

**Desarrollo de una nano-plataforma basada en puntos carbono dopados con boro para su potencial aplicación en la terapia contra el cáncer por captura neutrónica**

**Sergio Alejandro Barragán Sicua**

**Trabajo Dirigido**

**Tutores**

**Diana Consuelo Rodríguez Burbano PhD  
Alejandro Oyono Ondo Méndez PhD**



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

## Agradecimientos

Agradezco a mi madre, Carmen Elisa Sicua, por apoyarme incondicionalmente y siempre creer en mí incluso cuando nadie más lo hizo, además de enseñarme a ser mejor persona cada día. A mi hermana, Danna Fernanda Soriano Sicua, por ser mi compañía desde nuestra infancia y compartir conmigo cada triunfo y cada oportunidad de aprendizaje. A mi abuela, Paulina Sicua Mora, quien siempre ha estado para mí y me inspira a crecer diariamente y dar lo mejor. Este logro es posible gracias a mi familia.

Un agradecimiento especial al ministerio de ciencias, tecnología e innovación, MinCiencias, por darme la oportunidad de participar en la convocatoria 874 como joven talento, esto ha significado mucho para mi carrera y me ha formado como investigador.

Agradezco a mis compañeros y amigos con los que compartí momentos únicos durante toda la carrera, me quedo con muchos aprendizajes y recuerdos que hicieron de estos años algo inigualable.

Agradezco los directores de este trabajo, Diana Consuelo Rodríguez Burbano y Alejandro Oyono Ondo Méndez, que hicieron posible mi participación en la convocatoria 874 de MinCiencias y me han guiado de forma integral en cada etapa de este gran proyecto. Gracias por siempre separar un espacio para resolver mis dudas, por compartir sus conocimientos y vocación por el trabajo que realizan. A la unidad de Bioquímica de la universidad del Rosario por permitirme trabajar en su laboratorio y hacer uso de sus reactivos siempre que lo necesité. A Juan Guarín, Natalia Ochoa, Sonia Perilla y las demás personas con quienes compartí en los laboratorios de bioquímica y bioinstrumentación por ofrecerme su ayuda en todo momento.

Finalmente, les quiero agradecer a todos los profesores de la Universidad del Rosario y la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito por sus enseñanzas que me formaron como ingeniero biomédico.

## Resumen

El cáncer es una de las enfermedades con mayor tasa de mortalidad a nivel global. Dentro de los diferentes tipos de tratamientos que son utilizados para tratar esta enfermedad, la radioterapia se destaca por usar radiación ionizante y así, destruir las células cancerosas. El tumor se irradia con fotones de rayos X en la radioterapia convencional, atacando directa e indirectamente al ADN, y por consiguiente se promueve la muerte celular. Sin embargo, gran cantidad de células sanas son afectadas al aplicar la radioterapia convencional, pues gran parte de la radiación también genera daños en tejido sano circundante. Por otro lado, la terapia por captura neutrónica utiliza neutrones que no son capaces de generar especies reactivas, con la misma capacidad que lo hacen los fotones, adicionalmente, el rango de alcance de las partículas encargadas de dañar el ADN es de 4 a 14  $\mu\text{m}$ , lo que asegura que la reacción se dé únicamente al interior de las células a las cuales va dirigida la terapia. Sin embargo, se debe utilizar un compuesto capaz de capturar neutrones y ocasionar una reacción que genere partículas capaces de dañar el ADN. Compuestos con boro han sido los principales fármacos aplicados como radiosensibilizantes en la terapia por haz de neutrones. Esta técnica se conoce como terapia por captura neutrónica de boro (BNCT, por sus siglas en inglés), y ha demostrado tener alto potencial para combatir los tumores, principalmente, los inoperables por accesibilidad. Sin embargo, sus costos son elevados y su efectividad puede mejorar si se logra obtener una mayor concentración de boro al interior de las células cancerosas. Recientes estudios han demostrado que diferentes tipos de nanopartículas como los puntos de carbono, son candidatos prometedores en aplicaciones para combatir el cáncer debido a sus propiedades fisicoquímicas. A su vez, los puntos de carbono tienen alta capacidad de carga comparados con diferentes fármacos que se usan en la actualidad.

En este proyecto se evalúan diferentes estrategias para la síntesis de nanopartículas basadas en carbono y dopadas con boro. El desarrollo de este proyecto busca establecer un punto de partida en la investigación de una potencial plataforma radio-sensibilizante, para su aplicación en la radioterapia por haz de neutrones, con el potencial de aumentar la concentración de boro en las células cancerosas comparada con los fármacos que se usan en la actualidad. Los puntos de carbono fueron sintetizados por método microondas, optimizando parámetros como precursores de carbono orgánicos y la temperatura de reacción. Las nanoestructuras obtenidas fueron caracterizadas por potencial  $\zeta$ , siendo este  $-7.3\text{mV}\pm 3\text{mV}$  que indica la presencia de átomos con pares de electrones libres en la superficie de la nanoestructura; FTIR, confirmando la presencia de grupos funcionales asociados a los tipos de enlace OH, NH, C=CH, CH y CN en la superficie; y espectroscopía UV-Vis, determinando las bandas de absorción entre 200 nm y 300 nm para los puntos dopados correspondientes a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  y bandas de absorción de 200 nm a 500 nm para los puntos sin dopar con boro, la banda de emisión está comprendida entre 350 nm y 650 nm bajo excitación con lámpara de deuterio. Se realizó una evaluación preliminar de la citotoxicidad de estas nanoestructuras a partir de las evaluaciones de la viabilidad celular mediante el método MTT. Esta prueba sugiere biocompatibilidad en los puntos de carbono, pues la viabilidad celular en todos los casos fue mayor a 80 %.

Este estudio es de gran importancia, pues es un punto de partida para continuar con la investigación en nanoplataformas radio-sensibilizantes que permitan aumentar la eficacia de técnicas como BNCT para tratar el cáncer.

# Índice general

Agradecimientos . . . . .	I
Resumen . . . . .	II
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.2. Proyecto relacionado . . . . .	2
1.3. Objetivos . . . . .	3
1.3.1. General . . . . .	3
1.3.2. Específicos . . . . .	3
<b>2. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>4</b>
2.1. Radioterapia como tratamiento . . . . .	4
2.2. Retos de la radioterapia convencional . . . . .	4
2.3. Terapia por captura neutrónica . . . . .	5
2.4. Retos de la terapia por captura neutrónica . . . . .	6
2.5. Nanopartículas en aplicaciones biomédicas . . . . .	6
2.6. Puntos de carbono en BNCT . . . . .	7
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>9</b>
3.1. Síntesis de los puntos de carbono sin dopar . . . . .	10
3.2. Síntesis de los puntos de carbono dopados con boro . . . . .	11
3.3. Caracterización de puntos de carbono dopados y no dopados con boro . . . . .	12
3.3.1. Espectroscopía UV-Vis . . . . .	12
3.3.2. Espectroscopía de Fluorescencia . . . . .	12
3.3.3. Potencial Zeta ( $\zeta$ ) . . . . .	12
3.3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier . . . . .	12
3.4. Evaluación de la citotoxicidad . . . . .	12
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>14</b>
4.1. Caracterización de los puntos de carbono sin dopar con boro . . . . .	14
4.2. Caracterización de los puntos de carbono dopados con boro . . . . .	23
4.3. Ensayos de citotoxicidad . . . . .	26
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>28</b>
<b>6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS</b>	<b>29</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>30</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>32</b>

# Índice de figuras

2.1. Reacción nuclear de captura neutrónica utilizada en la BNCT, liberación de partículas $\alpha$ , ${}^7\text{Li}$ y fotones de energía $\gamma$ . . . . .	5
3.1. Diagrama de flujo de las etapas realizadas en el desarrollo de este proyecto . . .	9
3.2. Aminoácidos utilizados como precursores de los puntos de carbono. A) L- isoleucina, B) L-glutamina, C) L-histidina, D) L-arginina . . . . .	10
3.3. Reactor microondas Monowave 50, curvas temperatura y presión en función del tiempo. Reacción de ácido cítrico y L-histidina a 210°C . . . . .	11
3.4. Purificación mediante técnica de cromatografía por columnas, separación de la solución en las diferentes especies que la componen para conservar específicamente los puntos de carbono con fluoróforos . . . . .	11
4.1. Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados con ácido cítrico y L- isoleucina en función de las temperaturas evaluadas . . . . .	15
4.2. Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados con ácido cítrico y L- glutamina en función de las temperaturas evaluadas . . . . .	15
4.3. Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados con ácido cítrico y L- histidina en función de las temperaturas evaluadas . . . . .	16
4.4. Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados con ácido cítrico y L- arginina en función de las temperaturas evaluadas . . . . .	17
4.5. Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados a 200°C en función de los precursores ácido cítrico y L-aminoácidos . . . . .	18
4.6. Espectros de emisión con excitación monocromática de nanopartículas sintetizadas con: A) ácido cítrico y L-isoleucina. B) ácido cítrico y L-glutamina. C) ácido cítrico y L-histidina. D) ácido cítrico y L-arginina . . . . .	19
4.7. Espectros de emisión de las nanopartículas sintetizadas a partir de cada par ácido cítrico y L-aminoácido, fluorescencia a partir de excitación monocromática a 440 nm . . . . .	20
4.8. Espectros de emisión de las nanopartículas sintetizadas a partir de cada par ácido cítrico y L-aminoácido, excitación con lámpara de deuterio . . . . .	20
4.9. Gráfica de espectroscopía IR para puntos de carbono no dopados . . . . .	21
4.10. Estructura propuesta de las nanopartículas sin dopar con boro . . . . .	22
4.11. Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico y L-histidina y ácido bórico a diferentes concentraciones dispersos en agua destilada a 1 mg/mL . . . . .	23

4.12. Espectros de emisión puntos de carbono dopados con boro a diferentes concen- traciones. A una concentración de 1 mg/mL en agua destilada, se midieron los espectros de emisión al excitar las muestras con lámpara de deuterio . . . . .	24
4.13. Gráfica de espectroscopía IR para puntos de carbono no dopados . . . . .	24
4.14. Estructura propuesta de las nanopartículas dopadas con boro . . . . .	25
4.15. Resultados del ensayo MTT con los puntos de carbono no dopados con boro . .	26

# Índice de tablas

4.1. Frecuencias de vibración de las bandas evidenciadas en el espectro infrarrojo de los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico y L-histidina. . .	22
4.2. Frecuencias de vibración de las bandas evidenciadas en el espectro infrarrojo de los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico, L-histidina y ácido bórico . . . . .	25

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Motivación

El cáncer es una de las mayores causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo con el observatorio global de cáncer (GCO, por sus siglas en inglés), se registraron 19.292.789 nuevos casos de cáncer en todo el mundo y 101.839 en Colombia durante el 2020. Se estima que, para el mismo año, 9.958.133 fallecieron debido a esta enfermedad [1].

