

**Síntesis de una nanoplataforma basada en puntos de carbono
funcionalizados con curcumina**

Laura Camila Vargas Buitrago

Trabajo Dirigido

Tutoras

**Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD
Sandra Rocío Ramírez Clavijo, PhD**



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

Agradecimientos

Agradezco a todo el equipo que tuve en el desarrollo de esta investigación. A mis tutoras, Diana Rodríguez y Sandra Ramirez, gracias por todo el tiempo y apoyo dedicado.

Resumen

La curcumina es ampliamente usada por sus propiedades medicinales, útiles para el tratamiento de varias enfermedades debido a sus efectos antioxidantes, antiproliferativos y apoptóticos. Se han encontrado aplicaciones de la curcumina como anti-inflamatorio, antioxidante, antimutagénico, anticoagulante y anti-infeccioso; aunque su principal desventaja radica en su baja dispersabilidad en agua, razón por la cual requiere de una nanoplataforma para su transporte. En el presente proyecto se busca desarrollar una nanoplataforma formada por puntos de carbono (CDs por sus siglas en inglés), funcionalizados con curcumina, y evaluar su citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de seno MCF-7 y fibroblastos sanos 3T3. Como resultado, se obtiene la correcta síntesis y caracterización de los puntos de carbono funcionalizados con curcumina, los cuales demostraron inhibir el metabolismo celular en la línea celular de cáncer de seno MCF-7.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Motivación	1
1.1.1. Cáncer de seno	1
1.1.2. Curcumina	2
1.1.3. Nanoplateforma basada en puntos de carbono	2
1.2. Proyecto relacionado	3
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Contribuciones	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Cáncer de seno	5
2.2. Curcumina	6
2.3. Puntos de Carbono	7
2.4. Funcionalización de CDs	9
3. METODOLOGÍA	11
3.1. Síntesis de puntos de carbono	11
3.1.1. Funcionalización de puntos de carbono con curcumina	14
3.2. Métodos de Caracterización de puntos de carbono y curcumina	15
3.2.1. Espectroscopía UV-VIS	15
3.2.2. FTIR	16
3.2.3. Potencial Zeta	16
3.2.4. Ensayos de citotoxicidad	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Síntesis de puntos de carbono	20
4.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	25
4.3. Potencial Zeta	26
4.4. Citotoxicidad	27

5. CONCLUSIONES	33
6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS	34
BIBLIOGRAFÍA	35

Índice de figuras

2.1. Estructuras químicas de la curcumina [18]	7
2.2. Bandas del espectro de absorción y la transición de electrones en los puntos de carbono [21]	8
2.3. Absorción de la curcumina sobre la superficie de los CDs	10
3.1. Metodología de síntesis de puntos de carbono	11
3.2. Resultado de la síntesis de puntos de carbono	12
3.3. Ejemplo de cromatografía por columna con solución de puntos de carbono	13
3.4. Soluciones de etanol con distintas concentraciones de curcumina y 10mg de CDs en cada una de ellas	15
3.5. Células usadas para los ensayos antes de ser colocadas en el medio de cultivo y a las sustancias analizadas	18
4.1. Espectroscopía de la curcumina en distintas concentraciones de dispersión en etanol	20
4.2. Resultados posterior a la separación de moléculas por cromatografía por columna	20
4.3. Espectros de emisión de puntos de carbono sintetizados a diferentes temperaturas dispersados en una concentración de 0,1 mg/mL	21
4.4. Espectros de absorción y emisión de los puntos de carbono sintetizados a temperaturas de 140°C y 160°C. Dispersados en una concentración de 0,1 mg/mL	22
4.5. Puntos de carbono funcionalizados bajo luz ultravioleta	23
4.6. Comparación de espectrofotometría para a) solución de CDs funcionalizados con curcumina dispersados en etanol y b) solución de curcumina dispersada en etanol	23
4.7. Espectros de puntos de carbono antes y después de ser funcionalizados con curcumina	24
4.8. Espectros de emisión puntos de carbono antes y después de funcionalizar con curcumina	25
4.9. Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier en a) Curcumina b) CDs c) CDs funcionalizados con curcumina	26
4.10. Potencial zeta para la síntesis de CDs	27

4.11. Placas de cultivo de 96 pozos con células 3T3 antes y después de la incubación con resazurin	27
4.12. Placas de cultivo de 96 pozos con células MCF-7 antes y después de la incubación con resazurin	28
4.13. Viabilidad celular después del tratamiento con CDs (6 horas)	28
4.14. Viabilidad celular después del tratamiento con curcumina (6horas) . . .	29
4.15. Viabilidad celular después del tratamiento con CDs funcionalizados con curcumina (6 horas)	29
4.16. Viabilidad celular después del tratamiento con CDs (12 horas)	29
4.17. Viabilidad celular después del tratamiento con curcumina (12 horas) . .	30
4.18. Viabilidad celular después del tratamiento con CDs funcionalizados con curcumina (12 horas)	30

Índice de tablas

3.1. Concentraciones de curcumina utilizadas para la funcionalización de CDs	14
3.2. Distribución de los tratamientos en las placas de cultivo para las pruebas de citotoxicidad	17
3.3. Concentración y volumen usado para la curcumina	17
3.4. Concentración y volumen usado para CDs	18
3.5. Concentración y volumen usado para CDs funcionalizados con curcumina	18

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Motivación

1.1.1 Cáncer de seno

El cáncer de seno es el tipo de cáncer más común en mujeres; afecta al 25.4% a nivel mundial y con un porcentaje de 13,2% de mortalidad; siendo el cáncer con más muertes de mujeres en el mundo, según la OMS [1]. Se estima, que la tasa de incidencia es de 67,1 casos por cada 100.000 habitantes a nivel mundial, y la tasa de mortalidad en mujeres mayores de 15 años, corresponde a 18,9 muertes por cada 100.000 habitantes a nivel mundial [2]. En el caso de Colombia, al año se diagnostican 7.626 personas con cáncer de seno[3].

El cáncer, es una enfermedad que se desarrolla cuando las células comienzan a crecer sin control, por lo cual, cada vez se hacen más anormales, pasan por alto la apoptosis y se dividen sin ningún tipo de interrupción. De tal manera que se forman lo que se llaman tumores o neoplasias, los cuales, al ser cancerosos se denominan malignos; es decir, aquellos que se pueden extender a tejidos cercanos [4] [5].

En la actualidad existen diversos tratamientos contra el cáncer de seno, entre ellos, tratamientos locales, como la cirugía, en donde se extrae el tumor sin afectar el resto del cuerpo; antes o después a esta se puede necesitar de otros tratamientos según lo avanzado que esté el tumor. También, existen métodos sistémicos, en donde se usan medicamentos para tratamientos como la quimioterapia, la terapia hormonal o la inmunoterapia. Al ser terapias en donde se alcanzan las células de cualquier parte del cuerpo, pueden tener contraindicaciones en otros órganos [5][6]. En el caso de algunos métodos quimioterapéuticos, se tiene un efecto directamente sobre el ADN, evitando la reproducción de células cancerosas, otros interfieren en el crecimiento del ADN y ARN y otros son inhibidores de la mitosis[7]; estos tratamientos tienen múltiples desventajas debido a que no se afectan únicamente las células cancerosas sino todas las células del cuerpo sanas sufren las variaciones genéticas, principalmente en las células de la médula ósea, folículos pilosos, boca, tracto digestivo y órganos del sistema reproductor [8]. Los tratamientos como la terapia hormonal, se usan generalmente para reducir el tamaño

del tumor previo a realizar algún procedimiento de cirugía o radioterapia, o eliminar las células que se han extendido a otra parte del cuerpo [9]. Igual que los demás tratamientos sistémicos, también cuenta con desventajas como náuseas, fatiga, sofocos, cambios de ánimo y demás. En el tratamiento de inmunoterapia, se dedica por un lado a fortalecer el sistema inmunitario y combatir el cáncer, por otro lado encontrar células cancerosas y así destruirlas; sus desventajas son síntomas como fiebre, debilidad, mareos, náuseas, vómitos y escalofríos[10].

1.1.2 Curcumina

Existen alternativas para el tratamiento contra el cáncer de seno naturales, en los cuales se han reportado mejorías en el tumor canceroso, un ejemplo de estas, es una especie llamada curcumina. Esta es una alternativa natural, ya que proviene de la planta cúrcuma longa, la cual, ha sido empleada desde la antigüedad por sus propiedades medicinales, reconocida por su acción antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral [4].

Se han estudiado las propiedades de la curcumina aislada como fármaco, en donde se reportó actividad anti-mutagénica frente a los mutágenos que requieren actividad metabólica; también se ha encontrado actividad antitumoral en donde se inhibe el crecimiento de células tumorales ya que bloquea el crecimiento de las células cancerosas [4].

Entre las ventajas de la curcumina se encuentra que no se han reportado daños en los cromosomas, embriones ni tiene acciones mutagénicas. No obstante este colorante natural tiene unas desventajas al estar contraindicada para pacientes con obstrucción del tracto biliar debido a que este compuesto estimula la vesícula y puede ser riesgoso. Sin embargo, la FDA la ha reportado como segura debido a que no se ha informado ningún efecto adverso importante en estudios clínicos [11].

La más grande desventaja de la curcumina, es su poca capacidad de dispersión e insolubilidad en el agua, lo cual conlleva distintos problemas en aplicaciones de disolución en medio acuoso. Por lo cual, actualmente para su fácil manipulación se usa un medio basado en etanol. [12]

1.1.3 Nanoplataforma basada en puntos de carbono

La curcumina, al tener la desventaja de insolubilidad en el agua y ya que el cuerpo humano se compone de un 65 % - 70 % agua, requiere que sea acoplada a un medio de transporte dispersable en el agua, y además, cuente con propiedades de biocompatibilidad y estabilidad química. Por esto, una alternativa es usar una nanoplataforma basada en los puntos de carbono (CDs por sus siglas en inglés), los cuales, son un tipo de nanomaterial basado principalmente en carbono, de tamaño aproximado de 10 nm [13]. Son comúnmente usados para diversas aplicaciones debido a sus propiedades de estabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad [14]. Además, cuentan con propiedades ópticas, como la fluorescencia, en donde se pueden obtener varios espectros de emisión

según las diferentes síntesis y precursores para los puntos de carbono. El interés de este proyecto se centra en la síntesis de los CDs y su funcionalización con curcumina. Para los CDs, se busca que exhiban propiedades fluorescentes en el rango visible naranja-rojo del espectro electromagnético, en busca de las propiedades ópticas que tengan un mínimo de superposición con fluoróforos endógenos.

1.2 Proyecto relacionado

En el presente proyecto, se busca desarrollar una nanoplataforma basada en puntos de carbono, funcionalizados superficialmente con curcumina, el cual hace parte del proyecto “Desarrollo de los componentes de un sistema de liberación controlada de medicamentos basado en un hidrogel electrorresponsivo integrado por puntos de carbono funcionalizados con curcumina” financiado con fondos UR-Capital Semilla. En este, se busca crear un sistema de liberación controlada de fármacos; en donde el aporte del presente proyecto es la síntesis de puntos de carbono de emisión roja y su revestimiento con curcumina, puntualizando las ventajas y beneficios del uso de la curcumina como fármaco; además, evaluar su citotoxicidad sobre una línea celular de fibroblastos sanos 3T3 y una línea tumoral del cáncer de seno MCF-7.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Desarrollar una nanoplataforma basada en CDs funcionalizados con curcumina.

1.3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar puntos de carbono con emisión en el rango visible naranja-rojo del espectro electromagnético.
- Desarrollar el protocolo de funcionalización de la superficie de los CDs con curcumina.
- Evaluar la citotoxicidad de los CDs antes y después de ser funcionalizados con curcumina, sobre una línea celular de fibroblastos sanos 3T3 y una línea tumoral de cáncer de seno MCF-7.

