

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES

Síntesis y caracterización de óxido de grafeno lactosilado como sistema transportador de doxorrubicina con direccionamiento hacia el receptor de asialoglicoproteína en células de cáncer de hígado.

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES

Presenta:

Q. B.C. Kevin Ricardo Díaz Gálvez

Hermosillo, Sonora

agosto de 2020

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**

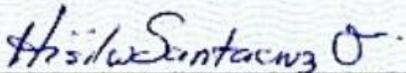
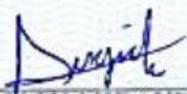
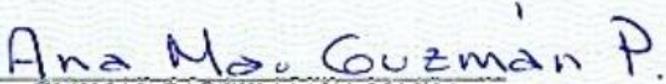


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado designados para revisar la tesis de maestría de Kevin Ricardo Díaz Gálvez han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias de Materiales, otorgado por la Universidad de Sonora.

The image shows five handwritten signatures, each followed by a horizontal line and then the printed name and title of the signatory. The signatures are in blue ink on a light blue background.

 SANTACRUZ ORTEGA*HISILA DEL CARMEN Presidente	 SARAHIA SAINZ*JOSE ANDRE-I Secretario
 BURGARA ESTRELLA*ALEXEL JESUS Sinodal	 SUGICH MIRANDA*ROCIO Sinodal
 GUZMAN PARTIDA*ANA MARIA Sinodal externo	

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro

Jefe del Departamento

A dios y mi familia, en especial a mi padre y madre por apoyarme incondicionalmente en todo momento.

Para Ricardo, Patrick y Nayelli por estar siempre presente y motivarme en esta travesía.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora mi alma mater, por el apoyo brindado durante mi formación académica en licenciatura y maestría, de igual manera, al Laboratorio de Química supramolecular del departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) y al Laboratorio de Biofísica del Departamento de Investigación de Física necesaria para realizar (DIFUS), por haberme brindado la infraestructura necesaria para realizar el trabajo de investigación.

A cada uno de los sinodales, a la M.C. Ana María Guzmán Partida, a la Dra. Rocio Sugich Miranda y al Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella por los consejos y exigencias realizadas, que me ayudaron a mejorar la calidad del trabajo, así como su disposición de ayudar a resolver mis dudas.

A los profesores del posgrado, por el conocimiento y consejos proporcionados durante mi formación. A mis compañeros y amigos, en especial a Ramon Flores, Daniel Ruiz y Esteban López; a mi novia Nayelli Terán, quién me brindó amor y apoyo durante toda esta travesía.

A la Dra. María Elisa Martínez Barbosa y Dra. Erika Campa Silva por confiar en mí y apoyarme en mi siguiente etapa del posgrado.

Con profundo respeto agradezco a la Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega y al Dr. José Andre-i Sarabia Sainz por haberme brindado la oportunidad de adquirir experiencia, conocimiento; por la confianza y el apoyo brindado.

INDICE

	Página.
FORMA DE APROBACIÓN	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
INDICE	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMEN	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCION	20
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVO	23
3.1. Objetivo general	23
3.2. Objetivos particulares	23
4. ANTECEDENTES	24
4.1. Nanomateriales en la farmacología	24
4.1.1. Biomateriales y sus aplicaciones	24
4.1.2. Matrices poliméricas sintéticas y naturales	25
4.2. Grafeno y sus derivados	25
4.2.1. Propiedades del grafeno	26
4.2.2. Óxido de grafeno	27
4.2.2.1. Estructura química de OG	28
4.2.2.2. Estabilidad de OG en suspensión	30
4.3. Biocompatibilidad de OG	30
4.3.1. Bioacumulación	32
4.3.2. Compatibilidad en sangre	33
4.3.3. Inflamación y respuesta inmune	34

4.3.4. Captación celular	36
4.4. Aplicaciones biológicas de OG	37
4.4.1. Sistemas transportadores de fármacos	38
4.5. Métodos de síntesis de OG	39
4.5.1. Método de Hummers. Oxidación de grafito	39
4.5.2. Métodos de exfoliación de OGr	47
4.5.3. Funcionalización de OG	48
4.6. Sistemas transportadores con direccionamiento celular	50
4.7. Carcinoma hepatocelular	51
4.7.1. Epidemiología	51
4.7.2. Alteraciones presentes en CHC	52
4.7.3. Receptor de asialoglicoproteínas	53
4.7.3.1. Unión ligando - RAGP	54
4.8. Terapia contra el cáncer. Doxorrubicina.	55
4.8.1. Mecanismo de adsorción DOX-OG	56
4.8.2. Mecanismo de liberación de doxorrubicina	56
5. PARTE EXPERIMENTAL	58
5.1. Materiales	58
5.2. Metodología	58
5.2.1. Oxidación de grafito (OGr)	58
5.2.2. Exfoliación de OGr en agua	59
5.2.3. Silanización de OG con APTES (OGA)	59
5.2.4. Glicación térmica de OGA con lactosa (OGAL)	60
5.2.5. Adsorción de doxorrubicina en OGAL (OGAL - DOX)	61
5.3. Caracterización de OG y sus modificaciones	61

5.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada (FTIR-ATR)	61
5.3.2. Ensayo con lectina ligando a enzima (ELLA)	62
5.3.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	62
5.3.4. Potencial Zeta	62
5.3.5. Ensayo de actividad hemolítica	63
5.3.6. Ensayo del MTT	64
5.3.7. Ensayo de bio-reconocimiento OGAL	65
5.3.8. Análisis estadístico	65
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	66
7. CONCLUSIONES	92
8. REFERENCIAS	93
9. ANEXO I.	110
Figura A1. Espectros FTIR de OGA y OGAL	
10. ANEXO II.	111
Tabla A1. Productos obtenidos	

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página.
1	Diferencia estructural entre grafito y óxido de grafeno. Presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, epóxidos y carboxilo, distribuidos de manera aleatoria en superficie y bordes laminares.	26
2	Representación estructural del óxido de grafeno con distribución aleatoria de grupos carbonilo, carboxilo, hidroxilo y epóxidos. Fuente: Dreyer y cols., 2009	27
3	Representación del modelo de Lerf – klinowski muestra la estructura de óxido de grafeno y la distribución de sus grupos funcionales. Fuente: Wei y cols., 2015.	28
4	Lado izquierdo densidad de carga alrededor del coloide; lado derecho, distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado. Fuente: Zeta, P., 1997	29
5	Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra la liberación libre de fármaco. Fuente: Liechty y cols., 2010.	38
6	Ejemplificación de las tres posibles estructuras cíclicas presentes en grafito y grafeno. 1, 3, 5 – ciclohexatrieno (rojo), 2, 4 – ciclohexadieno (azul) y ciclohexeno (verde).	40
7	Reacción de sulfonación e hidratación de cicloalquenos. a) 1, 3, 5 – ciclohexatrieno, b) 2, 4 – ciclohexadieno y c) ciclohexeno. Fuente: Eigler y cols., 2013.	42
8	Mecanismo de formación de grupos epóxidos en a) 2, 4 – ciclohexadieno y b) cicloalquenos presentes en grafeno y grafito.	43
9	Mecanismo de reacción de permanganato de potasio con ácido sulfúrico. Formación de ion heptóxido de dimagnesio, óxido de manganeso (VI) y productos secundarios.	43
10	Mecanismo de reacción de heptóxido de dimagnesio a) 1, 3, 5 – ciclohexatrieno (rojo), b) ciclohexeno (azul) y c) 2, 3 – ciclohexeno.	44
11	Esquema general formación de ácido carboxílico, siendo R el alqueno donde se lleva a cabo la escisión para la posterior introducción de grupos funcionales.	45

12	Oxidación de tolueno por reacción con permanganato de potasio en medio ácido. Formación de ácido carboxílico en la estructura de grafeno.	45
13	Sobre- oxidación de alcoholes para formación de aldehído (intermediario) y ácido carboxílico en la estructura de grafeno. En una primera etapa, el permanganato de potasio en ambiente ácido propicia un ataque nucleofílico seguido de la formación del grupo carbonilo (como intermediario), seguido de la deprotonación del grupo hidrato para la formación final de ac. carboxílico.	46
14	Ejemplificación de la formación de hidratos por protonación de oxígeno carbonílico presente en la estructura de grafeno.	47
15	Representación esquemática de la estructura y relación geométrica del sitio de unión del RAGPs. Fuente: Huang y cols., 2017.	54
16	Mecanismo de adsorción DOX sobre lamina de OG; (izquierda) vista superior y (derecha) vista lateral. Fuente: Vovusha y cols., 2018.	57
17	Funcionalización de OG con APTES. a) Esquema de reacción amino - silanización entre OG y APTES, b) Esquema general representa la obtención de OGA 1 y 2 (a, b) lámina gris con puntos rojos representa al oxido de grafeno, siendo los puntos rojos los diferentes grupos funcionales con oxígeno y la parte azul representa al APTES soportado.	68
18	a) Representación de la reacción de glicación del OGA con lactosa, b) esquema general de representación del OGAL.	69
19	Espectros de FTIR por la metodología de ATR. A) OGr 1, B) OGr 2, C) OG 1 y D) OG 2.	71
20	Espectros FTIR – ATR de OGAL 2b (rojo), y su intermediario OGA 2b (azul).	72
21	ELLA para el reconocimiento de OGAL por la lectina Ricinus communis. OGAL 1a (rojo-oscuro), OGAL 1b (rojo), OGAL 2a (azul) y OGAL 2b (azul-oscuro) Los valores de densidad óptica a 480 nm se compararon mediante la	74

	prueba t de Student. $p \leq 0.05$. Diferentes letras (a, b, c y d) indican la significación estadística ($p \leq 0.05$).	
22	Caracterización morfológica por AFM de: A) OGr 1, B) OGr 2, C) OG 1 y D) OG 2. Lado izquierdo OGr 1 y OGr 2; lado derecho: OG 1 y OG 2	75
23	Micrografías de OGA 2b (lado izquierdo) y OGAL 2b (lado derecho)	77
24	Evaluación del efecto hemolítico en GR tratados con muestras OGr y OG. Fila 1) muestra OGr 1; fila 2) OGr 2; fila 3) OG 1 y fila 4) OG 2. Control positivo (agua + eritrocitos), control negativo (PBS + eritrocitos). Los experimentos se hicieron por triplicado.	81
25	Representación gráfica porcentual de viabilidad de GR con OGr y OG. Los glóbulos rojos se incubaron con diferentes concentraciones (0.003 a 2 mg/mL) de OGr 1 (morado), OGr 2 (azul) y OG 1 (rojo), OG 2 (rojo-oscuro). La representación gráfica de la viabilidad de los glóbulos rojos se determinó en función del grado de hemólisis. Los datos son la media \pm desviación estándar para tres experimentos separados.	82
26	Ensayo de viabilidad de glóbulos rojos con OGA y OGAL. Los glóbulos rojos se incubaron con diferentes concentraciones (0.003 a 2 mg/mL) de OGAL 2b (rojo) y OGA 2b (azul). La representación gráfica de la viabilidad de los glóbulos rojos se determinó en función del grado de hemólisis. Los datos son la media \pm desviación estándar para tres experimentos separados.	83
27	Ensayo MTT con OGr y OG en células HeLa. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGr 1 (morado), OGr 2 (azul), OG 1 (rojo) y OG 2 (rojo-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.	84
28	Ensayo MTT con OGr y OG en células T47D. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGr 1 (morado), OGr 2 (azul), OG 1 (rojo) y OG 2 (rojo-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.	85

29	Ensayo MTT con OGr y OG en células HepG2. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGr 1 (morado), OGr 2 (azul), OG 1 (rojo) y OG 2 (rojo-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.	85
30	Ensayo MTT en células HeLa con OGA y OGAL. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGA 2a (azul), OGAL 2a (azul-oscuro), OGA 2b	86
31	Ensayo MTT en células T47D con OGA y OGAL. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGA 2a (azul), OGAL 2a (azul-oscuro), OGA 2b (verde) y OGAL 2b (verde-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.	87
32	Ensayo MTT en células HepG2 con OGA y OGAL. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGA 2a (azul), OGAL 2a (azul-oscuro), OGA 2b (verde) y OGAL 2b (verde-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.	87
33	Mecanismo de reacción entre OGAL y DOX. a) Representación de la adsorción de DOX en OGAL y b) esquema general de representación del OGAL- DOX.	89
34	Ensayo de reconocimiento de la célula HepG2. Primer hilera: cultivo celular HepG2, campo claro y campo oscuro, presencia de emisión fluorescente roja por excitación de doxorubicina. Segunda hilera: cultivo celular HeLa, ausencia de la molécula fluorescente por nula interacción carbohidrato- receptor.	90
35	Aparición de cuerpos apoptóticos tras la interacción de OGAL 2b – DOX con las células HepG2.	91
36	Propuesta de liberación de la DOX acarrado por OGAL en células cancerígenas de hígado.	92

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página.
1	Grupos que pueden formar puentes de hidrogeno en OG y DOX a pH 2, 7 y 10.	58
2	Nomenclatura del etiquetado de las muestras sintetizadas por el método de Hummers sin modificar y modificado	67
3	Nomenclatura del etiquetado de las muestras conjugadas con APTES	68
4	Nomenclatura del etiquetado de las muestras lactosiladas	70
5	Valores de potencial Z (mV), en diferentes solventes para las muestras OGr 1, OGr 2, OG 1 y OG 2.	77
6	Valores de potencial Z (mV) en diferentes solventes para las muestras OGA 1a, OGA 1b, OGA 2a y OGA 2b..	78
7	Valores de potencial Z (mV) en diferentes solventes para las muestras OGAL 1a, OGAL 1b, OGAL 2a y OGAL 2b.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

Gr. Grafito

OGr. Óxido de grafito

OG. Óxido de grafeno

OGA. Óxido de grafeno - APTES

OGAL. Óxido de grafeno - APTES – lactosa

DOX. Doxorrubicina

OGAL- DOX. Óxido de grafeno - APTES - lactosa – doxorrubicina

BEAS-2B. Células pulmonares humanas

A549. Células epiteliales de carcinoma de pulmón

RPMI – 8226. Células de mieloma múltiple

PEG. Polietilenglicol

DOC. Desoxicolato de sodio

OG - PEG. Óxido de grafeno - polietilenglicol

OG - DOC. Óxido de grafeno - desoxicolato de sodio

L929. Fibroblastos de ratones

PEI. Polietilenimina

HeLa. Células de carcinoma cérvico- uterino

OG – PEI. Óxido de grafeno - polietilenimina

GR. Glóbulos rojos

AST. Aspartato aminotransferasa

ALT. Alanina transaminasa

ALP. Fosfatasa alcalina

Dex. Dextrano

OG - Dex. Óxido de grafeno - dextrano

TMC. Trimetil quitosano

FA. Ácido fólico
KClO₃. Clorato potásico
HNO₃. Ácido nítrico fumante
H₂SO₄. Ácido sulfúrico
NaNO₃. Nitrato sódico
KMnO₄. Permanganato de potasio
H₃O⁺. Hidrónio
HSO₄⁻. Sulfato de hidrógeno
SO₃. Óxido de azufre VI
H₂O. Agua
(SO₄)⁻². Anión sulfato
Mn₂O₇. Heptóxido de dimagnesio
MnO₃⁺. Ion permanganato
H₂O₂. Peróxido de hidrogeno
O₃. Oxigeno gaseoso
H₂CO₃. Ácido carbónico
DMF. N, N-dimetilformamida
NMP. N-metil-2-pirrolidona
THF. Tetrahidrofurano
PTX. Paclitaxel
MA. Acrilato de metilo
FA. Ácido fólico
PTX – OG. Óxido de grafeno - paclitaxel
HSA. Albúmina de suero humano
VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular
ACC. Células de carcinoma adenoide
HA. Ácido hialurónico
B16F1. Células de melanoma

p Glu. Poliglutamato
p Lys. Polilisina
RAG. Receptor de ácido glicirretínico
RTf. Receptor de transferrina
GFR. Receptor de factor de crecimiento
AG. Arabinogalactano
CHC. Carcinoma hepatocelular
RAGP. Receptor de asialoglicoproteína
CDRs. Dominios de reconocimiento de carbohidratos
ELLA. Ensayo con lectina ligada a enzima
FTIR. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
AFM. Microscopía de fuerza atómica
SEM. Microscopía electrónica de barrido
MTT. Ensayo bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
RES. Retículo endotelial rugoso
ROS. Especies reactivas de oxígeno
GR. Glóbulos rojos
C3. Complemento 3
C4. Complemento4
C5. Complemento 5
C6. Complemento 6
PER. Efecto de permeabilidad y retención
APTES. 3-aminopropil trietoxisilano
FITC. Isotiocianato de fluoresceína
OPD. o- fenilendiamina
PBS. Tampón fosfato salino (siglas en ingles Phosphate buffered saline)
FBS. Suero fetal bovino
DMEM. Dulbecco's Modified Eagle Medium

RPMI. Medio Roswell Park Memorial Institute

IC₅₀. Concentración inhibidora

CO₂. Dióxido de carbono

nm. nanometros

mW. megawalts

PTX - paclitaxel

MA - Acrilato de metilo

Pluronic P123 - polietilenglicol – polipropilenglicol – polietilenglicol

RES - Retículo endotelial rugoso

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un sistema transportador de doxorubicina (DOX) a base de óxido de grafeno - APTES (OGA) lactosilado (OGAL) para el direccionamiento específico hacia el receptor de asialoglicoproteína (RAGP) en células de cáncer hepático. Las variaciones en la etapa de oxidación durante el proceso de síntesis, fueron importantes en la cantidad de lactosa conjugada en el producto final, ya que existe una estrecha relación entre el número de grupos funcionales dispuestos en la superficie de óxido de grafeno (OG) y la cantidad de lactosa presente en las láminas del mismo. Estas modificaciones estructurales del material fueron analizadas por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), observándose la presencia de grupos característicos de OGAL a los 3200 cm^{-1} (-OH), 1719 cm^{-1} (C=O), 1059 cm^{-1} (C-O-C), 1050 cm^{-1} (Si-O) y 940 cm^{-1} (C-O) para lactosa. Este resultado fue confirmado por un ensayo con lectina ligando a enzima (ELLA), indicando la lactosilación de las muestras. El tamaño y morfología fue analizado por microscopía de fuerza atómica (AFM) donde se mostró un tamaño laminar de 400 nm por 3 nm de espesor. En cuanto a las pruebas de compatibilidad, se realizaron evaluaciones de actividad hemolítica en glóbulos rojos y ensayo de citotoxicidad en diferentes líneas celulares cancerígenas donde para ambos casos, el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo por encima del 90%. Por último, se evaluó el reconocimiento específico mediado por la interacción lactosa - RAGP presentes en células HepG2, observándose un reconocimiento dependiente lactosa evidenciado por la emisión de fluorescencia a 570 nm. La adsorción exitosa del sistema y su reconocimiento tras esta modificación, se confirmó por microscopía confocal. Estos resultados proponen al óxido de grafeno lactosilado como un sistema transportador de doxorubicina con reconocimiento específico en receptores presentes en células hepáticas.

ABSTRACT

In this work, a graphene oxide - APTES (OGA) lactosylated transporter system for doxorubicin was developed for specific targeting to the asialoglycoprotein receptor (RAGP) in liver cancer cells. The variations in the oxidation stage during the synthesis process were important in the amount of conjugated lactose in the final product, since there is a close relationship between the number of functional groups arranged on the surface of graphene oxide (OG) and the amount of lactose present in its sheets. These structural modifications of the material were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), observing the presence of characteristic groups of OGAL at 3200 cm^{-1} (-OH), 1719 cm^{-1} (C = O), 1059 cm^{-1} (C-O-C), 1050 cm^{-1} (Si-O) and 940 cm^{-1} (CO) for lactose. This result was confirmed by an enzyme-linked lectin (ELLA) assay indicating lactosylation of the samples. The size and morphology was analyzed by atomic force microscopy (AFM) where a lamellar size of 400 nm by 3 nm thick was shown. Regarding the compatibility tests, evaluations of hemolytic activity in red blood cells, and cytotoxicity assay in different cancer lines were carried out. Finally, the specific recognition mediated by the lactose-RAGP interaction present in HepG2 cells was evaluated. Successful adsorption of the system and its recognition after this modification was confirmed by confocal microscopy. These results propose lactosylated graphene oxide as a doxorubicin transporter system with specific recognition in receptors present in liver cells.

1. INTRODUCCIÓN

Los avances en el desarrollo de sistemas con aplicaciones en el campo de la biomedicina, han llevado al diseño de materiales capaces de satisfacer las necesidades clínicas. Esto, se puede lograr con el desarrollo de sistemas nanoestructurados con direccionamiento hacia células vivas, por ejemplo, transportadores de fármacos capaces de atravesar la membrana celular sin producir toxicidad (Vila y cols., 2012). Para ello, se requiere de un vehículo estable cuyas propiedades fisicoquímicas permitan su transporte a través de entornos fisiológicos complejos, mientras que las modificaciones específicas aseguren la captación e internalización en las células diana (McCallion y cols., 2015).

En la actualidad, algunos investigadores han optado por el uso de matrices poliméricas inorgánicas, cuyas propiedades sean lo suficientemente buenas para sus aplicaciones en sistemas biológicos. Estudios recientes han vinculado al óxido de grafeno (OG) como posible sistema transportador de fármacos, debido a la capacidad de inmovilizar un gran número de moléculas en su superficie con estructura planar (Cao y cols., 2015).

Como características importantes del OG está su capacidad de dispersarse en agua y otras soluciones orgánicas; así mismo, la presencia de grupos funcionales oxigenados, sirven como sitios de modificación química para el direccionamiento biológico. Estas propiedades pueden emplearse para interactuar y acoplar en su estructura diversos fármacos, a través de enlaces covalentes o no covalentes (Chen y cols., 2010). En este sentido, resulta evidente el gran interés en este material, ya que la posibilidad de transportar fármacos hacia células, mediante afinidad

biológica, disminuiría los efectos tóxicos que presentan algunos compuestos terapéuticos (Stankovich y cols., 2007).

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el segundo tipo de cáncer con mayor frecuencia y la tercera causa de muerte a nivel mundial (Deng y cols., 2015; Aguilar y cols., 2015). Mas de medio millón de casos son diagnosticados anualmente, lo cual representa un problema de salud pública (Ferlay y cols., 2015). Lamentablemente, el CHC es uno de los pocos cánceres cuya incidencia se encuentra en aumento continuo; anualmente su prevalencia indica que la tasa de incidencia es muy similar a la tasa de mortalidad (Aguilar y cols., 2015).

Una estrategia para desarrollar tratamientos específicos, es mediante la modificación química del OG con lactosa. La lactosa se utiliza como ligando debido a que las células hepáticas presentan una alta expresión del receptor de asialoglicoproteína (RAGP) (500,000 RAGP por hepatocito), el cual cuenta con dominios de reconocimiento para galactosas (CDRs) (D'Souza y Devarajan, 2015; Huang y cols., 2017).

Por lo tanto, el estudio del proceso de obtención de OG y su posterior modificación con APTES (OGA) y lactosa (OGAL), es fundamental para determinar el biorreconocimiento, biocompatibilidad y capacidad de transportar doxorubicina hacia células de cáncer hepático. Esto generará conocimiento que podrá contribuir en el desarrollo de alternativas en el tratamiento del carcinoma hepatocelular (Cao y cols., 2015).

2. HIPÓTESIS

La incorporación de lactosa en la lámina de óxido de grafeno con doxorubicina permitirá su direccionamiento y reconocimiento específico al receptor de asialoglicoproteína presente en células de cáncer de hígado.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener óxido de grafeno lactosilado, con propiedades biocompatibles, para su aplicación como transportador de doxorrubicina con direccionamiento específico al receptor de asialoglicoproteína en células de cáncer de hígado.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Sintetizar OG por el método de Hummers con modificaciones químicas y mecánicas.
2. Lactosilar al óxido de grafeno mediante glicación térmica y caracterizar su química estructural por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y ensayo con lectina ligada a enzima (ELLA); morfología por microscopía de fuerza atómica (AFM), y estabilidad por potencial Z.
3. Evaluar el efecto hemolítico del OG, OGA y OGAL en glóbulos rojos.
4. Cuantificar el porcentaje de viabilidad de OG, OGA y OGAL en diferentes líneas celulares mediante el ensayo bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).
5. Inmovilizar doxorrubicina en el sistema OGAL
6. Estudiar la interacción específica de OGAL y OGAL-DOX en células de cáncer hepático.

4. ANTECEDENTES

4.1 Nanomateriales en la farmacología

La nanotecnología es un campo multidisciplinario con gran impacto en áreas como electrónica, materiales y medicina (Mnyusiwalla y cols., 2003). Con el surgimiento de la nanomedicina, se intensificaron los esfuerzos por mejorar el diagnóstico, monitoreo y tratamiento para el control de diversas enfermedades (Moghimi y cols., 2005). Esta área se enfoca en el diseño y formulación de nanomateriales que cumplan con el transporte y reparto de fármacos, manteniendo un alto grado de especificidad. Los nanomateriales con aplicaciones biomédicas, son compuestos coloidales cuyos tamaños varían entre los 20 hasta 200 nm. (Bobo y cols., 2016). La ventaja de estos materiales es que ofrecen la posibilidad de transportar fármacos insolubles, protegiéndolos y mejorando su distribución en tejidos. Por esta razón, se espera que la nanotecnología en la farmacéutica represente un avance significativo en el desarrollo de tratamientos de diversas enfermedades, especialmente el cáncer (Hirsjarvi y cols., 2011).

4.1.1. Biomateriales y sus aplicaciones

Los biomateriales son aquellos capaces de estar en contacto con el cuerpo humano, durante un tiempo determinado, sin afectar o inducir un efecto nocivo para el organismo. La característica para ser considerado biomaterial es cumplir con dos criterios: ser biocompatibles y ser bio-funcionales (Piña., 2010). Según el origen del material, se clasifican en dos grandes grupos: polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los primeros se aplican principalmente en la industria biomédica, entre los más usados se encuentra la seda, colágeno, elastina, alginato, quitosano y celulosa; estos polímeros buscan reemplazar a los sintéticos (Loureiro dos Santos., 2017).

Por otro lado, los polímeros sintéticos son más versátiles y propensos a modificación química: Esto último amplía el margen de aplicación a fin de satisfacer necesidades específicas (Tang y cols., 2014). Algunos ejemplos de

estos polímeros son los poliacrilatos, poliamidas, policarbonatos, polioles, entre otros (Kumbar y cols., 2014; Osorio-Delgado y cols., 2017)

La mayoría de los polímeros, sus derivados o copolímeros tienen aplicaciones en la ingeniería tisular o regenerativa de piel, músculo, hueso y vasos sanguíneos, sin embargo, muchas matrices poliméricas tanto sintéticas como naturales, comienzan a utilizarse en áreas de la nanomedicina y farmacología (Israni y cols., 2019; Tang y cols., 2014). Idealmente estos materiales deben ser biodegradables, biocompatibles, bio-absorbibles y bioactivos (Osorio-Delgado y cols., 2017). Es decir, los materiales deben involucrarse en procesos metabólicos, ser capaces de degradarse y excretarse en orina (Shanmugam y Sahadevan., 2018).

4.1.2. Matrices poliméricas sintéticas y naturales

En la actualidad, las matrices poliméricas poseen una gran cantidad de aplicaciones entre las que destaca como sistemas de administración controlada. Existen varios tipos de nanoestructuras poliméricas estudiadas para el transporte y liberación de fármacos; estas estructuras pueden ser de origen natural o sintético (Kamaly y cols., 2016). Recientemente se ha propuesto al OG como una matriz polimérica prometedora, ya que tiene la ventaja de inmovilizar por adsorción superficial al agente terapéutico durante mayor tiempo, teniendo una eficiencia de carga superior a los polímeros naturales. Por ello, se han hecho esfuerzos de encontrar en este sistema una aplicación confiable en el campo de la farmacología (Doppalapudi y cols., 2016; Kamaly y cols., 2016).

4.2. Grafeno y sus derivados

El grafeno es una lámina de hidrocarburo aromático policíclico dispuestos en forma hexagonal plana (Boehm y cols., 1962) (Figura 1). El grafeno es estructuralmente análogo al grafito (Gr) y solo se diferencia de él, por disposición espacial del apilamiento laminar de sus capas. Este apilamiento se debe a las interacciones de Van der Waals que predominan entre ellas, manteniendo un espacio de separación de aproximadamente 6 Å (Ruoff y cols., 2009). El grafeno, en cambio, se constituye de una sola lámina, lo cual le confiere al material

propiedades electrónicas, ópticas y mecánicas, que lo hace especialmente atractivo, tanto en investigación como posibles aplicaciones en la electrónica, informática, sector energético, entre otros (Soldado y cols., 2010).

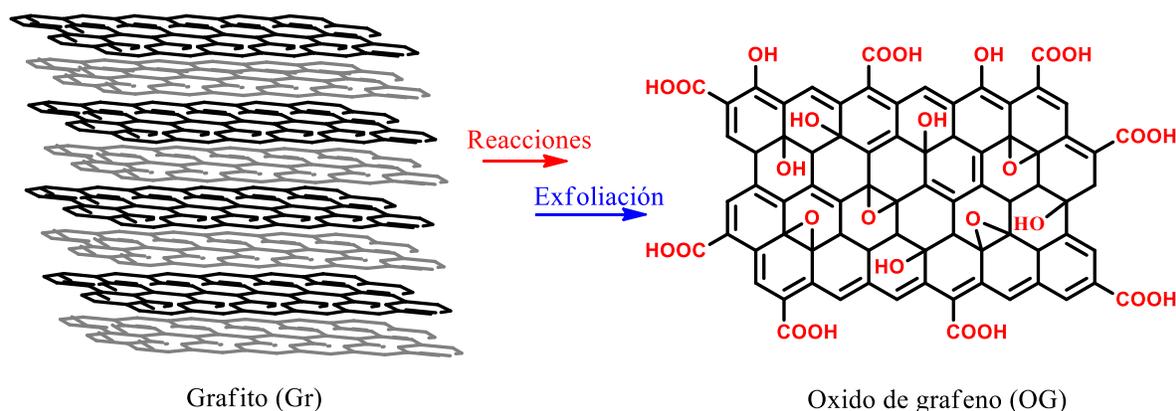


Figura 1. Diferencia estructural entre grafito y óxido de grafeno. Presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, epóxidos y carboxilo, distribuidos de manera aleatoria en superficie y bordes laminares.

