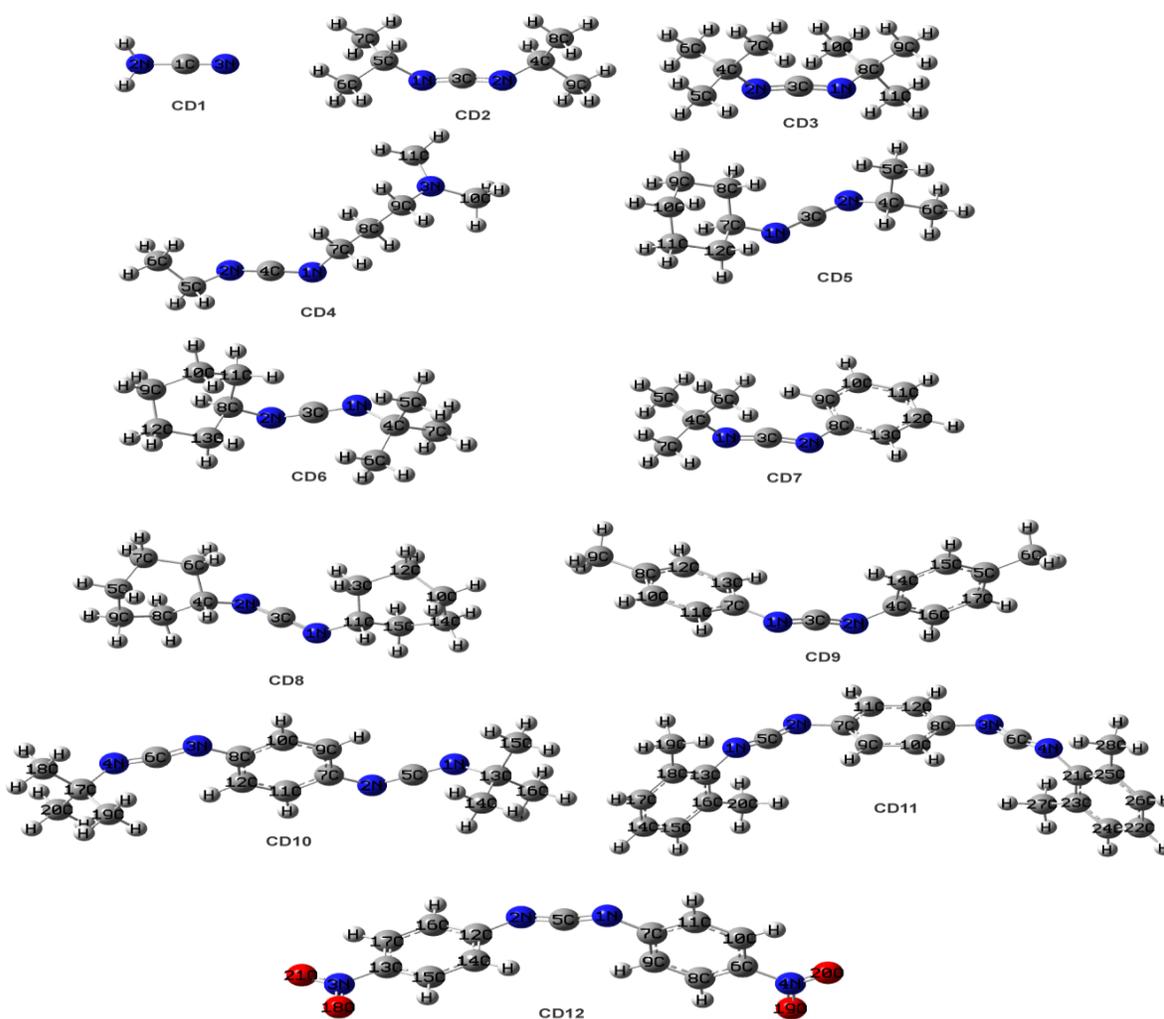


Figura 15 Estructuras optimizadas de las diferentes carbodiimidas.

Las carbodiimidias previamente descritas fueron optimizadas con la química modelo descrita en la sección anterior con el fin de obtener las estructuras de mínima energía (Figura 15), confirmando la ausencia de frecuencias imaginarias por medio del cálculo de frecuencia. Posteriormente de las estructuras optimizadas se realizaron los cálculos de energía de las especies en estado neutro, catiónico y aniónico, para calcular las propiedades globales y locales de reactividad química.

### 6.1.1.2 Reactividad global y local

**Tabla 3** Descriptores de reactividad calculados en fase gas y fase acuosa. Los valores se presentan en eV, con excepción de S la cual está definida en  $m (eV)^{-1}$ .

	I		A		X		$\eta$		$\omega$		S	
	GAS	ACUOSA	GAS	ACUOSA	GAS	ACUOSA	GAS	ACUOSA	GAS	ACUOSA	GAS	ACUOSA
CD1	10.512	7.784	-3.329	-1.113	3.591	3.336	13.841	8.896	0.932	1.251	72.249	112.410
CD2	8.765	6.966	-3.027	-0.811	2.869	3.078	11.792	7.778	0.698	1.218	84.803	128.568
CD3	8.498	6.796	-2.818	-0.792	2.840	3.002	11.316	7.588	0.713	1.188	88.370	131.787
CD4	7.508	6.564	-1.805	-0.610	2.852	2.977	9.313	7.174	0.473	0.618	107.373	139.391
CD5	8.638	6.893	-2.915	-0.839	2.861	3.027	11.553	7.732	0.709	1.185	86.558	129.333
CD6	7.685	6.037	-1.247	0.734	3.219	3.386	8.932	5.304	1.160	2.161	111.957	188.537
CD7	8.375	6.728	-2.768	-0.788	2.804	2.970	11.143	7.516	0.705	1.173	89.742	133.049
CD8	8.481	-----	-2.694	-----	2.893	-----	11.175	-----	0.749	-----	89.485	-----
CD9	7.370	5.995	-0.847	0.858	3.261	3.427	8.217	5.137	1.294	2.286	121.699	194.666
CD10	7.014	5.629	-0.698	1.082	3.158	3.356	7.711	4.547	1.293	2.476	129.685	219.925
CD11	8.613	6.824	1.393	2.737	5.003	4.780	7.219	4.087	3.467	5.591	138.523	244.678
CD12	7.028	5.703	-0.397	1.062	3.315	3.382	7.425	4.641	1.480	2.465	134.680	215.471

De acuerdo a las propiedades de reactividad en fase gas y fase acuosa (Tabla 3) podemos definir que el potencial de ionización el cual nos indica la energía necesaria para separar un electrón de su sistema da como resultado que la CD 1 en ambas fases requiere de la mayor energía para formar un catión y la CD 10 en ambas fases requiere de menor energía para formar un catión.

La electronegatividad nos indica la tendencia que tienen las moléculas para atraer electrones presentando la CD 11 el valor más grande en ambas fases y la CD 7 el valor más pequeño en ambas fases, por lo tanto serán estas carbodiimidias las que tienen mayor facilidad y menor facilidad respectivamente para atraer los electrones.

Analizando la facilidad de las moléculas para formar un anión definida por la afinidad electrónica las carbodiimidias en fase gas presentan en su mayoría valores negativos por lo que se define que no son susceptibles a formar un anión salvo en el caso de la CD 11. Por otro parte se observa que en algunos casos los valores negativos se vuelven positivos al evaluarlos en fase acuosa, sin embargo, la CD 11 sigue presentando el valor mayor lo que indica que es la que tendrá mayor facilidad para formar un anión y la CD6 tendrá menor facilidad de formar un anión. Al saturarse de electrones el sistema se logra una estabilización definida por la electrofilicidad, siendo la CD 11 la más estable en ambas fases y la CD 7 la menos estable en ambas fases.

La resistencia que oponen estas moléculas a reaccionar con otros sistemas esta medida por la dureza química y de acuerdo a los resultados obtenidos la CD 1 es la más resistente a este cambio en ambas fases y la CD 11 la menos resistente en ambas fases, caso contrario, al evaluar la blandura nos indica que tan susceptible de reaccionar con otros sistemas la CD 11 presenta el valor más grande por lo que es la más susceptible de reaccionar y la CD 1 el valor más pequeño lo indica que será la menos susceptible de reaccionar ya que esta propiedad es el inverso de la dureza química.

**Tabla 4** Poder electrodonador y poder electroceptor, índice neto de Electrofilicidad. Los valores se presentan en eV.

	$\omega^+$		$\omega^-$		$\Delta\omega^\pm$	
	GAS	ACUOSA	GAS	ACUOSA	GAS	ACUOSA
CD1	3.592	3.474	0.001	0.139	3.594	3.613
CD2	2.869	3.243	0.001	0.165	2.870	3.408
CD3	2.840	3.163	0.00001	0.161	2.840	3.324
CD4	2.881	3.173	0.029	0.195	2.910	3.368
CD5	2.861	3.182	0.00006	0.155	2.862	3.337
CD6	3.328	4.185	0.109	0.800	3.436	4.985
CD7	2.804	3.128	0.00003	0.158	2.804	3.286
CD8	2.894	-----	0.001	-----	2.895	-----
CD9	3.439	4.320	0.177	0.893	3.616	5.214
CD10	3.354	4.438	0.196	1.083	3.551	5.521
CD11	6.420	8.237	1.417	3.456	7.836	11.693
CD12	3.602	4.447	0.287	1.064	3.889	5.511

De acuerdo a Gázquez *et al.*<sup>47 48</sup> el poder electrodonador ( $\omega^-$ ) y poder electroceptor ( $\omega^+$ ) permiten encontrar la susceptibilidad de donar o aceptar una pequeña cantidad de carga, la cual es necesaria para tomar parte en interacciones químicas. Además, la electrofilicidad neta ( $\Delta\omega^\pm$ ) es usada para obtener valores más representativos de la electrofilicidad. Las diferentes carbodiimidias se

evaluaron bajo estas propiedades (Tabla 4). Conforme a los resultados la CD 11 es la más susceptible para aceptar carga en ambas fases.

Evaluando la susceptibilidad de donar carga en fase acuosa la CD 1 es la más susceptible, mientras que en fase gas es la CD 3. Finalmente el índice de electrofilicidad neta muestra que la CD 11 es la más estable al recibir un cantidad de carga ya que tiene los valores más grandes del poder electrodonador y poder electroceptor.

**Tabla 5** Hiperblandura local condensada de las carbodiimidias en fase gas y fase acuosa las unidades se presentan en milli (eV)<sup>-1</sup>.