1.4 Contribuciones

El presente proyecto desarrolla una nanoplataforma basada en puntos de carbono, funcionalizados con curcumina, en donde se realiza la síntesis de CDs y su recubrimiento con curcumina, para posteriormente, encapsular la nanoplataforma en un hidrogel electrorresponsivo en un tratamiento contra el cáncer de seno. En un futuro, también

podrá tener múltiples aplicaciones en las diferentes alternativas de tratamientos contra el cáncer de seno y demás enfermedades como la diabetes, Alzheimer, epilepsia o asma. Esto, gracias al potencial de la curcumina como fármaco de origen natural, con acción anti-inflamatoria, antioxidante, anti-mutagénica, y anti-coagulante.

Capítulo 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer de seno

El cáncer de seno, es el tipo de cáncer más común en mujeres, afecta al 25,4 % a nivel mundial, con un porcentaje de 13,2 % de mortalidad; siendo el cáncer con más muertes de mujeres en el mundo, según la OMS [1]. Se estima, que la tasa de incidencia es de 67,1 casos por cada 100.000 habitantes a nivel mundial, y la tasa de mortalidad en mujeres mayores de 15 años, corresponde a 18,9 muertes por cada 100.000 habitantes a nivel mundial [2]. Cada año, aproximadamente 1,5 millones de mujeres en el mundo son diagnosticadas con cáncer de seno, un 25 % de todas las mujeres con cáncer. Esta enfermedad, puede llegar a hacer metástasis en otros tejidos, es capaz de invadir huesos, pulmones, y hasta cerebro, siendo destructivo a su paso. Para su diagnóstico temprano, se realizan exámenes anuales a mujeres mayores de 40 años, ya que corresponde a la población de riesgo en este tipo de patología; aun cuando puede afectar todo tipo de personas sin importar factores de género y edad. Adicionalmente, la incidencia de cáncer ha venido en aumento año tras año. Aunque el diagnóstico temprano disminuye las posibles muertes por esta enfermedad, siguen existiendo múltiples casos de fallecimientos al año. Se estiman 11 millones de casos de cáncer de seno para el año 2030 en el mundo [15].

El cáncer, es una enfermedad que se desarrolla cuando las células comienzan a crecer sin control, pasan por alto la apoptosis y se dividen sin ningún tipo de interrupción, formando tumores o neoplasias, los cuales, al ser cancerosos se denominan maligno [2] [5]. Para que una célula normal, se convierta en una célula tumoral, en esta deben ocurrir mutaciones genéticas [16].

El ambiente en el que se encuentre el tumor es vital para que se desarrolle o no carcinogénesis; ya que se han reportado estudios donde demuestran que las modificaciones epigenéticas en el ambiente tumoral pueden promover el inicio del cáncer. Además, se han reportado células madre malignas "*CSCs cancer stem cells*" que se asocian a la iniciación del tumor y la recurrencia que puede tener, además de poseer particulares habilidades de resistencia frente a diferentes tratamientos como la quimioterapia y radioterapia [15].

Existen dos teorías de cómo comienza y progresa el cáncer de seno; la primera, llamada la teoría de las células madre del cáncer "*cancer stem cell theory*" y la teoría estocástica. La primera, menciona que todos los subtipos de tumores se derivan de las mismas células madre o progenitoras, adquiriendo sus mismas características de mutaciones genéticas y epigenéticas; por el contrario, la teoría estocástica, menciona que todos los subtipos de tumores se derivan de el mismo tipo de célula, ya sea progenitora o diferenciada [15].

La clasificación de tumores malignos toma en cuenta factores relacionados con la malignidad del tumor, su tamaño, forma, estado ganglionar y metástasis a distancia. Además de estos factores, su clasificación depende de si el tumor tiene receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y la expresión 2 del factor de crecimiento humano (HER2). Aunque la mayoría de los tumores son clasificados de manera histológica, la cual toma en cuenta únicamente características clinicopatológicas, se ha demostrado que cánceres del mismo tipo histológico, pueden tener comportamientos biológicos diferentes. Los 4 subtipos correspondientes a la clasificación biológica del tumor de glándula mamaria son Luminal A, Luminal B, HER2-OE y Basal [17].

2.2 Curcumina

La curcumina, de fórmula $C_{21}H_{20}O_6$, es una especia procedente de la curcuma longa, perteneciente al grupo de curcuminoides (fenoles de tipo natural). Es un compuesto tautomérico, es decir que dependiendo de si se encuentra en disolución de componentes polares adquiere una forma ceto o enólica respectivamente como se puede observar en la Figura 2.1. No es soluble en agua, pero sí fácilmente soluble en disolventes polares como el etanol, metanol, cloroformo o acetonitrilo. [18]

Varios estudios han reportado a la curcumina como inhibidora de proliferación de diferentes células tumorales, informando que se induce la detención de G2/M, mediante la activación el control mitótico en las células MCF-7, en donde las células se detuvieron en la fase G1 del ciclo celular; también induce la apoptosis de estas células, inhibiendo e induciendo diferentes expresiones génicas, como la inhibición de *Wnt/ β - catenina*.

Dependiendo del tipo de cáncer que se desarrolle, en el proceso de división celular, surge la activación anormal de la vía de señalización *Wnt/ β - catenina*. Durante este proceso, se ha reportado la asociación de la curcumina con la regulación de mecanismos epigenéticos, modulando vías de señalización como *Wnt/ β - catenina* (vía de señalización frecuentemente alteradas en cáncer y con alteraciones epigenéticas en sus componentes de regulación)[19]. Esto, debido a que en este proceso, se da la metilación del ADN, parte esencial para el desarrollo normal de la división, en donde las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) en especial la DNMT1, son las encargadas de metilar ADN durante el proceso de división celular [4]. Las proteínas de DNMTs pueden ser reguladas por la curcumina, y tiene un efecto de inhibición sobre las enzimas que catalizan la metilación del ADN; esto implica, que puede actuar incrementando la sensibilidad

de células tumorales, potencializado su efecto anti-proliferativo [19].

Además de la inhibición de la vía *Wnt/β - catenina*; también se han encontrado efectos de la curcumina al inhibir la expresión de la vía ciclina D1 en las células MCF-7 y MDA-MB-231 [20]

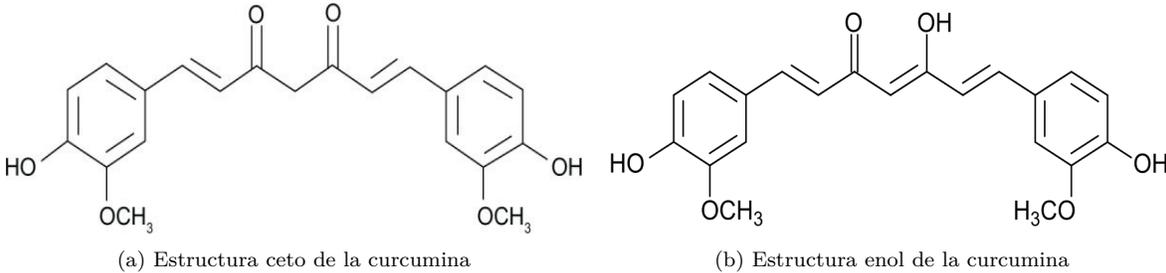


Figura 2.1: Estructuras químicas de la curcumina [18]

2.3 Puntos de Carbono

Los CDs son un tipo de nanopartícula, compuesto en su mayoría por carbono de estructura sp_2/sp_3 y varios grupos funcionales como OH, COOH y NH_2 [21].

Gracias a sus abundantes grupos funcionales, los puntos de carbono son fácilmente modificables, lo cual lo convierte en una ventaja a la hora de optimizar sus propiedades mediante la adición de moléculas orgánicas o poliméricas capaces de adherirse a la cubierta del nanomaterial [22].

Los puntos de carbono, han sido usados para múltiples aplicaciones en diferentes campos como bioimágenes, sensado, fotocatalisis, liberación de fármacos, entre otras. Esto debido a sus propiedades de biocompatibilidad, bajo costo, y propiedades ópticas de absorción y fluorescencia, las cuales se pueden manipular a través de parámetros como el tipo de síntesis, condiciones de reacción y precursores utilizados para ella [21]. Además, gracias a estas propiedades ópticas, los CDs, tiene una mejor estabilidad a la luz, es decir, mayor resistencia al fotoblanqueo y fotoenlazamiento y alta fluorescencia. [22]

Los puntos de carbono, al sintetizarse por diferentes métodos y precursores, presentan diferentes comportamientos en el espectro de absorción; sin embargo, generalmente se observan bandas de absorbancia en la región de 200nm - 400nm y posiblemente con una extensión en el rango visible, en la cual se dependerá de los enlaces que se hayan generado en la síntesis de los puntos[23] [24]. Las bandas surgen de las transiciones entre los enlaces orbitales moleculares de los grupos funcionales presentes en los CDs; en la Figura 2.2 se expone la existencia de cinco bandas, en las cuales, según la longitud de onda se conoce el tipo de enlaces que conforman el nanomaterial y en dónde se encuentran estos enlaces. Estos, pueden hallarse en el núcleo de los CDs o en el revestimiento de estos; en donde una longitud de onda por debajo de 400 nm nos da a conocer los grupos funcionales que lo rodean, y por encima de esta cifra aquellos encontrados en su núcleo[21][25].

La primera banda del espectro, corresponde a la transición $\pi - \pi^*$ con una longitud de onda menor a 300nm, atribuidos a los enlaces C=C; la segunda banda, se atribuye al paso de $n - \pi^*$ (300nm-400nm) correspondiente a los enlaces C=O y C=N, ambas bandas [23]. Por lo contrario, los valores superiores a 400 nm se refieren a la adición de nitrógeno en el enlace sp_2 del carbono; ya que, se coloca un exceso de electrones en los orbitales π^* desocupados y reduce la brecha HOMO-LUMO, la cual se atribuye a la máxima diferencia de energía que puede existir entre dos orbitales ("*Highest Occupied Molecular Orbital*" y "*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*") [21].

Los puntos de carbono con emisión roja tienen electrones π en sp_2 en el revestimiento del nanomaterial; lo que conlleva a una absorción en las longitudes de onda entre 500-800nm, por lo tanto, en el espectro de absorción se puede observar el tipo y contenido de los grupos funcionales [21]. De tal manera; que los CDs, que contienen grupos funcionales como -OH, COOH y NH_2 y su superficie, reduce los niveles de energía, haciendo la brecha HOMO LUMO más pequeña y desplazando los valores de absorción a una longitud de onda superior a 650 nm [26].

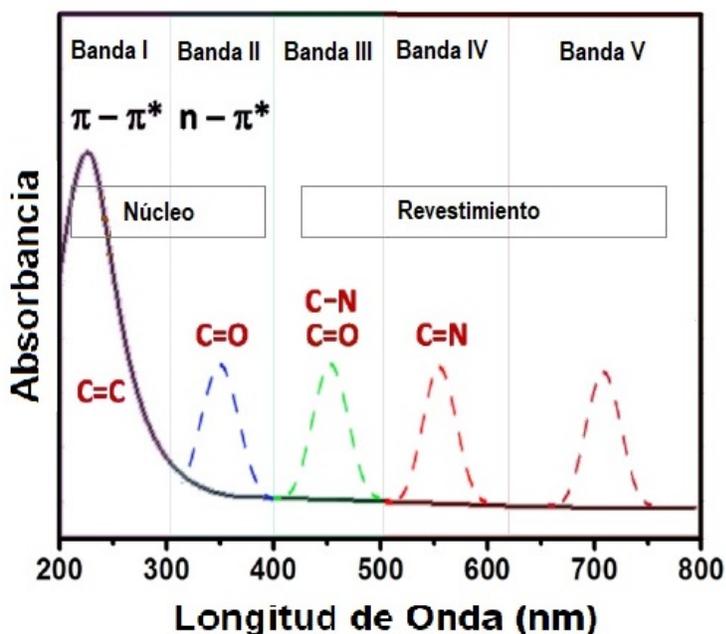


Figura 2.2: Bandas del espectro de absorción y la transición de electrones en los puntos de carbono [21]

La fluorescencia en los CDs se puede comprobar observando el espectro de emisión; el cual da a conocer la luz que emite el material, mientras que en el espectro de absorción, se observa la luz que absorbe el material al ser expuesto a diferentes longitudes de onda, los resultados de este, se atribuyen a los enlaces que existan en el material, ya sea en el núcleo o la superficie de estos [24].