4.2.1. Propiedades del grafeno

El grafeno posee gran área superficial, movilidad eficiente de electrones, buena conductividad térmica y eléctrica (Sohail y cols., 2017). La estructura del grafeno está constituida por átomos de carbono dispuestos en forma de hexagonal con interacciones covalentes y no covalentes, lo cual genera una especie de red por apilamiento de enlaces $\pi - \pi$. Este efecto de apilamiento y las interacciones hidrófobas, son las principales fuentes de unión de fármacos u otras moléculas, aunque el margen de interacción se encuentra limitado. Al funcionalizarlo; con otras moléculas afines, aumentan las posibilidades de aplicaciones médicas (Loh y cols., 2010; Dreyer y cols., 2010).

Las modificaciones estructurales del grafeno son cruciales en un ambiente biológico, pues al mantener constante interacción con proteínas, podría inducir una respuesta dañina por parte del sistema inmune del huésped, así como afección en la membrana celular que causarían toxicidad directa (Orecchioni y cols., 2017)

Para reducir los efectos nocivos del grafeno y mejorar propiedades como estabilidad, tamaño y funcionalización con otras moléculas, se ha propuesto el método de Hummers para su modificación (Botas y cols., 2013). Al introducir grupos oxigenados sobre las láminas de grafeno, estos servirán como agentes enlazantes para otras moléculas compatibles, facilitando con ello el acarreamiento y/o direccionamiento del sistema (Yang y cols., 2013).

4.2.2. Óxido de grafeno

El OG puede ser considerado un nanomaterial con propiedades únicas, debido principalmente a la composición de su estructura atómica (Figura 2). Actualmente, es ampliamente investigado para fines de tratamiento de aguas, producción de energía y sensores de contaminantes; sin embargo, gracias a su alta área superficial y gran disponibilidad de sitios activos, se ha propuesto para aplicaciones biomédicas (Perreault y cols., 2015). Esto debido a que el OG, al ser un material anfifílico, posee zonas hidrofílicas por los grupos carboxilos y especies oxidadas que permiten captar especies hidrofílicas por interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno, dispersándose fácilmente en agua y solventes polares.

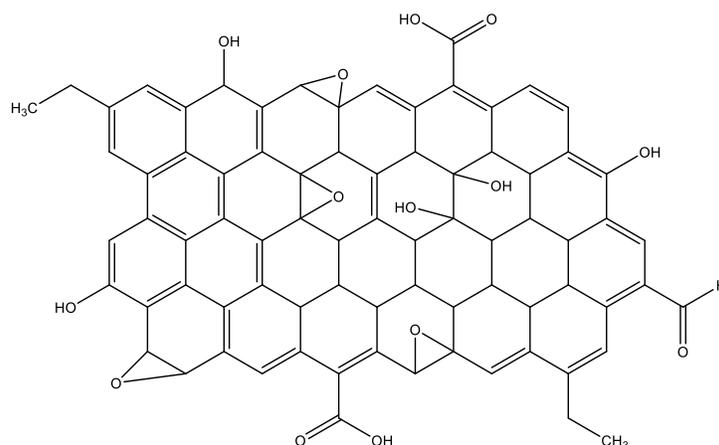


Figura 2. Representación estructural del óxido de grafeno con distribución aleatoria de grupos carbonilo, carboxilo, hidroxilo y epóxidos. Fuente: Dreyer y cols., 2009.

Por otro lado, la presencia de estos grupos resulta favorable para adicionar otros polímeros o moléculas bioactivas que cumplan el papel de transporte y orientación con fines terapéuticos (Rodríguez y cols., 2016).

4.2.2.1. Estructura química de OG

El OG posee un gran número de propiedades sobresalientes desde eléctricas, ópticas, térmicas e incluso biomédicas. Esto se deben principalmente a su estructura híbrida con dominios sp^2 y estados sigma de dominio sp^3 (Dikin y cols., 2007). Tras la oxidación del grafeno, su estructura molecular se modifica con la incorporación de grupos hidroxilo y epóxidos en los planos basales; grupos carboxilos y carbonilos en los bordes laminares (Schniepp y cols., 2006; Stankovich y cols., 2007). Esto se explica mejor con el modelo de Lerf – Klinowski (Figura 3), quien define la estructura de OG como dos regiones diferenciables entre sí. La primera zona es aquella donde predominan carbonos con hibridación sp^2 , es decir, levemente funcionalizada; y la segunda, donde existe una predominancia de carbonos sp^3 con alto grado de funcionalización (Schniepp y cols., 2006; Dreyer y cols., 2010).

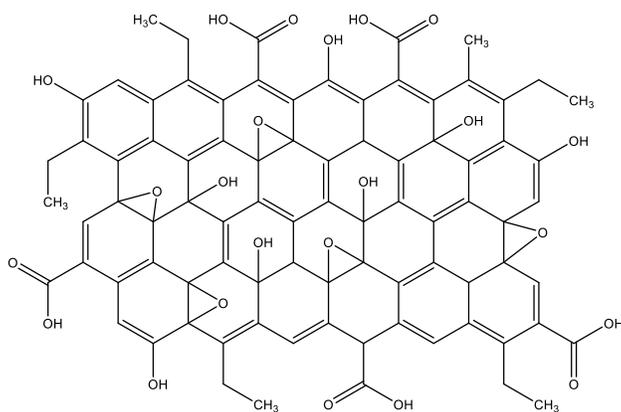


Figura 3. Representación del modelo de Lerf – klinowski muestra la estructura de óxido de grafeno y la distribución de sus grupos funcionales. Fuente: Wei y cols., 2015.

Estos grupos funcionales le confieren una carga superficial negativa al OG facilitando la exfoliación y la formación de coloides estables en agua (Dreyer y cols., 2014).

La unión covalente de oxígeno puede generar desorden y rugosidad en las mono - láminas de OG, esto provoca un fenómeno de apilamiento de múltiples capas, aumentando con ello el grosor y disminuyendo los tamaños laterales (Mkhoyan y cols., 2009). Para contrarrestar esto, diversos grupos han modificado las láminas

con polímeros hidrofílicos, y exfoliado adicionalmente al OG, logrando mejorar la estabilidad de suspensión en solución.

4.2.2.2. Estabilidad del OG en suspensión

La presencia de grupos oxigenados vuelve al OG altamente hidrofílico, actuando como agentes estabilizantes en solución acuosa (Rourke y cols., 2011). Estos grupos le confieren una carga superficial negativa, repeliendo las láminas entre ellas, evitando agregarse (Malvern., 2009).

En condiciones fisiológicas, el OG mantiene un comportamiento como coloide (Figura 4), su capacidad para permanecer suspendido en solución depende de las interacciones químicas de su superficie y la composición química del medio (Deng y cols., 2011). La presencia de iones, sales y biomoléculas en el medio, al interactuar con el OG provocarán fluctuaciones o agregados de las láminas suspendidas (Ren y cols., 2012; Feng y cols., 2011). Por esta razón, el OG al ser transferido a medios de cultivo celular, tiende a precipitar (McCallion y cols., 2015).

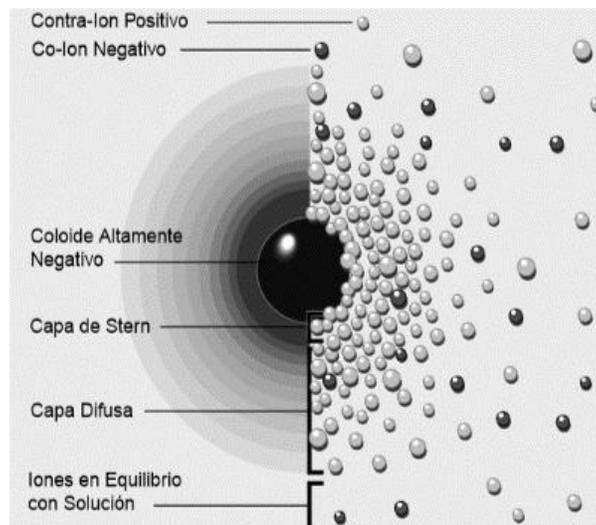


Figura 4. Lado izquierdo densidad de carga alrededor del coloide; lado derecho, distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado. Fuente: Zeta, P., 1997.

Otro factor importante es el tamaño y grosor de las láminas, ya que estas contribuyen a su estabilidad. Mientras más pequeñas, menor peso molecular, por ende, mayor el tiempo para sedimentar. Este parámetro puede mejorarse según las

condiciones de oxidación y las variaciones metodológicas implementadas (Dreyer y cols., 2014).

Para medir la estabilidad de un material, normalmente se realizan mediciones del potencial eléctrico del coloide en solución, o potencial Z. Este potencial es una medida de la atracción o repulsión electrostática entre el material en dispersión y las moléculas en el medio (Krishnamoorthy y cols., 2012). Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial Z cercano a cero, tenderán agregarse, pero si todas las partículas se encuentran cargadas, estas se repelerán entre sí y se mantendrán en suspensión.

Para que una suspensión sea considerada estable debe presentar un potencial absoluto de ± 30 mV.

Por ello, el diseño de materiales con fines terapéuticos debe priorizar la estabilidad en medios fisiológicos complejos, así como asegurar la permanencia de la funcionalidad específica de la molécula, sobre todo tras la unión de fármacos insolubles en la superficie (Mkhoyan y cols., 2009; Cao y cols., 2015).

4.3. Biocompatibilidad del OG

Un factor determinante en la toxicidad del OG es el método de síntesis utilizado debido a la gran variabilidad en composición y estructura generados (Marcano y cols., 2010). Esta diversidad estructural se debe a la interacción con diferentes contaminantes durante el proceso de síntesis, modificando las propiedades del OG obtenido (Chua y cols., 2012).

Las características físicas como tamaño, número de capas, forma e hidrofobicidad, así como las características químicas, como moléculas añadidas tras la funcionalización, son determinantes para disminuir drásticamente el efecto de toxicidad del OG en sistemas vivos (Yang y cols., 2013).

Vallabani y cols., (2011) exfoliaron térmicamente OG y evaluaron su toxicidad en células pulmonares humanas (BEAS-2B). Por citometría de flujo demostraron que el OG indujo citotoxicidad y apoptosis celular a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Resultados similares fueron reportados por Chang y cols., (2011) quienes evaluaron la toxicidad de OG células epiteliales de carcinoma de pulmón (A549). Los resultados mostraron que OG induce estrés oxidativo celular incluso a bajas concentraciones, así como ligera disminución de la viabilidad celular a altas concentraciones. Wu y cols., (2014) evaluaron la citotoxicidad de OG en células de mieloma múltiple (RPMI – 8226), mostrando baja citotoxicidad a concentraciones de 100 mg/L.

Diversos estudios han demostrado que la incorporación de polímeros biodegradables de origen natural como quitosano, ácido poliláctico y ciclodextrina, mejoran la biocompatibilidad y biodegradabilidad del OG (Depan y cols., 2011). Liu y cols., (2008) sintetizaron y funcionalizaron OG con polietilenglicol (PEG), reportando que tanto OG como OG - PEG, no mostraron toxicidad al interactuar con células cancerígenas de colon. Wojtoniszak y cols., (2012) sintetizaron y redujeron OG bifuncionalizado con PEG, desoxicolato de sodio (DOC) y Pluronic P123. Este estudio mostró mayor biocompatibilidad en el caso de OG - PEG y potencial toxicidad para OG-DOC y OG - pluronic P123 en fibroblastos de ratones (L929). Feng y cols., (2011) reportaron biocompatibilidad de OG - polietilenimina (PEI) a concentraciones de 300 µg/mL en células de carcinoma cérvico-uterino (HeLa). Los resultados de OG – PEI fueron ligeramente mejores a los obtenidos con OG, los autores lo atribuyen a la estabilidad mejorada de OG – PEI en ambiente fisiológico.

Otra estrategia novedosa ha sido modificar al OG con moléculas compatibles con células y biomoléculas del cuerpo humano, como azúcares, para mejorar la biocompatibilidad de esta matriz en la liberación controlada de moléculas terapéuticas. Adicionalmente, actuarían como ligando al interactuar con la membrana celular, promoviendo su endocitosis (Cao y cols., 2015). Esta orientación tiene un alto potencial para satisfacer los desafíos actuales en la terapia contra el cáncer. La biocompatibilidad del OG funcionalizado, ha generado gran interés como sistema de administración de genes, biosensores, bio imágenes, o bien,

aplicaciones antibacterianas, cultivo celular e ingeniería de tejidos (Liu y cols., 2013).

4.3.1. Bioacumulación

La cinética de distribución sanguínea está considerablemente relacionada con el tamaño de las partículas, así como con su geometría. Estudios realizados con nanoestructuras han demostrado que las partículas con diámetros inferiores a 30 nm son excretadas rápidamente vía sistema urinario, mientras que partículas superiores a los 500 nm, son fagocitadas y eliminadas a través del sistema retículo endotelial (Chen y cols., 2013).

La geometría de la escama de OG es crucial para la acumulación (Shen y cols., 2014). Aquellas nanopartículas que no puedan degradarse inducen la formación de granulomas por medio de la fagocitosis frustrada de macrófagos (Brown y cols., 2007; Ali-Boucetta y cols., 2011).

Reportes recientes han informado que la bioacumulación se ha visto afectada tras la funcionalización del grafeno (Li y cols., 2014). Moore y cols., (2014) reportaron que OG con PEG se acumulaba en retículo endotelial rugoso (RES) de bazo e hígado de ratón, pero rápidamente eliminado. Resultados similares fueron publicados por Yang y cols., (2011) quienes estudiaron la farmacocinética y biodistribución, del OG – PEG *in vivo* en ratones Balb/c. Estos datos mostraron bajos niveles de este material en la mayoría de los órganos transcurridos 3 días después de la inyección, exceptuando hígado y bazo cuya disminución fue relativamente lenta.

Diversos autores han comparado al OG sin funcionalizar y modificado con diferentes polímeros. En un estudio realizado por Li y cols., (2012), confirmaron en evaluaciones *in vitro* con macrófagos humanos, que el OG modificado con PEG causaba menor toxicidad directa y menor degradabilidad al entrar en contacto con estas células. Este grupo de investigación concluyó que los enlaces disulfuro usados para enlazar covalentemente ambos compuestos permitió que OG se degradara más fácilmente tras su interacción con la célula de interés. En este

sentido, la funcionalización OG con otros polímeros aumenta la biocompatibilidad y disminuye la polidispersidad del material; sin embargo, las interacciones adversas con células del sistema inmune, proteínas o moléculas de sistemas vivos, representan un desafío mayor en la estabilidad y funcionalidad de la molécula (McCallion y cols., 2015).

4.3.2. Compatibilidad en sangre

Diseñar un sistema administrador de fármacos, es indispensable evaluar su compatibilidad con los componentes sanguíneos (Zhang y cols., 2010). Los glóbulos rojos (GR) tienen una capacidad reducida de responder al estrés oxidativo que se genera tras la interacción del grafeno con entornos biológicos. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) tienden a interactuar con la membrana celular de los GR, induciendo daño celular (Wu y cols., 2014). La hemólisis es un indicador sensible del daño inducido por grafeno (Chowdhury y cols., 2013).

Estudios *in vitro* reportaron que el OG tiende agregarse al ponerse en contacto en medio de cultivo celular, sin embargo, no indujeron hemólisis a una concentración de 75 $\mu\text{g/mL}$ (Sasidharan y cols., 2012). Contradictoriamente Liao y cols., (2011) reportaron presencia de hemólisis a concentraciones inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ en OG tratado hidrotérmicamente. Esta discrepancia en resultados puede deberse a las diferencias en tamaño y grosor de las láminas de grafeno y OG obtenido, pudiendo inducir lisis en eritrocitos (McCallion y cols., 2015).

Singh y cols., (2011) reportaron la inducción de tromboembolismo pulmonar en ratones al suministrar OG y OG reducido, denotando el efecto protrombótico por acción de la carga superficial. Los autores relacionan la distribución de carga superficial del OG con la activación plaquetaria.

Diversos investigadores propusieron funcionalizar al OG con moléculas estructuralmente compatibles. Sasidharan y cols., (2015) reportaron niveles altos de enzimas hepáticas, en suero sanguíneo de ratones tras inyectar grafeno - PEG. Así mismo, los niveles de los marcadores bioquímicos hepáticos aspartato aminotransferasa (AST), alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP),

albúmina, globulina y proteína total se encontraron elevados a las 24 h del suministro, indicativo de daño hepático.

Otro factor importante a considerar es el espesor y los tamaños laterales de las láminas. McCallion y cols., (2015) informan sobre OG y OG - quitosano sintetizado a diferentes tiempos de sonicación. Los tamaños obtenidos fueron variados en el rango 10 μm , siendo las láminas de OG más exfoliadas las que indujeron mayor daño sobre la membrana eritrocitaria. Por el contrario, el OG recubierto con quitosano, causó un daño menor.

Un reporte similar fue presentado por Singh y cols., (2012), quienes sintetizaron grafeno funcionalizado con amina para evaluar su compatibilidad en ambientes biológicos. Este material no indujo estimulación plaquetaria ni tromboembolismo pulmonar en ratones. Se consideró que, tras inducir una carga parcial positiva en la superficie, este se vuelve más compatible en sangre que el OG sin modificar. Chowdhury y cols., (2013) funcionalizaron de forma no covalente grafeno con dextrano (Dex) y evaluaron los niveles del factor 4 plaquetario en sangre total de donantes. Se reportó que OG - Dex en dosis de 1 a 10 mg/mL no inducía activación plaquetaria. En ambas publicaciones, la modificación adicional de OG con un polímero bio-compatibles, mejoró su comportamiento en ambiente fisiológico.

En la actualidad, los esfuerzos por encontrar un material a base de grafeno con propiedades hemo-compatibles ideales, sigue siendo un reto para posibles aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos.

4.3.3. Inflamación y respuesta inmune

La interacción entre el biomaterial y las proteínas séricas del huésped, pueden inducir una respuesta inmune y activación del complemento (Tan y cols., 2013). Esto generaría una respuesta inflamatoria aguda o crónica, pudiendo desarrollar tejido de granulación y fibrosis (Osorio-Delgado y cols., 2017).

Para fines de aplicación biomédica, el OG debe cumplir con ciertos parámetros toxicológicos; se debe conocer la bio-distribución en órganos, la cinética sanguínea, la acumulación en tejido y su tasa de eliminación tras su administración (Yan y cols.,

2011). Además, numerosos grupos han reportado acerca de efectos inflamatorios e inmunosupresión de materiales de carbono en modelos animales (Zolnik y cols., 2010). El reconocimiento e interacción del grafeno con células inmunes puede inducir inmunomodulación y desarrollo de infecciones en el huésped (Sasidharan y cols., 2015).

Tanto el OG como sus derivados. pueden ocasionar respuestas sistemáticas adversas. Otro factor a considerar es la geometría de las láminas de grafeno. Yue y cols., (2012) realizaron evaluaciones con láminas de OG de dos dimensiones distintas, 350 nm y 2 μ m. Reportaron que aquellas de mayor tamaño, provocaron aumento en secreción de citocinas inflamatorias en líneas celulares de macrófagos. Este informe coincide con el publicado por Singh y cols., (2012), quienes reportaron que láminas de OG con gran tamaño, indujeron un aumento en el flujo de linfocitos y macrófagos en tejido adiposo tras una inyección subcutánea en ratones. Los autores atribuyen que estas formas son más reactivas químicamente, ya que las insaturaciones entre los átomos de carbono y la presencia de grupos funcionales como COOH y OH, confieren una carga parcial negativa, lo que, al interaccionar de forma directa con las células, modularía una ruta crítica de señalización celular atribuible a la carga superficial del material induciendo toxicidad celular.

Estudios presentados por Liu y cols., (2012) indican que la secreción de citocinas proinflamatorias puede ser menos marcada en células humanas que en macrófagos murinos. Este efecto fue observado tras múltiples inoculaciones OG de pequeño tamaño laminar, presentándose acumulación de células inflamatorias dentro del tejido hepático.

Por otra parte, Tan y cols., (2013) reportaron la unión entre OG y la proteína C3 del complemento, induciendo la activación de la cascada del complemento. Contrariamente OG - PEG evitó su unión con el complemento por repulsión estérica. Zhou y cols., (2012) informaron sobre la activación celular y secreción de citocinas proinflamatorias tras la ingesta de OG por macrófagos. Li y cols., (2014) reportaron inflamación y formación de edema pulmonar y granuloma en ratones tras la

administración sistémica de OG. Tkach y cols., (2013) reportaron que el grafeno suprime las interacciones entre las células dendríticas y los linfocitos T.

Predecir el comportamiento del sistema inmune tras interactuar con OG es sumamente complicado, pues tendría que evaluarse el comportamiento entre OG y quince tipos de células inmunitarias, como linfocitos T, leucocitos, monocitos, células NK y células dendríticas. Es importante funcionalizar el OG con moléculas de superficie como grupos amino, para así aumentar la compatibilidad con las células inmunitarias humanas (Orecchioni y cols., 2017).

4.3.4. Captación celular

La flexibilidad del material es fundamental al momento de transportar y orientar al sistema hacia una zona determinada. Los mecanismos de vectorización pasivos son muy atractivos, debido a que los materiales no necesitan una modificación complicada. Aunado a esto, aprovechar el efecto de permeabilidad y retención (PER) en la zona tumoral es ventajoso, ya que, tras la administración por vía intravenosa, el material vectorizado preferencialmente se acumulará en este sector (McCallion y cols., 2015). El efecto PER, es un fenómeno donde la vascularización, permeabilidad y drenaje linfático se encuentran disminuidos en la zona tumoral.

El OG presenta diferencias en su velocidad de captación celular, esto en función del tipo de célula involucrada. En células tumorales, por ejemplo, se ha demostrado ser más rápida, esto debido al gran área superficial de las láminas de OG y la demanda de requerimientos nutricionales que vulnerabiliza la endocitosis en estas células (Vila y cols., 2012).

El pH en el microambiente tumoral puede resultar favorable en la liberación de fármacos. El OG en condiciones neutras tiene una carga superficial negativa, sin embargo, en el ambiente ácido del tumor puede acercarse a positiva. Esto facilita la interacción con la membrana celular y su posterior endocitosis (Feng y cols., 2014).

Otra estrategia ventajosa es funcionalizar al OG con moléculas específicas (ligandos) que sean reconocidos por los receptores de la superficie celular. Este tipo

de transporte activo mejoraría el direccionamiento del sistema transportador hacia el tejido o célula diana, facilitando su captación (Peshattiwat y cols., 2019).

Hu y cols., (2014) sintetizaron un compuesto a base de OG, trimetil quitosano (TMC) y ácido fólico (FA) evaluando su capacidad de direccionamiento hacia el receptor de FA presente en células HeLa. Los resultados obtenidos fueron gratificantes, pues el material pudo internalizarse de manera eficiente a través de endocitosis mediada por el receptor FA. Estos resultados fueron contrastados con un control negativo, células A549 donde no se sobre- expresan estos receptores.

El OG al tratarse de una macromolécula, su modo de transporte es activo, y su mecanismo de entrada sigue una vía clásica. Esta consiste en un proceso impulsado por el receptor de membrana celular, donde la proteína transportadora citoplasmática reconoce a esta macromolécula y lo transloca hacia los poros nucleares (Lange y cols., 2007).

Esta velocidad de absorción, relacionada con el tamaño y volumen, es debido a las interacciones catiónicas multivalentes del OG con las células. Partículas de mayor tamaño necesitan una fuerza motriz más fuerte y energía adicional en el proceso de internalización (Vila y cols., 2012). Se considera que láminas con un tamaño en el rango de los 100 a 200 nm, con disposición catiónica de sus grupos funcionales, mejorarán el proceso de internalización.

4.4. Aplicaciones biológicas del OG

Los esfuerzos por lograr avances en el área biomédica han llevado al desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Bajo este criterio, los materiales con finalidad biológica, además de no presentar citotoxicidad, deben mantener la respuesta celular adecuada una vez aplicado en el humano (Williams y cols., 2009).

Un criterio importante en el OG son las dimensiones laminares, sobre todo cuando se habla de absorción celular, aclaramiento renal, transporte de la barrera hematoencefálica, degradación y otros fenómenos biológicos, donde tienen un papel fundamental (Liu y cols., 2013). El pequeño tamaño del OG facilita la entrada

en la célula tras la interacción, y presenta gran estabilidad en solución, aumentando la dispersión (Sánchez y cols., 2012).

Por esta razón, las láminas de OG de tamaño nanométrico presentan mejores características para aplicaciones biomédicas. Otro parámetro importante es la carga superficial, la forma laminar y la química en superficie, donde los grupos funcionales presentes faciliten su interacción con otras moléculas estructuralmente compatibles (Depan y cols., 2011; Liu y cols., 2013).

4.4.1. Sistemas transportadores de fármacos

El uso de nanomateriales a base de grafeno supone una amplia gama de aplicaciones biomédicas relacionadas como agente terapéutico en modelos *in vitro* e *in vivo* (Yue y cols., 2012; McCallion y cols., 2015). Los sistemas vectorizados con liberación controlada, ofrecen la ventaja de mantener una liberación sostenida durante un tiempo mayor respecto al fármaco convencional (Liechty y cols., 2010). La Figura 5 compara al sistema de administración de fármacos convencional y un sistema de liberación controlada conforme el tiempo, donde se muestra las diferencias de estabilidad con oscilaciones en la concentración mínima de toxicidad en comparación con un mejor comportamiento sostenido en la liberación controlada.

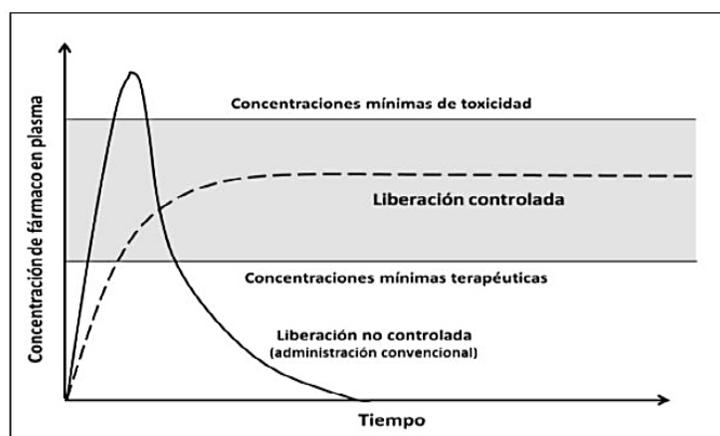


Figura 5. Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra la liberación libre de fármaco. Fuente: Liechty y cols., 2010.

Esta posibilidad del OG por transportar moléculas terapéuticas se debe a la presencia de grupos funcionales con capacidad de interaccionar con diversas

moléculas debido a su estructura planar bidimensional. Esta propiedad permite que el OG se considere un buen material para una amplia gama de aplicaciones en la farmacología (Liu y cols., 2013). Por otro lado, la funcionalización del OG con moléculas que promuevan la selectividad hacia receptores de los órganos, puede generar especificidad y eficacia terapéutica, así como seguridad debido a la disminución efectos secundarios en el organismo (Cao y cols., 2015).

Estudios *in vivo* relacionados con OG funcionalizado con un polímero, demostraron una acumulación en el sistema retículo endotelial en hígado y bazo, lo que sugirió una fácil eliminación del cuerpo con ausencia de citotoxicidad; por otra parte, cuando se administró OG sin funcionalizar, este se acumuló en pulmón, produciendo edema y formación de granulomas. Por esta razón, es importante la funcionalización del OG para sus potenciales aplicaciones biomédicas (Chung y cols., 2013).

4.5. Métodos de síntesis de OG

Para la obtención de OG existen tres métodos principales de síntesis: método de Staudenmaier, Brodie y Hummers - Offeman, diferenciándose entre sí, por el tipo de reactivo utilizado (Krishnamoorthy y cols., 2013).

Brodie en 1859, fue el primero en sintetizar de forma exitosa láminas de OG. Este método consistió en poner a reaccionar clorato potásico (KClO_3) con grafito y ácido nítrico fumante (HNO_3) (Brodie, 1859). Años más tarde, Staudenmaier propuso mejorar este método añadiendo ácido sulfúrico (H_2SO_4) y varió los tiempos de adición del KClO_3 a la reacción, como resultado, obtuvo láminas de OG de menor tamaño y mejor estabilidad (Poh y cols., 2012). Finalmente, en 1985, Hummers y Offeman propusieron reemplazar HNO_3 por nitrato sódico (NaNO_3) e hicieron reaccionar grafito con una mezcla de permanganato de potasio (KMnO_4) y H_2SO_4 (Hummers y Offeman, 1958). Debido a la facilidad de producción y bajos costos, el método de Hummers - Offeman es el más utilizado en la actualidad, sin embargo, cada grupo de trabajo puede realizar variaciones metodológicas en el proceso de síntesis. Las variaciones pueden ser en el tipo de ácido, las cantidades de reactivos

utilizado, los tiempos de reacción y/o la temperatura de reacción (Edwards y Coleman, 2013).

Dependiendo del método de síntesis utilizado, las características estructurales del OG, como tamaño, grado de oxidación y cantidad de grupos funcionales tendera a variar, y dependiendo del interés, permitirá transportar fármacos hidrofóbicos en superficie (McCallion y cols., 2015).

4.5.1. Método de Hummers. Oxidación de grafito

Durante este proceso, el grafito se oxida progresivamente con agentes químicos en medio ácido, introduciendo sobre su estructura, un gran número de grupos funcionales que contienen oxígeno (Chua y cols., 2012) (Figura 6). La forma más común de grafito utilizado para estas reacciones es en polvo, el cual ha sido purificado para eliminar la contaminación heteroatómica (Wissler., 2006).

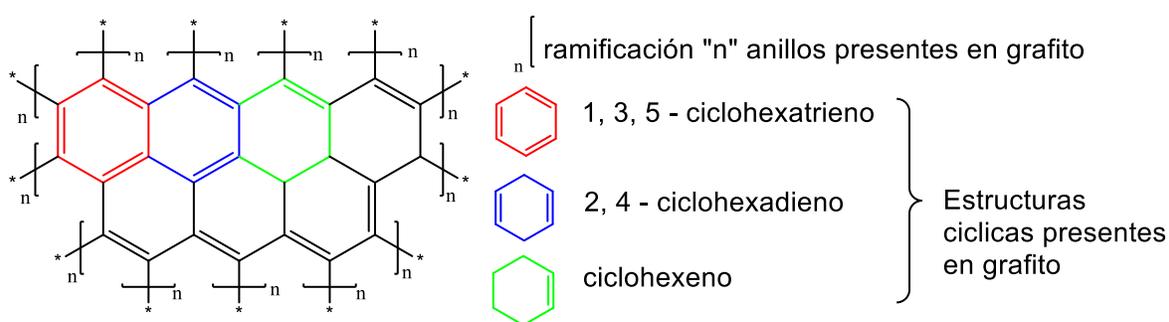


Figura 6. Ejemplificación de las tres posibles estructuras cíclicas presentes en grafito y grafeno. 1, 3, 5 – ciclohexatrieno (rojo), 2, 4 – ciclohexadieno (azul) y ciclohexeno (verde).

