

Este artículo puede ser usado únicamente para uso personal o académico. Cualquier otro uso requiere permiso del autor o editor.

El siguiente artículo fue publicado en *Boletín del Grupo Español del Carbón*, 43: 13-16 (2017); y lo puede consultar en <http://www.gecarbon.org/boletin.asp>

Enzymatic degradation of nitrogen-doped multiwall carbon nanotubes

Degradación enzimática de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno

G. Azuara-Tuexi^{1,2}, F. López-Urías¹, M. Quintana², E. Muñoz-Sandoval^{1*}

¹Advanced Materials Division, IPICYT, Camino a presa San José 2055, Lomas 4a sección, San Luis Potosí 78216, México.

²Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, UASLP, Av. Manuel Nava #6, Zona Universitaria, C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P. México.

* Corresponding Author: ems@ipicyt.edu.mx

RESUMEN

Es bien conocido que a la fecha la toxicidad de los nanotubos de carbono aún no está bien estudiada. Muy recientemente se estableció que los nanotubos de carbono llamados MWCNT-7 sean clasificados como posiblemente carcinogénicos para los humanos [1]. Este resultado es muy importante ya que promueve una evaluación muy cuidadosa de las nanoestructuras de carbono cada vez que se pretenda comercializarlos mediante una aplicación. Por tanto, el estudio de la interacción de estos materiales de carbono con sistemas biológicos es de fundamental importancia para el desarrollo seguro de nanomateriales, en particular de nanomateriales de carbono. En este trabajo presentamos resultados referentes a la respuesta de nanotubos de carbono multicapas dopados con nitrógeno (N-MWCNTs) al estar expuestos a la enzima peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*, HRP, por sus siglas en inglés). De acuerdo a los resultados de la caracterización de microscopía electrónica de barrido y de transmisión, encontramos que la degradación de los N-MWCNTs aumenta a medida que el tiempo de exposición aumenta. Los mecanismos de degradación se discuten de acuerdo a estos resultados.

ABSTRACT

It is well known that to date the toxicity of carbon nanotubes is not well studied. Most recently it was established that carbon nanotubes called MWCNT-7 are classified as possibly carcinogenic to humans [1]. This result is very important because it promotes a very careful assessment of the carbon nanostructures whenever intended to market by a specific application. Therefore, the study of the interaction of these carbon materials with biological systems is critical to the safe development of nanomaterials, particularly carbon nanomaterials. We present results concerning the response of nitrogen-doped multiwall carbon nanotubes (N-MWCNTs) when exposed to the enzyme horseradish peroxidase (HRP). According to the results of the characterization of scanning electron microscopy and transmission, we found that the degradation of N-MWCNTs increases as the exposure time increases. The mechanism of degradation is discussed according to these results.

INTRODUCCIÓN

Los nanotubos de carbonón continúan siendo uno de los nanomateriales que más se han estudiado en las dos últimas décadas. En la primera parte de su desarrollo, entre los años 1991 y 2000, se les adjudicaron muchísimas propiedades potenciales que posiblemente iban a invadir todos los ámbitos de la industria [2]. Sin embargo, debido al descubrimiento experimental del grafeno su importancia disminuyó considerablemente y la del grafeno aumentó drásticamente [2,3]. No obstante esta situación, los nanotubos de carbono siguen siendo uno de los nanomateriales con mayor número de publicaciones y con aplicaciones industriales que están verdaderamente avanzando con éxito [4]. Recientemente se han analizado los alcances de las investigaciones y aplicaciones del carbono [5]. En este mismo estudio se reconocen varias áreas con mucho potencial para el caso de nanomateriales, y también se presentan las dificultades que este tipo de estructuras pueden tener con respecto a la toxicidad para los humanos y los posibles daños al medio ambiente, si su fabricación, desarrollo y uso de estos nanocarbons no se hace de manera responsable y en forma segura [5]. Por esta situación, es muy importante estudiar las interacciones de los nanomateriales de carbono con los seres vivos en general y, en particular, los daños biológicos que los nanotubos de carbono dopados y sin dopar pueden causar. El dopaje de MWCNTs con nitrógeno, es decir la incorporación de un átomo de nitrógeno en las redes grafiticas de los MWCNT ayuda, por ejemplo, a mejorar la reactividad química de la superficie. Recientemente, y con el fin de dilucidar la bioactividad de los nanotubos de carbono de múltiples capas dopados con nitrógeno (N-MWCNTs) en las células humanas, se estudiaron los efectos de sus propiedades físico-químicas en estos sistemas biológicos y se compararon con el caso de los conocidos MWCNT-7 [6]. En este sentido, la bibliografía recoge ejemplos en los que el dopaje con átomos de nitrógeno en las capas de carbono de los MWCNTs aumentó su biocompatibilidad [7]. Por otra parte, ya se ha mostrado que N-MWCNTs que habían sido previamente tratados con ácidos presentan citotoxicidad a altas dosis, es decir, su toxicidad depende directamente de su concentración [8]. También se ha investigado la citocompatibilidad y hemocompatibilidad de MWCNTs sin dopar y