La síntesis de los puntos de carbono se da en alguna de las dos rutas principales, la primera conocida como "*de arriba hacia abajo*" o "*top-down*", y la segunda, "*de abajo hacia arriba*" o "*botton-up*". En la primera ruta, se espera que los precursores usados se rompan para obtener las partículas de tamaño nanométrico; mientras que la segunda, se da por pirólisis directa de moléculas nanométricas [27].

Existen diversos métodos para sintetizar CDs, cada uno de ellos con respuesta a diferentes aplicaciones, como la ablación láser, oxidación electroquímica, quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, microondas, y método solvothermal[28].

La síntesis solvothermal es un método no tóxico y de bajo costo, con el cual se pueden usar diferentes precursores [28]. Se basa en calentar los precursores y el solvente a temperaturas por encima del punto de ebullición del solvente, evaporándolo y aumentando la presión en un recipiente herméticamente sellado en un autoclave en donde se facilita la interacción de los precursores debido a que se forma un estado de fluido crítico en el cual se forman reacciones químicas en condiciones no habituales y posteriormente, cuando la solución se enfría, se encuentran las estructuras en la fase que se desean [29] [30].

2.4 Funcionalización de CDs

La funcionalización, es un proceso químico, el cual inserta grupos funcionales para la incorporación o unión con otras moléculas. Para la funcionalización superficial de los puntos de carbono con curcumina, se debe desarrollar un procedimiento en donde parte de la superficie de los CDs queden revestidos por moléculas de curcumina, tomando en cuenta que la absorción de la curcumina sobre la superficie de los CDs ocurre por la interacción de N-O entre los grupos amino terminales en la superficie de los CDs y los grupos cetónicos alifáticos de la curcumina como se observa en la Figura 3.4.

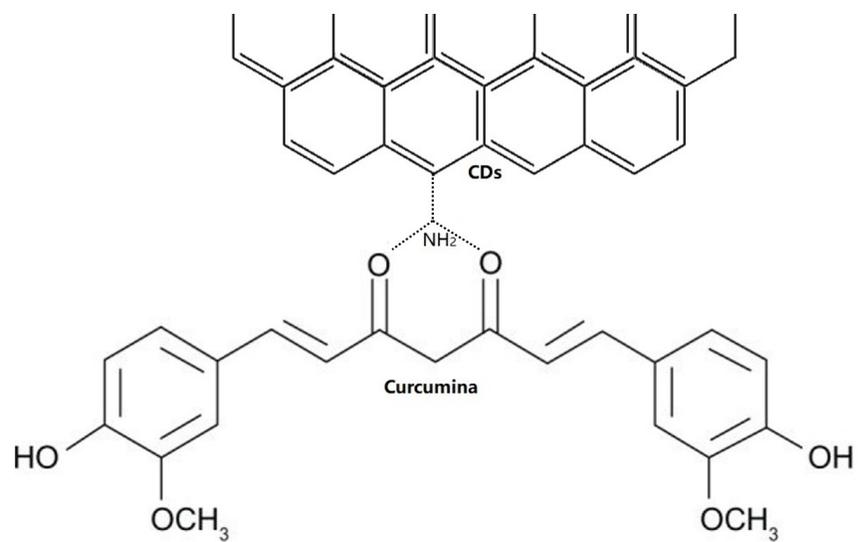


Figura 2.3: Absorción de la curcumina sobre la superficie de los CDs

Capítulo 3

METODOLOGÍA

3.1 Síntesis de puntos de carbono

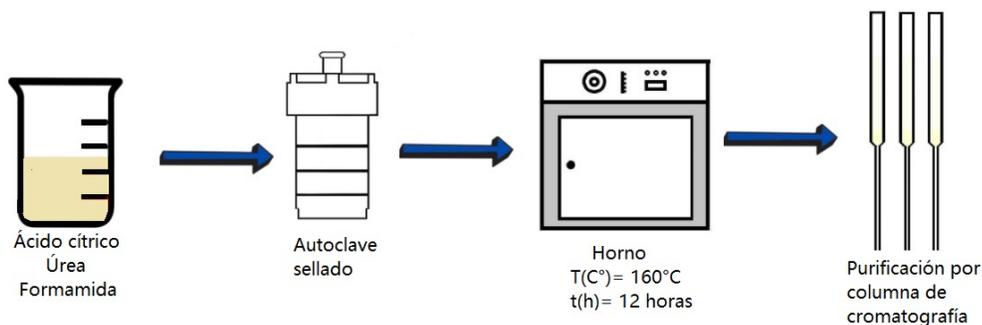


Figura 3.1: Metodología de síntesis de puntos de carbono

Para la síntesis de puntos de carbono, se utilizan como precursores, el ácido cítrico $C_6H_8O_7$ y la urea CH_4N_2O y utilizando como solvente la formamida CH_3NO . Se utiliza el método de síntesis *bottom up* solvotermal. En este método, se coloca la mezcla de precursores de 1g de urea y 1g de ácido cítrico en 15 mL de formamida como solvente. Este pasa a un autoclave de teflón que posteriormente se deja en el horno por 12 horas, a una temperatura de 160°C, como se observa en la Figura 3.1 [31]. Posterior a las 12 horas de síntesis, se obtuvo una solución color rojo oscuro tal como se observa en la figura 3.2 a).



(a) Resultado de la síntesis solvotermal



(b) Resultado de la síntesis solvotermal bajo espectroscopía UV-VIS

Figura 3.2: Resultado de la síntesis de puntos de carbono

El producto de la muestra mostrada en la Figura 3.2, corresponde a la mezcla de puntos de carbono, fluoróforos y demás partículas libres; por lo que se procede a un proceso de purificación. Primero, se centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos; se retira el sobrenadante eliminando el precipitado que se haya formado y se procede a centrifugar dos veces más a 10.000rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se filtra por un filtro de $0,22\mu\text{m}$ [31]. Finalmente, con el objetivo de separar los puntos de carbono de otro tipo de partículas como fluoróforos y unir moléculas restantes; se realiza un proceso de

cromatografía por columna, el cual es una técnica de purificación de compuestos que aprovecha las diferencias de polaridad entre moléculas de tal manera que estas pasen por separado. Esta fase, se compone de una fase estacionaria y una fase móvil; la fase estacionaria es el gel de sílice SiO_2 , el cual se coloca dentro de la columna para que posteriormente pase a través de él la fase móvil y la mezcla. Como fase móvil se utiliza un solvente polar en proporción 1:1 de agua milli Q y acetonitrilo.

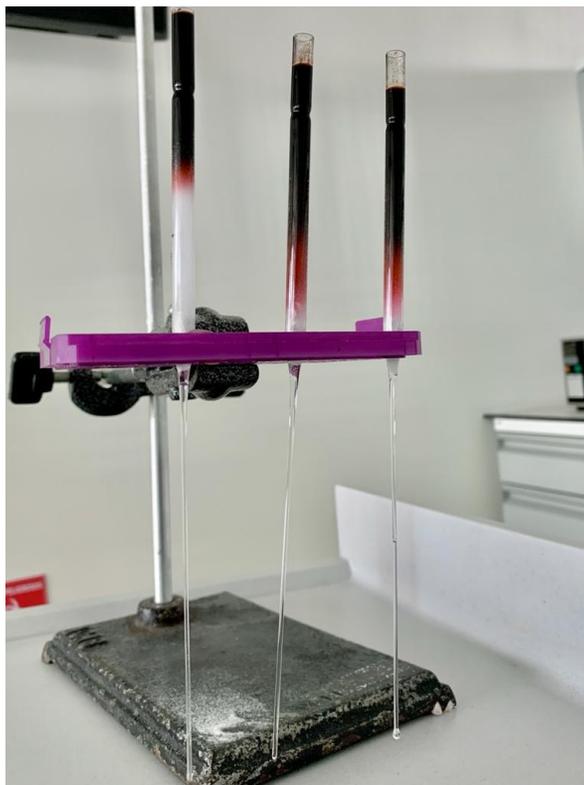


Figura 3.3: Ejemplo de cromatografía por columna con solución de puntos de carbono

En la Figura 3.3, se puede observar un ejemplo de cromatografía por columna; en donde se usa el solvente 1:1 como fase móvil y a través de él pasa la reacción de síntesis. Una vez obtenida la solución de puntos de carbono, se filtra nuevamente con un filtro de $0,22\mu m$, se procede a secar en un horno a una temperatura de $80^{\circ}C$ durante 5 horas aproximadamente; con el fin de remover todo el solvente y posteriormente, dispersar los puntos secos en el solvente y concentración requerida (Tabla 3.1)

Para determinar la temperatura óptima de reacción, se realiza la síntesis con dos temperaturas correspondientes a $140^{\circ}C$ y $160^{\circ}C$. Ya que los enlaces que conforman los CDs dependen de la síntesis usada. Se procesa a evaluar los resultados a ambas temperaturas con el fin de hallar qué enlaces hay en los CDs sintetizados y conocer cuál es más afín con la aplicación en este caso.

Tabla 3.1: Concentraciones de curcumina utilizadas para la funcionalización de CDs

Masa de puntos de carbono (mg)	Concentraciones de curcumina $\mu\text{g/mL}$
10	45
10	2,25
10	1,125
10	0,675
10	0,287

Los puntos de carbono sintetizados para la funcionalización con curcumina deben tener grupos amino terminales en su superficie, de tal manera que se debe evaluar si existen enlaces Carbono Nitrógeno, los cuales posteriormente conformarán enlaces con el grupo carboxílico de la curcumina. Por esta razón; la temperatura escogida fue aquella que presentó enlaces con nitrógeno y a su vez, contó con la mayor intensidad lumínica en el espectro de emisión respecto a las demás temperaturas.

3.1.1 Funcionalización de puntos de carbono con curcumina

La funcionalización de puntos de carbono con curcumina, se realiza uniendo la nanoplataforma con diferentes concentraciones de curcumina dispersada en etanol, con el fin de obtener la mejor concentración, en la cual, existan más CDs funcionalizados. Primero se dispersan cinco muestras con concentraciones de curcumina diferentes (Tabla 3.1) y 10mg de CDs en cada una de ellas. Posteriormente, las soluciones permanecen en agitación magnética durante 48 horas, como se observa en la Figura 3.4. Finalmente se realiza la evaluación de absorción con espectroscopía UV-VIS sobre la superficie de los CDs en función de la concentración de curcumina.



Figura 3.4: Soluciones de etanol con distintas concentraciones de curcumina y 10mg de CDs en cada una de ellas

Después de obtener las soluciones de puntos y curcumina en etanol, se purifican de manera similar al mencionado anteriormente, mediante cromatografía por columna, tomando la fase estacionaria de gel de sílice y pasando a través de la columna como fase móvil el solvente de agua ultrapura (Milli Q). Finalmente, después del proceso de cromatografía por columna, se filtran las partículas más pequeñas de la solución a través de un filtro de $22\mu\text{m}$.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos de los CDs funcionalizados con curcumina, se toma la espectroscopía de absorción y emisión de la curcumina dispersada en etanol; observando su comportamiento para su posterior análisis.

3.2 Métodos de Caracterización de puntos de carbono y curcumina

3.2.1 Espectroscopía UV-VIS

La espectroscopía UV-VIS, es técnica basada en la medición de la radiación ultravioleta y visible en una molécula [32]. Esta espectroscopía se trabaja en el rango de 200nm a 800 nm, con el fin de brindar la mayor información posible de los estados energéticos y moleculares de las muestras. El instrumento de medición es llamado un

espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES con el software Ocean View, el cual se compone de una fuente de luz ultravioleta [33].

3.2.2 FTIR

La espectroscopia infrarroja (IR) es una técnica usada para el análisis de las estructuras atómicas basándose en la interacción entre la radiación infrarroja con la materia, al medir las frecuencias de radiación a la que las sustancias absorben y conducen a la producción de vibraciones en las moléculas. De tal manera que de información acerca de las estructuras químicas de la muestra; esta medirá la interacción de la radiación infrarroja con los CDs, con el fin de determinar los grupos funcionales que se encuentran en la superficie [34].