El grafito estructuralmente está constituido por capas estrechamente alineadas y apiladas (Dimiev y cols., 2014). El tamaño de estas láminas en su estado natural, influye en la disposición final de los grupos funcionales, ya que láminas de mayor tamaño tienen un mayor grado de intercalación que las pequeñas (Ling., 2019). Para facilitar la introducción de grupos oxigenados, es necesario aumentar las distancias interlaminares del grafito. Esto se logra mediante la permeabilidad de moléculas pequeñas, disminuyendo las fuerzas de interacción que mantiene unidas las láminas (Ibarra - Hernández y cols., 2018). De forma secuencial, los agentes

oxidantes reaccionarán rápidamente con los átomos de carbono insaturados (Park y cols., 2009).

El método de Hummers señala el uso de H_2SO_4 , NaNO_3 y KMnO_4 como agentes oxidantes para la obtención de OG, generando durante su reacción gases tóxicos: NO_2 y N_2O_4 (Marcano y cols., 2010).

La primera etapa de la reacción comienza entre H_2SO_4 y grafito. Al ser un medio muy ácido, podemos identificar diferentes tipos de iones: el hidrónio (H_3O^+), el sulfato de hidrógeno (HSO_4^-), óxido de azufre VI (SO_3) y agua (H_2O). Estos iones participan activamente durante el proceso de sulfonación entre HSO_4^- y los carbonos insaturados presentes en grafito (Figura 7).

Sulfonación e hidratación de cicloalquenos

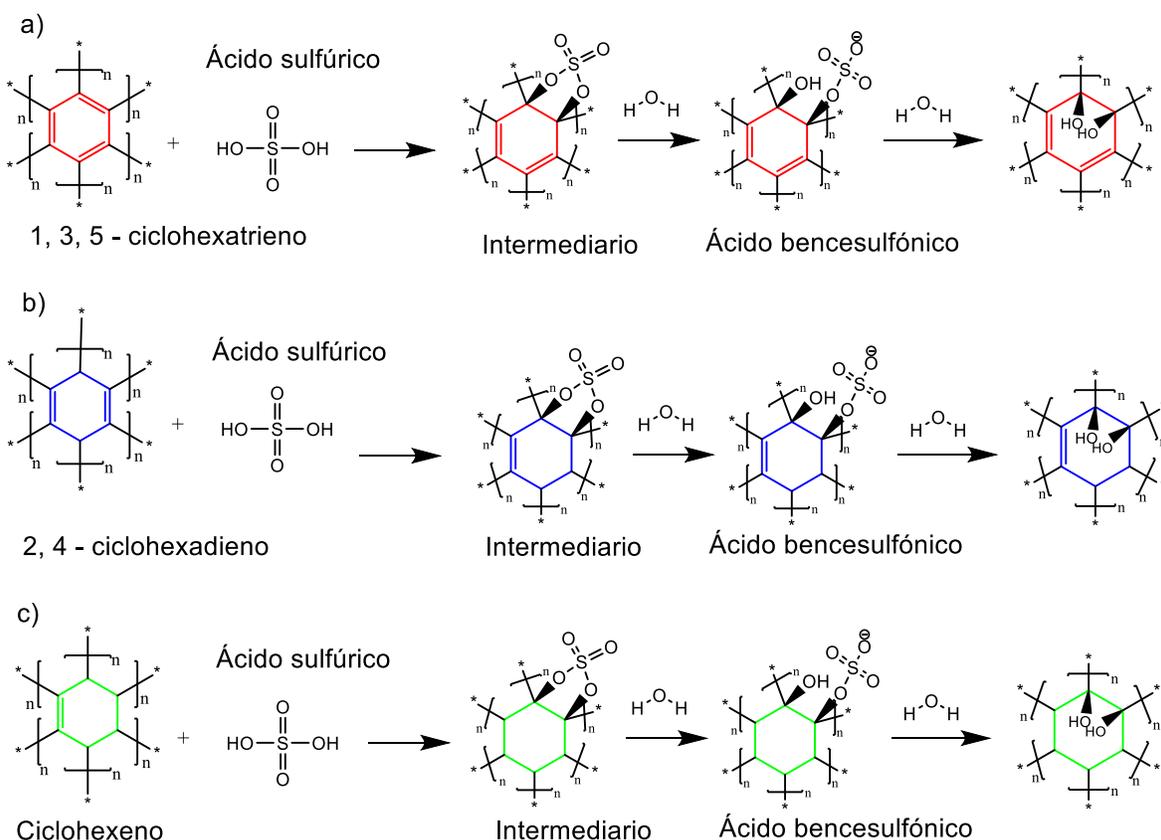


Figura 7. Reacción de sulfonación e hidratación de cicloalquenos: a) 1, 3, 5 – ciclohexatrieno, b) 2, 4 – ciclohexadieno y c) ciclohexeno. Fuente: Eigler y cols., 2013.

Como intermediario se obtiene el organosulfato, ácido bencensulfónico (Eigler y cols., 2013). Esto se evidencia durante la reacción con la aparición de un color azul - oscuro, conocido como *grafito azul* (Dimiev y cols., 2014).

Por afinidad electroquímica, el ataque nucleofílico se dará en los dominios sp^2 de los átomos de carbono. Esta unión se estabilizará con la formación de dominios sp^3 , repercutiendo su estructura con la aparición de regiones amorfas (Sheshmani y cols., 2013).

Simultáneo a esto, las moléculas de agua producen hidrólisis del organosulfato cíclico formando un nuevo enlace C – O e introduciendo aleatoriamente en bordes y superficie laminar, grupos hidroxilos, fenoles y epóxidos, tras la oxidación de alquenos sustituidos con fenilo (Yapu y cols., 2013; Eigler y cols., 2013) (Figura 8). Por la reactividad de los grupos epóxidos presentes en las láminas, es posible la formación de sulfatos covalentes reticulares con intermediarios vecinos.

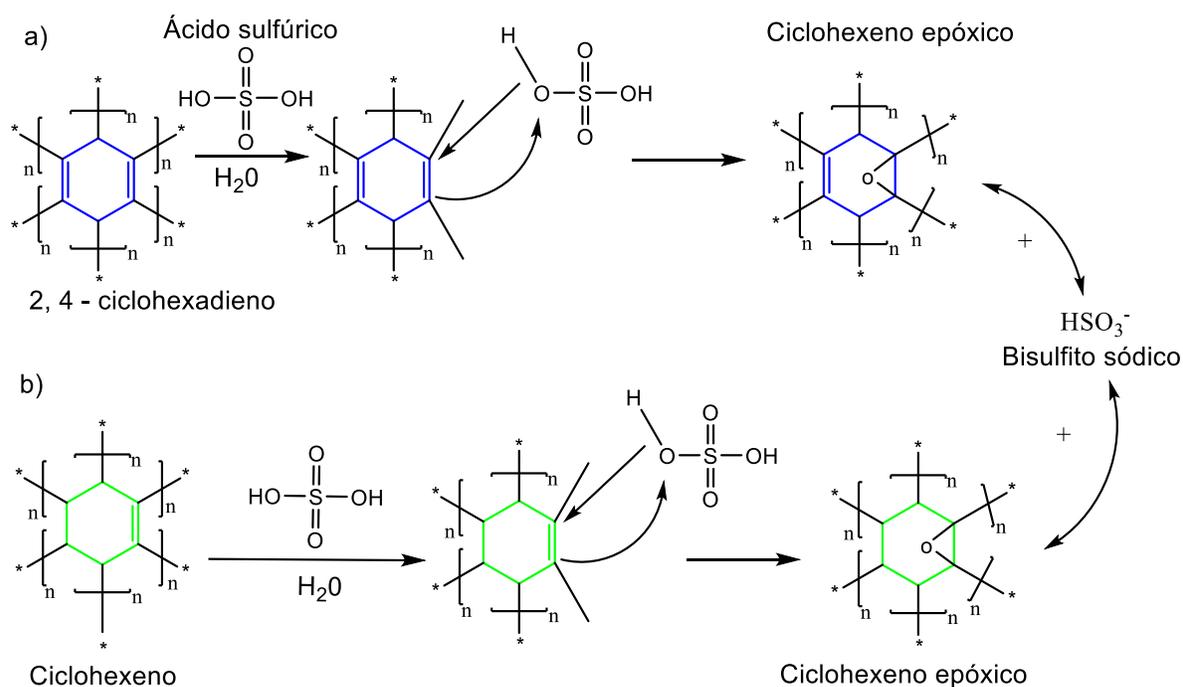


Figura 8. Mecanismo de formación de grupos epóxidos en a) 2, 4 – ciclohexadieno y b) cicloalquenos presentes en grafeno y grafito.

La segunda etapa de la reacción comienza tras la adición de NaNO_3 a la solución.

Esta molécula se ioniza en Na^+ y NO_3^- , actúan junto con el anión sulfato $(\text{SO}_4)^{-2}$ aumentando el espacio interlamilar, de esta manera, los agentes oxidantes penetran con mayor facilidad por estos espacios (Sheshmani y cols., 2013).

Al polarizarse estas moléculas, atraen a las especies iónicas de carga opuesta y, en las capas más externas del grafito, se introducen estos iones y provocan una expansión y separación (Jerónimo y cols., 2019).

Además de evitan el re- apilamiento, estas moléculas favorecen la rotura de capas gráficas y penetración del KMnO_4 , dando lugar a una mayor formación de grupos oxigenados (Rodriguez- Pastor y cols., 2014).

La tercera etapa se añade KMnO_4 al preparado anterior, habiendo una reacción inmediata. Como producto de la reacción entre KMnO_4 y los demás reactivos se forma el heptóxido de dimagnesio (Mn_2O_7) y óxido de manganeso (VI) (MnO_3^+) (Figura 9) a quienes se les atribuye como agentes oxidantes selectivo de hibridaciones sp^2 (Dzhabiev y cols., 2005).

Mecanismo de reacción

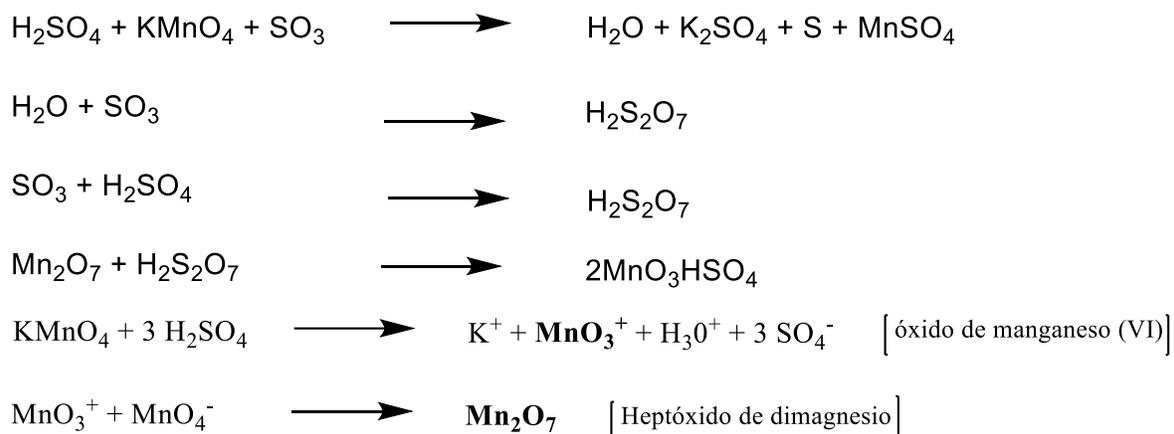


Figura 9. Mecanismo de reacción de permanganato de potasio con ácido sulfúrico. Formación de ion heptóxido de dimagnesio, óxido de manganeso (VI) y productos secundarios.

El ataque nucleofílico se dará al contacto con los anillos aromáticos presentes en el grafito (Cepeda y cols., 2017). De las tres estructuras presentes aleatoriamente en la superficie de las láminas de grafito (1, 3, 5 – ciclohexatrieno, 2, 4 – ciclohexadieno y ciclohexeno), los iones anteriormente mencionados pueden reaccionar con las insaturaciones de sus anillos y generar nuevas estructuras (Figura 10). La reacción del KMnO_4 en medio ácido se evidencia con la aparición de un color verde oscuro (Roger y cols., 1961).

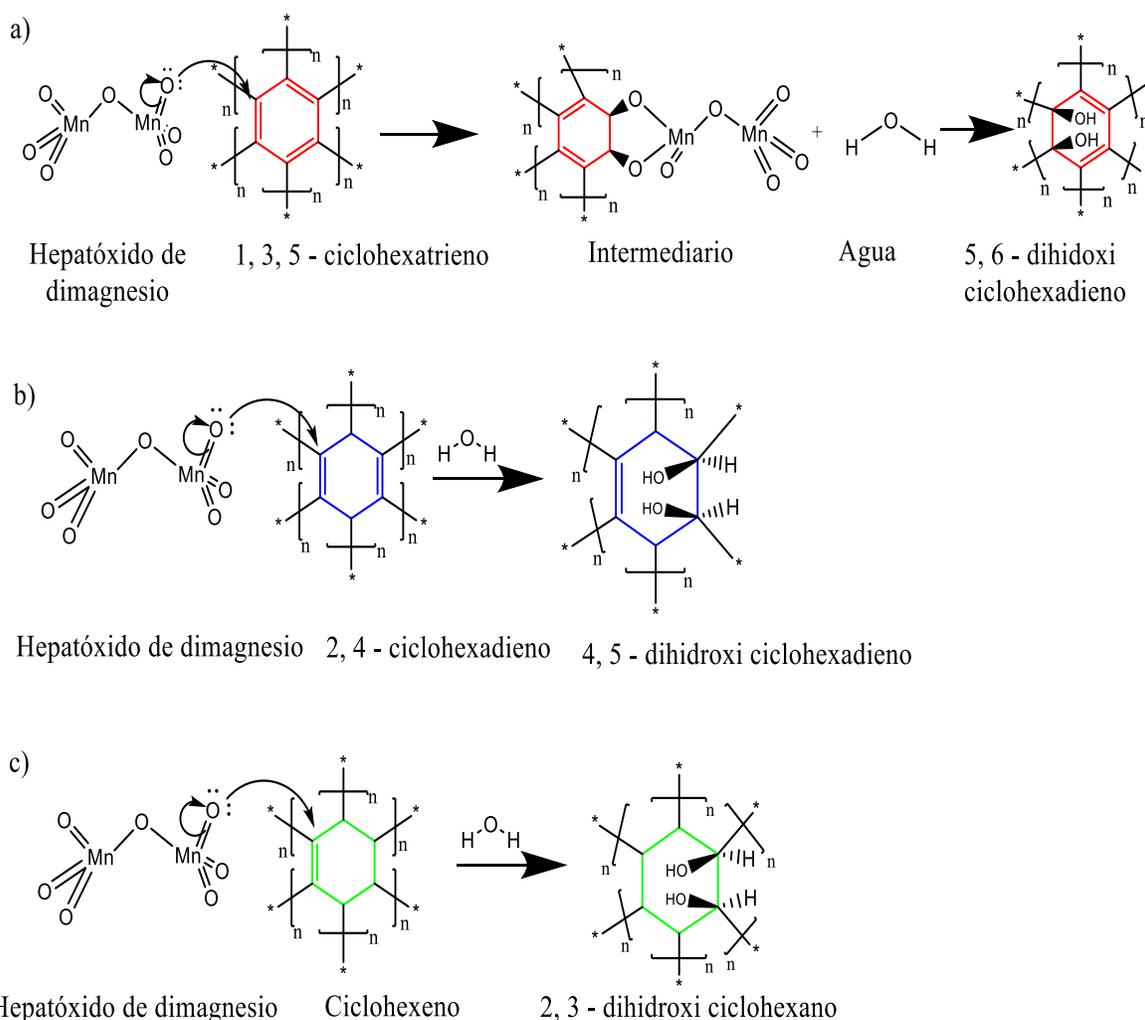


Figura 10. Mecanismo de reacción de hepatóxido de dimagnesio a) 1, 3, 5 – ciclohexatrieno (rojo), b) ciclohexadieno (azul) y c) 2, 3 – ciclohexeno.

La presencia de otros iones con reactividad menor, es probable que también participen en el proceso de oxidación, sobre todo en las zonas vulnerables del grafito, como aquellas donde el grupo oxígeno sea un intermediario y posteriormente

se estabilice (Ibarra-Hernández y cols., 2018). De esta manera, el grado de oxidación sobre la estructura dependerá de la difusión de estas moléculas y la morfología de las láminas (Eigler y cols., 2013). Los átomos de carbono unidos a los grupos OH distorsionan ligeramente su estructura tetraédrica, lo cual arruga parcialmente la lámina. Esto se debe a que la estructura es casi plana en regiones bencénicas (Ling., 2019).

El agente oxidante necesita reemplazar moléculas intercalantes existentes o insertarse entre ellas. Este paso determina la velocidad de formación del OG (Dimiev y cols., 2014). Tras la interacción con alcoholes y fenoles, continuará la oxidación para la formación carbonilos y ácidos carboxílicos (Figura 11).

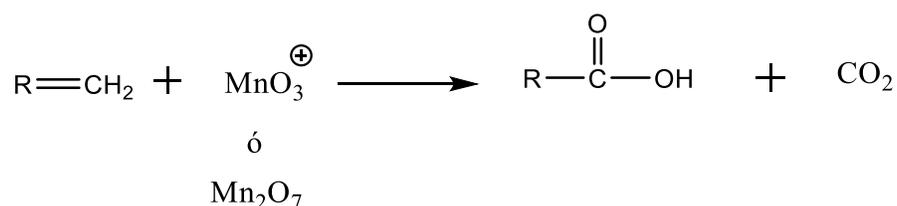


Figura 11. Esquema general formación de ácido carboxílico, siendo R el alqueno donde se lleva a cabo la escisión para la posterior introducción de grupos funcionales.

La pérdida de continuidad en los bordes laminares del grafito también deja expuesto a sufrir oxidación por acción de estos agentes (Yapu y cols., 2013). Las estructuras cíclicas terminales, el grupo reaccionante es metilo, dando como resultado la formación de ácido carboxílico (Figura 12).

Oxidación de alquilbenceno

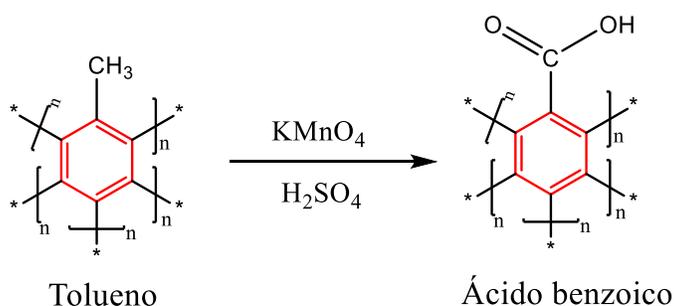


Figura 12. Oxidación de tolueno por reacción con permanganato de potasio en medio ácido. Formación de ácido carboxílico en la estructura de grafito.

En el caso de los grupos funcionales hidroxilos terminales, el esquema de reacción se puede generalizar con una reacción con el grupo fenol y KMnO_4 , produciendo como intermediario el grupo aldehído, donde tras una progresión oxidativa, tenderá a formarse el grupo hidrato y finalmente ac. carboxílico en la estructura de grafeno por sobre- oxidación de alcoholes (Figura 13).

Reacción de alcoholes primarios y secundarios (alquibenceno). Sobreoxidación de alcoholes

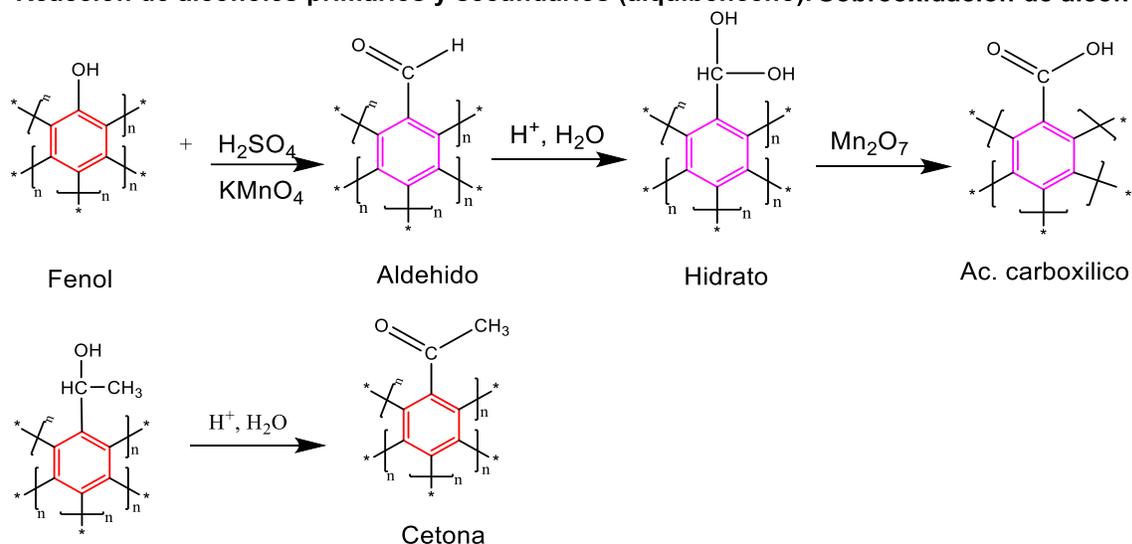


Figura 13. Sobre- oxidación de alcoholes para formación de aldehído (intermediario) y ácido carboxílico en la estructura de grafeno. En una primera etapa, el permanganato de potasio en ambiente ácido propicia un ataque nucleofílico seguido de la formación del grupo carbonilo (como intermediario), seguido de la deprotonación del grupo hidrato para la formación final de ac. carboxílico.

La cuarta etapa consiste en un proceso de purificación de la solución, para ello se adiciona peróxido de hidrogeno (H_2O_2) con la finalidad de eliminar el exceso de permanganato y dióxido de manganeso (Zaaba y cols., 2017).



El peróxido al ser altamente polar, se descompone en oxígeno gaseoso (O_2) y agua, lo cual implica una reacción altamente exotérmica (Bascuñan y cols., 2007). Esto resulta termodinámicamente desfavorable debido a pirólisis de grupos que contienen oxígeno, produciendo monóxido y dióxido de carbono en forma de vapor. Por esta razón, OGr resulta ser heterogéneo en su química superficial, mostrando

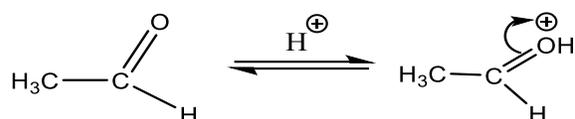
tras su exfoliación y posterior funcionalización, una distribución superficial diferente (Wilson y cols., 2009; Dreyer y cols., 2010). Paso seguido, se adiciona agua miliQ (H₂O) para remover residuos y absorber el CO₂, que al disolverse forma ácido carbónico (H₂CO₃), de ahí el aumento de la acidez.



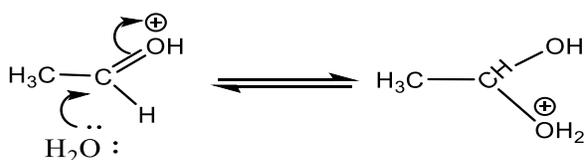
Es posible que, tras entrar en contacto con agua, los ácidos carboxílicos presentes en OGr sufran una protonación del oxígeno y formen hidratos (Figura 14).

Mecánismo de reacción

Etapa 1. Protonación del oxígeno carbonílico.



Etapa 2. Ataque nucleófilo del agua al carbonilo protonado



Etapa 3. Desprotonación del hidrato

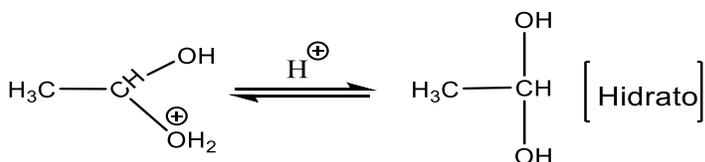


Figura 14. Ejemplificación de la formación de hidratos por protonación de oxígeno carbonílico presente en la estructura de grafeno.

La basificación del medio para llegar a la neutralidad se hace con NaOH, donde los ajustes del pH ocasionan una reacción adicional:

$\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_3^- + \text{H}^+$ El OGr obtenido tiene un color mucho más claro que el grafito debido a la pérdida de conjugación electrónica provocada por el proceso de oxidación (Lerf y cols., 1998). Su aspecto es áspero y rugoso, de forma laminar con bordes irregulares (Mkhoyan y cols., 2009).

La morfología laminar, su dimensión y transparencia, dependerá del grado de oxidación y la estrategia de exfoliación utilizada durante la síntesis (Krishnamoorthy y cols., 2013). La velocidad de calentamiento por adición de reactivo, también es un factor importante, un rápido calentamiento resulta en una expansión y delaminación, esto por la rápida evaporación del agua y gases producidos por la pirólisis térmica de los grupos oxigenados (Schniepp y cols., 2006; Stankovich y cols., 2007)

4.5.2. Métodos de exfoliación de OGr

Como anteriormente mencionamos, se obtuvo OGr por el método de oxidación Hummers. Estructuralmente, el grafito ha sufrido la incorporación de grupos oxigenados en superficie, y aumentado el distanciamiento interlaminar, sufriendo una exfoliación química parcial (Park y cols., 2009). Además, la presencia de oxígeno en OGr lo vuelve altamente hidrófilo, de aquí su facilidad de exfoliación en medios acuosos (Long y cols., 2010).

En la actualidad, existen diversos métodos de exfoliación de OGr difiriendo entre sí, por las características morfológicas del OG obtenido

La exfoliación térmica es uno de ellos. Supone que los compuestos de intercalación en grafito, tienen a exfoliar al calentarse, esto mediante la formación de gas a nivel interlaminar. Chung, (2002), expandió térmicamente al grafito intercalado con H_2SO_4 , sin lograr una exfoliación completa del grafito a nivel de láminas individuales

La exfoliación mecánica por su parte, hace uso de un baño de ultrasonidos en agua o disolventes orgánicos. Paredes y cols., (2008), informaron acerca del uso de N, N-dimetilformamida (DMF), N-metil-2-pirrolidona (NMP), tetrahidrofurano (THF) y etilenglicol como solventes exfoliantes para la obtención de OG. Se reportó que estos solventes facilitaron la exfoliación a obtención de láminas con gran estabilidad a largo plazo. Jung y cols., (2007) obtuvieron por exfoliación mecánica, láminas de OG reducido con tamaño inferior a los 500 nm, esto para evaluar las propiedades ópticas del material. Esto sustenta que, agitar mecánicamente la muestra durante un tiempo suficiente, es una alternativa para lograr la des- laminación del OGr y obtención de OG (Wang y cols., 2010). Pese a esto, es importante controlar los

tiempos de sonicación pues la energía aplicada sobre las láminas podría reducir el tamaño por acumulación de tensiones (Botas y cols., 2013).

El uso de agentes químicos como método de exfoliación es poco eficiente, ya que, si bien es cierto, la penetración de estos en el espacio interlaminar del OGr produce una exfoliación parcial, no es suficiente como para producir laminas individuales de OG, o de hacerlo, estas tenderían a reagruparse (Marcano y cols., 2010).

Por las razones anteriormente mencionadas, la exfoliación mecánica por agitación o ultrasonicación en agua, es la más utilizada en la obtención de OG.

4.5.3. Funcionalización de OG

Con el fin de mejorar el tratamiento tradicional contra el cáncer, se ha optado por el diseño y desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos que cumplan con una distribución dirigida de fármaco a la zona de afección (Chen y cols., 2013). Dado los avances logrados en la investigación del OG como sistema transportador de fármacos, se ha probado el suministro de diversos medicamentos anticancerígenos con liberación selectiva en los sitios del tumor (Cao y cols., 2015).

Recientemente Vinothini y cols. (2019), reportaron la eficiencia terapéutica del paclitaxel (PTX) cargado en OG y acrilato de metilo (MA) como vehículo transportador. Este sistema fue conjugado adicionalmente con ácido fólico (FA), un ligando ampliamente utilizado por su afinidad a los receptores de folato (glicofosfatidilinositol), expresados en cáncer de mama, ovario, pulmón y colón. Los resultados mostraron alta especificidad hacia los receptores de células de cáncer de mama, así como un efecto inhibitorio en el crecimiento celular del mismo.

Resultados similares fueron reportados por Deng y cols., (2018), quienes estudiaron la liberación de PTX – OG reducido, encapsulado en albúmina de suero humano (HSA). A su vez, se conjugó con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para el direccionamiento específico al sitio de tumor. Este sistema mostró buenos resultados en evaluaciones *in vitro* e *in vivo*, pues el efecto fototérmico de OG y la expansión térmica de los depósitos de HSA, permitieron una liberación controlada

de PTX y un efecto anticancerígeno en células de carcinoma adenoide quístico (ACC).

Jung y cols., (2014) conjugaron OG con ácido hialurónico (HA) para la liberación y entrega específica de epirubicina *in vitro*, con células de melanoma B16F1. Estas células expresan receptores CD44 y LYVE - 1, por lo que la afinidad del HA es alta, facilitando la endocitosis del compuesto epirubicina/OG - HA. Este ensayo demostró, además, que la carga y liberación de epirubicina fue dependiente del pH, mostrando mejores resultados a pH ácido.

Eckhart y cols., (2019) conjugaron covalentemente OG con poliglutamato (p Glu) y polilisina (p Lys). La finalidad fue evaluar los posibles efectos de osteogénesis y neurogénesis de los péptidos conjugados Pep - G. Para ello, se hizo uso de la línea celular PC12, la cual es una mezcla de células neuroblásticas y eosinófilas de rata. Los resultados demostraron adhesión celular y diferenciación neuronal mejorada. Esto contribuyen la investigación de andamios de tejido regenerativo a base de materiales gráficos.

