

Diseño de un dispositivo de irradiación para la simulación *in vitro* de las condiciones de exposición a fototerapia con luz UV a puntos carbono

Andrea Natalia Méndez Zuluaga

Trabajo Dirigido

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



**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2023**

Agradecimientos

Agradezco a mis padres Gladys y Antonio quienes siempre me han brindado su apoyo y me han enseñado a seguir mi camino de la mejor manera posible a pesar de los obstáculos que se hayan podido presentar. A mis hermanos Oscar, Luz y Jacqueline, por acompañarme, guiarme y darme fuerzas cuando no las he tenido, por estar siempre ahí cada uno a su modo, este logro también es de ustedes.

A mis sobrinos, Miguel y Cristian, les agradezco desde lo más profundo su forma de alegrar mi vida con cada ocurrencia. También a mi cuñada Jackelin, por cada consejo y ayudarme a entender, desde su rol cómo docente, mi proceso académico y no desfallecer.

Agradezco a mis amigas Angie, Melany y Alejandra por escucharme, animarme, ayudarme y aguantarme durante la carrera. A Karol, Jhoan, Carlos, Valentina y Lina por ser un apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio, aprendí mucho de cada uno de ustedes y valoro muchísimo el que estuvieran presentes para mí siempre que los necesité.

Quiero agradecer a Juan, Hernán y Sonia por su gran ayuda, guía y disposición en todo mi proceso, su vocación por lo que hacen hicieron ameno mi camino y aprendí mucho de cada uno de ustedes, gracias por ayudarme cuando no sabía qué hacer o cómo proceder.

Agradezco a Ana Sierra y a las psicólogas Ana Murillo y Viviana Velásquez de la Universidad del Rosario, por el acompañamiento y la ayuda brindada en mis crisis emocionales, sin ustedes no hubiera sido posible para mí finalizar mi proyecto de grado y mi carrera. Llevo conmigo cada una de sus enseñanzas y agradezco por cada momento en el que mágicamente aparecieron preocupándose por mí y acompañándome en mi proceso.

Agradezco a mis tutores, Diana Consuelo Rodríguez Burbano y Alejandro Oyono Ondo Méndez por su gran paciencia y comprensión, por su acompañamiento y dedicación. De ustedes llevo conmigo su pasión por la ciencia y el amor por la investigación. Gracias por enseñarme tanto con su calidad como profesionales y con cada consejo brindado para hacer de mí alguien mejor cada día como persona y como profesional. Les agradezco infinitamente que no se hayan dado por vencidos conmigo y que hayan creído en mí.

Por último, agradezco a todos los profesores de la Universidad del Rosario y la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito por sus enseñanzas a lo largo de todo el pregrado. Especialmente a Julián Gutiérrez, Alejandro Reina y Sandra González, la pasión por su profesión, su rol como docentes y su gran empatía encendió en mí la pasión que tengo por la ciencia sin dejar a un lado la calidez humana, gracias por esforzarse para formar en mí el amor por la academia.

Resumen

La terapia fotodinámica es un tratamiento usado para el cáncer en estados no avanzados y ubicado en zonas donde puede llegar la luz. Este usa la energía de la luz visible y oxígeno presente en un tejido, para estimular la actividad destructiva de células cancerosas de un fármaco, llamado agente fotosensibilizador [1]. Su principio de funcionamiento se basa en la irradiación del agente fotosensibilizador a una longitud de onda específica, esto para favorecer la excitación de este fármaco a un estado de alta energía conocido como estado triplete excitado [2]. La energía producida en esta transición se transfiere directamente a las moléculas con contenido de oxígeno produciendo especies reactivas de oxígeno, también llamadas ROS, por sus siglas en inglés (Reactive Oxygen Species) [3]. Las ROS además de ser especies citotóxicas e inducir a las células a la apoptosis y/o necrosis, generan daño vascular [4].

El uso de los agentes fotosensibilizadores presenta una gran ventaja dada por su naturaleza fotoactiva. Dado que la irradiación es dirigida solamente a una zona particular, el tejido sano que aún pueda contener el fármaco, al no ser irradiado no se ve afectado [5]. No obstante, presentan desventajas entre las cuales se encuentra su hidrofobicidad y la limitación de los sitios dónde puede llegar la luz. Para ello, se propone el uso de nanopartículas como posibles vehículos de transporte y el acoplamiento de estas con el fármaco para potenciar el tratamiento de terapia fotodinámica[6].