		$S_k^{(2)}$							
		GAS				AQUEOUS			
CD1	5 H	1.03571	3 N	-0.95844	1 C	1.10597	2 N	-2.19645	
	4 H	1.02045	2 N	-0.62451	4 H	0.57798	3 N	-0.04354	
	---	-----	1 C	-0.47321	5 H	0.55587	---	-----	
CD2	3 C	0.45869	2 N	-0.59549	3 C	1.34894	1 N	-1.25935	
	18 H	0.05732	1 N	-0.59305	22 H	0.14306	2 N	-1.25922	
	14 H	0.05626	12 H	-0.00870	23 H	0.14281	----	----	
	4 C	0.05556	21 H	-0.00862	17 H	0.13538	----	----	
	5 C	0.05333	----	----	13 H	0.13538	----	----	
CD3	18 H	0.20738	2 N	-0.82813	3 C	0.63428	2 N	-1.69281	
	29 H	0.20725	1 N	-0.82543	29 H	0.60182	1 N	-1.39069	
	3 C	0.12623	8 C	-0.03391	18 H	0.60097	14 H	-0.04194	
	28 H	0.09031	4 C	-0.03241	12 H	0.26554	24 H	-0.04104	
	20 H	0.08908	14 H	-0.01629	25 H	0.26389	11 C	-0.03724	
CD4	4C	0.89431	3N	-1.69927	4C	4.61267	3N	-6.16700	
	1N	0.33144	13H	-0.36401	2N	3.00846	13H	-1.66179	
	23H	0.31540	17H	-0.35625	1N	2.77309	17H	-1.65786	
	22H	0.27917	10C	-0.18186	23H	1.39209	10C	-1.21645	
	2N	0.21311	11C	-0.17628	7C	1.11416	11C	-1.21506	
CD5	3 C	0.327705	2 N	-0.73058	3 C	1.299914	2 N	-1.60186	
	14 H	0.125349	1 N	-0.47470	14 H	0.456515	1 N	-0.72138	
	22 H	0.122284	20 H	-0.13244	5 C	0.294481	12 C	-0.23437	
	5 C	0.093798	12 C	-0.08108	19 C	0.271183	20 H	-0.21007	
	17 H	0.009304	7 C	-0.05058	4 C	0.262753	7 C	-0.18361	
CD6	3 C	0.519857	2 N	-0.54980	3 C	1.345915	2 N	-1.60341	
	12 C	0.218238	1 N	-0.45525	12 C	0.741944	1 N	-1.00609	
	9 C	0.143002	13 C	-0.22884	9 C	0.563017	13 C	-0.69925	
	4 C	0.089135	11 C	-0.08678	27 H	0.258703	11 C	-0.26208	
	8 C	0.062866	10 C	-0.08321	24 H	0.216220	10 C	-0.19532	
CD7	24 H	0.19579	2 N	-0.74804	3 C	0.87406	2 N	-1.41455	
	3 C	0.15792	1 N	-0.72413	17 H	0.52018	1 N	-1.37373	
	17 H	0.13791	23 H	-0.13011	24 H	0.48398	23 H	-0.33485	

	28 H	0.09374	8 C	-0.04407	15 H	0.34448	8 C	-0.13164
	26 H	0.09342	4 C	-0.03705	33 H	0.21086	12 C	-0.05053
CD8	3 C	0.48622	2 N	-1.69935	---	-----	---	-----
	30 H	0.23169	1 N	-0.51429	---	-----	---	-----
	36 H	0.22773	15 C	-0.19517	---	-----	---	-----
	33 H	0.20020	27 H	-0.14393	---	-----	---	-----
	28 H	0.18055	23 H	-0.40336	---	-----	---	-----
CD9	3 C	0.56192	1 N	-0.28649	3 C	1.95938	2 N	-0.41598
	13 C	0.10957	2 N	-0.28556	14 C	0.26804	1 N	-0.41529
	14 C	0.10815	16 C	-0.10344	13 C	0.26615	12 C	-0.24410
	10 C	0.10238	11 C	-0.10209	25 H	0.20033	15 C	-0.24311
	17 C	0.101545	15 C	-0.09330	22 H	0.19972	27 H	-0.23262
CD10	5 C	0.456303	3 N	-0.43886	5 C	1.130587	2 N	-1.28867
	6 C	0.456286	2 N	-0.43871	6 C	1.130587	3 N	-1.28862
	9 C	0.204675	4 N	-0.32226	9 C	0.819155	1 N	-0.67824
	12 C	0.204659	1 N	-0.32219	12 C	0.819155	4 N	-0.67619
	13 C	0.076802	10 C	-0.20703	40 H	0.278887	10 C	-0.63539
CD11	19 O	0.80460	1 N	-1.05503	19 O	3.50609	1 N	-4.35924
	18 O	0.80409	2 N	-1.05499	18 O	3.50603	2 N	-4.35918
	20 O	0.79985	13 C	-0.62931	20 O	3.50250	13 C	-1.74000
	21 O	0.79937	6 C	-0.62888	21 O	3.50244	6 C	-1.74000
	4 N	0.76523	16 C	-0.30903	3 N	2.91625	5 C	-1.65835
CD12	6 C	0.33943	1 N	-0.48731	6 C	1.10663	2 N	-1.24115
	5 C	0.33660	4 N	-0.48191	5 C	1.10649	3 N	-1.24106
	13 C	0.23417	7 C	-0.34473	7 C	0.22603	1 N	-0.51606
	14 C	0.23232	8 C	-0.34172	8 C	0.22603	4 N	-0.51601
	21 C	0.22323	3 N	-0.26824	12 C	0.12546	10 C	-0.05962

Las carbodiimidas exhiben una alta reactividad debido al carácter electrofílico del átomo central de carbono y el carácter nucleofílico del nitrógeno también en la parte central de la molécula. Por lo tanto, tanto el carbono y los nitrógenos ligados por enlaces dobles son fácilmente atacados por una variedad de nucleófilos y electrófilos. Dado que las funciones de Fukui son una herramienta importante para los químicos se emplearon para calcular los índices de Fukui y subsecuentemente se usaron para determinar la Hiperblandura local condensada, la cual es usada de forma intramolecular de acuerdo con el tamaño de la molécula, esto hace que puedan ser evaluadas contra otras moléculas de distintos tamaños.

En la tabla 5 se muestran los valores de Hiperblandura local condensada, se tomaron en cuenta los primeros cinco valores para el ataque electrofílico favorecido con valores negativos y nucleofílico favorecido con valores positivos. En la mayoría de las carbodiimidas tanto el ataque nucleofílico y electrofílico son bien descritos de acuerdo a los resultados obtenidos. Por otra parte en la CD 1,

CD 4 y CD 11 los ataques se encuentran en otros átomos presentes en la estructura. En la CD 1 el ataque nucleofílico en fase gas está presente en un hidrogeno en lugar del átomo de carbono, sin embargo, en fase acuosa el ataque se encuentra en el carbono central, esto puede deberse a la interacción del solvente con el amino presente en la molécula pudiendo formar puente de hidrogeno. El ataque electrofílico en fase gas se encuentra en el nitrógeno N3 en el triple enlace, sin embargo, en fase acuosa el ataque se presenta en el nitrógeno del grupo amino. En la CD 4 el ataque electrofílico es localizado en el N3, se esperaba que el N1 y N2 fueran los siguientes para el ataque electrofílico, pero estos están en el ataque nucleofílico, lo cual está en contra de lo esperado, por lo tanto se revisó la densidad de carga de la molécula y se encontró que los átomos más susceptibles al ataque electrofílico fue el N1 y N2 con los valores más negativos incluso que el N3. Por otra parte, el ataque nucleofílico y electrofílico no se encuentran en la parte central de la CD 11; estos ataques están localizados en los grupos nitro, lo cual indica que las carbodiimidias pueden formar diferentes moléculas en lugar de las esperadas. En general, la Hiperblandura local describen bien los sitios de ataque, además el estudio en fase gas y fase acuosa no muestran diferencias significativas.

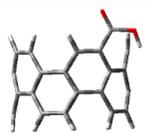
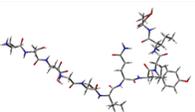
De forma general la CD11 es la que presenta mejores propiedades de reactividad al tener la mayor facilidad de atraer electrones, formar un anión y estabilizarse al saturarse de electrones. Esta carbodiimida es la que opondrá menor resistencia a reaccionar con otros sistemas. Es la más susceptible de aceptar un pequeña cantidad de carga teniendo el valor más grande de la electrofilicidad neta debido a los grupos nitro presentes en su estructura, es por ello que los sitios más reactivos se encuentran en esta misma zona de la molécula en lugar de la parte central de la misma ( $N=C=N$ ).

### 6.1.1.3 Energías de reacción

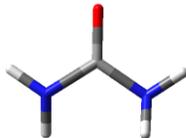
El estudio de las reacciones entre el nanotubo de carbono, los diferentes carbodiimidas, el péptido y la arginina se realizaron con el fin de encontrar las reacciones más estables, y determinar cuáles reacciones son espontáneas y cuáles no. En la Tabla 6 se muestra de forma general la reacción donde X indica las diferentes carbodiimidas que se utilizaron para el estudio, y la Y indica las N-acilurea formadas por la reacción, estas moléculas son el residuo que se forma por la entrada de la molécula con grupo amino. El grupo amino desplaza la parte de la O-acilisourea que es el compuesto inestable que se forma de la unión del nanotubo de carbono con la carbodiimida. Los valores de las energías están en unidades de Hartrees, se encuentran en fase gas y fase acuosa, ya que la mayoría de las reacciones se llevó a cabo en agua, sin embargo, la CD8 al ser un sólido ceroso se simuló en fase gas ya que no se disuelve en agua.

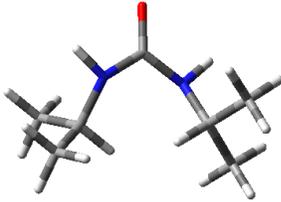
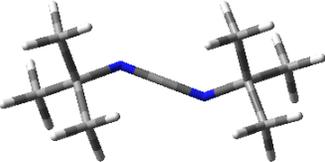
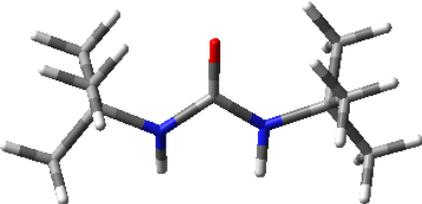
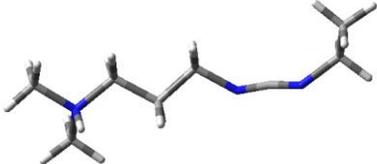
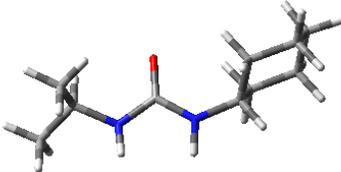
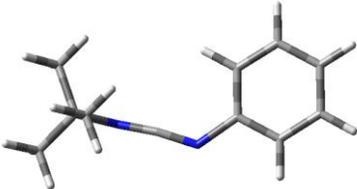
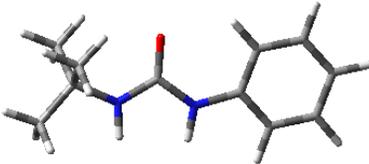
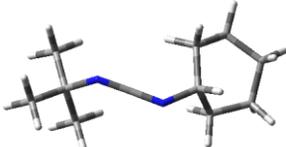
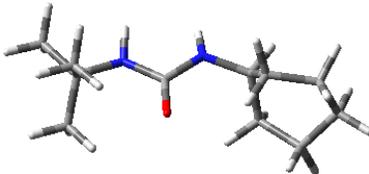
En la Tabla 7 se muestran los valores de la energía de las diferentes carbodiimidas, así como las respectivas N-acilurea. Todas las carbodiimidas excepto la CD8 se encuentran en fase acuosa, por lo tanto el valor de la CD8 así como la N-acilurea están dados en fase gas.

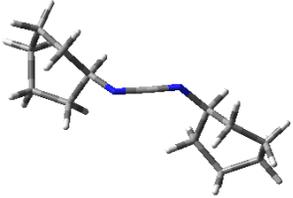
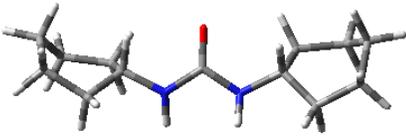
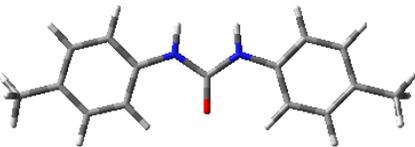
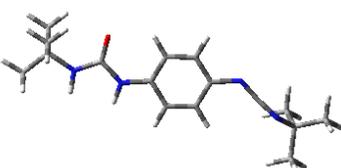
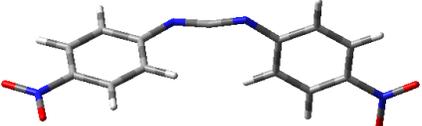
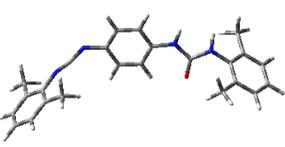
**Tabla 6** Reacción general de la funcionalización de nanotubos de carbono utilizando carbodiimidas como activadores.

