

**Prueba de Concepto para la Detección de L-lactato en Solución Acuosa  
Basado en la Fluorescencia de los Puntos de Carbono**

**Jessica D. Sánchez Fonseca**

**Trabajo Dirigido**

**Tutoras**

**Diana C. Rodríguez Burbano, PhD  
Emma Martín Rodríguez, PhD**



UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO  
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA  
BOGOTÁ D.C  
2021

## Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mi madre, Dora Fonseca, por todo su amor y entrega, todos mis logros y lo que soy es gracias a ti, tú eres mi fortaleza, mi inspiración y mi más grande amor. Eres mi ejemplo de vida como mujer. Agradezco a mi hermano Jhon, por ser mi mayor motivación para ser mejor cada día, por su cariño y apoyo que han sido esenciales en cada proceso de mi vida. Y por su ejemplo de madurez para perseguir los sueños y tener muy claro hacia donde se va.

También doy gracias a mi padre por ser un ejemplo en hacer su trabajo, siempre de la mejor manera. Gracias a mis abuelos Parmenio Fonseca y Flor Angela por creer en mi y darme siempre palabras de aliento llenas de amor. A mis primos, gracias por ser ejemplo de superación y esfuerzo.

Agradezco a la doctora Diana Consuelo Rodríguez Burbano y la doctora Emma Martín Rodríguez, por ser unas increíbles mentoras, guiarme y apoyarme en este proceso y por brindarme oportunidades y conocimientos para mi formación como investigadora. De ustedes he aprendido que la ciencia es bella y que vale la pena trabajar por ella.

Doy gracias a mis amigos, Juan González por su amistad incondicional a lo largo de la carrera, a Manuela Suarez por darle chispa a mi vida, Antonia Molina por ser mi apoyo constante y Michelle Soto por su paciencia. Ustedes han sido parte esencial en este proceso, a todos los llevo en mi corazón.

Por último, les quiero agradecer a todos los profesores de la Universidad del Rosario y la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito por sus enseñanzas a lo largo de esta carrera. Especialmente agradezco a los doctores Álvaro David Orjuela, Oscar Julian Perdomo, Juan Manuel López, Sandra Cancino y Alejandro Ondo por su apoyo y consejos en mi formación como profesional. Además agradezco inmensamente a Juan, Sonia, el equipo de laboratorio de bioquímica de la EMCS y al semillero SyNERGIA por brindarme su apoyo y ayuda en el desarrollo de este trabajo.

## Resumen

Conocer la concentración de los niveles de L-lactato provee información útil en diagnóstico clínico y la medicina deportiva. Actualmente, la medición de este analito puede realizarse a través de sensores basados en sistemas electroquímicos o por medio de pruebas en laboratorio, demandando un alto costo económico, además, de infraestructura robusta para ubicar equipos en laboratorios y el talento humano necesario para el manejo de muestras e interpretación de resultados. El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una prueba de concepto para la detección de L-lactato en solución acuosa, a partir de las propiedades de fluorescencia que poseen los puntos de carbono (PC). Este trabajo está vinculado a el proyecto marco ***“Método alternativo para la detección de L-lactato en solución acuosa basado en la fluorescencia de los puntos de carbono”***. El desarrollo del proyecto se dividió en tres fases principales, la síntesis de los puntos de carbono por método solvotermal (PC-S) y por reacción de microondas (PC-M), la caracterización de las nanopartículas obtenidas por potencial zeta (PZ), espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y espectrofotometría UV-Vis. Finalmente se hace uso del peróxido de hidrógeno, correspondiente a el subproducto de la acción enzimática de la lactato oxidasa sobre el L-lactato, con el fin de identificar cambios en la intensidad de emisión. Como principales resultados se obtuvo que los PC-M presentaron una respuesta lineal decreciente ante la variación del analito, mientras que los PC-S presentaron una respuesta exponencial decreciente. Además los PC-M y PC-S presentaron correlaciones entre las imágenes adquiridas bajo irradiación de 365 nm y la concentración del peróxido de hidrógeno. Esta prueba de concepto constituye la fase inicial para el desarrollo de un método alternativo para la detección del L-lactato, en donde a partir de la fluorescencia generada bajo estimulación de luz ultravioleta de los PC dispersos en una solución acuosa de L-lactato, la concentración de este pueda ser estimada por medio de un sistema de bajo costo y portable.

# Índice general

Agradecimientos . . . . .	I
Resumen . . . . .	II
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.2. Proyecto relacionado . . . . .	3
1.3. Objetivos . . . . .	4
1.3.1. General . . . . .	4
1.3.2. Específicos . . . . .	4
1.4. Contribuciones . . . . .	4
1.5. Organización del documento . . . . .	4
<b>2. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>6</b>
2.1. L-lactato como biomarcador . . . . .	6
2.1.1. Ruta metabólica para la producción de L-lactato . . . . .	6
2.1.2. Ruta alterna de interés para la producción de L-Lactato . . . . .	9
2.1.3. Importancia en la medicina . . . . .	10
2.1.4. Sistemas actuales de medición de L-lactato . . . . .	12
2.2. Puntos de carbono . . . . .	14
2.2.1. Síntesis . . . . .	14
2.2.2. Pruebas de caracterización . . . . .	15
2.2.3. Propiedades . . . . .	16
2.2.4. Aplicaciones en detección de peróxido de hidrógeno . . . . .	16
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>18</b>
3.1. Síntesis de puntos de carbono . . . . .	18
3.1.1. Síntesis asistida por microondas . . . . .	19
3.1.2. Síntesis solvotermal . . . . .	20
3.2. Caracterización de los puntos de carbono . . . . .	21
3.2.1. Potencial zeta . . . . .	21
3.2.2. Espectroscopia infrarroja (FTIR) . . . . .	21
3.2.3. Espectroscopia Uv-Vis . . . . .	21
3.3. Caracterización de las propiedades de fluorescencia para la detección de L-lactato . . . . .	22

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
4.1. Caracterización de los puntos de carbono . . . . .	25
4.1.1. Método asistido por microondas . . . . .	25
4.1.2. Método solvotermal . . . . .	29
4.2. Caracterización de las propiedades de fluorescencia para la detección de L-lactato	34
4.2.1. Método asistido por microondas . . . . .	34
4.2.2. Método solvotermal . . . . .	36
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS</b>	<b>42</b>
6.1. Trabajos futuros . . . . .	42
6.2. Recomendaciones . . . . .	42
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO</b>	<b>47</b>

# Índice de figuras

2.1. Fases de la glucólisis: a) fase preparativa (etapa 1 - etapa 5) y b) fase de rendimiento energético (etapa 6 - etapa 10). . . . .	7
2.2. Destinos del piruvato según condiciones fisiológicas de oxigenación. . . . .	8
2.3. Reducción piruvato a L-lactato catalizada por la enzima LDH. . . . .	9
2.4. Ciclo de Cori que relaciona la glucólisis y gluconeogénesis. . . . .	9
2.5. Reducción de piruvato a L-lactato catalizada por la enzima LO. . . . .	10
2.6. Formas de detección convencionales de L-lactato. . . . .	12
3.1. Etapas de la metodología desarrollada en el proyecto. . . . .	18
3.2. Proceso de síntesis de puntos de carbono por método de microondas. . . . .	20
3.3. Proceso de síntesis de puntos de carbono por método solvotermal. . . . .	21
3.4. Proceso de segmentación. A) Imagen original. B) Máscara para realizar la segmentación. C) Imagen segmentada en escala de grises . . . . .	23
4.1. Muestras obtenidas a distintos tiempos por cromatografía de columna bajo luz de 365 nm. . . . .	24
4.2. Propiedades ópticas de PC-M a 2 mg/mL en solución acuosa. . . . .	25
4.3. FTIR de PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico. . . . .	26
4.4. Espectros de absorción en función de la concentración de los PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico. . . . .	27
4.5. Curva de calibración de absorción en función de la concentración de los PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico. . . . .	27
4.6. Fotos de emisión bajo una irradiación de 365 nm variando la concentración de los PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico. . . . .	28
4.7. Espectros de emisión en función de la concentración de los PC-M en solución acuosa. . . . .	28
4.8. Curva de calibración de intensidad de los PC-M en solución acuosa. . . . .	29
4.9. Propiedades ópticas de PC-S a 0,05 mg/mL en solución acuosa. . . . .	30
4.10. FTIR de PC-S sintetizados a partir de urea y ácido cítrico como fuentes de carbono y nitrógeno. . . . .	31
4.11. Espectros de absorción en función de la concentración de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico. . . . .	32
4.12. Curva de calibración de absorción en función de la concentración de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico. . . . .	32
4.13. Fotos de emisión bajo una excitación de 365 nm de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico. . . . .	33

4.14. Espectros de emisión en función la concentración de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico. . . . .	33
4.15. Área bajo la curva de la intensidad en función de la concentración de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico. . . . .	34
4.16. Fotos de emisión en solución acuosa bajo una irradiación de 365 nm con una concentración constante de PC-M de 2 mg/mL sintetizados a partir de ácido cítrico variando la concentración de $H_2O_2$ . . . . .	35
4.17. Espectros de emisión en solución acuosa variando la concentración de $H_2O_2$ a una concentración constante de 2 mg/mL de los PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico. . . . .	35
4.18. Área bajo la curva de intensidad de PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico a una concentración constante de 2 mg/mL variando la concentración de $H_2O_2$ . . . . .	36
4.19. Fotos de emisión en solución acuosa bajo una irradiación de 365 nm con una concentración constante de PC-S de 0,03 mg/mL sintetizados a partir de ácido cítrico y urea variando la concentración de $H_2O_2$ . . . . .	37
4.20. Espectros de emisión en solución acuosa variando la concentración de $H_2O_2$ a una concentración constante de 0,03 mg/mL de los PC-S sintetizados a partir de ácido cítrico y urea. . . . .	38
4.21. Área bajo la curva de intensidad de PC-S sintetizados a partir de ácido cítrico y urea manteniendo la concentración de PC-S constante y variando la concentración de $H_2O_2$ . . . . .	38

# Índice de tablas

2.1. Producción y depuración de L-lactato. Tomada de [31] . . . . .	10
2.2. Sensores disponibles comercialmente de L-lactato [5], [13] . . . . .	13
2.3. Estudios desarrollados haciendo uso de puntos de carbono para la detección de peróxido de hidrógeno . . . . .	17
4.1. Valores de correlación entre histogramas de imágenes en escala de grises de los PC-S en solución acuosa y la concentración de peróxido de hidrógeno presente en la muestra. . . . .	39

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

En este primer capítulo se presenta la motivación general del trabajo, incluyendo un contexto general sobre la pregunta de investigación que se plantea. A partir de esto, se presenta el proyecto marco, los objetivos del estudio, las contribuciones y la organización del documento.

### 1.1 Motivación

El lactato es un compuesto químico quiral, por lo tanto, puede encontrarse de la forma levógira (L-lactato) o de la forma dextrógira (D-lactato) [1]. El D-lactato es un metabolito producto del metabolismo de algunas bacterias y se presenta en los seres humanos únicamente en caso de infecciones bacterianas intestinales o del líquido cefalorraquídeo[2]. El L-lactato puede ser metabolizado por los seres humanos por medio de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), es la forma que se encuentra comúnmente en el cuerpo humano [3]. El L-lactato es un compuesto que se produce a partir del metabolismo anaeróbico de la glucosa; este se activa cuando las células se ven privadas de oxígeno, el organismo está bajo condiciones de actividad extenuante o el proceso de respiración mitocondrial está bloqueado [4], [5].

Los niveles de L-lactato en plasma proveen información sobre el equilibrio entre su producción y depuración [6]. En promedio, para una persona sana en estado de reposo, los valores normales de concentraciones de L-lactato en sangre varían entre 0.5 – 1.5 mM, mientras que, durante el ejercicio, la concentración de L-lactato puede incrementar hasta 12 mM. Si el desarrollo de actividades requiere una alta exigencia física pueden incluso alcanzarse valores de concentración de L-lactato en plasma de hasta 25 mM [7]. Una consecuencia de la producción de este metabolito es el aumento de la concentración intracelular de protones ( $H^+$ ). Si la tasa de producción de L-lactato es alta comparada con la tasa de depuración, el mecanismo de amortiguamiento celular de pH no será suficiente para neutralizar el incremento de especies  $H^+$ , lo que se manifiesta en una disminución del pH intracelular. Una severa disminución del pH intracelular puede resultar en una acidosis celular la cual afecta el rendimiento muscular y funcionamiento tisular [8].

Es importante resaltar que clínicamente en estado de reposo los valores de concentración superiores a 4 mM de L-lactato en plasma se consideran como un aumento severo de este metabolito. Este incremento de la cantidad de L-lactato y una baja eficiencia en su depuración puede desencadenar diferentes afecciones como choque hemorrágico o embolia pulmonar, ambas consecuencia de una acidosis láctica [9]. Otras condiciones asociadas a niveles irregulares

de concentración de L-lactato, son choques endotóxicos, insuficiencia respiratoria, hepatopatías e insuficiencia renal [10].

Otra área en la que el conocimiento de la presencia y concentración de este metabolito es de gran importancia es la medicina deportiva y el rendimiento deportivo. Poder conocer los niveles de L-lactato y especialmente el umbral en el que se activa el metabolismo anaeróbico de la glucosa permite caracterizar el nivel de entrenamiento físico de un atleta. La adquisición de información tal como concentración de L-lactato en función del tiempo de actividad física favorece los procesos de entrenamiento y la evaluación de la resistencia física del deportista [11].

Dada la importancia de la detección y cuantificación de L-lactato, ha surgido el interés de desarrollar biosensores con una alta especificidad y bajo costo que permitan conocer la presencia y cantidad de este metabolito de una forma simple, directa, rápida, con procedimientos sencillos de preparación de la muestra a ser analizada. La gran mayoría de los sistemas portátiles utilizados actualmente para la detección de L-lactato se basan en un funcionamiento electroquímico el cual hace uso de electrodos para interpretar el cambio de corriente producido por reacciones enzimáticas. Estos sistemas sensan y cuantifican el metabolito en muestras de suero sanguíneo, lo que implica una recolección de muestra invasiva y en ocasiones calificada como dolorosa [12]. Además, requieren de tiras reactivas plásticas, para recolectar la muestra biológica y realizar la reacción enzimática, esto supone un alto costo económico y medioambiental. A pesar de que permiten adquirir datos en el punto de atención del paciente, los sensores no presentan un buen comportamiento a altas concentraciones de L-lactato ( $>8$  mM), de forma que no permiten un correcto monitoreo del L-lactato bajo condiciones clínicas o actividades deportivas de alto rendimiento [13], [14].

La cuantificación de este metabolito también se realiza a través de exámenes clínicos en laboratorio. Esta se realiza mediante la lectura de la absorbancia del cromóforo que se obtiene a partir de la reacción dada por la enzima lactato oxidasa (LO) para determinar los niveles de L-lactato en muestras de suero sanguíneo. Este sistema no se ajusta para ser usado en los puntos de atención al usuario pues requiere de manipulación de reactivos, transporte y riguroso tratamiento previo de la muestra, y además requiere de equipos especializados para medir la absorbancia del cromóforo y personal especializado que pueda interpretar los resultados [15], [16].

Alternativas de biosensores portátiles que puedan cumplir con las condiciones deseadas se basan en el uso de nanomateriales, especialmente de nanopartículas que presentan propiedades de absorción y emisión fluorescentes [17]. El proceso de detección se basa en analizar cambios en sus propiedades ópticas, los cuales pueden ser registrados e interpretados fácilmente por un usuario no especializado y sin recurrir a equipos de un alto costo económico. La mayoría de los estudios existentes que han explorado esta alternativa se basan en el uso de nanopartículas semiconductoras que, aunque presentan una gran eficiencia de luminiscencia tienen el inconveniente de que suelen presentar en su composición metales tóxicos como cadmio o plomo y se degradan fácilmente si no se conservan en las condiciones adecuadas.

Una opción de nanomateriales ambientalmente sostenibles son los puntos de carbono (PC). Los PC pueden ser sintetizados a partir de abundantes fuentes precursoras que abarcan desde moléculas orgánicas sencillas hasta recursos naturales, lo que hace que el acceso a la síntesis de estas nanopartículas no requiera de elevados presupuestos [18], [19]. Las propiedades luminiscentes de los PC muestran variaciones en su intensidad o longitud de onda de emisión en la presencia de analitos dispersos en el medio en el que se encuentren [20], [21]. Así, que con

una rigurosa calibración de la fluorescencia de los PC en función de la concentración de los analitos presentes en una muestra es posible asociar la variación en la fluorescencia de las nanopartículas con la concentración de L-lactato producido. En el caso específico de la detección de L-lactato se han reportado estudios en los que se hace uso del peróxido de hidrógeno como subproducto de la reacción enzimática dada por la lactato oxidasa para inhibir o aumentar la intensidad de emisión en función de la concentración del analito [22].

El desarrollo de sistemas para la adquisición y análisis de fluorescencia de bajo costo es un desafío que se puede abordar desde el área de ingeniería. Donde el uso de las propiedades fluorescentes de los PC y las ventajas de los sistemas de visión por computador aumentan el potencial de desarrollar nuevos biosensores, especialmente para aplicaciones clínicas. Para el desarrollo de un biosensor basado en papel para la detección de L-lactato compatible con la realización de pruebas diagnósticas de bajo coste en el punto de atención del paciente, sin necesidad de desplazar muestras a laboratorios especiales, es necesario desarrollar una prueba de concepto, con el fin de explorar y verificar la idea de asociar la variación en la fluorescencia de los PC de acuerdo a la concentración de L-lactato o subproductos asociados a reacciones enzimáticas sobre este, presentes en la muestra.

## 1.2 Proyecto relacionado

El proyecto que aquí se presenta está vinculado al proyecto marco “*Método alternativo para la detección de L-lactato en solución acuosa basado en la fluorescencia de los puntos de carbono*” financiado por recursos internos para la investigación del programa de ingeniería biomédica de la Universidad del Rosario en convenio con la Universidad Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito. Este proyecto busca llevar a cabo las fases iniciales del desarrollo de un biosensor basado en papel para la detección de L-lactato y cuenta con la participación de los investigadores Álvaro David Orjuela Cañón PhD. (UR – EMCS), Oscar Julián Perdomo Charry PhD. (UR – EMCS), Diana Consuelo Rodríguez Burbano PhD. (UR – EMCS) y Emma Martín Rodríguez PhD. (Universidad Autónoma de Madrid).