La espectroscopía FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) por su parte, toma la espectroscopía infrarroja IR y se une con el principio matemático de la transformada de Fourier, con el fin de transformar la salida del espectro IR y permitir la identificación de materiales y su concentración [35]. Estas señales se tomaron a las tres soluciones finales: los CDs, la curcumina y los CDs funcionalizados con curcumina.

3.2.3 Potencial Zeta

El potencial zeta, es la diferencia de potencial eléctrico que existe entre las capas de una partícula. Este voltaje, sirve para conocer información acerca de la estabilidad, y dispersión de las partículas [36]. Para la caracterización de los CDs, se usa el potencial zeta midiendo el potencial eléctrico entre las capas de diferente fase eléctrica; con el objetivo de medir la estabilidad de las dispersiones coloidales [37].

3.2.4 Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad celular, se evalúa con el fin de observar si una sustancia tiene efecto sobre un modelo biológico, por ejemplo, líneas celulares frente a un componente. Para realizar los ensayos de citotoxicidad, se utilizaron dos líneas celulares con el fin de comparar el efecto de la nanoplateforma sobre una línea celular de fibroblastos y otra sobre células cancerosas. Por lo cual se utilizaron las líneas 3T3 y MCF-7 respectivamente (Figura 3.6). Esta se realiza por el método de resazurin, el cual es un colorante indicador de viabilidad celular, un método rápido, no tóxico y eficiente, útil para el seguimiento de la proliferación, tanto en líneas celulares de fibroblastos como tumorales. Se usa debido a que no es un método destructivo en los cultivos celulares, lo cual beneficia a la no pérdida de células en los ensayos, además, de poderse adaptar fácilmente a ensayos in vitro gracias a su homogeneidad [38]. El resazurin, al ser colocado en el medio de cultivo con las células, pasa de ser un azul no fluorescente, a un rosa fluorescente ya a que pasa a ser resorufina; esto debido al consumo de oxígeno en el metabolismo celular. Donde la citotoxicidad se indica, por la disminución de los valores de fluorescencia resultante

Tabla 3.2: Distribución de los tratamientos en las placas de cultivo para las pruebas de citotoxicidad

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		CS	C1	DF3	DF5	C2	C4	CDs1	CDs3	CDs5	CS	
C		CS	DF1	DF3	DF5	C2	C4	CDs1	CDs3	CDs5	CS	
D		CS	DF1	DF3	DF5	C2	C4	CDs1	CDs3	CDs5	CS	
E		CS + ETOH	DF2	DF4	C1	C3	C5	CDs2	CDs4			
F		CS + ETOH	DF2	DF4	C1	C3	C5	CDs2	CD4			
G		CS + ETOH	DF2	DF4	C1	C3	C5	CDs2	CDs4			
H		Rsz ctrl										

Tabla 3.3: Concentración y volumen usado para la curcumina

Curcumina	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen (μL)
C1	500	48
C2	250	24
C3	125	12
C4	50	4,8
C5	25	2,4

con respecto a las células sin tratamiento. [39]

En el ensayo de viabilidad celular, se utilizan 4 frascos de 96 pozos, dos de ellos para la evaluación de la línea celular 3T3 y los dos siguientes para la línea celular MCF-7; en estos, se colocan 15.000 células por cada pozo en medio de cultivo y posteriormente las solución de CDs, curcumina y CDs funcionalizados; para finalmente retirar el medio y colocar resazurin $4,4\mu\text{M}$. Este tratamiento se incubaba para posteriormente añadir el resazurin después de 6 o 12 horas. Dos de ellos para 6 horas y dos para 12 horas, cada par con un línea celular diferente.

Como se indica en la Tabla 3.2, se colocaron las tres soluciones mencionadas a 5 concentraciones diferentes, y un triplicado para cada concentración. En donde CS hace referencia a células solas, CS+ETOH células más etanol, Rsz ctrl al control de resazurin, DF a los puntos funcionalizados, C a la curcumina y CDs a los puntos de carbono. Cada uno de ellos con una numeración según su concentración, siendo 1 la más concentrada, las concentraciones se pueden observar en las tablas 3.3, 3.4 y 3.5.

En las tablas 3.2, 3.3 y 3.4 se pueden observar las distintas concentraciones y volúmenes usados, tanto para la evaluación de puntos de carbono, curcumina, y puntos de carbono funcionalizados con curcumina.

El montaje se realiza con ambos tipos de líneas celulares (3T3 y MCF-7) y se procede a hacer los ensayos incubando las células con los CDs, y posteriormente colocando el

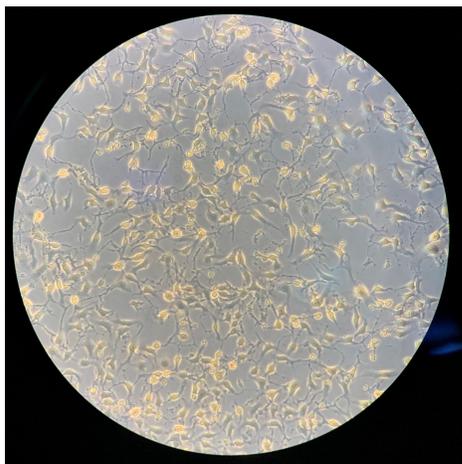
Tabla 3.4: Concentración y volumen usado para CDs

CDs	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen (μL)
CDs1	500	60
CDs2	250	30
CDs3	125	15
CDs4	50	6
CDs5	25	4

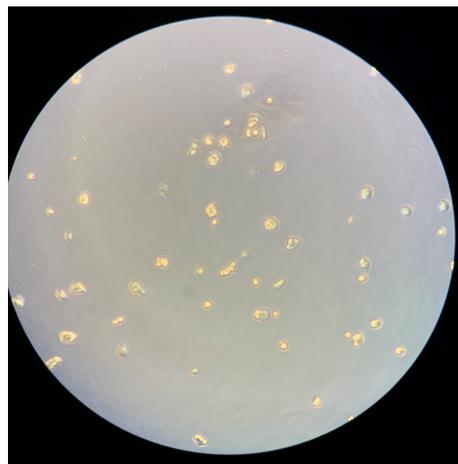
Tabla 3.5: Concentración y volumen usado para CDs funcionalizados con curcumina

CDs funcionalizados	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen (μL)
DF1	500	60
DF2	250	30
DF3	125	15
DF4	50	6
DF5	25	4

resazurin en las sustancias a evaluar; para posteriormente monitorear el estado de la viabilidad celular en las siguientes horas (4,6,12 horas).



(a) Células 3T3



(b) Células MCF-7

Figura 3.5: Células usadas para los ensayos antes de ser colocadas en el medio de cultivo y a las sustancias analizadas

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de puntos de carbono, observando espectroscopía UV-VIS, espectroscopía por infrarrojo (FTIR) y potencial zeta. También el análisis de la funcionalización de CDs con curcumina y sus resultados a través de espectroscopía UV-VIS y FTIR. Asimismo, los resultados hallados ensayos de citotoxicidad y su correspondiente análisis y estadísticas.

Para optimizar las propiedades de los CDs, haciéndolos funcionales en tratamientos contra células tumorales, como en el tratamiento para el cáncer de seno y la línea celular de tumores mamarios MCF-7, se realiza la funcionalización con curcumina. Para esto, en primer lugar se toma la espectroscopía de la curcumina y se analizan sus enlaces, con el fin de encontrar los grupos amino terminales que la componen. En la Figura 4.1. a) se observa la absorción en donde se exponen concentraciones de $500\mu\text{g}/\text{mL}$, $250\mu\text{g}/\text{mL}$, $125\mu\text{g}/\text{mL}$, $50\mu\text{g}/\text{mL}$ y $25\mu\text{g}/\text{mL}$, en las cuales existe un máximo de absorbancia en 425nm en todas las concentraciones, con un aumento de absorbancia según su concentración [18]. En la Figura 4.1 b) se observa el espectro de emisión, en donde el pico de intensidad, se encuentra en 590 nm, el cual corresponde a la banda de su característico color amarillo.

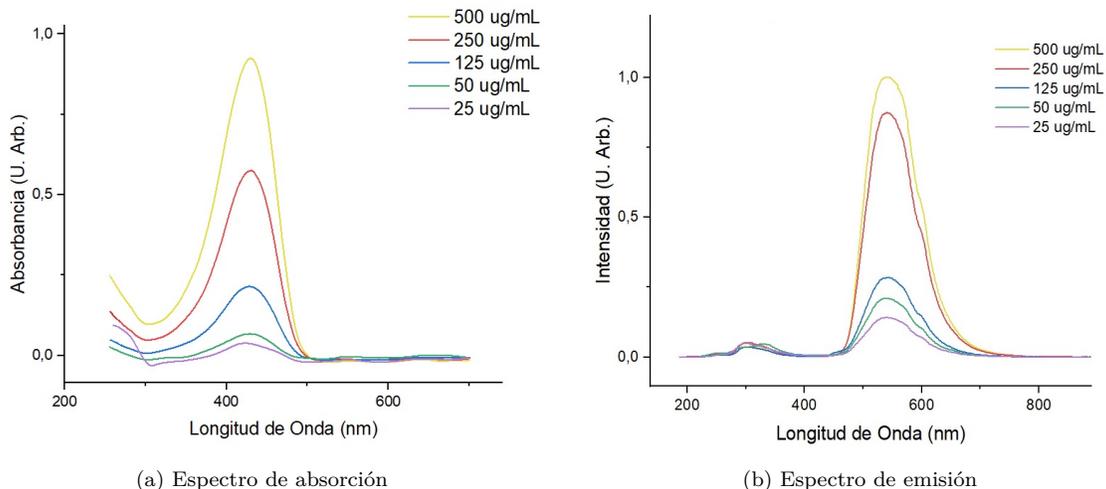


Figura 4.1: Espectroscopía de la curcumina en distintas concentraciones de dispersión en etanol

4.1 Síntesis de puntos de carbono

Los CDs fueron sintetizados a partir de los precursores de ácido cítrico y urea en el solvente formamida por la reacción del método de síntesis solvotermal, siguiendo el procedimiento reportado en la sección 3.1. Posteriormente, se realiza el procedimiento de cromatografía por columna, y se observan los resultados de la separación molecular bajo la luz ultravioleta, obteniendo los resultados de la Figura 4.2. en donde al separar las moléculas según su peso molecular y polaridad, se separan los CDs de otras moléculas remanentes presentes en la reacción; primero se obtienen los fluoróforos libres (con más fluorescencia) y por último, las partículas residuo sin ningún tipo de fluorescencia y por último, las partículas residuo sin ningún tipo de fluorescencia. Por lo cual, en el medio, se encuentran las moléculas que no corresponden ni a fluoróforos libres ni a residuos de partículas grandes. Por lo tanto, se precede a tomar las soluciones fluorescentes de la mitad, que corresponden a los puntos de carbono purificados.

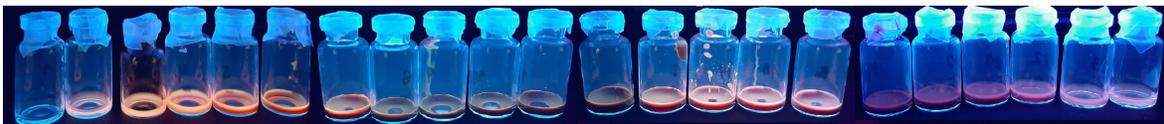


Figura 4.2: Resultados posterior a la separación de moléculas por cromatografía por columna

Esta síntesis se realiza para dos temperaturas de síntesis diferentes (140°C y 160°C), con el fin de posteriormente evaluar cuál de ellas tendrá un mejor resultado de acuerdo a la aplicación requerida.

Con un equipo de espectrofotometría FLAMES-S-XR1-ES y el software Ocean View, se analiza el espectro de emisión para las dos diferentes temperaturas de síntesis, cada una a 12 diferentes longitudes de onda, como se observa en la Figura 4.3. A su vez, en la Figura 4.4 a) se halla el espectro de absorción de los CDs sintetizados y en la Figura 4.4 b) se analiza en la misma figura la emisión de la temperatura de 140°C y 160°C irradiándolas con la misma longitud de onda de 350 nm y comparando la intensidad de cada una de ellas.