	REACTIVOS			PRODUCTOS	
			<b>X</b>		<b>Y</b>
GAS	-1724.356	-4396.496		-6044.451	
ACUOSA	-1724.373	-4396.574		-6044.534	

**Tabla 7** Energía de las diferentes carbodiimidas así como las N-acilurea productos de la reacción.

CD1		
-----	---	---

	-148.782463	-225.236169
CD2		
	-384.504576	-460.951281
CD3		
	-463.083291	-539.531811
CD4		
	-939.928937	-1016.384181
CD5		
	-501.177197	-577.630939
CD6		
	-536.911969	-613.362847
CD7		
	-540.457347	-616.906176

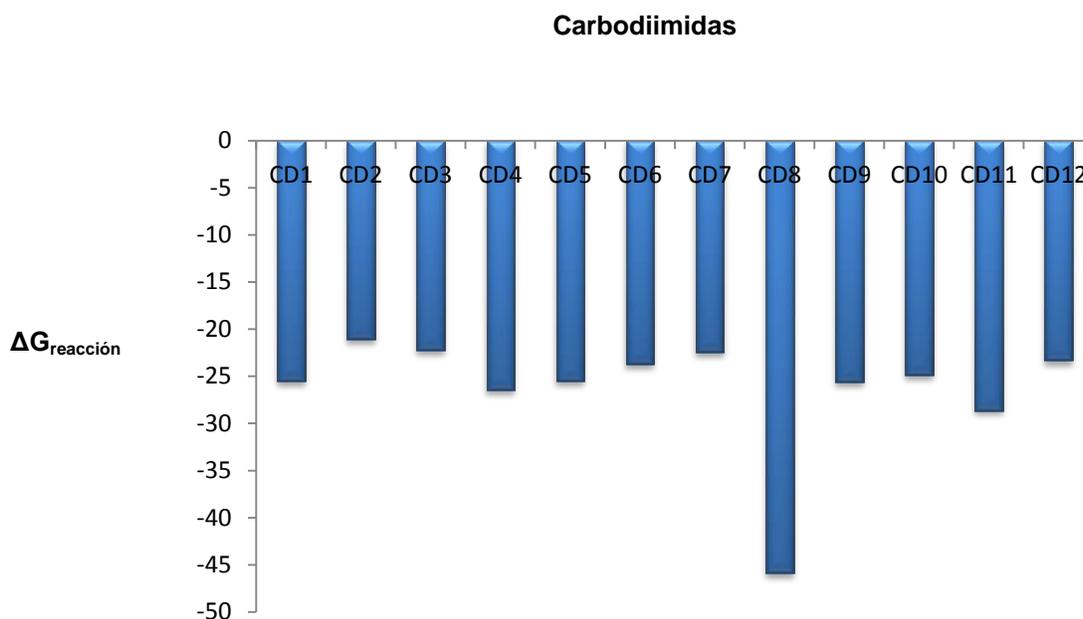
CD8		
	-617.825712	-694.276131
CD9		
	-689.326041	-765.779900
CD10		
	-841.644751	-918.097471
CD11		
	-1019.753448	-1096.212148
CD12		
	-1146.464694	-1222.914975

A partir de estos valores se procedió a realizar el cálculo de los  $\Delta G$  de reacción que sigue el principio de:

$$\Delta G_{\text{reacción}} = \sum E_{\text{productos}} - \sum E_{\text{reactivos}}$$

Donde  $E_{\text{productos}}$  corresponde a la energía de los productos y  $E_{\text{reactivos}}$  corresponde a la energía de los reactivos. En la Figura 16 se muestran los valores de los  $\Delta G$  de reacción para las diferentes reacciones donde se utilizaron las carbodiimidias como activadores. Las unidades están dadas en Kcal/mol, las cuales se obtuvieron de multiplicar los Hartrees por el valor de conversión de

627.5095. Como se puede observar en todas las reacciones se obtienen valores negativos lo cual indica que todas las reacciones son espontaneas, siendo la reacción más espontánea la que se lleva a cabo con la CD8 la cual fue llevada a cabo en fase gas.



**Figura 16**  $\Delta G$  de reacción de las diferentes reacciones donde intervienen las carbodiimidias como activadores.

El orden de espontaneidad en las reacciones es el siguiente:

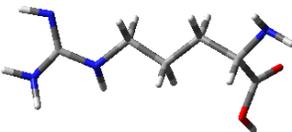
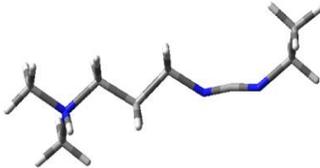
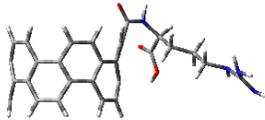
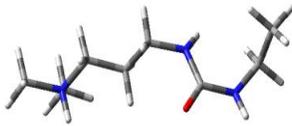
CD8>CD11>CD4>CD9>CD5>CD1>CD10>CD6>CD12>CD7>CD3>CD2

Dado que la CD4 es la más utilizada en los reportes de la literatura ya que es más fácil manejarla de forma experimental, es un punto de partida para comprar las carbodiimidias que no han sido probadas. Solo la CD8 que se trabaja en fase sólida y la CD11 exhiben una mayor espontaneidad al llevar a cabo la reacción en comparación con la CD4 lo cual indica que la CD11 podría ser un buen candidato para llevar a cabo la reacción de forma experimental en fase acuosa. Por otro lado también se puede observar que la CD2 es la que exhibe una menor espontaneidad en comparación con las demás carbodiimidias a pesar de ser una de las comunes.

Se simularon las reacciones empleando como molécula biológica a la arginina, de acuerdo a los resultados previos solo se tomaron en cuenta la CD 4 (Tabla 8) y la

CD 8 (Tabla 9). Las energías de los reactivos y productos se muestran a continuación:

**Tabla 8** Estructuras optimizadas y energías de reactivos y productos en agua utilizando la CD4 como activador.

<b><u>REACTIVOS</u></b>		
		
-1724.3730	-606.3589	-939.9289
<b><u>PRODUCTOS</u></b>		
		
-2254.3036	-1016.3757	

$$\Sigma E_{\text{productos}} = (\text{ENERGÍA NTC-ARGININA} + \text{ENERGÍA UREA4})$$

$$= (-2254.3036 + (-1016.3757)) = -3270.6793 \text{ HARTREE}$$

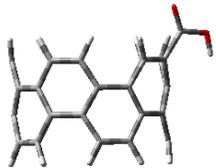
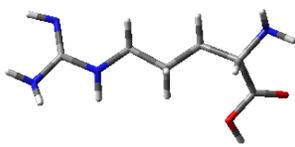
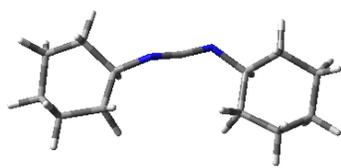
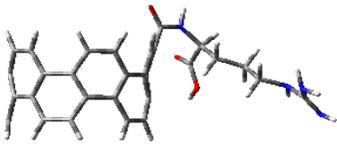
$$\Sigma E_{\text{reactivos}} = (\text{ENERGÍA NTC} + \text{ENERGÍA ARGININA} + \text{ENERGÍA CD4})$$

$$= (-1724.3730 + (-606.3589) + (-939.9289)) = -3270.6608 \text{ HARTREE}$$

$$\Delta G_{\text{RXN}} = -3270.6793 - (-3270.6608) = -0.0185 \text{ HARTREES} * (627.503 \text{ Kcal/mol})$$

$$= \underline{-11.6089 \text{ Kcal/mol}}$$

**Tabla 9** Estructuras optimizadas y energías de reactivos y productos en THF utilizando la CD8 como activador.

<b><u>REACTIVOS</u></b>		
		
-1724.3693	-606.3548	-617.8293
<b><u>PRODUCTOS</u></b>		
		
-2254.2970	-694.2852	

$$\Sigma E_{\text{productos}} = (\text{ENERGÍA NTC-ARGININA} + \text{ENERGÍA UREA8})$$

$$= (-2254.2970 + (-694.2852)) = -2948.5822 \text{ HARTREE}$$

$$\Sigma E_{\text{reactivos}} = (\text{ENERGÍA NTC} + \text{ENERGÍA ARGININA} + \text{ENERGÍA CD8})$$

$$= (-1724.3693 + (-606.3548) + (-617.8293)) = -2948.5534 \text{ HARTREE}$$

$$\Delta G_{\text{RXN}} = -2948.5822 - (-2948.5534) = -0.0288 \text{ HARTREES} * (627.503 \text{ Kcal/mol})$$

$$= \underline{-18.0722 \text{ Kcal/mol}}$$

De acuerdo a los resultados obtenidos las reacciones de amidación se darán de forma espontánea, siendo la reacción de amidación donde se utiliza la CD8 como activante la que presenta mayor espontaneidad. Al analizar las condiciones experimentales que se presentan en la literatura las cuales se referencian en la parte experimental los tiempos de síntesis donde interviene la CD8 son menores en comparación con la CD4, además esta última requiere de aditivos para aumentar el rendimiento en la reacción.

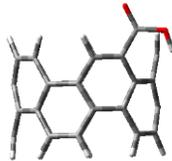
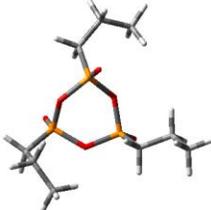
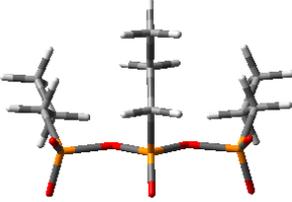
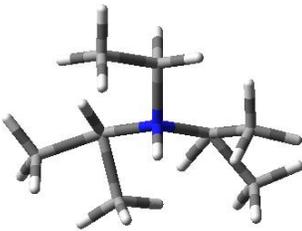
De acuerdo a los resultados obtenidos las reacciones de amidación pueden ser llevadas a cabo con las diferentes carbodiimidas estudiadas, siendo las reacciones más espontáneas aquellas donde se usan las carbodiimidas 8, 11 y 4 para la funcionalización del NTC con el péptido.

## 6.1.2 Anhídrido propilfosfonico (T3P)

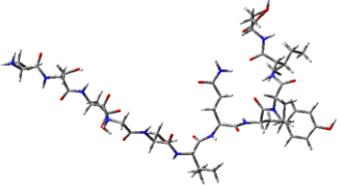
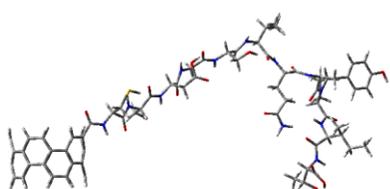
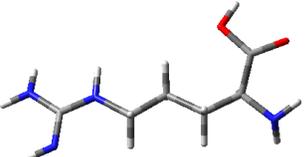
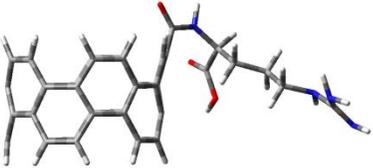
### 6.1.2.1 Energías de reacción

Por otra parte se analizó la reacción empleando el activante T3P (Tabla 10), al igual que en el caso donde se emplean las carbodiimidas hay ciertos reactivos y productos que se mantienen constantes en la reacción, y se definen solo el reactivo y producto que varía en la reacción como x y y respectivamente (Tabla 11).

**Tabla 10** Estructuras optimizadas de reactivos y productos empleadas en la reacción de amidación por medio del agente activante T3P. Unidades Hartrees.