El proyecto marco tiene como objetivo general desarrollar un método alternativo para la detección de L-lactato en solución acuosa basado en puntos de carbono y herramientas de visión por computador. Cuenta con dos fases generales para su implementación, en la primera se busca sintetizar y caracterizar las propiedades ópticas de los puntos de carbono en solución acuosa para la detección de L-Lactato a partir de la acción enzimática que la lactato oxidasa (LO) tenga sobre este, para posteriormente en la segunda fase desarrollar un sistema de visión por computador para interpretar la información obtenida de la fluorescencia que se genera a partir de los puntos de carbono en presencia de los diferentes analitos.

El presente trabajo hace parte de la fase I donde se desarrollará una prueba de concepto, con el fin de explorar y verificar la idea de asociar la variación en la fluorescencia de los puntos de carbono con la concentración de peróxido de hidrógeno, subproducto asociado a la acción enzimática de LO sobre el L-lactato. Es así que la presente investigación se constituye como la base fundamental para el desarrollo de un biosensor basado en papel para la detección de L-lactato y es necesaria para dar continuidad a la fase II del proyecto previamente descrito que consiste en determinar la concentración de L-lactato a partir de imágenes de fluorescencia y curvas de calibración por medio de técnicas de visión por computador.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1. General

Desarrollar una prueba de concepto para la detección de L-lactato en solución acuosa basado en la fluorescencia de los puntos de carbono en presencia del peróxido de hidrógeno.

### 1.3.2. Específicos

- Sintetizar y caracterizar las propiedades fluorescentes de los puntos de carbono obtenidos por reacción de microondas y método solvotermal.
- Evaluar las propiedades fluorescentes en solución acuosa de los puntos de carbono en presencia de peróxido de hidrógeno en solución acuosa, subproducto asociado a la reacción de la enzima lactato oxidasa sobre el L-lactato.
- Explorar el desarrollo de una base de datos con imágenes de fluorescencia y las curvas de calibración previamente mencionadas para correlacionar y determinar la concentración de peróxido de hidrógeno presente en la muestra.

## 1.4 Contribuciones

Con el desarrollo de la prueba de concepto que se plantea en el presente trabajo se busca identificar una respuesta de fluorescencia de los puntos de carbono que se pueda correlacionar con la concentración de nivel de L-lactato en la muestra. A partir de este resultado se espera desarrollar un algoritmo y un sistema portable que permita identificar la concentración de L-lactato a partir de las curvas de calibración e imágenes de fluorescencia de los puntos de carbono. Es así que los resultados del presente proyecto constituyen la base para la implementación de un sistema sensorial portable con respuesta óptica, de fácil interpretación para la detección de L-lactato.

## 1.5 Organización del documento

El presente documento se divide en siete capítulos principales. En el primer capítulo se presenta la problemática que se busca resolver con la investigación que aquí se desarrolla, posteriormente se plantean los objetivos para abarcar dicha problemática y la organización del documento.

El segundo capítulo corresponde al estado del arte, en donde se establecen todos los conceptos necesarios para comprender la problemática y la solución propuesta. En el estado del arte en lo correspondiente al L-lactato se describen las rutas para la reducción de piruvato a L-lactato, su importancia en la medicina y los métodos de detección actuales. En relación a los puntos de carbono se describen métodos de síntesis, pruebas de caracterización, propiedades y aplicaciones en sensores para la detección de peróxido de hidrógeno.

En el tercer capítulo se presentan los materiales y la metodología llevada a cabo para el desarrollo de este proyecto. Se presentan los métodos de síntesis utilizados, las técnicas de caracterización utilizadas para determinar carga superficial, grupos funcionales presentes en la superficie de las nanopartículas, sus propiedades ópticas en presencia y ausencia de

peróxido de hidrógeno y la construcción de la base de datos con las imágenes. El cuarto capítulo contiene los resultados obtenidos de este estudio, y el análisis de la caracterización en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno en solución acuosa.

En el quinto capítulo se tratan las conclusiones a las que se llegaron con base en la discusión de los resultados. Finalmente, en el capítulo siete se plantean los trabajos futuros que se pueden desarrollar con base a los resultados obtenidos.

## Capítulo 2

# ESTADO DEL ARTE

En este capítulo se presentan las rutas para la producción de L-lactato a partir de piruvato, la importancia de conocer los valores de L-lactato en el diagnóstico clínico y la medicina deportiva y se describen los sistemas de medición de L-lactato actualmente disponibles. Además, se hace una descripción de los puntos de carbono (PC), los métodos de síntesis, sus propiedades y aplicaciones en sensores de peróxido de hidrógeno, subproducto asociado a la acción enzimática de la lactato oxidasa sobre el L-lactato.

### 2.1 L-lactato como biomarcador

#### 2.1.1. Ruta metabólica para la producción de L-lactato

El metabolismo es un conjunto de reacciones sincronizadas e intermediadas por enzimas, cuyo objetivo principal es cubrir las necesidades vitales de las células y el organismo. Las rutas metabólicas permiten obtener energía partir de nutrientes y también la formación de moléculas precursoras, macromoléculas y biomoléculas con funciones especializadas. Una de las principales rutas del metabolismo celular es la de la glucosa, puesto que es la principal fuente de energía para el cuerpo humano y la base de muchos polisacáridos. El metabolismo de la glucosa esta compuesto por una ruta catabólica degradativa denominada glucólisis y una ruta anabólica, que sintetiza glucosa a partir de intermediarios metabólicos, conocida como gluconeogénesis [23].

- Glucólisis

Es el proceso oxidativo de la glucosa que ocurre en el citosol y no requiere de oxígeno. Es la forma más rápida de obtener moléculas de ATP (adenosín trifosfato) para la célula. La ruta Embden-Meyerhof, mediante un proceso catabólico de reacciones permite la transformación de una molécula de glucosa a dos de piruvato. Esta ruta se divide en dos fases, la fase preparativa y la de rendimiento energético, como se observa en la figura 2.1.

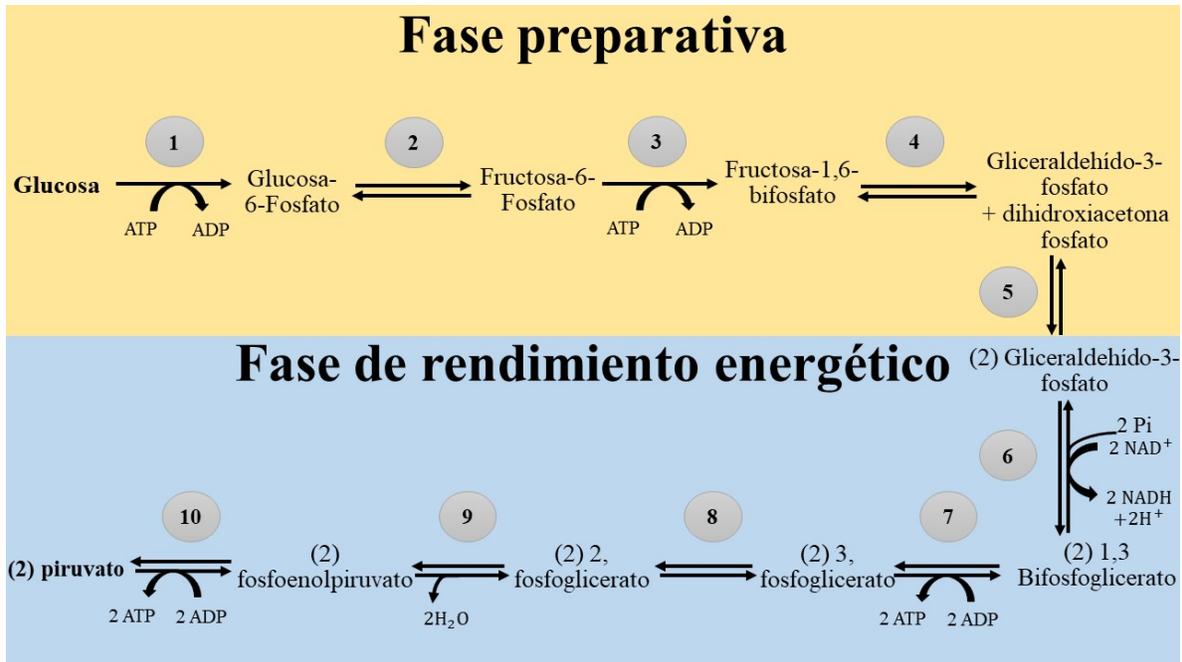
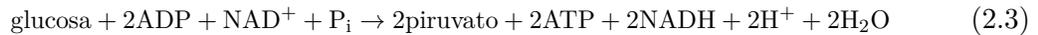
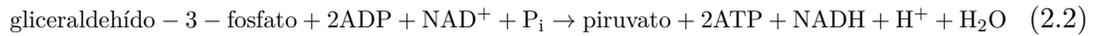
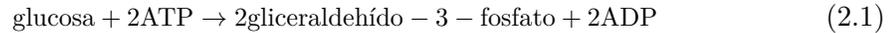


Figura 2.1: Fases de la glucólisis: a) fase preparativa (etapa 1 - etapa 5) y b) fase de rendimiento energético (etapa 6 - etapa 10).

En la fase preparativa en el primer paso se da la fosforilación de la glucosa, en donde un grupo fosfato se transfiere del ATP a la glucosa y la transforma en glucosa-6-fosfato, esta reacción es catalizada por la enzima hexoquinasa y es irreversible bajo condiciones intracelulares. En el siguiente paso la glucosa-6-fosfato se convierte en su isómero, la fructosa-6-fosfato para que posteriormente en el paso tres un grupo fosfato pueda ser transferido del ATP a la fructosa-6-fosfato y producir fructosa-1,6-bifosfato. Este paso lo cataliza la enzima fosfofructocinasa, que puede ser regulada para acelerar o frenar la vía de la glucólisis. En el cuarto paso la fructosa-1,6-bifosfato se rompe para generar dos azúcares de tres carbonos: la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato, estas moléculas son isómeros el uno del otro, pero solo el gliceraldehído-3-fosfato puede continuar directamente con los siguientes pasos de la glucólisis. Finalmente en el quinto paso, la DHAP se convierte en gliceraldehído-3-fosfato [24].

Continuando con la fase de rendimiento energético en el sexto paso dos semirreacciones ocurren simultáneamente: 1) la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato (uno de los azúcares de tres carbonos que se forma en la fase inicial), y 2) la reducción del  $NAD^+$  (Nicotinamida adenina dinucleótido) en  $NADH$  y  $H^+$ . La reacción general es exergónica y libera la energía que luego se usa para fosforilar la molécula, lo que forma 1,3-bifosfoglicerato. Luego en el paso siete el 1,3-bifosfoglicerato dona uno de sus grupos fosfato al ADP, transformándolo en una molécula de ATP y en el proceso se convierte en 3-fosfoglicerato. En el octavo paso se tiene que el 3-fosfoglicerato se convierte en su isómero, el 2-fosfoglicerato para que posteriormente en el paso nueve el 2-fosfoglicerato pierda una molécula de agua y se transforme en fosfoenolpiruvato (PEP). Finalmente, en el décimo paso el PEP de inmediato dona su grupo fosfato al ADP, y se forma la

segunda molécula de ATP. Al perder su fosfato, el PEP se convierte en piruvato, el producto final de la glucólisis [24]. En resumen el balance de la fase preparatoria se observa en la ecuación 2.1, el de la fase de rendimiento energético en la 2.2 y la ecuación general de la glucólisis en la 2.3.



■ Destinos del piruvato

El piruvato producido en la glucólisis puede ser metabolizado por diferentes rutas en dependencia de las condiciones y necesidades celulares, como se observa en la figura 2.2. Las rutas catabólicas más relevantes son la descarboxilación oxidativa del piruvato y la fermentación láctica.

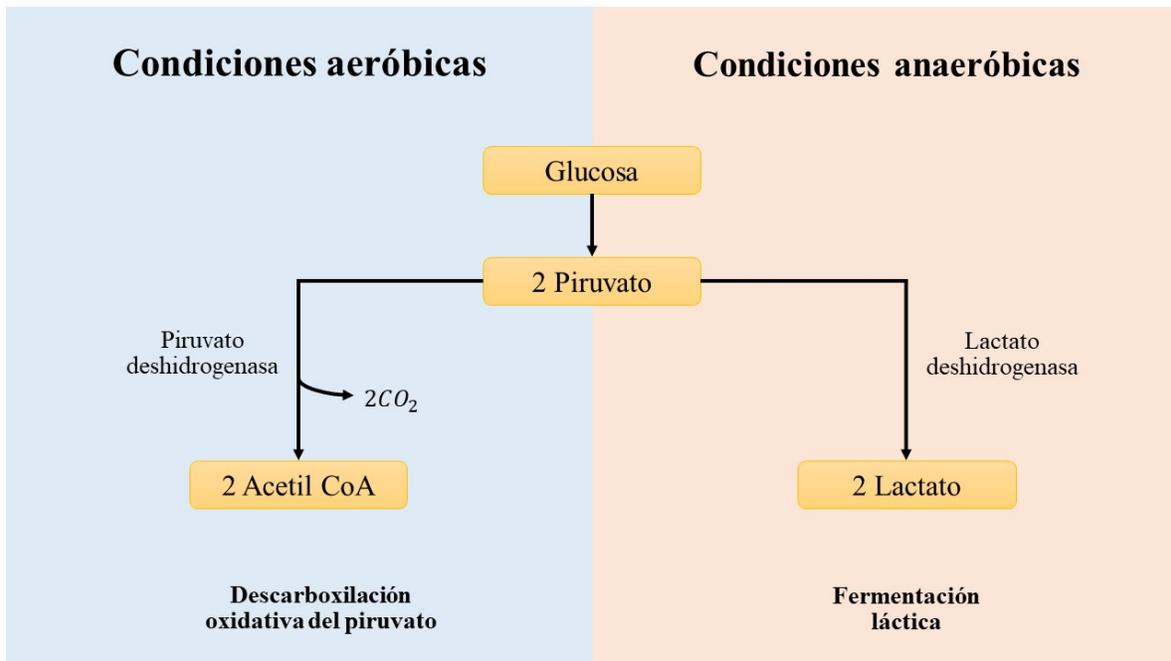
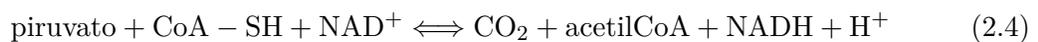


Figura 2.2: Destinos del piruvato según condiciones fisiológicas de oxigenación.

Bajo condiciones aeróbicas se da el proceso de descarboxilación oxidativa del piruvato, en donde el primer paso es una descarboxilación que origina una molécula de acetil CoA, la cual por el ciclo de Krebs se degrada y produce ATP. La reacción de esta descarboxilación oxidativa del piruvato se muestra en la ecuación 2.4 [23].



Por otro lado, bajo condiciones anaeróbicas o hipóxicas el piruvato se reduce a L-lactato por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), como se observa en la figura 2.3.

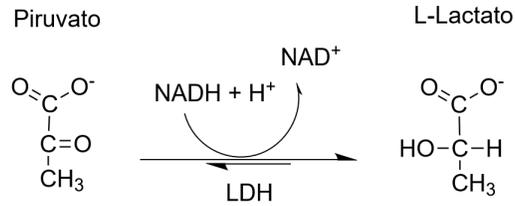


Figura 2.3: Reducción piruvato a L-lactato catalizada por la enzima LDH.

La fermentación láctica además de producir la reducción de piruvato a L-lactato, proporciona un mecanismo de conversión de  $NADH$  y  $H^+$  a  $NAD^+$  para evitar una parálisis celular energética por falta de  $NAD^+$  para realizar la glucólisis. Cuando se presentan altas concentraciones de L-lactato en la sangre, el pH disminuye y puede producirse acidosis [25]. Es por ello que el L-lactato debe ser reciclado por medio de la sangre que llega al hígado, donde se convierte en piruvato por el proceso de gluconeogénesis, como se observa en la figura 2.4. Dependiendo de la demanda energética el piruvato se almacena como glucógeno o es convertido nuevamente a glucosa [23].

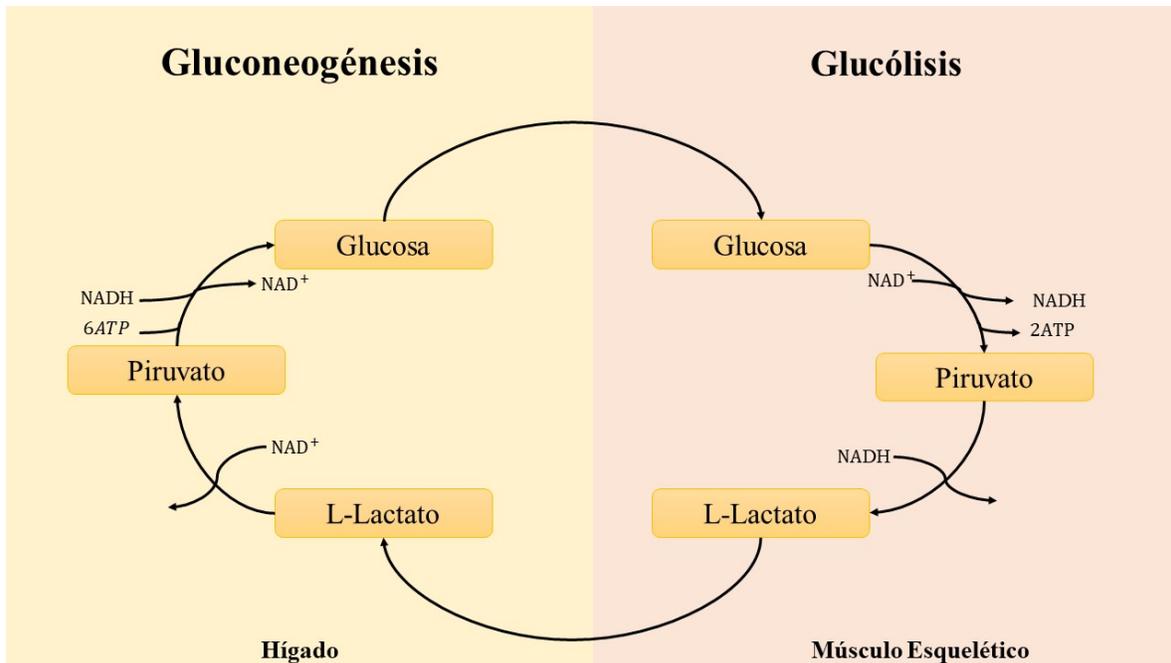


Figura 2.4: Ciclo de Cori que relaciona la glucólisis y gluconeogénesis.