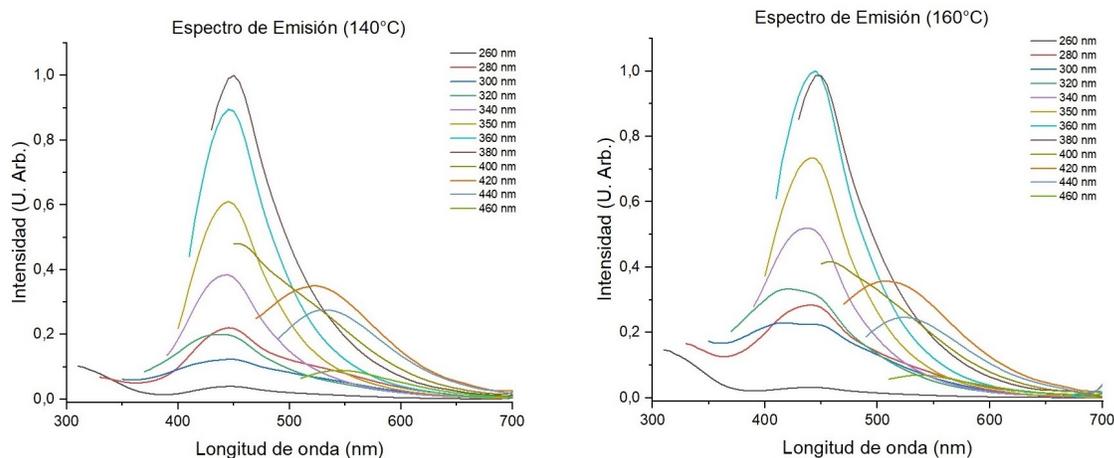


Figura 4.3: Espectros de emisión de puntos de carbono sintetizados a diferentes temperaturas dispersados en una concentración de 0,1 mg/mL

En la Figura 4.3 b), se observa el espectro de emisión en donde, existen dos bandas de emisión dependiendo de la excitación que hayan recibido. En el rango de 600 nm correspondientes a las mayores excitaciones y en 550 nm correspondiente a las menores. Lo que indica que los espectros respectivos a las longitudes de onda de excitación desde 380 nm se relacionan con estructuras del núcleo de los CDs, mientras que las mayores de 380 nm se relacionan con el revestimiento de los puntos [31].

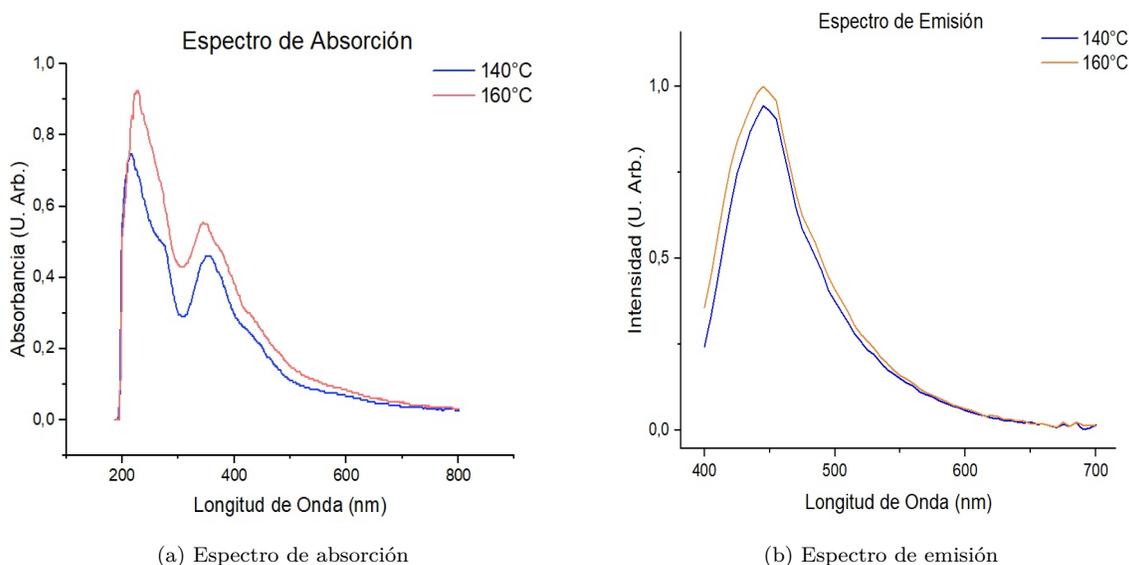


Figura 4.4: Espectros de absorción y emisión de los puntos de carbono sintetizados a temperaturas de 140°C y 160°C. Dispersados en una concentración de 0,1 mg/mL

En la Figuras 4.4, se pueden observar la comparación de espectros de las dos temperaturas escogidas. El espectro de absorción 4.4 a) se toma en cuenta para conocer si existen enlaces Carbono Nitrógeno en los puntos de carbono. Tanto en la temperatura de 140°C como 160°C, se observan máximos de absorbancia cercanas a 220nm y 350nm, los cuales se contribuyen a la segunda banda correspondiente a enlaces C=O y C-N. La diferencia radica en que la temperatura de 160°C tiene una absorbancia mayor. El espectro de emisión 4.4 b) es relativamente parecido entre ambas temperaturas; sin embargo; el área bajo la curva correspondiente a la curva de la temperatura de 160°C, es mayor al de la temperatura de 140°C. Por lo tanto; la síntesis a 160°C fue la más apta para la funcionalización con curcumina.

Con la temperatura escogida de 160°C, se realizan las nuevas síntesis de CDs y posteriormente su funcionalización con curcumina, la cual, se realiza después del proceso de cromatografía por columna (Figura 4.5) en donde se puede observar la fluorescencia de los puntos de carbono funcionalizados bajo luz ultravioleta. También se puede observar la comparación entre la solución de CDs funcionalizados y la curcumina, ambos dispersos a la misma concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de etanol (Figura 4.6).



Figura 4.5: Puntos de carbono funcionalizados bajo luz ultravioleta

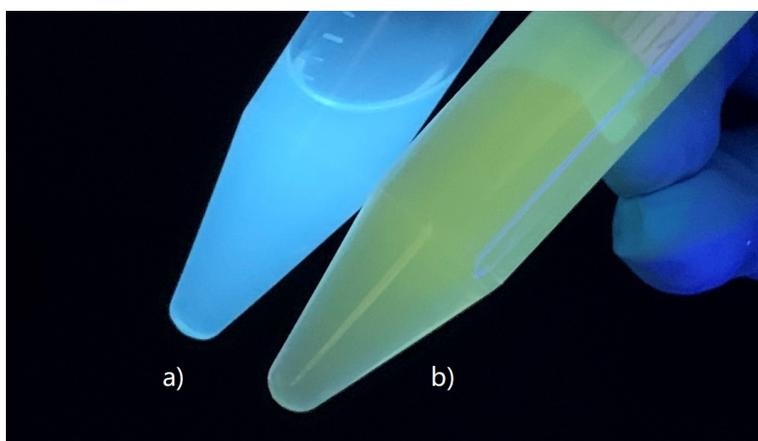


Figura 4.6: Comparación de espectrofotometría para a) solución de CDs funcionalizados con curcumina dispersados en etanol y b) solución de curcumina dispersada en etanol

Con el fin de analizar los resultados de las síntesis de CDs y CDs funcionalizados, las soluciones se dispersan a diferentes concentraciones en etanol después del procedimiento de síntesis, purificación, y secado. En la Figura 4.7 se muestran tres concentraciones en donde se puede observar el espectro de absorción a) CDs antes de ser funcionalizados con curcumina b) CDs funcionalizados con curcumina, a tres diferentes concentraciones de dispersión en etanol.

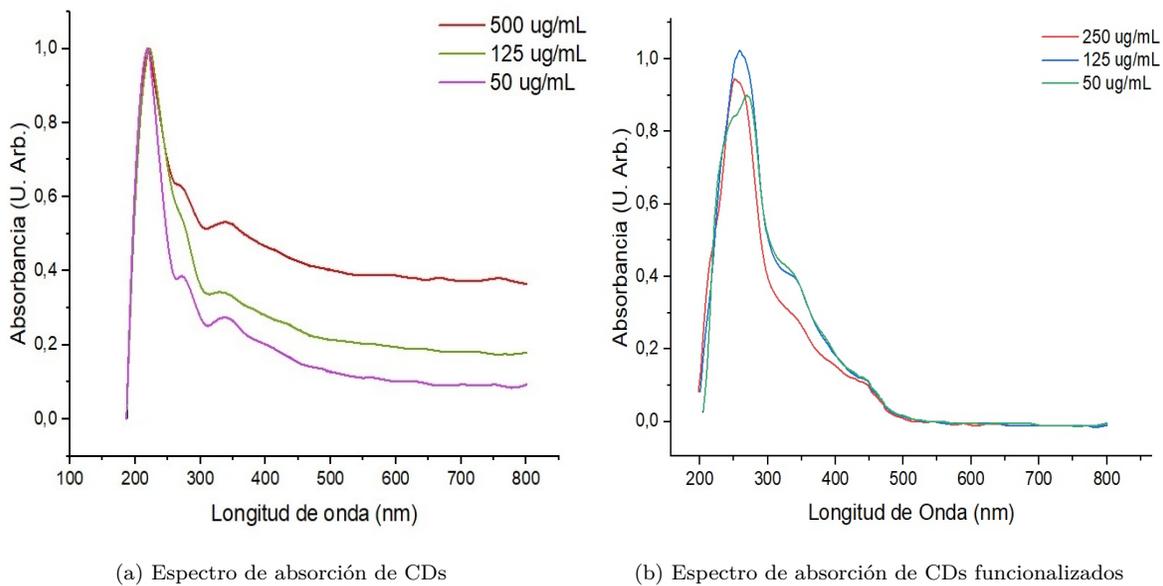


Figura 4.7: Espectros de puntos de carbono antes y después de ser funcionalizados con curcumina

En la Figura 4.7 a), se observa una absorbancia con un máximo valor en 220 nm, atribuida a la transición de enlaces $\pi - \pi^*$ de los enlaces C=C. También se observa un pico máximo en 350 nm, correspondiente a la segunda Banda de 300nm a 400nm, que se atribuyen a enlaces $n - \pi^*$; es decir, que existen enlaces C=O en el núcleo de los CDs (Figura 2.2).

En la Figura 4.7 b) se puede observar el espectro de absorción de los puntos funcionalizados tras la adición de curcumina, donde se busca, que los enlaces visualizados en los CDs y en la curcumina se observen en el espectro de absorción de estos. El espectro de puntos funcionalizados se compara con la espectro teórico correspondiente a la suma física de los espectros de los CDs y la curcumina [31]. Se observa que una banda de absorción que se encontraba en 350nm (Figura 4.7 a)), se desplazó hacia una mayor longitud de onda, alrededor de 430 nm, acercándose a la banda de absorción de la curcumina (Figura 4.1). Razón por la cual podemos inferir que los niveles de energía ahora están más cerca entre ellos, es decir que la energía entre las bandas es menor y se encuentran enlaces C-N.