REACTIVOS			
	<b>X</b>		
-1724.372		-1831.001	-370.808
PRODUCTOS			
<b>Y</b>			
	-1906.	-371.260	

**Tabla 11** Reactivos y productos independientes en la reacción.

	REACTIVOS		PRODUCTOS
<b>PÉPTIDO</b>		<b>NTC-PÉP</b>	
	-4396.573		-6044.534
<b>ARGININA</b>		<b>NTC-ARG</b>	
	-606.358		-2254.302

$$\begin{aligned}\Sigma E_{\text{productos}} &= (\text{ENERGÍA NTC-PEP} + \text{ENERGÍA SAL} + 2\text{ENERGÍA DIEA2}) \\ &= (-6044.534 + (-1906.474) + 2(-371.260)) = -8693.528 \text{ HARTREE}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\Sigma E_{\text{reactivos}} &= (\text{ENERGÍA NTC} + \text{ENERGÍA PÉPTIDO} + \text{ENERGÍA T3P} + 2\text{ENERGÍA DIEA}) \\ &= (-1724.372 + (-4396.573) + (-1831.001) + 2(-370.808)) = -8693.562 \text{ HARTREE}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{RXN}} &= -8693.528 - (-8693.562) = 0.034 \text{ HARTREES} * (627.503 \text{ Kcal/mol}) \\ &= \underline{21.33 \text{ Kcal/mol}}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\Sigma E_{\text{productos}} &= (\text{ENERGÍA NTC-ARGININA} + \text{ENERGÍA SAL} + \text{ENERGÍA DIEA2}) \\ &= (-2254.302 + (-1906.474) + 2(-371.260)) = -4903.296 \text{ HARTREE}\end{aligned}$$

$$\Sigma E_{\text{reactivos}} = (\text{ENERGÍA NTC} + \text{ENERGÍA ARGININA} + \text{ENERGÍA T3P} + \text{ENERGÍA DIEA})$$

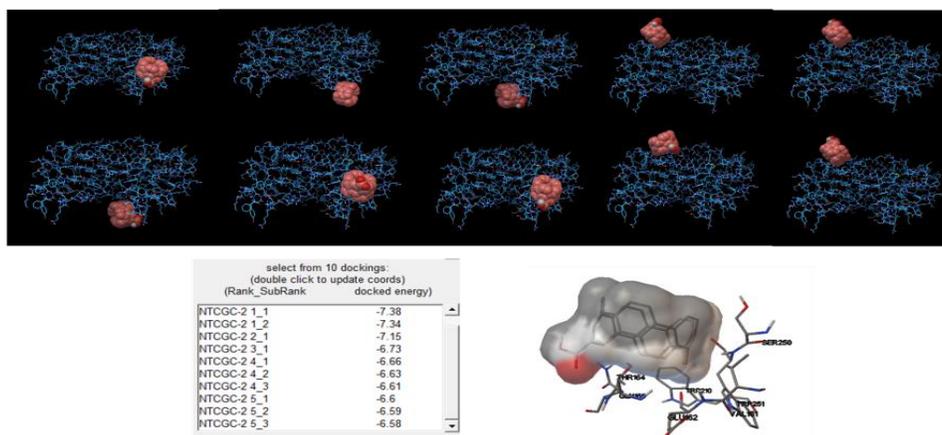
$$= (-1724.372 + (-606.358) + (-1831.001) + 2(-370.808)) = -4903.347 \text{ HARTREE}$$

$$\Delta G_{\text{RXN}} = -4532.0852 - (-4532.5409) = 0.051 \text{ HARTREES} * (627.503 \text{ Kcal/mol})$$

$$= \underline{32.002 \text{ Kcal/mol}}$$

Se observa que en ambas reacciones donde se trabajó con el T3P el proceso absorbe energía mostrando que este proceso es endergónico y por lo tanto no espontáneo. Por lo cual se requiere de administrarse energía, esto se puede hacer por medio de movimiento, temperatura o exceso de reactivos.

### 6.1.3 Acoplamiento molecular

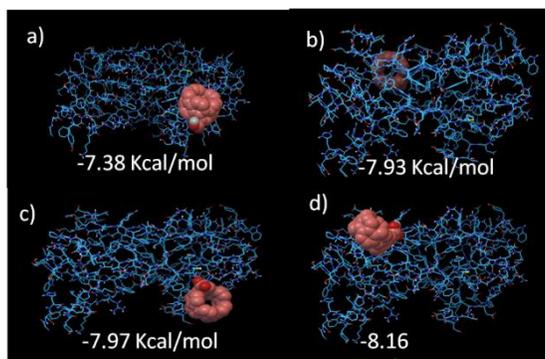


**Figura 17** Posiciones más estables del acoplamiento entre el NTC y el péptido.

Uno de los objetivos de este estudio era emplear una enzima como catalizador, se hicieron los acoplamientos del NTC y el péptido con las diferentes enzimas. El NTC y el péptido se trabajaron en los acoplamientos por separado. En la Figura 17 se muestran los diez acoplamientos más estables del NTC con la enzima 1UMH y

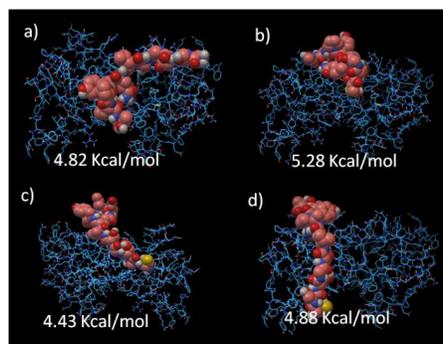
muestra de forma general como nos da el programa los resultados, así como la interacción con los diferentes aminoácidos. Los resultados muestran una energía de enlace negativa, es decir, el NTC y la enzima tienden a acoplarse de forma espontánea. Además se valoró el máximo número de evaluaciones de la energía a un nivel alto y bajo ya que dependiendo del nivel dependerá el tiempo de cálculo.

En la Figura 18 se muestran las interacciones del NTC con la enzima de forma rígida y la evaluación de la energía bajo (a), rígida y la evaluación de la energía alto (b), no rígido y la evaluación de energía bajo (c) y no rígido y la evaluación de energía alto (d), así como los respectivos valores de energía de enlace, lo que se puede observar es que el NTC si tendrá una interacción espontánea con la enzima independientemente de cómo sea tratado el ligando, es decir, como rígido o no rígido, los valores son cercanos entre sí, la diferencia radica en que el máximo número de evaluaciones que fueron trabajados a un nivel alto los cuales demoran más tiempo en converger, por lo que en posteriores cálculos se trabajara a un nivel de cálculo bajo.



**Figura 18** Acoplamiento Enzima-NTC.

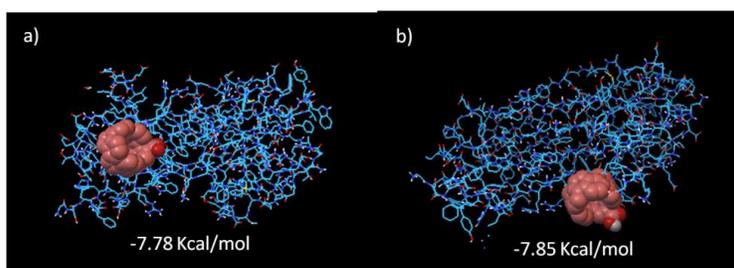
También se analizó la interacción de la enzima como se muestra en la Figura 19 la interacción entre la enzima y el péptido de forma rígido a un nivel de evaluación de la energía bajo (a) y alto (c), y no rígido a un nivel de evaluación de la energía bajo (b) y alto (d). Por lo valores de la energía se determinó que es un proceso no espontaneo dado que los valores son positivos, además no se observa una diferencia significativa entre los valores lo cual nos dice que independientemente de cómo se trate al ligando ya se rígido o no rígido, a un nivel alto o bajo esto no hace que los valores sean negativos.



**Figura 19** Acoplamiento Enzima-Péptido.

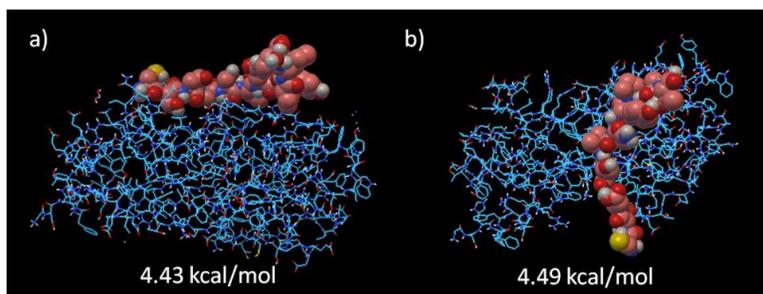
Si bien la interacción entre el NTC y la enzima es un proceso espontáneo, lo cual nos habla de porque la inmovilización de enzimas sobre el NTC de carbono es un proceso muy utilizado, la interacción con el péptido no se dará de forma espontánea. Se analizaron enzimas de este mismo grupo para ver si es posible que en algún caso se lleve esta interacción de forma espontánea.

En la Figura 20 se muestra la interacción Enzima-NTC (PDB: 1UMI del organismo *mus musculus*), estos fueron trabajados como un ligando rígido (a) y no rígido (b) a un nivel de la evaluación de la energía bajo, lo que se puede observar es que dicha interacción independientemente de cómo sea tratado el ligando se dará de forma espontánea, indicando valores muy cercanos entre sí.



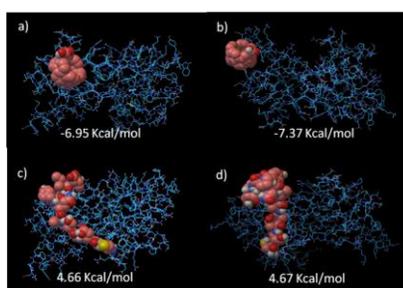
**Figura 20** Acoplamiento Enzima-NTC.

Una vez analizada la interacción del NTC se procedió a trabajar la interacción con el péptido, los resultados se muestran en la Figura 21 donde se trabajó con el péptido rígido (a) y no rígido (b) a un nivel de la evaluación de la energía bajo. Los valores también son positivos como en el caso de la enzima anterior, por lo que también en este caso no se dará de forma espontánea.

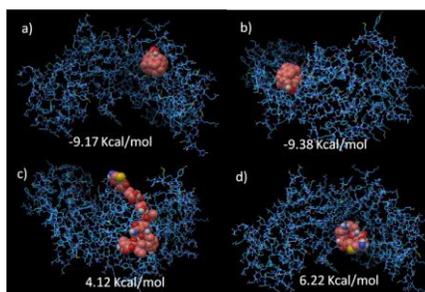


**Figura 21** Acoplamiento Enzima-Péptido.

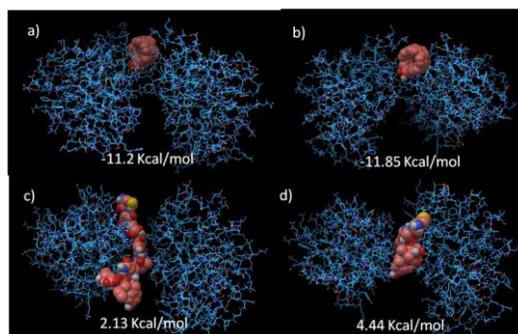
En la Figura 22 (PDB: 2RJ2), 19(PDB: 4B8E) y 23 (PDB: 3FSH) se muestra la interacción Enzima-NTC y Enzima-Péptido. La interacción Enzima-NTC tratando al NTC como rígido (Figuras 22 a, 23 a y 24 a) y no rígido (Figuras 22 b, 23 b y 24 b), a un nivel de evaluación de energía bajo muestran valores negativos, lo cual indica una interacción espontánea entre la enzima y el NTC, sin embargo, esta interacción no se dará en el sitio activo de las enzimas. Por otra parte la interacción de la Enzima- Péptido tratando al péptido como rígido (Figuras 22 c, 23 c y 24 c) y no rígido (Figuras 22 d, 23 d y 24 d), a un nivel de evaluación de energía bajo muestran valores positivos, lo cual indica que no habrá interacción espontánea entre la enzima y el péptido.



**Figura 22** Acoplamiento Enzima-NTC y Enzima-Péptido.



**Figura 23** Acoplamiento Enzima-NTC y Enzima-Péptido.



**Figura 24** Acoplamiento Enzima-NTC y Enzima-Péptido.

Otras enzimas procedentes de diferentes organismos se analizaron, las interacciones entre la enzima y el péptido (Tabla 12) dan como resultado valores de energía de enlace positivos, por lo cual podemos concluir que la enzima no está interactuando con el péptido de forma espontánea.

**Tabla 12** Energía de enlace del péptido con diferentes enzimas de tipo ligasa C-N.

PDB ID	ENERGÍA DE ENLACE
4OHR	3.58 Kcal/mol
2LXP	4.46 Kcal/mol
4LAD	4.36 Kcal/mol
4K7S	3.53 Kcal/mol
4K7U	4.09 Kcal/mol
4K7W	4.10 Kcal/mol
4JJQ	2.61 Kcal/mol
4LDT	4.99 Kcal/mol
4BWF	4.26 Kcal/mol
2LWR	3.95 Kcal/mol
3W31	3.72 Kcal/mol
2H2Y	3.41 Kcal/mol
4FH1	3.34 Kcal/mol
4JQU	4.14 Kcal/mol

Las enzimas tiene afinidad por le NTC al adsorberse sobre su superficie, sin embargo, el péptido no presenta esta afinidad lo que indica que las reacciones de amidación no son factibles por medio de una enzima como catalizador.