### 2.1.2. Ruta alterna de interés para la producción de L-Lactato

Una ruta alterna a la explicada previamente para producir piruvato a partir de L-lactato es haciendo uso de la enzima lactato oxidasa (LO). La LO es una enzima de la especie de las oxidasas, una flavoproteína globular. Para su producción comercial se hace uso de microorganismos como las bacterias del tipo *Pediococcus sp.* o *Aerococcus viridans* [26]. En presencia

de oxígeno molecular, la enzima cataliza la oxidación de L-lactato a piruvato, produciendo peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) el cual es electroquímicamente activo (figura 2.5) [27].

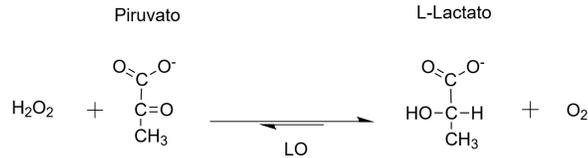


Figura 2.5: Reducción de piruvato a L-lactato catalizada por la enzima LO.

Esta enzima se usa comercialmente para el desarrollo de pruebas de laboratorio con el fin de conocer la concentración del L-lactato presente en la muestra. En general sus aplicaciones hacen uso del  $H_2O_2$  subproducto de la oxidación, el cual puede provocar cambios en determinado transductor (electroquímico u óptico). Por ello a lo largo del desarrollo del proyecto se hará uso del  $H_2O_2$ , por su relación de proporción 1:1 con el L-lactato.

### 2.1.3. Importancia en la medicina

Los niveles de L-lactato en sangre en una persona sana varían entre 0.5 - 1.5 mM. Cuando se hace una actividad deportiva que requiere una alta demanda energética estos pueden aumentar a 12 mM y como máximo llegar a los 25mM [7]. En caso de estar en estado de reposo y presentar un aumento en los niveles de L-lactato, esto puede deberse a estados fisiológicos bajo condiciones anormales. A continuación se describen los casos en los que se presentan aumento de L-lactato y la utilidad de su detección.

#### A. Diagnóstico clínico

Cuando las células se ven privadas de oxígeno o el organismo está bajo condiciones de actividad extenuante, la producción de L-lactato puede aumentar en una razón más rápida que en la que ocurre su depuración[28]. Clínicamente, esta condición se denomina hiperlactatemia. Además de producirse hiperlactatemia por un aumento en los niveles de L-lactato, esta puede darse por problemas en la depuración, generando una acumulación de este metabolito [29]. En la tabla 2.1 puede observarse la proporción de producción y depuración con los respectivos órganos implicados. La hiperlactatemia se clasifica en tipo A, que se da por una activación del metabolismo anaeróbico por hipoxia tisular y tipo B, que no se relaciona con causas anaeróbicas y puede ser causada por enfermedades subyacentes como insuficiencia renal o hepática, fármacos o errores innatos del metabolismo[30].

Tabla 2.1: Producción y depuración de L-lactato. Tomada de [31]

Producción	Depuración
Músculo esquelético 25 %	Hígado 60 %
Piel 25 %	Riñón 30 %
Eritrocitos 20 %	Músculo esquelético 5 %
Cerebro 20 %	Músculo cardiaco 5 %
Intestinos 10 %	

En caso de un aumento por hipoxia, es decir en casos de hiperlactatemia tipo A se

busca suplir las necesidades metabólicas por medio de la ruta anaeróbica. Para acentuar esa demanda energética, se estimula la reducción de piruvato a L-lactato, como una fuente de  $NAD^+$  para realizar el proceso de glucólisis. En estos casos la tasa global de producción excede la capacidad renal y hepática de depuración y por lo tanto se produce acumulación en los niveles de L-lactato, disminuyendo el pH y generando acidosis láctica [32]. Durante una hipoxia severa, el ATP producido es insuficiente para equilibrar las necesidades energéticas osmóticas e iónicas, por lo que la membrana celular sufre una despolarización acentuada que produce finalmente un edema celular y muerte celular [33].

En la hiperlactatemia tipo B, se da un exceso de producción de L-lactato o la inhibición en su depuración, por causa de enfermedades subyacentes como la insuficiencia hepática, insuficiencia renal, insuficiencia respiratoria, diabetes o sepsis [34]. Particularmente en la insuficiencia hepática, los niveles de L-lactato aumentan debido a su acumulación, causada por un mal funcionamiento del proceso de depuración, pues el hígado es el principal órgano encargado de esto [35]. Por otro lado, en el caso de la diabetes se produce una disminución en la actividad enzimática del proceso aeróbico, llevando al sistema a producir ATP por medio del sistema anaeróbico y por lo tanto un aumento en la producción de L-lactato [36].

Es así que la detección y cuantificación de L-lactato constituye una parte muy importante para el diagnóstico, interpretación y tratamiento de problemas patológicos relacionados con hipoxia, problemas de sepsis, renales, hepáticos o a causa de medicamentos. Otro caso en el que es importante conocer continuamente los niveles de L-lactato, es en aquellos pacientes críticamente enfermos, pues esto permite un criterio médico más objetivo con el fin de establecer riesgos y guiar tratamientos encaminados a evitar posibles choques sépticos y problemas de acidosis láctica. En caso de ingresar por urgencias el L-lactato debe medirse como máximo luego de las 3 horas de ingreso, monitoreando sus valores continuamente cada 6 horas [37].

## B. Medicina deportiva

En el caso de los deportistas de alto rendimiento se activan los músculos de contracción rápida, aumentando la demanda de ATP a tal punto que las mitocondrias que tienen se saturan y no pueden continuar la producción de este nucleótido [6]. En ese punto se procede a hacer uso de la ruta anaeróbica como una respuesta rápida a la demanda de energía que se tiene por la actividad muscular, aumentando los niveles de L-lactato [24]. Cuando el L-lactato aumenta a un ritmo mayor en comparación con la depuración, se acumula en el músculo y se utiliza como indicador de la adaptación de un atleta a sus entrenamientos deportivos. Por ello, la medicina deportiva requiere un monitoreo constante dependiente de las series sobre los niveles de L-lactato con el objetivo de para establecer un umbral láctico que indique el nivel de entrenamiento del atleta, el rendimiento en los entrenamientos y su resistencia [38]. El umbral láctico corresponde a la máxima capacidad del atleta para realizar una actividad física de alta demanda energética, por ello a medida que el atleta aumenta su resistencia y capacidad física se espera que le tome más tiempo llegar a este umbral.

### 2.1.4. Sistemas actuales de medición de L-lactato

Actualmente los sistemas convencionales para la medición de L-lactato se pueden clasificar en sensores portátiles basados en sistemas electroquímicos o pruebas clínicas de laboratorio, como se observa en la figura 2.6. Estos sistemas sensan y cuantifican el metabolito en muestras de suero sanguíneo, lo que implica una recolección de muestra invasiva y en ocasiones calificada como dolorosa [12].

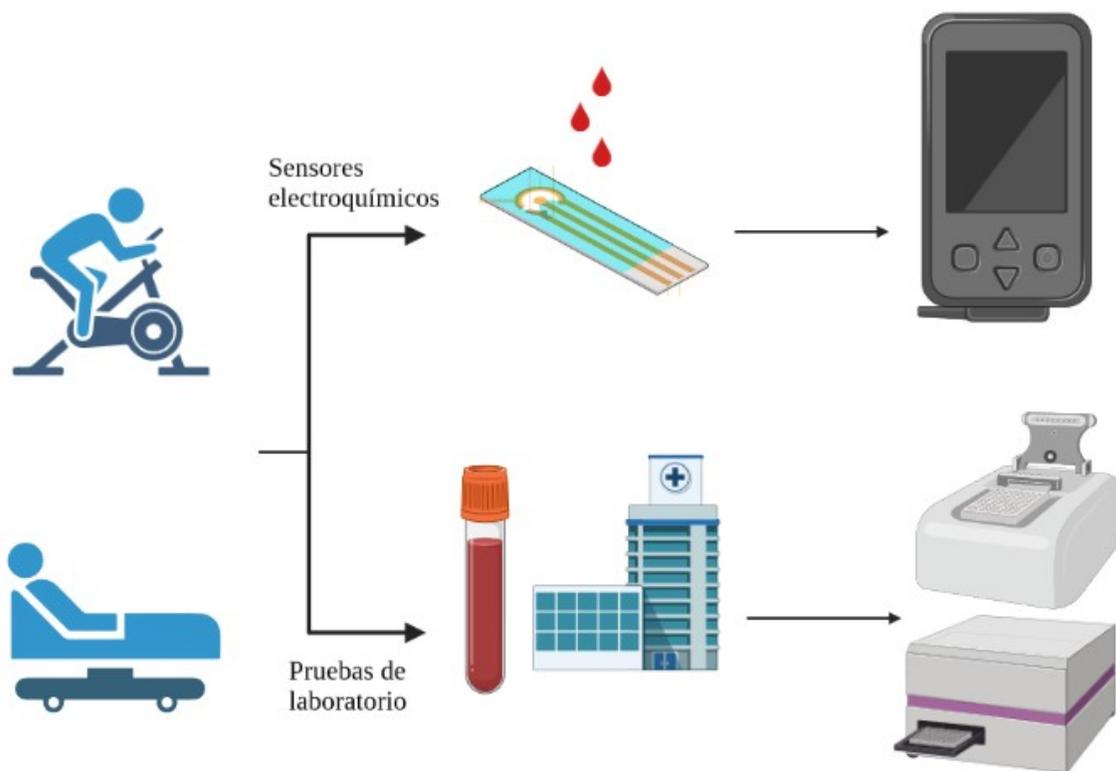


Figura 2.6: Formas de detección convencionales de L-lactato.

#### A. Electroquímicos

Los sistemas portátiles que actualmente se encuentran en el mercado basan su funcionamiento en reacciones electroquímicas enzimáticas. En las que se usa un dispositivo para interpretar el cambio de corriente producida por reacciones de oxidación o reducción intermediada por enzimas en electrodos. Para la detección de L-lactato los sensores electroquímicos hacen uso de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y lactato oxidasa (LO). La LDH tiene actividad catalítica para la conversión de L-lactato  $NADH$  y  $H^+$  a  $NAD^+$  y piruvato. La  $NAD^+$  actúa como mediador para transportar los electrones entre la enzima y el electrodo, en la superficie del electrodo la  $NADH$  se oxida bajo la influencia de un potencial aplicado y la corriente de oxidación es directamente proporcional a la concentración de L-lactato en la muestra. Por otro lado, la LO al oxidar el L-lactato forma peróxido de hidrógeno, el cual es electroquímicamente activo y puede reducirse u oxidarse para dar una corriente eléctrica directamente proporcional a la concentración del L-lactato [12].

En Bogotá el dispositivo comercial estándar es el Lactate Scout, que basa su funcionamiento en un sistema electroquímico que tiene como muestra sangre, y usualmente es utilizado para el control fisiológico y bioquímico de los atletas de alto rendimiento [39]. El sensor presenta un rango de detección de 0.5 - 25 mM y resultados en un lapso de 15 segundos. Se suministra con una solución de calibración que se utiliza como control de calidad para garantizar que el equipo funciona correctamente. En la tabla 2.2 se pueden observar otros sensores disponibles en el mercado basados en sistemas electroquímicos con sus respectivos rangos de detección.

Tabla 2.2: Sensores disponibles comercialmente de L-lactato [5], [13]

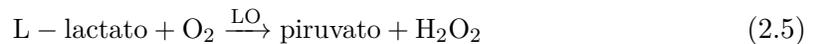
Sensor	Rango de detección (mM)	Tiempo de análisis (s)
Lactate Pro	0.8 - 23.3	60
Lactate Plus	0.3 - 25	13
Lactate Scout	0.5 - 25	15
The edge	0.7 - 22.2	45
Lactate Xpress	0.3 - 20	13

Algunas desventajas que presentan estos sensores es que requieren de tiras reactivas plásticas para recolectar la muestra biológica y realizar la reacción enzimática, suponiendo un alto costo económico y medioambiental. Además aunque permite la adquisición de datos en el punto de atención del paciente, los sensores no presentan un buen comportamiento en rangos de L-lactato superiores a 8 mM, de forma que no permiten un correcto monitoreo del analito bajo condiciones clínicas o actividades deportivas de alto rendimiento [11], [13], [14].

La dificultad en obtener precisión en la medida de concentración de L-lactato, cuando se une la enzima LDH, se puede deber a que la oxidación de la coenzima es una reacción reversible, lo que se traduce en una producción mínima de especies NADH, dificultado su cuantificación [40]. Por otro lado, si se hace uso de la enzima LO, los problemas pueden deberse a que la enzima cuenta con una capa proteica, que se comporta como una barrera a la transferencia de electrones, por lo que esta separación y la distancia entre el mediador y la enzima disminuyen el funcionamiento óptimo del sensor [41].

## B. Cambios de absorción

Entre las pruebas que se realizan en laboratorios se encuentran las que se basan en cambios de absorción. Estas hacen uso de la lactato oxidasa (LO) para oxidar el L-lactato y generar peróxido de hidrógeno, como se observa en la ecuación 2.5.



Posteriormente el peróxido de hidrógeno es utilizado para generar un cromógeno por medio de la peroxidasa. De esta forma la intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración del L-lactato y se determina midiendo el aumento de absorbancia de la banda ubicada entre 540 nm y 550 nm. Algunas desventajas que presenta este método es la recolección de la muestra, pues algunos recipientes pueden afectar el resultado, además se debe hacer un proceso de centrifugación y separación para

recolectar únicamente el plasma sanguíneo. Este método requiere de personal especializado para el manejo y transporte de muestras, además se requieren de equipos como el espectrofotómetro para su respectivo análisis. No es apto para ser usado en los puntos de atención al usuario, pues la muestra debe ser transportada para ser analizada, además la manipulación de la muestra requiere de mayor cuidado y limpieza para garantizar la estabilidad de los reactivos y obtención de resultados correctos [15], [16].

### C. Cambios de fluorescencia

Como alternativa a los métodos mencionados previamente se han desarrollado estudios donde se hace uso de la fluorescencia para la detección del L-lactato. De Marcos, et al. desarrollaron un método de detección de L-lactato en sangre, basándose en la fluorescencia dada por la  $NAD^+$  y haciendo uso de la oxidación del piruvato con la enzima LDH, el método presenta un rango de detección de 2-20  $\mu\text{g/mL}$  [42]. Durante la reacción la intensidad de la fluorescencia de la  $NAD^+$  disminuye y esto se asocia al aumento de las concentraciones de L-lactato. Por otro lado, Groegel, et al. desarrollaron un método basado en la detección de peróxido de hidrógeno, el cual se obtiene a partir de la oxidación del L-lactato por la enzima LO. El funcionamiento se debe gracias a una transferencia de electrones entre el peróxido de hidrógeno y el fluoróforo 4-amino-1,8-naftalimida acoplado a p-anisidina, la intensidad de la fluorescencia aumentó en función de la concentración de L-lactato [43]. El método presenta un rango de detección de L-lactato de 0.5 a 10  $\mu\text{M}$  con un tiempo de respuesta de seis minutos y un límite de detección de 164 nM.

Estos métodos requieren de equipos especializados para hacer la medición de la señal de intensidad, además de personal especializado para su interpretación y manejo de muestras. Además como se menciono previamente aquellos métodos que hacen uso de la enzima LDH para hacer la conversión a  $NAD^+$  presentan inconvenientes pues al ser una reacción reversible se pueden perder especies del analito y por lo tanto obtener un resultado erróneo, puesto que estos sistemas se basan en la fluorescencia de la coenzima  $NAD^+$ .

Los sistemas previamente explicados son los que se encuentran actualmente disponibles para la medición del L-lactato. Sin embargo, presentan desventajas como la necesidad de equipos y personal especializado para la interpretación de resultados. Es así que en los últimos años con el fin de evitar esos problemas surge el interés en las nanopartículas con propiedades ópticas, que presentan respuestas fluorescentes en presencia de diversos analitos y permiten identificar el cambio dado por concentración basándose en la intensidad de emisión. Los puntos de carbono han llamado especialmente la atención por sus propiedades fluorescentes para aplicaciones biomédicas, como sensores de metabolitos como la glucosa y el L-lactato [44].

## 2.2 Puntos de carbono

### 2.2.1. Síntesis

Los puntos de carbono (PC) son nanopartículas de morfología cuasi-esférica, de diámetro usualmente inferior a 10 nm. Los PC están compuestos de carbono (principalmente de carácter  $sp^2$  y, a veces,  $sp^3$ ), aunque su estructura final es dependiente de la composición química de los precursores utilizados para sus síntesis [45]. Los métodos de síntesis pueden clasificarse como “top down” o “bottom up”. En los métodos “top down” se usan como precursores piezas

grandes como grafito, grafeno, nano-diamantes u hollín de carbono y técnicas como combustión térmica, ablación láser y oxidación química o electroquímica, esta forma de síntesis presenta desventajas como bajo control del tamaño de las nanopartículas o bajo rendimiento cuántico y ventajas como ser procesos rápidos y sencillos. Por otro lado, para los métodos “bottom up” se reportan precursores como ácido cítrico y precursores biológicos como carbohidratos. En cuanto a las técnicas se usan aquellas como la carbonización basada en calor como solvothermal o hidrotermal o aquellas que hacen uso de irradiación asistidas por microondas [46]-[48].