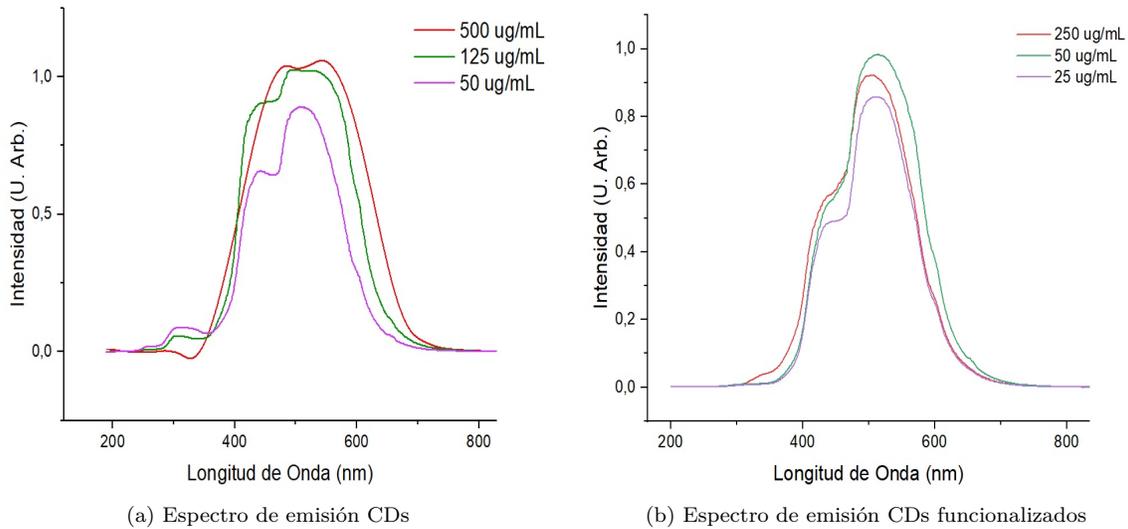


Figura 4.8: Espectros de emisión puntos de carbono antes y después de funcionalizar con curcumina

La Figura 4.8 a) expone el espectro de emisión a tres concentraciones, en donde el máximo oscila entre 500nm; por lo cual, podemos deducir que estas bandas se atribuyen a los enlaces existentes en el revestimiento de los CDs. La Figura 4.8 b) expone que el máximo de intensidad del espectro de emisión, está presente entre 500nm y 550 nm; lo que sugiere que la fluorescencia de los CDs, está siendo solapada por la emisión de la curcumina, que tiene una banda centrada en 532 nm [31].

4.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La Figura 4.9, se muestra la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. en 4.9 a) se observa la curcumina, donde existen tres picos de transmitancia; en 1750cm^{-1} , 1900cm^{-1} y 900cm^{-1} . en 4.9 b) se exponen los CDs en donde los picos de transmitancia son menos notorios pero se evidencian en 3000cm^{-1} y 1900cm^{-1} . Mientras que en la Figura 4.9 c) se observan picos predominantes en 1900cm^{-1} , 1750cm^{-1} y 3000cm^{-1} .

El espectro FTIR en los puntos de carbono cuenta con unas bandas características para los grupos funcionales; la región entre 2333 y 3178cm^{-1} se atribuye a los grupos $-\text{OH}$ y NH_2 ; bandas entre 1550 y 1620cm^{-1} debidas a grupos aromáticos $\text{C}=\text{C}/\text{C}=\text{N}$ y en la regionon de 1000 a 1250cm^{-1} se asignan a las vibraciones $\text{C}-\text{O}$ [31]. Por lo tanto, los picos de transmitancia en 1900cm^{-1} en los CDs y los CDs funcionalizados se debe a el doble enlace $\text{C}=\text{O}$ y enlace simple $\text{C}-\text{N}$. Mientras que en la curcumina, la banda de 1750cm^{-1} se debe a la existencia del grupo ester $\text{C}=\text{O}$ asociadas a las vibraciones de estiramiento del hidroxilo; y las bandas entre 980 y 120cm^{-1} se caracteriza por la existencia de polisacáridos [40] Lo cual nos confirma la existencia de enlaces nitrogena-

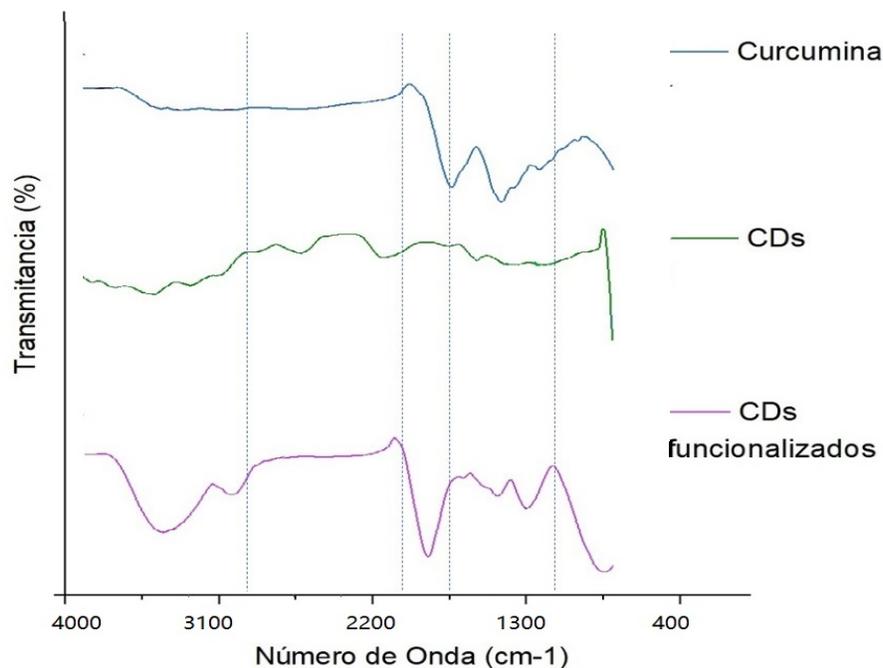


Figura 4.9: Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier en a) Curcumina b) CDs c) CDs funcionalizados con curcumina

dos en los CDs funcionalizados y a la vez, coincidiendo con las estructuras químicas de la curcumina. Por lo tanto se comprueba la correcta funcionalización de los puntos de carbono con curcumina.

4.3 Potencial Zeta

La prueba de potencial zeta, se realizó en el laboratorio de ingeniería de tejidos de la Universidad de los Andes; en donde, se utiliza un equipo de Zetasier-Malvern instruments. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 4.10. En donde se puede observar que el pico máximo se encuentra en un valor de -35 mV para las tres pruebas realizadas, lo cual nos indica que existe una carga negativa en los CDs debido a la existencia de pares electrónicos libres por la presencia de nitrógeno [41]. Confirmando la existencia de enlaces nitrogenados en la superficie de los CDs.

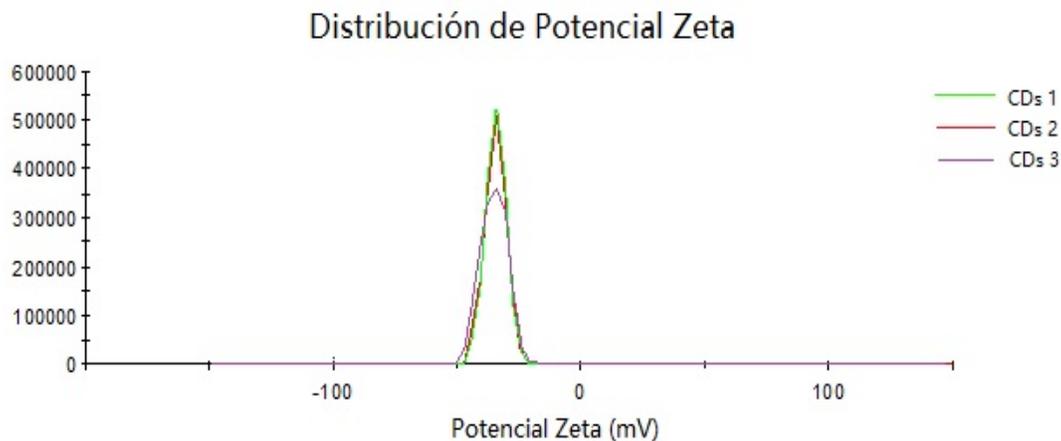


Figura 4.10: Potencial zeta para la síntesis de CDs

4.4 Citotoxicidad

Una vez obtenidos los CDs, la curcumina y los CDs funcionalizados, se procede a realizar los ensayos de citotoxicidad, en donde se evaluarán dos líneas celulares, una de cáncer de seno MCF-7 y otra de fibroblastos normales 3T3. Sembrando las células en un ambiente similar al natural a 37°C y 5% de CO_2 esperando la proliferación celular para el ensayo.

Después de realizar el procedimiento reportado en la sección 3.2.4. se toman mediciones a 4, 6 y 24 horas siguientes para observar cómo va evolucionando el metabolismo celular cuando pasan más horas con cada solución. Para las células 3T3, se puede observar en la Figura 4.11 a) el color del medio antes de la aplicación del resazurin y en 4.10 b) 4 horas después de que se ha aplicado el resazurin al medio y las células. Asimismo, en la Figura 4.12 se observa el montaje de células MCF-7, a) Antes de la aplicación del resazurin, b) Pasadas 4 horas de la aplicación del resazurin.

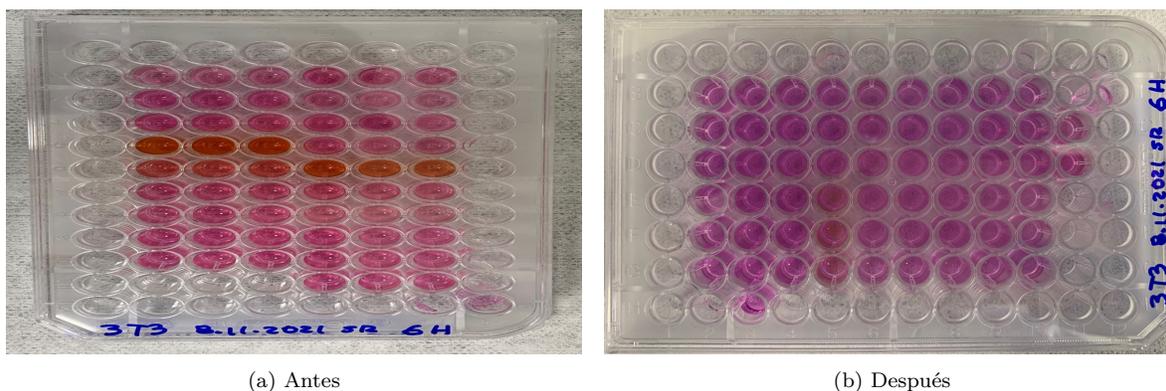


Figura 4.11: Placas de cultivo de 96 pozos con células 3T3 antes y después de la incubación con resazurin

En la Figura 4.11, se observa el medio de cultivo antes de añadir resazurin a los pozos y después de 4 horas de haber añadido resazurin; se distingue que existe un cambio de color debido al cambio de resazurin a resorufina, tanto en la línea 3T3 como en la línea MCF-7.

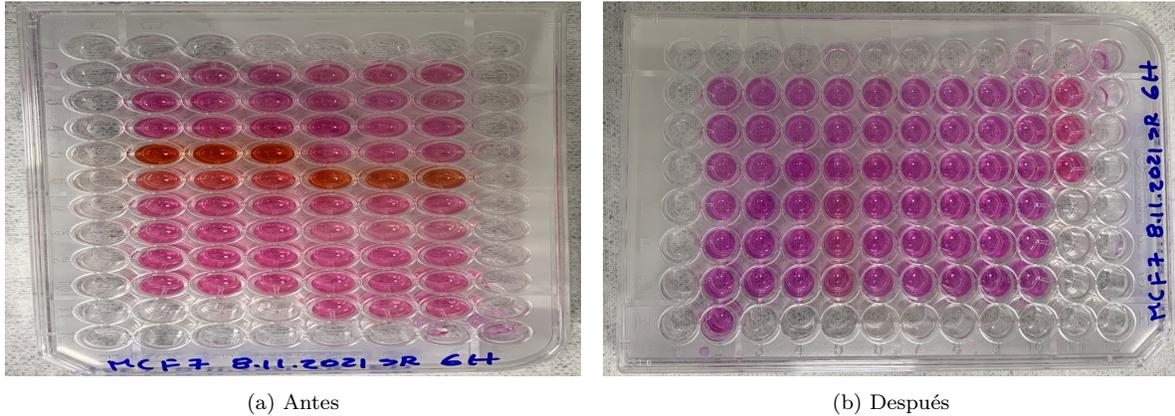


Figura 4.12: Placas de cultivo de 96 pozos con células MCF-7 antes y después de la incubación con resazurin

Finalmente, se obtienen los valores de fluorescencia emitida por la resorufina al excitar a una longitud de onda de 535 nm y 595 nm de emisión. Se comparan los datos obtenidos tomando en cuenta cada una de las concentraciones.