Múltiples estrategias son utilizadas para tratar el cáncer. Entre estas, las más comunes son: la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia; dependiendo el tipo de tumor y su grado de avance, el médico puede sugerir practicar alguna de las estrategias mencionadas o combinaciones de estas. La radioterapia es un tratamiento en el que se usan altas dosis de radiación para eliminar las células cancerosas al dañar su ADN de manera irreparable evitando su división o generando su muerte [2]. Esta técnica se ha aplicado como tratamiento para atacar tumores que se encuentran en zonas inoperables y también, como un complemento a la cirugía [3][4].

No obstante, los tratamientos con radioterapia convencional presentan limitaciones en cuanto a su efectividad pues, en muchos casos, los efectos secundarios afectan la calidad de vida de los pacientes dado que gran cantidad de células sanas se ven afectadas por la radiación. Adicionalmente, los costos en los fármacos empleados en la radioterapia convencional son elevados y no son accesibles para todas las personas [3]. Por esta razón, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan mejores resultados en el tratamiento del cáncer, aumentando la efectividad, reduciendo los efectos secundarios y que a su vez sean accesibles económicamente [5].

Una alternativa a la radioterapia convencional, es la terapia por captura de neutrones por boro (BNCT), donde se aprovecha la capacidad del boro-10 (B) para capturar neutrones. Esto para generar partículas con alta transferencia lineal de energía capaces de causar daños en el ADN, por lo que se busca transportar, selectivamente, átomos de B al interior de las células cancerosas. Valiéndose del hecho que las células cancerosas tienen un alto metabolismo de aminoácidos esenciales, el B se conjuga a uno de estos aminoácidos, generalmente L-fenilalanina, compuesto conocido como BPA [6]. El BPA se inyecta al torrente sanguíneo y da paso a su acumulación en las células cancerosas. Una vez acumulado, el área tumoral se irradia con neutrones para que se genere una reacción nuclear. Como resultado de dicha reacción, se da

paso a la liberación de partículas  $\alpha$ , el isótopo  $^7\text{Li}$  y radiación  $\gamma$ . Estas partículas generan el rompimiento de la doble hélice del ADN al reaccionar con los nucleótidos, destruyendo sus enlaces de forma irreversible e induciendo la muerte celular [4][6].

La BNCT se propuso hace más de 80 años [7]. Sin embargo, en la actualidad sigue siendo un reto aumentar la selectividad de los compuestos con B para entrar en las células cancerosas y, a su vez, incrementar la concentración de B dentro de esas células para mejorar la efectividad del tratamiento [4]. Actualmente, los compuestos que han demostrado mejores resultados son el boro-fenilalanina (BPA) y sulfidrilborano (Sodium Boroncaptate BSH) [8]. Aun así, la efectividad del tratamiento puede mejorar, esto porque sólo hay un átomo de B por molécula de BPA o BHS. Es por esto que es necesario aumentar la concentración de B que ingresa selectivamente a las células cancerosas para potencializar el efecto de la BNCT [4].

El desarrollo de nuevos aceleradores capaces de liberar haces de neutrones más potentes [9] y la aparición de nanopartículas capaces de liberar medicamentos controladamente, han impulsado la investigación de nuevas técnicas para la liberación de fármacos con B en células tumorales de forma efectiva [10]. Recientes estudios han demostrado que diferentes tipos de nanopartículas como los puntos de carbono, son candidatos prometedores en aplicaciones para combatir el cáncer debido a sus propiedades fisicoquímicas [11].

Los puntos de carbono son nanoestructuras fluorescentes y cero-dimensionales, de tamaño usualmente menor a 10 nm. En la literatura, estos nanomateriales se destacan por ser biocompatibles, poseer una alta capacidad de carga para su integración con otros compuestos químicos y medicamentos, fluorescencia modificable y bajo costo de síntesis [12]. Numerosos estudios demuestran el potencial de los puntos de carbono para terapia y diagnóstico del cáncer [13].

Este estudio tiene como objetivo la síntesis y caracterización de una nano-plataforma basada en puntos de carbono dopados con boro como potencial agente radiosensibilizante en BNCT con una evaluación preliminar de su citotoxicidad.

## 1.2 Proyecto relacionado

Esta investigación hace parte del proyecto “Estudios metabólicos de cáncer de mama, gliomas y tiroides: una aproximación a la identificación de biomarcadores de riesgo y a la intervención con nanotecnología” de la convocatoria MinCiencias 874 para el fortalecimiento de proyectos en ciencias de la salud con talento joven e impacto regional.

La ejecución de este proyecto es liderada por el grupo de Investigación Clínica de la Universidad del Rosario en todas sus etapas. Las demás instituciones de educación superior involucradas participan en el levantamiento de información proveniente de los análisis bioquímicos y simulaciones matemáticas propuestas, así como el acompañamiento teórico mediante la participación en la red de conocimiento y aprendizaje que surge de este macroproyecto. Las instituciones hospitalarias públicas y privadas participan como centros principales para la inclusión de sujetos de investigación, aplicación de instrumentos de recolección de datos y recolección de muestras biológicas, así como los ensayos técnicos de radiación *in-vitro* de los

cultivos celulares. La articulación de todos estos actores y aliados estratégicos en este proyecto, constituye una ocasión única para vincular y brindar a jóvenes talento profesionales y de pregrado la oportunidad de nutrir su formación personal y profesional con la participación en una comunidad de aprendizaje y red de conocimientos construida con la experiencia de instituciones y profesionales del más alto nivel, de diferentes disciplinas del conocimiento, en distintas situaciones para el desarrollo de actividades y con múltiples escenarios para la aplicación de conocimientos.

El objetivo general del proyecto marco es describir los perfiles metabolómicos séricos o tisulares de pacientes con diagnóstico y en riesgo bajo, intermedio y alto de cáncer de mama, cerebral y tiroideo, y diseñar nanoplataformas para la sensibilización de tumores a la radioterapia basada en fotones y neutrones y a la quimioterapia.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1. General**

Desarrollar una nanoplataforma basada en puntos de carbono dopados con boro como un potencial agente radiosensibilizante en radioterapia por captura neutrónica.

#### **1.3.2. Específicos**

1. Sintetizar y caracterizar puntos de carbono con diferentes precursores para evaluar sus propiedades ópticas.
2. Optimizar el procedimiento de síntesis para obtener puntos de carbono dopados con Boro.
3. Evaluar la citotoxicidad en los puntos de carbono sintetizados.

## Capítulo 2

# ESTADO DEL ARTE

### 2.1 Radioterapia como tratamiento

La radioterapia es uno de los tratamientos más utilizados en oncología. Este consiste en emplear distintos tipos de radiación como rayos X, rayos gamma, o partículas como protones o neutrones, en particular o en conjunto con cirugía o quimioterapia, para atacar, reducir y destruir los tumores. En la radioterapia convencional se emplean fotones de rayos X para ocasionar daños en el ADN y así, acabar con los tumores, generando un daño directo o indirecto [2].

El efecto directo, los haces de rayos X que inciden en las células interactúan con las moléculas de ADN ionizándolas y causando daños irreversibles [14]. En la acción indirecta, la transferencia de energía de la radiación incidente a los átomos presentes en el lugar de irradiación provoca el decaimiento de tales átomos a especies de radicales libres. Un radical libre se define como un átomo neutro, eléctricamente, con un ‘hueco’ o electrón no ocupado en la posición orbital. Los radicales libres son especies electrofílicas y altamente reactivas. Teniendo presente que el agua, es la especie molecular que se encuentra en mayor cantidad en los sistemas biológicos, es usualmente el intermediario entre la formación de radicales libres y su propagación. La interacción del agua con la radiación resulta en la formación de varias moléculas tóxicas, entre estas, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el  $H_2O_2$  puede transmitirse de molécula a molécula causando daño en cada encuentro, generando un efecto en cadena, así, puede ocurrir un efecto acumulativo mayor que la simple ionización o ruptura de uniones. Las especies de  $H_2O_2$  son capaces de llegar al núcleo de la célula y generar daños graves en el ADN. El efecto indirecto es generalmente el fenómeno con mayor impacto en tratamientos de radioterapia [15].

Más de la mitad de las personas que padecen cáncer reciben radioterapia como parte del tratamiento oncológico propuesto por los especialistas. La radioterapia es uno de los tratamientos que más emplean los médicos para tratar el cáncer [16].

### 2.2 Retos de la radioterapia convencional

El principal objetivo de la radioterapia es hacer incidir dosis terapéuticas de radiación ionizante en el tumor sin exceder la tolerancia en los tejidos sanos circundantes. Para algunos

tipos de tumores radiorresistentes, como son los gliomas, la radioterapia convencional sirve sólo para retardar y disminuir el tamaño del tumor sin destruirlo por completo, ya que las dosis de radiación necesarias para producir su erradicación son demasiado altas y así como eliminan el tumor, también ocasionan la muerte de los tejidos vecinos sanos. Esta es una gran limitación hablando de los tumores cerebrales. De la misma forma, el tratamiento de tumores próximos a un órgano altamente sensible a los efectos de la radiación, como la médula espinal, se ve severamente limitado. Para dimensionar la importancia de desarrollar mejoras en la radioterapia, la sobrevivencia de pacientes con metástasis cerebral después de ser sometidos a tratamientos con radioterapia no supera los 10 meses [17].

Se ha confirmado la necesidad de administrar dosis con una gran exactitud, sobre todo cuando se aplican técnicas con escalamiento de dosis, es decir, dosis superiores a las definidas como estándares en la radioterapia convencional. Esto porque gran parte de la radiación llega a tejidos sanos, provocando serios efectos secundarios [18]. De esta forma, es necesario focalizar la energía de la radiación específicamente en los tumores.

### 2.3 Terapia por captura neutrónica

Una de las desventajas de la radioterapia convencional es el daño de tejidos sanos por la radiación que llega a ellos. La terapia por captura neutrónica de boro (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) es una modalidad de tratamiento que permite destruir selectivamente células tumorales y que a su vez, genera un daño muy reducido al tejido normal circundante, comparado con el de la radioterapia convencional [19]. Esta técnica se basa en reacciones de captura neutrónica que conllevan a una posterior fisión. Luego de suministrar compuestos borados, que contengan boro-10 (B) un isótopo natural no radiactivo del boro, se irradia con neutrones térmicos de baja energía, usualmente menor a 0.4 eV para producir isótopos altamente inestables de boro-11, que decae liberando una partícula  $\alpha$  ( ${}^4\text{He}$ ) y un núcleo de  ${}^7\text{Li}$  (figura 2.1). Estas partículas generan un daño irreversible en el ADN, induciendo a la muerte celular por apoptosis. Ya que estas partículas de alta Transferencia de energía líneal (LET) tienen una distancia de alcance limitada en el tejido que va de 5  $\mu\text{m}$  a 9  $\mu\text{m}$ , sus efectos destructivos son limitados a las células que contienen boro [6].



Figura 2.1: Reacción nuclear de captura neutrónica utilizada en la BNCT, liberación de partículas  $\alpha$ ,  ${}^7\text{Li}$  y fotones de energía  $\gamma$

Para que este tratamiento sea efectivo, se deben cumplir una serie de condiciones:

- La concentración de boro al interior del tumor en el momento de la irradiación debe estar en el rango de 15  $\mu\text{g}$  a 25  $\mu\text{g}$  por gramo de tejido.
- El boro debe acumularse al menos tres veces más en el tumor que en la sangre y que en los tejidos sanos circundantes.
- El compuesto borado a usar no debe ser tóxico.