N-MWCNTs sintetizados por deposición química en fase vapor [9]. En este caso los resultados mostraron que N-MWCNTs tienen una buena citocompatibilidad, pero presentan cierto grado de toxicidad en el curso del cultivo. Independientemente de los resultados que se han encontrado con respecto a la toxicidad de los nanotubos de carbono, es necesario plantear estrategias que permitan disminuir el efecto negativo que pudieran tener los nanotubos de carbono en un sistema biológico. Una de las rutas para hacer desaparecer a los nanotubos de carbono (NTC) toda vez que hayan cumplido con su misión, es su degradación mediante protocolos biológicos. Por tanto, implementando el uso de diferentes métodos de degradación de MWCNT se ha podido demostrar que los NTC pueden ser eliminados mediante el uso de enzimas [10-13]. Siguiendo la referencia [10], en este trabajo se ha estudiado la respuesta que los N-MWCNTs previamente funcionalizados tienen ante un tratamiento biológico usando la enzima peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés) como eliminador de los nanotubos de carbono y usando como sustrato de la enzima el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se encuentra que hay una mayor degradación cuando se realiza un tratamiento ácido a los nanotubos previo a su degradación enzimática.

METODOLOGIA

Los nanotubos de carbono de paredes múltiples dopados con nitrógeno fueron fabricados mediante la pirólisis de una disolución compuesta de ferroceno ($Fe(C_5H_5)_2$) y de bencilamina ($C_6H_5CH_2NH_2$) usando el método de deposición química de vapor asistida por aerosol (*Aerosol-Assisted Chemical Vapor Deposition*, AACVD, por sus siglas en inglés). La solución se preparó con 2.5% de ferroceno y 97.5% de bencilamina, ambas en peso. La bencilamina se utiliza para incluir átomos de nitrógeno a la red grafitica de los N-MWCNTs, aunque también es una fuente de átomos de carbono. En el caso del ferroceno, se utiliza para generar las nanopartículas de hierro o de carburo de hierro que son el catalizador para la producción de N-MWCNTs. El ferroceno también contribuye con átomos de carbono para la fabricación de estos nanotubos de carbono. El material depositado dentro del tubo de cuarzo, que es utilizado como reactor, se obtuvo raspando cuidadosamente centímetro por centímetro la superficie del tubo de cuarzo y se recogió en papel encerado que se utiliza para pesar. El material obtenido de cada centímetro, se pesa y se almacena en papel de aluminio para su posterior funcionalización y caracterización. Todas las muestras obtenidas después de la síntesis, de la funcionalización con ácidos y las degradadas se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido usando un microscopio Nanolab FEI Helios 600 que funciona a 5 kV. También se usó para la caracterización morfológica un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM por sus siglas en inglés) de 300 kV FEI Tecnai F30 STWIN G2. La funcionalización química de los N-MWCNTs se realizó utilizando una mezcla acuosa 4 M de ácido

sulfúrico y ácido nítrico (3:1, v/v), dando un total de 400 ml de una mezcla homogénea. La relación entre los N-MWCNTs y la mezcla de ácido fue de 1 (x ml de ácido para x mg de N-MWCNTs). Esta sustancia se sometió a una agitación ultrasónica durante 30 minutos en un matraz Erlenmeyer. A continuación, se logró un lavado extensivo con agua destilada hasta que el valor pH de la solución estuvo alrededor de 7. El material obtenido después de este procedimiento se llamó N-MWCNTs-ox.