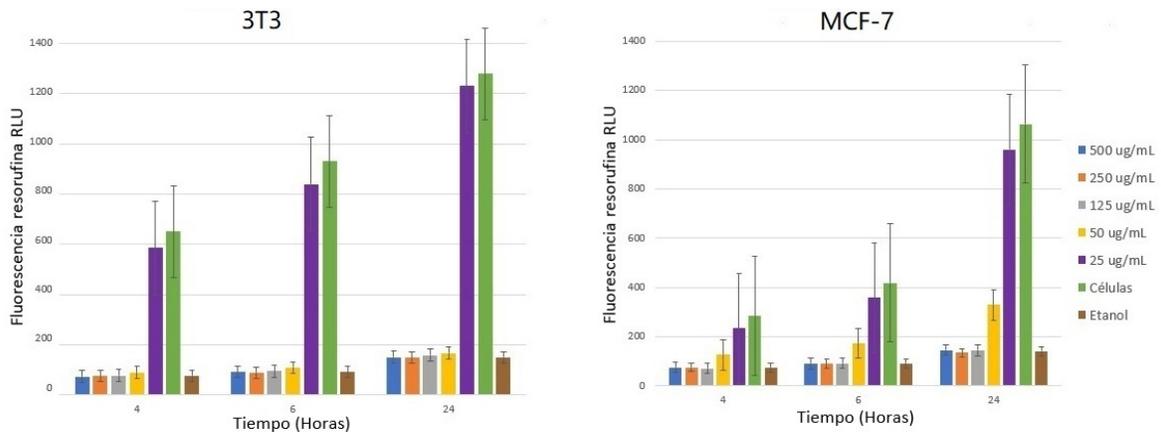


Figura 4.13: Viabilidad celular después del tratamiento con CDs (6 horas)

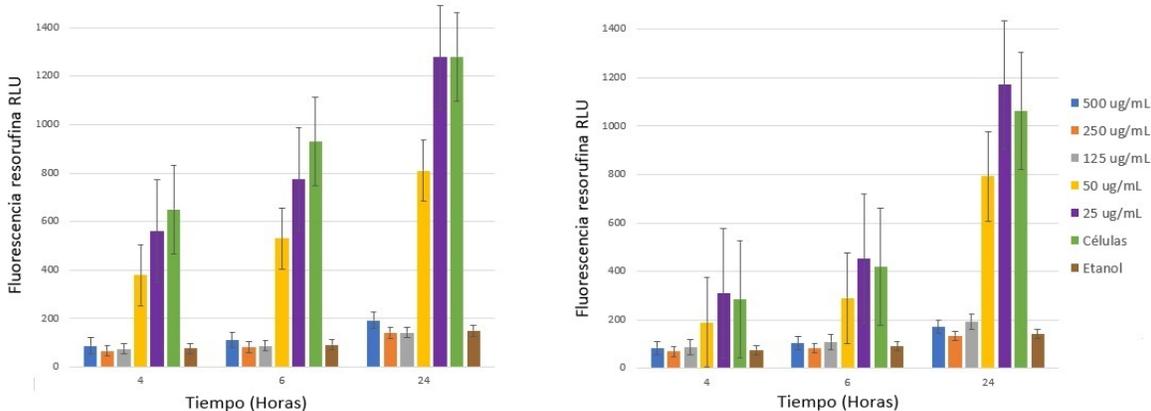


Figura 4.14: Viabilidad celular después del tratamiento con curcumina (6horas)

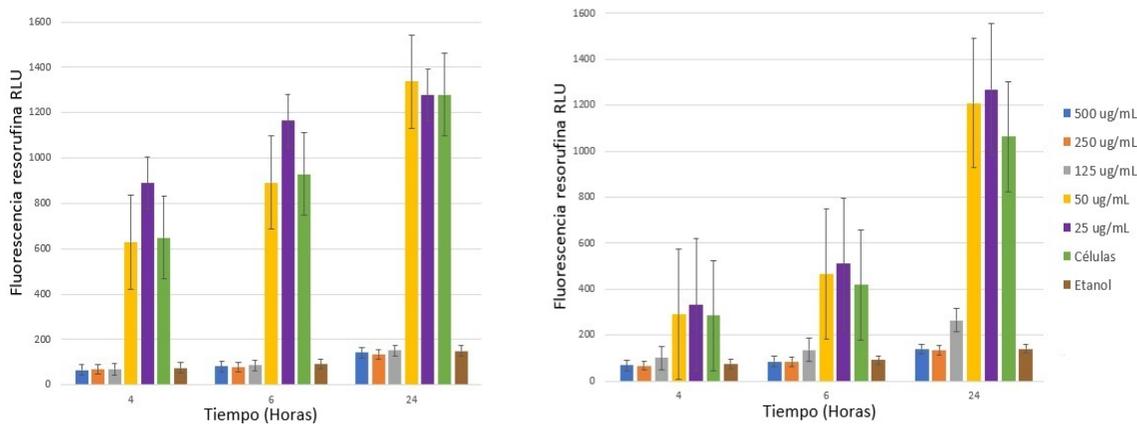


Figura 4.15: Viabilidad celular después del tratamiento con CDs funcionalizados con curcumina (6 horas)

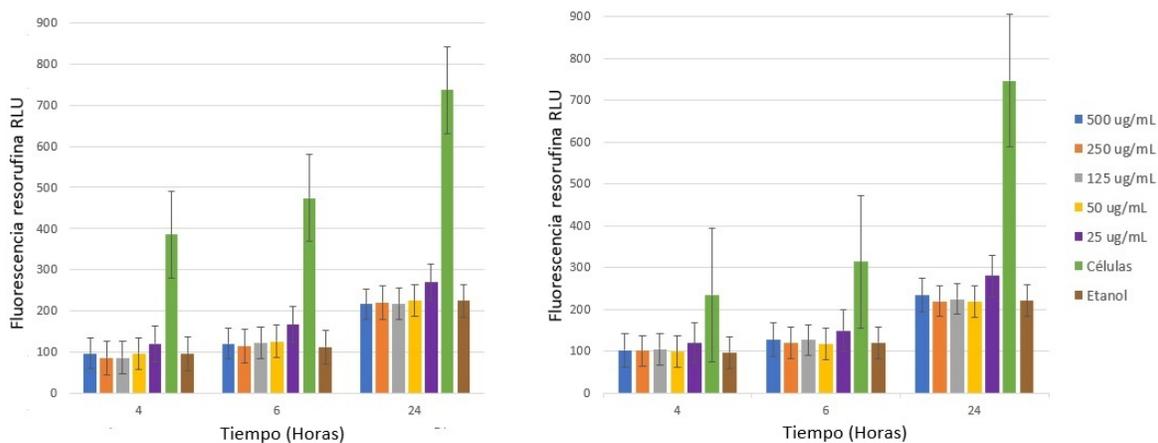


Figura 4.16: Viabilidad celular después del tratamiento con CDs (12 horas)

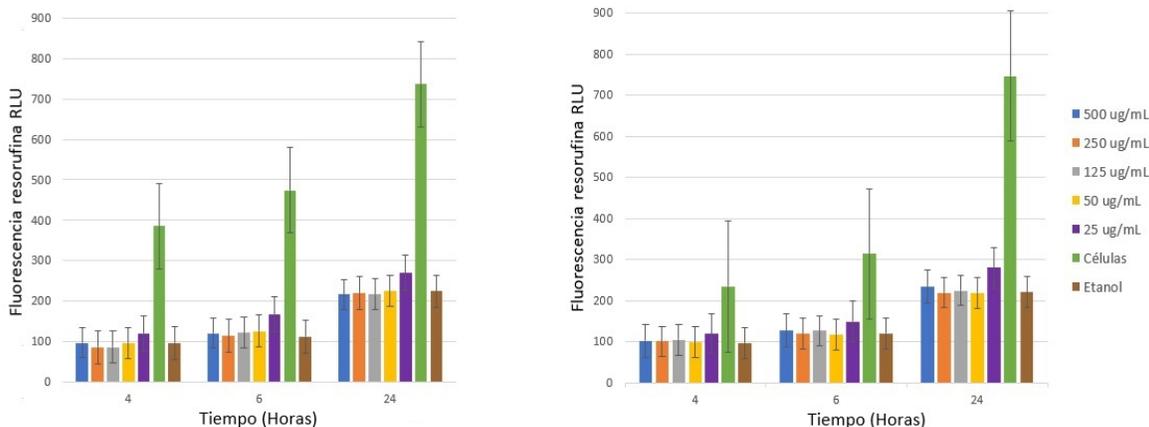


Figura 4.17: Viabilidad celular después del tratamiento con curcumina (12 horas)

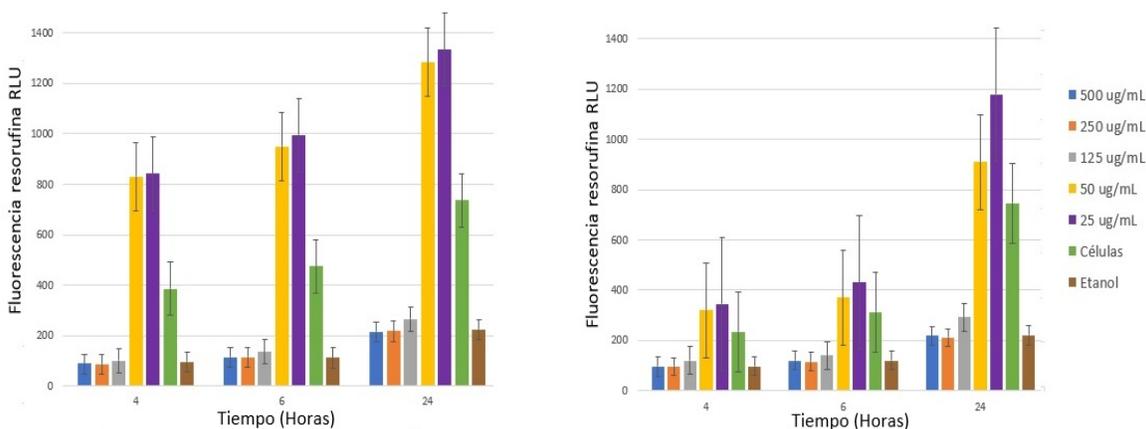


Figura 4.18: Viabilidad celular después del tratamiento con CDs funcionalizados con curcumina (12 horas)

En las Figuras 4.13-4.18 se muestran los resultados de la fluorescencia de resorufina, a las cinco concentraciones usadas además de las células control que se midieron sin añadir ningún tipo de tratamiento y el control de etanol. La viabilidad celular en el control de etanol, en todas las gráficas mostradas, es similar a los resultados de viabilidad de las células tratadas a las más altas concentraciones de dispersión en etanol. Al no tener ningún tratamiento de CDs o curcumina en el etanol y obtener niveles inferiores al 15% en las células incubadas por 6 horas, y al 30% en las incubadas por 12 horas; puede indicar que probablemente los resultados de viabilidad celular se vieron afectados por el solvente usado para la dispersión, ya que el etanol puede afectar disminuyendo las propiedades de no toxicidad de los puntos de carbono y la curcumina.

En los ensayos donde se incubaron las células con el tratamiento por 6 horas (Figuras 4.13, 4.14, 4.15) se observa que en la menor concentración, correspondiente a $25\mu g/mL$, su viabilidad celular es similar al de las células no tratadas, mientras que en las mayores

concentraciones la viabilidad es muy baja. En las Figuras 4.14 y 4.15 correspondientes al tratamiento de curcumina y CDs funcionalizados, se observa una mayor viabilidad celular que en los CDs (Figura 4.13) en la concentración de $500 \mu\text{g}/\text{mL}$, tanto para la línea 3T3 como para la línea MCF-7.

En las Figuras 4.16 a 4.18, se observan los resultados obtenidos de la viabilidad celular después de incubar las células y los tratamientos nombrados por 12 horas; se observan similitudes de viabilidad entre las dos líneas celulares, tanto con CDs, curcumina y CDs funcionalizados. Sin embargo, en la Figura 4.18 correspondiente a los CDs funcionalizados con curcumina, se observa una mayor viabilidad celular en la concentración de $25\mu\text{g}/\text{mL}$, al compararlos con los resultados obtenidos con CDs y la curcumina, en ambas líneas celulares.