A pesar de que numerosos compuestos de boro se han sintetizado, hasta ahora sólo dos de ellos han sido utilizados en ensayos clínicos, el di-sodio-undecahidro-mercapto-closododecarborato (BSH) y con más frecuencia, la p-hidroxiboro-fenilalanina (BPA) [20].

En la actualidad se llevan a cabo ensayos clínicos de BNCT en diferentes partes del mundo ya que es una técnica que surgió hace más de 80 años como una muy buena alternativa a la radioterapia convencional, pero debido a los bajos recursos tecnológicos de la época, esta técnica no se siguió estudiando [6]. Sin embargo, el avance tecnológico en los desarrollos de fármacos y en el desarrollo de aceleradores más potentes han impulsado el estudio de esta técnica nuevamente. Algunos de los países en donde hay ensayos clínicos en curso son: Japón, Finlandia, Estados Unidos, Taiwán, Países bajos, Alemania, Italia, Argentina, República Checa y Suecia [20].

## 2.4 Retos de la terapia por captura neutrónica

Después de décadas de investigación, la terapia por captura neutrónica ha demostrado ser altamente efectiva para tratar el cáncer, pero existe una fuerte necesidad de optimizar el uso de BPA y BSH o desarrollar nuevos compuestos borados o transportadores de boro que puedan mejorar la selectividad a las células tumorales y la micro distribución celular, especialmente para diferentes subpoblaciones de células cancerosas. A pesar de que la BNCT no está disponible en muchas regiones, tiene el potencial de volverse un éxito en el campo de la oncología en un futuro cercano [4][20].

En Colombia, se dispone de un reactor nuclear en el Servicio Geológico Colombiano, este reactor puede ser adaptado para la investigación y aplicación de BNCT. Esto le permitiría al país ser uno de los pocos con la capacidad de desarrollar e implementar esta prometedora alternativa a la radioterapia convencional.

## 2.5 Nanopartículas en aplicaciones biomédicas

Las nanopartículas se definen como partículas sólidas y coloidales, con un rango de tamaño entre 10 y 1000 nm. Las nanopartículas, comparadas con partículas de mayor tamaño, ofrecen algunos beneficios como mayor relación área superficial-volumen. Debido a su diversidad de propiedades fisicoquímicas, en los últimos años ha crecido el interés en darles a estas usos en diferentes aplicaciones biomédicas como liberación controlada de fármacos, *bioimaging*, biomarcadores, biosensores y liberación de genes ('gene delivery') [21].

Los puntos de carbono son un tipo de nanopartículas basadas en carbono, con tamaño menor a 10 nm, de fácil síntesis ya que se pueden obtener a partir de precursores orgánicos y de bajo costo. Estas nanopartículas han sido materia de investigación en los últimos años debido a sus excelentes y modificables propiedades ópticas con alto potencial para su uso en aplicaciones biomédicas [22]. Gracias a sus propiedades ópticas, los puntos de carbono empezaron a ser investigados como agentes de contraste demostrando resultados prometedores al experimentar un efecto de fotoluminiscencia fuerte y estable cuando son excitados con láser en el infrarrojo cercano [23]. Luego, se reportó su potencial en el área de bio-imagen ('*bioimaging*') *in-vivo*, S.T. Yang et al. Sugirieron fuerte fluorescencia *in-vivo* junto con características de no toxicidad y biocompatibilidad [24].

Posteriormente, se empezaron a reportar aplicaciones de *'bioimaging' in-vivo* teniendo en cuenta el efecto de autofluorescencia, por lo que se buscan alternativas para sintetizar puntos de carbono con emisiones en el rango entre 450 nm y 650 nm del espectro electromagnético para evitar este fenómeno de fluorescencia endógena de los tejidos [25][26]. La posibilidad de introducir heteroátomos como dopantes en los puntos de carbono y funcionalizar su superficie, los convirtió en buenos candidatos para aplicaciones en el área de liberación de fármacos ya que se podían integrar con otros elementos y compuestos [27]. Ahora, su aplicación en oncología está siendo altamente estudiada, pues su desempeño como transportadores para liberación de fármacos ha sido reportado y calificado como sobresaliente [28].

Es de gran importancia realizar la caracterización de los puntos de carbono en aplicaciones biomédicas, pues es la base para trabajar con ellos, ya que se pueden asociar sus propiedades fisicoquímicas con las posibles respuestas biológicas cuando las células están en interacción con las nanopartículas.

## 2.6 Puntos de carbono en BNCT

Considerando la capacidad de los puntos de carbono para integrarse con otros compuestos o elementos mediante su dopaje y funcionalización, estos son candidatos prometedores para transportar boro selectivamente a células cancerosas con la finalidad de aumentar la concentración de boro al interior de las mismas, si son comparados con los fármacos que se usan en la actualidad como BPA y BSH.

Dado que esta técnica está siendo investigada en la actualidad y los puntos de carbono están en auge para tratar y diagnosticar cáncer, ya se han reportado algunos resultados preliminares de métodos de síntesis, precursores, dopantes, caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y biocompatibilidad. Estos resultados demuestran que hay una acumulación de boro en las células tumorales y reafirman el potencial de los puntos de carbono dopados con boro para aumentar la eficacia de la terapia BNCT [29][30].

En estos estudios se han utilizado ácido bórico y teraborato de sodio como fuentes de boro, también se reporta que el ácido cítrico ha sido usado como fuente de carbono junto con etilendiamina. Los puntos de carbono fueron sintetizados por método de microondas y solvotermal. Todas las caracterizaciones realizadas demuestran carga superficial negativa y grupos funcionales como OH, NH y C=O en la superficie de la nanopartícula, adicionalmente, se reporta la presencia de la banda de 200 nm a 300 nm en los espectros de absorción, correspondiente a los enlaces C=C, confirmando la existencia de los puntos de carbono.

Este proyecto es una fase inicial del desarrollo de nanoplataformas para su aplicación en BNCT, por lo tanto. En este se proponen protocolos de síntesis y caracterización de los puntos de carbono dopados y no dopados con boro. En esta etapa es fundamental realizar la caracterización de las propiedades ópticas, de absorción y emisión, pues mediante estas se puede comparar el antes y después del dopaje con boro, y así, comprobar que el boro está teniendo un efecto en los puntos de carbono. Los cambios en los espectros de emisión y absorción sugieren cambios en la estructura de los puntos de carbono. Es una forma indirecta

de comprobar que los puntos de carbono están dopados con boro, sin embargo, para confirmar la presencia de boro es necesario llevar a cabo la caracterización por absorción atómica.

## Capítulo 3

# METODOLOGÍA

A partir de los objetivos planteados en este trabajo se diseñaron diferentes etapas para su desarrollo. En la figura 3.1, se puede observar el diagrama de flujo del proceso que se siguió para la ejecución del proyecto.

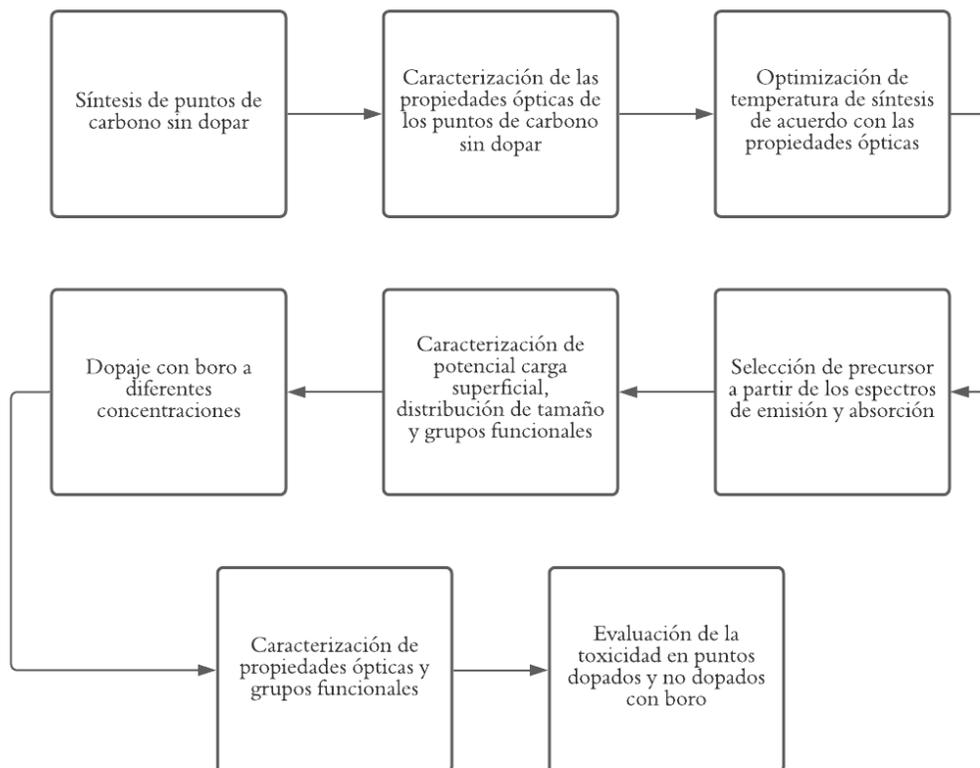


Figura 3.1: Diagrama de flujo de las etapas realizadas en el desarrollo de este proyecto

### 3.1 Síntesis de los puntos de carbono sin dopar

Se efectuó la síntesis de puntos de carbono no dopados por método de reactor microondas variando precursores orgánicos y temperatura de reacción. Como fuente de carbono se utilizó ácido cítrico (Sharlau) y como fuente de nitrógeno se utilizaron aminoácidos compuestos con diferentes cantidades atómicas de nitrógeno (Sigma- Aldrich); L-isoleucina con 1 átomo de nitrógeno; L-glutamina, 2 átomos de nitrógeno; L- histidina, 3 átomos de nitrógeno; L-arginina, 3 átomos de nitrógeno. Las estructuras moleculares se muestran en la figura 3.2.

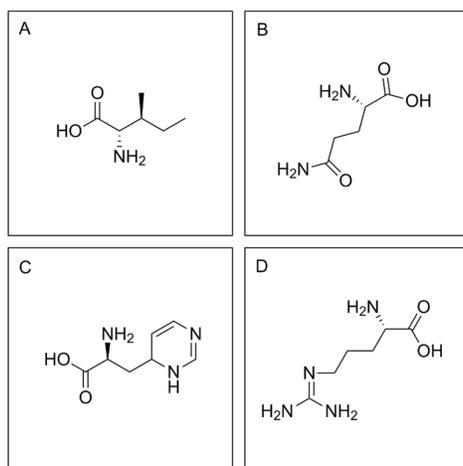


Figura 3.2: Aminoácidos utilizados como precursores de los puntos de carbono. A) L- isoleucina, B) L-glutamina, C) L-histidina, D) L-arginina

Para la obtención de puntos de carbono (PC), el ácido cítrico y el L-aminoácido se dispersan en agua destilada (6 mL) en una proporción en masa de 1:1. Las soluciones obtenidas se homogenizan por vortex y sonicación (equipo Elmasonic por 2 minutos). Posteriormente, la solución se somete a reacción en el reactor de síntesis de microwaves MONOWAVE 50 (figura 3.3) (Anton Paar, Austria). La temperatura de reacción fue determinada por medio de la evaluación de sus propiedades de absorción y emisión. 180°C, 195°C y 210°C son las temperaturas estudiadas. El tiempo de reacción es de 10 minutos para todos los casos. Figura 3.3.