Dentro de las nanopartículas evaluadas para minimizar estas limitaciones se encuentran los puntos de carbono (Carbon Dots - CD) [7]. La propiedad de absorber y emitir luz que tienen los CD les brinda un potencial carácter fotosensibilizador, sin embargo, se debe determinar su efectividad [8]. Para ello, en este proyecto se prototipa un dispositivo que irradia con luz ultravioleta a CD contenidos en una placa de 96 pozos de cultivo celular, a diferentes alturas, para posteriormente generar ROS y explorar su efecto fotosensibilizador.

El dispositivo se diseñó e imprimió en 3D utilizando la técnica de manufactura aditiva Fused Filament Fabrication. Con la finalidad de evaluar el prototipo, se realiza un protocolo experimental en el cual se evalúan las alturas del dispositivo y la concentración de CD. Se encuentra que la irradiación proporcionada por el dispositivo, en las distancias menores o iguales a 17cm desde la fuente de luz, actúa como un foco coherente y distribuye la irradiación de forma homogénea en los pozos, por lo cual posteriormente, se puede estimar la concentración de ROS y evaluar si esta es estadísticamente significativa. Se observa que la concentración de puntos de carbono que más genera ROS, tanto en PBS como en medio de cultivo celular es de 50 µg/mL.

Índice general

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	1
1.2. Objetivos.....	2
1.2.1. Objetivo general.....	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. Contribuciones	3
2. ESTADO DEL ARTE	4
2.1. Puntos de Carbono	4
2.2. Fototerapia	4
2.2.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y el funcionamiento de la fototerapia.....	5
2.3. Montajes de irradiación.....	7
2.4. Prototipado rápido: Impresión 3D.....	8
2.4.1. Métodos de impresión 3D.....	9
3. METODOLOGÍA	11
3.1. Diseño del prototipo.....	12
3.1.1. Diseño 3D del montaje físico	13
3.1.2. Diseño eléctrico.....	14
3.2. Prototipado.....	14
3.3. Evaluación y verificación del prototipo.....	15
3.3.1. Protocolo experimental de irradiación	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Diseño y prototipado	19

4.2. Aplicación de las pruebas de evaluación	23
5. CONCLUSIONES	28
6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXOS.....	35
Anexo 1: Obtención del metanol anhídrido.....	35

Índice de figuras

Figura 2.2.1.1 Producción química de las diferentes especies reactivas de oxígeno	5
Figura 2.2.1.2 Esquemático del proceso de terapia fotodinámica (PDT) y terapia fototérmica (PTT). Tomada de [3].....	6
Figura 2.3.1 ;ontajes experimentales de irradiación. A. Circuito de matriz de LED. B. HP450G-LED. Adaptadas de [41], [44].....	7
Figura 2.4.1 Línea del tiempo de los hitos más importantes de la impresión 3D y de sus aplicaciones biomédicas. Adaptado de [48].....	8
Figura 2.4.1.1 Mecanismo de impresión 3D con Powder Bed Fusion. Adaptada de [50].....	9
Figura 2.4.1.2 Proceso de impresión 3D con Fused Filament Fabrication. Adaptada de [54].	10
Figura 3.1.1 A. Vista inferior del prototipo. B. Vista frontal del prototipo.	13
Figura 3.2.1 A. Impresora Fused Form 300 utilizada en la impresión 3D del dispositivo. B. Filamento de PLA negro utilizado.....	14
Figura 3.3.1.1.1 Proceso de síntesis de puntos de carbono por medio de reacción asistida por microondas.....	16
Figura 3.3.1.2.1 Distribución de las muestras de puntos de carbono a diferentes concentraciones en la placa de pozos.	17
Figura 3.3.1.2.2 Esquema de distancias con respecto a la fuente de luz para cada altura del dispositivo.	18
Figura 4.1.1 Planos CAD de cada parte del dispositivo. A. Bandeja para LEDs. B. Puerta. C. Soporte para la placa de pozos. D. Estante con rieles a diferentes alturas. E. Tapa para la placa de pozos. F. Manija para la puerta.	19
Figura 4.1.2 Proceso de impresión por FFF del estante, con patrón grid y crecimiento vertical de la pieza.....	20