El procedimiento para la degradación enzimática fue el siguiente: i) 1 mg de N-MWCNTs-ox se mezcló con 1 ml de agua destilada en un vial de vidrio y se dispersó utilizando un mezclador ultrasónico; ii) con el fin de activar la enzima, 0,8 mg de enzima HRP se incorporaron a 1 ml de solución salina de fosfato (*Phosphate-buffered saline*, PBS por sus siglas en inglés) a un pH de 7,0 a 7,4; iii) 10 μ l de H_2O_2 se añadieron como sustrato a una concentración de 80 mM; iv) las muestras se agitaron a 200 rpm durante 24 horas, pero a las 4, 6, 8, 10 y 12 horas se añadieron 250 μ l de H_2O_2 para evitar la muerte y desactivación de la enzima. Las muestras se recogieron y se lavaron con agua desionizada con la finalidad de detener la reacción catalítica. El producto obtenido después de este proceso se denomina N-MWCNTs-ox-e. Las diferentes muestras se prepararon para caracterizarlas mediante SEM y TEM.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la Figura 1 se muestra el perfil de los pesos obtenidos de cada centímetro que se raspó en el interior del tubo de cuarzo, el cual se utilizó para la síntesis de N-MWCNT. El máximo valor para el peso se obtuvo en la región entre los centímetros 21 y 23. Se observa un segundo pico entre los centímetros 41 y 43, pero el rendimiento no es tan pronunciado. Nótese que la zona que rodea al máximo contiene la mayor parte de la muestra.

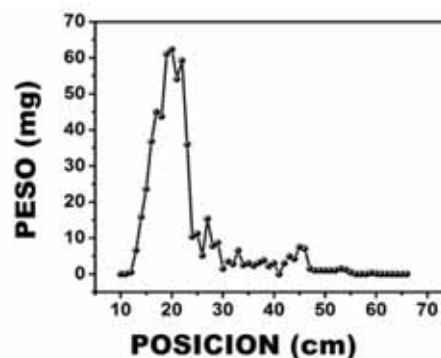


Figura 1. Perfil de los pesos de los N-MWCNT obtenidos de cada centímetro del tubo de cuarzo utilizado como reactor para la síntesis.

Figure 1: Profile of the weights of N-MWCNT scratched from each centimeter of quartz tube used as reactor for the synthesis.

En la Figura 2 se muestran imágenes de microscopía de barrido (SEM por sus siglas en inglés) de los diferentes aspectos de los N-MWCNTs tal y como fueron obtenidos después de la síntesis en el caso del centímetro 15 (Figura 2a y Figura 2b) y del centímetro 23 (Figura 2c y Figura 2d). Se puede observar a partir de las imágenes SEM de baja

magnificación que las muestras que se obtuvieron en el centímetro 15 presentan nanotubos de carbono con diámetros mayores que en el caso del centímetro 23. Sin embargo, en las imágenes de alta magnificación de SEM (Figura 2b y Figura 2d) se observa que el diámetro de los nanotubos del centímetro 15 es más grande que el de los nanotubos fabricados en el centímetro 23.

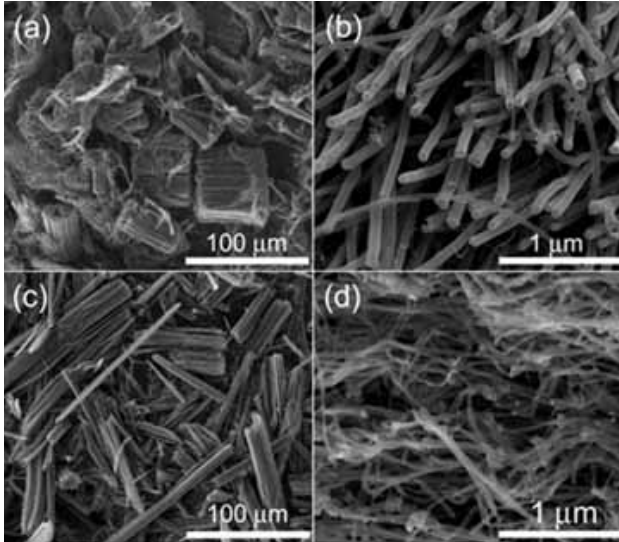


Figura 2. Imágenes de SEM a baja y alta magnificación de N-MWCNTs crecidos en el centímetro 15 (a y c) y en el centímetro 23 (b y d).