Figura 3.3: Reactor microondas Monowave 50, curvas temperatura y presión en función del tiempo. Reacción de ácido cítrico y L-histidina a 210°C

La mezcla obtenida se purifica siguiendo el procedimiento que se reporta a continuación. El producto se centrifuga a 15000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se filtra (Minisart NY 25 PTFE f 0.20  $\mu\text{m}$ ) y se somete a una separación por cromatografía por columnas para separar fluoróforos libres moleculares y otras especies basadas en carbono de baja fluorescencia (figura 3.4). Luego de la fase de purificación, se secan las muestras en el concentrador de vacío (Cen-trifugal centrivap ® micro IR 77010) a 65°C con radiación IR durante 5 horas.

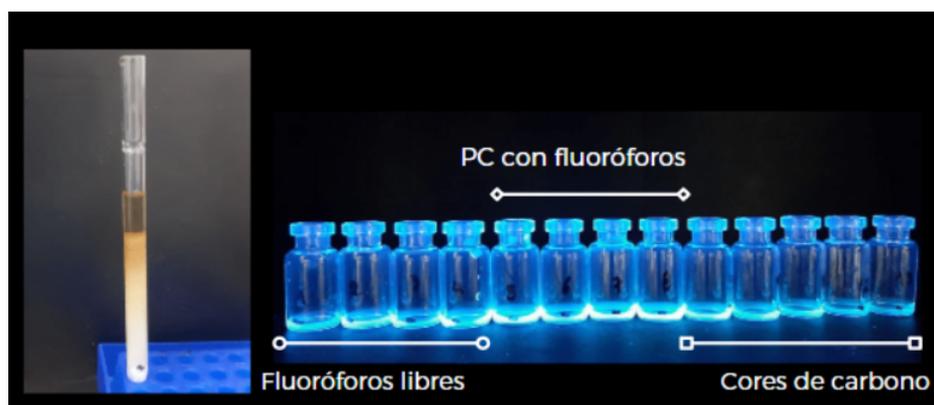


Figura 3.4: Purificación mediante técnica de cromatografía por columnas, separación de la solución en las diferentes especies que la componen para conservar específicamente los puntos de carbono con fluoróforos

### 3.2 Síntesis de los puntos de carbono dopados con boro

Los puntos de carbono dopados con boro se sintetizaron siguiendo un procedimiento modificado al reportado en la sección 3.1. En este caso, se mezclan ácido cítrico y L-histidina

con ácido bórico, como fuente de boro. La concentración de boro en la solución se varía con respecto a la cantidad de ácido cítrico. Las concentraciones de boro a estudiar son el 1 %, 2 %, 5 %, 10 % y 20 %.

Estos se dispusieron en el reactor microondas a una temperatura de 200°C por 10 minutos. Posterior a la síntesis, el proceso de purificación es el mismo que para los puntos de carbono no dopados con boro.

### **3.3 Caracterización de puntos de carbono dopados y no dopados con boro**

#### **3.3.1. Espectroscopía UV-Vis**

Los espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas se midieron en el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES y su software Ocean View. Las mediciones se realizaron para longitudes de onda que van en un rango de 200 nm a 800 nm usando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los datos obtenidos con Ocean View fueron procesados con el software MatLab para obtener las gráficas de absorbancia en función de la longitud de onda. Para la evaluación de las propiedades de absorción de los puntos de carbono sintetizados, siguiendo el procedimiento reportado en la sección 3.1, se prepararon soluciones acuosas de puntos de carbono a 1 mg/mL.

#### **3.3.2. Espectroscopía de Fluorescencia**

Los espectros de emisión se midieron en un Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek) y espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES y su software Ocean View. Las mediciones del espectro de fluorescencia se realizaron con las mismas soluciones utilizadas para obtener los espectros de absorción.

#### **3.3.3. Potencial Zeta ( $\zeta$ )**

La carga superficial se determina a través del potencial  $\zeta$ , obtenido del equipo Zetasizer MAL1036108 (Malvern Instruments) con la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), se dispuso de un muestra de puntos de carbono dispersos en agua destilada a 5mg/mL.

#### **3.3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier**

Los espectros infrarrojos de absorción son medidos con la técnica de ATR en el espectrómetro Nicolet iS5 system (Thermo Fisher Scientific Inc), para establecer los grupos funcionales presentes en las superficie de las nanopartículas sintetizadas. Estos espectros fueron medidos para los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico y L-histidina dopados y no dopados con boro. Las nanopartículas estaban secas, se utilizaron muestras de 10 mg de masa.

### **3.4 Evaluación de la citotoxicidad**

Se analizó la citotoxicidad de las nanopartículas sintetizadas por medio del ensayo MTT. Se utilizó la línea celular HT29, células de cáncer de colon humano, pues es importante establecer su viabilidad ya que las nanopartículas sintetizadas van dirigidas a células cancerosas. También se hicieron pruebas con la línea 3T3-L1, células diferenciadas en fibroblastos, que presentan

alta sensibilidad a los cambios en el medio. Es importante evaluar la biocompatibilidad en células sanas para determinar si existe un efecto toxico no deseado. Se sembraron las dos líneas celulares en una placa de 96 pozos, 10.000 células por pozo, y se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% de  $CO_2$  por una noche. Se adicionaron al medio celular diferentes soluciones acuosas de puntos de carbono, obteniendo como concentraciones finales 0, 125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dichas concentraciones fueron preparadas a partir de una solución madre de puntos de carbono dispersos en agua destilada a 10  $\text{mg}/\text{mL}$ . De la solución madre, se toman diferentes volúmenes para ser mezclados con el medio celular DMEM y así, obtener las diferentes concentraciones a utilizar en este ensayo.

Luego de ser incubadas se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de solución MTT a cada pozo utilizado y se cultivó por 4 horas a 37°C. Seguido a eso se retiró la solución de MTT y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO para disolver las sales de formazan. Por último, se midió la densidad óptica a 560 nm al obtener los valores absorción por medio del Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek).

## Capítulo 4

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del proceso de síntesis de puntos de carbono dopados y no dopados con boro por reacción de microondas. Adicionalmente, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de las propiedades ópticas y fisicoquímicas. Por último, se presenta una evaluación preliminar de su citotoxicidad en líneas celulares HT-29 y 3T3-L1 por medio de un ensayo MTT.

### 4.1 Caracterización de los puntos de carbono sin dopar con boro

En esta sección se presentan los resultados de la síntesis y caracterización de los puntos de carbono para su potencial aplicación en BNCT.

Se sintetizaron puntos de carbono con ácido cítrico y aminoácidos con diferentes cantidades atómicas de nitrógeno (L- isoleucina con 1 átomo de nitrógeno; L- glutamina, 2 átomos de nitrógeno; L- histidina, 3 átomos de nitrógeno; L- arginina, 3 átomos de nitrógeno). Pues se ha reportado que la presencia de nitrógeno puede modificar las propiedades ópticas de los puntos de carbono. Luego, se midieron sus espectros de absorción y emisión. Esto con el fin de seleccionar los precursores a utilizar en el proceso de dopaje.

Como paso inicial se sintetizaron puntos de carbono a diferentes temperaturas (180°C, 195°C y 210°C) para cada caso ya que diferentes temperaturas pueden favorecer o no la presencia de picos de absorción en diferentes longitudes de onda, correspondientes a los distintos tipos de enlaces y transiciones.

Se dispersaron todas las muestras obtenidas con las diferentes temperaturas (180°C, 195°C y 210°C) en agua destilada, a una concentración de 1 mg/mL y se obtuvieron los espectros de absorción para cada precursor aminoácido considerado. En las figuras 4.1 a la 4.4 se muestran los espectros obtenidos.

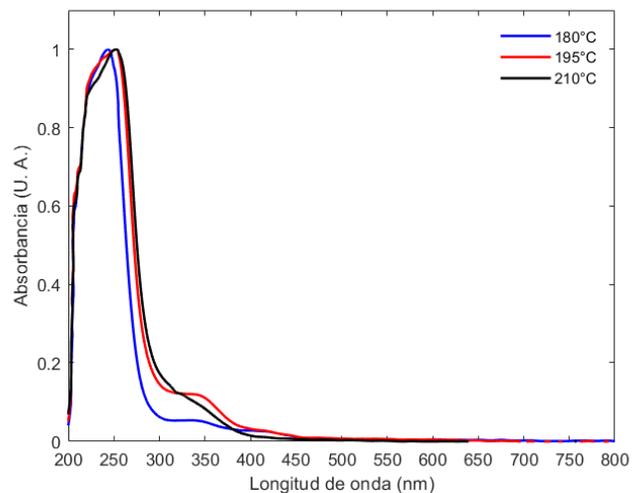


Figura 4.1: Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados con ácido cítrico y L-isoleucina en función de las temperaturas evaluadas

Las propiedades de absorción de los puntos de carbono sintetizados con L-isoleucina y ácido cítrico como precursores se muestra en la figura 4.1. Las bandas en la región de 200 a 300 nm confirman la presencia de enlaces C=C correspondientes a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Adicionalmente, se evidencia una banda de menor intensidad en el rango de de 300 nm a 400 nm, atribuido a la presencia de enlaces C=O correspondientes a la transición  $n \rightarrow \pi^*$ .

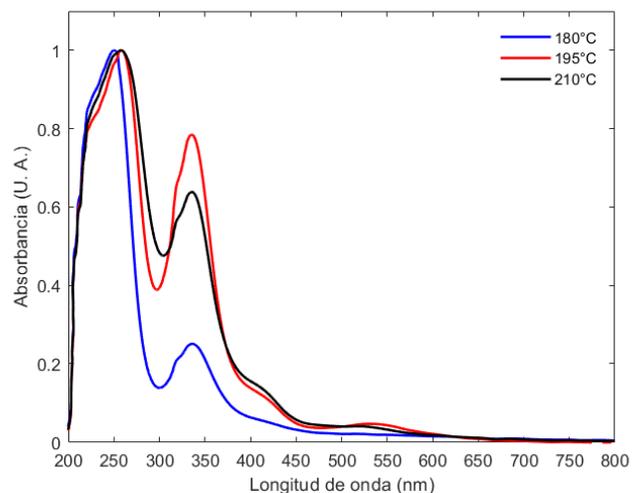


Figura 4.2: Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados con ácido cítrico y L-glutamina en función de las temperaturas evaluadas

Las propiedades de absorción de los puntos de carbono sintetizados a partir de L-glutamina y ácido cítrico se presentan en la 4.2. Las bandas de este espectro en el rango 200 nm a 300 nm confirman la presencia de enlaces C=C y C=O conformando el centro de los puntos de

carbono. Adicionalmente, se evidencian bandas de absorción en la región 400 nm a 500 nm y de 500 nm a 600 nm, sugiriendo la presencia de enlaces C=N y C=O en la superficie de los puntos de carbono.