El método asistido por microondas se basa en la capacidad de las moléculas polares para absorber la radiación de microondas y convertirla en calor por medio de calentamiento dieléctrico. Esto se da debido a que las moléculas polares generan calor a través de la pérdida dieléctrica y la fricción entre ellas [49]. Este proceso de síntesis presenta ventajas con respecto a otras técnicas de calentamiento pues la reacción es rápida y eficiente. Esta técnica permite una distribución homogénea del calor, evitando la formación de subproductos que posteriormente deben eliminarse en el proceso de lavado [50]. Dado que la irradiación de microondas se puede detener instantáneamente, el riesgo de sobrecalentamiento de las muestras generalmente se minimiza. Las principales limitaciones de las reacciones asistidas por microondas están relacionadas con la presión que puede alcanzar el reactor pues está directamente relacionada con el punto de ebullición del disolvente y la temperatura de reacción. Otro inconveniente es el volumen requerido para la ampliación comercial. La mayoría de los reactores de microondas funcionan en un sistema basado en recipientes pequeños, lo que impide su uso en reacciones a gran escala [51].

En el proceso de síntesis por el método solvothermal se hace uso de un reactor autoclave, que consiste en un recipiente de presión encargado de conseguir la temperatura deseada y cuyo cuerpo es de acero inoxidable, además tiene una cámara presurizada de teflón en la que se introducen los elementos a reaccionar. El funcionamiento de este se basa en la transferencia de calor por conducción. Típicamente se observan distribuciones de temperatura heterogéneas dentro del recipiente de reacción, donde el exterior está más caliente y el centro más frío, esto puede resultar en reacciones incompletas y promover la formación de subproductos e impurezas [52]. Requieren tiempos de reacción largos para asegurar que el medio de reacción haya alcanzado completamente la temperatura establecida. La exposición prolongada al calor puede en algunos casos conducir a la degradación de los reactivos minimizando el rendimiento o simplemente impidiendo que ocurra la reacción. Como ventajas presenta el poder reaccionar volúmenes mayores en comparación con la técnica asistida por microondas, además permite reaccionar solventes no polares.

### 2.2.2. Pruebas de caracterización

#### A. Potencial Zeta

El potencial zeta (PZ) representa la magnitud de atracción o repulsión electrostática entre las partículas, lo cual es útil para determinar la estabilidad de las nanopartículas. El PZ se halla ubicando la muestra en un campo eléctrico midiendo la cantidad de trabajo que debe realizar la nanopartícula para moverse, técnica que se conoce como dispersión electroforética [53].

#### B. Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) brinda información

cuantitativa sobre los grupos funcionales presentes en la superficie de los PC. El espectro infrarrojo identifica la estructura molecular de estos grupos funcionales basándose en la vibración y rotación de los átomos. Cuando se atraviesa una muestra con una longitud de onda específica, la muestra absorbe la energía de esta cuando es igual a la energía necesaria para que se dé una vibración de los átomos. Las muestras se irradian con longitudes de onda que van desde los  $4000\text{ cm}^{-1}$  a los  $400\text{ cm}^{-1}$ , por ello es necesario reconstruir el espectro a través de la transformada de Fourier [54].

### C. Espectroscopia ultravioleta-visible

La espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis) se utiliza para determinar las propiedades de absorción y emisión de las nanopartículas. El funcionamiento de este se basa en las transiciones de los electrones entre las bandas de energía de las moléculas al ser excitados. Estas transiciones son dependientes de los enlaces presentes en las moléculas. Cuando a los electrones se les excita a una longitud de onda igual a la energía necesaria para pasar de un estado fundamental a un estado de mayor energía, estos la absorben y hacen la transición entre las bandas de energía, lo que genera los espectros de absorción. Cuando los electrones regresan a su estado fundamental desde un estado de mayor energía se produce la emisión de la luz, y a partir de esto se obtienen los espectros de emisión [55].

### 2.2.3. Propiedades

Los PC poseen propiedades ópticas y fisicoquímicas que han sido estudiadas desde su descubrimiento [56]. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas los PC tienen la capacidad de presentar estabilidad coloidal y de adherirse a moléculas en su superficie por medio de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o por la formación de enlaces covalentes [48]. En cuanto a sus propiedades ópticas los PCs tienen la propiedad de generar fluorescencia en el espectro visible al ser irradiados con luz UV-Vis. Además presentan propiedades como fotoestabilidad y ausencia de fotoblanqueo [20], [21]. Es así que ha aumentado el interés en los PC en aplicaciones biomédicas como agentes de contraste para muchas técnicas de adquisición de imágenes, plataformas diagnósticas y de liberación de medicamentos y biosensores [57]. Para aplicaciones en biosensores los PC han sido usados como elemento transductor electroquímico, piezo-eléctrico u óptico que reacciona ante la presencia del analito de interés. En el caso de los biosensores ópticos estos se basan en la respuesta ante diferentes analitos, provocando inhibición o aumento en la intensidad de emisión [58].

### 2.2.4. Aplicaciones en detección de peróxido de hidrógeno

El uso de fluorescencia ofrece ventajas, como proporcionar resultados analíticos mediante lectura visual directa y mejorar la precisión y sensibilidad, con bajos límites de detección. Es por ello que han surgido estudios en los que los puntos de carbono cambian su intensidad de fluorescencia en función de la concentración de peróxido de hidrógeno, demostrando un buen comportamiento en los rangos y límites de detección [17]. En la tabla 2.3 se observan algunos de los estudios que se han desarrollado para la detección de peróxido de hidrógeno con su respectivo rango de detección.

Tabla 2.3: Estudios desarrollados haciendo uso de puntos de carbono para la detección de peróxido de hidrógeno

Nanopartícula	Precursores	Rango de detección (mM)	Límite de detección (mM)	Referencia
Puntos de carbono	Ácido cítrico y tiramina	$1-7.5 \cdot 10^{-4}$	$8.14 \cdot 10^{-7}$	[22]
Puntos de carbono	L-penicilamina	$0.1 - 100 \cdot 10^{-3}$	-	[59]
Puntos cuánticos de carbono	Hígado de cerdo	$5 - 60 \cdot 10^{-3}$	$0.86 \cdot 10^{-3}$	[60]
Puntos cuánticos de carbono	Granos de mostaza	0.02-0.2	0.015	[61]
Puntos de carbono	Ácido cítrico	$1 - 20 \cdot 10^{-3}$	$0.98 \cdot 10^{-3}$	[62]

Rossini, et al. desarrollaron un sensor para la detección de L-lactato haciendo uso de puntos de carbono [22]. El sensor basa su funcionamiento en el comportamiento de los puntos de carbono en presencia del peróxido de hidrógeno, que se obtiene a partir de la oxidación del L-lactato por medio de la lactato oxidasa. Se observó que la intensidad de fluorescencia de los puntos de carbono disminuye cuando aumenta la concentración del peróxido de hidrógeno, el sensor tiene como muestra suero sanguíneo o saliva y presenta un rango de detección de  $1-7.5 \cdot 10^{-4} mM$  y un límite de detección de  $8.14 \cdot 10^{-7} mM$ . Para hacer una lectura de las concentraciones los autores hacen uso de la técnica de espectrofotometría, por lo que requieren de equipos de alto costo y personal capacitado para la interpretación de los resultados.

## Capítulo 3

# METODOLOGÍA

En la figura 3.1, se puede observar el diagrama de flujo del proceso que se llevó a cabo para la ejecución del proyecto. La primera etapa consiste en la síntesis de puntos de carbono (PC) por método de reacción por microondas y solvotermal, a continuación se realizó la caracterización de las nanopartículas obtenidas y finalmente la caracterización de las propiedades fluorescentes en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno por medio de la construcción de una base de datos con imágenes de las soluciones bajo irradiación de 365 nm y curvas de calibración de la intensidad de emisión.

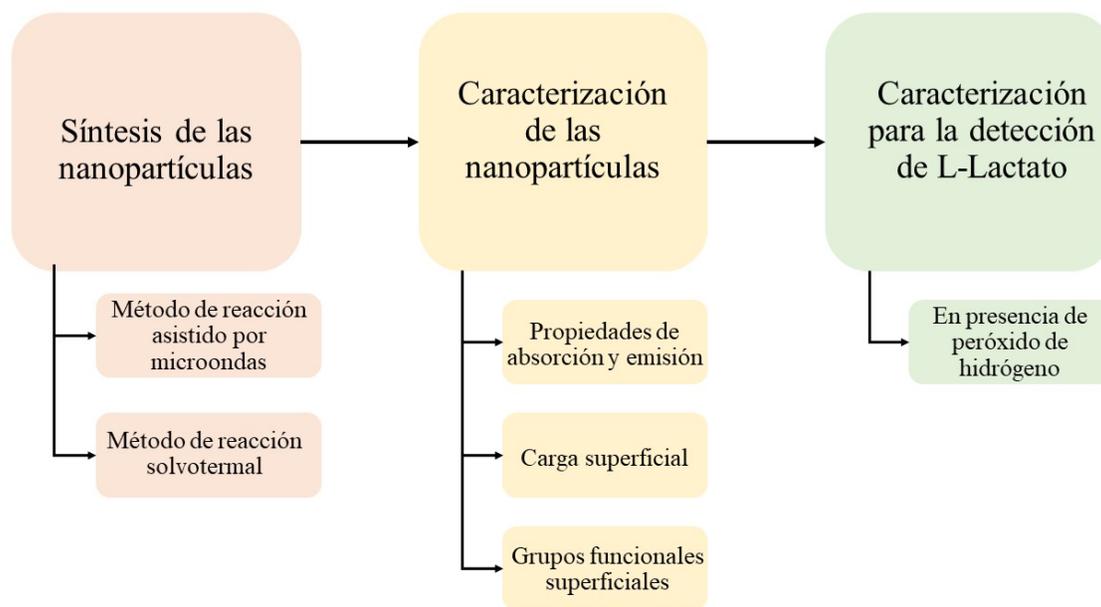


Figura 3.1: Etapas de la metodología desarrollada en el proyecto.

### 3.1 Síntesis de puntos de carbono

En general los procedimientos de síntesis contaron con tres etapas principales, la síntesis, el lavado y el secado. Los tipos de síntesis utilizados en este proyecto fueron del tipo "bottom-

up", consiguiendo una carbonización de los precursores orgánicos basada en radiación o calor. Se realizó un proceso de lavado con el fin de minimizar la presencia de productos secundarios y precursores sin reaccionar de diferentes tamaños y perfiles de dispersabilidad, evitando errores en los resultados por presencia de impurezas fluorescentes [63]. Para el lavado se hizo uso de métodos como filtración, centrifugación y cromatografía por columna. Para eliminar la materia insoluble se usaron filtros de jeringa de tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , de esta forma las impurezas que tenían mayor tamaño que el poro fueron excluidas. El proceso de centrifugación se utilizó para eliminar las impurezas insolubles que se encontraban en el fondo del tubo y al finalizar el proceso se separó y almacenó el sobrenadante que contenía los PC.

Para eliminar las pequeñas impurezas insolubles se realizó el proceso de cromatografía por columna. El mecanismo de separación se basa en el tamaño de las moléculas, de las moléculas capaces de penetrar los poros las primeras que eluyen son las grandes y luego las demás en orden decreciente de sus masas moleculares. Este paso consistió en una fase estacionaria y una fase móvil, la fase estacionaria se obtuvo al mezclar gel de sílice y una solución buffer en una pipeta pasteur, con un diámetro de 7 mm y altura de 5 cm, formando gránulos de distintos tamaños [64]. La fase móvil consistía en la dispersión de la solución que se obtuvo a partir del proceso previo de lavado. Para seleccionar los recipientes que contenían los PC se irradiaban bajo una lámpara de luz UV de 365 nm, con el fin de diferenciarlos de los fluoróforos y residuos.

### 3.1.1. Síntesis asistida por microondas

En la figura 3.2 se observa el proceso de síntesis de los puntos de carbono llevada a cabo por el método de reacción asistido por microondas. Este es un proceso modificado al realizado por Rossini, et al. [65]. Los reactivos que se utilizaron fueron 0.5g de ácido cítrico (Scharlau) como precursor orgánico y 3mL de N,N-dimetilformamida (Scharlau) y 3 mL de etanol absoluto (Scharlau) como disolventes. Como primer paso se realizó el pesaje de los materiales seguidos de un proceso de agitación tipo vortex y sonicación por 5 minutos. La solución resultante se introdujo en el reactor de síntesis de microondas MONOWAVE 50 (Anton Paar, Austria), durante 5 minutos a una temperatura de 175°C y utilizando el método de calentamiento AFAP (As fast as posible) con una duración total de 15 minutos (5 minutos de calentamiento, 5 minutos de reacción y 5 minutos de enfriamiento). Posterior a la síntesis se llevó a cabo la etapa de lavado, para esto se realizó una centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos, luego se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2  $\mu\text{m}$  y por último se realizó cromatografía por columna haciendo uso de una fase estacionaria constituida por gel de sílice y la solución buffer (agua miliQ y acetonitrilo) y una fase móvil dada por la solución. Para el proceso de secado se utilizó un horno a 65°C por 12 horas. Las muestras se almacenaron secas en tubos eppendorf de 2 mL, para luego disolverse y ser utilizadas.

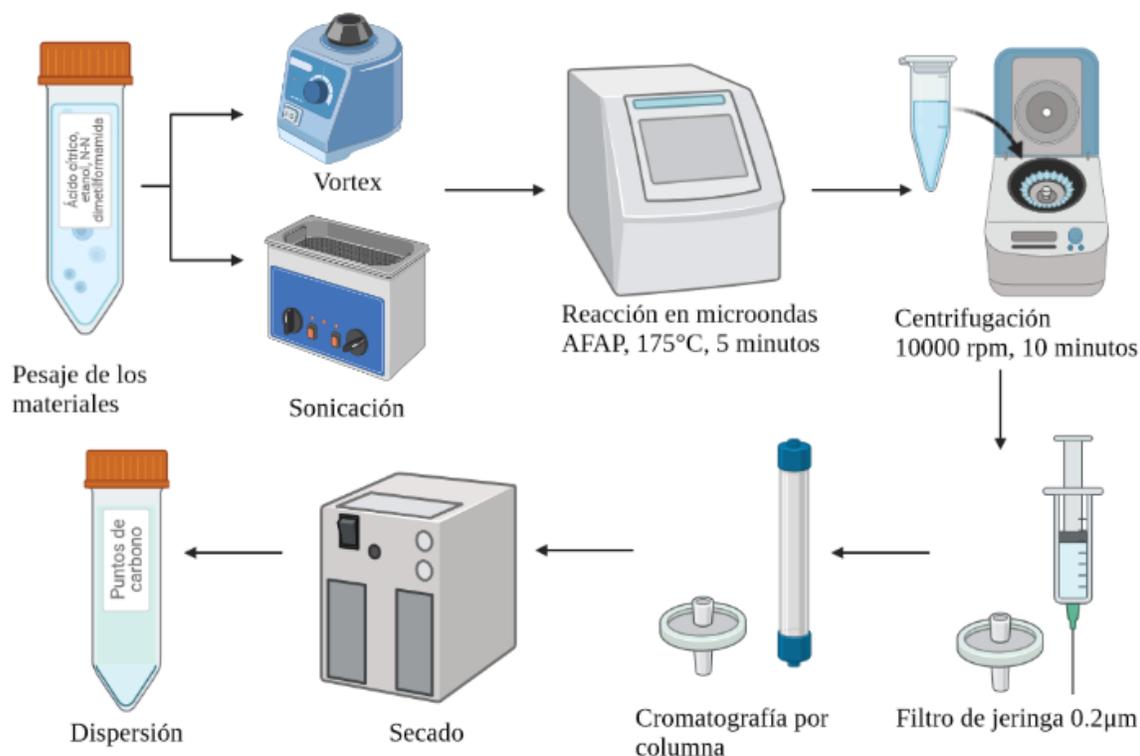


Figura 3.2: Proceso de síntesis de puntos de carbono por método de microondas.

### 3.1.2. Síntesis solvotermal

El proceso de esta técnica de síntesis se puede observar en la figura 3.3. Este es un proceso modificado al realizado por Rossini, et al. [22]. Los reactivos que se utilizaron fueron 1 g de ácido cítrico (Scharlau) y 1 g de urea (Sigma-Aldrich) como precursores orgánicos y 15 mL de formamida (Sigma-Aldrich) como solvente. Como primer paso se realizó el pesaje de los materiales, seguidos de un proceso de sonicación por 10 minutos. La solución resultante se introdujo en el reactor solvotérmico, durante 12 horas a una temperatura de 160°C. Posterior a la síntesis se tuvo la etapa de lavado, para esto se hizo una centrifugación a 4.000 rpm por 20 minutos, se retiró el sobrenadante y este se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por 10 minutos dos veces, luego se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm y por último se realizó cromatografía por columna haciendo uso de una fase estacionaria constituida por gel de sílice y la solución buffer (agua miliQ y acetonitrilo) y una fase móvil dada por la solución. Para el proceso de secado se utilizó un horno a 100°C por 6 horas. Las muestras se almacenaron secas en tubos eppendorf de 2 mL, para luego disolverse y ser utilizadas.