Figure 2. SEM images at low and high magnification of N-MWCNTs grown on centimeter 15 (a and c) and on centimeter 23 (b and d).

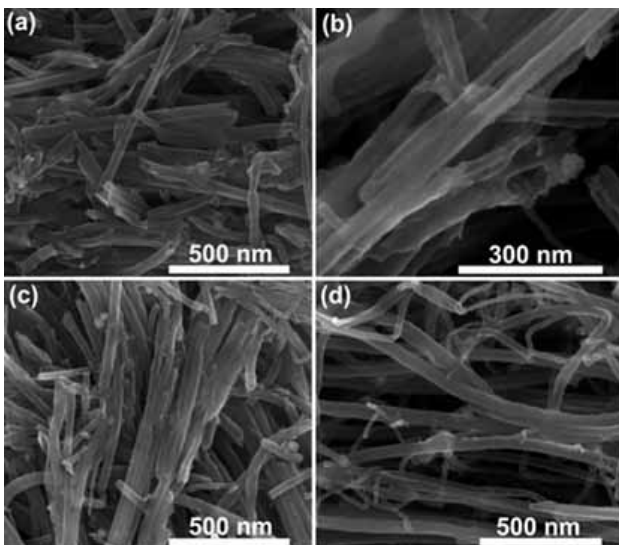


Figura 3. Imágenes de microscopía SEM presentando N-MWCNTs que después de haber sido sometidos a un proceso de oxidación se expusieron a un proceso de degradación enzimática. (a-d) presentan los casos de 2, 4, 8 y 12 horas de exposición a esta enzima, respectivamente.

Figure 3. SEM microscopy images showing nitrogen-doped multiwalled carbon nanotubes that after having been subjected to an oxidation process were exposed to an enzymatic degradation process. (a-d) show the cases of 4, 6, 8 and 12 hours of exposure to the enzyme, respectively.

En la Figura 3 se muestran imágenes SEM de las diferentes muestras que se han sometido a tratamientos ácidos y tratamientos con la enzima HRP. En la Figura 3a se observan nanotubos muy pequeños de, aproximadamente, 2 micras de longitud. Algunos de ellos están carcomidos (ver flecha). Nótese que a 4 horas de exposición con

las enzimas HRP los N-MWCNTs se observan severamente dañados. La Figura 3b muestra N-MWCNTs expuestos a un tratamiento enzimático durante 6 horas. Los N-MWCNTs presentan grandes orificios y diámetros no uniformes. A 8 horas de exposición (ver Figura 3c) los N-MWCNT además de poseer longitudes muy pequeñas, parecen tener un diámetro menor. Aparentemente no hay mucho cambio en los N-MWCNTs después de estar 12 horas expuestos a la enzima HRP. Sin embargo, parece que hay presentes nanotubos muy delgados (ver Figura 3d).

La Figura 4 muestra los resultados de las mediciones de los diámetros de las diferentes caracterizaciones SEM para los diversos casos analizados. Se observa que, en general, el diámetro tiende a decrecer a medida que la exposición de los N-MWCNTs es más larga, aunque en el caso de 12 horas aparentemente hay un incremento del diámetro. Desconocemos la razón por la cual este comportamiento pudo haberse dado y estudios más detallados son necesarios para dilucidar tal situación.

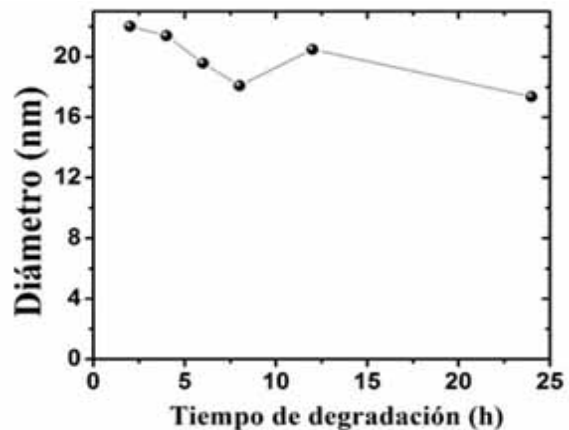


Figura 4. Grafica de diámetros de N-MWCNTs contra tiempo de exposición enzimática. Cada punto representa el promedio de más de 100 mediciones de diámetros en imágenes SEM obtenidas en cada caso.