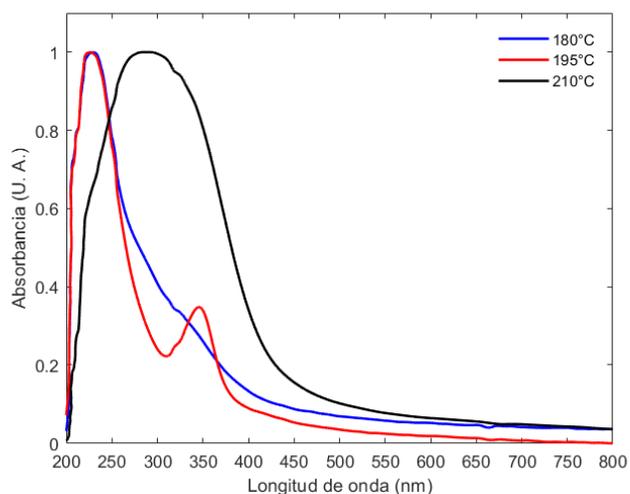


Figura 4.3: Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados con ácido cítrico y L-histidina en función de las temperaturas evaluadas

Los espectros de absorción de los PC sintetizados a partir de L-histidina y ácido cítrico se presentan en la 4.3. Las bandas de este espectro en el rango 200 nm a 300 nm y de 300 nm a 400 nm confirman la presencia de enlaces C=C y C=O conformando el centro de los puntos de carbono. También, se aprecian bandas de absorción en la región 400 nm a 500 nm, indicando la presencia de enlaces C=N y C=O en la superficie de los puntos de carbono. La temperatura de 210°C demuestra absorción desde 200 nm hasta más de 500 nm, esto es de especial interés porque su interacción con los fotones es mucho mayor comparada con las otras temperaturas de síntesis.

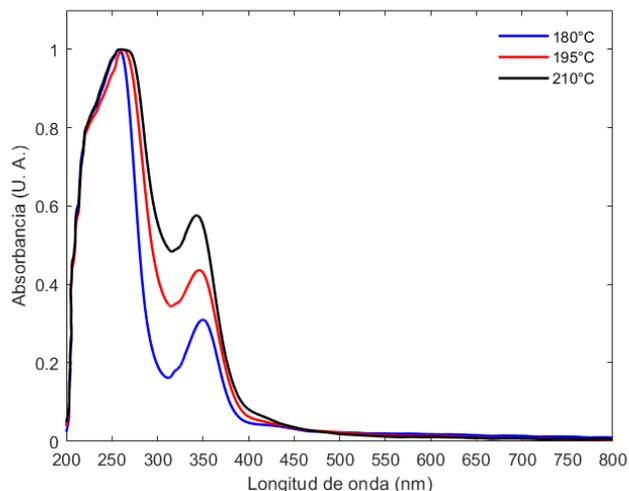


Figura 4.4: Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados con ácido cítrico y L-arginina en función de las temperaturas evaluadas

Los espectros de absorción de los PC sintetizados a partir de L-arginina y ácido cítrico se presentan en la 4.4. Las bandas de este espectro en el rango 200 nm a 300 nm y de 300 nm a 400 nm confirman la presencia de enlaces C=C y C=O conformando el centro de los puntos de carbono. La temperatura modifica la amplitud de los picos en la banda de 300 nm a 400 nm pero no su existencia.

A partir de los espectros de absorción se comprueba la existencia de PC en todos los casos, pues la absorción en la banda de 200 nm a 300 nm indica la presencia de la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  que se refiere a los enlaces C=C o carbonos aromáticos  $sp^2$ .

A pesar de que todas las muestras demostraron variación de la amplitud del rango abarcado por las bandas de absorción con respecto a la temperatura, se buscó seleccionar una temperatura óptima para todas las reacciones propuestas, independiente del L-aminoácido incorporado como precursor. Para ello se determinó el área bajo la curva de cada muestra, siendo las temperaturas de 195°C y 210°C las que mayor área bajo la curva tenían en los espectros de absorción. Así, se decidió realizar una prueba sintetizando a 200°C con cada aminoácido propuesto como precursor. En la figura 4.5 se muestra los espectros de absorción obtenidos.

Las áreas  $A$  bajo la curva para cada muestra a 200°C fueron halladas y se determinó que  $A_{Histidina} > A_{Glutamina} > A_{Arginina} > A_{Isoleucina}$ . Por lo tanto, los PC sintetizados con ácido cítrico y L-histidina presentan una mayor absorción con diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético.

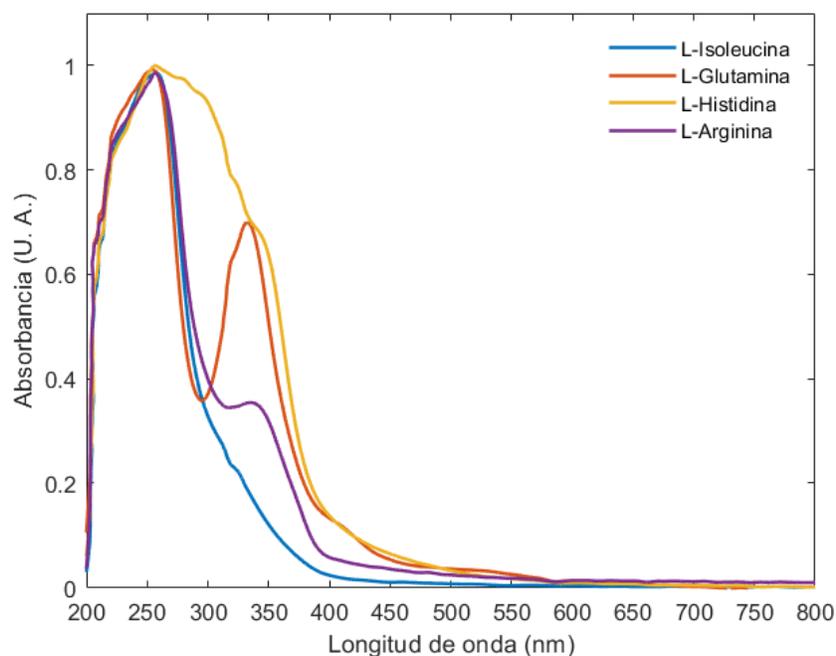


Figura 4.5: Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados a 200°C en función de los precursores ácido cítrico y L-aminoácidos

Teniendo en cuenta que la temperatura de 200°C se determinó como óptima, se obtuvieron los espectros de emisión para los precursores sintetizados a esa temperatura. Dos tipos de espectros de emisión fueron medidos para cada muestra: espectro de emisión a partir de excitación con haces de luz monocromática (figura 4.6) y el espectro de emisión cuando las muestras son excitadas con una lámpara de deuterio (figura 4.8).

En la figura 4.6 A, se puede notar que las emisiones de los puntos de carbono sintetizados con L-isoleucina se encuentran principalmente en longitudes de onda menores a 400 nm, lo que corresponde a el rango UV y al azul del espectro electromagnético. En el caso de las emisiones de las nanopartículas sintetizadas con L-glutamina (figura 4.6 B), es posible afirmar que, sí hay fotones con longitudes de onda mayores a 500 nm, especialmente cuando se irradia con longitudes de onda superiores a los 360 nm. Los puntos de carbono sintetizados a partir de L-histidina (figura 4.6 C) demuestran emisiones que van desde el ultravioleta hasta más de 500 nm, esto representa una ventaja si se buscan emisiones que estén en longitudes de onda superiores a 400 nm. Los espectros de emisión de los puntos de carbono sintetizados con L-arginina son muy similares a los espectros de las nanopartículas sintetizadas a partir de L-isoleucina, emisiones principalmente en el azul, violeta y ultravioleta (figura 4.6 D).

De acuerdo con los espectros de emisión se confirma que los puntos de carbono sintetizados presentan fluorescencia en el espectro visible (400 nm a 700 nm). Principalmente, se evidencia emisiones cercana a los 400 nm correspondiente, no obstante, se ha reportado que en este rango se favorece la generación de autofluorescencia con las células y tejidos, por esta razón, en aplicaciones como *bioimaging*, se buscan emisiones mayores a 500 nm para evitar este

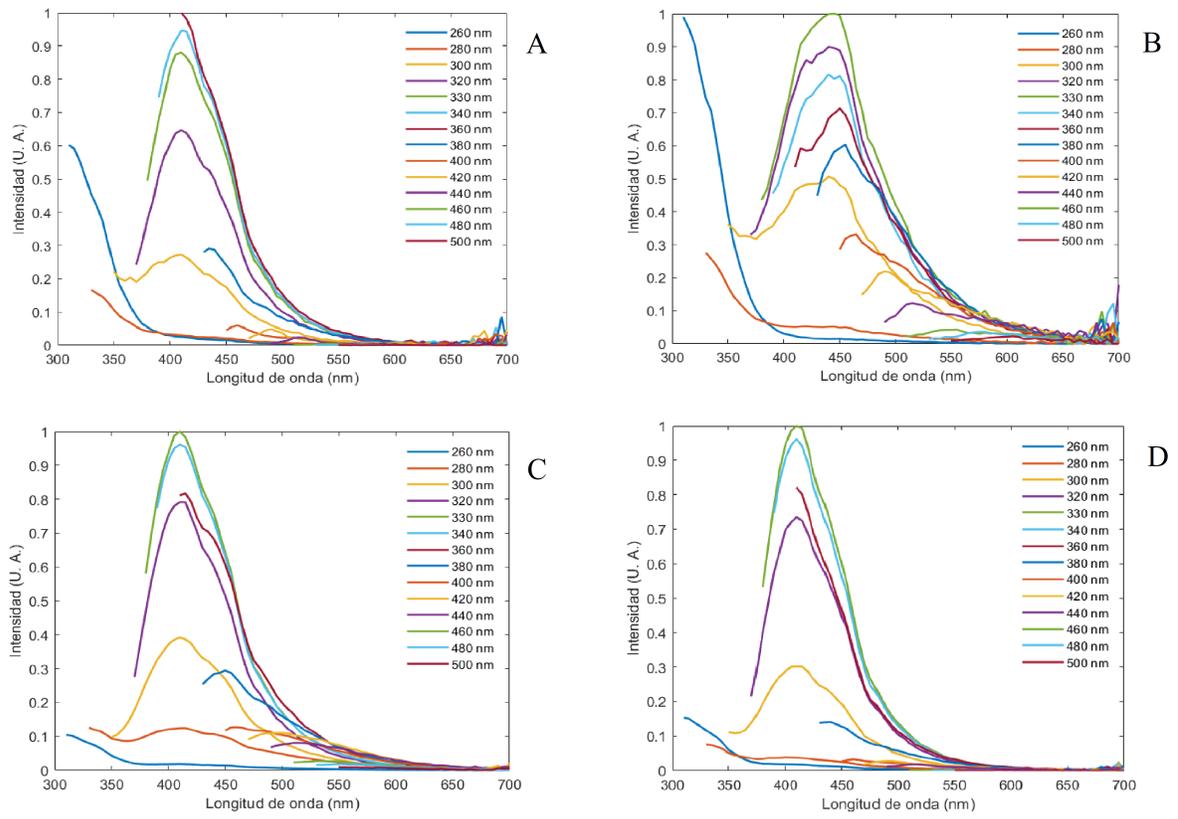


Figura 4.6: Espectros de emisión con excitación monocromática de nanopartículas sintetizadas con: A) ácido cítrico y L-isoleucina. B) ácido cítrico y L-glutamina. C) ácido cítrico y L-histidina. D) ácido cítrico y L-arginina

fenómeno de fluorescencia endógena de los tejidos

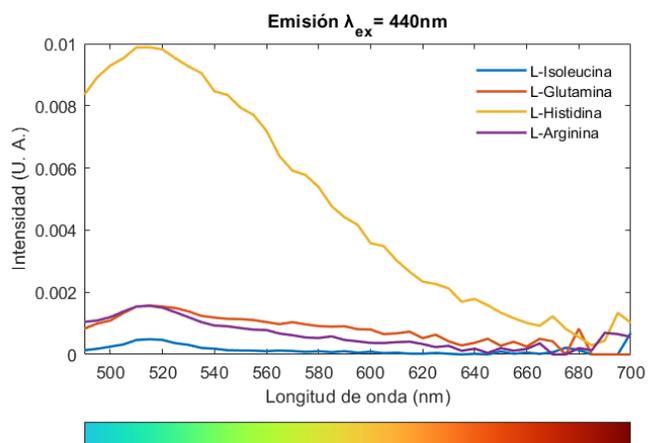


Figura 4.7: Espectros de emisión de las nanopartículas sintetizadas a partir de cada par ácido cítrico y L-aminoácido, fluorescencia a partir de excitación monocromática a 440 nm