Publicaciones similares realizadas por Roggenbuck y cols., (2012) y Managit y cols., (2003) reportaron el uso de carbohidratos como moléculas de direccionamiento vehicular de OG, transportador de doxorubicina, con fines terapéuticos para el carcinoma hepatocelular (CHC). Cao y cols., (2015) sugieren aprovechar la alta afinidad de la lactosa hacia los receptores de células hepáticas, para direccionar privilegiadamente, medicamentos a esta zona tumoral.

4.6. Sistemas transportadores con direccionamiento celular

La falta de control en la distribución de los medicamentos administrados, genera una serie de desventajas que culminan en que el tratamiento sea poco efectivo (Hirsjarvi y cols., 2011). Con la finalidad de mejorar esto, la mayoría de los esfuerzos se encuentran dirigidos en el diseño de sistemas de liberación de fármacos con duración prolongada en circulación (Rojas y cols., 2016). La nanomedicina propone que estos sistemas de distribución de fármacos adicionalmente tengan

direccionamiento hacia la zona de afección, evitando los efectos no deseados del tratamiento convencional (Liechty y cols., 2010).

Estos sistemas de liberación suponen incorporar al fármaco dentro de matrices poliméricas, evitando alcanzar concentraciones tóxicas en sangre, protegiéndolos del ambiente y aumentando el tiempo de interacción con células específicas (Ni y cols., 2012). Los sistemas nanoestructurados que respondan a estímulos externos, luz, calor, pH o campos magnéticos, son candidatos ideales para la liberación controlada de fármacos (Zhou y cols., 2014).

Los nanomateriales inorgánicos han adquirido gran interés como transportadores de fármacos debido a su gran estabilidad, alto rendimiento y bajo costo (Wu y cols., 2014). Recientemente se ha propuesto al OG como material de suministro de fármacos debido a su biocompatibilidad, alta solubilidad y gran área superficial (Wu y cols., 2013).

Hay dos maneras de inducir el direccionamiento de fármacos, de forma activa o pasiva. En el direccionamiento pasivo, es muy importante el tamaño de la partícula para poder determinar la ruta de circulación, interacción y eliminación del fármaco, ya que este proceso es tipo difusión (Lee y cols., 2012; Peppas y Blanchette y cols., 2004). Este criterio es importante, ya que, por ejemplo, en el caso del hígado, es sabido que nanopartículas transportadoras de fármacos con tamaño mayor a los 100 nm, son capturadas (Schafer y cols., 1994).

En el caso del direccionamiento activo, es necesario el uso de un ligando en la superficie del material transportador de fármaco, el cual será reconocido y captado por la célula de interés (Hirsjarvi y cols., 2011). En este sentido puede hacerse uso de ligandos superficiales del material transportador, para seleccionar específicamente, moléculas de superficie celular con quienes interaccionará y posteriormente será internalizado (Xu y cols., 2015). Para fines prácticos, este tipo de transporte ha tenido gran impacto en la incorporación de sistemas para el tratamiento de cáncer, en especial, contra el carcinoma hepatocelular (Bertrand y cols., 2014).

4.7. Carcinoma hepatocelular

El CHC es un tipo neoplasia del hígado que afecta los hepatocitos (Forner y cols., 2016). Se trata de un hepatoma que se manifiesta con hipervascularidad y con un crecimiento intrahepático (Aguilar y cols., 2015). Este padecimiento deriva de un 93% de enfermedades metabólicas hereditarias, o en el 20% restante, por enfermedades de carácter adquisitivo como alcoholismo, hepatitis B y C (Nordenstedt y cols., 2010; Huezco y cols., 2014).

4.7.1. Epidemiología

El CHC es el séptimo tipo de cáncer con mayor frecuencia y la tercera causa de muerte a nivel mundial (Deng y cols., 2015; Aguilar y cols., 2015). Más de medio millón de casos son diagnosticados anualmente, lo cual representa un problema de salud pública (Ferlay y cols., 2015). Alarmantemente, el CHC es uno de los pocos cánceres cuya incidencia se encuentra en aumento continuo, anualmente su prevalencia indica que la tasa de incidencia es muy similar a la tasa de mortalidad (Aguilar y cols., 2015).

A nivel mundial el mayor número de casos se ha presentado en Asia y África, mientras que en Europa y América el número es mucho menor (Huezco y cols., 2014). En México, la incidencia ha aumentado en los últimos años llegándose a registrar alrededor de 6 mil casos anualmente (Uribe y cols., 2010; Fernández, y cols., 2011). Por desgracia en México al igual que en otras partes del mundo, la tasa de incidencia es muy similar a la tasa de mortalidad, presentándose un mayor número de casos en poblaciones de 65 años o más, afectando tanto a hombres como mujeres (Méndez - Sánchez y cols., 2008; Huezco y cols., 2014).

Una de las causas que vuelve mortal a este tipo de cáncer son las alteraciones a nivel tisular e incluso molecular, generando un daño prácticamente irreparable y una tasa de mortalidad muy alta con una baja esperanza de vida (Schwartz y cols., 2014).

4.7.2. Alteraciones presentes en CHC

Dentro de las alteraciones que se presentan en CHC, se encuentran las tisulares y moleculares. Las alteraciones tisulares, se caracterizan por la presencia de nódulos regenerativos con tamaños de 1 cm, y que resultan en una proliferación descontrolada de células hepáticas (Balogh y cols., 2016). Los hepatocitos tumorales necesitan de mayor cantidad de energía y sustrato que las células normales, esto por la síntesis anormal de *novo* de nucleótidos, lípidos y proteínas para su incontrolable proliferación, haciéndose presente, además, la hipervascularización (Kim y cols., 2016). En condiciones normales, los vasos sanguíneos del hígado están constituidos por células endoteliales, células murales y membranas basales (Ebrahimkhani y cols., 2017). Sin embargo, en la zona del tumor es frecuente la presencia de vasos sanguíneos con diámetros y estructuras irregulares, atribuibles a la ausencia de células endoteliales o membranas basales, permitiendo con ello un aumento en la permeabilidad y retención en la zona (efecto PER) (Ebrahimkhani y cols., 2017). Esta es una alteración en la cual partículas grandes, incluyendo proteínas, macromoléculas, liposomas, micelas, etc., tienden a acumularse y prolongar su tiempo de retención en los tejidos tumorales (Danhier, 2016).

Por otra parte, las alteraciones moleculares se presentan en los hepatocitos presentes en el CHC, donde se observa una sobreexpresión de diferentes receptores de la membrana celular (Ebrahimkhani y cols., 2014). Entre los receptores más importantes de este tipo de célula, se encuentra, el receptor de ácido glicirretínico (RAG), integrinas, receptor de transferrina (RTf), CD+, receptor de biotina, receptor de factor de crecimiento (GFR) y el receptor de asialoglicoproteínas, mismo que predomina en abundancia e importancia (D'Souza y Devarajan, 2015; Wang y cols., 2015).

4.7.3. Receptor de asialoglicoproteínas

El RAGPs o "receptor de Ashwell-Morell" es una lectina presente en los mamíferos cuya función principal es mantener la homeostasis de las glicoproteínas séricas mediante el reconocimiento, y posterior endocitosis de glicoproteínas con residuos

terminales de galactosa (D'Souza y Devarajan, 2015; Huang y cols., 2017; Liu y cols., 2017). Los hepatocitos pueden llegar a expresar hasta 500 000 RAGPs en sus lados basales (Liu y cols., 2017). Estos receptores también se encuentran en menor proporción en células extrahepáticas como monocitos, macrófagos peritoneales, espermatozoides y células intestinales (D'Souza y Devarajan, 2015).

Estas glicoproteínas al llegar al término de su vida media, son endocitadas a través de vesículas revestidas con clatrina, para ser posteriormente llevada a los lisosomas para su degradación (Huang y cols., 2017).

La estructura del RAGP varía en algunos seres vivos. En el caso de los humanos, tiene dos subunidades de 50 kDa (H1) y una de 46 kDa (H2) (Figura 15) (Huang y cols., 2017). Tienen el dominio citoplasmático muy corto, con un amino terminal. La región del tallo consistente en repeticiones de estructuras en espiral helicoidal (Grewal, 2017). El tallo une la membrana de la región donde se lleva a cabo la señal, los dominios de reconocimiento de carbohidratos (CDRs).

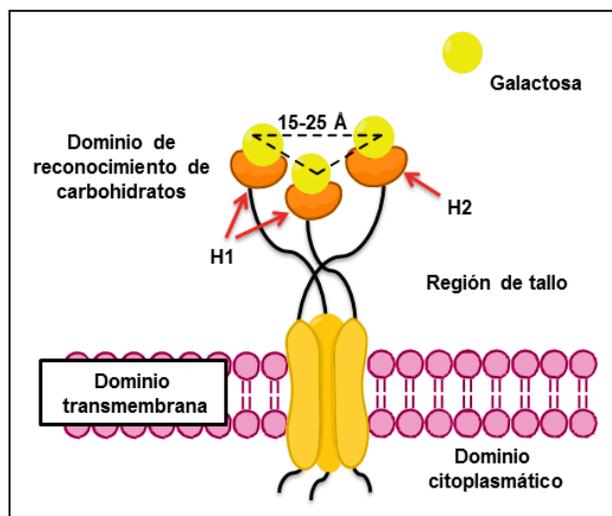


Figura 15. Representación esquemática de la estructura y relación geométrica del sitio de unión del RAGPs. Fuente: Huang y cols., 2017.

En los CDR se encuentra un centroide que está formado por los aminoácidos ácido aspártico 241, ácido aspártico 265, asparagina 264, ácido glutámico 252, glutamina 239 y triptófano 243. Este es el sitio de unión al ligando, donde se forman puentes de hidrógeno de los grupos 3- y 4- hidroxilo de galactosa. Además, existe una

interacción hidrófoba con átomos C3, C4, C5 y C6 pertenecientes al triptófano 243 de RAGP, que le confiere estabilidad a la interacción con la galactosa (D'Souza y Devarajan, 2015).

4.7.3.1. Unión ligando – RAGP

Es bien sabido que ligandos a base de carbohidratos exhiben una alta afinidad al RAGP. Arabinogalactano (AG), por ejemplo, es un polímero a base de galactosa y pululano, un polímero a base de glucosa, se encuentran entre los ligandos de carbohidratos ampliamente estudiados para la vectorización mediada por RAGP. Sin embargo, la lactosa ha demostrado tener mayor afinidad, especificidad y avidéz al receptor que otros ligandos debido a que su estructura cumple con los factores clave en la interacción con el RAGP (Grewal, 2017; D'Souza y Devarajan, 2015)

Para que pueda dar la interacción con el RAGP, se deben considerar factores isoméricos del carbohidrato, la densidad, ramificación y enlace de galactosa (D'Souza y Devarajan, 2015). En el caso de este receptor, es importante que el carbohidrato se presente en D-galactosa, debido a que se forman los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas correctas con el RAGP. Por otra parte, la densidad de superficie es importante ya que la superficie de galactosa se asociará con mayor fuerza de unión. Esto es debido a que el receptor tiene tres CDRs y, por lo tanto, tres sitios de unión al ligando. Es decir, mientras mayor sea la densidad de galactosa, más probabilidad habrá de interaccionar.

En el caso de los enlaces de galactosa, se ha reportado que los β -Gal (β 1-4) tienen mayor afinidad que otros tipos de enlaces. Se observó que los α -Gal (α 1-3) disminuye la afinidad de 50 a 250 veces en comparación al β 1-4 (Grewal, 2017; D'Souza y Devarajan, 2015).

4.8. Terapia contra el cáncer. Doxorubicina

Doxorubicina es un fármaco antitumoral ampliamente utilizado en la terapia contra el cáncer (Wu y cols., 2014), actuando como intercalador del ADN (Aubel-Sadron, 1984). Debido al carácter de administración sistémico, puede causar cardiotoxicidad, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad (Speth y cols., 1988; Tulubas y

cols., 2013). Para evitar la expresión de estos efectos secundarios, se ha propuesto la vectorización específica hacia el sitio de afección, esto con el uso de un nano-transportador que incluya en su estructura una molécula ligando, que facilite la interacción y posterior endocitosis del sistema (Depan y cols., 2011).

Existen diversos tipos de mecanismos utilizados para cargar medicamentos sobre materiales nanoestructurados, tales como adsorción superficial, encapsulación, enlaces de hidrógenos, y otros tipos de interacciones (Zhou y cols., 2014). Estructuras que contengan moléculas altamente aromáticas, pueden interaccionar con otras complementarias a través de fuertes interacciones no covalentes tipo π , y con ello, aumentar la capacidad de carga de fármaco (Ebrahimkhani y cols., 2008).

El OG, cuya estructura exhibe carbonos con hibridación sp^2 , distribuidos a lo largo de una gran área superficial, esto resulta ventajoso al momento de promover la adsorción del fármaco en comparación a otros materiales transportadores (Wu y cols., 2013).

A pesar de estas ventajas, se debe tener en consideración las posibles limitantes tras la modificación. Por ejemplo, el tamaño de los sistemas transportadores para superar las barreras del sistema reticuloendotelial (Zhao y cols., 2014). La presencia de poros (400 nm a 2 μ m) en el endotelio de los vasos sanguíneos, favorece la extravasación de nanopartículas con menor tamaño hacia el torrente sanguíneo, y aprovechando el efecto de permeabilidad y retención, el sistema transportador llegaría a la zona del tumor (MacEwan y cols., 2010). Otro factor importante es la eficiencia de carga de fármaco, la cual es dependiente del material polimérico donde se pretende inmovilizar o encapsular (Yang y cols., 2008). Respecto a esto, se ha informado acerca del grado de saturación de OG alrededor de 1 mg DOX/ 1 mg OG respecto a otros materiales, los cuales tienen una eficiencia de carga menor (Depan y cols., 2011).

Esta capacidad de carga aunado con una funcionalización adicional que promueva una vectorización activa hacia el sitio de afección, postularía al OG como posible transportador de fármacos con fines terapéuticos.

4.8.1. Mecanismo de adsorción DOX - OG

La DOX puede cargarse sobre OG por interacciones $\pi - \pi$, efecto hidrofóbico y puentes de hidrógeno (Figura 16) (Han y cols., 2008). Los enlaces de hidrógeno entre DOX y GO pueden presentarse de la siguiente manera: ($-\text{COOH}$) de GO y ($-\text{OH}$) de DOX; ($-\text{COOH}$) de GO y ($-\text{NH}_2$) de DOX; ($-\text{OH}$) de GO y ($-\text{OH}$) de DOX; y ($-\text{OH}$) de GO y ($-\text{NH}_2$) de DOX (Wu y cols., 2013). Debido a que la estructura del OG posee regiones con carbonos hibridados sp^3 que contienen grupos funcionales oxigenados, también poseen regiones con carbonos hibridados sp^2 en la red aromática que mantienen su dominio (Yang y cols. 2008).

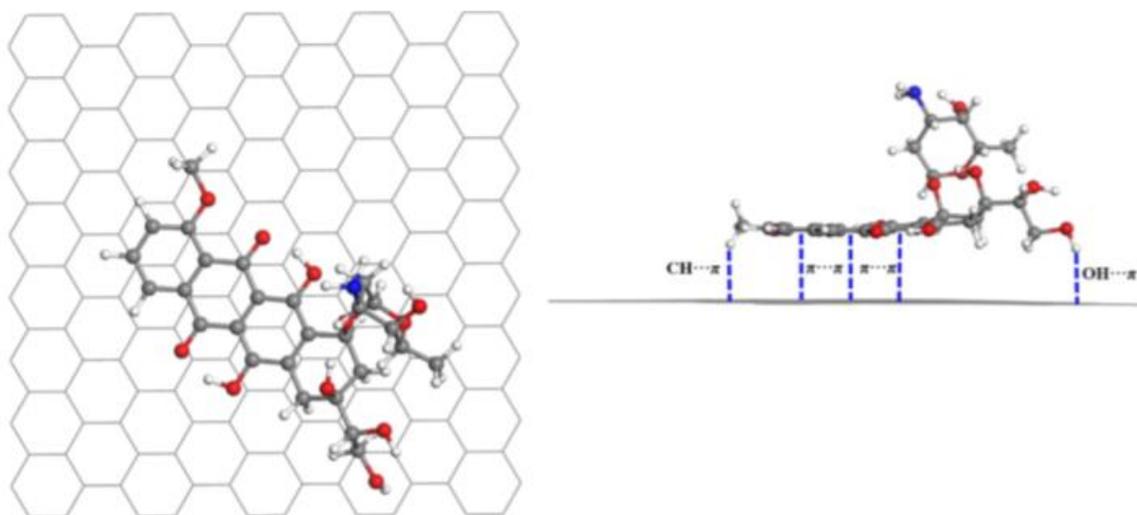


Figura 16. Mecanismo de adsorción DOX sobre lamina de OG; (izquierda) vista superior y (derecha) vista lateral. Fuente: Vovusha y cols., 2018.

Por otro lado, las interacciones tipo $\pi - \pi$ entre OG y DOX, puede ser las más importantes, ya que la carga de DOX en OG puede seguir siendo alta aun disminuyendo los puentes de hidrógeno en condiciones ácidas (Zhou y cols., 2014).

OG al tener una carga superficial negativa, atraen fácilmente moléculas de DOX cargadas positivamente, lo cual produce una adsorción mediada por atracciones electrostáticas (Lin y cols., 2008).

4.8.2. Mecanismo de desorción de doxorubicina

El comportamiento de un sistema transportador de fármacos depende de varios factores experimentales como pH, tamaño, tasa de degradación, interacción superficie - fármaco, y el comportamiento del sistema en solventes orgánicos (Depan y cols., 2011). Una vez formado el sistema OG – DOX, a pH bajo, aumenta la hidrofilia y con ello la solubilidad de DOX debido a una mayor protonación de los grupos ($-NH_2$) lo que conduce a la liberación del fármaco en condiciones acuosas (Wu y cols., 2013).

En condiciones ácidas, ($-NH_2$) forma ($-NH_3^+$) y, por lo tanto, no puede formar enlaces de hidrógeno. Además, el (H^+) competirá con los grupos formadores de enlaces, para luego debilitar la interacción del enlace hidrógeno formado (Yang y cols., 2008). En condiciones básicas, ($-COOH$) de OG existe como ($-COO^-$) y puede formar enlace de hidrógeno con ($-OH$) o ($-NH_2$) de DOX. Su comportamiento a diferentes pH se muestra en la tabla 1. Esto permite la presencia de interacciones coulombicas ya que, a pH básico, los grupos funcionales terminales tanto del OG como de DOX se ionizan, y hace posible que tiendan a interactuar complementariamente (Depan y cols., 2011).

Tabla 1. Grupos que pueden formar puentes de hidrogeno en OG y DOX a pH 2, 7 y 10.

pH	OG	DOX
10	$-OH$	$-OH, NH_2$
7	$-OH, -COOH$	$-OH, NH_2$
2	$-OH, -COOH$	$-OH$

El comportamiento del material en el medio depende del pH, y esto puede resultar ventajoso en la liberación del fármaco, tanto en microambientes cancerosos (pH 6.8) como en los orgánulos lisosomales y endosomales (pH 5.0 – 6.5) de las células (Wu y cols., 2013). Así, el comportamiento del sistema puede determinarse por medición del potencial Z a diferentes pH. Esto es de suma importancia ya que la desorción de DOX en OG, se da en citoplasma, luego pasar al núcleo donde se intercala con el ADN. Esto evita la replicación y división celular, lo cual conduce a la apoptosis (Zhou y cols., 2014).

Por lo anteriormente explicado, en este trabajo se sintetizó OG como sistema transportador de DOX, con orientación específica hacia los dominios de reconocimiento de carbohidratos presentes en la membrana de células cancerígenas de hígado. Esta selectividad estará dada por la funcionalización de moléculas de carbohidratos (lactosa) en superficie del sistema.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Materiales

El grafito, 3-aminopropil trietoxisilano (APTES), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (FBS), D-lactosa monohidratada (Lac), isotiocianato de fluoresceína (FITC), Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Las células HepG2 (cáncer de hígado humano), HeLa (carcinoma cervical humano) y T47D (carcinoma de mama humano) se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA, EE. UU.). La aglutinina I de *Ricinus communis* (RCA I) se obtuvo del Vector Lab (Burlingame, CA, EE. UU.). Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando agua pura Tipo 2 ($0.18 \mu\text{S cm}^{-1}$).

5.2. Metodología

5.2.1. Oxidación de grafito (OGr)

La oxidación del grafito se llevó a cabo mediante el método de Hummers y Offeman (1958), con y sin modificaciones. En el método sin modificaciones se pesaron 0.250 g de grafito en polvo y se añadieron a un matraz Erlenmeyer con 15 mL de ácido sulfúrico concentrado, manteniendo una temperatura de 1°C en baño de hielo y agitación constante. Posteriormente, se añadieron 0.254 g de nitrato de sodio, manteniendo las condiciones de agitación y temperatura, durante 60 min. A continuación, se añadió lentamente 1.208 g de permanganato de potasio dividido en tres porciones de 400 mg (3 min entre cada adición) a una temperatura de reacción de 37°C . La solución se mantuvo en placa de agitación a 500 rpm durante 60 min, obteniendo óxido de grafito (Botas y cols., 2013).

Para la purificación de la muestra se añadieron 15 mL de agua desionizada seguido de 5 mL de peróxido de hidrógeno (Thomas y cols., 2013). Esta adición se realizó, cuidando que la temperatura no subiera por encima de los 70°C , ya que es una reacción exotérmica. Nuevamente, la solución se mantuvo en agitación durante 45 min, para luego adicionar 25 mL agua desionizada. Para remover los productos de desecho, se llevó a centrifugación a $1355 \times g$ / 10 min/ 14°C . Estos lavados se repitieron hasta que el sobrenadante quedó transparente. Entre cada ciclo de

centrifugación, la muestra fue re- suspendida y homogenizada por vórtex. Una vez que la solución fue clarificada, se ajustó el pH hasta la neutralidad, añadiendo hidróxido de sodio. La muestra fue etiquetada como OGr 1 y fue almacenada para continuar posteriormente con el proceso de exfoliación.

En el método con modificaciones, la oxidación del óxido de grafito partió de 0.250 g de grafito en polvo y se añadieron a un matraz Erlenmeyer, al cual se le adicionó 25 mL de ácido sulfúrico. La solución se colocó en placa de agitación 510 rpm durante 35 min a aproximadamente 1°C. A continuación, se añadieron 0.423 g de nitrato de sodio en dos porciones con intervalo de 10 min en agitación constante durante 60 min. Tras este tiempo, se retiró el baño de hielo y se pesaron 2 g de permanganato de potasio, mismo que fue dividido en 4 porciones y añadido a la solución con un intervalo de tiempo de 5 min. La temperatura se mantuvo a 37 °C en agitación durante 80 min. Una vez obtenido el óxido de grafito, se procedió a la purificación de la muestra. Se añadieron 25 mL de agua desionizada y 8.3 mL de peróxido de hidrógeno, con agitación durante 60 min, cuidando que la temperatura no superara los 60 °C. Posteriormente se realizaron lavados bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. La muestra fue guardada y etiquetada como OGr 2, para su posterior exfoliación.

5.2.2. Exfoliación de OGr en agua

Para la exfoliación de OGr1 y OGr2, las muestras fueron sonicadas en hielo por separado con 20 mL de agua desionizada en un procesador ultrasónico Q500 a una amplitud de 35% con varios pulsos de 45 segundos On y 15 segundos Off durante 20 min. La suspensión obtenida se centrifugó a 1355 x g durante 25 min a 15°C. Este procedimiento fue repetido cuatro veces. Las muestras resultantes, fueron consideradas como óxido de grafeno y se les denominó como OG 1 y OG 2, para luego ser almacenadas a -80 °C y ser liofilizadas para su posterior caracterización y uso.

5.2.3. Silanización de OG con APTES (OGA)

Las muestras liofilizadas OG 1 y OG 2, fueron sometidas a un proceso de silanización con 3-aminopropil trietoxisilano (APTES). Este proceso fue dividido en dos partes. La primera consistió en pesar 50 mg de OG 1 en polvo y se le adicionaron 30 mL de etanol. La muestra se dejó en agitación y se añadieron 50 μ L de APTES, y se dejó interaccionar durante 24 h. Después, se realizaron tres lavados de la muestra para eliminar el exceso de APTES, centrifugando a 1355 x g durante 5 min. El producto resultante OG 1- APTES, fue etiquetado como OGA 1a, el cual fue congelado y liofilizado para su uso posterior.

En la segunda parte se siguió el mismo protocolo, pero utilizando 10 μ L de APTES y el producto resultante fue etiquetado como OGA 1b. Para las muestras OG 2 se siguió el mismo procedimiento que OG1, dando lugar a los productos OGA 2a y OGA 2b.

5.2.4. Glicación térmica de OGA con lactosa (OGAL)

Las muestras obtenidas OGA 1a, OGA 1b, OGA 2a y OGA 2b fueron sometidas a glicación térmica con lactosa (Sarabia- Sainz y cols., 2009). Se pesó 1 mg de OGA 1a en un tubo falcón y se añadieron 15 mL de agua desionizada para re- suspender la muestra hasta lograr su completa disolución. Después se adicionaron 500 mg de lactosa monohidratada a la solución y se dejó en placa agitación a 410 rpm durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se congeló a -80 °C y se liofilizó. Esta muestra se calentó en una estufa a 80 °C durante 90 min. Posterior a este tiempo, la muestra fue enfriada a refrigeración (4.4 °C) rápidamente para detener la reacción de glicación. La muestra glicada fue lavada tres veces para remover el exceso de lactosa sin reaccionar, utilizando 20 mL de agua desionizada para re- suspenderla y posteriormente ser centrifugada a 1613 x g durante 20 min a 25 °C. La muestra fue etiquetada como OGAL 1a y fue congelada y liofilizada para su uso posterior. El mismo procedimiento fue realizado para el resto de las muestras, las cuales fueron denominadas como OGAL 1b, OGAL 2a y OGAL 2b.

5.2.5. Adsorción de doxorrubicina en OGAL (OGAL - DOX)

La adsorción de DOX en OGAL se llevó a cabo de la siguiente manera. Se pesaron 2 mg de OGAL en un tubo eppendorf y se añadió 500 μL de una solución 0.5 mg DOX/ 500 μL PBS. La mezcla se llevó a un baño sonicador durante 10 min y se dejó en placa de agitación a 270 rpm durante 2 h por 10 min y a una temperatura de 30 °C, en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo, se llevó a centrifugación 1613 x g durante 15 min a 15 °C.

5.3. Caracterización de OG y sus modificaciones

Las muestras OGr, OG, OGA y OGAL fueron caracterizadas para evaluar sus propiedades fisicoquímicas y de compatibilidad en condiciones biológicamente similares. Todas estas evaluaciones fueron realizadas por triplicado.

5.3.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con Reflexión Total Atenuada (ATR)

El análisis de grupos funcionales presentes en OGr, OG, OGA y OGAL se realizó mediante FTIR (Güler y cols., 2016). Las muestras en polvo fueron analizadas en un espectrómetro FTIR con un módulo UATR (Spectrum Two, Perkin Elmer, USA). El espectro infrarrojo se obtuvo a una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de 500 - 4000 cm^{-1} .

5.3.2. Ensayo con lectina ligando a enzima (ELLA)

Para este ensayo se preparó una solución madre de OGAL de 1 mg/mL PBS. Se mezclaron 100 μL de OGAL con 100 μL de buffer carbonato 50 mM pH 9.6. De esta mezcla, se tomaron 100 μL y se añadieron por triplicado a una placa ELISA y se dejaron reposar durante 14 h a 4 °C. Se removió la solución y se realizaron tres lavados con 200 μL de PBS – T (PBS Tween 20 0.1%), durante 5 min. En seguida la muestra fue bloqueada con 200 μL BSA 1.5%/ PBS - T durante 1 - 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente se removió la solución de bloqueo y se le añadieron 100 μL de la lectina RCA biotinilada (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para incubarse 1.5 h a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS -T y se le agregaron 100 μL de estreptavidina peroxidasa (1:2000) en PBS por 40 min. Finalmente, la solución fue removida, se hicieron 3 lavados con PBS-T y la reacción

de color fue desarrollada con una solución de SIGMA FAST-OPD, siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia de la reacción fue leída a 450 nm en un lector de ELISA (Espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO) a 1 min.

3.3. Microscopia de fuerza atómica (AFM)

La morfología y tamaño de las láminas se caracterizó por AFM (Alpha300RA, WiTec, Alemania). Las imágenes AFM se reconstruyeron en el modo sin contacto, utilizando nanosensores: NCHR (fuerza constante de 10 a 130 N/m). El análisis se realizó utilizando imágenes de escaneo de 5 x 5 μm . Las imágenes tridimensionales (3D) se analizaron con el software WiTec project FOUR v4.1.

5.3.4. Potencial Zeta

La carga superficial de las muestras fue estimada mediante la medición del potencial Zcon un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, UK), siguiendo la metodología de Lee y cols. (2017) y Kim y cols. (2016). Previo al análisis, las muestras fueron pesadas y preparadas a una concentración de 1 mg/mL y a un pH de 7.2 en diferentes soluciones: agua desionizada, solución salina fisiológica al 0.9%, PBS y DEMEM (por sus siglas en inglés Dulbecco's Modification of Eagle's Medium). Una vez homogenizado la mezcla, se tomaron 250 μL de cada muestra y se diluyó 1:4 para evitar saturar el sistema. Se agregaron 3 mL de la solución a una celda de cuarzo y se procedió a la lectura. Los experimentos se realizaron a una temperatura de 25°C utilizando un ángulo de medición de 90°. Estas lecturas fueron contrastadas con un blanco, el cual fue configurado dependiendo del solvente utilizado. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

5.3.5. Ensayo de actividad hemolítica

El análisis hemolítico de las muestras gráficas se realizó extrayendo muestra sanguínea con ayuda de tubos anticoagulante BD Vacutainer EDTA, acatando la reglamentación estipuladas por el Comité de Investigación de Ética. La dilución sanguínea se hizo tomando una alícuota de sangre total 15 μL y añadiéndolo a una solución con 1000 μL de PBS (relación 15: 1000). La solución PBS fue previamente homogenizada con 1 mg OG para la solución más concentrada, mientras que la

muestra más diluida fue de 0.039 mg/mL. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 11 g / 1 min. La hemólisis se determinó por absorbancia del sobrenadante a 540 nm, utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO). Como control positivo se utilizó sangre total con agua en la misma relación anteriormente mencionada, mientras que como control negativo se utilizó sangre total con PBS sin muestra. El cálculo de viabilidad (%) se hizo midiendo la diferencia porcentual de absorbancia entre el control positivo (100%) y el obtenido en cada muestra.