## **6.2 Desarrollo experimental**

### **6.2.1 Síntesis de NTC**

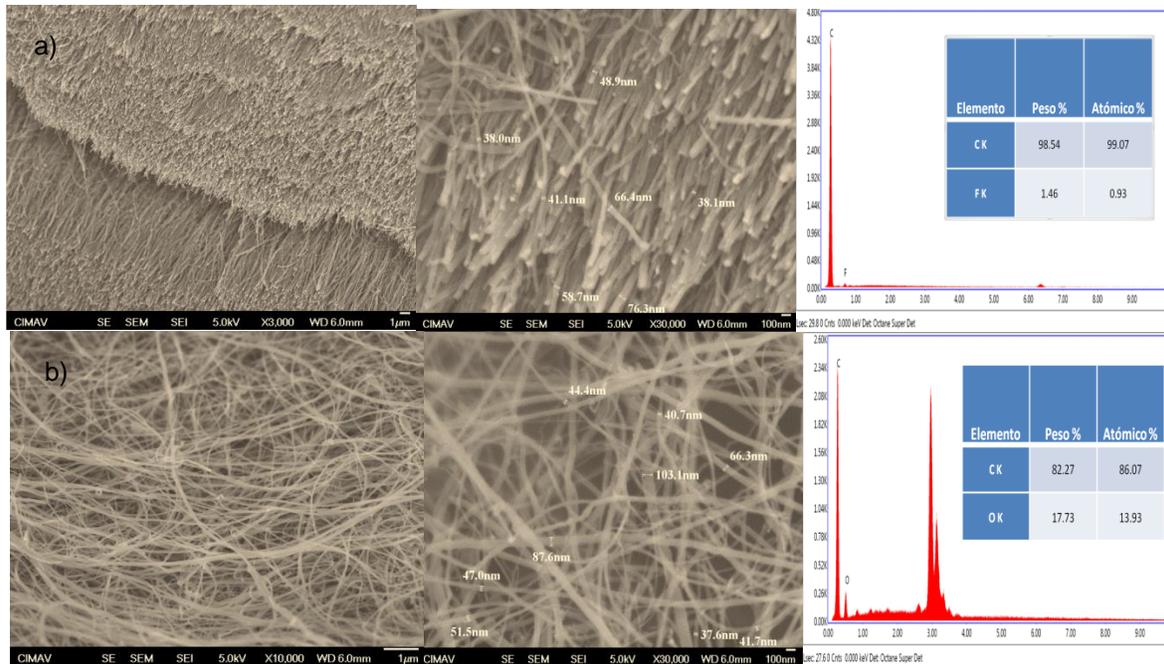
Para la síntesis de NTC se requiere de un sustrato (cuarzo) donde se deposita el Hierro proveniente del catalizador y una fuente de carbono, se ha visto que con el uso de tolueno se obtienen altos rendimientos comparado con otros hidrocarburos aromáticos como benceno o xileno <sup>115</sup>. El tiempo de síntesis generalmente es de 20 minutos, sin embargo, este tiempo se limita a 2 minutos para obtener NTC de longitudes más cortas, ya que a tiempos prolongados de reacción la longitud se incrementa.<sup>63</sup>

### **6.2.2 Purificación de NTC**

La purificación de NTC se llevó a cabo con el fin de poder eliminar los restos de carbón amorfo y catalizador presente en los NTC sintetizados ya que son considerados contaminantes. Este proceso genera múltiples defectos estructurales que son indeseables en aplicaciones como dispositivos mecánicos y electrónicos, sin embargo, para las aplicaciones biológicas y en este estudio es de especial interés generar estos defectos que servirán posteriormente para las reacciones de amidación. El rango de temperatura en el que se manejó la reacción fue de 90-100 °C ya que se ha visto que a temperaturas de 400 °C algunos grupos funcionales empiezan a disociarse y después de 500 °C los grupos carboxilo desaparecen<sup>111</sup>. El tiempo de reacción fue de 100 minutos, ya que también a tiempos prolongados de oxidación los grupos carboxilo se convierten en hidroxilo.

## 6.2.3 Caracterización

### 6.2.3.1 SEM

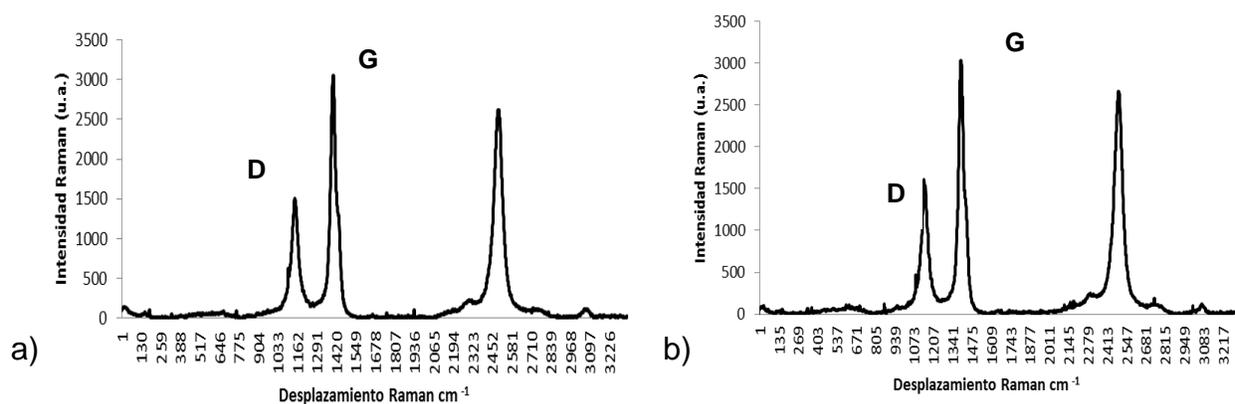


**Figura 25** NTC prístinos morfología y composición a) y NTC purificados morfología y composición b).

Los NTC prístinos y purificados se muestran en la Figura 25. El análisis por electrones secundarios de alta resolución nos permite visualizar la morfología de los NTC. Se puede observar que los NTC prístinos se encuentran agrupados paralelamente unos de otros, presentando puntas libres de semiesferas de fulerenos, los diámetros son variables desde 38 hasta 76.3 nm indicando que los NTC sintetizados son de pared múltiple, además el mapeo elemental por EDS indica la presencia de carbono que corresponde a los NTC y Fe que proviene de el catalizador. Por otra parte los NTC purificados con la mezcla de ácidos presenta de 37.6 hasta 103.2 nm de diámetro. El mapeo elemental muestra contenido de carbono así como la presencia de oxígeno, la cual puede ser atribuida a la formación de grupos funcionales de oxígeno generados por la oxidación.

### 6.2.3.2 Raman

Las modificaciones estructurales de las paredes laterales del nanotubo debido a la introducción de defectos y el acoplamiento de diferentes especies químicas pueden ser medidas por medio de la banda D y la banda G, utilizando el cociente de las intensidades IG/ID nos indica la proporción de nanotubos de carbono sintetizados frente a carbón a morfo generado, demuestra el grado de orden estructural y es considerado un índice de calidad, valores superiores a la unidad indican una elevada calidad del material sintetizado<sup>62</sup>. Por otra parte, también se han estudiado las intensidades desde la perspectiva ID/IG para la caracterización del grado de desorden estructural presente en las muestras analizadas, lo cual resulta muy eficiente para indicar la eficiencia de la funcionalización, cuando el valor de la relación de intensidades se aproxima a 1, significa que un gran número de defectos superficiales está presente en la superficie del nanotubo de carbono. Sin embargo, se necesitan más esfuerzos para hacer este método de caracterización confiable y tal vez también sensitivo a defectos específicos para el caso de NTC.<sup>118</sup>



**Figura 26** Espectros Raman de NTC prístinos a) y NTC purificados b).

Los espectros Raman (Figura 26) no muestra la presencia de la banda RBM ( $100-500 \text{ cm}^{-1}$ ), la cual es característica de NTC de pared simple ya que solo en raras ocasiones se ha podido observar los modos radiales de algún tubo interno de NTC de pared múltiple<sup>119</sup>, lo cual nos indica que tenemos NTC de pared múltiple. Con respecto a la banda G el perfil es de tipo Lorentziano lo que revela NTC de tipo

semiconductor y la banda G' indica la presencia de capas de grafito ordenadas paralelamente. Además se obtuvieron los índices de calidad que se comparan con los resultados de otros autores y se discutirán enseguida. En la tabla 14 se muestran los índices de calidad en NTC prístinos y purificados de otros autores y los resultados que se obtuvieron en el presente estudio. En NTC prístinos se observa valores mayores a la unidad, por lo tanto los NTC prístinos en todos los casos pueden ser considerados de buena calidad. Por otro lado en NTC prístinos el grado de orden estructural es mayor en comparación con NTC purificados, esto se debe a la introducción de defectos en las paredes del NTC, sin embargo, en las muestras evaluadas en este estudio se siguen presentando valores mayores a la unidad. Los NTC purificados por calentamiento presenta un mayor grado de desorden en comparación de los NTC prístinos, con esto resultados se puede inferir que se logró generar grupos funcionales de oxígeno.

Al comparar los resultados obtenidos con respecto a otros autores (Tabla 13) se observa que los NTC prístinos presentan un índice de calidad mayor al obtenido en los otros estudios. Los NTC purificados solo pueden ser comparados con un estudio del cual no se tiene referencia del método de síntesis. Se compara desde el punto de vista de desorden estructural presente en la muestra, como se puede observar el grado de desorden en NTC purificados por calentamiento es menor a los demás valores, ya que el tiempo de purificación está relacionado con el aumento de grupos funcionales en el NTC se debe considerar la diferencia de tiempos y por lo cual conlleva que se obtenga un mayor grado de desorden estructural.

Los resultados muestran un incremento de defectos después de purificar los NTC prístinos, esto debido al rompimiento de enlaces en las paredes del NTC cambiando la hibridación y generando una banda D más intensa.

**Tabla 13** Índices de calidad obtenidos por espectrometría Raman.

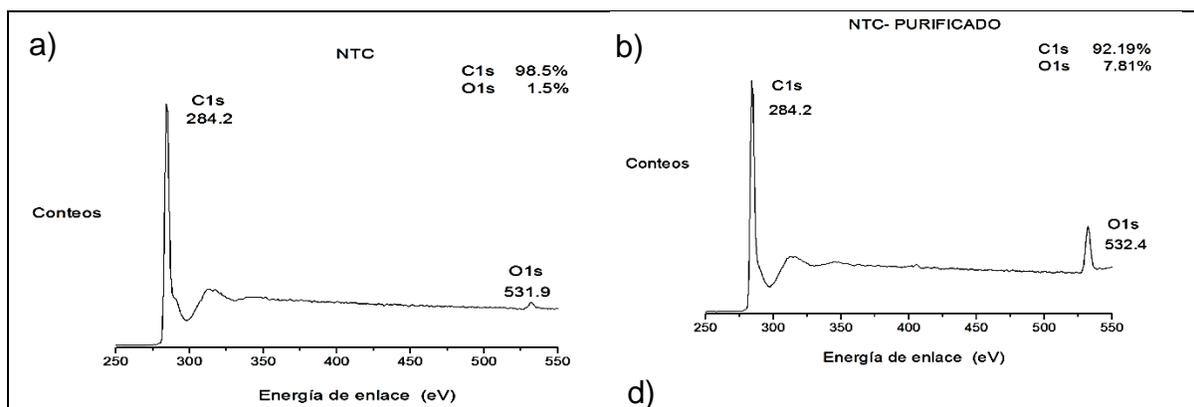
METODO DE SINTESIS DE NTC	NTC			
	Prístinos		Purificados	
	ID/IG	IG/ID	ID/IG	IG/ID
Spray pirolisis	0.533	1.91	0.537	1.87
Plasma <sup>62</sup>	-----	1.6	-----	-----
CVD <sup>73</sup>	0.854	1.17	-----	-----
----- <sup>80</sup>	0.95	-----	0.76	-----
			1.68	-----