Figura 4.1.3 Piezas del dispositivo impresas en 3D por FFF. A. Estante B. Estante con la puerta y la manija C.1. Vista superior de la tapa para la placa de pozos C.2. Vista inferior de la tapa para la placa de pozos D. Soporte para la placa de pozos E. Bandeja para LEDs.....	21
Figura 4.1.4 Espectro de fluorescencia de los LED UV adquiridos y utilizados como fuente de luz en el dispositivo.....	21
Figura 4.1.5 Fuente de luz del dispositivo correctamente funcionando al ser conectada al tomacorriente.....	22
Figura 4.1.6 A. Dispositivo con la fuente de luz encendida. B. LED rojo de verificación encendido cuando el dispositivo está en funcionamiento.	22
Figura 4.2.1 Emisión de los puntos de carbono sintetizados, diluidos en PBS (izquierda) y secos (derecha), bajo irradiación de 365nm.....	23
Figura 4.2.2 Intensidad de fluorescencia producida por cada concentración de CD disueltos en PBS en cada altura del dispositivo.	24
Figura 4.2.3 Placa de cultivo celular con la solución CD-sonda en medio de cultivo celular emitiendo fluorescencia al ser irradiada a 365nm con la fuente de luz UV del dispositivo.	25
Figura 4.2.4 Intensidad de fluorescencia producida en cada altura del dispositivo para cada concentración de CD disueltos en medio de cultivo celular.	25
Figura 4.2.5 Espectro de absorbancia del rojo fenol A. Obtenido con el lector multimodal Cytation™ 3 (Biotek) B. Reportado en la literatura a diferentes niveles de pH [62].....	26
Figura 4.2.6 Lámpara UV irradiando una placa de 96 pozos de cultivo celular. Tomada de [21].	27
Figura 1 Obtención del metanol anhidrido.	35

Índice de tablas

Tabla 4.1-1 Dimensiones de cada parte del dispositivo diseñado.	20
--	----

Índice de anexos

Anexo 1: Obtención del metanol anhídrido	35
--	----

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

El cáncer es un término que engloba un conjunto de enfermedades, en muchos casos mortales, que se producen cuando las propias células del cuerpo en su proceso natural de división celular se multiplican sin control formando generalmente masas nocivas de tejido (tumores) que pueden llegar a expandirse a diferentes partes del organismo con tejido sano [9]. Actualmente el cáncer se considera la causa número uno de mortalidad a nivel mundial. En 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de muertes [10], [11]. En Colombia, según cifras del Ministerio de Salud, en promedio 33 mil personas al año mueren de cáncer. Sin embargo, esas cifras han aumentado y tan solo para el año 2020, 4 millones de personas fueron diagnosticadas con esta enfermedad, de las cuales 1,4 millones murieron [12], [13].

Uno de los tratamientos generalmente usados para combatir el cáncer, en estado no avanzado y ubicado en áreas superficiales donde la luz puede llegar, como el cáncer de piel o en el revestimiento de órganos, es la fototerapia [14]. La terapia fotodinámica o fototerapia es un tratamiento que utiliza agentes fotosensibilizadores junto con luz para generar estrés oxidativo, lo que posteriormente mata las células cancerosas; estos agentes sólo funcionan tras ser activados por la irradiación de luz a una longitud de onda específica [1], [2], [15].

Los agentes fotosensibilizadores son, en su mayoría, hidrofóbicos. Presentan sus principales ventajas en la tendencia del tejido tumoral en acumularlos, debido a que no presentan un mecanismo de eliminación de desechos eficiente comparado con el mecanismo del tejido sano. Adicionalmente, la irradiación es dirigida solamente a un área particular, por lo que, si quedan residuos del fármaco en el tejido sano, si no es irradiado no se ve afectado [6], [7]. Sin embargo, su característica fotoactiva limita su aplicación a los sitios dónde puede llegar la luz, por lo tanto, las zonas en las que se puede aplicar el tratamiento. Además de generar efectos secundarios como la fotosensibilidad.

Para mitigar sus limitaciones y efectos secundarios[1], se propone el uso de nanopartículas como posibles vehículos de transporte que optimicen su administración y el acoplamiento de estas con el fármaco para potenciar el tratamiento de terapia fotodinámica [6]. Dentro de las nanopartículas evaluadas se encuentran los puntos de carbono (Carbon Dots - CD) [7]. Estos son biocompatibles y no generan reacciones inmunes en el cuerpo al ser fácilmente asimilados por el mismo debido a su naturaleza carbónica [16]–[18]. Las propiedades ópticas que tienen los CD les brinda un potencial uso como fotosensibilizador [8].