5.3.6. Ensayo del MTT

El ensayo de viabilidad celular se realizó en las líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HepG2), cáncer cérvico-uterino (HeLa) y carcinoma de mama (T47D), utilizando bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT). Según lo descrito por Teran-Saavedra, la densidad celular por pozo fue de 10 000 células/ 200 µL medio por pocillo, para ello las variaciones en medio celular fue DMEM (por sus siglas en inglés, Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) para HepG2 y HeLa, y RPMI (por sus siglas en inglés, Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10% SFB (suero fetal bovino) para T47D. Las células fueron incubadas a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 h. Posteriormente, el medio se reemplazó por 200 µL de medio homogenizado con 1mg - 0.039 mg de OG, lo mismo para las muestras OGr, OGA y OGAL. Se determinó el intervalo IC 50 de las muestras en las células HepG2, HeLa y T47D.

5.3.7. Ensayo de bio-reconocimiento OGAL

Previo a evaluar la interacción celular, las muestras OGA y OGAL fueron marcadas con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo la metodología propuesta por Huang y cols., (2017). Para esto, se mezclaron 0.5 mL de FITC (0.4 mg/ mL de DMSO) con 2 mL de las muestras (OGA y OGAL respectivamente). Se dejó en placa de agitación 510 rpm/ 3 h en oscuridad y temperatura ambiente, para después lavarse con agua y someterse a varios ciclos de centrifugación (1613 x g, 10 min a 25 °C). La conjugación de FITC en OGA y OGAL se evaluó mediante espectros de

excitación y emisión (λ_{exc} 480 nm y λ_{emi} 520 nm) utilizando un Fluorolog (Horiba JobinYvon, Palaiseau France) con el software FluorEssence.

Las muestras marcadas con FITC se evaluaron utilizando células HepG2 (RAGP +) y células HeLa (RAGP -) como control. Las células se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de 10 000 células / 200 μ L por pocillo usando DMEM con 10 % SFB. Se procedió a incubación (5% de CO₂ a 37 °C durante 24 h) y transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron tres veces con solución salina fisiológica (200 μ L), para incubarse nuevamente ahora con las muestras (OGA y OGAL) a concentraciones que iban de los 2 mg/ 200 μ L - 0.039 mg/ μ L a 37 °C durante 30 min. Las células se enjuagaron tres veces con solución salina fisiológica (200 μ L), y luego se observaron por microscopía confocal (las dimensiones de imagen fueron 1024 x 1024 píxeles). La intensidad de fluorescencia se cuantificó tomando las regiones del cuerpo celular en el campo visual que se seleccionaron como las regiones de interés (RIO). Las imágenes y la intensidad de fluorescencia media se obtuvieron mediante microscopía confocal (Nikon TiEclipse C2+, Japón) con láseres de 488 nm con un aumento de 20x.

5.3.8. Análisis estadístico

Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar. Para el ensayo ELLA, se determinaron diferencias significativas usando la prueba t de Student. El análisis estadístico de la intensidad de fluorescencia de la interacción celular se realizó utilizando un ANOVA unidireccional seguido de la aplicación de la prueba de Tukey. $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El óxido de grafeno representa unos de los materiales con gran potencial para ser empleado en el área biomédica, específicamente como transportador de medicamentos. Sin embargo, para poderlo utilizar, es importante que OG incluya algunas características como biocompatibilidad, estabilidad coloidal, baja reactividad, entre otras. En este sentido, es imprescindible establecer las mejores condiciones para la obtención de láminas de OG, así como sus adecuaciones para ser empleado como transportador a un sitio específico en un organismo.

Como se mencionó en el apartado 5.2.1., la síntesis para la obtención de OGr se hizo por el método de Hummers - Offeman, sin modificaciones para la obtención de OGr 1 y con modificaciones, para la obtención de OGr 2. Las modificaciones al método se realizaron con la finalidad de aumentar el número de sitios oxidados en la estructura del grafito y evaluar si aumenta la capacidad del material para transportar DOX. Las muestras OGr 1 y OGr 2 fueron exfoliadas para la obtención de OG 1 y OG 2, siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.2.2. Estas muestras fueron etiquetadas como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Nomenclatura del etiquetado de las muestras sintetizadas por el método de Hummers sin modificar y modificado

Nombre de la muestra	Características
OGr 1	Óxido de grafito sin modificaciones en la síntesis
OGr 2	Óxido de grafito con modificaciones en la síntesis
OG 1	OGr 1 + exfoliación
OG 2	OGr 2 + exfoliación

Posterior a la obtención de láminas de OG, se procedió a la conjugación con APTES como se indicó en el apartado 5.2.3. El objetivo de la adición de APTES fue incorporar grupos aminos, mediante enlaces covalentes, en la superficie de la lámina previo a la reacción de glicación. Los enlaces de unión entre OG y APTES se muestran en la figura 17.

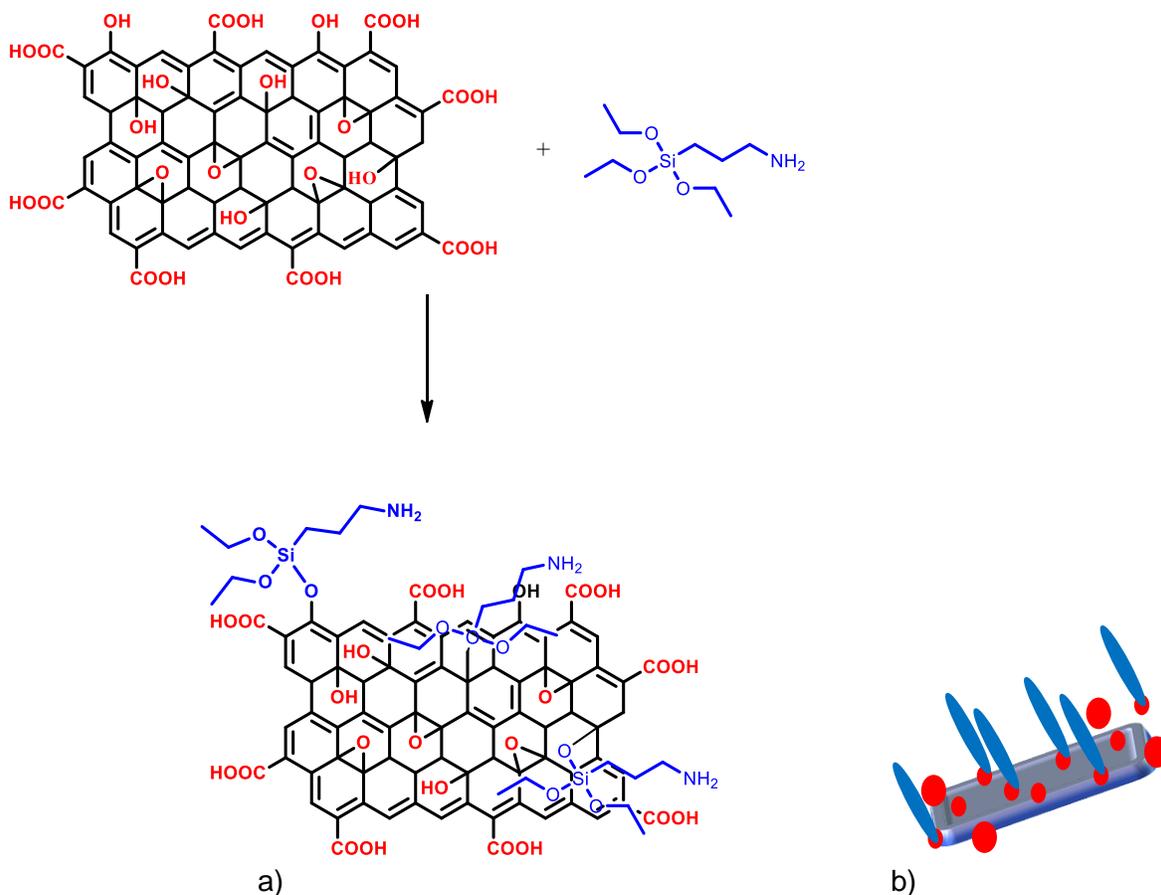


Figura 17. Funcionalización de OG con APTES. a) Esquema de reacción amino - silanización entre OG y APTES, b) Esquema general representa la obtención de OGA 1 y 2 (a, b), la lámina gris con puntos rojos representa al oxido de grafeno, siendo los puntos rojos los diferentes grupos funcionales con oxígeno y la parte azul representa al APTES soportado.

Para la amino- silanización de cada muestra de OG (OG1 y OG 2) se evaluaron dos cantidades de APTES, 0.214 (50 μ L) y 0.048 (10 μ L) mmoles, etiquetándose como se muestra en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Nomenclatura del etiquetado de las muestras conjugadas con APTES

Nombre de la muestra	Características
OGA 1a	OG 1 + 50 μ L APTES (0.214 mmol)
OGA 1b	OG 1 + 10 μ L APTES (0.048 mmol)
OGA 2a	OG 2 + 50 μ L APTES (0.214 mmol)
OGA 2b	OG 2 + 10 μ L APTES (0.048 mmol)

Finalmente, las muestras conjugadas con APTES se funcionalizaron con lactosa, mediante glicación térmica, indicada en el apartado 5.2.4. La reacción de glicación se muestra en la figura 18.

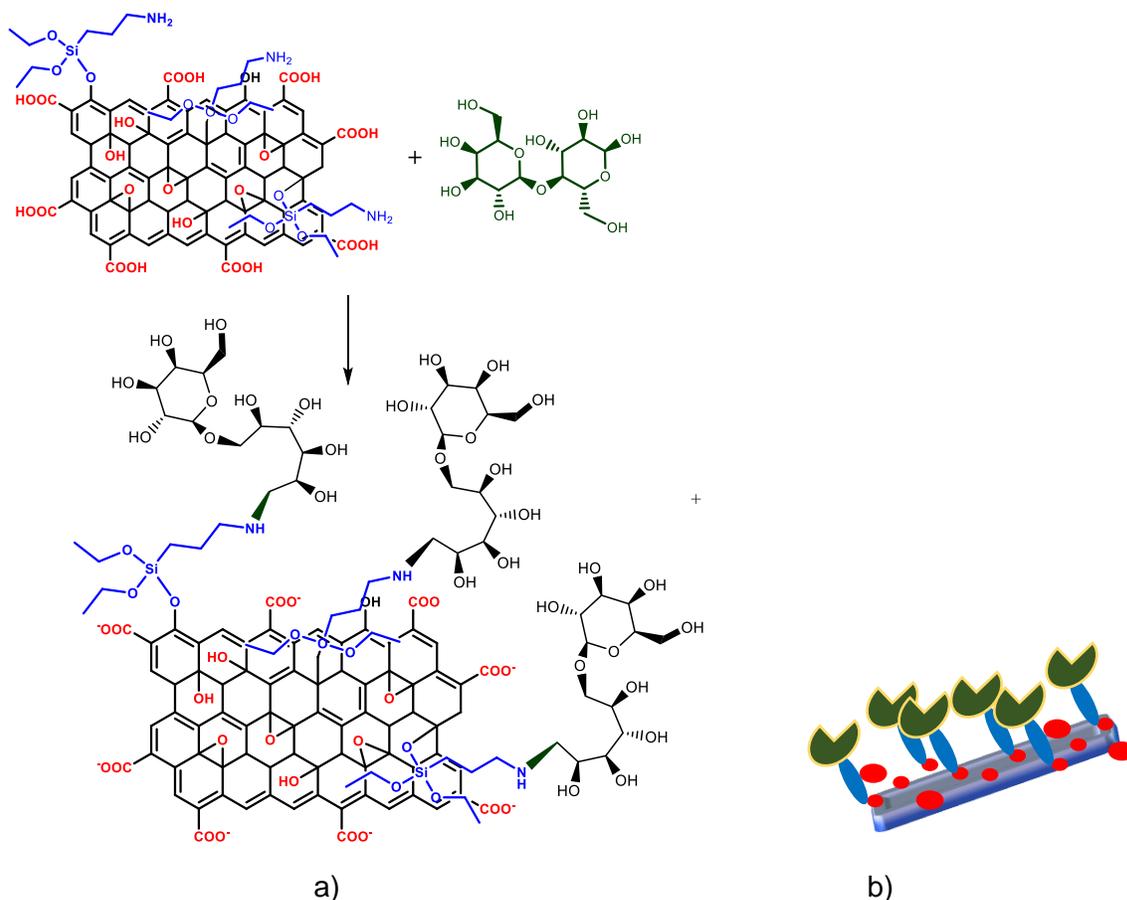


Figura 18 a) Representación de la reacción de glicación del OGA con lactosa, b) esquema general de representación del OGAL. Fuente: Gagliardino y Rossi., 2000

En esta reacción el grupo amino de APTES reaccionó con el grupo carbonilo de la glucosa presente en la lactosa, formándose primero un enlace imina (C=N) y por las condiciones acuosas y temperatura de 80°C, se estabiliza el enlace como amina (C-NH). Las muestras obtenidas por la glicación fueron etiquetadas como se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Nomenclatura del etiquetado de las muestras lactosiladas

Nombre de la muestra	Características
OGAL 1a	OGA 1a + 500 mg lactosa (1.3876 mmol)
OGAL 1b	OGA 1b + 500 mg lactosa (1.3876 mmol)
OGAL 2a	OGA 2a + 500 mg lactosa (1.3876 mmol)
OGAL 2b	OGA 2b + 500 mg lactosa (1.3876 mmol)

6.1. Observaciones físicas y químicas de OGr, OG, OGA y OGAL

Visualmente OGr y OG, presentaron solubilidad moderada en suspensión acuosa, con una tonalidad café oscuro y abundante turbidez; sin embargo, en el caso de OG, su suspensión se prolongó durante mayor tiempo en relación con OGr. Esta característica de OG se podría atribuir a la presencia de grupos oxigenados en la superficie y bordes laminares, volviéndolo más hidrofílico .

Tras la adición de APTES (OGA) las muestras no tuvieron cambios en la coloración, aunque si en la turbidez. Esta turbidez puede deberse a la acción como tensoactivo del APTES, lo cual denota su presencia en la solución. Así mismo, el efecto de precipitación no fue visible, aun dejándose en reposo durante un tiempo prolongado.

Al adicionar lactosa a las muestras de OGA, se promovió la reacción de glicación (OGAL), observándose una tonalidad oscuro - blanquecina, misma que desapareció después de los lavados. Al re- suspender la muestra, se vio mejorada su solubilidad, aunque la turbidez persistió.

Finalmente, las muestras fueron caracterizadas por la técnica de Infrarrojo para evaluar los cambios realizados durante el proceso de síntesis.

6.2. Caracterización fisicoquímica de OGr, OG, OGA y OGAL

6.2.1. Análisis por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada (FTIR-ATR)

Con la finalidad de observar las diferencias químicas, en el grado de oxigenación de las muestras OGr y OG, se realizó un análisis cualitativo por FTIR. (figura 19).

En la figura A y B se presentan los espectros de OGr 1 y 2, mientras que C y D corresponden a OG 1 y 2 respectivamente.

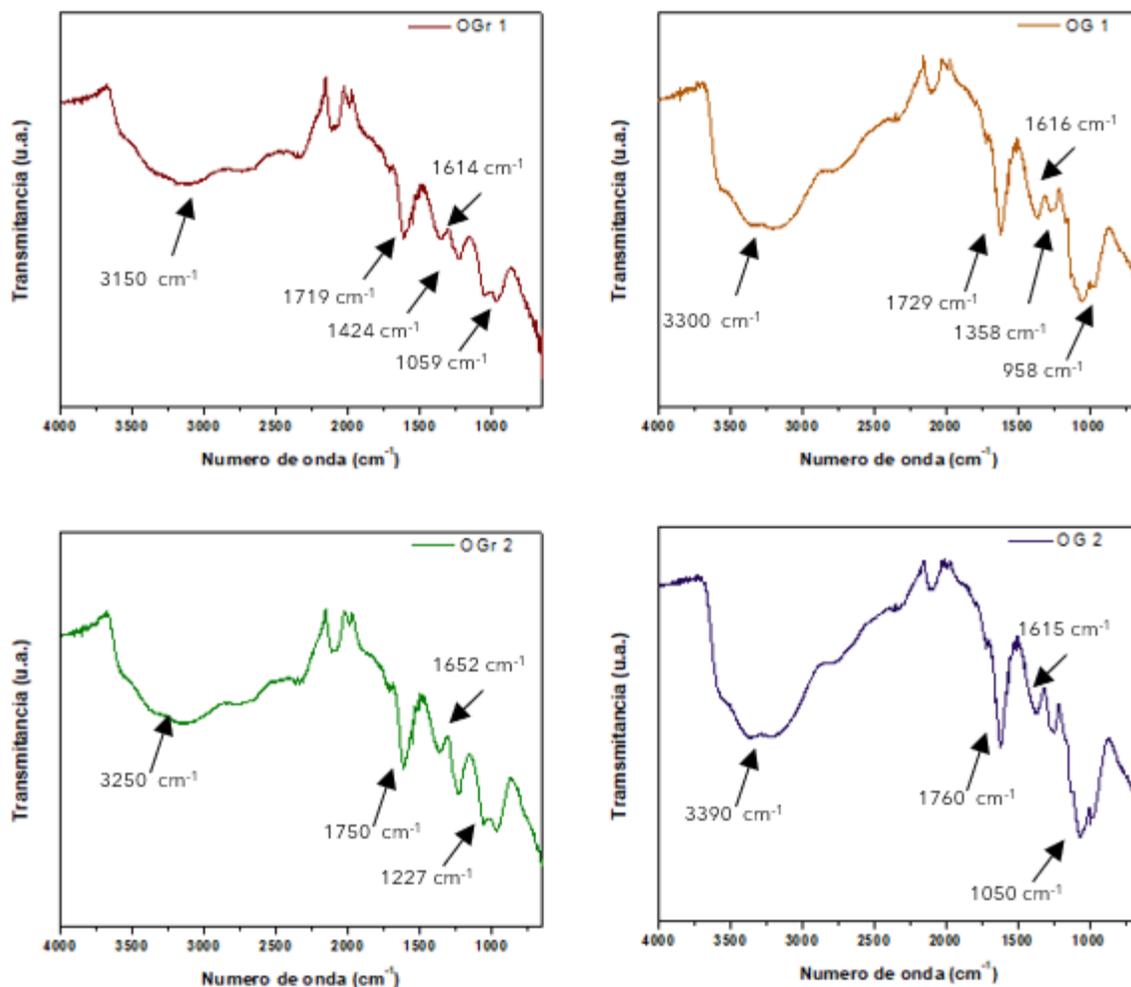


Figura 19 Espectros de FTIR por la metodología de ATR. A) OGr 1, B) OGr 2, C) OG 1 y D) OG 2.

En ambos espectros (A y B) se observan las diversas bandas, independientemente de la concentración de los reactivos. Las señales en las posiciones 1719 cm⁻¹ y 1729 cm⁻¹ corresponde a los estiramientos de los grupos carbonilo de los grupos COOH, las señales en 1614 y 1616 cm⁻¹ corresponden a los estiramientos C=C, y las señales en 1424 cm⁻¹ y 1358 cm⁻¹ corresponden a C=O del grupo ácido. En el rango de 1035 a 1065 cm⁻¹ se observa el estiramiento C-O de grupos alcoholes y la señal que aparece en el rango de 975 a 958 cm⁻¹, corresponde al estiramiento C-O de epóxidos. Las diferencias espectrales en OGr se mostraron en la banda 1059

cm^{-1} y 1227 cm^{-1} , que corresponden al estiramiento del grupo éter (-C-O) de los epóxidos y a de los $3100 \text{ cm}^{-1} - 3200 \text{ cm}^{-1}$ con la flexión correspondiente al enlace oxígeno - hidrogeno (-OH). La presencia de estas bandas debido a sus grupos funcionales, son características tanto para OGr como OG (Depan y cols., 2011). Si bien es cierto, los espectros OG 1, 2 (a y b) y OGr 1, 2 (a y b), difieren principalmente en la intensidad de sus bandas, viéndose una disminución en OGr atribuible al impedimento estérico que presenta el efecto de apilamiento laminar. Es decir, las interacciones interlaminares en OGr dejan menos expuestos los grupos funcionales para ser captados por el equipo. Así mismo, en OG se observa una deformación en el rango de los $3100 \text{ cm}^{-1} - 3200 \text{ cm}^{-1}$ debido a la presencia de humedad en las muestras analizadas. Este efecto también fue reportado por Mermoux y cols., (1991) quienes reportaron la misma banda en la región del espectro $3600 \text{ cm}^{-1} - 3200 \text{ cm}^{-1}$. Si bien esta deformación es apreciable en todas en las bandas de los espectros de la muestra, se nota con mas claridad en el rango de los $3500 - 3100 \text{ cm}^{-1}$.

El análisis FTIR-ATR de las muestras OGA y OGAL (OGA 2b y OGAL 2b) se muestra en figura 20.

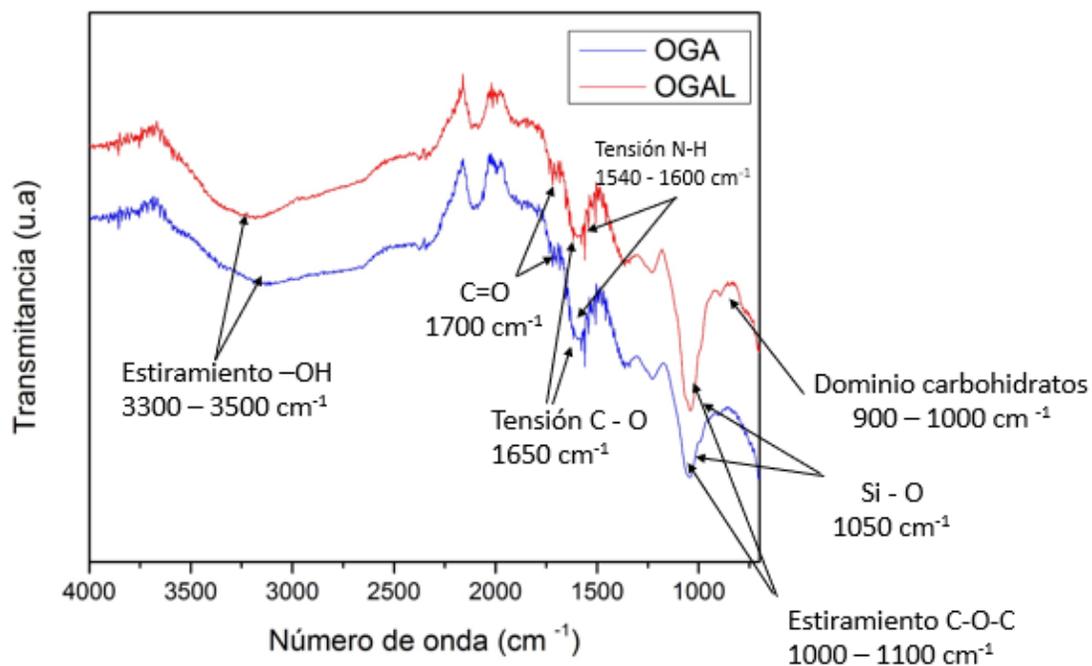


Figura 20. Espectros FTIR – ATR de OGAL 2b (rojo), y su intermediario OGA 2b (azul).

Se observa que los espectros de OGA a diferencia de los espectros de OG (Figura 19), muestran cambios en la región de 3500 a 2000 cm^{-1} , un estiramiento C-H a 2900 cm^{-1} , el cual se empalma con el estiramiento N-H que aparece en esta región. Además, se observaron picos más definidos en la región de 1300 a 900 cm^{-1} , que corresponden a las señales Si-O-C, Si-O-Si y Si-O-C. Sin embargo, debido al empalmamiento de las señales en esta región, no se observaron bandas definidas para asignarlas correctamente. Resultados similares fueron reportados por Serodre y cols., (2019), con bandas de Si-O-Si a 894 cm^{-1} , Si-O-C a 1014 cm^{-1} y Si-OH a 1117 cm^{-1} . También Araque-Caballero (2015), mostró resultados similares en las vibraciones de los enlaces N-H a 3414 cm^{-1} , C-H a 2933 cm^{-1} , banda Si-O-C a 1038 cm^{-1} , Si-O-Si a 1045 cm^{-1} y Si-O-C 1125 cm^{-1} .

Por otra parte, en el espectro de OGAL, además de las bandas características de APTES, se observó la aparición de una banda del grupo amina (-NH) a 1630 cm^{-1} y C-N a 1302 cm^{-1} . También se observó la banda correspondiente a la huella de carbohidratos alrededor de los 900 – 1000 cm^{-1} . La aparición de esta banda fue también reportada por Kaminska y cols., (2015), en el rango de los 1050 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} . Así mismo, Solís-Oba y cols., (2011), informaron la aparición de una banda de 930 a 1190 cm^{-1} correspondiente a lactosa, y de 1500 a 1700 cm^{-1} el grupo amida. Si bien este estudio por FTR-ATR no brindó información preliminar de la presencia de lactosa, el ensayo con lectina ligado a una enzima (ELLA), nos permitió confirmar la disponibilidad de esta molécula dado su interacción con la lectina RCA.

6.2.2. Ensayo con lectina ligado a enzima (ELLA) para la identificación de lactosa en OGAL

En la vectorización del material (OGAL), utilizando lactosa como ligando, es necesario determinar que la galactosa quedó expuesta y que el tratamiento de glicación no afectó su estructura, preservando su capacidad para establecer reconocimiento biológico. Para esto, se realizó un análisis de bio- reconocimiento, con la lectina RCA1, de todas las muestras OGAL con las diferentes modificaciones realizadas durante la síntesis (Figura 21).

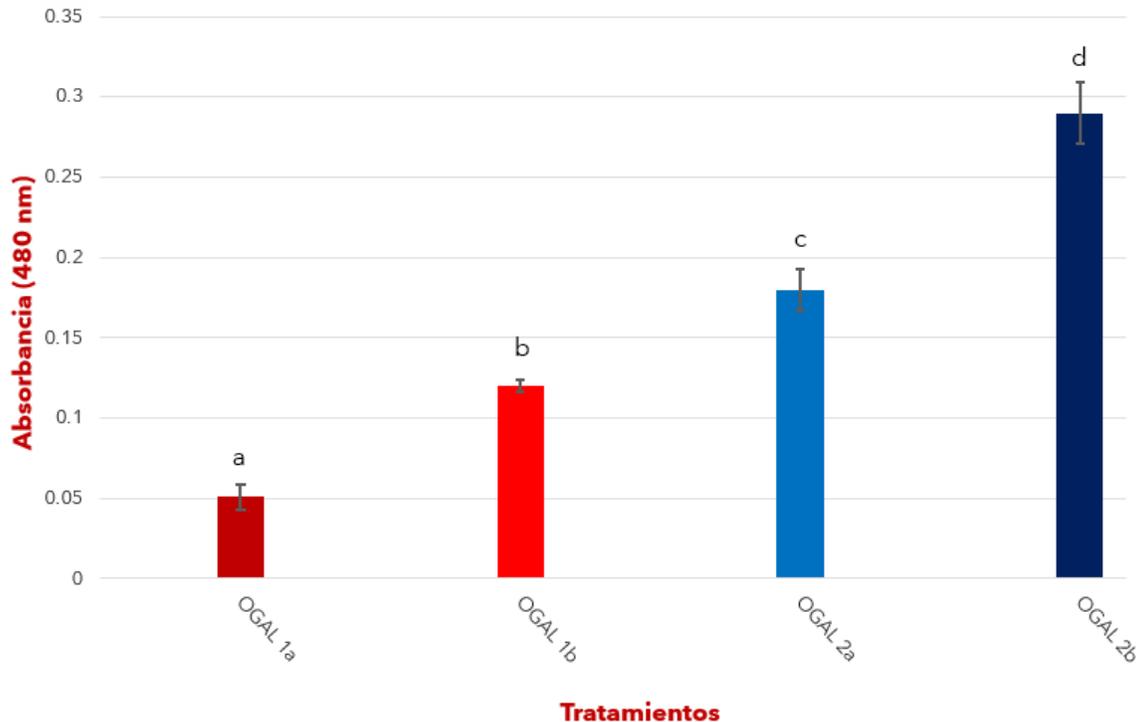


Figura 21. ELLA para el reconocimiento de OGAL por la lectina *Ricinus communis*. OGAL 1a (rojo-oscuro), OGAL 1b (rojo), OGAL 2a (azul) y OGAL 2b (azul-oscuro) Los valores de densidad óptica a 480 nm se compararon mediante la prueba t de Student. $p \leq 0.05$. Diferentes letras (a, b, c y d) indican la significación estadística ($p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos indicaron que todas las muestras fueron conjugadas adecuadamente con lactosa, ya que todas presentaron reconocimiento con la lectina RCA. Este reconocimiento se logró debido a la unión covalente del término reductor de la lactosa (glucosa) con el grupo amino terminal de APTES, dejando disponible la galactosa (Sarabia y cols., 2011; Ledesma-Osuna y cols., 2018). Las muestras OGAL 2 (a, b), obtenidas por el método de Hummer-Offerman modificado, presentaron mayor bio- reconocimiento, lo que indica que estas muestras presentaron mayor accesibilidad a reaccionar con lactosa, ya que se incrementaron los sitios oxigenados con los que reaccionó el APTES.

Al comparar las muestras OGAL 2 se observó mayor bio- reconocimiento en las muestras con menor cantidad de APTES (OGAL 2b), mientras que en el caso de OGAL 1, el reconocimiento por la lectina fue mayor en OGAL1b. Lo anterior indica que la saturación en OG se alcanzó por debajo de los 50 μL de APTES, es decir,

que la cantidad de APTES presente en OG está condicionado por la primera etapa de síntesis, ya que las muestras con mayor grado de oxidación, fueron las que mostraron mejores resultados (Liu y cols., 2013).

6.2.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

En la figura 22 se muestran las imágenes obtenidas por la técnica de AFM. Este estudio permite evaluar los cambios morfológicos de los materiales cuando son sometidos a una reacción química. Las imágenes A y B corresponden a los materiales antes de la exfoliación, mientras que C y D corresponden a la de los materiales después de la exfoliación.