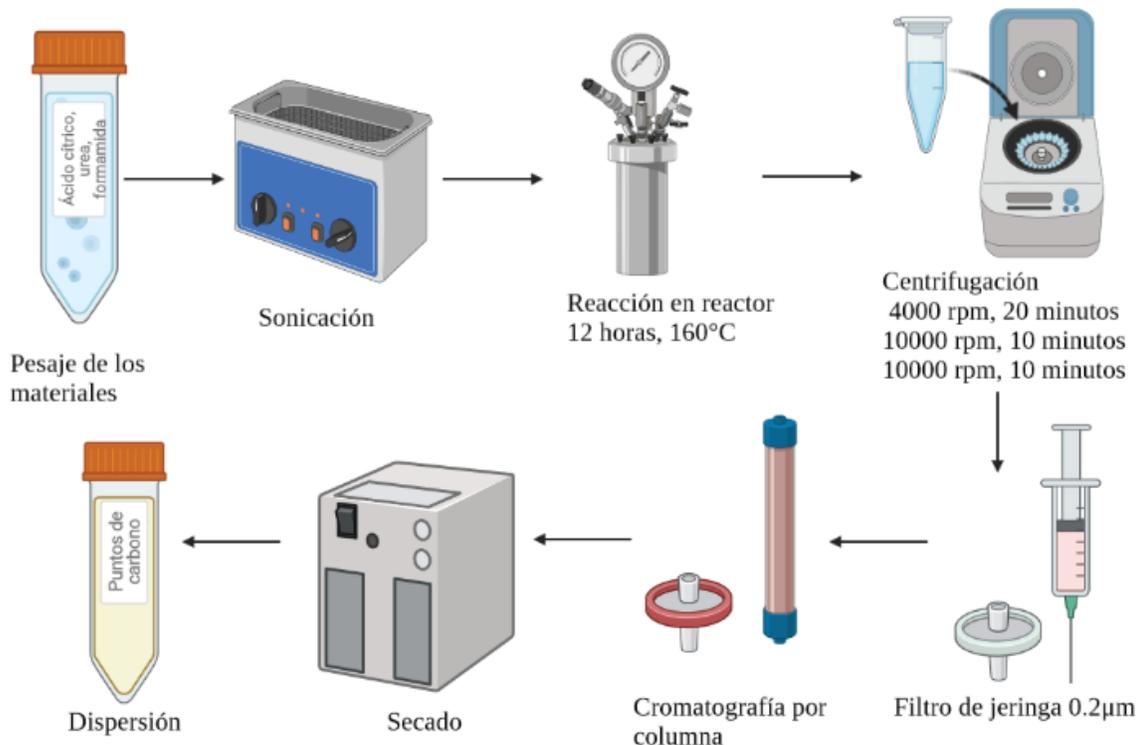


Figura 3.3: Proceso de síntesis de puntos de carbono por método solvotermal.

### 3.2 Caracterización de los puntos de carbono

Los puntos de carbono fueron caracterizados por la prueba de potencial zeta (PZ) para conocer su carga superficial, espectroscopía de infrarrojo (FTIR) para la identificar los grupos funcionales superficiales y Espectrofotometría UV-Vis y fluorescencia para la determinación de las propiedades de absorción y emisión de los puntos de carbono.

#### 3.2.1. Potencial zeta

La prueba PZ se realizó con el equipo Zetasizer-Malvern instruments del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos de la Universidad de los Andes. Las muestras se dispersaron a una concentración de 1 mg/mL en agua destilada.

#### 3.2.2. Espectroscopia infrarroja (FTIR)

La caracterización de los espectros de FTIR se hizo con el equipo ThermoScientific Nicolet iS5 FTIR y el software OMNIC. Se tomaron las mediciones de los PC en estado solido a partir de una muestra de 10 mg y se analizaron por medio del software Origin Lab ®.

#### 3.2.3. Espectroscopia Uv-Vis

Los espectros de absorción UV-Vis y fluorescencia de los puntos de carbono se obtuvieron por medio del espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES, con el software Ocean View a tempe-

ratura ambiente. Las mediciones se tomaron en un rango de longitud de onda desde 200 nm a 800 nm usando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los datos obtenidos de Ocean View fueron tratados con el software Origin Lab ® para obtener las gráficas de absorción y emisión en función de la longitud de onda y finalmente obtener una curva de calibración que permita conocer la concentración de puntos de carbono obtenida en función de estas.

### **3.3 Caracterización de las propiedades de fluorescencia para la detección de L-lactato**

La fluorescencia exhibida por los PC es proporcional a la cantidad de nanopartículas que generan este fenómeno óptico. En este caso se evaluaron cambios en la intensidad de la fluorescencia en presencia del peróxido de hidrógeno, el cual es producto de la acción enzimática de la enzima lactato oxidasa en el L-lactato para convertirla en piruvato.

Por espectroscopía de fluorescencia se construyeron curvas de calibración haciendo uso del área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia de los puntos de carbono en función de la concentración del peróxido de hidrógeno. Esto se hizo variando la concentración del analito desde 0 mM hasta 50 mM. Además por cada concentración de peróxido de hidrógeno se tomó una fotografía bajo la irradiación de una lámpara de 365 nm.

Las imágenes adquiridas se almacenaron en carpetas diferentes dependiendo el método de síntesis (Asistida por microondas, solvotermal), además se crearon subcarpetas con nombre de la concentración constante de los puntos de carbono. Las imágenes se almacenaron tituladas con la concentración de peróxido de hidrógeno presente en la solución.

Con el objetivo de identificar si se presenta una variación en las imágenes en función de la concentración del peróxido de hidrógeno se hizo uso del software MATLAB R2021a. Para esto se realizó una segmentación por umbral para crear una máscara con la región de interés (ROI), como se observa en la imagen 3.4. La imagen original se pasó a escala de grises y se operó con la máscara que se obtuvo. A partir de la imagen segmentada se halló el contraste a partir de la distribución de los valores de píxeles dado por la matriz de co-ocurrencia en niveles de grises, con estos se hizo la correlación con la concentración de peróxido de hidrógeno.

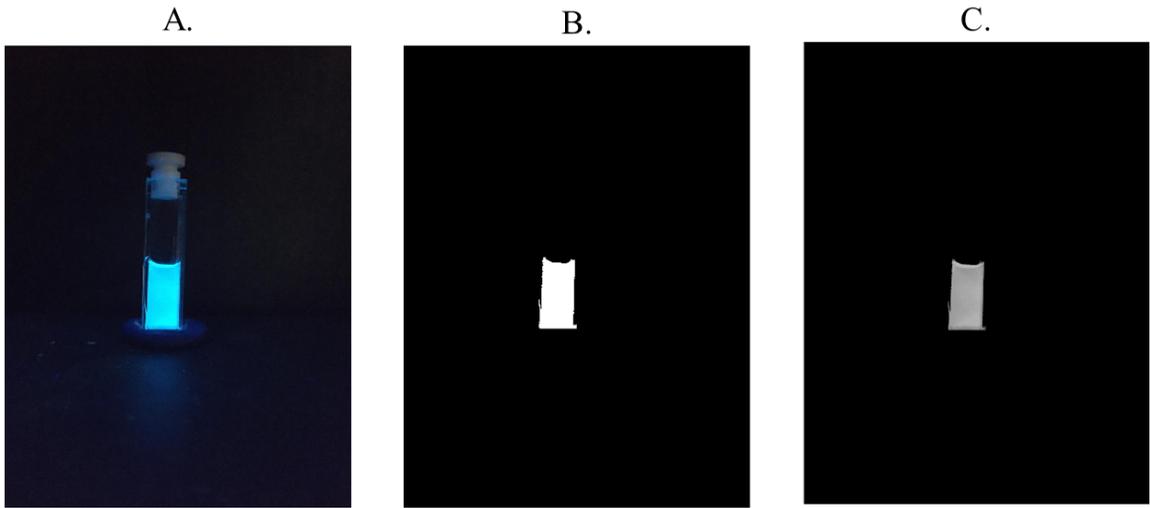


Figura 3.4: Proceso de segmentación. A) Imagen original. B) Máscara para realizar la segmentación. C) Imagen segmentada en escala de grises

## Capítulo 4

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del proceso de síntesis de puntos de carbono y sus propiedades de acuerdo a las técnicas de caracterización. Adicionalmente, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de la fluorescencia en presencia del peróxido de hidrógeno, sus curvas de calibración y las correlaciones dadas a partir de las imágenes.

De la síntesis se pudo observar que en el caso del método de microondas no se necesitó de tantos procesos de lavado como en el método solvotermal, sin embargo para aplicaciones donde se requiera producción a escala el método solvotermal presenta ventajas pues permite sintetizar mayor cantidad de nanopartículas. En la figura 4.1 se observan ejemplos de muestras que se obtuvieron del proceso de síntesis y lavado por cromatografía de columna, los recipientes se cambiaron cada que se completaban 0,2 cm en altura de estos. En el caso del método asistido por microondas los recipientes que se observan son del sexto al decimosegundo. Por otro lado en el caso del método solvotermal corresponden del recipiente decimosegundo al decimoctavo. Los que se observan en la figura son aquellos que presentaron mayor fluorescencia al ser irradiados bajo una luz de 365 nm.



Figura 4.1: Muestras obtenidas a distintos tiempos por cromatografía de columna bajo luz de 365 nm.

## 4.1 Caracterización de los puntos de carbono

### 4.1.1. Método asistido por microondas

En la figura 4.2 se observan puntos de carbono obtenidos a partir de la síntesis asistida por microondas (PC-M) a una temperatura de 175°C, irradiados bajo una luz de 365 nm. Además se observan los espectros de absorción y emisión de PC a una concentración de 2mg/mL dispersos en agua, lo que indica que el método de síntesis favorece la formación de PC fluorescentes.

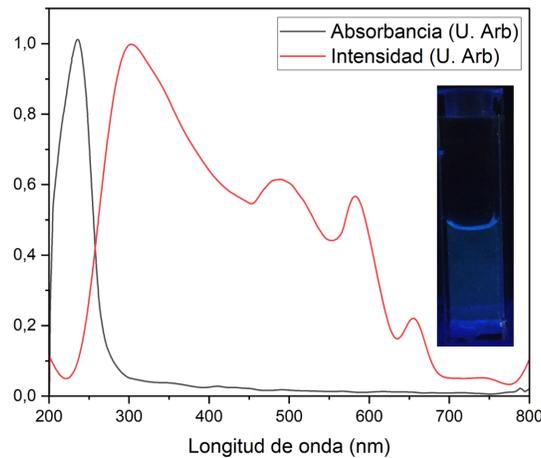


Figura 4.2: Propiedades ópticas de PC-M a 2 mg/mL en solución acuosa.

A partir del proceso de lavado y secado se obtuvo una muestra de 10 mg para usarse en la técnica de caracterización FTIR. En la figura 4.3 se observa la información estructural de la superficie de los PC-M. Entre los  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $2500\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la región de enlaces de unión simple a H, según la gráfica se tienen enlaces asociados a las funcionalidades -OH y -CH. Las uniones dobles se observan en la región de  $2000\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$ , confirmando la presencia de enlaces -C=C y -C=O. Finalmente en la región que va desde los  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  se tienen las uniones simples, en este caso C-O. A partir de los resultados se puede deducir que el ácido cítrico usado para la síntesis de los PC sirve como fuente de las especies atómicas O, C y H para los enlaces -OH, -C=O y -CH. Por otro lado, los enlaces -C=C y C-O se atribuyen a las hibridaciones  $sp^2$  y  $sp^3$  características de los PC.

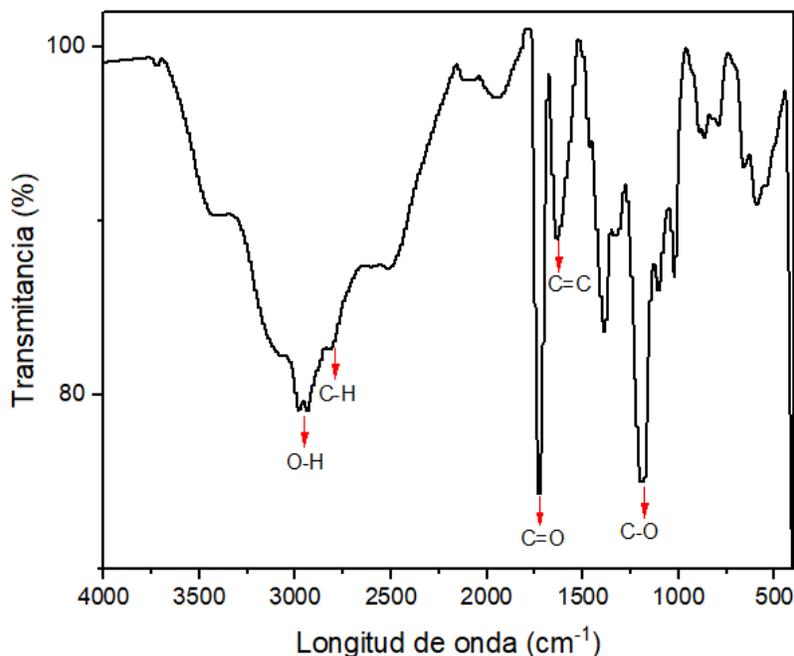


Figura 4.3: FTIR de PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico.

Para el estudio de las propiedades ópticas se variaron las concentraciones de los PC de 0,25 mg/mL a 2 mg/mL dispersos en agua. El espectro de absorción en función de la concentración se puede observar en la figura 4.4. Se muestra que los espectros están centrados a la longitud de onda de mayor transición. Los máximos de las bandas de absorción varían entre los 200 nm y 300 nm, los cuales se atribuyen a las transiciones  $\pi-\pi^*$ , dadas por el enlace  $-C=C$  [66], como se mencionó previamente atribuidas a las hibridaciones  $sp^2$  de los PC. En la gráfica se evidencia un corrimiento en función a las concentraciones de los PC, esto puede deberse a los puentes de hidrógeno que se forman entre el agua y el enlace  $-C=O$ , pues a mayor concentración más puentes de hidrógeno se presentan y por lo tanto mayor corrimiento en la banda de absorción. Para verificar que el corrimiento se da por el solvente, entonces debería compararse con otros solventes, distintos al agua.

Para estudiar el comportamiento de la absorción en función de la concentración de los puntos de carbono se realizó una curva de calibración como se presenta en la figura 4.5. Para determinar el punto de absorbancia por cada concentración se halló el área bajo la curva del espectro. En la gráfica se evidencia un comportamiento lineal en función de la concentración de los puntos, es decir a mayor concentración mayor absorción se tiene por parte de los PC. A partir del coeficiente de determinación ajustado (Adj.  $R^2$ ), con un valor de 0,96 se puede interpretar que hay un modelo de ajuste lineal que predice de forma eficiente la variación de la absorción en función de la concentración.

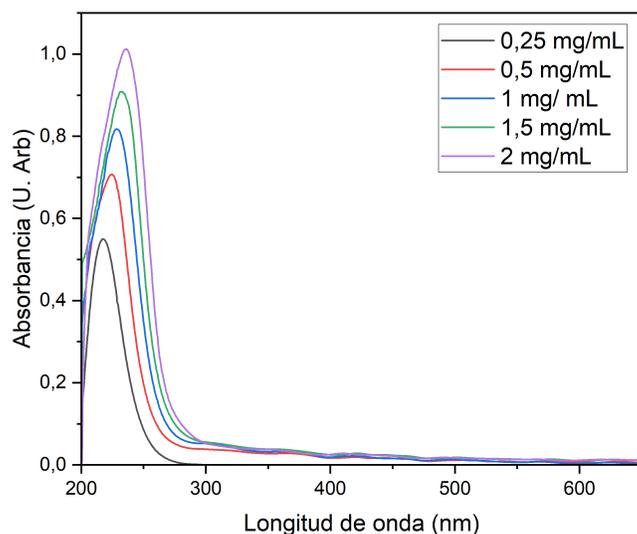


Figura 4.4: Espectros de absorción en función de la concentración de los PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico.

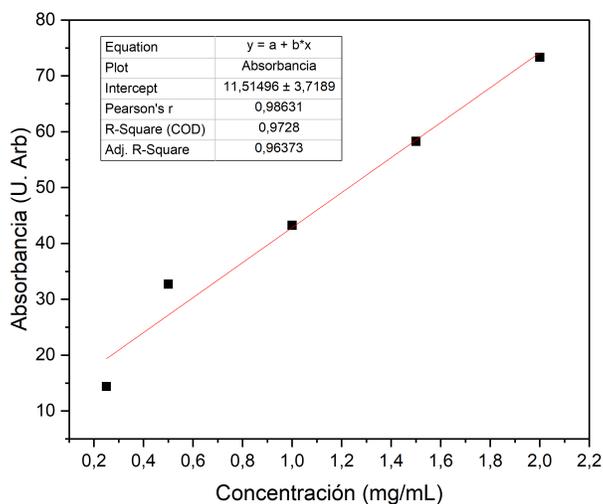


Figura 4.5: Curva de calibración de absorción en función de la concentración de los PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico.

Para observar el comportamiento de la intensidad de emisión de los PC-M se usaron concentraciones variando de 0,25 mg/mL a 2 mg/mL diluidas en agua. En la figura 4.6, irradiadas bajo una longitud de onda de 365 nm se evidencia como a medida que disminuye la concentración la fluorescencia de las soluciones disminuye. Los espectros de emisión de los PC-M se

muestran en la figura 4.7, estos se obtuvieron al irradiar los PC-M con una lampara de deuterio. Se observan bandas fluorescentes entre los 300 nm y 650 nm, los máximos corresponden a una longitud de onda de 300 nm, 500 nm, 600 nm y 650 nm.

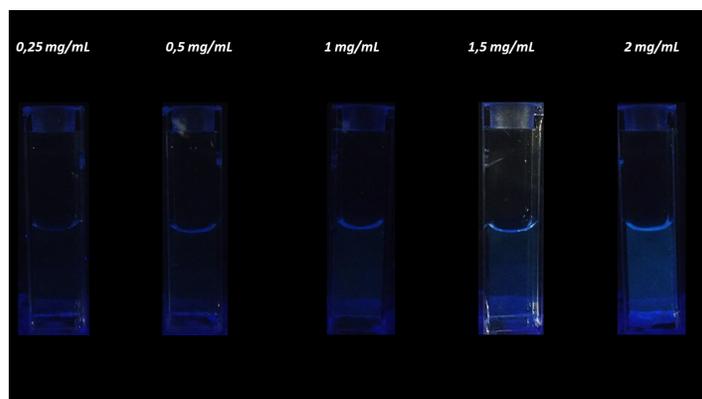


Figura 4.6: Fotos de emisión bajo una irradiación de 365 nm variando la concentración de los PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico.