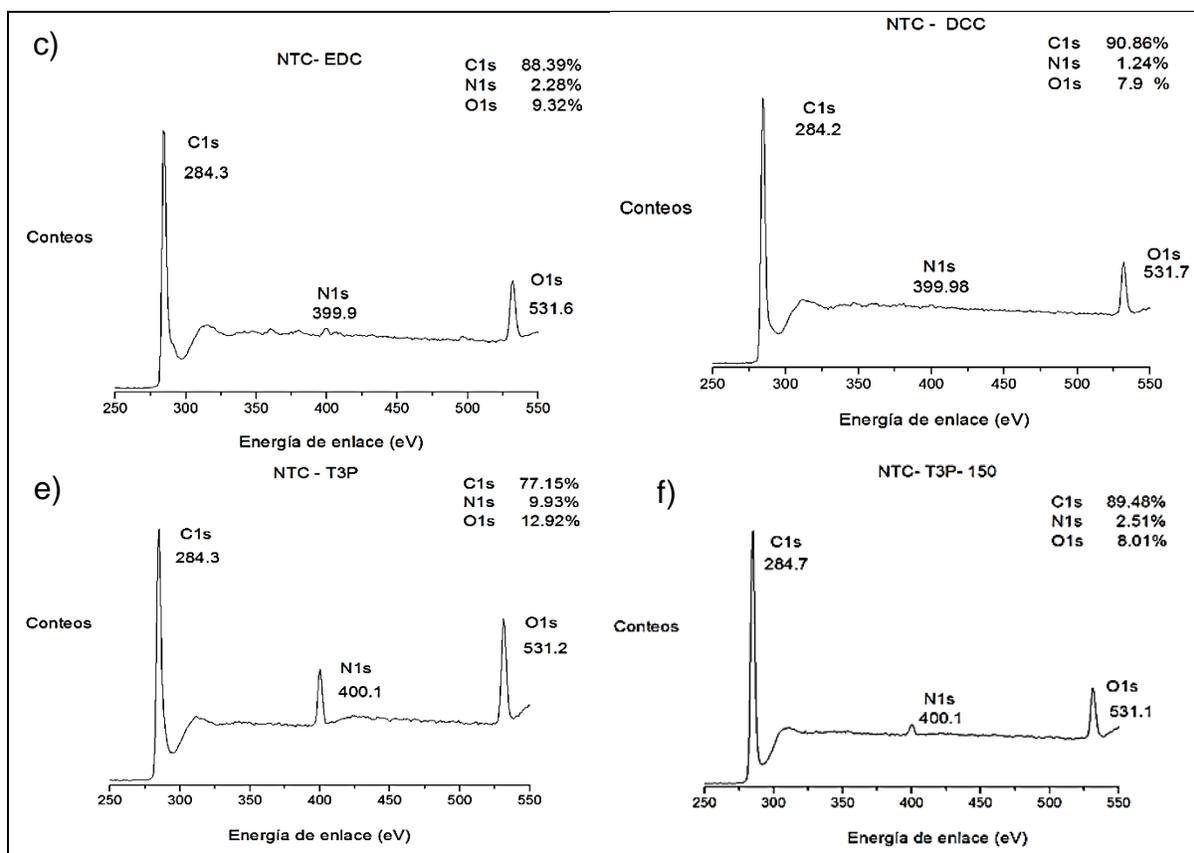
### 6.2.3.3 Titulación Bohem

De acuerdo a Chen *et al.*<sup>116</sup> encontraron un porcentaje de 1.89% en peso de grupos COOH, mientras que en nuestro estudio se encontró un porcentaje de 1.8% en peso en la titulación directa y un 1.5% en peso en la retro titulación. Esto se puede deber a los fragmentos carbonosos que se adsorben sobre la superficie del NTC y en los cuales se generan grupos funcionales de oxígeno, contribuyendo a una mayor cuantificación de estos grupos que no se encuentran dentro de la estructura del NTC<sup>120</sup>.

El tratamiento de purificación logró la generación de grupos carboxilos necesarios para llevar a cabo las reacciones de amidación.

### 6.2.3.4 Análisis simple de XPS





**Figura 27** Espectros XPS de NTC prístinos a); NTC purificados b); NTC amidados con EDC (CD4) c); NTC amidados con DCC (CD8); NTC amidados con T3P e); NTC amidados con T3P en condiciones inertes y temperatura de 150 °C.

De forma cuantitativa y cualitativa podemos observar que el NTC prístino (Figura 27 a) en su mayoría presenta carbono acompañado de un porcentaje muy pequeño de oxígeno que puede ser procedente del sustrato donde se sintetizaron los NTC. Al purificar los NTC por medio de ácidos podemos observar que el porcentaje de oxígeno se incrementa debido a la oxidación que sufre el NTC (Figura 27 b). Por otro lado al funcionalizar los NTC con diferentes activadores se observa además de la presencia de carbono y oxígeno, nitrógeno el cual es procedente de la arginina. En el caso de la reacción por medio de la carbodiimida EDC (Figura 27 c) se observa presencia de nitrógeno lo cual concuerda con lo reportado por Chen *et al.*<sup>19</sup>, el cual está presente casi en la misma proporción que en el caso donde se utilizó el T3P condiciones de temperatura (150 °C) y atmosfera inerte (Figura 27 f). La funcionalización por medio de la carbodiimida DCC (Figura 27 d) presenta el menor porcentaje de nitrógeno, siendo esta la

reacción menos eficiente. La funcionalización donde se emplea el activante TP3 (Figura 27 e) en condiciones de temperatura ambiente y sin condiciones de atmosfera inerte presenta el mayor porcentaje de nitrógeno, lo que indica que este proceso de funcionalización es el más eficiente. Estos resultados nos indican que se generó una nueva metodología de funcionalización abriendo nuevas posibilidades en esta línea de investigación.

## VII. CONCLUSIONES

- ✓ De acuerdo a la caracterización de las carbodiimidias la CD 11 es la que presenta mejores propiedades de reactividad al tener la mayor facilidad de atraer electrones, formar un anión y estabilizarse al saturarse de electrones debido a la presencia de grupos nitro en su estructura.
- ✓ El análisis de los datos teóricos de las reacciones de amidación utilizando las diferentes carbodiimidias son termodinámicamente favorables, siendo la más estable de las reacciones NTC-PEP la que tiene como activador la CD8 que puede ser debido a que la densidad electrónica se concentra en la parte central de la estructura.
- ✓ Las reacciones de amidación teóricas donde se utiliza el activador T3P son reacciones no favorables termodinámicamente, por lo que será necesario administrarles energía.
- ✓ Las enzimas son catalizadores naturales, sin embargo, no es factible utilizarse como activador en las reacciones de amidación. Esto se debe a que no existe interacción en el sitio catalítico.
- ✓ De acuerdo a los resultados experimentales las reacciones de amidación pueden llevarse a cabo por medio de diferentes activadores, siendo la más eficiente aquella donde se utiliza el T3P, esto puede ser debido a que este reactivo presenta menor porcentaje de reacciones laterales.
- ✓ Se logró desarrollar una nueva metodología para la amidación de NTC empleando el activante T3P, que ofrece mayores ventajas frente a las carbodiimidias, ya que genera mayor rendimiento.
- ✓ Con base en los resultados del análisis teórico, para las energías libres de reacción de Gibbs de la funcionalización de nanotubos de carbono, particularmente por el método de amidación, se obtuvieron los activadores más adecuados para el desarrollo experimental. Los resultados experimentales compaginaron con las predicciones teóricas planteadas.

## VIII. RECOMENDACIONES

- ✓ Las reacciones de amidación donde interviene el T3P como activante pueden ser evaluadas con otras metodologías teóricas variando funcionales y conjunto base.
- ✓ Estandarizar la reacción de amidación donde se utiliza el T3P, variando las condiciones de tiempo, temperatura, mezclado, exceso de reactivos, etc.

## IX. DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Obra Cinco Sentidos***, Colegio Bilingüe Belmont, 2012, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Experimentos científicos en la III Jornadas de ciencia y tecnología***, en el marco de la Feria del Libro, 2012, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Un Rincón para la Ciencia***, dentro de las actividades del XVIII Aniversario de CIMAV, 2012, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Experimentos científicos en la IV Jornadas de ciencia y tecnología***, en el marco de la Feria del Libro, 2013, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Taller de Integración de Padres e Hijos***, en el marco del 20 aniversario de CIMAV, 2014, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Experimentos científicos en el marco de la Feria Infantil de Arte y Ciencia***, 2015, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Funcionalización de nanotubos de Carbono mediante diferentes activadores***, Sesión de póster de divulgación científica, 2015, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Experimentos Científicos en el marco de la Feria Infantil y Juvenil de Arte y Ciencia 2016***, 2016. Chihuahua, Chih.

## X. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, Erasmo Orrantia Borunda, Norma Flores Holguín, ***Estudio Teórico de Nanotubos de Carbono Funcionalizados***, XI Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica, 2012, Toluca de Lerdo, México.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Estudió teórico de Nanotubos de Carbono Funcionalizados***, Semana académica de la Universidad Junta de los Ríos, 2013, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, Erasmo Orrantia Borunda, Norma Flores Holguín, ***Estudio de estados de transición en la funcionalización de nanotubos de carbono***, XII Reunión Mexicana de Físico Química Teórica, 2013, Querétaro, Qto.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***En búsqueda de un método verde de Funcionalización de Nanotubos de carbono***, IX congreso CIMAV, 2014, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Reactividad química global y local de carbodiimidas***, XIII Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica, 2014, Morelia, Michoacán.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***En búsqueda de un método verde para la funcionalización de nanotubos de carbono***, como parte de los seminarios de CIMAV, 2015, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, Erasmo Orrantia Borunda, Norma Flores Holguín, ***Funcionalización de Nanotubos de Carbono***, Expo-Foro 2015 “Chihuahua Vive Innovando”, 2015, Chihuahua, Chih.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Energías de formación en reacciones de funcionalización de nanotubos de carbono***, XIV Reunión Mexicana de Físicoquímica teórica, 2015, Guadalajara, Jalisco.
- ✓ Kathy A. Ramírez Balderrama, ***Energías de formación en reacciones de funcionalización de nanotubos de carbono***, XV Reunión Mexicana de Físicoquímica teórica, 2016, Mérida, Yucatán.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A., Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *297* (5582), 787-792.
2. Prlainović, N. Ž.; Bezbradica, D. I.; Rogan, J. R.; Uskoković, P. S.; Mijin, D. Ž.; Marinković, A. D., Surface functionalization of oxidized multi-walled carbon nanotubes: Candida rugosa lipase immobilization. *Comptes Rendus Chimie* **2016**, *19* (3), 363-370.
3. Liang, F.; Chen, B., A review on biomedical applications of single-walled carbon nanotubes. *Current medicinal chemistry* **2010**, *17* (1), 10-24.
4. Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N., Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (New York, N.Y.)* **2006**, *311* (5761), 622-7.
5. Sobhani, Z.; Dinarvand, R.; Atyabi, F.; Ghahremani, M.; Adeli, M., Increased paclitaxel cytotoxicity against cancer cell lines using a novel functionalized carbon nanotube. *International journal of nanomedicine* **2011**, *6*, 705-19.
6. Kang, S.; Herzberg, M.; Rodrigues, D. F.; Elimelech, M., Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! *Langmuir* **2008**, *24* (13), 6409-6413.
7. Vecitis, C. D.; Schnoor, M. H.; Rahaman, M. S.; Schiffman, J. D.; Elimelech, M., Electrochemical Multiwalled Carbon Nanotube Filter for Viral and Bacterial Removal and Inactivation. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45* (8), 3672-3679.
8. Mohan, R.; Shanmugaraj, A. M.; Sung Hun, R., An efficient growth of silver and copper nanoparticles on multiwalled carbon nanotube with enhanced antimicrobial activity. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **2011**, *96* (1), 119-26.
9. Brady-Estévez, A. S.; Schnoor, M. H.; Kang, S.; Elimelech, M., SWNT–MWNT Hybrid Filter Attains High Viral Removal and Bacterial Inactivation. *Langmuir* **2010**, *26* (24), 19153-19158.
10. Banerjee, I.; Mondal, D.; Martin, J.; Kane, R. S., Photoactivated antimicrobial activity of carbon nanotube-porphyrin conjugates. *Langmuir* **2010**, *26* (22), 17369-74.
11. Liu, M.; Chen, B.; Xue, Y.; Huang, J.; Zhang, L.; Huang, S.; Li, Q.; Zhang, Z., Polyamidoamine-Grafted Multiwalled Carbon Nanotubes for Gene Delivery: Synthesis, Transfection and Intracellular Trafficking. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22* (11), 2237-2243.
12. Hassan, H. A. F. M.; Smyth, L.; Rubio, N.; Ratnasothy, K.; Wang, J. T. W.; Bansal, S. S.; Summers, H. D.; Diebold, S. S.; Lombardi, G.; Al-Jamal, K. T., Carbon nanotubes' surface chemistry determines their potency as vaccine nanocarriers in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release* **2016**, *225*, 205-216.
13. Rege, K.; Ravavikar, N. R.; Kim, D.-Y.; Schadler, L. S.; Ajayan, P. M.; Dordick, J. S., Enzyme–Polymer–Single Walled Carbon Nanotube Composites as Biocatalytic Films. *Nano Letters* **2003**, *3* (6), 829-832.
14. Wang, Y.; Tang, Z.; Kotov, N. A., Bioapplication of nanosemiconductors. *Materials Today* **2005**, *8* (5, Supplement 1), 20-31.