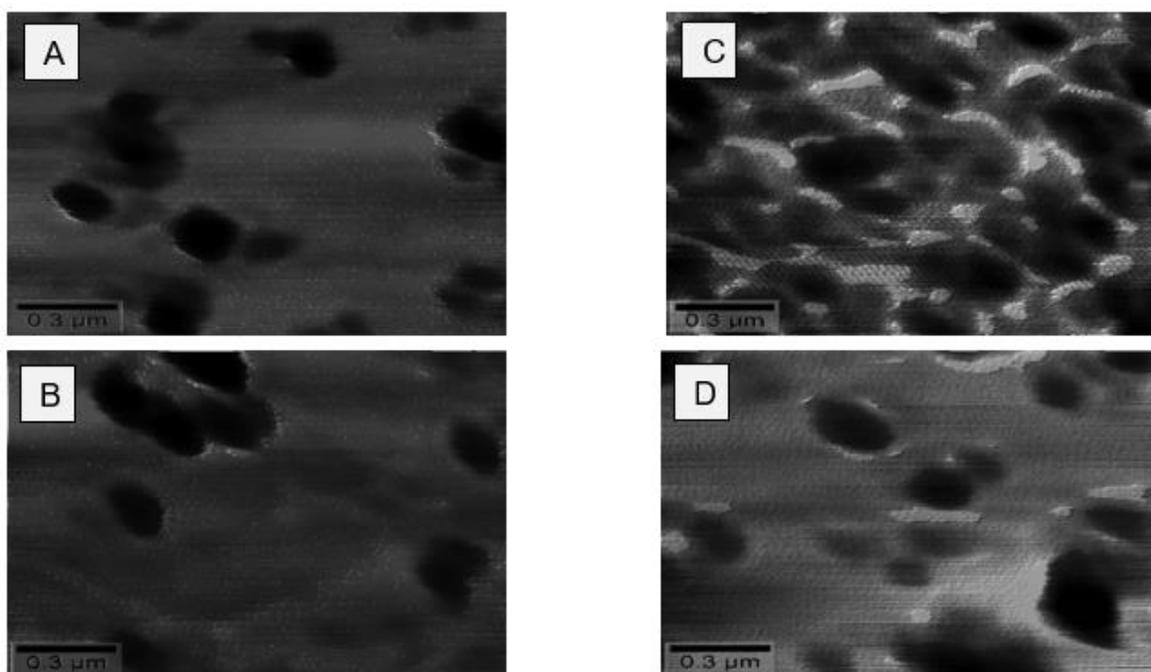


Figura 22. Caracterización morfológica por AFM de: A) **OGr 1**, B) **OGr 2**, C) **OG 1** y D) **OG 2**. Lado izquierdo OGr 1 y OGr 2; lado derecho: OG 1 y OG 2

Morfológicamente, las láminas de OGr tienen un arreglo por apilamiento, con bordes irregulares y abundante rugosidad, mientras que OG, al tratarse de mono- láminas, el arreglo visual tiende a ser mucho más difuminado con un contorno laminar más definido. OGr 1 y OGr 2 obtuvieron un tamaño laminar de aproximadamente 300 nm de longitud y 8 nm de ancho. Estas dimensiones disminuyeron en el caso de las muestras exfoliadas (OG 1 y OG 2), cuyos tamaños fueron de alrededor de 220 nm

de longitud y 3 nm de grosor. Resultados similares fueron presentados por Wang y cols., (2018), quienes obtuvieron láminas de OG de 297 nm con un grosor de 2.53 nm. Las dimensiones de las muestras de grafito pueden explicarse por la presencia de interacciones de Van der Waals presentes entre lámina y lámina (Ruoff y cols., 2009), pero al momento de oxidarse el grafito, aumenta la presencia de grupos funcionales en la superficie y bordes laminares, aumentando su distancia interlaminar. Esto provoca una disminución de las fuerzas Van der Waals, pasando la distancia interlaminar de 6 Å, presente en el grafito, a casi el doble en las muestras OGr (Park y cols., 2009). Además se dan corrimientos de las láminas, dando un mayor tamaño al material. Al llevar a cabo la exfoliación, hay rompimientos de las interacciones intermoleculares presentes en el OGr y se obtienen mono- laminas gráficas, las cuales presentan un menor grosor laminar (Krishnamoorthy y cols., 2013).

Las imágenes de OGA (OGA 2b) y OGAL (OGAL 2b) se muestran en la figura 23. Se puede observar que, a pesar del aumento en la complejidad molecular del compuesto, hay mayor nitidez al momento de observar la estructura panorámica laminar.

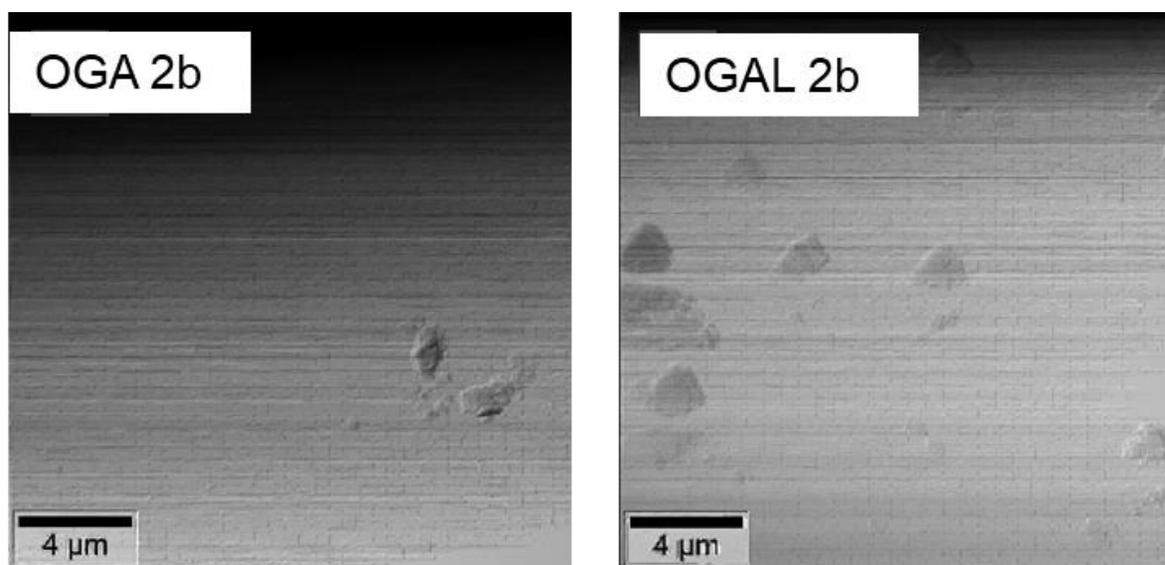


Figura 23. Micrografías de OGA 2b (lado izquierdo) y OGAL 2b (lado derecho)

Dado que en las etapas de adición APTES y lactosa se realizaron varios ciclos de sonicación, es entendible la presencia de mono- laminas con diferentes tamaños y aspectos. Por ejemplo, en la imagen de OGA se observa una estructura muy similar a la mostrada con OG en la figura 20; sin embargo, la diferencia morfológica radica al momento de contrastarlo con OGAL, ya que este tiene un aspecto semi globular. Esta diferencia probablemente se atribuya al acomodo que adquirió la lactosa en las láminas de OG, así como a la forma en como esta quedó disponible. El aumento en el tamaño no solo confirma que la modificación se llevó a cabo, sino que también coincide con lo reportado por Cao y cols., (2015), quienes atribuyeron este aumento al efecto de reticulación a través de la formación de enlace amida.

6.2.4. Potencial Z

Para evaluar la carga superficial de las muestras y por tanto su estabilidad coloidal, se realizó la medición de su potencial Z (tabla 5) en diferentes solventes. Los valores de potencial Z para OGr 2 y OG 2 son mayores con respecto a OGr 1 y OG 2. Esto indica que las modificaciones realizadas a los métodos para la obtención de OGr fueron adecuados, ya que el material se oxido en mayor grado.

Tabla 5. Valores de potencial Z (mV), en diferentes solventes para las muestras OGr 1, OGr 2, OG 1 y OG 2.

Solvente	Muestra			
	OGr 1	OGr 2	OG 1	OG 2
Agua desionizada	-33 ± 0.4	-35 ± 0.5	-45 ± 0.3	-47 ± 0.8
Solución salina fisiológica	-20 ± 0.7	-20 ± 0.8	-24 ± 0.2	-26 ± 0.1
PBS	-25 ± 0.4	-26 ± 0.1	-31 ± 0.6	-33 ± 0.7
DMEM	-22 ± 0.9	-24 ± 0.5	-27 ± 0.8	-29 ± 0.3

Al comparar los valores de potencial Z obtenidos entre OGr 1 / OG 1 y OGr 2 / OG 2, se observa que en OG se obtuvieron valores mayores, lo cual pudiera atribuirse a que su aspecto laminar le permite interactuar con mayor facilidad con el medio. En este contexto, las muestras OGr presentan un apilamiento laminar, lo que disminuye esta interacción (Deng y cols., 2011). De los cuatro materiales presentados en la tabla 5, la muestra OG 2 fue la que presentó la mejor estabilidad

en todos los medios, ya que el material se encuentra con grupos cargados en forma aniónica, lo cual pudiera indicar que los grupos carboxilatos se encuentran desprotonados, permitiendo una interacción mayor con el agua, a través de puentes de hidrógeno (Krishnamoorthy y cols., 2012).

La carga de la muestra OG 2 cambio de -47 ± 0.8 mV a -26 ± 0.1 mV cuando pasó de agua desionizada a solución salina fisiológica. Este mismo comportamiento se observó con el resto de las muestras. La disminución de la carga se atribuyó a que en la solución salina fisiológica se encuentran cationes (Na^+) que interactúan con los grupos cargados de los materiales formando enlaces iónicos, lo que disminuye la carga del material. En PBS también están presentes cationes y aniones (fosfato de sodio, cloruro de potasio y fosfato de potasio), los cuales incrementan también los valores de potencial Z. (Ren y cols., 2012; Feng y cols., 2011).

En DMEM, las moléculas presentes son más complejas (aminoácidos, glucosa, sales, vitaminas), por lo que se da un mayor número de interacciones de diferente naturaleza como las interacciones iónicas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Las diferentes interacciones que se pueden presentar entre el medio y los grupos presentes en las muestras están los pares iónicos entre los grupos carboxilatos y los grupos aminos de los aminoácidos, lo cuales permitirían estabilizar la carga superficial de la lámina, pero desestabilizarían su capacidad de suspensión en el medio, por lo que el potencial Z es bajo (McCallion y cols., 2015). La etapa de reacción con APTES y lactosa, las muestras obtenidas OGA y OGAL, fueron analizadas también mediante potencial Z (Tabla 6 y 7).

Tabla 6. Valores de potencial Z (mV) en diferentes solventes para las muestras OGA 1a, OGA 1b, OGA 2a y OGA 2b.

Medio	Muestra			
	OGA 1a	OGA 1b	OGA 2a	OGA 2b
Agua desionizada	-35 ± 0.4	-32 ± 0.5	-37 ± 0.3	-39 ± 0.2
Solución salina fisiológica	-20 ± 0.6	-23 ± 0.1	-19 ± 0.8	-20 ± 0.7
PBS	-25 ± 0.6	-15 ± 0.9	-27 ± 0.1	-25 ± 0.4
DMEM	-21 ± 0.7	-9 ± 0.1	-18 ± 0.4	-22 ± 0.9

Tabla 7. Valores de potencial Z (mV) en diferentes solventes para las muestras OGAL 1a, OGAL 1b, OGAL 2a y OGAL 2b.

Medio	Muestra			
	OGAL 1a	OGAL 1b	OGAL 2a	OGAL 2b
Agua desionizada	-32 ± 0.4	-33 ± 0.6	-38 ± 0.4	-35 ± 0.3
Solución salina fisiológica	-18 ± 0.5	-20 ± 0.2	-16 ± 0.2	-12 ± 0.2
PBS	-17 ± 0.8	-13 ± 0.6	-19 ± 0.7	-22 ± 0.3
DMEM	-9 ± 0.4	-7 ± 0.1	-14 ± 0.3	-11 ± 0.3

Debido a que los valores obtenidos en FTIR-ATR y ELLA fueron las muestras con mejores características para el propósito del trabajo, solamente OGA 2b y OGAL 2b fueron analizados.

Como se puede observar, OGA y OGAL mostraron un comportamiento muy similar al obtenido por las muestras OG, es decir, el valor más alto se obtuvo en agua desionizada con -35 ± 0.3 y -39 ± 0.2 para OGAL y OGA respectivamente, mientras que los valores más bajos fueron en DMEM con -11 ± 0.3 y -22 ± 0.9 , respectivamente. Esta disminución en los valores se le puede atribuir a las modificaciones químicas realizadas en la superficie y bordes laminares tras la incorporación de moléculas de APTES y lactosa. Estas moléculas no sólo afectan los puntos de interacción antes mencionados, sino que aumentan el peso molecular del coloide, permaneciendo menor tiempo en suspensión (Patil y cols., 2007). Los valores obtenidos son prometedores para aquellas moléculas con funcionalidad y se considera que tienen una estabilidad óptima cuando alcanzan valores alrededor de los -30 mV (Zeta, P., 1997). Los materiales sintetizados en este trabajo se espera que puedan ser utilizados como materiales acarreadores de fármacos, razón por la cual se realizaron pruebas para evaluar su toxicidad.

6.2.5. Análisis hemolítico del óxido de grafeno

Para evaluar el posible efecto hemolítico de los materiales gráfiticos, se pusieron a interaccionar OGr (1, 2) y OG (1, 2) con glóbulos rojos. La figura 24 muestra que ninguna de las muestras presentó efecto hemolítico incluso a concentraciones de 2

mg/mL. La metodología empleada se presenta en la sección 5.3.5. Las fotografías muestran los glóbulos rojos en el fondo y claridad en el sobrenadante sin evidencia de color rojo atribuible a hemoglobina libre. Esto pone de manifiesto que ni el tamaño de las láminas ni la concentración de las muestras, tienen un efecto nocivo para los eritrocitos (Wang y cols., 2015; Singh y cols., 2012).

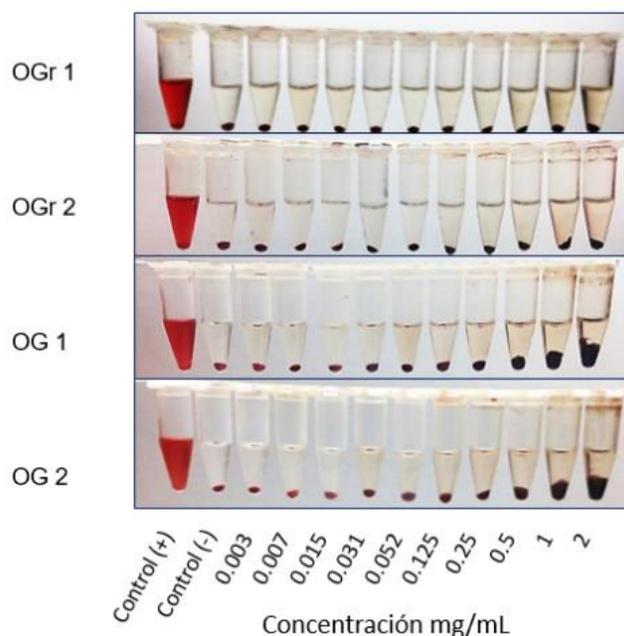


Figura 24. Evaluación del efecto hemolítico en GR tratados con muestras OGr y OG. Fila 1) muestra OGr 1; fila 2) OGr 2; fila 3) OG 1 y fila 4) OG 2. Control positivo (agua + eritrocitos), control negativo (PBS + eritrocitos). Los experimentos se hicieron por triplicado.

La tonalidad turbio – oscura que se observa en el sobrenadante de las muestras con mayor concentración son propiamente del material gráfico. La representación gráfica de la viabilidad de los glóbulos rojos se muestra en la figura 25, donde las muestras fueron sometidas a concentraciones diferentes del material gráfico en el rango de 0.003 a 2 mg/mL y se compararon con un control positivo (agua + sangre) y un control negativo (PBS + sangre).

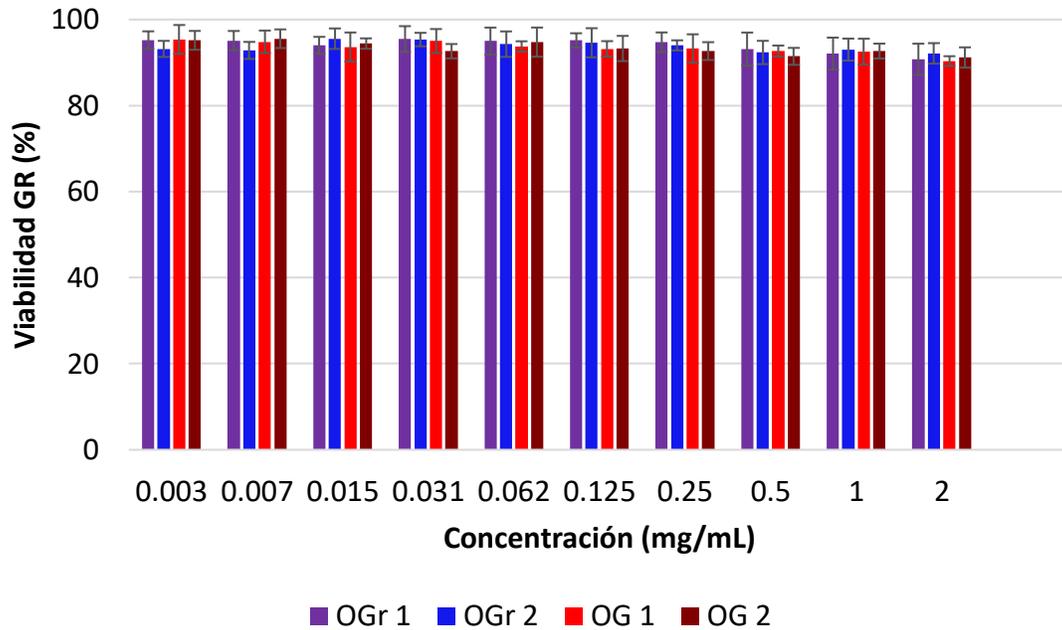


Figura 25. Representación gráfica porcentual de viabilidad de GR con OGr y OG. Los glóbulos rojos se incubaron con diferentes concentraciones (0.003 a 2 mg/mL) de OGr 1 (morado), OGr 2 (azul) y OG 1 (rojo), OG 2 (rojo-oscuro). La representación gráfica de la viabilidad de los glóbulos rojos se determinó en función del grado de hemólisis. Los datos son la media \pm desviación estándar para tres experimentos separados.

Los valores obtenidos fueron confirmativos de lo observado en la figura 24, ya que el porcentaje de viabilidad celular, incluso a concentraciones elevadas, se mantuvo por encima del 90%. Este comportamiento de las muestras fue similar al reportado por Pinto y cols., (2013), quienes encontraron que laminas obtenidas por el método de Hummers, no causaron lisis de los glóbulos rojos a concentraciones de 200 μ g/mL.

Los valores de viabilidad de las muestras OGA 2b y OGAL 2b (figura 26) fue también similar y confirma que las modificaciones realizadas en la estructura del material, inducen un efecto nocivo sobre los eritrocitos (Bhattacharya y cols., 2016).

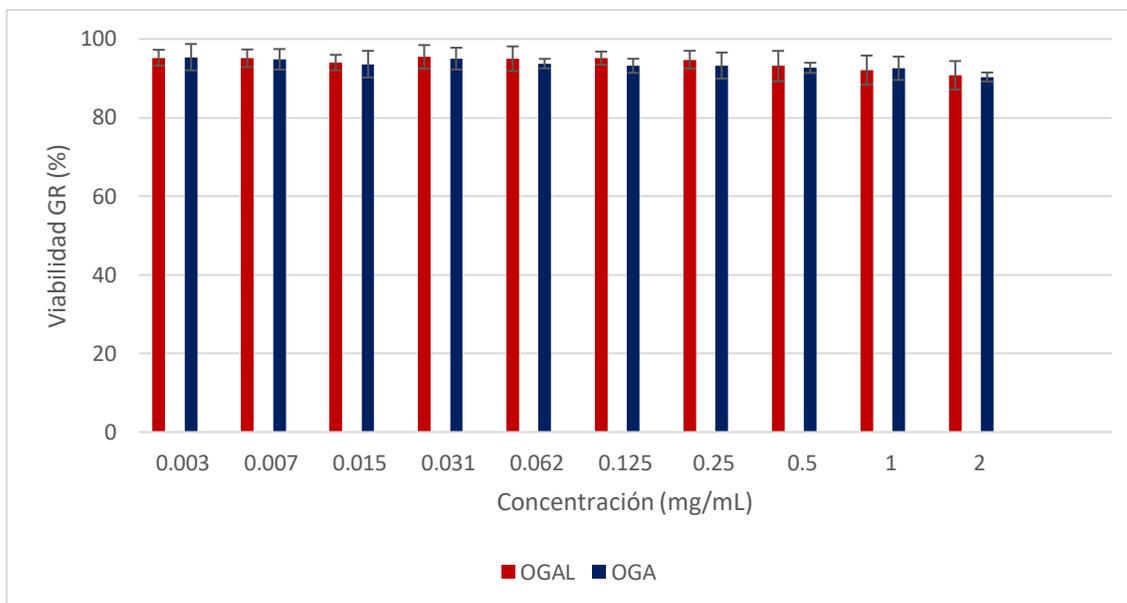


Figura 26. Ensayo de viabilidad de glóbulos rojos con OGA y OGAL. Los glóbulos rojos se incubaron con diferentes concentraciones (0.003 a 2 mg/mL) de OGAL 2b (rojo) y OGA 2b (azul). La representación gráfica de la viabilidad de los glóbulos rojos se determinó en función del grado de hemólisis. Los datos son la media \pm desviación estándar para tres experimentos separados.

Por lo tanto, las muestras OGA 2b y OGAL 2b evaluadas, no presentaron efecto hemolítico significativo sobre los eritrocitos, incluso a concentraciones de 2 mg/mL, pues el porcentaje de viabilidad se mantuvo por encima del 90%. De esto concluimos que, el compuesto OGAL, no indujo un efecto nocivo al contacto con células eritrocitarias.

6.2.6. Ensayo MTT

El efecto citotóxico sobre el metabolismo celular se evaluó en las líneas celulares HeLa, T47D y HepG2 mediante la técnica del MTT. Esta prueba se basa en medir la capacidad de las mitocondrias por reducir este reactivo. Los resultados que se presentan en las figuras 27 28 y 29, se observa que las muestras no mostraron efectos sobre la actividad mitocondrial en células HepG2, T47D y HeLa, lo que indica que las células no se vieron afectadas a concentraciones de 0.003 - 0.25 mg/mL, el porcentaje de viabilidad se mantuvo por encima del 80 % en las tres líneas celulares.

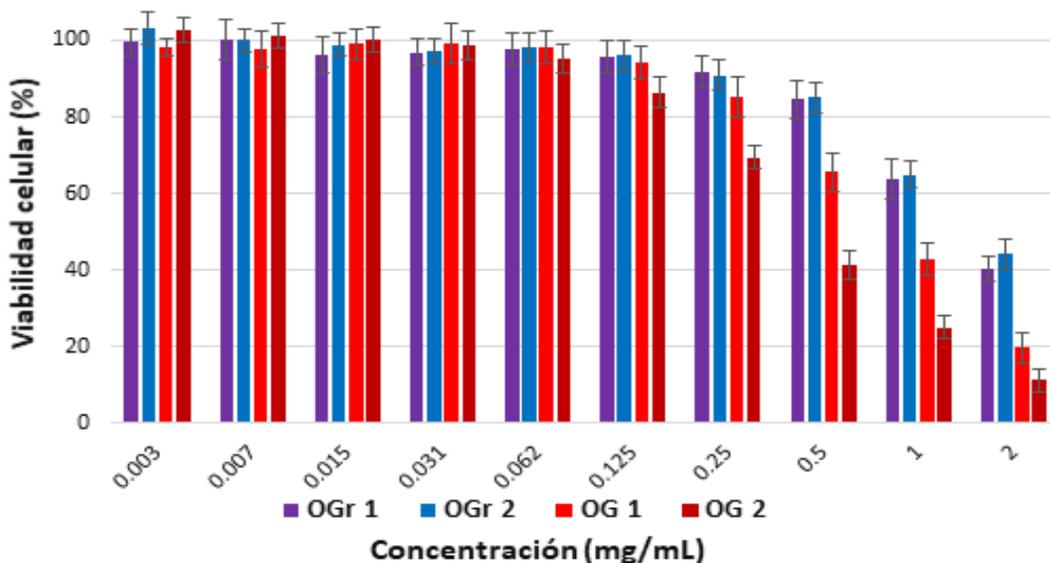


Figura 27. Ensayo MTT con OGr y OG en células HeLa. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGr 1 (morado), OGr 2 (azul), OG 1 (rojo) y OG 2 (rojo-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.

En los ensayos con células HeLa, se observó la mayor pérdida de viabilidad respecto altas concentraciones, especialmente en las muestras OG 1 y OG 2. Al aumentar la concentración, la citotoxicidad fue mayor ya que la viabilidad celular fue disminuyendo considerablemente, pues los valores de la IC_{50} fue 0.5 mg/mL en HeLa. La citotoxicidad puede atribuirse a factores físicos como: tamaño, características dimensionales, defectos estructurales; y químicos como: grupos funcionales y carga (Sarkar y cols., 2015).

En el caso de la línea celular T47D y HepG2 (figura 28 y 29), la disminución del porcentaje de viabilidad fue del 40% a concentraciones de 1 - 2 mg/mL. Tadzyszak y cols., (2018), informaron que la toxicidad del material es dependiente de la célula, y señalaron la importancia de la química superficial del OG, es decir, de las moléculas utilizadas para modificar la estructura de grafeno.

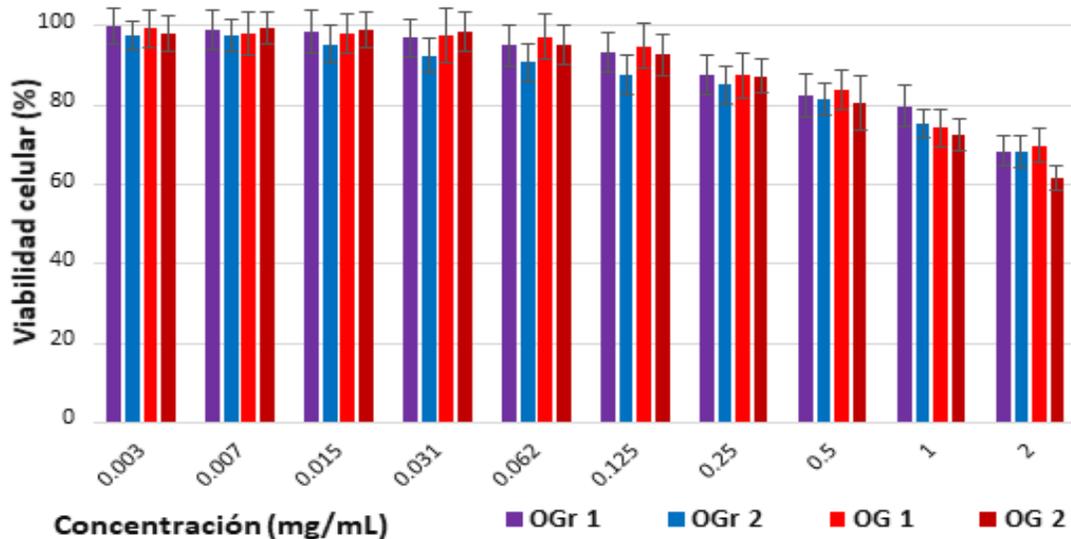


Figura 28. Ensayo MTT con OGr y OG en células T47D. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGr 1 (morado), OGr 2 (azul), OG 1 (rojo) y OG 2 (rojo-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.

Estos resultados coincidieron con los reportados por De (2014) y Kawata (2009) quienes informaron toxicidad no significativa en células de cáncer de pulmón y carcinoma hepatocelular, resaltando la importancia del tamaño y estructura laminar del compuesto.

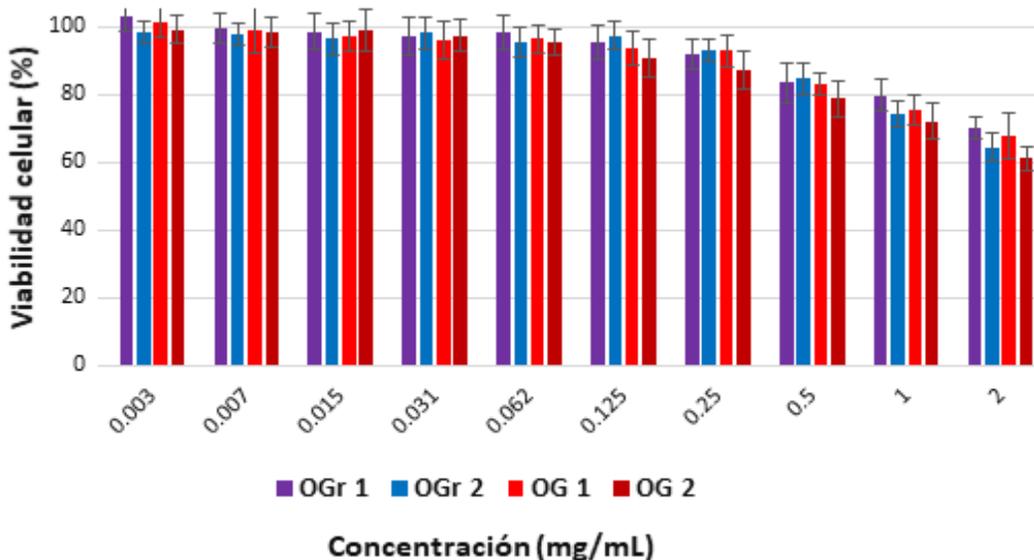


Figura 29. Ensayo MTT con OGr y OG en células HepG2. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL) de OGr 1 (morado), OGr 2 (azul), OG 1 (rojo) y OG 2 (rojo-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.

En las tres líneas celulares probadas en el ensayo hubo mayor sensibilidad a la citotoxicidad a concentraciones altas, lo cual concuerda con lo publicado por Pérez-Albaladejo y cols., 2017, quien menciona que la velocidad y facilidad con la que un compuesto entra en la célula depende principalmente de la biodisponibilidad en el medio, de las propiedades físico - químicas de la molécula y de la permeabilidad de la membrana plasmática.