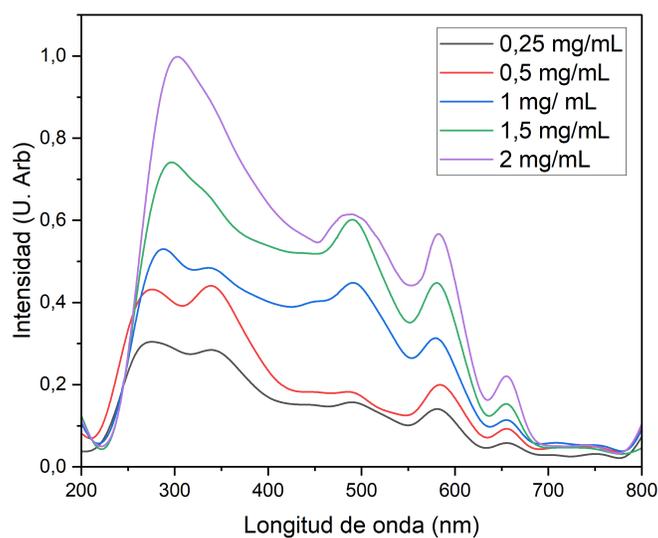


Figura 4.7: Espectros de emisión en función de la concentración de los PC-M en solución acuosa.

De la gráfica de absorción de los PC-M se puede observar que a pesar de presentar bandas entre los 200 nm y 300 nm, estas son pequeñas, lo que puede estar relacionado con el comportamiento de las gráficas de emisión de la figura 4.7. Pues los electrones a pesar de realizar transiciones a estados de energía superiores, al volver a su estado fundamental no cuentan con la suficiente energía para emitir fuertemente en el rango visible.

Se realizó una curva de calibración para estudiar el comportamiento de la intensidad de emisión en función de la concentración de los PC, como se observa en la figura 4.8. La curva de calibración se halló determinando el área bajo la curva por cada espectro, con el fin de saber la intensidad total por concentración. Se obtuvo que la intensidad tiene una tendencia lineal creciente con un Adj.  $R^2$  del 0,99 dependiente de la concentración de los puntos de carbono. Es así que hay un modelo lineal que explica como aumenta proporcionalmente la intensidad de emisión en función de la concentración de PC-M en solución acuosa.

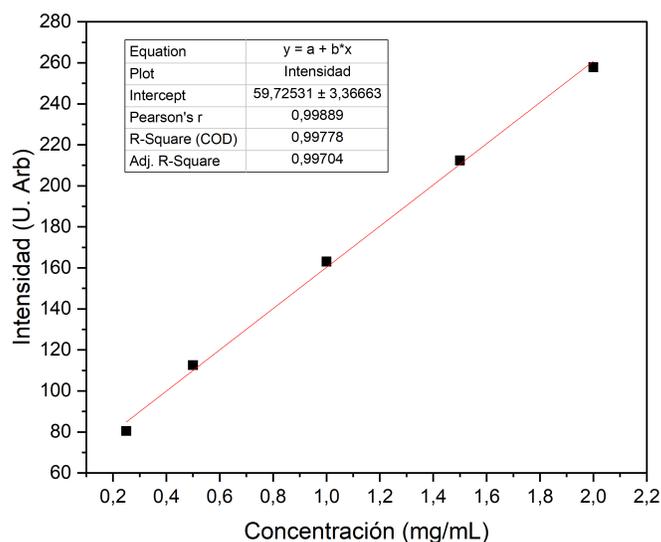


Figura 4.8: Curva de calibración de intensidad de los PC-M en solución acuosa.

#### 4.1.2. Método solvotermal

En la figura 4.9 se observan puntos de carbono obtenidos a partir de la síntesis por método solvotérmico (PC-S) a una temperatura de  $160^{\circ}\text{C}$ , irradiados bajo una luz de  $365\text{ nm}$ . Además se observan los espectros de absorción y emisión de PC-S a una concentración de  $0,05\text{ mg/mL}$  dispersos en agua, lo que indica que el método de síntesis favorece la formación de PC fluorescentes.

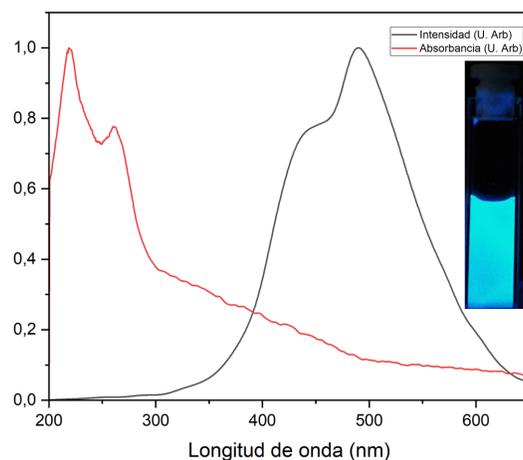


Figura 4.9: Propiedades ópticas de PC-S a 0,05 mg/mL en solución acuosa.

De acuerdo con la literatura el uso de nitrógeno en la síntesis de los PC modifica las características ópticas de estos [65]. En este caso evaluando el método PC-S (figura 4.9) efectivamente se observa cómo hay más bandas de absorción y con mayor anchura, en comparación con el método PC-M (figura 4.2). En cuanto al espectro de emisión se evidencia un corrimiento de la banda de fluorescencia hacia mayores longitudes de onda. Además, se evidencian las diferencias en las propiedades ópticas por la muestra que se observa en las figuras bajo irradiación de 365 nm, pues en los PC-S esta tiene una mayor intensidad de fluorescencia azul en comparación con los PC-M.

En la figura 4.10 se observa la información estructural de la superficie de los PC-S haciendo uso de una muestra de 10 mg. Entre los  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $2500\text{ cm}^{-1}$  se tienen los enlaces -NH, -OH y -CH. En la región que cubre de  $2000\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$ , se tienen las uniones dobles, a este respecto se evidencian los enlaces de vibración -C=C y -C=O. Finalmente en la región que va desde los  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  se tienen las uniones simples, como en este caso se observan los enlaces C-O y C-N. Es así que el ácido cítrico sirve como fuente de las especies atómicas O, C y H, y la urea de las especies de N. Esto debido a que en sus composiciones presentan alto contenido de estos átomos. Los enlaces -C=C y C-O se atribuyen a las hibridaciones  $sp^2$  y  $sp^3$  características de los PC.

De la información estructural se observa como en comparación con los PC-M se tienen mayor cantidad de enlaces, debido a que hay un precursor de más para las especies atómicas presentes en la superficie de las nanopartículas. Además se evidencia un cambio en la escala de la transmitancia pues en los PC-S se observan valores desde 10 %, mientras que en los PC-M se observan valores a partir de 75 %. Esto es un indicador de que en los PC-S hay mayor intensidad en sus diferentes tipos de vibraciones dadas por los enlaces previamente mencionados.

De la prueba de PZ, se obtuvo un valor de  $-34,6 \pm 4.38\text{ mV}$ , lo que indica una carga eléctrica negativa presente en la superficie de los PC-S. Esto se atribuye a la presencia de los pares libres electrónicos de las especies presentes del nitrógeno. Además indica que los PC-S presentan estabilidad en disolución, pues entre más negativo el valor del potencial zeta mayor

estabilidad se tiene en solución acuosa [67].

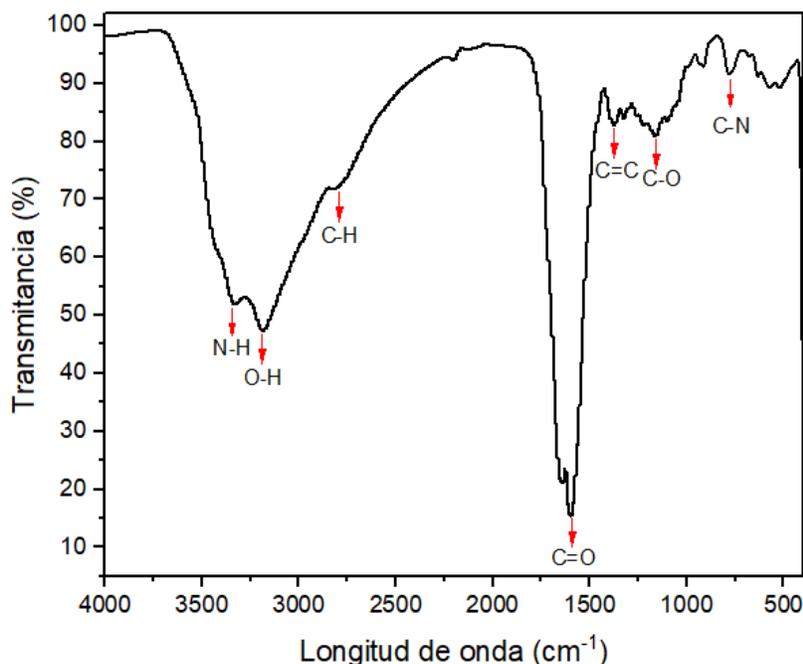


Figura 4.10: FTIR de PC-S sintetizados a partir de urea y ácido cítrico como fuentes de carbono y nitrógeno.

Para el análisis de las propiedades ópticas se variaron las concentraciones de los PC-S de 0,01 mg/mL a 0,1 mg/mL dispersas en agua. Los espectros de absorción se muestran en la figura 4.11. Se pueden observar bandas de absorción entre los 200 nm y 300 nm, los cuales se atribuyen a las transiciones electrónicas  $\pi$ - $\pi^*$ , relacionadas al enlace  $-C=C$  y bandas entre los 300 nm y 400 nm dadas por las transiciones  $n$ - $\pi^*$ , relacionadas a los grupos funcionales basados en nitrógeno. Como se mencionaba previamente, este método en comparación con los PC-M presenta la banda de absorción dada por las transiciones  $n$ - $\pi^*$  y presenta una mayor banda entre los 200 nm y 300 nm.

Para estudiar el comportamiento de la absorción en función de la concentración de los puntos de carbono se realizó una curva de calibración como se observa en la figura 4.12. Para el desarrollo de la curva se halló el área bajo la curva de la absorbancia por cada concentración. De la tendencia lineal se tiene un  $\text{Adj. } R^2$  del 0,99 lo que implica que hay un ajuste lineal que explica la variación de la absorbancia en función de la concentración de PC-S.

Los PC-S y los PC-M presentan un comportamiento lineal de la absorción en función de la concentración de nanopartículas presentes en la solución acuosa (figuras 4.5 y 4.12). Sin embargo, las diferencias están dadas por las concentraciones que se usan, pues en el caso de los PC-M se usan desde los 0,25 mg/mL hasta los 2 mg/mL pero en el caso de los PC-S se usan valores desde 0,01 mg/mL hasta 0,1 mg/mL. Esto debido a que cuando se hacía uso de concentraciones superiores a 0,1 mg/mL de los PC-S los espectros de absorción perdían información pues se presentaba mayor ruido y en el caso de los máximos presentes entre los 200 nm y 300 nm (figura 4.4), únicamente se observaba uno de ellos.

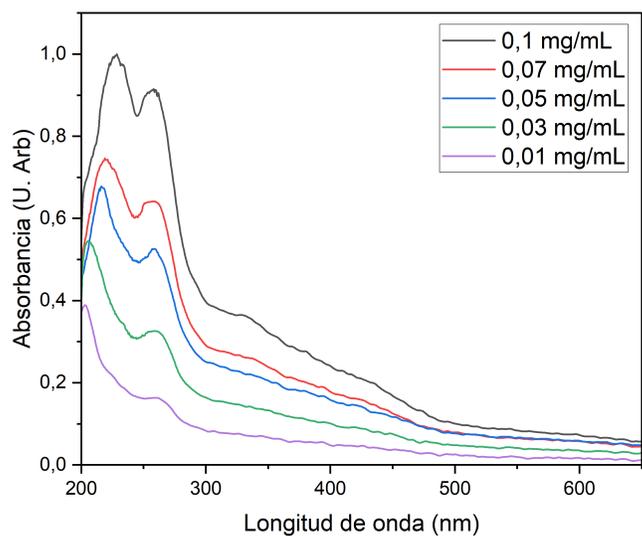


Figura 4.11: Espectros de absorción en función de la concentración de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico.

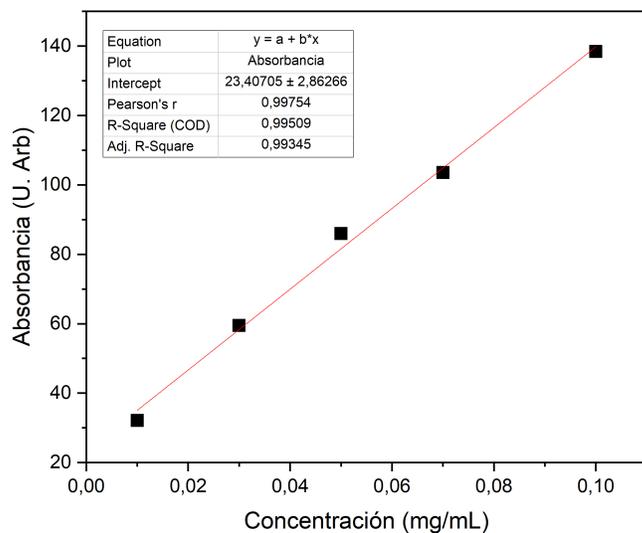


Figura 4.12: Curva de calibración de absorción en función de la concentración de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico.

En la figura 4.13 se observan las soluciones utilizadas en los espectros de absorción y emisión bajo una irradiación de 365 nm, como se ve exhiben una fluorescencia azul brillante. Al aumentar la concentración de los PC-S se evidencia un aumento en la intensidad de la

fluorescencia. Los espectros de emisión de las concentraciones se observan en la figura 4.14, estos se obtuvieron al irradiar los PC-S con una lámpara de deuterio. Se observan bandas fluorescentes entre los 400 nm y 600 nm, los máximos corresponden a una longitud de onda de 500 nm.

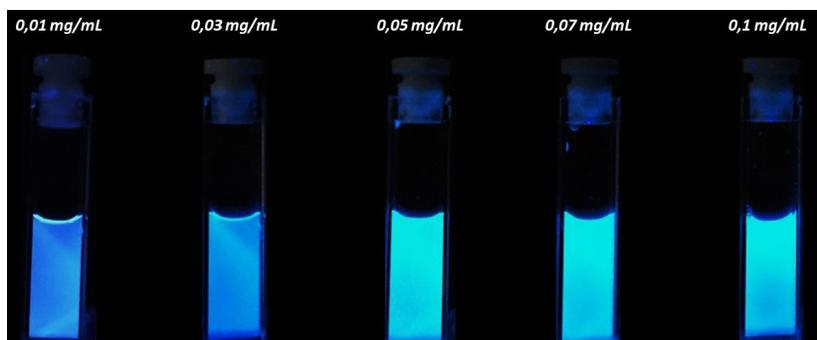


Figura 4.13: Fotos de emisión bajo una excitación de 365 nm de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico.

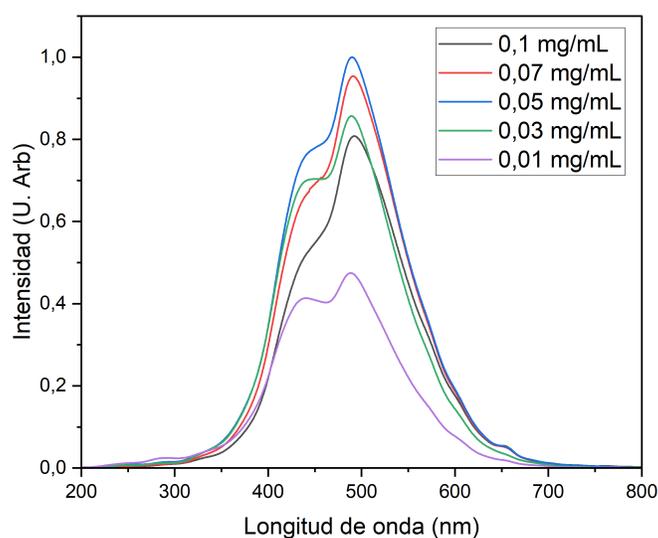


Figura 4.14: Espectros de emisión en función la concentración de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico.

Para estudiar el comportamiento de la intensidad en función de la concentración de los PC-S, se halló el área bajo la curva de los espectros para cada concentración, el experimento se repitió tres veces para confirmar los resultados de los espectros y por lo tanto del área bajo la curva. Obteniendo valores de desviación estándar entre el 2,5 % y 5.6 %. En la figura 4.15 se observan los valores promedios y desviaciones estándar correspondientes a cada concentración. Se evidencia como la intensidad primero aumenta y luego disminuye, conforme

aumenta la concentración. La inhibición por agregados (aggregation-caused quenching ACQ) se da generalmente cuando la absorción en las bandas  $\pi$ - $\pi^*$  presentan una alta intensidad [68]. Se producen agregados en las moléculas bloqueando las rotaciones intramoleculares [69]. En este caso como se evidenció en la figura 4.11, de la caracterización de la absorción los PC-S presentan una alta intensidad en la banda  $\pi$ - $\pi^*$ , además el comportamiento se da a medida que aumenta la concentración de los PC-S lo que contribuye al aumento del área de esta banda, por lo que el comportamiento de la figura 4.15 puede explicarse a partir del fenómeno de ACQ. En este caso no se presenta un comportamiento lineal como lo hacen los PC-M (figura 4.8), sin embargo si se presenta una mayor intensidad en emisión azul.

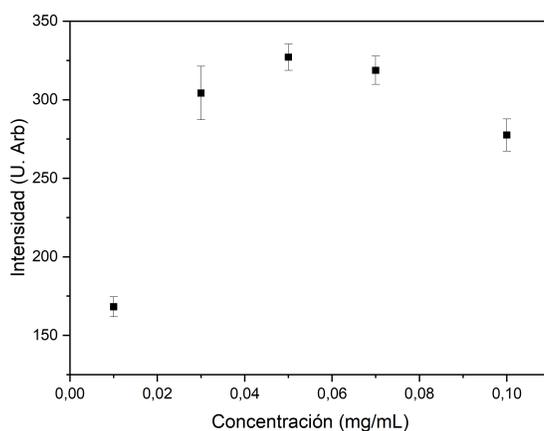


Figura 4.15: Área bajo la curva de la intensidad en función de la concentración de los PC-S disueltos en agua sintetizados a partir de urea y ácido cítrico.

## 4.2 Caracterización de las propiedades de fluorescencia para la detección de L-lactato

Para el desarrollo de esta caracterización se hace uso del concepto de la ruta alterna para la producción de piruvato a partir de L-lactato haciendo uso de la lactato oxidasa (LO). Como se explicó previamente en la figura 2.5 la enzima cuenta con la capacidad de oxidar el L-lactato a piruvato produciendo peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en proporción 1:1. Para las pruebas se usaron los PC-M y PC-S manteniendo una concentración de estos constante y variando la concentración del  $H_2O_2$ . Las concentraciones de  $H_2O_2$  variaron de 0mM a 50 mM en solución acuosa, esto teniendo en cuenta que los valores de L-lactato en sangre van de 0 mM hasta 25 mM.