15. Cai, H.; Cao, X.; Jiang, Y.; He, P.; Fang, Y., Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *375* (2), 287-293.
16. Singh, K. V.; Pandey, R. R.; Wang, X.; Lake, R.; Ozkan, C. S.; Wang, K.; Ozkan, M., Covalent functionalization of single walled carbon nanotubes with peptide nucleic acid: Nanocomponents for molecular level electronics. *Carbon* **2006**, *44* (9), 1730-1739.
17. Cabral, M. F.; Barrios, J. D.; Kataoka, E. M.; Machado, S. A. S.; Carrilho, E.; Garcia, C. D.; Ayon, A. A., Computational, electrochemical, and spectroscopic, studies of acetylcholinesterase covalently attached to carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *103*, 624-629.
18. Cabral, M. F.; Sgobbi, L. F.; Kataoka, E. M.; Machado, S. A. S., On the behavior of acetylcholinesterase immobilized on carbon nanotubes in the presence of inhibitors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *111*, 30-35.
19. Chen, Q.; Chen, M.; Zhou, J.; Han, Q.; Wang, Y.; Fu, Y., The application of chiral arginine and multi-walled carbon nanotubes as matrices to monitor hydrogen peroxide. *Bioelectrochemistry* **2013**, *91*, 32-36.
20. Fu, Y.; Chen, M.; Cui, X.; Wang, L.; Chen, Q.; Zhou, J., Recognition behavior of chiral nanocomposites toward biomolecules and its application in electrochemical immunoassay. *Science China Chemistry* **2010**, *53* (6), 1453-1458.
21. Lian, Y.; Maeda, Y.; Wakahara, T.; Akasaka, T.; Kazaoui, S.; Minami, N.; Shimizu, T.; Choi, N.; Tokumoto, H., Nondestructive and High-Recovery-Yield Purification of Single-Walled Carbon Nanotubes by Chemical Functionalization. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (26), 8848-8854.
22. Madhu, C.; Basavaprabhu; Vishwanatha, T. M.; Sureshbabu, V. V., T3P (propylphosphonic anhydride) mediated conversion of N $\alpha$ -protected amino/peptide acids into thioacids. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (11), 1406-1409.
23. Sharnabai, K. M.; Nagendra, G.; Vishwanatha, T. M.; Sureshbabu, V. V., Efficient synthesis of N-protected amino/peptide Weinreb amides from T3P and DBU. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54* (6), 478-482.
24. Burnham, O. W. J. Facilitating Non-Covalent Interactions: 'Nanoglue' for DNA-CNT Nanohybrid Complexes.
25. Schlick, T., *Molecular Modeling and simulation An interdisciplinary Guide*. 2002.
26. Lewars, E. G., *Computational Chemistry Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. Kluwer Academy Publishers: United States of America, 2003.
27. Boyd, K. B. L. D. B., *Reviews in computational chemistry*. VCH Publishers, Inc.: 1990; p 419.
28. foresman, J. B. F., A.E., *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods* Gaussian, Inc.: U.S.A., 1996; Vol. Second Edition.
29. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry* **2009**, *30* (16), 2785-91.

30. Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W., Conceptual Density Functional Theory. *Chemical Reviews* **2003**, *103* (5), 1793-1874.
31. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review. B, Condensed matter* **1988**, *37* (2), 785-789.
32. Raghavachari, K., Perspective on "Density functional thermochemistry. III. The role of exact exchange". In *Theoretical Chemistry Accounts: New Century Issue*, Cramer, C. J.; Truhlar, D. G., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2001; pp 361-363.
33. Adamo, C.; Barone, V., Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *The Journal of Chemical Physics* **1999**, *110* (13), 6158-6170.
34. Zhao, Y.; Truhlar, D. G., A new local density functional for main-group thermochemistry, transition metal bonding, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *The Journal of Chemical Physics* **2006**, *125* (19), 194101.
35. Zhao, Y.; Truhlar, D. G., The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts* **2008**, *120* (1), 215-241.
36. Slater, J. C., Atomic Shielding Constants. *Physical Review* **1930**, *36* (1), 57-64.
37. Magalhães, A. L., Gaussian-Type Orbitals versus Slater-Type Orbitals: A Comparison. *Journal of Chemical Education* **2014**, *91* (12), 2124-2127.
38. Boys, S. F., Electronic Wave Functions. I. A General Method of Calculation for the Stationary States of Any Molecular System. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1950**, *200* (1063), 542-554.
39. Wang, C.; Clark li, J. K.; Kumar, M.; Paddison, S. J., An ab initio study of the primary hydration and proton transfer of CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H and CF<sub>3</sub>O(CF<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H: Effects of the hybrid functional and inclusion of diffuse functions. *Solid State Ionics* **2011**, *199-200*, 6-13.
40. Mizera, M.; Lewadowska, K.; Talaczyńska, A.; Cielecka-Piontek, J., Computational study of influence of diffuse basis functions on geometry optimization and spectroscopic properties of losartan potassium. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *137*, 1029-1038.
41. Parr, R. G.; Donnelly, R. A.; Levy, M.; Palke, W. E., Electronegativity: The density functional viewpoint. *The Journal of Chemical Physics* **1978**, *68* (8), 3801-3807.
42. Parr, R. G.; Pearson, R. G., Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (26), 7512-7516.
43. Pearson, R. G., Chemical hardness and density functional theory. *Journal of Chemical Sciences* **2005**, *117* (5), 369-377.
44. Yang, R. G. P. W., Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Press: New York, 1989.
45. P.K. Chattaraj, S. N., B. Maiti, Reactivity descriptors, in: P.; Bultnick, H. D. W., W. Langenaeker, J.P. Tollenaere *Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery*. Marcel Dekker Inc.: 2004.

46. Parr, R. G.; Szentpály, L. v.; Liu, S., Electrophilicity Index. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (9), 1922-1924.
47. Gázquez, J. L.; Cedillo, A.; Vela, A., Electrodonating and Electroaccepting Powers. *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111* (10), 1966-1970.
48. Gázquez, J. L., Perspectives on the Density Functional Theory of Chemical Reactivity. *Journal of the Mexican Chemical Society* **2008**, *52*, 3-10.
49. Chattaraj, P. K.; Chakraborty, A.; Giri, S., Net Electrophilicity. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113* (37), 10068-10074.
50. Parr, R. G.; Yang, W., Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106* (14), 4049-4050.
51. Morell, C.; Grand, A.; Toro-Labbé, A., New Dual Descriptor for Chemical Reactivity. *The Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109* (1), 205-212.
52. Morell, C.; Grand, A.; Toro-Labbé, A., Theoretical support for using the  $\Delta f(r)$  descriptor. *Chemical Physics Letters* **2006**, *425* (4-6), 342-346.
53. Iijima, S.; Ichihashi, T., Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* **1993**, *363* (6430), 603-605.
54. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354* (6348), 56-58.
55. He, H.; Pham-Huy, L. A.; Dramou, P.; Xiao, D.; Zuo, P.; Pham-Huy, C., Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. *BioMed Research International* **2013**, *2013*, 12.
56. Hamada, N.; Sawada, S.-i.; Oshiyama, A., New one-dimensional conductors: Graphitic microtubules. *Physical Review Letters* **1992**, *68* (10), 1579-1581.
57. Kanoun, O.; Müller, C.; Benchirouf, A.; Sanli, A.; Dinh, T.; Al-Hamry, A.; Bu, L.; Gerlach, C.; Bouhamed, A., Flexible Carbon Nanotube Films for High Performance Strain Sensors. *Sensors* **2014**, *14* (6), 10042.
58. Popov, V. N., Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2004**, *43* (3), 61-102.
59. Dai, H., Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties. *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35* (12), 1035-1044.
60. Kong, J.; Cassell, A. M.; Dai, H., Chemical vapor deposition of methane for single-walled carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters* **1998**, *292* (4-6), 567-574.
61. Bhatia, R.; Prasad, V., Synthesis of multiwall carbon nanotubes by chemical vapor deposition of ferrocene alone. *Solid State Communications* **2010**, *150* (7-8), 311-315.
62. CALZADA, C. M. D.; JIMÉNEZ, B. M., Método de producción de nanotubos de carbono en ausencia de catalizadores metálicos. Google Patents: 2012.
63. Malek Abbaslou, R. M.; Soltan, J.; Dalai, A. K., The effects of carbon concentration in the precursor gas on the quality and quantity of carbon nanotubes synthesized by CVD method. *Applied Catalysis A: General* **2010**, *372* (2), 147-152.
64. Gore, J. P.; Sane, A., *Flame Synthesis of Carbon Nanotubes*. 2011.
65. Shelimov, K. B.; Esenaliev, R. O.; Rinzler, A. G.; Huffman, C. B.; Smalley, R. E., Purification of single-wall carbon nanotubes by ultrasonically assisted filtration. *Chemical Physics Letters* **1998**, *282* (5-6), 429-434.

66. Huang, H.; Kajiura, H.; Yamada, A.; Ata, M., Purification and alignment of arc-synthesis single-walled carbon nanotube bundles. *Chemical Physics Letters* **2002**, *356* (5–6), 567-572.
67. Li, H.; Feng, L.; Guan, L.; Shi, Z.; Gu, Z., Synthesis and purification of single-walled carbon nanotubes in the cottonlike soot. *Solid State Communications* **2004**, *132* (3–4), 219-224.
68. Chiang, I. W.; Brinson, B. E.; Smalley, R. E.; Margrave, J. L.; Hauge, R. H., Purification and Characterization of Single-Wall Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (6), 1157-1161.
69. Li, J.; Zhang, Y., A simple purification for single-walled carbon nanotubes. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2005**, *28* (3), 309-312.
70. Strong, K. L.; Anderson, D. P.; Lafdi, K.; Kuhn, J. N., Purification process for single-wall carbon nanotubes. *Carbon* **2003**, *41* (8), 1477-1488.
71. Rinzler, A. G.; Liu, J.; Dai, H.; Nikolaev, P.; Huffman, C. B.; Rodríguez-Macías, F. J.; Boul, P. J.; Lu, A. H.; Heymann, D.; Colbert, D. T.; Lee, R. S.; Fischer, J. E.; Rao, A. M.; Eklund, P. C.; Smalley, R. E., Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: process, product, and characterization. *Applied Physics A* **1998**, *67* (1), 29-37.
72. A. C. Dillon; T. Gennett; K. M. Jones; J. L. Alleman; P. A. Parilla; Heben, M. J., A Simple and Complete Purification of Single-Walled Carbon Nanotube Materials. *Advanced Materials* **1999**, *11* (16), 1354-1999.
73. Raffa, V.; Ciofani, G.; Nitodas, S.; Karachalios, T.; D'Alessandro, D.; Masini, M.; Cuschieri, A., Can the properties of carbon nanotubes influence their internalization by living cells? *Carbon* **2008**, *46* (12), 1600-1610.
74. Yu, A.; Bekyarova, E.; Itkis, M. E.; Fakhruddinov, D.; Webster, R.; Haddon, R. C., Application of Centrifugation to the Large-Scale Purification of Electric Arc-Produced Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (30), 9902-9908.
75. Park, K. C.; Hayashi, T.; Tomiyasu, H.; Endo, M.; Dresselhaus, M. S., Progressive and invasive functionalization of carbon nanotube sidewalls by diluted nitric acid under supercritical conditions. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15* (3), 407-411.
76. Zhao, N.; He, C.; Li, J.; Jiang, Z.; Li, Y., Study on purification and tip-opening of CNTs fabricated by CVD. *Materials Research Bulletin* **2006**, *41* (12), 2204-2209.
77. Liu, M.; Yang, Y.; Zhu, T.; Liu, Z., Chemical modification of single-walled carbon nanotubes with peroxytrifluoroacetic acid. *Carbon* **2005**, *43* (7), 1470-1478.
78. Schönfelder, R.; Rummeli, M. H.; Gruner, W.; Löffler, M.; Acker, J.; Hoffmann, V.; Gemming, T.; Büchner, B.; Pichler, T., Purification-induced sidewall functionalization of magnetically pure single-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology* **2007**, *18* (37), 375601.
79. Jia, H.; Lian, Y.; Ishitsuka, M. O.; Nakahodo, T.; Maeda, Y.; Tsuchiya, T.; Wakahara, T.; Akasaka, T., Centrifugal purification of chemically modified single-walled carbon nanotubes. *Science and Technology of Advanced Materials* **2005**, *6* (6), 571-581.
80. Rike Yudianti, H. O., Sudirman, Yukie Saito, Tadahisa Iwata, Jun-ichi Azuma, Analysis of Functional Group Sited on Multi-Wall Carbon Nanotube Surface  
*The Open Materials Science Journal* **2011**, *9* (5), 242-247.