Considerando que emisiones con longitud de onda mayor a 500 nm son útiles en algunas aplicaciones biomédicas de los puntos de carbono, se decide analizar la excitación a 440 nm para cada muestra, dado que se puede evidenciar emisión en longitudes de onda desde 490 nm y hasta 680 nm. En la figura 4.7 se puede observar que las nanopartículas sintetizadas a partir de ácido cítrico y L-histidina tienen emisiones que se extienden hasta la región naranja-roja del espectro electromagnético.

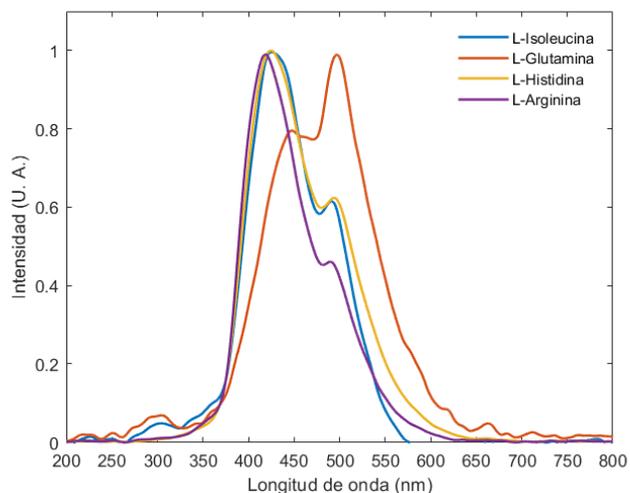


Figura 4.8: Espectros de emisión de las nanopartículas sintetizadas a partir de cada par ácido cítrico y L-aminoácido, excitación con lámpara de deuterio

En la figura 4.8 se pueden comparar los espectros de emisión de los puntos de carbono obtenidos de los diferentes aminoácidos en estudio. Una lámpara de deuterio es usada como fuente de excitación. Las nanopartículas sintetizadas con ácido cítrico y L-glutamina se destacan ya que presentan una banda de emisión que se extiende hacia regiones de mayor longitud de onda y mínima generación de autofluorescencia. Sin embargo, se encontró un problema de repetibilidad al usar L-glutamina ya que se obtuvieron diferentes resultados en los espectros de absorción a pesar de que se siguió el mismo protocolo de síntesis para todos los casos.

Teniendo en cuenta los inconvenientes experimentales asociados al uso de L-glutamina, se determinó que las nanopartículas sintetizadas con ácido cítrico y L-histidina son las apropiadas para experimentar en la incorporación de átomos de boro como dopantes.

La carga superficial fue calculada mediante el potencial  $\zeta$  obtenido con el método DLS. La carga superficial de los puntos de carbono obtenidos a partir de ácido cítrico y L-histidina se determinó a partir del potencial zeta ( $\zeta$ ). La solución acuosa de estos puntos de carbono evidenciaron un potencial  $\zeta$  estimado de  $-7.3 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$ . Este valor indica la presencia de átomos electronegativos como el oxígeno y el nitrógeno en la superficie de las nanopartículas, hipótesis que complementa lo sugerido en los resultados de los espectros de absorción.

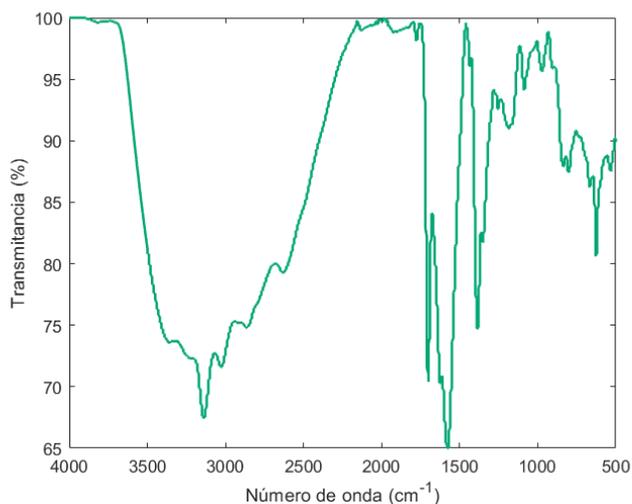


Figura 4.9: Gráfica de espectroscopía IR para puntos de carbono no dopados

Para determinar los grupos funcionales presentes en la superficie de los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico y L-histidina se midió el espectro infrarrojo (figura 4.9). A continuación, en la tabla 4.1 se relacionan las bandas vibracionales que se evidencian en el espectro, con los posibles enlaces y grupos presentes en los puntos de carbono.

Tabla 4.1: Frecuencias de vibración de las bandas evidenciadas en el espectro infrarrojo de los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico y L-histidina.

Vibración de tensión ( $cm^{-1}$ )	Tipo de enlace	Grupo asociado
3370	OH	Hidroxilo
3250	NH	Amino
3150	OH	Hidroxilo
3020	C=CH	Alqueno
2860	CH	Alcano
1700	C=O	Carbonilo
1580	C=C	Alqueno aromático
1390	CH	Alcano
1350	CN	Amina
1200	CN	Amina

De acuerdo con los enlaces reportados en la tabla 4.1, es posible asociarlos con los grupos funcionales presentes en los precursores, como son los grupos ácido carboxílico, amina y amida. Así como también se confirma la presencia de carbonos aromáticos  $sp^2$ .

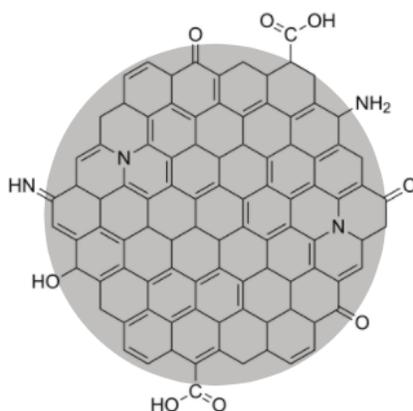


Figura 4.10: Estructura propuesta de las nanopartículas sin dopar con boro

Integrando los resultados de las anteriores caracterizaciones, se propone una estructura para los puntos de carbono sintetizados (figura 4.10). En esta estructura se evidencia la presencia de los grupos funcionales determinados con las técnicas de caracterización como los carbonos  $sp^2$  que se mencionaron en el análisis de resultados de espectros de absorción así como en los resultados de FTIR. Grupos carbonilo que se evidencian en las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  correspondientes a las bandas de 300 nm a 400 nm y de 400 nm a 500 nm en los espectros de absorción y las frecuencias de vibración correspondientes en FTIR. Los grupos OH, NH y CN mencionados previamente, por sus frecuencias de vibración evidenciadas en FTIR. Teniendo en cuenta que el oxígeno tiene presencia de pares de electrones libres como lo sugieren los resultados de potencial  $\zeta$ . Así, la estructura de nanopartícula propuesta es

congruente con los resultados obtenidos en cada técnica de caracterización.

## 4.2 Caracterización de los puntos de carbono dopados con boro

Se dispersaron en agua destilada los puntos de carbono con boro a una concentración de 1 mg/mL, se obtuvieron los espectros de absorción de cada concentración de boro para ser comparados, los espectros se muestran en la figura 4.11.

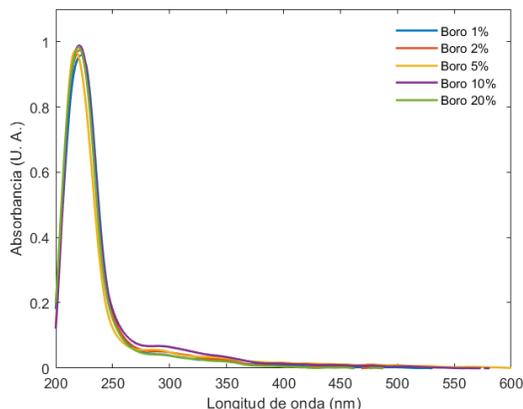


Figura 4.11: Espectros de absorción puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico y L-histidina y ácido bórico a diferentes concentraciones dispersos en agua destilada a 1 mg/mL

Se dispersaron en agua destilada los puntos de carbono con boro a una concentración de 1 mg/mL y se midieron los espectros de absorción (figura 4.11). Se evidencia absorción en la banda de 200 nm a 300 nm por lo que es posible afirmar la presencia de carbonos aromáticos  $sp^2$  y también está presente la transición  $n \rightarrow \pi^*$ , sin embargo, si se compara con los puntos sin dopar, sí existe un efecto ‘*quenching*’ o extinción en las bandas de 400 nm a 500 nm, esto puede deberse a la presencia de otras transiciones del boro o a menor cantidad de átomos de nitrógeno en las nanopartículas dopadas con boro, comparadas con las no dopadas

Los espectros de emisión de los PC dopados, sintetizados a diferentes concentraciones de boro se muestran en la figura 4.12. Estos demuestran emisiones en la banda de 400 nm a 500 nm y de 500 nm a 600 nm correspondientes a la mayor parte del espectro visible (del azul al naranja). Al comparar la fluorescencia de los puntos de carbono dopados a diferentes concentraciones, se puede afirmar que en la banda de 475 nm a 550 nm existe un efecto leve en la amplitud del pico, dependiente de la concentración. Asimismo, se determinó que la mayor interacción con la energía se presentó en el espectro de emisión de los puntos de carbono dopados con boro al 10 % ya que el área bajo la curva es mayor a las de las otras concentraciones de boro.