Dado que las afecciones ocasionadas por OGr y OG en líneas celulares se debe a la inducción excesiva de especies reactivas de oxígeno, es de suma importancia su funcionalización para aumentar su compatibilidad con fines biológicos (Gurunathan y cols., 2013). Estas especies producen oxidación de biomoléculas como lípidos y proteínas en la membrana celular. La oxidación de las moléculas que conforman la membrana altera su permeabilidad selectiva, lo que conduce a una pérdida del equilibrio osmótico de la célula (Pérez y cols., 2007). La representación gráfica de los valores obtenidos para el ensayo MTT de estos materiales se muestra en las figuras 30, 31 y 32, donde se puede observar que a concentraciones incluso de 2 mg/m, el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo por encima del 90%.

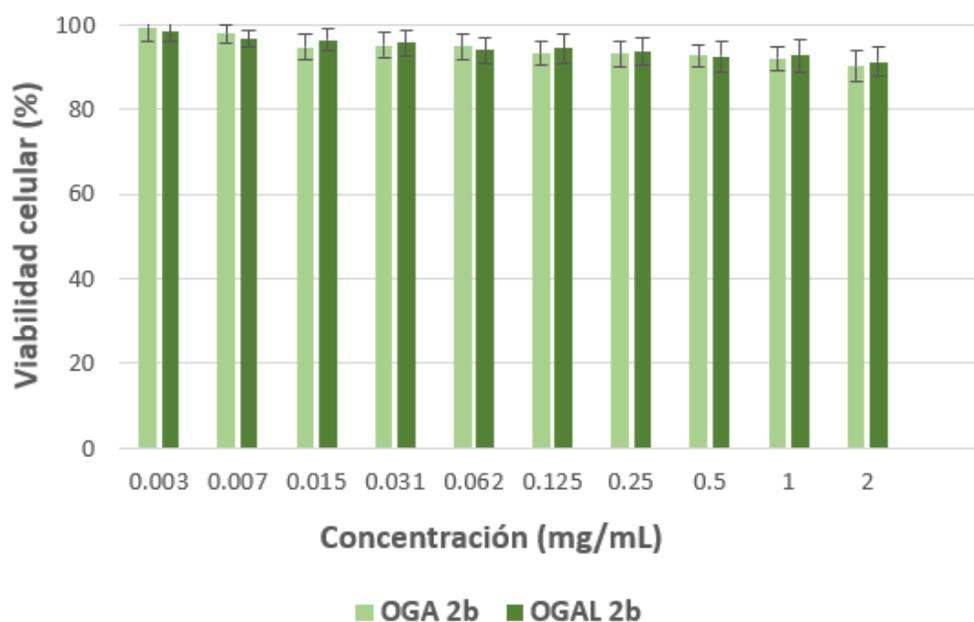


Figura 30. Ensayo MTT en células HeLa con OGA y OGAL a diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL). Muestra OGA 2b (verde) y OGAL 2b (verde-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.

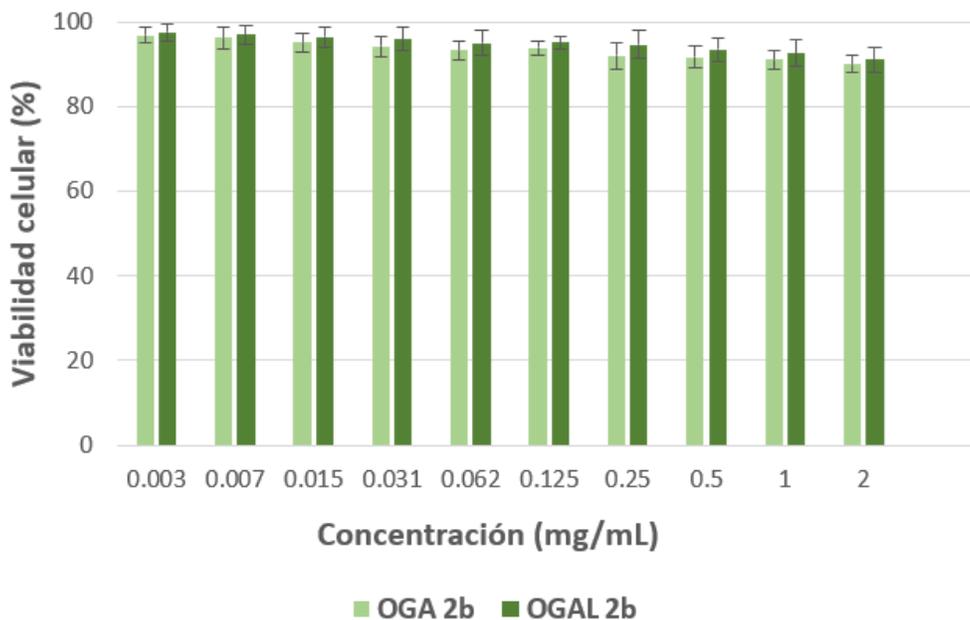


Figura 31. Ensayo MTT en células T47D con OGA y OGAL. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL). Muestra OGA 2b (verde) y OGAL 2b (verde-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.

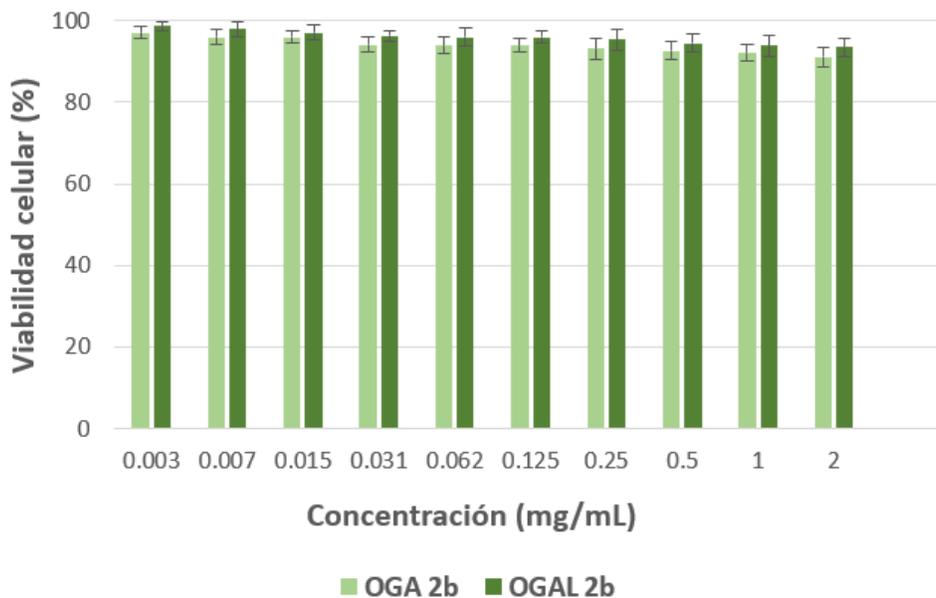


Figura 32. Ensayo MTT en células HepG2 con OGA y OGAL a diferentes concentraciones (0.003 – 2 mg/mL). Muestra OGA 2b (verde) y OGAL 2b (verde-oscuro). Los datos son medias \pm desviación estándar para tres experimentos separados.

Aunque ninguna de las muestras OGA/ OGAL mostró citotoxicidad significativa a concentraciones de 0.003 - 2 mg/mL en las líneas celulares evaluadas, es relevante

destacar que la funcionalización de OGA con lactosa, pudo aumentar su biocompatibilidad. Un estudio similar fue realizado por Cao y cols., (2015), quienes evaluaron la compatibilidad de láminas de OG lactosilado en cultivos HepG2. Reportaron que las muestras no indujeron estrés oxidativo ni ruptura mecánica de las membranas celulares por el tamaño laminar, que son los mecanismos más aceptables para explicar la citotoxicidad del grafeno (Yuan y cols., 2012). Presuntivamente, dado que la lactosa es un azúcar no tóxico y la superficie del OG se encuentra recubierta con ella, entonces las láminas pueden ser endocitadas y no inducir un efecto nocivo en el metabolismo celular en el tiempo de evaluación utilizado en el experimento. De Sousa y cols., (2018), sintetizaron láminas de OG recubiertas con el carbohidrato manosa a concentraciones de 250 $\mu\text{g/mL}$, sin reportar algún efecto citotóxico en la evaluación *in vitro*. En este contexto, el nivel de lactosilación de OG es una estrategia interesante para modular los efectos biológicos hacia una mejor biocompatibilidad (Tadyszak y cols., 2018). Estos resultados sugieren que, tras la funcionalización del material con carbohidratos, la biocompatibilidad con agentes celulares fue buena.

6.2.7. Adsorción de doxorrubicina en OGAL

Por los resultados anteriormente obtenidos, la muestra OGAL 2b fue seleccionada para evaluar a capacidad de adsorber doxorrubicina en su estructura. Para esto se utilizó la metodología reportada por Wu y cols., (2013) descrita en la sección 5.2.5.

El OG estructuralmente posee anillos aromáticos en su superficie, es decir, su estructura plana con orbitales tipo π permite las interacciones de apilamiento π - π con moléculas ricas en anillos aromáticos, como DOX. Además, la presencia de los diferentes grupos oxigenados permite también formar otros tipos de interacciones, como los puentes de hidrógeno con los grupos ácidos carboxílicos, hidroxilos y grupos carbonilos, así como también interacciones electrostáticas entre los grupos carboxilatos. La DOX es una molécula plana que también puede formar interacciones π - π pero también tiene grupos NH_2 y OH que pueden formar puentes de hidrógeno, y dependiendo del pH, interacciones electrostáticas (Lin y cols.,

2008). En la figura 33, se ejemplifica las posibles interacciones entre DOX y OGAL
2b.

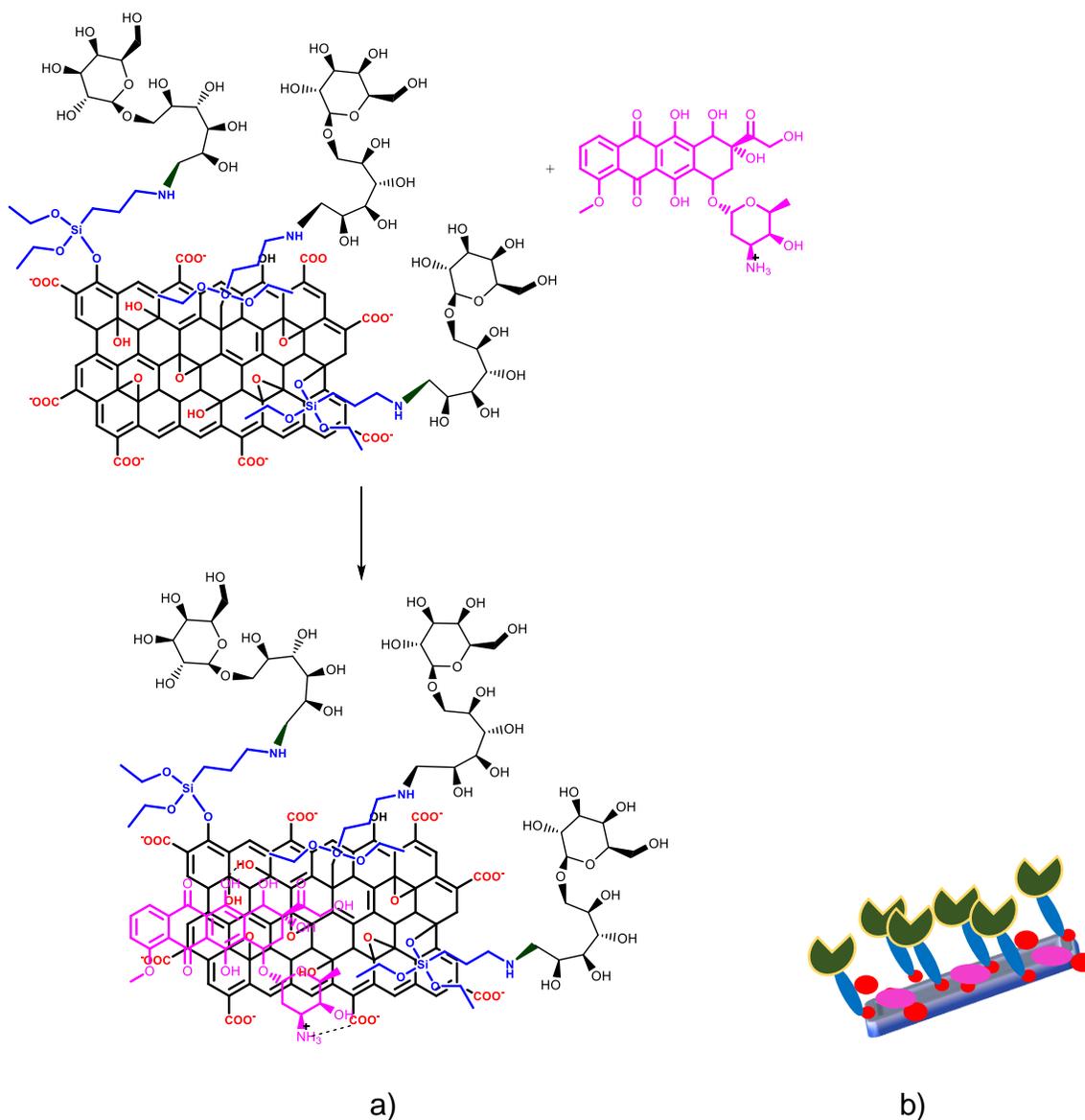


Figura 33. Mecanismo de reacción entre OGAL y DOX. a) Representación de la adsorción de DOX en OGAL y b) esquema general de representación del OGAL- DOX.

Estas interacciones denotan la posibilidad de adsorción de DOX sobre las laminas de OG, por agitación moderada en ausencia de luz (Vovusha y cols., 2018). Chen y cols., (2018) reportaron la efectividad de carga de DOX en un sistema a base de

OG y ácido lactobiónico. Así mismo, Dai y cols., corroboraron una alta eficiencia de cargar de DOX sobre láminas de OG - PEG

6.2.8. Evaluación del OGAL como vehículo transportador de doxorubicina.

Este estudio consistió en evaluar el reconocimiento del material OGAL 2b en células HepG2 (células que expresan el RAGP) por microscopía confocal. Se utilizó como control negativo, la línea celular HeLa (células que no expresan este receptor). Debido a la propiedad fluorescente de la DOX, no fue necesario el marcaje previo con un fluoróforo para evidenciar la interacción (Motlagh y cols., 2016). En la figura 32 se evidencia la interacción entre el RAGP de las células HepG2 con OGAL 2b-DOX, lo cual se evidencia con una emisión de fluorescencia post- excitación a 540nm. Las fotografías inferiores corresponden a los cultivos de HeLa, izquierda campo claro, centro campo oscuro y derecha excitación para emisión de DOX.

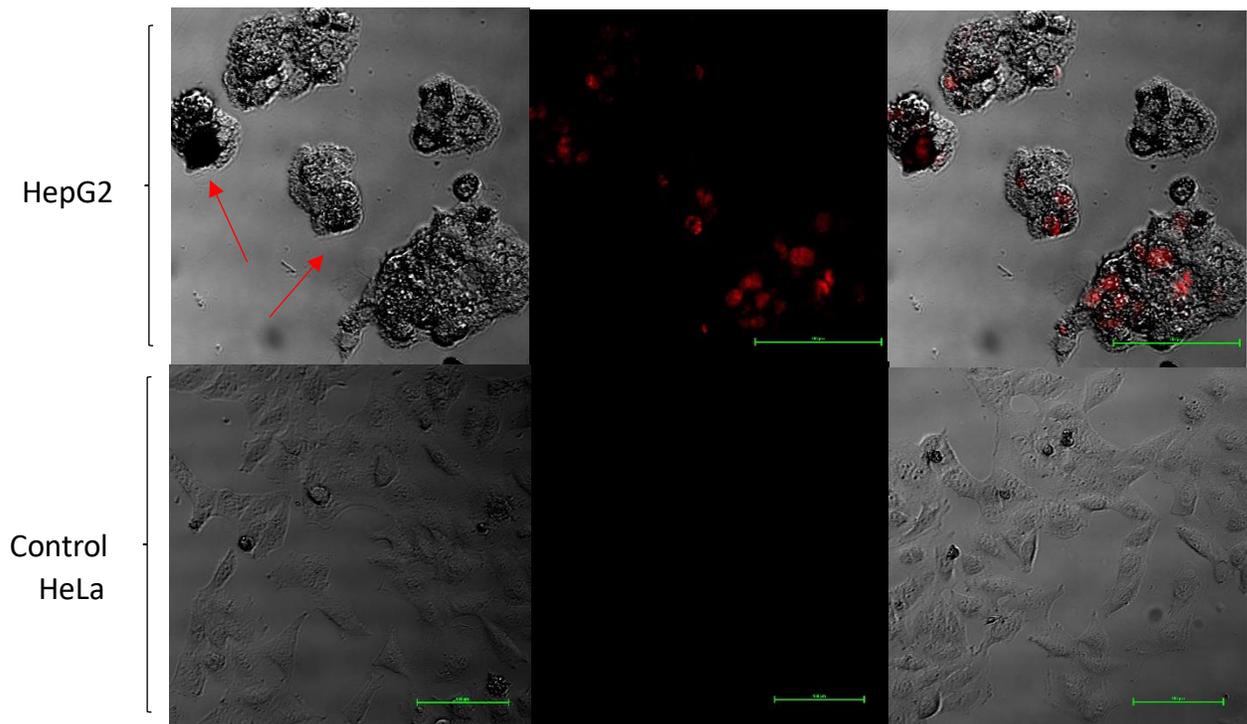


Figura 34. Ensayo de reconocimiento de la célula HepG2. Primer hilera: cultivo celular HepG2, campo claro y campo oscuro, presencia de emisión fluorescente roja por excitación de doxorubicina. Segunda hilera: cultivo celular HeLa, ausencia de la molécula fluorescente por nula interacción carbohidrato- receptor.

Como se puede observar en la imagen, estas células no se presentó fluorescencia debido a la ausencia de RAGP. Esto corrobora el reconocimiento específico de OGAL 2b- DOX con este receptor hepático.

En la figura 35 se muestran los resultados de la interacción de OGAL 2b-DOX con las células HepG2 conforme transcurre el tiempo, donde al cabo de pocos minutos, la regularidad de la célula se fue perdiendo y con ello, la aparición de posibles cuerpos apoptóticos (Zhou y cols., 2014)

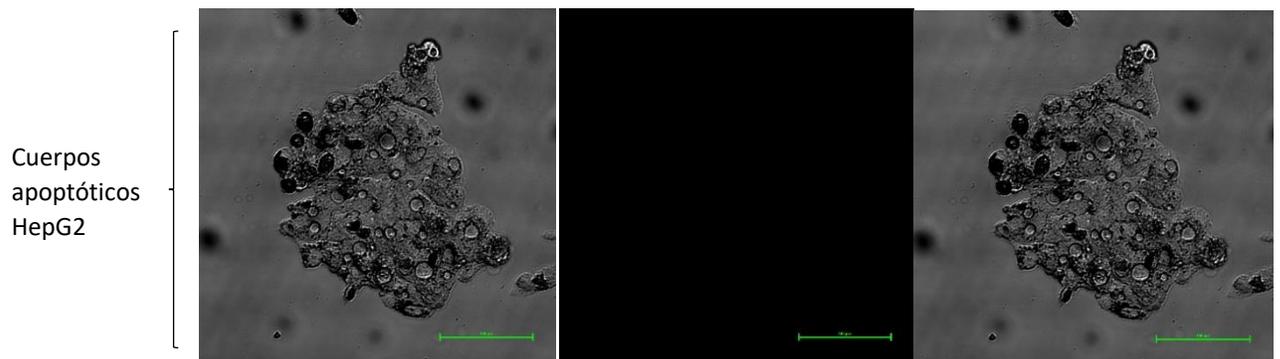


Figura 35. Aparición de cuerpos apoptóticos tras la interacción de OGAL 2b – DOX con las células HepG2.

Se ha visto que, en endosomas de células cancerígenas, el pH del medio es más ácido (pH 5.5), lo que permite que los grupos ácidos se protonen, disminuyendo las interacciones electrostáticas entre DOX y OGAL 2b, y permitiendo que el medicamento se libere en citoplasma celular y llegue al núcleo, intercalándose con el ADN para interferir en el metabolismo normal de la célula, induciendo la apoptosis. En la Figura 36, se representa el posible modo de acción tras la interacción.

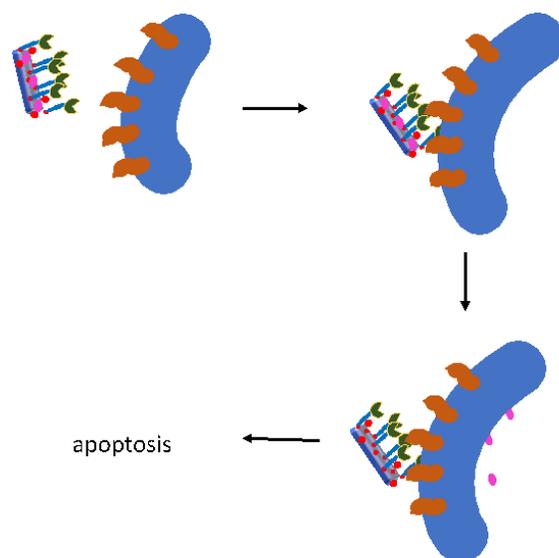


Figura 36. Propuesta de liberación de la DOX acarrado por OGAL en células cancerígenas de hígado.

Aunque no se realizó un estudio para evaluar la cantidad de DOX que el material OGAL-2b puede retener, los resultados obtenidos indican que este material es un buen candidato para ser utilizado en procesos de vectorización de fármacos. De ser así, se podría decir que la cantidad de fármaco adsorbido en la superficie fue suficiente para inducir la muerte celular.

Los resultados anteriormente obtenidos indican que es factible utilizar nuestro prometedor sistema de liberación de fármacos (OGAL 2b - DOX) en un proceso de cáncer de hígado. Aunque consideramos que es necesarios seguir explorando condiciones de optimización en posteriores etapas de evaluación.

7. CONCLUSIONES

1. Las modificaciones realizadas en el método de Hummers y Offefman favorecieron la obtención de láminas de OG con mejores propiedades de estabilidad, tamaño y biocompatibilidad comparadas con las sintetizadas por el método tradicional.
2. Los materiales obtenidos OG, OGA y OGAL presentaron buenas propiedades para ser utilizados en sistemas biológicos, ya que no provocaron efectos hemolíticos en glóbulos rojos y en las líneas celulares HeLa, T47D y HepG2.
3. Se obtuvieron cuatro materiales OGAL 1a, OGAL 1b, OGAL 2a y OGAL 2b, de los cuales el material OGL 2b, presentó prometedoras características para su captación específica en receptores de asialoglicoproteínas presentes en células HepG2.
4. La capacidad de carga del fármaco DOX sobre el sistema OGAL 2b, fue evidenciada. Este hecho comprueba que este material cuenta con características suficiente para futuras evaluaciones y posibles aplicaciones en el área de la biomedicina.

8. REFERENCIAS

1. Vila, M., Portolés, M. T., Marques, P. A. A. P., Feito, M. J., Matesanz, M. C., Ramírez-Santillán, Vallet-Regi, M. (2012). Cell uptake survey of pegylated nanographene oxide. *Nanotechnology*, 23(46), 465103.
2. McCallion, C., Burthem, J., Rees, K., Golovanov, A., Pluen, A. 2016. Graphene in therapeutics delivery: problems, solutions and future opportunities. *Eur J Pharm Biopharm*.
3. Cao, X., Zheng, S., Zhang, S., Wang, Y., Yang, X., Duan, H., Chen, Y. (2015). Functionalized graphene oxide with hepatocyte targeting as anti-tumor drug and gene intracellular transporters. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 15(3), 2052-2059.
4. Chen J., Yao B., Li C., Shi G. 2013. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide, 225
5. Stankovich, S., Dikin, D. A., Piner, R. D., Kohlhaas, K. A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Ruoff, R. S. (2007). Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *carbon*, 45(7), 1558-1565.
6. Deng, W., Qiu, J., Wang, S., Yuan, Z., Jia, Y., Tan, H., Zheng, R. (2018). Development of biocompatible and VEGF-targeted paclitaxel nanodrugs on albumin and graphene oxide dual-carrier for photothermal-triggered drug delivery in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine*, 13, 439.
7. Aguilar Bolados, H. (2015). Desarrollo de nanocompositos avanzados de caucho natural mediante aplicación de método látex.
8. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
9. D'Souza, A. A. y Devarajan, P. V. 2015. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - Strategies and applications. *J Control Release*. 203: 126-139.

10. Nordenstedt, H., White, D. L., & El-Serag, H. B. (2010). The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 42, S206-S214.
11. Mnyusiwalla A., Daar, A. S., Singer, P. A. 2003. Mind the gap: science and ethics in nanotechnology. *Nanotechnology*.
12. Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB journal*, 19(3), 311-330.
13. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. y Corrie, S. R. 2016. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res.* 33(10): 2373-2387.
14. Hirsjarvi, S., Passirani, C. y Benoit, J. P. 2011. Passive and active tumour targeting with nanocarriers. *Curr Drug Discov Technol.* 8(3): 188-196.
15. Piña, M. C. (2015). Los biomateriales y sus aplicaciones. *Revista: "Casa del tiempo*, 28, 55-58.
16. Dos Santos, L. L. (2017). *Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties*.
17. Tang, X., Thankappan, S. K., Lee, P., Fard, S. E., Harmon, M. D., Tran, K., & Yu, X. (2014). Polymeric biomaterials in tissue engineering and regenerative medicine. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (pp. 351-371). Elsevier.
18. Kumbar, S.G., Laurencin, C.T. and Deng, M., *Natural and synthetic biomedical Polymers*. 1st Edition. Burlington: Elsevier Ltd., 2014.
19. Osorio-Delgado, M. A., Henao-Tamayo, L. J., Velásquez-Cock, J. A., Cañas-Gutierrez, A. I., Restrepo-Múnera, L. M., Gañán-Rojo, P. F., Castro-Herazo, C. I. (2017). Biomedical applications of polymeric biomaterials. *Dyna*, 84(201), 241-252.
20. Israni, N., & Shivakumar, S. (2019). Polyhydroxybutyrate: Development and applications as a biodegradable biotextile. In *Materials for Biomedical Engineering* (pp. 405-444). Elsevier.
21. Shanmugam, K., & Sahadevan, R. (2018). Bioceramics—An introductory overview. *Fundamental Biomaterials: Ceramics*. Elsevier, 1-46.

22. Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O. C. 2016. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical reviews*.
23. Doppalapudi, S., Jain, A., Domb, A. J., & Khan, W. (2016). Biodegradable polymers for targeted delivery of anti-cancer drugs. *Expert opinion on drug delivery*, 13(6), 891-909.
24. Boehm, H. P., Clauss, A., Fischer, G., & Hofmann, U. (1962). Surface properties of extremely thin graphite lamellae. In *Proceedings of the fifth conference on carbon* (Vol. 1, pp. 73-80). New York: Pergamon Press.
25. Ruoff, R. S. & Park, S. (2009). Chemical methods for the production of graphenes. *Nature nanotechnology*, 4(4), 217.
26. Soldano, C., Mahmood, A., & Dujardin, E. (2010). Production, properties and potential of graphene. *Carbon*, 48(8), 2127-2150.
27. Sohail, M., Saleem, M., Ullah, S., Saeed, N., Afridi, A., Khan, M., & Arif, M. (2017). Modified and improved Hummer's synthesis of graphene oxide for capacitors applications. *Modern Electronic Materials*, 3(3), 110-116.
28. Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M. 2010. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat Chem* 2010; 2:1015–24.
29. Dreyer, D. R., Todd, D., & Bielawski, C. W. 2014. Harnessing the chemistry of graphene oxide, *Chem Soc Rev* 43, 5288-5301.
30. Perreault, F., Faria, A. F. De, & Elimelech, M. 2015. Environmental applications of
31. graphene-based nanomaterials, *Chem Soc Rev* 44, 5861-5896.
32. Wei, J., Vo, T., & Inam, F. (2015). Epoxy/graphene nanocomposites—processing and properties: a review. *RSC Advances*, 5(90), 73510-73524.
33. Rodríguez Villalón, A. (2016). Grafeno: síntesis, propiedades y aplicaciones biomédicas.
34. Dikin, D. A., Stankovich, S., Zimney, E. J., Piner, R. D., Dommett, G. H., Evmenenko, G., Ruoff, R. S. (2007). Preparation and characterization of graphene oxide paper. *Nature*, 448(7152), 457-460.

35. Schniepp, H. C., Li, J. L., McAllister, M. J., Sai, H., Herrera-Alonso, M., Adamson, D. H., Aksay, I. A. (2006). Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(17), 8535-8539.
36. Mkhoyan, K. A., Contryman, A. W., Silcox, J., Stewart, D. A., Eda, G., Mattevi, C., Chhowalla, M. (2009). Atomic and electronic structure of graphene-oxide. *Nano letters*, 9(3), 1058-1063.
37. Rourke, J. P., Pandey, P. A., Moore, J. J., Bates, M., Kinloch, I. A., Young, R. J., & Wilson, N. R. (2011). The real graphene oxide revealed: stripping the oxidative debris from the graphene-like sheets. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(14), 3173-3177.
38. Malvern Instruments, 2009, Zetasizer Nano User Manual. Capítulo 15.
39. Deng, D., Yu, L., Pan, X., Wang, S., Chen, X., Hu, P., Bao, X. (2011). Size effect of graphene on electrocatalytic activation of oxygen. *Chemical communications*, 47(36), 10016-10018.
40. Ren, T., Li, L., Cai, X., Dong, H., Liu, S., & Li, Y. (2012). Engineered polyethylenimine/graphene oxide nanocomposite for nuclear localized gene delivery. *Polymer Chemistry*, 3(9), 2561-2569.
41. Feng, L., Zhang, S., & Liu, Z. (2011). Graphene based gene transfection. *Nanoscale*, 3(3), 1252-1257.
42. Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., Kim, S. 2012. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation, 38.
43. Zeta, P. (1997). Un curso completo en 5 minutos. Zeta-Meter Inc.
44. Marcano, D., Kosynkin, D., Berlin, J., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Alemany, L. B., Lu, W., Tour, J. 2010, Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano* 4, 4806-4814.
45. Chua, C., Sofer Z., Pumera M. 2012. Graphite oxides: effects of permanganate and chlorate oxidants on the oxygen composition, *Chem. – Eur. J.* 18, 13453–13459.