Los CD presentan una alta energía superficial libre, resistencia al fotoblanqueo y amplios espectros de absorción. Estas características les proporcionan un mayor rango de longitudes de

onda de excitación, emitiendo fluorescencia siempre a la misma intensidad y en los rangos de luz visible, desencadenando en la activación de los mismos procesos químicos que los agentes fotosensibles, como la formación de ROS [19][20].

Para la determinación de la efectividad de los puntos de carbono en la fototerapia, es necesario realizar una irradiación, con luz ultravioleta (UV) o alguna luz de alta energía, a los CD para que emitan la fluorescencia que puede potencialmente generar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inducir la muerte en las células cancerosas.

En el trabajo realizado por Rueda Parra, 2022 [21], se obtuvieron puntos de carbono con emisión azul que no son citotóxicos para las células 3T3 (fibroblastos embrionarios aislados de ratón). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas entre las medias de producción de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species – ROS), las cuales son indicadores de estrés oxidativo.

La principal razón por la que no se evidenció diferencias significativas, no pudieron ser atribuidas a las propiedades ópticas de los CD, sino, al montaje experimental utilizado para la irradiación. Principalmente, se presentaron inconvenientes con el direccionamiento de la luz UV y la irradiación no uniforme sobre la placa de pozos de cultivo celular, generando un efecto de sombra que posteriormente desemboca en una diferencia de irradiación.

Con el fin de disminuir o erradicar esta diferencia de irradiación en los CD es necesario enfocar la luz UV solamente en ellos en un rango que no genere sombra (90°), además de mitigar todos los posibles riesgos de que otro factor, ya sea ambiental o propio del montaje, generen fluorescencia o ROS que puedan afectar la medición.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Diseñar el prototipo de un dispositivo para la evaluación de la generación de especies reactivas de oxígeno a partir de la irradiación con luz ultravioleta de puntos de carbono.

1.2.2. Objetivos específicos

- I. Diseñar un dispositivo de irradiación UV a medida de la placa de 96 pozos para cultivo celular, con diferentes alturas y que no permita el ingreso de luz del entorno.
- II. Prototipar y verificar el diseño propuesto según los requisitos técnicos establecidos.
- III. Evaluar el prototipo construido realizando pruebas preliminares de su uso a partir de la estimación de ROS producidas tras la irradiación con luz de 365nm de puntos de carbono con propiedades ópticas que potencialmente puedan tener respuesta fotosensibilizante.

1.3. Contribuciones

Por medio del presente trabajo se presenta un prototipo de dispositivo que permite la irradiación UV de potenciales agentes fotosensibilizadores para la cuantificación de la generación de especies reactivas de oxígeno *in vitro*. Este dispositivo, además de contribuir en la continuación de investigación en el área de la ciencia de materiales, contribuye a la apropiada implementación de futuros proyectos que incluyan irradiación directa con luz UV en sus protocolos. El prototipo asegura que los fotones UV emitidos inciden de manera homogénea en agentes fotosensibilizadores, además evita factores de interferencia en mediciones tales como filtración de luz del ambiente o el movimiento de la placa para cultivo celular.

Capítulo 2

ESTADO DEL ARTE

2.1. Puntos de Carbono

Los puntos de carbono se descubrieron accidentalmente en 2004 durante la purificación de nanotubos de carbono de pared simple. Son nanopartículas fluorescentes de carbón en forma regularmente de esferas de tamaño menor a 10nm. Presentan estabilidad coloidal acuosa, alta biocompatibilidad y facilidad de funcionalización en su superficie [22]–[25].

La estructura y composición de estas nanopartículas es dependiente de los precursores, solventes y el método de síntesis utilizado, donde el carbono es el átomo de mayor abundancia con hibridaciones sp^2 y sp^3 que les permite establecer sistemas conjugados con enlaces dobles y simples, disminuyendo la energía entre los orbitales y favoreciendo procesos de absorción y emisión de luz en el espectro ultravioleta [26].

La absorción de luz de los puntos de carbono dentro del espectro UV se da debido a la transición $\pi-\pi^*$ de los enlaces dobles de carbono en los anillos aromáticos que se forman en el núcleo. Estas transiciones se encuentran aproximadamente entre los 250nm y los 400nm de longitud de onda, lo que permite que cuando los electrones pasen de nuevo al estado de reposo emitan luz en el espectro visible [27]–[30].