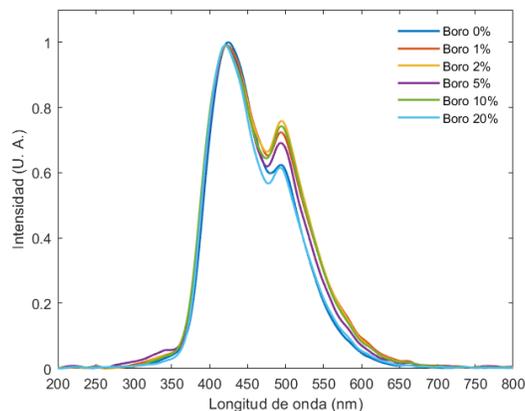


Figura 4.12: Espectros de emisión puntos de carbono dopados con boro a diferentes concentraciones. A una concentración de 1 mg/mL en agua destilada, se midieron los espectros de emisión al excitar las muestras con lámpara de deuterio

Para determinar los grupos funcionales presentes en la nanopartícula se compararon los números de onda correspondientes a los picos en la gráfica de transmitancia con los valores estandarizados que se encuentran en la literatura, de acuerdo con la figura 4.13.

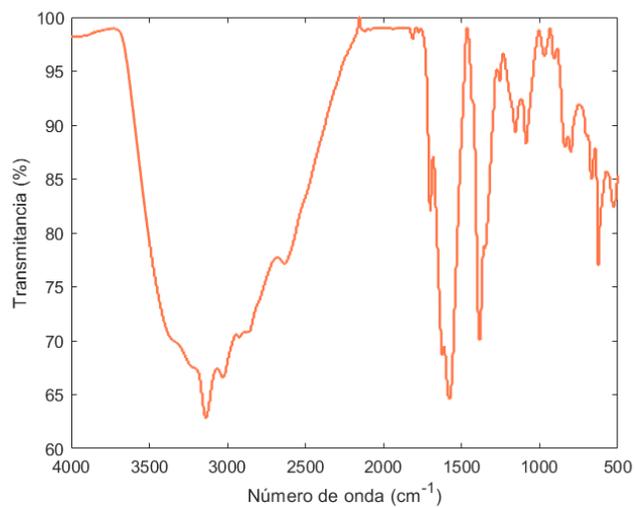


Figura 4.13: Gráfica de espectroscopía IR para puntos de carbono no dopados

A continuación, en la tabla 4.2, se relacionan las vibraciones de tensión, picos presentes en la figura 4.13, con los posibles enlaces y grupos presentes en los puntos de carbono dopados con boro en la mayor concentración (20%).

Tabla 4.2: Frecuencias de vibración de las bandas evidenciadas en el espectro infrarrojo de los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico, L-histidina y ácido bórico

Vibración de tensión ( $cm^{-1}$ )	Tipo de enlace	Grupo asociado
3380	OH	Hidroxilo
3230	NH	Amino
3140	OH	Hidroxilo
3040	C=CH	Alqueno
2870	CH	Alcano
1700	C=O	Carbonilo
1630	C=C	Alqueno aromático
1380	CH	Alcano
1160	CN	Amina

De acuerdo con los enlaces reportados en la tabla 4.2, se pueden asociar con los grupos funcionales presentes en los precursores, como son los grupos hidroxilo, amina y amida. De igual forma, se confirma la presencia de carbonos aromáticos  $sp^2$ .

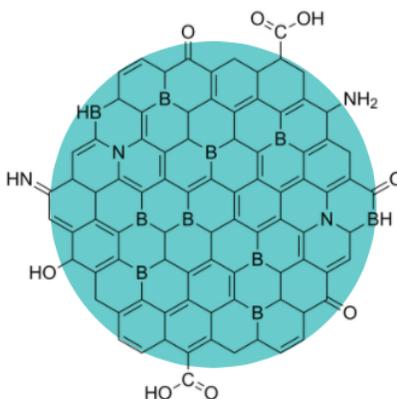


Figura 4.14: Estructura propuesta de las nanopartículas dopadas con boro

Teniendo en cuenta los resultados de las anteriores caracterizaciones, se propone una estructura para los puntos de carbono dopados con boro (figura 4.14). En esta estructura se evidencia la presencia de los grupos funcionales determinados con las técnicas de caracterización como los carbonos  $sp^2$  mencionados en los resultados de propiedades ópticas de absorción. Los grupos OH, NH y CN mencionados, por sus frecuencias de vibración evidenciadas en FTIR. De esta forma, la estructura de nanopartícula propone los grupos y enlaces sugeridos obtenidos en los resultados de cada técnica de caracterización, en este caso se supone la presencia de boro en los PC, pero se deben realizar otras caracterizaciones para confirmar esa hipótesis.

Las estructuras propuesta tienen carga superficial negativa, esto se debe a los grupos funcionales presentes en la superficie. A nivel biológico esto puede representar una ventaja en cuanto al transporte selectivo, ya que se ha reportado que puntos de carbono con carga su-

periférica negativa son capaces de atravesar la membrana por endocitosis con mayor facilidad que las nanopartículas con carga superficial positiva. Dado que la membrana celular es parcialmente negativa, las estructuras con carga positiva tienden a agregarse con la membrana, adicionalmente, se han relacionado efectos citotóxicos e inflamación con cargas superficiales positivas. Esto debe ser confirmado mediante la caracterización de captación celular por citometría de flujo.[31][32].

El paso de puntos de carbono a través de la membrana se puede dar mediante diferentes mecanismos, principalmente se ha reportado endocitosis como el más común, aun así, esto es materia de investigación pues todavía hay muchas incógnitas en esta área.[31].

### 4.3 Ensayos de citotoxicidad

Se utilizaron las líneas celulares HT-29 y 3T3-L1 para llevar a cabo la prueba de citotoxicidad. Se utilizó la línea celular HT29, células de cáncer de colon humano, pues es importante establecer su viabilidad ya que las nanopartículas sintetizadas van dirigidas a células cancerosas. También se hicieron pruebas con la línea 3T3-L1, células diferenciadas en fibroblastos, presentan alta sensibilidad a los cambios en el medio. Es de suma importancia evaluar la citotoxicidad en diferentes líneas celulares para obtener más información sobre la biocompatibilidad de las nanopartículas sintetizadas. En la figura 4.15, se puede observar el resultado del ensayo MTT realizado en donde las barras representan la viabilidad celular de los cultivos al ser expuestos a una solución de nanopartículas sin dopar con boro, dispersas en agua destilada. El ensayo se llevó a cabo con diferentes concentraciones de cada solución (0, 125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se hicieron tres repeticiones del ensayo para cada concentración de las nanopartículas. Estos datos se promediaron y normalizaron tomando la media de los controles negativos (células sin agentes exógenos adicionados al medio) como el 100 % de viabilidad celular.

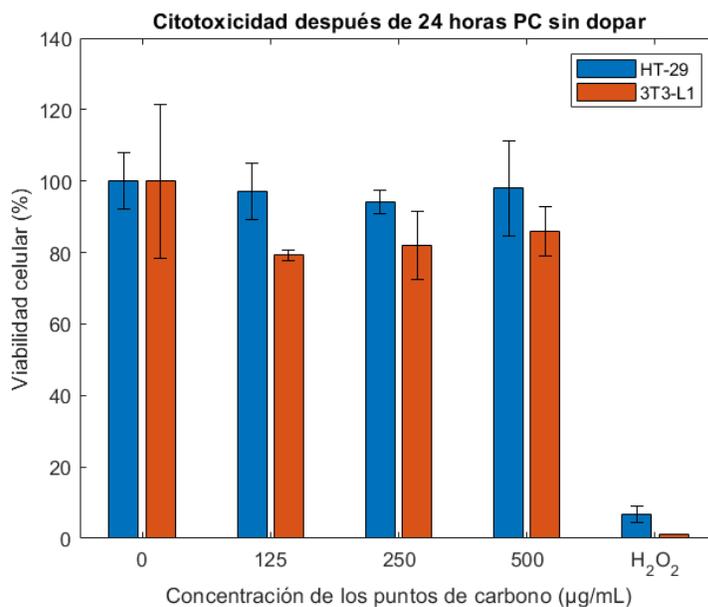


Figura 4.15: Resultados del ensayo MTT con los puntos de carbono no dopados con boro

Teniendo en cuenta que el control negativo (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no contiene ninguna de las nanopartículas sintetizadas se establece que una viabilidad celular completa equivale a 100%. Adicionalmente, se encuentra el peróxido de hidrogeno a 1.5% m/v, compuesto con muy alta citotoxicidad, esto con el fin de comparar los efectos de los puntos de carbono con el control negativo y con este agente tóxico. En todos los casos, la viabilidad celular supera el 80%, lo que sugiere biocompatibilidad. Sin embargo, se evidencian diferencias entre las dos líneas celulares pues en HT-29 las viabilidades son muy cercanas al 100% mientras que en las células 3T3-L1 la viabilidad es un poco más baja, cercana al 80%. Esto puede deberse a la alta sensibilidad e esta línea celular a cualquier cambio en el entorno.

## Capítulo 5

# CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos de este proyecto, enfocados a la síntesis y caracterización de nanopartículas, específicamente puntos de carbono, se efectuó la síntesis de puntos de carbono dopados con boro y una evaluación preliminar de la citotoxicidad en puntos no dopados. Se realizó la síntesis de puntos de carbono por método de reacción por microondas a 200°C que exhiben una absorción en longitudes de onda entre los 200 y 500 nm y una emisión en longitudes de onda que van desde el ultravioleta hasta longitudes mayores a los 550 nm. La presencia de los grupos amino que se encuentran en los diferentes aminoácidos utilizados como precursores, tienen un impacto en las propiedades ópticas de los puntos de carbono. Las propiedades de fluorescencia se atribuyen a los grupos funcionales presentes en estos precursores utilizados.

Las nanoestructuras obtenidas fueron caracterizadas por potencial  $\zeta$ , siendo este  $-7.3\text{mV} \pm 3\text{mV}$  que indica la presencia de átomos con pares de electrones libres en la superficie de la nanoestructura como el oxígeno y el nitrógeno; FTIR, confirmando la presencia de grupos funcionales asociados a los tipos de enlace OH, NH, C=CH, CH y CN en la superficie; y espectroscopía UV-Vis, determinando las banda de absorción entre 200 nm y 300 nm para los puntos dopados correspondientes a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  y bandas de absorción de 200 nm a 500 nm para los puntos sin dopar con boro, la banda de emisión está comprendida entre 350 nm y 650 nm bajo excitación con lámpara de deuterio.

Considerando los resultados preliminares obtenidos del ensayo MTT, se identifica que los puntos de carbono no dopados con boro presentan una baja citotoxicidad que permite la viabilidad celular de células HT29 y 3T3-L1 y su actividad metabólica. Este resultado es información inicial de la biocompatibilidad de estas nanopartículas.

## Capítulo 6

# RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

A corto plazo se plantea determinar la presencia de boro en los puntos de carbono dopados a través de la técnica de absorción atómica, adicionalmente, realizar pruebas de citotoxicidad de las nanopartículas dopadas con boro en diferentes líneas celulares con método de azul tripán y ensayos MTT. A mediano plazo, se busca probar diferentes fuentes de boro como ácido bórico, ácido fenilo borbónico o tetraborato de sodio como dopantes para irradiar con neutrones. Por último, a largo plazo se propone optimizar las nanopartículas para entrar selectivamente a las células cancerosas y posterior realización de pruebas de irradiación *in-vitro* para evaluar la efectividad de los puntos de carbono dopados con boro y comparar los resultados con los fármacos que existen en la actualidad.