### 4.2.1. Método asistido por microondas

Para las pruebas se hizo uso de la concentración que evidenció mayor intensidad de emisión en ausencia del  $H_2O_2$  (figura 4.7). Se mantuvo constante la concentración de PC-M en 2 mg/mL y se fue variando la concentración de  $H_2O_2$  en solución acuosa. En la figura 4.16 se muestra como a medida que aumenta la concentración de  $H_2O_2$  disminuye la intensidad de emisión en la solución bajo una irradiación de 365 nm. En la figura 4.17 se observan

los espectros de emisión correspondientes a las concentraciones 0 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM y 50 mM de  $H_2O_2$ . Como se evidencia a medida que aumenta la concentración de  $H_2O_2$  disminuye la intensidad de emisión de la solución. En general se observan bandas fluorescentes entre los 300 nm y 650 nm, las mismas que se observaron en ausencia del  $H_2O_2$  (figura 4.7).

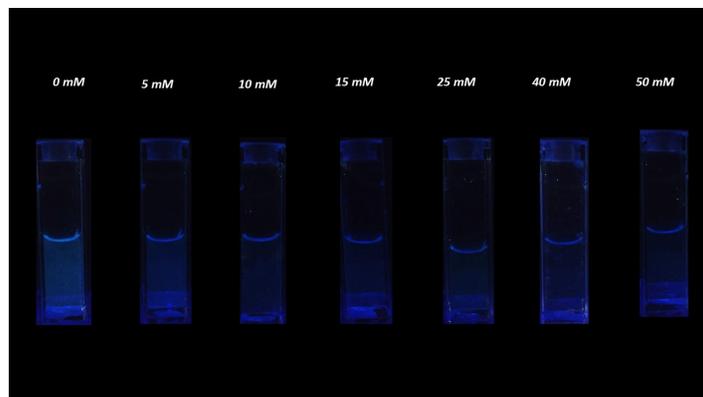


Figura 4.16: Fotos de emisión en solución acuosa bajo una irradiación de 365 nm con una concentración constante de PC-M de 2 mg/mL sintetizados a partir de ácido cítrico variando la concentración de  $H_2O_2$ .

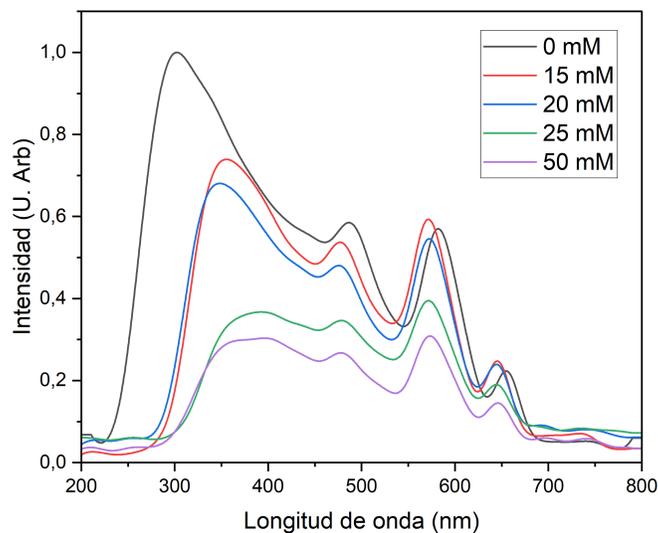


Figura 4.17: Espectros de emisión en solución acuosa variando la concentración de  $H_2O_2$  a una concentración constante de 2 mg/mL de los PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico.

Para analizar el comportamiento de la intensidad dependiente de la concentración del  $H_2O_2$  se realizó una curva de calibración como se muestra en la figura 4.18. Esto se hizo hallando el área bajo la curva de los espectros. Se observa un comportamiento lineal decre-

ciente, pues a medida que aumenta la concentración del analito disminuye la intensidad total de emisión pues se esta inhibiendo la fluorescencia.

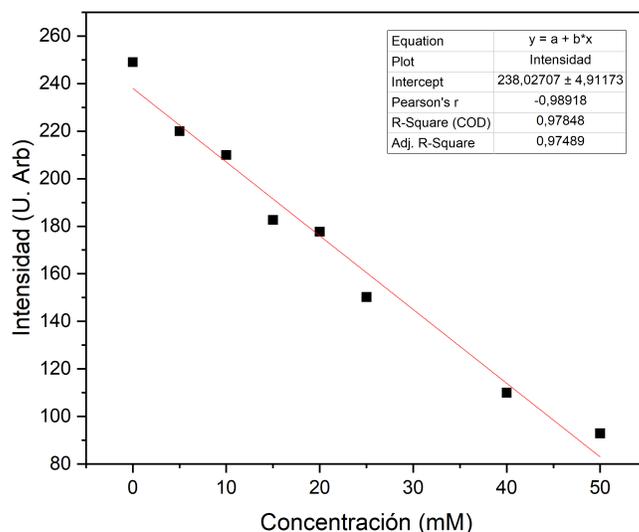


Figura 4.18: Área bajo la curva de intensidad de PC-M sintetizados a partir de ácido cítrico a una concentración constante de 2 mg/mL variando la concentración de  $H_2O_2$ .

Por cada concentración de  $H_2O_2$  presente en la muestra de PC-M a 2 mg/mL se tomó una fotografía bajo una irradiación de 365 nm. Las imágenes fueron almacenadas en la carpeta llamada 'Asistida por microondas', en este caso se obtuvieron 8 fotos, correspondientes a las concentraciones utilizadas para hallar los espectros de la figura 4.18. Para determinar si existe una relación entre las imágenes y la concentración de  $H_2O_2$  las fotos fueron segmentadas a la ROI y se pasaron a escala de grises. Por cada imagen se halló su correspondiente matriz de co-ocurrencia en niveles de grises lo que permitió realizar un análisis de como es el cambio de textura de las fotos en función de la concentración de  $H_2O_2$ . A partir de la matriz se halló el contraste para cada imagen y con este valor se determinó la correlación con las concentraciones del analito. Los resultados de correlación fueron de -0,4512, esto implica que no hay una relación entre las variables.

#### 4.2.2. Método solvotermal

Como se observó en la figura 4.15 en ausencia de  $H_2O_2$  los PC-S presentan inhibición por aglomeraciones conforme aumenta su concentración a partir de los 0,05 mg/mL. En este caso se decide hacer uso de concentraciones menores o iguales a 0,05 mg/mL de PC-S para evaluar los cambios de intensidad en presencia del analito. Además se hace uso de diferentes concentraciones para verificar el comportamiento de los PC-S en presencia del  $H_2O_2$ . En este caso se hacen más pruebas que con los PC-M debido a que presentan una mayor intensidad de emisión y por lo tanto una mayor posibilidad de cambio de la misma en función del analito. En la figura 4.19 se observan las soluciones utilizadas en los espectros de emisión a una

concentración de 0,03 mg/mL de PC-S en solución acuosa, bajo una irradiación de 365 nm, como se ve exhiben una fluorescencia azul brillante. Al aumentar la concentración de  $H_2O_2$  se evidencia una disminución en la intensidad de la fluorescencia.

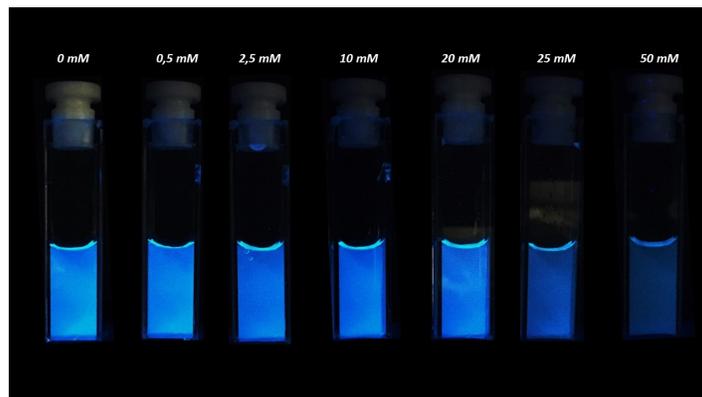


Figura 4.19: Fotos de emisión en solución acuosa bajo una irradiación de 365 nm con una concentración constante de PC-S de 0,03 mg/mL sintetizados a partir de ácido cítrico y urea variando la concentración de  $H_2O_2$ .

En la figura 4.20 se observan los espectros de emisión variando la concentración de  $H_2O_2$  y manteniendo constante la de PC-S a 0,03 mg/mL. Estos se obtuvieron al irradiar los PC-S con una lámpara de deuterio. Se observan bandas fluorescentes entre los 400 nm y 600 nm, los máximos corresponden a una longitud de onda de 500 nm. Se halló el área bajo la curva de cada espectro de emisión con el fin de estudiar el comportamiento de la intensidad en función de la concentración de los PC-S, como se observa en la figura 4.21. Se evidencia como la intensidad disminuye, conforme aumenta la concentración del  $H_2O_2$ . Se observa como la gráfica para las 3 concentraciones tienen un comportamiento de decaimiento exponencial.

En comparación con los PC-M (figura 4.18) en este caso no se obtuvo un comportamiento lineal en función del analito de interés, sin embargo a pesar de no poder ajustarse a un modelo lineal se obtuvo una respuesta que cambia en función de la concentración del  $H_2O_2$ . La forma de los espectros en los dos casos se mantuvieron como en los espectros que se hallaron en ausencia del  $H_2O_2$  (figuras 4.7 y 4.14), lo que indica que los métodos propuestos presentan estabilidad en presencia del  $H_2O_2$ .

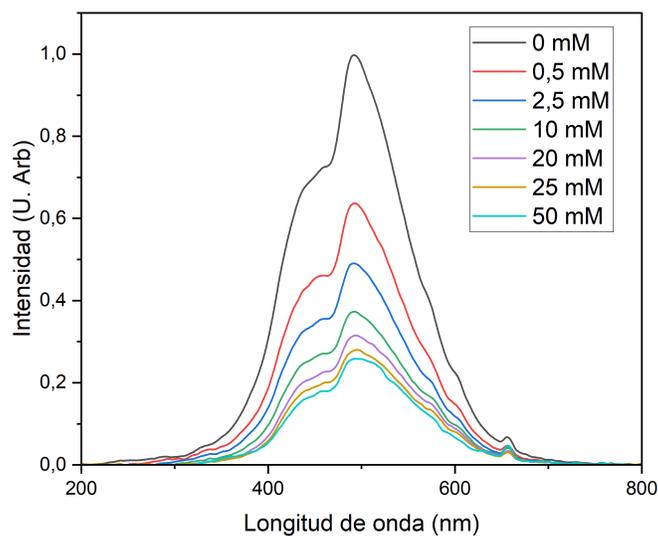


Figura 4.20: Espectros de emisión en solución acuosa variando la concentración de  $H_2O_2$  a una concentración constante de 0,03 mg/mL de los PC-S sintetizados a partir de ácido cítrico y urea.

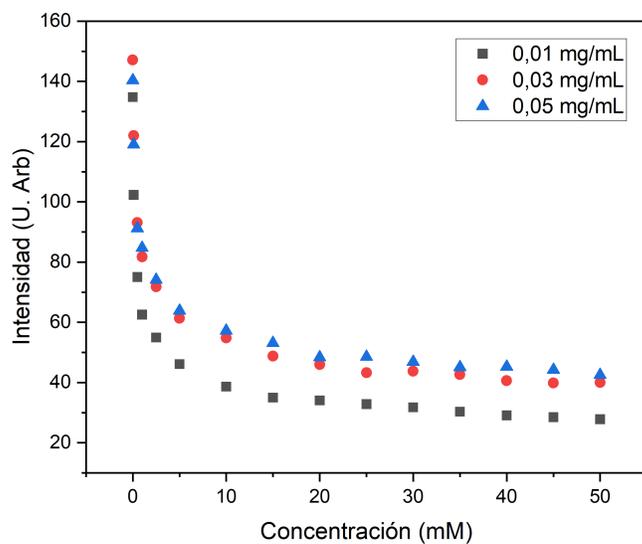


Figura 4.21: Área bajo la curva de intensidad de PC-S sintetizados a partir de ácido cítrico y urea manteniendo la concentración de PC-S constante y variando la concentración de  $H_2O_2$ .

Por cada concentración de  $H_2O_2$  presente en la muestra de PC-S se tomó una fotografía bajo una irradiación de 365 nm. Las imágenes fueron almacenadas en la carpeta llamada

'Solvothermal', en este caso se obtuvieron 15 elementos por cada concentración de PC-S (0,01 mg/mL; 0,03 mg/mL; 0,05 mg/mL ), correspondientes a las concentraciones utilizadas para hallar los espectros de la figura 4.21. Para determinar si existe una relación entre las imágenes y la concentración de  $H_2O_2$  las fotos fueron segmentadas a la ROI y se pasaron a escala de grises. Por cada imagen se halló su correspondiente matriz de co-ocurrencia en niveles de grises lo que permitió realizar un análisis del cambio de textura de las fotos en función de la concentración de  $H_2O_2$ . A partir de la matriz se halló el contraste para cada imagen y con este valor se determinó la correlación con las concentraciones del analito. Como se evidencia en la tabla 4.1 los resultados de correlación presenta un valor negativo inferior a -0,5. Esto implica que hay una relación inversa entre las variables.

Tabla 4.1: Valores de correlación entre histogramas de imágenes en escala de grises de los PC-S en solución acuosa y la concentración de peróxido de hidrógeno presente en la muestra.

Concentración PC-S (mg/mL)	Coefficiente de correlación
0,01	-0,9566
0,03	-0,6749
0,05	-0,5016

Al realizar un análisis de los resultados en presencia del  $H_2O_2$  se evidencia como los dos tipos de PC obtuvieron una respuesta óptica ante los cambios de concentración de este. Se observó una disminución en la intensidad de emisión de los PC. Esto puede deberse a que el  $H_2O_2$  es una especie reactiva de oxígeno, con la capacidad de generar radicales libres que pueden producir inhibición en la fluorescencia de las moléculas [70], en este caso de las nanopartículas. Este principio de funcionamiento basado en la inhibición por las especies reactivas de oxígeno permite el desarrollo de sensores haciendo uso del concepto de respuesta de emisión 'on/off' [71].

Además se observó que los PC-S en comparación con los PC-M presentaron un comportamiento exponencialmente decreciente en función al aumento de la concentración de  $H_2O_2$ . Esto pudo deberse a saturaciones dadas por el aumento de la concentración del analito, pues se observa como a partir de 20 mM la respuesta de la intensidad de emisión no presenta cambios significativos, como lo hace en valores de 0 mM a 15 mM. En estudios desarrollados previamente para la detección de  $H_2O_2$  se observan de igual forma comportamientos exponenciales en función del aumento del analito, en los que a partir de determinada concentración (>30mM) no presentan cambios significativos en la intensidad de los espectros [59], [62].

A pesar de que los dos métodos presentaron respuestas de disminución de intensidad de emisión en función de la concentración del  $H_2O_2$ , en las correlaciones que se realizaron el método de PC-M no presentó valores que indiquen una relación entre las imágenes y la concentración del analito. Es así que los PC-S además de presentar mayor intensidad de emisión como se observó en las fotografías tiene valores de correlación que indican una relación inversa entre el  $H_2O_2$  y las imágenes adquiridas. El hecho de que se presente un cambio de intensidad en función de la concentración del  $H_2O_2$  y exista correlación entre esta variable y las imágenes adquiridas, implica que se puede seguir experimentando con base en la ruta alterna para la detección de L-lactato haciendo uso de la lactato oxidasa y teniendo como subproducto el  $H_2O_2$  con PC-S.

De la base de datos que se obtuvo se puede decir que fue útil para relacionar las imágenes de las soluciones con las concentraciones de  $H_2O_2$  y evaluar si es posible a partir de una cámara

de celular y una luz de 365 nm identificar los cambios del analito. Esto es útil para desarrollar sistemas portátiles de detección de L-lactato que puedan ser utilizados en el punto de atención del paciente, sin necesidad de equipos especializados o personal altamente capacitado para la toma y el análisis de espectros de emisión.

## Capítulo 5

# CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en el proyecto, de los PC-M y PC-S se logró una síntesis que favorece la formación de nanopartículas fluorescentes. En cuanto a los PC-M en la estructura superficial presentaron enlaces -OH, -CH, -C=C, -C=O y C-O, teniendo al ácido cítrico como fuente de las especies atómicas O, C y H. En las propiedades ópticas se variaron las concentraciones de 0,25 mg/mL a 2 mg/mL en solución acuosa. En el espectro de absorbancia se tuvieron transiciones  $\pi-\pi^*$  y en el espectro de emisión bandas entre los 300 nm y 650 nm. En los espectros de absorción y emisión al hallar el área bajo la curva se presentó un comportamiento lineal creciente, lo que implica que existe un modelo que explica la relación de estas variables.

Por otro lado, los PC-S en la estructura superficial presentaron enlaces -NH, -OH, -CH, -C=C, -C=O, C-N y C-O, teniendo al ácido cítrico como fuente de las especies atómicas O, C y H y a la urea como fuente de N. De la prueba PZ se obtuvo que los PC-S cuentan con estabilidad en disolución por su valor negativo. En las propiedades ópticas se variaron las concentraciones de 0,01 mg/mL a 0,1 mg/mL en solución acuosa. En el espectro de absorbancia se evidenciaron transiciones electrónicas  $\pi-\pi^*$  y  $n-\pi^*$  y bandas de emisión entre los 400 nm y 600 nm. Al hallar el área bajo la curva de los espectros en absorbancia se obtuvo un comportamiento lineal creciente, sin embargo en los espectros de emisión se observó inhibición por aglomeración a partir de los 0,05 mg/mL.