La disipación de la energía absorbida se realiza en forma de radiación electromagnética de fotones, lo que se evidencia como el fenómeno óptico de fluorescencia de luz en el espectro visible. Esta forma de luminiscencia no presenta fotoblanqueo, por lo que siempre emitirá la misma fluorescencia independientemente del tiempo de almacenamiento o del tiempo de irradiación [4].

Las principales aplicaciones reportadas para los CD son en biosensores, fabricación de dispositivos, bioimágenes, liberación controlada de fármacos e incluso en tratamiento de enfermedades. Uno de estos tratamientos está enfocado en el cáncer, debido a sus propiedades ópticas, las cuales les permitiría ser potenciales agentes fotosensibilizantes, especialmente en la terapia fotodinámica [8], [19], [31], [32].

2.2. Fototerapia

La terapia fotodinámica o fototerapia (PDT por sus siglas en inglés) es un tratamiento no invasivo y no resistente a medicamentos, por lo que no suele tener resistencia cruzada con otros tratamientos contra el cáncer. Utiliza agentes o medicamentos fotosensibilizadores junto con luz para eliminar células cancerosas; estos agentes sólo funcionan luego de ser activados por la irradiación de luz a una longitud de onda específica [4].

El proceso del tratamiento empieza introduciendo el agente fotosensibilizador en el torrente sanguíneo a través de una vena o sobre la piel; en algunos casos es administrado vía oral. Después de 24 a 72 horas, dependiendo del agente utilizado, la mayor parte de este abandona las células sanas, pero es absorbido por las células cancerosas. Finalmente, se irradia con luz la zona a tratar, foto-activando el agente y desencadenando que reaccione por medio de la hidrólisis con oxígeno molecular o con las biomoléculas presentes.

Esta reacción forma diferentes tipos de ROS, tales como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (O_2) o radical hidroxilo ($-OH$), las cuales al ser especies citotóxicas que causan daño vascular, impiden que el tumor tenga acceso a fuentes de oxígeno, causando, en la mayoría de los casos, su muerte [4].

No obstante, este tratamiento presenta efectos secundarios diversos, como fotosensibilidad, hinchazón, cambios en la piel y cambios en el sistema inmunológico [4]. En la búsqueda de minimizar las reacciones negativas de estos agentes fotosensibilizadores sin afectar su desempeño como tratamiento del cáncer, se ha investigado como opción utilizar puntos de carbono, ya que por sus propiedades ópticas se podría potencializar la generación de ROS y, además, no generan reacciones inmunes en el cuerpo al ser fácilmente asimilados por el mismo debido a su naturaleza carbónica [16]–[18].

2.2.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y el funcionamiento de la fototerapia

Las ROS son metabolitos del oxígeno con una alta capacidad oxidante. Estas especies pueden ser radicales como el superóxido o no radicales como el oxígeno singlete. Son generadas naturalmente por el organismo por medio del metabolismo celular a nivel mitocondrial [33]. Los metabolitos ROS producen estrés oxidativo, el cual, es una señal que controla procesos de muerte en el ciclo celular; las ROS inducen a la apoptosis y/o necrosis por su citotoxicidad [28], [29], [34]. La producción química de las diferentes ROS se observa en la figura 2.2.1.1.

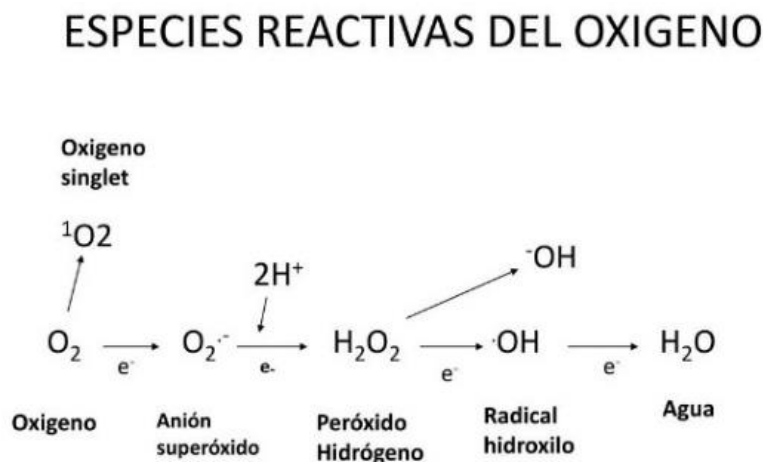


Figura 2.2.1.1 Producción química de las diferentes especies reactivas de oxígeno