Como recomendación, se propone cuantificar y analizar la presencia de puntos de carbono dopados con boro al interior de las células, sanas y cancerosas, mediante técnicas de bioimagen. Teniendo en cuenta que las nanopartículas tienen propiedades de fotoluminiscencia que permiten tal detección.

# Bibliografía

- [1] GLOBOCAN, *Cancer today*, en. dirección: <http://gco.iarc.fr/today/home> (visitado 12-11-2021).
- [2] Instituto Nacional del Cáncer, *Radioterapia para el cáncer*, es, *cgvArticle*, Archive Location: *nciglobal,ncienterprise*, nov. de 2017. dirección: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia> (visitado 12-11-2021).
- [3] D. E. Citrin, «Recent Developments in Radiotherapy,» en, *New England Journal of Medicine*, vol. 377, n.º 11, D. L. Longo, ed., págs. 1065-1075, sep. de 2017, ISSN: 0028-4793, 1533-4406. DOI: 10.1056/NEJMra1608986. (visitado 12-11-2021).
- [4] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA), *Current Status of Neutron Capture Therapy*, ép. TECDOC Series 1223. Vienna: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2001.
- [5] American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2021*, en. dirección: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2021.html> (visitado 12-11-2021).
- [6] R. F. Barth, A. H. Soloway y R. G. Fairchild, «Boron Neutron Capture Therapy for Cancer,» *Scientific American*, vol. 263, n.º 4, págs. 100-107, oct. de 1990, ISSN: 0036-8733. DOI: 10.1038/scientificamerican1090-100. (visitado 12-11-2021).
- [7] L. E. Farr y J. S. Robertson, «Neutron capture therapy,» de, en *Allgemeine Strahlentherapeutische Methodik / Methods and Procedures of Radiation Therapy*, L. Diethelm, O. Olsson, F. Strnad et al., eds., vol. 16 / 2, Series Title: Handbuch der Medizinischen Radiologie / Encyclopedia of Medical Radiology, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1971, págs. 68-92, ISBN: 978-3-642-80606-3 978-3-642-80605-6. DOI: 10.1007/978-3-642-80605-6\_2. (visitado 12-11-2021).
- [8] M. Lamba, A. Goswami y A. Bandyopadhyay, «A periodic development of BPA and BSH based derivatives in boron neutron capture therapy (BNCT),» en, *Chemical Communications*, vol. 57, n.º 7, págs. 827-839, 2021, ISSN: 1359-7345, 1364-548X. DOI: 10.1039/D0CC06557A. (visitado 12-11-2021).
- [9] E. Zavjalov, A. Zaboronok, V. Kanygin et al., «Accelerator-based boron neutron capture therapy for malignant glioma: a pilot neutron irradiation study using boron phenylalanine, sodium borocaptate and liposomal borocaptate with a heterotopic U87 glioblastoma model in SCID mice,» en, *International Journal of Radiation Biology*, vol. 96, n.º 7, págs. 868-878, jul. de 2020, ISSN: 0955-3002, 1362-3095. DOI: 10.1080/09553002.2020.1761039. (visitado 12-11-2021).

- [10] I. V. J. Feiner, K. R. Pulagam, K. B. Uribe et al., «Pre-targeting with ultra-small nanoparticles: boron carbon dots as drug candidates for boron neutron capture therapy,» en, *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 9, n.º 2, págs. 410-420, 2021, ISSN: 2050-750X, 2050-7518. DOI: 10.1039/D0TB01880E. (visitado 12-11-2021).
- [11] G. G. Naik, J. Shah, A. K. Balasubramaniam y A. N. Sahu, «Applications of natural product-derived carbon dots in cancer biology,» en, *Nanomedicine*, vol. 16, n.º 7, págs. 587-608, mar. de 2021, ISSN: 1743-5889, 1748-6963. DOI: 10.2217/nmm-2020-0424. (visitado 12-11-2021).
- [12] M. Liu, «Optical Properties of Carbon Dots: A Review,» *Nanoarchitectonics*, vol. 1, n.º 1, págs. 1-12, ene. de 2020, ISSN: 2717-5332, 2717-5324. DOI: 10.37256/nat.112020124.1-12. (visitado 12-11-2021).
- [13] Q. Jia, Z. Zhao, K. Liang et al., «Recent advances and prospects of carbon dots in cancer nanotheranostics,» en, *Materials Chemistry Frontiers*, vol. 4, n.º 2, págs. 449-471, 2020, ISSN: 2052-1537. DOI: 10.1039/C9QM00667B. (visitado 12-11-2021).
- [14] M. Goblirsch, C. Lynch, W. Mathews, J. C. Manivel, P. W. Mantyh y D. R. Clohisy, «Radiation treatment decreases bone cancer pain through direct effect on tumor cells,» *Radiation research*, vol. 164, n.º 4, págs. 400-408, 2005.
- [15] M. Núñez, M. UdelaR y U. d. T. de ALASBIMN, «Efectos biológicos de las radiaciones– Dosimetría,» *Escuela Universitaria de Tecnología Médica UdelaR, Montevideo, Uruguay Comité de Tecnólogos de ALASBIMN*, vol. 11, 2008.
- [16] S. Faithfull, «Radiotherapy,» en *Cancer nursing: Care in context, 2nd ed.* Malden: Blackwell Publishing, 2008, págs. 317-359, ISBN: 1-4051-2253-6 (Paperback); 978-1-4051-2253-5 (Paperback).
- [17] Y. Prezado y L. Biomédica ID17, «Fundamentos físicos y efectos biológicos de la radioterapia con radiación sincrotrón,» *Revista de Física Médica*, vol. 11, n.º 1, jun. de 2010, Section: Artículos de revisión. (visitado 16-11-2021).
- [18] M. E. Castellanos, «Las nuevas tecnologías: necesidades y retos en radioterapia en América Latina,» *Revista Panamericana de Salud Pública*, vol. 20, págs. 143-150, 2006.
- [19] M. A. Pisarev, M. A. Dargosa, L. Thomasz y G. Juvenal, «Tratamiento del cáncer por captura neutrónica de boro: Su aplicación al carcinoma indiferenciado de tiroides,» *Medicina (Buenos Aires)*, vol. 66, n.º 6, págs. 569-573, 2006.
- [20] H. Tanaka, «Current Status of Accelerator-Based Boron Neutron Capture Therapy (BNCT),» *Igaku butsuri: Nihon Igaku Butsuri Gakkai kikanishi= Japanese journal of medical physics: an official journal of Japan Society of Medical Physics*, vol. 41, n.º 3, págs. 117-121, 2021.
- [21] K. McNamara y S. A. Tofail, «Nanoparticles in biomedical applications,» *Advances in Physics: X*, vol. 2, n.º 1, págs. 54-88, 2017.
- [22] F. Yuan, S. Li, Z. Fan, X. Meng, L. Fan y S. Yang, «Shining carbon dots: synthesis and biomedical and optoelectronic applications,» *Nano Today*, vol. 11, n.º 5, págs. 565-586, 2016.

- [23] L. Cao, X. Wang, M. J. Meziani et al., «Carbon Dots for Multiphoton Bioimaging,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, n.º 37, págs. 11 318-11 319, 2007, PMID: 17722926. DOI: 10.1021/ja0735271. eprint: <https://doi.org/10.1021/ja0735271>.
- [24] S.-T. Yang, L. Cao, P. G. Luo et al., «Carbon dots for optical imaging in vivo,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, n.º 32, págs. 11 308-11 309, 2009.
- [25] H. Tao, K. Yang, Z. Ma et al., «In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite,» *Small*, vol. 8, n.º 2, págs. 281-290, 2012.
- [26] W. Wang, L. Cheng y W. Liu, «Biological applications of carbon dots,» *Science China Chemistry*, vol. 57, n.º 4, págs. 522-539, 2014.
- [27] S. Chaudhary, A. Umar, K. Bhasin y S. Singh, «Applications of carbon dots in nanomedicine,» *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 13, n.º 6, págs. 591-637, 2017.
- [28] Q. Zeng, D. Shao, X. He et al., «Carbon dots as a trackable drug delivery carrier for localized cancer therapy in vivo,» *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 4, n.º 30, págs. 5119-5126, 2016.
- [29] I. V. Feiner, K. R. Pulagam, K. B. Uribe et al., «Pre-targeting with ultra-small nanoparticles: boron carbon dots as drug candidates for boron neutron capture therapy,» *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 9, n.º 2, págs. 410-420, 2021.
- [30] J. Li, J. Kong, S. Ma et al., «Exosome-Coated 10B Carbon Dots for Precise Boron Neutron Capture Therapy in a Mouse Model of Glioma In Situ,» *Advanced Functional Materials*, pág. 2100969, 2021.
- [31] M. Usman, Y. Zaheer, M. R. Younis et al., «The effect of surface charge on cellular uptake and inflammatory behavior of carbon dots,» *Colloid and Interface Science Communications*, vol. 35, pág. 100 243, 2020.
- [32] M. Weiss, J. Fan, M. Claudel et al., «Density of surface charge is a more predictive factor of the toxicity of cationic carbon nanoparticles than zeta potential,» *Journal of nanobiotechnology*, vol. 19, n.º 1, págs. 1-19, 2021.

## ANEXOS

### Protocolo síntesis de puntos de carbono:

1. Pesar 250 mg de ácido cítrico monohidratado y 250 mg de L-aminoácido (precursores).
2. Dispersar los precursores en 6 mL de agua destilada.
3. Hacer vortex por 1 minuto y luego sonicar a temperatura ambiente por 2 minutos.
4. Hacer reaccionar la solución obtenida en el reactor microondas a 10 minutos con la temperatura deseada (180°C, 195°C, 200°C o 210°C).
5. Centrifugar a 15000 rpm durante 15 minutos, conservar únicamente el sobrenadante.
6. Purificar mediante diálisis por 24 horas (omitir paso 7) o realizar cromatografía por columnas.
7. Preparar solución 1:1 de agua MilliQ y acetonitrilo, usar altura de silica gel de 5 cm para las columnas.
8. Conservar únicamente las muestras correspondientes a los PC con fluoróforos.
9. Filtrar a 0.2 $\mu$ m.
10. Secar en concentrador a vacío con radiación IR a 65°C durante 4 a 5 horas.

### Protocolo caracterización de propiedades ópticas:

1. Dispersar los puntos de carbono secos en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL.
2. Depositar 2 mL de la solución en una celda de cuarzo.
3. Medir espectros de absorción en espectrofotómetro.
4. Medir espectros de emisión excitando únicamente con lámpara de deuterio (Apagar lámpara halógena) en el espectrofotómetro.
5. Procesar las gráficas en el software de su preferencia con un filtro pasa-bajas con frecuencia de corte de 1 Hz y un filtro de ventana móvil.
6. Normalizar la gráfica para que el valor máximo sea 1.
7. Hallar el área bajo la curva.