81. Velasco-Santos, C. M.-H., A. L.; Fuentes-Ramírez, R.; Galindo-Esquivel, I. R.; Sánchez-Márquez, J. A., Análisis de la modificación superficial de los nanotubos de carbono sometidos a distintos tratamientos de oxidación. *Acta Universitaria* **2013**, 17-22.
82. Venkatesan, N.; Yoshimitsu, J.; Ito, Y.; Shibata, N.; Takada, K., Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials* **2005**, 26 (34), 7154-7163.
83. Hariharasubramanian, A.; Dominic Ravichandran, Y.; Rajesh, R.; Rajendra Kumar, K.; Kanagaraj, M.; Arumugam, S., Covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with anthracene by green chemical approach and their temperature dependent magnetic and electrical conductivity studies. *Materials Chemistry and Physics* **2014**, 143 (2), 838-844.
84. Vogel, S. R.; Müller, K.; Plutowski, U.; Kappes, M. M.; Richert, C., DNA-carbon nanotube interactions and nanostructuring based on DNA. *physica status solidi (b)* **2007**, 244 (11), 4026-4029.
85. S. R. Shin; C. K. Lee; I. S. So; J. H. Jeon; T. M. Kang; C. W. Kee; S. I. Kim; G. M. Spinks; G. G. Wallace; Kim, S. J., DNA-Wrapped Single-Walled Carbon Nanotube Hybrid Fibers for supercapacitors and Artificial Muscles. *Advanced Materials* **2008**, 20 (3), 466-470.
86. Mu, Q.; Liu, W.; Xing, Y.; Zhou, H.; Li, Z.; Zhang, Y.; Ji, L.; Wang, F.; Si, Z.; Zhang, B.; Yan, B., Protein Binding by Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes Is Governed by the Surface Chemistry of Both Parties and the Nanotube Diameter. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112 (9), 3300-3307.
87. Nakayama-Ratchford, N.; Bangsaruntip, S.; Sun, X.; Welsher, K.; Dai, H., Noncovalent Functionalization of Carbon Nanotubes by Fluorescein-Polyethylene Glycol: Supramolecular Conjugates with pH-Dependent Absorbance and Fluorescence. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (9), 2448-2449.
88. Vairavapandian, D.; Vichchulada, P.; Lay, M. D., Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 626 (2), 119-129.
89. Meng, L.; Fu, C.; Lu, Q., Advanced technology for functionalization of carbon nanotubes. *Progress in Natural Science* **2009**, 19 (7), 801-810.
90. Zheng, M.; Jagota, A.; Strano, M. S.; Santos, A. P.; Barone, P.; Chou, S. G.; Diner, B. A.; Dresselhaus, M. S.; Mclean, R. S.; Onoa, G. B.; Samsonidze, G. G.; Semke, E. D.; Usrey, M.; Walls, D. J., Structure-Based Carbon Nanotube Sorting by Sequence-Dependent DNA Assembly. *Science (New York, N.Y.)* **2003**, 302 (5650), 1545-1548.
91. Zheng, M.; Jagota, A.; Semke, E. D.; Diner, B. A.; McLean, R. S.; Lustig, S. R.; Richardson, R. E.; Tassi, N. G., DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nat Mater* **2003**, 2 (5), 338-342.
92. Ellison, M. D.; Chorney, M., Reaction of folic acid with single-walled carbon nanotubes. *Surface Science* **2016**.
93. Basiuk, E. V.; Ramírez-Calera, I. J.; Meza-Laguna, V.; Abarca-Morales, E.; Pérez-Rey, L. A.; Re, M.; Prete, P.; Lovergine, N.; Álvarez-Zauco, E.; Basiuk, V. A., Solvent-free functionalization of carbon nanotube buckypaper with amines. *Applied Surface Science* **2015**, 357, Part B, 1355-1368.

94. Ramírez-Calera, I. J.; Meza-Laguna, V.; Gromovoy, T. Y.; Chávez-Uribe, M. I.; Basiuk, V. A.; Basiuk, E. V., Solvent-free functionalization of fullerene C<sub>60</sub> and pristine multi-walled carbon nanotubes with aromatic amines. *Applied Surface Science* **2015**, *328*, 45-62.
95. Ramanathan, T.; Fisher, F. T.; Ruoff, R. S.; Brinson, L. C., Amino-Functionalized Carbon Nanotubes for Binding to Polymers and Biological Systems. *Chemistry of Materials* **2005**, *17* (6), 1290-1295.
96. Peng, Z.; Holm, A. H.; Nielsen, L. T.; Pedersen, S. U.; Daasbjerg, K., Covalent Sidewall Functionalization of Carbon Nanotubes by a "Formation–Degradation" Approach. *Chemistry of Materials* **2008**, *20* (19), 6068-6075.
97. Gabriel, G.; Sauthier, G.; Fraxedas, J.; Moreno-Mañas, M.; Martínez, M. T.; Miravittles, C.; Casabó, J., Preparation and characterisation of single-walled carbon nanotubes functionalised with amines. *Carbon* **2006**, *44* (10), 1891-1897.
98. Park, M.-S.; Kim, K. H.; Lee, Y.-S., Fluorination of single-walled carbon nanotube: The effects of fluorine on structural and electrical properties. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2006**.
99. Jung, M.-J.; Jeong, E.; Lee, Y.-S., The surface chemical properties of multi-walled carbon nanotubes modified by thermal fluorination for electric double-layer capacitor. *Applied Surface Science* **2015**, *347*, 250-257.
100. Chamssedine, F.; Guérin, K.; Dubois, M.; Disa, E.; Petit, E.; Fawal, Z. E.; Hamwi, A., Fluorination of single walled carbon nanotubes at low temperature: Towards the reversible fluorine storage into carbon nanotubes. *Journal of Fluorine Chemistry* **2011**, *132* (12), 1072-1078.
101. Im, J. S.; Chang Kang, S.; Bai, B. C.; Suh, J.-K.; Lee, Y.-S., Effect of thermal fluorination on the hydrogen storage capacity of multi-walled carbon nanotubes. *International Journal of Hydrogen Energy* **2011**, *36* (2), 1560-1567.
102. Lee, S.-E.; Lee, M. Y.; Lee, M.-K.; Jeong, E.; Lee, Y.-S., Effect of fluorination on the mechanical behavior and electromagnetic interference shielding of MWCNT/epoxy composites. *Applied Surface Science* **2016**, *369*, 189-195.
103. Mickelson, E. T.; Huffman, C. B.; Rinzler, A. G.; Smalley, R. E.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L., Fluorination of single-wall carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters* **1998**, *296* (1–2), 188-194.
104. Araújo, R. F.; Proença, M. F.; Silva, C. J.; Castro, T. G.; Melle-Franco, M.; Paiva, M. C.; Villar-Rodil, S.; Tascón, J. M. D., Grafting of adipic anhydride to carbon nanotubes through a Diels-Alder cycloaddition/oxidation cascade reaction. *Carbon* **2016**, *98*, 421-431.
105. Jarrahpour, A.; Doroodmand, M. M.; Ebrahimi, E., The first report of [2+2] ketene–imine cycloaddition reactions (Staudinger) on carbon nanotubes. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (23), 2797-2801.
106. Lawson, D. B.; Walker, A., Cycloaddition of ethene on a series of single-walled carbon nanotubes. *Computational and Theoretical Chemistry* **2012**, *981*, 31-37.
107. Utegulov, Z. N.; Mast, D. B.; He, P.; Shi, D.; Gilland, R. F., Functionalization of single-walled carbon nanotubes using isotropic plasma treatment: Resonant Raman spectroscopy study. *Journal of Applied Physics* **2005**, *97* (10), 104324.

108. Xu, Y.; Wang, X.; Tian, R.; Li, S.; Wan, L.; Li, M.; You, H.; Li, Q.; Wang, S., Microwave-induced electrophilic addition of single-walled carbon nanotubes with alkylhalides. *Applied Surface Science* **2008**, *254* (8), 2431-2435.
109. Dyke, C. A.; Tour, J. M., Solvent-Free Functionalization of Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (5), 1156-1157.
110. Mohamed, N. M.; Irshad, M. I.; Abdullah, M. Z.; Saheed, M. S. M., Novel growth of carbon nanotubes on nickel nanowires. *Diamond and Related Materials* **2016**, *65*, 59-64.
111. Zhang, Z.; Pfefferle, L.; Haller, G. L., Characterization of functional groups on oxidized multi-wall carbon nanotubes by potentiometric titration. *Catalysis Today* **2015**, *249*, 23-29.
112. Sheng, G.; Alsaedi, A.; Shammakh, W.; Monaquel, S.; Sheng, J.; Wang, X.; Li, H.; Huang, Y., Enhanced sequestration of selenite in water by nanoscale zero valent iron immobilization on carbon nanotubes by a combined batch, XPS and XAFS investigation. *Carbon* **2016**, *99*, 123-130.
113. Jeong, Y. N.; Choi, M. Y.; Choi, H. C., Preparation of Pt- and Pd-decorated CNTs by DCC-activated amidation and investigation of their electrocatalytic activities. *Electrochimica Acta* **2012**, *60*, 78-84.
114. Aguilar-Elguézabal, A.; Antúnez, W.; Alonso, G.; Delgado, F. P.; Espinosa, F.; Miki-Yoshida, M., Study of carbon nanotubes synthesis by spray pyrolysis and model of growth. *Diamond and Related Materials* **2006**, *15* (9), 1329-1335.
115. Das, N.; Dalai, A.; Soltan Mohammadzadeh, J. S.; Adjaye, J., The effect of feedstock and process conditions on the synthesis of high purity CNTs from aromatic hydrocarbons. *Carbon* **2006**, *44* (11), 2236-2245.
116. Chen, J.; Chen, Q.; Ma, Q., Influence of surface functionalization via chemical oxidation on the properties of carbon nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, *370* (1), 32-38.
117. Hu, H.; Bhowmik, P.; Zhao, B.; Hamon, M. A.; Itkis, M. E.; Haddon, R. C., Determination of the acidic sites of purified single-walled carbon nanotubes by acid–base titration. *Chemical Physics Letters* **2001**, *345* (1–2), 25-28.
118. Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R.; Jorio, A., Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Physics Reports* **2005**, *409* (2), 47-99.
119. Zhao, X.; Ando, Y.; Qin, L.-C.; Kataura, H.; Maniwa, Y.; Saito, R., Radial breathing modes of multiwalled carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters* **2002**, *361* (1–2), 169-174.
120. Salzmann, C. G.; Llewellyn, S. A.; Tobias, G.; Ward, M. A. H.; Huh, Y.; Green, M. L. H., The Role of Carboxylated Carbonaceous Fragments in the Functionalization and Spectroscopy of a Single-Walled Carbon-Nanotube Material. *Advanced Materials* **2007**, *19* (6), 883-887.