Se pudo observar que existe un error importante al analizar los resultados del triplicado de pozos. Ya que este solía variar considerablemente, principalmente en las células no tratadas. Además se observó una tendencia en donde los pozos de triplicado de las células no tratadas más cercanas al etanol generalmente se obtenía una menor viabilidad celular que en los pozos más lejanos.

Las toxicidades altas en las células con tratamientos de curcumina y CDs, puede deberse al solvente usado para la dispersión de los puntos. Además, se observa como la viabilidad es mayor en los tratamientos incubados por 6 horas en comparación con los de 12 horas; esto, incluyendo las células no tratadas, también se observa que al pasar del tiempo la viabilidad disminuye, es decir, que en la incubación por más tiempo murieron más células.

Con el fin de hacer una comparación entre las líneas celulares utilizadas, se realiza una prueba t-student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, en donde la hipótesis nula corresponde a que existen diferencias significativas en la viabilidad celular de las células 3T3 en comparación con las células MCF-7, en las tres sustancias analizadas. Para esto, se elige la concentración de $25\mu\text{g}/\text{mL}$ ya que es donde más se observan diferencias significativas entre sustancias y se toma un intervalo de confianza correspondiente al 95 %. Para los CDs, curcumina y CDs funcionalizados incubados por 6 horas, se obtiene un p-valor de 0.276, 0.500 y 0.789 correspondientemente, en los tres casos, rechazando la hipótesis nula. A su vez, se comparan los resultados entre líneas celulares de los CDs, curcumina y CDs funcionalizados incubados por 12 horas, se obtiene un p-valor de 0.282, 0.508 y 0.898 respectivamente, en los tres casos, rechazando la hipótesis nula.

La segunda hipótesis se basa en que existen diferencias significativas del porcentaje de viabilidad celular entre los puntos de carbono sin funcionalizar y los puntos de carbono funcionalizados. En donde se toma un intervalo de confianza del 95 %; para realizar las pruebas, se analiza la menor concentración, tanto para los CDs y CDs

funcionalizados. En el caso de la línea celular 3T3 en la incubación por 6 horas, se obtuvo un p-valor de 0.380, rechazando la hipótesis nula; mientras que en la incubación por 12 horas se obtuvo un p-valor de 0,029 en donde no se rechaza la hipótesis nula para los fibroblastos. Por otro lado, en las células tumorales MCF-7 en la incubación por 6 horas, se obtuvo un p-valor de 0.635, e incubación por 12 horas un p-valor de 0.224 rechazando la hipótesis nula en ambos casos.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados para el proyecto, se logra desarrollar una nanoplateforma basada en puntos de carbono funcionalizados con curcumina, basándose en los resultados espectrales mostrados; y su vez la síntesis y caracterización de CDs con una emisión entre los 400 y 600 nm. También, se desarrolló el protocolo para la funcionalización de curcumina en los puntos de carbono, variando las concentraciones y tomando en cuenta cada uno de los resultados obtenidos.

Finalmente, se evaluó la citotoxicidad de los CD sobre dos líneas celulares, tomando en cuenta cómo se vieron afectadas las células de cáncer de seno frente a células sanas. El uso de etanol, puede haber afectado las propiedades de no toxicidad de los puntos de carbono y la curcumina, teniendo un impacto significativo en los resultados de viabilidad celular, tanto en las células tumorales MCF-7 como en los fibroblastos 3T3.

Capítulo 6

RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

Con este proyecto se llevó a cabo la etapa de síntesis de puntos de carbono funcionalizados con curcumina. Posteriormente, se seguirá realizando el proyecto Capital Semilla, en donde la nanoplataforma sintetizada y funcionalizada, podrá ser almacenada en un hidrogel electrorresponsivo con el fin de actuar como fármaco para personas diagnosticadas con cáncer de seno.

Se propone realizar más pruebas para la evaluación de la nanoplataforma. A la fecha de este documento, se enviaron las muestras para la toma de microscopía de fuerza atómica con el fin de analizar la distribución del tamaño de las nanopartículas, se está a la espera de la realización de las mediciones. Y finalmente la toma de potencial zeta para los CDs funcionalizados.

Los resultados hallados contribuyen para realizar ensayos a futuro con curcumina modificada para poder experimentar con otro tipo de solvente y de esta forma, reevaluar la citotoxicidad sin ningún tipo de afectación. A mediano plazo, también se busca realizar más ensayos, para minimizar el error que pudo existir en las pruebas de viabilidad celular.

Bibliografía

- [1] *Día mundial contra el cáncer 2021*. OMS Organización mundial de la salud, 2021.
- [2] M. P. J. Herrera, *CANCER DE MAMA Y CUELLO UTERINO*. Instituto Nacional de Salud, 2018.
- [3] E. Tiempo, «¿Cuántas muertes se registran en Colombia al año por cáncer de seno?,» 2018.
- [4] A. H. Ana Isabel y R.-P. Olga Palomino, «Últimos avances en las aplicaciones terapéuticas de Curcuma longa L. y sus componentes aislados,» 2018.
- [5] M. Adrienne G. Waks MD; Eric P. Winer, «Breast Cancer Treatment,» 2019.
- [6] C. Wittekind y M. Neid, «Cancer invasion and metastasis,» *Oncology*, vol. 69, págs. 14-16, 2005. DOI: 10.1159/000086626.
- [7] A. Márquez, Y. V, B. Balcázar y F. Ancízar Aristizábal, «Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética. Revista Colombiana de Biotecnología,» vol. 18(1), 2016. DOI: doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18.
- [8] «Efectos secundarios de la quimioterapia,» *American Cancer Society*,
- [9] «Terapia hormonal para tratar el cáncer,» *Instituto Nacional del cáncer*,
- [10] «Pros y contras de la inmunoterapia para combatir un cáncer,» *NIH MedlinePlus*,
- [11] S. J. Hewlings y D. S. Kalman, «Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health.,» *Foods (Basel, Switzerland)*, vol. 6(10), págs. 14-16, 2017. DOI: 10.3390/foods6100092.
- [12] S. Mondal, S. Ghosh y S. P. Moulik, «Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study,» *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 158, págs. 212-218, 2016, ISSN: 1011-1344. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>.
- [13] R. Jelinek, *Carbon Quantum Dots. Carbon Nanostructures*. Springer, 2017.
- [14] C.-L. Shen, Q. Lou, K.-K. Liu, L. Dong y C.-X. Shan, «Chemiluminescent carbon dots: Synthesis, properties, and applications,» *Nano Today*, vol. 35, pág. 100954, 2020, ISSN: 1748-0132. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100954>.

- [15] M. Zohre y H. Salehiniya, «Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world,» vol. 11, págs. 151-164, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>.
- [16] M. J. D. C. M. María Teresa Martín de Civetta, *Carcinogénesis*. ResearchGate, 2011.
- [17] J. Y. Tsang y G. M. Tse, «Molecular Classification of Breast Cancer,» vol. 27, n.º 1, 27-35(9), 2020. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000232>.
- [18] K. I. Priyadarsini, «The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent,» *Molecules*, vol. 19, n.º 12, págs. 20 091-20 112, 2014, ISSN: 1420-3049. DOI: [10.3390/molecules191220091](https://doi.org/10.3390/molecules191220091).
- [19] F. M. C. M. Andrés Hernán Cardona Echeverry Diego Fernando Uribe Yunda, «Actividad antitumoral de la curcumina asociada a la regulación de mecanismos epigenéticos: implicaciones en la vía Wnt/-catenina,» 2016.
- [20] D. Liu y Z. Chen., «The Effect of Curcumin on Breast Cancer Cells,» vol. 16(2), págs. 133-137, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.2.133>.
- [21] M. Liu, «Optical Properties of Carbon Dots: A Review,» *Universal Wiser*, 2020.
- [22] C. Xia, S. Zhu, T. Feng, M. Yang y B. Yang, «Evolution and Synthesis of Carbon Dots: From Carbon Dots to Carbonized Polymer Dots,» *Advanced Science*, vol. 6, n.º 23, pág. 1901316, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/adv.201901316>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adv.201901316>.
- [23] L. R. Liu. Junjun y B. Yang, «Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications,» vol. 6, págs. 2179-2195, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01306>.
- [24] D. Pavia, G. Lampman, G. Kriz y J. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning, 2008, ISBN: 9780495114789.
- [25] C. Daqin, W. Weiwei, Y. Yongjun, Z. Yang, W. Zhongyi y H. Ping, «Intense multi-state visible absorption and full-color luminescence of nitrogen-doped carbon quantum dots for blue-light-excitable solid-state-lighting,» *J. Mater. and Chem. C*, vol. 4, págs. 9027-9035, 38 2016. DOI: [10.1039/C6TC02853E](https://doi.org/10.1039/C6TC02853E).
- [26] D. M. Sudolská M y S. S, «Nature of absorption bands in oxygen-functionalized graphitic carbon dots,» vol. 119(23), págs. 13 369-13 373, 2015.
- [27] C.-L. Shen, Q. Lou, K.-K. Liu, L. Dong y C.-X. Shan, «Chemiluminescent carbon dots: Synthesis, properties, and applications,» *Nano Today*, vol. 35, pág. 100 954, 2020, ISSN: 1748-0132. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100954>.
- [28] A. S. P. Bhartiya, «Carbon dots: Chemistry, properties and applications,» 2018.

- [29] J. D. C. Geovo, «SÍNTESIS SOLVOTERMAL Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO POLÍMERO DE COORDINACION A PARTIR DEL LIGANDO ÁCIDO 3-HIDROXI-2,7- NAFTALENODISULFONATO CON ALUMINIO,» 28 de 2020.
- [30] R. Briseño, «Síntesis solvotermal y caracterización de polvos nanoestructurados de Titanato de Bario,» Tesis doct., feb. de 2015. DOI: 10.13140/RG.2.1.2912.0481.
- [31] T. X. Zhang X y H. Y., «Blue/yellow emissive carbon dots coupled with curcumin: a hybrid sensor toward fluorescence turn-on detection of fluoride ion,» *Journal of hazardous materials. PubMed*, vol. 8, n.º 411, pág. 125184, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125184>.
- [32] J. M. C. R. G. C. P. I. E. M. Merlín y E. S. M. Martínez, «La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama,» vol. 12, n.º 2, 2018, ISSN: 1870-9095.
- [33] J. Maldonado Cubas, R. Casañas Pimentel, M. Merlín y E. San Martín-Martínez, «La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama,» vol. 12, 1:7, mayo de 2018.
- [34] T. V. M. A y A. AM, «Journal of Chronotherapy and Drug Delivery Measurement Techniques and Pharmaceutical Applications of Zeta Potential A Review,» *PubMed*, vol. 46(6), págs. 502-520, 2016. DOI: 10.1080/10408347.2016.1157013.
- [35] J. Schmitt y H.-C. Flemming, «FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis,» *International Biodeterioration Biodegradation*, vol. 41, n.º 1, págs. 1-11, 1998, ISSN: 0964-8305. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)80002-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)80002-4).
- [36] «Potencial Zeta,»
- [37] E. S. M. M. J. Batalla Mayoral A. Cuadros Moreno, «Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas,» *Dialnet*, vol. 8, n.º 4, 2014, ISSN: 1870-9095.
- [38] L. Escobar M y F. A. Aristizebal G, «Aplicacion de un metodo fluorometrico para evaluar la proliferacion celular en lineas celulares tumorales,» *Vitae*, vol. 17, págs. 173-180, mayo de 2010, ISSN: 0121-4004.
- [39] W. McMillian M.K. Li L.Parker J.B.Patel L.Zhong Z.Gunnett J.W. Powers y M. Johnson, «An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells,» vol. 18, págs. 1573-6822, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1015559603643>.
- [40] «Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR),» págs. 1-7,
- [41] S. Nurettin, S. S. S., S. Mehtap y S. Coskun, «Nitrogen and Sulfur Doped Carbon Dots from Amino Acids for Potential Biomedical Applications,» vol. 29, págs. 1191-1200, 2019.