Según los los objetivos enfocados a evaluar la respuesta fluorescente de los PC para la detección de L-lactato se varió la concentración de  $H_2O_2$  entre 0 mM y 50 mM manteniendo la concentración de nanopartículas constante en solución acuosa. En el caso de los PC-M se evidencio un comportamiento linealmente decreciente, sin embargo no se encontró un valor de correlación entre el contraste de las imágenes de la base de datos y la concentración de  $H_2O_2$ . Por otro lado, los PC-S presentaron un comportamiento exponencialmente decreciente en función de la concentración del analito y además se encontraron correlaciones inversas entre el contraste de las imágenes de la base de datos y el  $H_2O_2$  presente en la muestra. Por lo anterior los PC-S son nanopartículas con potencial aplicación para el desarrollo de un sensor de L-lactato siguiendo la ruta alterna y haciendo uso de la enzima lactato oxidasa para la producción de  $H_2O_2$  en proporción 1:1 con el analito principal, el L-lactato.

## Capítulo 6

# RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

### 6.1 Trabajos futuros

A corto plazo se propone continuar con las pruebas de propiedades fluorescentes en solución acuosa en presencia del L-lactato, lactato oxidasa y en presencia de la reacción metabolito-enzima (L-lacato y lactato oxidasa). Además se deben adquirir las imágenes bajo irradiación de 365 nm y determinar las curvas de calibración haciendo uso de los espectros de emisión como se realizo para el peróxido de hidrógeno. De acuerdo al objetivo del proyecto marco *“Método alternativo para la detección de L-lactato en solución acuosa basado en la fluorescencia de los puntos de carbono”*, a mediano plazo se propone realizar un algoritmo y sistema portable que permita identificar la concentración de L-lactato a partir de las curvas de calibración y las fotos adquiridas. Finalmente a largo plazo se plantea el desarrollo de un biosensor basado en papel para la detección de L-lactato que pueda ser usado en el punto de atención del paciente.

### 6.2 Recomendaciones

Para determinar una correlación precisa entre las fotos bajo una irradiación de 365 nm es importante tener unas condiciones controlables en la adquisición de estas. Pues las imágenes que actualmente se tienen en la base de datos pudieron verse afectadas por no encontrarse bajo las mismas condiciones de luz y posición.

# Bibliografía

- [1] C. Ichai, H. Quintard y J.-C. Orban, *Metabolic disorders and critically ill patients: from pathophysiology to treatment*. Springer, 2017.
- [2] M. Montagné, H. Erdmann, M. Comtat y J.-L. Marty, «Comparison of the performances of two bi-enzymatic sensors for the detection of D-lactate,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 27, n.º 1-3, págs. 440-443, 1995.
- [3] L. Gladden, «Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium,» *The Journal of physiology*, vol. 558, n.º 1, págs. 5-30, 2004.
- [4] F. Baigorri-González y J. L. Balanza, «Oxigenación tisular y sepsis,» *Medicina intensiva*, vol. 29, n.º 3, págs. 178-184, 2005.
- [5] L. Rassaei, W. Olthuis, S. Tsujimura, E. J. Sudhölter y A. van den Berg, «Lactate biosensors: current status and outlook,» *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 406, n.º 1, págs. 123-137, 2014.
- [6] S. E. Allen y J. L. Holm, «Lactate: physiology and clinical utility,» *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, vol. 18, n.º 2, págs. 123-132, 2008.
- [7] M. L. Goodwin, J. E. Harris, A. Hernández y L. B. Gladden, «Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians,» *Journal of diabetes science and technology*, vol. 1, n.º 4, págs. 558-569, 2007.
- [8] A. A. P. Lima y E. Silva, *Monitoring Tissue Perfusion in Shock: From Physiology to the Bedside*. Springer, 2018.
- [9] F. Valenza, G. Aletti, T. Fossali, G. Chevillard, F. Sacconi, M. Irace y L. Gattinoni, «Lactate as a marker of energy failure in critically ill patients: hypothesis,» *Critical Care*, vol. 9, n.º 6, págs. 1-6, 2005.
- [10] J. Bakker, R. Postelnicu y V. Mukherjee, «Lactate: where are we now?» *Critical care clinics*, vol. 36, n.º 1, págs. 115-124, 2020.
- [11] J. A. Davis, «Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research.,» *Medicine and Science in sports and Exercise*, vol. 17, n.º 1, págs. 6-21, 1985.
- [12] K. Rathee, V. Dhull, R. Dhull y S. Singh, «Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review,» *Biochemistry and biophysics reports*, vol. 5, págs. 35-54, 2016.
- [13] R. K. Tanner, K. L. Fuller y M. L. Ross, «Evaluation of three portable blood lactate analysers: Lactate Pro, Lactate Scout and Lactate Plus,» *European journal of applied physiology*, vol. 109, n.º 3, págs. 551-559, 2010.

- [14] C. Científico, P. G. Ramírez, R. D. García, A. G. Ortega, E. G. Campuzano, S. Malumbres, J. M. Soria, M. M. Pérez, X. N. Segarra, P. O. Sáez et al., «Lactato: utilidad clínica y recomendaciones para su medición,»
- [15] Labtest, «Instrucciones De Uso del Lactato enzimático,» págs. 1-6,
- [16] W. Lab, «Prueba de laboratorio para la detección de lactato,» págs. 1-3,
- [17] C.-S. Chu, M.-W. Hsieh y Z.-R. Su, «Hydrogen peroxide sensing based on carbon quantum dots,» en *MATEC Web of Conferences*, EDP Sciences, vol. 59, 2016, pág. 01 001.
- [18] X. Zhang, M. Jiang, N. Niu, Z. Chen, S. Li, S. Liu y J. Li, «Natural-product-derived carbon dots: from natural products to functional materials,» *ChemSusChem*, vol. 11, n.º 1, págs. 11-24, 2018.
- [19] X. Lin, M. Xiong, J. Zhang, C. He, X. Ma, H. Zhang, Y. Kuang, M. Yang y Q. Huang, «Carbon dots based on natural resources: Synthesis and applications in sensors,» *Microchemical Journal*, pág. 105 604, 2020.
- [20] Z. Zhang, G. Yi, P. Li, X. Zhang, H. Fan, Y. Zhang, X. Wang y C. Zhang, «A minireview on doped carbon dots for photocatalytic and electrocatalytic applications,» *Nanoscale*, vol. 12, n.º 26, págs. 13 899-13 906, 2020.
- [21] Y. Choi, Y. Choi, O.-H. Kwon y B.-S. Kim, «Carbon dots: bottom-up syntheses, properties, and light-harvesting applications,» *Chemistry—An Asian Journal*, vol. 13, n.º 6, págs. 586-598, 2018.
- [22] E. L. Rossini, M. I. Milani, L. S. Lima y H. R. Pezza, «Paper microfluidic device using carbon dots to detect glucose and lactate in saliva samples,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 248, pág. 119 285, 2021.
- [23] E. F. Canosa, *Bioquímica: conceptos esenciales*. Ed. Médica Panamericana, 2014.
- [24] D. L. Nelson y M. M. Cox, *Lehninger: principios de bioquímica*. 2015.
- [25] G. G. Guilbault, G. Palleschi y G. Lubrano, «Non-invasive biosensors in clinical analysis,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 10, n.º 3-4, págs. 379-392, 1995.
- [26] I. Bravo, M. Revenga-Parra, F. Pariente y E. Lorenzo, «Reagent-less and robust biosensor for direct determination of lactate in food samples,» *Sensors*, vol. 17, n.º 1, pág. 144, 2017.
- [27] I. Shitanda, M. Mitsumoto, N. Loew, Y. Yoshihara, H. Watanabe, T. Mikawa, S. Tsujimura, M. Itagaki y M. Motosuke, «Continuous sweat lactate monitoring system with integrated screen-printed Mgo-templated carbon-lactate oxidase biosensor and microfluidic sweat collector,» *Electrochimica Acta*, vol. 368, pág. 137 620, 2021.
- [28] B. Phypers y J. T. Pierce, «Lactate physiology in health and disease,» *Continuing education in Anaesthesia, critical care & pain*, vol. 6, n.º 3, págs. 128-132, 2006.
- [29] Í. Gillespie, P. G. Rosenstein y D. Hughes, «Update: clinical use of plasma lactate,» *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, vol. 47, n.º 2, págs. 325-342, 2017.
- [30] H. Khosravani, R. Shahpori, H. T. Stelfox, A. W. Kirkpatrick y K. B. Laupland, «Occurrence and adverse effect on outcome of hyperlactatemia in the critically ill,» *Critical Care*, vol. 13, n.º 3, págs. 1-5, 2009.

- [31] Á.-V. JL, G.-G. AC, D. EJ y R.-W. FL, «Índices estáticos y dinámicos de la hiperlactatemia.,» *Medicina Interna de México*, vol. 32, n.º 2, 2016.
- [32] G. Jasso-Contreras, F. González-Velázquez, L. Bello-Aguilar, A. García-Carrillo, M. R. Muñoz-Rodríguez y L. Pereda-Torales, «Niveles de lactato como predictor de mortalidad en pacientes con choque séptico,» *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, vol. 53, n.º 3, págs. 316-321, 2015.
- [33] J. M. Bustos, «Hipoxia y Cianosis,» *Revista Medica Sinergia*, vol. 1, n.º 9, págs. 9-12, 2016.
- [34] G. Gutierrez y J. D. Williams, «The riddle of hyperlactatemia,» *Critical Care*, vol. 13, n.º 4, págs. 1-2, 2009.
- [35] J. A. Kruse, S. A. Zaidi y R. W. Carlson, «Significance of blood lactate levels in critically III patients with liver disease,» *The American journal of medicine*, vol. 83, n.º 1, págs. 77-82, 1987.
- [36] M. Heredero Valdés, V. R. Mena Miranda y R. L. Riverón Corteguera, «Acidosis láctica: algunas consideraciones,» *Revista Cubana de Pediatría*, vol. 72, n.º 3, págs. 183-193, 2000.
- [37] Y. Freund, S. Delerme, H. Goulet, M. Bernard, B. Riou y P. Hausfater, «Serum lactate and procalcitonin measurements in emergency room for the diagnosis and risk-stratification of patients with suspected infection,» *Biomarkers*, vol. 17, n.º 7, págs. 590-596, 2012.
- [38] K. Kawaji, Y. Fujita, Y. Yajima, M. Shirataka y H. Kubo, «Usefulness of anaerobic threshold in estimating intensity of exercise for diabetics,» *Diabetes research and clinical practice*, vol. 6, n.º 4, págs. 303-309, 1989.
- [39] A. L. A. Berdeal, «¿ Cómo interpretar los resultados del test estándar de lactato que se presentan en los atletas durante el ciclo de entrenamiento?» *Laboratorio de Fisiología del Deporte*, 2014.
- [40] M. G. Torres y S. L. Gómez, «Acido láctico: Una revisión sobre los métodos de determinación y purificación,» *Biociencias*, vol. 14, n.º 2, págs. 149-175, 2019.
- [41] S. Menolasina, A. De Santis, F. Díaz, A. Sánchez, A. Aguilar y O. Contreras, «Factores que influyen en el comportamiento electroquímico de sustancias de interés médico y farmacológico en electrodos modificados,» *Avances en Química*, vol. 5, n.º 1, págs. 3-14, 2010.
- [42] S. de MARCOS, J. GALBÁ y J. R. CASTILLO, «An enzyme fluorescence quenching method for the determination of lactate in synthetic blood serum,» *Analytical sciences*, vol. 11, n.º 2, págs. 233-238, 1995.
- [43] D. B. Groegel, M. Link, A. Duerkop y O. S. Wolfbeis, «A New Fluorescent PET Probe for Hydrogen Peroxide and its Use in Enzymatic Assays for L-Lactate and D-Glucose,» *ChemBioChem*, vol. 12, n.º 18, págs. 2779-2785, 2011.
- [44] K. K. Chan, S. H. K. Yap y K.-T. Yong, «Biogreen synthesis of carbon dots for biotechnology and nanomedicine applications,» *Nano-micro letters*, vol. 10, n.º 4, págs. 1-46, 2018.

- [45] A. Alaghmandfar, O. Sedighi, N. T. Rezaei, A. A. Abedini, A. M. Khachatourian, M. S. Toprak y A. Seifalian, «Recent advances in the modification of carbon-based quantum dots for biomedical applications,» *Materials Science and Engineering: C*, pág. 111 756, 2020.
- [46] L. Ansari, S. Hallaj, T. Hallaj y M. Amjadi, «Doped-carbon dots: Recent advances in their biosensing, bioimaging and therapy applications,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, pág. 111 743, 2021.
- [47] M. L. Liu, B. B. Chen, C. M. Li y C. Z. Huang, «Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications,» *Green chemistry*, vol. 21, n.º 3, págs. 449-471, 2019.
- [48] X. Sun e Y. Lei, «Fluorescent carbon dots and their sensing applications,» *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 89, págs. 163-180, 2017.
- [49] E. Grant, B. J. Halstead et al., «Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating,» *Chemical society reviews*, vol. 27, n.º 3, págs. 213-224, 1998.
- [50] M. R. Rosana, J. Hunt, A. Ferrari, T. A. Southworth, Y. Tao, A. E. Stiegman y G. B. Dudley, «Microwave-specific acceleration of a Friedel–Crafts reaction: evidence for selective heating in homogeneous solution,» *The Journal of organic chemistry*, vol. 79, n.º 16, págs. 7437-7450, 2014.
- [51] T. V. de Medeiros, J. Manioudakis, F. Noun, J.-R. Macairan, F. Victoria y R. Naccache, «Microwave-assisted synthesis of carbon dots and their applications,» *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 7, n.º 24, págs. 7175-7195, 2019.
- [52] C. O. Kappe, «Controlled microwave heating in modern organic synthesis,» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 43, n.º 46, págs. 6250-6284, 2004.
- [53] S. Bhattacharjee, «DLS and zeta potential—what they are and what they are not?» *Journal of controlled release*, vol. 235, págs. 337-351, 2016.
- [54] X. Hou, S. Lv, Z. Chen y F. Xiao, «Applications of Fourier transform infrared spectroscopy technologies on asphalt materials,» *Measurement*, vol. 121, págs. 304-316, 2018.
- [55] K. Torres-Rivero, J. Bastos-Arrieta, N. Fiol y A. Florido, «Metal and metal oxide nanoparticles: An integrated perspective of the green synthesis methods by natural products and waste valorization: applications and challenges,» en *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 94, Elsevier, 2021, págs. 433-469.
- [56] X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H. J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker y W. A. Scrivens, «Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, n.º 40, págs. 12 736-12 737, 2004.
- [57] H. Feng y Z. Qian, «Functional carbon quantum dots: a versatile platform for chemosensing and biosensing,» *The Chemical Record*, vol. 18, n.º 5, págs. 491-505, 2018.
- [58] C. Ji, Y. Zhou, R. M. Leblanc y Z. Peng, «Recent developments of carbon dots in biosensing: A review,» *ACS sensors*, vol. 5, n.º 9, págs. 2724-2741, 2020.
- [59] S. K. Bhunia, S. Dolai, H. Sun y R. Jelinek, «“On/off/on” hydrogen-peroxide sensor with hemoglobin-functionalized carbon dots,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 270, págs. 223-230, 2018.

- [60] C. Yuan, X. Qin, Y. Xu, Q. Jing, R. Shi e Y. Wang, «High sensitivity detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose based on carbon quantum dots-catalyzed 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine oxidation,» *Microchemical Journal*, vol. 159, págs. 105-115, 2020.
- [61] S. Chandra, V. K. Singh, P. K. Yadav, D. Bano, V. Kumar, V. K. Pandey, M. Talat y S. H. Hasan, «Mustard seeds derived fluorescent carbon quantum dots and their peroxidase-like activity for colorimetric detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ascorbic acid in a real sample,» *Analytica chimica acta*, vol. 1054, págs. 145-156, 2019.
- [62] S. G. Liu, S. Mo, L. Han, N. Li, Y. Z. Fan, N. B. Li y H. Q. Luo, «Oxidation etching induced dual-signal response of carbon dots/silver nanoparticles system for ratiometric optical sensing of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-related bioanalysis,» *Analytica chimica acta*, vol. 1055, págs. 81-89, 2019.
- [63] J. B. Essner, J. A. Kist, L. Polo-Parada y G. A. Baker, «Artifacts and errors associated with the ubiquitous presence of fluorescent impurities in carbon nanodots,» *Chemistry of Materials*, vol. 30, n.º 6, págs. 1878-1887, 2018.
- [64] H. Z. Fernández, «Cromatografía en columna 8,» *Métodos Cromatográficos*, págs. 16,
- [65] B. Vercelli, R. Donnini, F. Ghezzi, A. Sansonetti, U. Giovanella y B. La Ferla, «Nitrogen-doped carbon quantum dots obtained hydrothermally from citric acid and urea: The role of the specific nitrogen centers in their electrochemical and optical responses,» *Electrochimica Acta*, vol. 387, págs. 138-157, 2021.
- [66] M. Liu, «Optical properties of carbon dots: a review,» *Nanoarchitectonics*, págs. 1-12, 2020.
- [67] C. Murru et al., «Nanopartículas de proteínas de soja: preparación, caracterización y aplicación a la encapsulación de  $\beta$ -caroteno,» 2017.
- [68] X. Ma, R. Sun, J. Cheng, J. Liu, F. Gou, H. Xiang y X. Zhou, «Fluorescence aggregation-caused quenching versus aggregation-induced emission: a visual teaching technology for undergraduate chemistry students,» *Journal of Chemical Education*, vol. 93, n.º 2, págs. 345-350, 2016.
- [69] Y. Chen, J. W. Lam, R. T. Kwok, B. Liu y B. Z. Tang, «Aggregation-induced emission: fundamental understanding and future developments,» *Materials Horizons*, vol. 6, n.º 3, págs. 428-433, 2019.
- [70] O. Oter y A.-C. Ribou, «Quenching of long lifetime emitting fluorophores with paramagnetic molecules,» *Journal of fluorescence*, vol. 19, n.º 3, págs. 389-397, 2009.
- [71] S. Bhattacharya, R. Sarkar, S. Nandi, A. Porgador y R. Jelinek, «Detection of reactive oxygen species by a carbon-dot-ascorbic acid hydrogel,» *Analytical chemistry*, vol. 89, n.º 1, págs. 830-836, 2017.