46. Yang, K., Gong, H., Shi, X., Wan, J., Zhang, Y., & Liu, Z. (2013). In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. *Biomaterials*, 34(11), 2787-2795.
47. Vallabani, N. V., Mittal, S., Shukla, R. K., Pandey, A. K., Dhakate, S. R., Pasricha, R., & Dhawan, A. (2011). Toxicity of graphene in normal human lung cells (BEAS-2B). *Journal of biomedical nanotechnology*, 7(1), 106-107.
48. Chang, Y., Yang, S. T., Liu, J. H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Wang, H. (2011). In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology letters*, 200(3), 201-210.
49. Wu, S., Zhao, X., Cui, Z., Zhao, C., Wang, Y., Du, L., & Li, Y. (2014). Cytotoxicity of graphene oxide and graphene oxide loaded with doxorubicin on human multiple myeloma cells. *International journal of nanomedicine*, 9, 1413.
50. Liu, Z., Robinson, J. T., Sun, X., & Dai, H. (2008). PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *Journal of the American Chemical Society*, 130(33), 10876-10877.
51. Wojtoniszak, M., Chen, X., Kalenczuk, R. J., Wajda, A., Łapczuk, J., Kurzewski, M., Borowiak-Palen, E. (2012). Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89, 79-85.
52. Liu, J., Cui, L., & Losic, D. (2013). Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta biomaterialia*, 9(12), 9243-9257.
53. Shen, J. M., Huang, G., Zhou, X., Zou, J., Yang, Y., Chen, Y. F., & Men, S. K. (2014). Safety evaluation of graphene oxide-based magnetic nanocomposites as MRI contrast agents and drug delivery vehicles. *RSC advances*, 4(92), 50464-50477.
54. Brown, D. M., Kinloch, I. A., Bangert, U., Windle, A. H., Walter, D. M., Walker, G. S., Stone, V. I. C. K. I. (2007). An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon*, 45(9), 1743-1756.

55. Ali-Boucetta, H., Bitounis, D., Raveendran-Nair, R., Servant, A., Van den Bossche, J., & Kostarelos, K. (2013). Purified graphene oxide dispersions lack in vitro cytotoxicity and in vivo pathogenicity. *Advanced healthcare materials*, 2(3), 433-441.
56. Li, B., Zhang, X. Y., Yang, J. Z., Zhang, Y. J., Li, W. X., Fan, C. H., & Huang, Q. (2014). Influence of polyethylene glycol coating on biodistribution and toxicity of nanoscale graphene oxide in mice after intravenous injection. *International journal of nanomedicine*, 9, 4697.
57. Moore, T. L., Podilakrishna, R., Rao, A., & Alexis, F. (2014). Systemic administration of polymer-coated nano-graphene to deliver drugs to glioblastoma. *Particle & Particle Systems Characterization*, 31(8), 886-894.
58. Yang, K., Wan, J., Zhang, S., Zhang, Y., Lee, S. T., & Liu, Z. (2011). In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice. *ACS nano*, 5(1), 516-522.
59. Li, Y., Liu, Y., Fu, Y., Wei, T., Le Guyader, L., Gao, G., Chen, C. (2012). The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, 33(2), 402-411.
60. Zhang, L., Xia, J., Zhao, Q., Liu, L., & Zhang, Z. (2010). Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *small*, 6(4), 537-544.
61. Chowdhury, S. M., Kanakia, S., Toussaint, J. D., Frame, M. D., Dewar, A. M., Shroyer, K. R., Sitharaman, B. (2013). In vitro hematological and in vivo vasoactivity assessment of dextran functionalized graphene. *Scientific reports*, 3, 2584.
62. Sasidharan, A., Swaroop, S., Koduri, C. K., Girish, C. M., Chandran, P., Panchakarla, L. S., Koyakutty, M. (2015). Comparative in vivo toxicity, organ biodistribution and immune response of pristine, carboxylated and PEGylated few-layer graphene sheets in Swiss albino mice: a three month study. *Carbon*, 95, 511-524.

63. Liao, K. H., Lin, Y. S., Macosko, C. W., & Haynes, C. L. (2011). Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS applied materials & interfaces*, 3(7), 2607-2615.
64. Singh, S. K., Singh, M. K., Nayak, M. K., Kumari, S., Shrivastava, S., Grácio, J. J., & Dash, D. (2011). Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets. *ACS nano*, 5(6), 4987-4996.
65. Singh, S. K., Singh, M. K., Kulkarni, P. P., Sonkar, V. K., Grácio, J. J., & Dash, D. (2012). Amine-modified graphene: thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications. *ACS nano*, 6(3), 2731-2740.
66. Tan, X., Feng, L., Zhang, J., Yang, K., Zhang, S., Liu, Z., & Peng, R. (2013). Functionalization of graphene oxide generates a unique interface for selective serum protein interactions. *ACS applied materials & interfaces*, 5(4), 1370-1377.
67. Yan, L., Zhao, F., Li, S., Hu, Z., & Zhao, Y. (2011). Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale*, 3(2), 362-382
68. Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*. 2010;151(2):458-65.
69. Yue, H., Wei, W., Yue, Z., Wang, B., Luo, N., Gao, Y., Su, Z. (2012). The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials*, 33(16), 4013-4021.
70. Liu, J. H., Yang, S. T., Wang, H., Chang, Y., Cao, A., & Liu, Y. (2012). Effect of size and dose on the biodistribution of graphene oxide in mice. *Nanomedicine*, 7(12), 1801-1812.
71. Zhou, H., Zhao, K., Li, W., Yang, N., Liu, Y., Chen, C., & Wei, T. (2012). The interactions between pristine graphene and macrophages and the production of cytokines/chemokines via TLR-and NF- κ B-related signaling pathways. *Biomaterials*, 33(29), 6933-6942.
72. Tkach, A. V., Yanamala, N., Stanley, S., Shurin, M. R., Shurin, G. V., Kisin, E. R., Castranova, V. (2013). Graphene oxide, but not fullerenes, targets

- immunoproteasomes and suppresses antigen presentation by dendritic cells. *Small*, 9(9-10), 1686-1690.
73. Orecchioni, M., Bedognetti, D., Newman, L., Fuoco, C., Spada, F., Hendrickx, W., Cesareni, G. (2017). Single-cell mass cytometry and transcriptome profiling reveal the impact of graphene on human immune cells. *Nature communications*, 8(1), 1-14.
74. Hu, H., Tang, C., & Yin, C. (2014). Folate conjugated trimethyl chitosan/graphene oxide nanocomplexes as potential carriers for drug and gene delivery. *Materials Letters*, 125, 82-85.
75. Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5101-5105.
76. Williams, G., & Kamat, P. V. (2009). Graphene- semiconductor nanocomposites: excited-state interactions between ZnO nanoparticles and graphene oxide. *Langmuir*, 25(24), 13869-13873.
77. Sanchez, V. C., Jachak, A., Hurt, R. H., & Kane, A. B. (2012). Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chemical research in toxicology*, 25(1), 15-34.
78. Brodie, B.C. (1859) On the Atomic Weight of Graphite. *Phil. Trans. R. Soc. London.*, 149, 249.
79. Poh, H. L., Šaněk, F., Ambrosi, A., Zhao, G., Sofer, Z., & Pumera, M. (2012). Graphenes prepared by Staudenmaier, Hofmann and Hummers methods with consequent thermal exfoliation exhibit very different electrochemical properties. *Nanoscale*, 4(11), 3515-3522.
80. Hummers Jr, W. S., & Offeman, R. E. (1958). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the american chemical society*, 80(6), 1339-1339.
81. Edwards, R. S., & Coleman, K. S. (2013). Graphene synthesis: relationship to applications. *Nanoscale*, 5(1), 38-51.
82. Wissler, M. (2006). Graphite and carbon powders for electrochemical applications. *Journal of power sources*, 156(2), 142-150.

83. Dimiev, A., Kosynkin, D. V., Alemany, L. B., Chaguine, P., & Tour, J. M. (2012). Pristine graphite oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 134(5), 2815-2822.
84. Ibarra-Hernández, A., Vega-Rios, A., & Osuna, V. (2018). Synthesis of graphite oxide with different surface oxygen contents assisted microwave radiation. *Nanomaterials*, 8(2), 106.
85. Park, S., & Ruoff, R. S. (2009). Chemical methods for the production of graphenes. *Nature nanotechnology*, 4(4), 217.
86. Ling, S. (2019). Structure and synthesis of graphene oxide. *Chinese Journal of Chemical Engineering*.
87. Eigler, S.; Enzelberger-Heim, M.; Grimm, S.; Hofmann, P.; Kroener, W.; Geworski, A.; Dotzer, C.; Röckert, M.; Xiao, J.; Papp, C.; Lytken, O.; Steinrück, H.-P.; Müller, P.; Hirsh, A. Wet Chemical Synthesis of Graphene. *Adv. Mater.* 2013, 25, 3583–35.
88. Sheshmani, S., & Fashapoyeh, M. A. (2014). Suitable chemical methods for preparation of graphene oxide, graphene and surface functionalized graphene nanosheets. *Acta Chimica Slovenica*, 60(4), 813-825.
89. Yapu, E. L., Blanco, M., Cabrera, S., Balanza, R., & Yapu, W. (2013). Oxido de Grafito Expandido. *Revista Boliviana de Química*, 30(2), 156-161.
90. Jerónimo, G. F., Salazar, C. A. G., González, V. A. G., & Salas, T. E. G. (2019). Química verde en la síntesis de rGO partiendo de la exfoliación electroquímica del grafito. *Ingenierías*, 22(83), 55.
91. Rodríguez Pastor, I. (2014). Tratamientos de purificación y acondicionamiento de grafenos para el desarrollo de aplicaciones.
92. Dzhabiev, T. S.; Denisov, N. N.; Moiseev, D. N.; Shilov, A. E. Formation of Ozone during the Reduction of Potassium Permanganate in Sulfuric Acid Solutions. *Russ. J. Phys. Chem.* 2005, 79, 1755–1760.
93. Cepeda, L. F., Oyervides, J. D. F., Marines, L. R., Galindo, A. S., & López, L. I. L. (2017). Grafeno, el material del futuro Síntesis y propiedades.
94. Roger, R., & Neilson, D. G. (1961). The Chemistry of Imidates. *Chemical Reviews*, 61(2), 179-211.

95. Zaaba, N. I., Foo, K. L., Hashim, U., Tan, S. J., Liu, W. W., & Voon, C. H. (2017). Synthesis of graphene oxide using modified hummers method: solvent influence. *Procedia engineering*, 184, 469-477.
96. Bascuñan Blaset, A. (2007). Balanceo de ecuaciones redox. Método del ion - electrón.
97. Wilson, N. R., Pandey, P. A., Beanland, R., Young, R. J., Kinloch, I. A., Gong, L., Sloan, J. (2009). Graphene oxide: structural analysis and application as a highly transparent support for electron microscopy. *ACS nano*, 3(9), 2547-2556.
98. Lerf, A., He, H., Forster, M., & Klinowski, J. (1998). Structure of graphite oxide revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(23), 4477-4482.
99. Long, D., Li, W., Ling, L., Miyawaki, J. 2010. Preparation of Nitrogen-Doped Graphene Sheets by a Combined Chemical and Hydrothermal Reduction of Graphene Oxide
100. Chung, D. D. L. (2002). Review graphite. *Journal of materials science*, 37(8), 1475-1489.
101. Paredes, J. I., Villar-Rodil, S., Martínez-Alonso, A., & Tascon, J. M. D. (2008). Graphene oxide dispersions in organic solvents. *Langmuir*, 24(19), 10560-10564.
102. Jung, I., Pelton, M., Piner, R., Dikin, D. A., Stankovich, S., Watcharotone, S., Ruoff, R. S. (2007). Simple approach for high-contrast optical imaging and characterization of graphene-based sheets. *Nano Letters*, 7(12), 3569-3575.
103. Wang, D., Kou, R., Choi, D., Yang, Z., Nie, Z., Li, J. 2010. Ternary Self-Assembly of Ordered Metal Oxide Graphene Nanocomposites for Electrochemical Energy Storage
104. Botas, P. Álvarez, P. Blanco, M. Granda, C. Blanco, R. Santamaría, L.J. Romasanta, R. Verdejo, M.A. López-Manchado, R. Menéndez, 2013. Graphene materials with different structures prepared from the same graphite by the Hummers and Brodie methods. *Carbon* 65, 156-164.

105. Vinothini, K., Rajendran, N. K., Ramu, A., Elumalai, N., & Rajan, M. (2019). Folate receptor targeted delivery of paclitaxel to breast cancer cells via folic acid conjugated graphene oxide grafted methyl acrylate nanocarrier. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 906-917.
106. Jung, H. S., Lee, M. Y., Kong, W. H., Do, I. H., & Hahn, S. K. (2014). Nano graphene oxide–hyaluronic acid conjugate for target specific cancer drug delivery. *RSC Advances*, 4(27), 14197-14200.
107. Eckhart, K. E., Holt, B. D., Laurencin, M. G., & Sydlík, S. A. (2019). Covalent conjugation of bioactive peptides to graphene oxide for biomedical applications. *Biomaterials science*, 7(9), 3876-3885.
108. Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 1, 149-173.
109. Ni, G., Wang, Y., Wu, X., Wang, X., Chen, S., & Liu, X. (2012). Graphene oxide absorbed anti-IL10R antibodies enhance LPS induced immune responses in vitro and in vivo. *Immunology letters*, 148(2), 126-132.
110. Wu, S., Zhao, X., Li, Y., Du, Q., Sun, J., Wang, Y., Xia, L. (2013). Adsorption properties of doxorubicin hydrochloride onto graphene oxide: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Materials*, 6(5), 2026-2042.
111. Brannon-Peppas, L., & Blanchette, J. O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 56(11), 1649-1659.
112. Schäfer, V., v. Briesen, H., Rubsamen-Waigmann, H., Steffan, A. M., Royer, C., & Kreuter, J. (1994). Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages. *Journal of microencapsulation*, 11(3), 261-269.
113. Lee, J. H., Shin, Y. C., Jin, O. S., Lee, E. J., Han, D. W., Kang, S. H., Kim, S. H. (2012). Cytotoxicity evaluations of pristine graphene and carbon nanotubes in fibroblastic cells. *Journal of the Korean Physical Society*, 61(6), 873-877.

114. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. y Farokhzad, O. C. 2014. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv. Rev.* 66: 2-25.
115. Xu, C., Zhao, H., Chen, H., & Yao, Q. (2015). CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug design, development and therapy*, 9, 4953.
116. Forner, A., Ayuso, C., Real, M. I., Sastre, J., Robles, R., Sangro, B., Bru, C. (2009). Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. *Medicina clinica*, 132(7), 272-287.
117. Huezos, M. S. G., Ávila, J. F. S., de Gastroenterología, A. M., de Radiología, S. M., de Oncología, S. M., & de Carcinoma, G. M. D. C. (2014). Consenso mexicano de diagnóstico y manejo del carcinoma hepatocelular. *Revista de Gastroenterología de México*, 79(4), 250-262.
118. Uribe, M., García, M., Chávez, N., & Román, J. (2010). Carcinoma hepatocelular. *Rev Gastroenterol México*, 75, 168-76.
119. Fernández, C. S., León, A. G., Herrera, T. M., Salazar, S. E., Sánchez, D. M., & Alcalá, O. R. (2011). Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. *SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD*.
120. Méndez-Sánchez, N., Villa, A. R., Vázquez-Elizondo, G., Ponciano-Rodríguez, G., & Uribe, M. (2008). Mortality trends for liver cancer in Mexico from 2000 to 2006. *Annals of Hepatology*, 7(3), 226-229.
121. Balogh, J., Victor III, D., Asham, E. H., Burroughs, S. G., Boktour, M., Saharia, A., Monsour Jr, H. P. (2016). Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of hepatocellular carcinoma*, 3, 41.
122. Kim B, Lee C, Lee E.S, Shin B.S, Youn Y.S. 2016. Paclitaxel and curcumin co-bound albumin nanoparticles having antitumor potential to pancreatic cancer. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 11(6), 708-714.
123. Danhier F. 2016. To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?. *Journal of Controlled Release*, 244, 108-121.

124. Ebrahimkhani, M. R., Neiman, J. A. S., Raredon, M. S. B., Hughes, D. J., & Griffith, L. G. (2014). Bioreactor technologies to support liver function in vitro. *Advanced drug delivery reviews*, 69, 132-157.
125. Huang, C., Li, N. M., Gao, P., Yang, S., Ning, Q., Huang, W., Tan, X. W. (2017). In vitro and in vivo evaluation of macromolecular prodrug GC-FUA based nanoparticle for hepatocellular carcinoma chemotherapy. *Drug delivery*, 24(1), 459-466.
126. Liu, Y., Wan, G., Guo, H., Liu, Y., Zhou, P., Wang, H., Zhang, N. (2017). A multifunctional nanoparticle system combines sonodynamic therapy and chemotherapy to treat hepatocellular carcinoma. *Nano Research*, 10(3), 834-855.
127. Grewal, P. K. (2017). Chapter thirteen—the Ashwell–Morell receptor. *Methods in Enzymology*, 223-241.
128. Aubel-Sadron, G., & Londos-Gagliardi, D. (1984). Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*, 66(5), 333-352.
129. Speth, P. A. J., Van Hoesel, Q. G. C. M., & Haanen, C. (1988). Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clinical pharmacokinetics*, 15(1), 15-31.
130. Tulubas, F., Gurel, A., Oran, M., Topcu, B., Caglar, V., & Uygur, E. (2015). The protective effects of ω -3 fatty acids on doxorubicin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology and industrial health*, 31(7), 638-644.
131. Han, X., Pan, J., Ren, D., Cheng, Y., Fan, P., & Lou, H. (2008). Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food and chemical toxicology*, 46(9), 3140-3146.
132. Lin, D., & Xing, B. (2008). Adsorption of phenolic compounds by carbon nanotubes: role of aromaticity and substitution of hydroxyl groups. *Environmental science & technology*, 42(19), 7254-7259.
133. Güler, G., Vorob'ev, M. M., Vogel, V., & Mäntele, W. (2016). Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation

- of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 161, 8-18.
134. Lee, C., Kim, B., Lee, S., Kim, T. H., Kim, J. O., Lee, E. S., Youn, Y. S. (2017). Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 183-191.
135. Zhang, Y., Nayak, T. R., Hong, H., & Cai, W. (2012). Graphene: a versatile nanoplatform for biomedical applications. *Nanoscale*, 4(13), 3833-3842.
136. Mermoux, M., Chabre, Y., & Rousseau, A. (1991). FTIR and ¹³C NMR study of graphite oxide. *Carbon*, 29(3), 469-474.
137. Eaton, P., Holmes, P., & Yarwood, J. (2001). In situ and ex situ FTIR–ATR and Raman microscopic studies of organosilane hydrolysis and the effect of hydrolysis on silane diffusion through a polymeric film. *Journal of applied polymer science*, 82(8), 2016-2026.
138. Kim, J., Seidler, P., Wan, L. S., & Fill, C. (2009). Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates. *Journal of colloid and interface science*, 329(1), 114-119.
139. Serodre, T., Oliveira, N. A., Miquita, D. R., Ferreira, M. P., Santos, A. P., Resende, V. G., & Furtado, C. A. (2019). Surface Silanization of Graphene Oxide Under Mild Reaction Conditions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(11), 2488-2499.
140. Araque Caballero, E. (2015). *Nanomateriales híbridos de óxido de grafeno y polímeros hidrosolubles para el diseño de plataformas biosensoras electroquímicas* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
141. Solís-Oba, M., Teniza-García, O., Rojas-López, M., Delgado-Macuil, R., Díaz-Reyes, J., & Ruiz, R. (2011). Application of infrared spectroscopy to the monitoring of lactose and protein from whey after ultra and nano filtration process. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55(3), 190-193.

142. Kamisan, A. I., Kamisan, A. S., Md Ali, R., Kudin, T., Ishak, T., Hassan, O. H., Yahya, M. F. (2015). Synthesis of graphene via green reduction of graphene oxide with simple sugars. In *Advanced Materials Research* (Vol. 1107, pp. 542-546). Trans Tech Publications Ltd.
143. Wang, C., Zhang, Z., Chen, B., Gu, L., Li, Y., & Yu, S. (2018). Design and evaluation of galactosylated chitosan/graphene oxide nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of colloid and interface science*, 516, 332-341.
144. Wang, T., Zhu, S., & Jiang, X. (2015). Toxicity mechanism of graphene oxide and nitrogen-doped graphene quantum dots in RBCs revealed by surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. *Toxicology Research*, 4(4), 885-894.
145. Singh, S. K., Singh, M. K., Kulkarni, P. P., Sonkar, V. K., Grácio, J. J., & Dash, D. (2012). Amine-modified graphene: thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications. *ACS nano*, 6(3), 2731-2740.
146. Pinto, A. M., Goncalves, I. C., & Magalhães, F. D. (2013). Graphene-based materials biocompatibility: a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 188-202.
147. Tadzyszak, K., Wychowaniec, J. K., & Litowczenko, J. (2018). Biomedical applications of graphene-based structures. *Nanomaterials*, 8(11), 944.
148. De Sousa, M., Martins, C. H., Franqui, L. S., Fonseca, L. C., Delite, F. S., Lanzoni, E. M., Alves, O. L. (2018). Covalent functionalization of graphene oxide with D-mannose: evaluating the hemolytic effect and protein corona formation. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(18), 2803-2812.
149. Bhattacharya, K., Mukherjee, S. P., Gallud, A., Burkert, S. C., Bistarelli, S., Bellucci, S., Fadeel, B. (2016). Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(2), 333–351.
150. De, L. M., Ottaviano, L., Perrozzi, F., Nardone, M., Santucci, S., De, J. L., Poma, A. (2014). Flake size-dependent cyto and genotoxic evaluation of

- graphene oxide on in vitro A549, CaCo2 and vero cell lines. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 28(2), 281-289.
151. Gurunathan, S., Han, J. W., Eppakayala, V., & Kim, J. H. (2013). Green synthesis of graphene and its cytotoxic effects in human breast cancer cells. *International journal of nanomedicine*, 8, 1015.
152. Yuan, J., Gao, H., Sui, J., Duan, H., Chen, W. N., & Ching, C. B. (2012). Cytotoxicity evaluation of oxidized single-walled carbon nanotubes and graphene oxide on human hepatoma HepG2 cells: an iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicological Sciences*, 126(1), 149-161.
153. Kawata, K., Osawa, M., & Okabe, S. (2009). In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental science & technology*, 43(15), 6046-6051.
154. Sarabia-Sainz A.I, Ramos-Clamont G, Winzerling J, Vázquez-Moreno L. 2011. Bacterial recognition of thermal glycation products derived from porcine serum albumin with lactose. *Acta Biochim. Pol*, 58, 95-100.
155. Ledesma-Osuna A.I, Ramos-Clamont G, Vázquez-Moreno L. 2008. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochim Pol*, 55(3), 491-497.
156. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. 2007. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*, 28(31), 4600-4607.
157. Motlagh, N. S. H., Parvin, P., Ghasemi, F., & Atyabi, F. (2016). Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. *Biomedical optics express*, 7(6), 2400-2406.
158. Zhou, T., Zhou, X., & Xing, D. (2014). Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier. *Biomaterials*, 35(13), 4185-4194.
159. Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press.

160. Rodríguez González, C. (2012). Obtención de hojas de óxido de grafeno para el desarrollo de nanocompositos poliméricos (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
161. Roggenbuck, D., Mytilinaiou, M. G., Lapin, S. V., Reinhold, D., & Conrad, K. (2012). Asialoglycoprotein receptor (ASGPR): a peculiar target of liver-specific autoimmunity. *Autoimmunity Highlights*, 3(3), 119–125.
162. Managit, C., Kawakami, S., Nishikawa, M., Yamashita, F., & Hashida, M. (2003). Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 266(1-2), 77–84.
163. Vovusha, H., Banerjee, D., Yadav, M. K., Perrozzi, F., Ottaviano, L., Sanyal, S., & Sanyal, B. (2018). Binding characteristics of anticancer drug doxorubicin with two-dimensional graphene and graphene oxide: insights from density functional theory calculations and fluorescence spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(36), 21031-21038.
164. Teran-Saavedra, N. G., Sarabia-Sainz, J. A. I., Silva-Campa, E., Burgara-Estrella, A. J., Guzmán-Partida, A. M., Ramos-Clamont Montfort, & Vazquez-Moreno, L. (2019). Lactosylated albumin nanoparticles: potential drug nanovehicles with selective targeting toward an in vitro model of hepatocellular carcinoma. *Molecules*, 24(7), 1382.
165. Pérez, M. A., & Arancibia, S. R. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia. *Arch Neurocién (Mex)*, 12(1), 45-54.
166. Schwartz, R. E., Fleming, H. E., Khetani, S. R., & Bhatia, S. N. (2014). Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Biotechnology advances*, 32(2), 504-513.
167. Peshattiar, V., Kaikini, A., Dandekar, P., Devarajan, P. V., & Sathaye, S. (2019). In Vitro and In Vivo Models for Cancer and Infectious Diseases. In *Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis* (pp. 483-519). Springer, Cham.

168. Sarkar, K., Madras, G., & Chatterjee, K. (2015). Dendron conjugation to graphene oxide using click chemistry for efficient gene delivery. *RSC Advances*, 5(62), 50196-50 211.

ANEXO I. ESPECTROS FTIR – ATR de OGA y OGAL

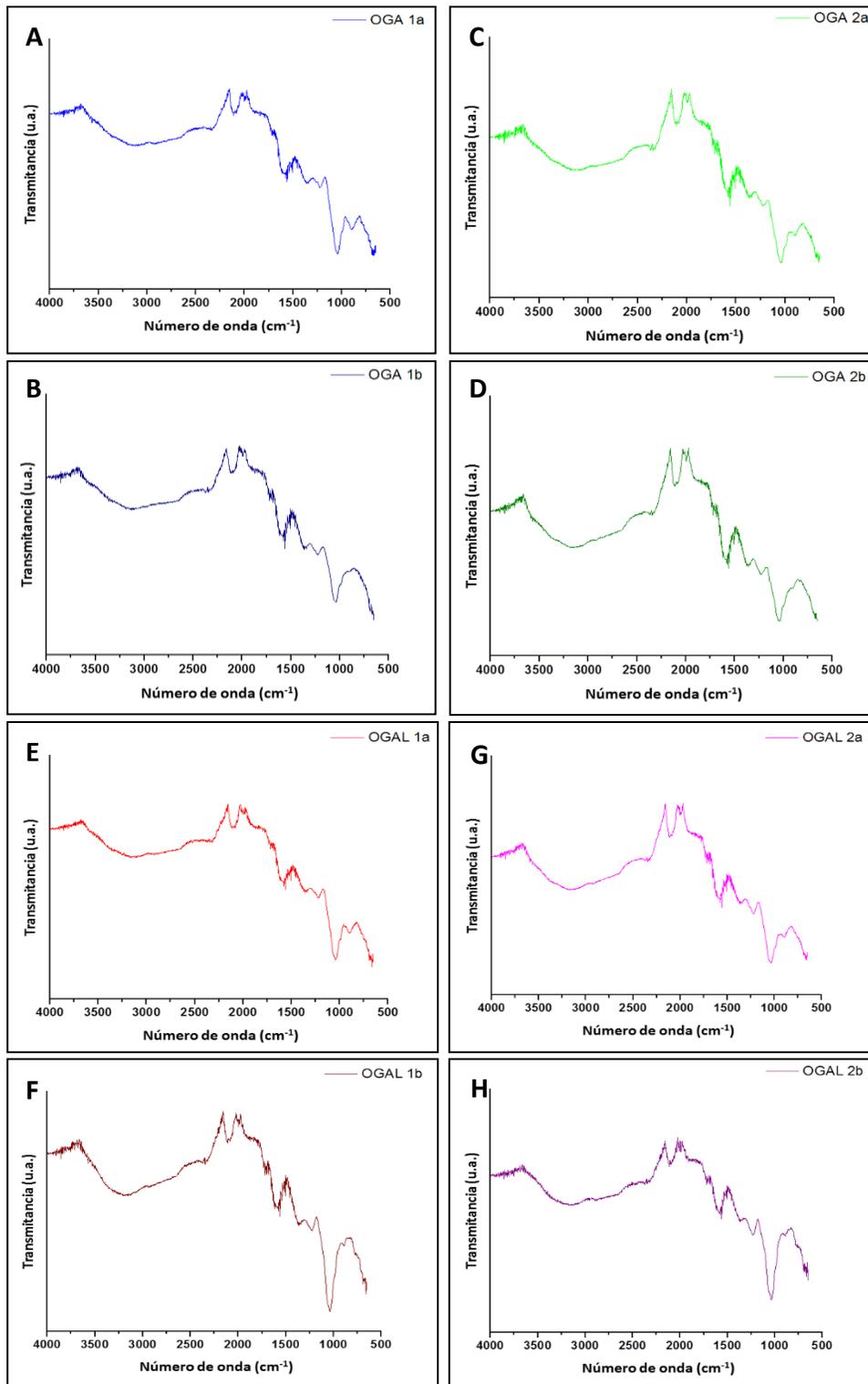


Figura A1. Espectro FT-IR de OGA 1a (A), OGA 1b (B), OGA 2a (C), OGA 2b (D), OGAL 1a (E), OGAL 1b (F), OGAL 2a (G) y OGAL 2b (H).

ANEXO II. PRODUCTOS OBTENIDOS

Tabla A1. Presentación en congresos

Presentación oral titulada “Specific capturing of glycosylated graphene oxide by asialoglycoprotein receptor: a strategic approach for liver targeting”	At the 5 Latin American Congress of Glycobiology and 2 Meeting of the Glycoscience in Health Thematic Network held on October 2-4, 2019 in Mexico City, Mexico.
Presentación del cartel “Specific capturing of glycosylated graphene oxide by asialoglycoprotein receptor: a strategic approach for liver targeting”	At the 5 Latin American Congress of Glycobiology and 2 Meeting of the Glycoscience in Health Thematic Network held on October 2-4, 2019 in Mexico City, Mexico.
Presentación de la conferencia: Óxido de grafeno: síntesis, caracterización y aplicaciones en la nanomedicina”.	XVII Semana Cultural de la División de ingeniería "Formando Ingenieros en el contexto global" 4 - 8 de noviembre 2019.
Presentación del cartel “Specific capturing of glycosylated graphene oxide by asialoglycoprotein receptor: a strategic approach for liver targeting”	XXIV Reunión Universitaria de Investigación en Materiales RUIM 2019. 6, 7 y 8 de noviembre 2019.