Figure 4. Plot of diameters of N-MWCNTs versus enzyme exposure time. Each point represents the average of over 100 diameter measurements obtained from SEM images corresponding to each case.

La Figura 5 presenta imágenes TEM de N-MWCNTs prístinos (de partida), (Figura 5a); después de un tratamiento ácido (Figura. 5b); después de estar expuestos a una degradación enzimática durante 4 horas (Figura 5c); y después de estar expuestos a degradación enzimática durante 8 horas (Figura 5d). En la Figura 5a los N-MWCNTs presentan su morfología típica tipo bambú con compartimentos separados por una multicapa delgada de carbono. Nótese que su superficie a veces contiene algunas capas de carbono onduladas. En la Figura 5b los N-MWCNTs se caracterizaron después del tratamiento ácido al que fueron sometidos para las pruebas de degradación. En este caso se observan algunos pequeños cambios en su superficie; en algunos casos las capas externas del nanotubo se distinguen bien a esta magnificación y están un poco desgarradas (ver parte superior derecha). La Figura 5c muestra los N-MWCNT después de que estuvieron bajo un proceso de degradación enzimática durante

4 horas. Estos nanotubos presentan deformación en su estructura, su superficie está dañada y los compartimentos también se ven afectados; las capas de carbono a veces se interrumpen y la superficie (6 u 8 capas) se observa también seriamente dañada (véase la Figura 5c). Si los N-MWCNT se exponen durante 4 horas más a la enzima HRP, los daños estructurales de los N-MWCNTs son severos (ver Figura 5d). Es posible observar que el diámetro se reduce y el compartimento a veces se elimina. También es posible observar daños graves en los compartimentos.

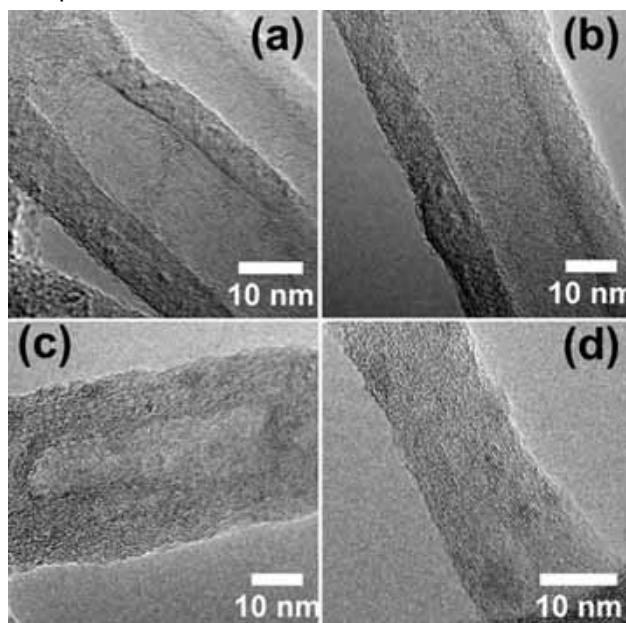


Figure 5. HRTEM images of N-MWCNT in different situations: (a) pristine; (b) after acid treatment; (c) after 4 hours of enzymatic degradation; (d) after 8 hours of enzymatic degradation.

Figure 5. HRTEM imágenes de N - MWCNT en diferentes situaciones: (a) prístino; (b) después de tratamiento con ácido; (c) después de 4 horas de la degradación enzimática; (d) después de 8 horas de la degradación enzimática.

CONCLUSIONES

Los nanotubos N-MWCNTs se sometieron a un tratamiento ácido para quitarles impurezas y carbono amorfo. Este tipo de estructuras son las que pueden ser usadas para diferentes aplicaciones. Es por tanto menester que este tipo de nanotubos sean estudiados en su respuesta a la degradación enzimática. En este trabajo se muestra como tras la exposición a enzimas HRP, los N-MWCNTs sufren cambios morfológicos que dan lugar a superficies carcomidas y a la aparición de huecos en las paredes del NTC. En este trabajo se investigó la degradación de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno mediante la utilización de la enzima HRP. Se demostró que la enzima ataca y elimina átomos de carbono de la superficie de la nanotubos, ocasionando daños importantes en las paredes grafiticas. También demostramos que los daños estructurales en los nanotubos pueden ser controlados por los tiempos de exposición con la enzima.

AGRADECIMIENTOS

GAT agradece al IPICYT por las facilidades prestadas para realizar esta investigación. EMS agradece al proyecto CONACYT CB-2013-220744.

Los autores agradecen al LINAN y al IPICYT por las facilidades otorgadas para una caracterización completa. También agradecemos a M.C. Beatriz A. Rivera-Escoto, a la Dra. Gladis J. Labrada-Delgado, a la Dra. Ana Iris Peña-Maldonado, y al Dr. Héctor G. Silva-Pereyra por su asistencia técnica.

REFERENCIAS

Artículos de revistas científicas.

- [1] <http://www.psr.org/environment-and-health/environmental-health-policyinstitute/responses/iarcs-review-carbon-nanotubes.html>.
- [2] Davenport M. Twists and Shouts: A nanotube Story. *ChemEng News* 2015; 93(23):10-15.
- [3] Munoz-Sandoval E. Trends in nanoscience, nanotechnology and carbon nanotubes: a bibliometric approach. *J Nanopart Res* 2013; 16(1): 2152.
- [4] De Volder MFL, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ. Carbon Nanotubes: Present and future commercial applications. *Science* 2013, 339:535-539.
- [5] Zhang J, Terrones M, Park CR, Mukherjee R, Monthioux M, Koratkar N, Kim YS, Hurt R, Frackowiak E, Enoki T, Chen Y, Bianco A. Carbon science in 2016: status, challenges and perspectives. *Carbon* 2016; 98:708-732.
- [6] Mihalchik AL, Ding W, Porter DW, McLoughlin C, Schwegler D, Sisler JD, Stefaniak AB, Snyder-Talkington BN, Cruz-Silva R, Terrones M, Tsuruoka S, Endo M, Castranova V, Qian Y. Effects of nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes compared to pristine multi-walled carbon nanotubes on human small airway epithelial cells. *Toxicology* 2015, 333, 25.
- [7] Terrones M. Synthesis, toxicity and applications of doped carbon nanotubes. *Acta Microscopica* 2007; 16 (1-2):33-34.
- [8] Munguía-Lopez JG, Muñoz-Sandoval E, Ortiz-Medina J, Rodríguez-Macias FJ, De Leon-Rodríguez A. Effects of nitrogen-doped Multiwall Carbon Nanotubes on Murine fibroblasts. *J Nanomater* 2015; 801606.
- [9] Zhao ML, Li DJ, Yuan L, Yue YC, Liu H, Sun X. Differences in cytocompatibility and hemocompatibility between carbon nanotubes and nitrogen-doped carbon nanotubes. *Carbon* 2011; 49(9); 3125-3133.
- [10] Zhao Y, Allen BL, Star A. Enzymatic degradation of multiwalled carbon nanotubes. *J Phys ChemA* 2011;115(34):9536-9544.
- [11] Modugno G, Ksar F, Battigelli A, Russier J, Lonchambon P, Eleto da Silva E, Ménard-Moyon C, Soulac B, Galibert A-M, Pinault M, Flahaut E, Mayne-L'Hermite M, Bianco A. A comparative study on the enzymatic biodegradability of covalently functionalized double- and multi-walled carbon nanotubes. *Carbon* 2016; 100:367-374.
- [12] Bussy C, Hadad, PM, Bianco A, Kostarelos K. Intracellular degradation of chemically functionalized carbon nanotubes using a long-term primary microglial culture model. *Nanoscale* 2016;8:590-601.
- [13] Sureshbabu AR, Kurapati R, Russier J, Ménard-Moyon C, Bartolini I, Meneghetti K, Kostarelos, Bianco A. Degradation-by-design: Surface modification with functional substrates that enhance the enzymatic degradation of carbon nanotubes. *Biomaterials* 2015; 72:20-28.