En la terapia fotodinámica, se generan ROS a partir de los agentes fotosensibilizadores, puesto que, al ser expuestos a la irradiación de la luz, los electrones de dichos agentes son excitados del estado neutro S_0 al estado singlete S_1 [30], [35]. Esto debido a la recopilación de energía que necesitan para saltar de un estado a otro por medio de la luz absorbida. Luego de realizar dicho salto de banda energética, los electrones pueden decaer o retornar a su estado neutral en tres posibles formas (figura 2.2.1.2):

- I. A través de la relajación no radiativa liberando la energía absorbida en forma de calor.
- II. A través de la relajación radiativa produciendo luminiscencia fluorescente.
- III. Realizando transferencia de energía desde S_1 al estado triple excitado T_1 del agente radiosensibilizante por medio de un cruce intersistema [3].

Cuando los electrones toman la vía de retorno III, para liberar la energía desde T_1 nuevamente puede relajarse al estado S_0 por disipación de calor, fosforescencia o generando radicales libres por la transferencia de electrones a especies con contenido atómico de oxígeno que luego forman especies reactivas de oxígeno. Cuando reaccionan con agua o con oxígeno molecular forman radicales hidroxilo ($-OH$), superóxido (O_2^-) o peróxido (H_2O_2), y/o oxígeno singlete (O_2). La presencia de ROS induce el estrés oxidativo que posteriormente llevan a la célula a la apoptosis y finalmente a la necrosis [3], [36].

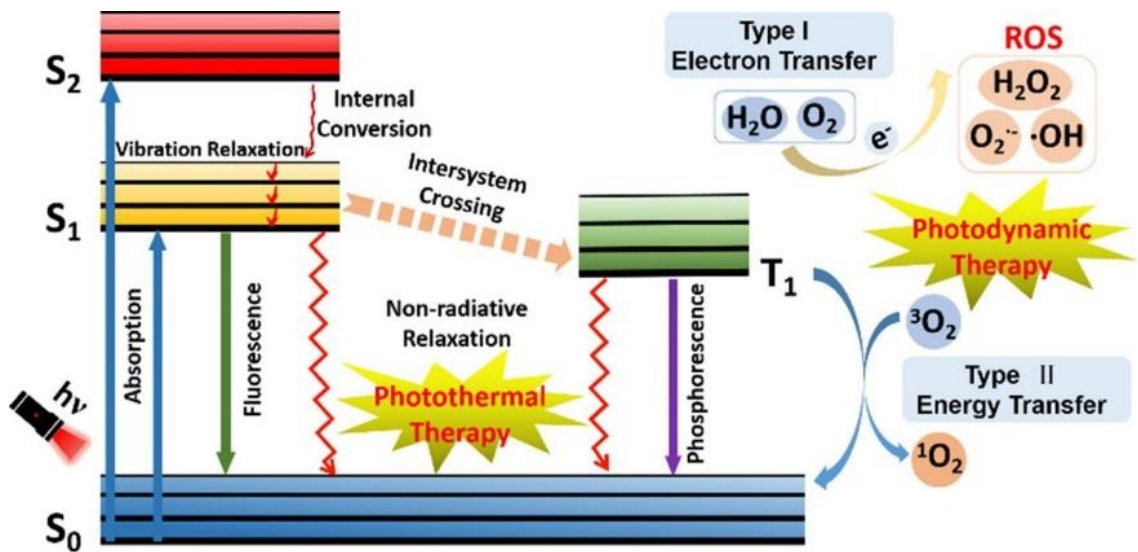


Figura 2.2.1.2 Esquemático del proceso de terapia fotodinámica (PDT) y terapia fototérmica (PTT). Tomada de [3].

Una de las grandes limitaciones de la fototerapia como tratamiento efectivo para el cáncer radica en la incapacidad de transmitir la luz adecuada a la parte interna de los tumores grandes debido a la baja profundidad de penetración tisular de la luz. Para ello se están investigando formas de optimizar y mejorar este proceso con una mayor producción de ROS que pueda realizar una destrucción efectiva de las células cancerosas [37].

2.3. Montajes de irradiación

En la literatura se han reportado diferentes montajes experimentales de irradiación a células cultivadas en pozos especiales para ello. En los estudios realizados con estos montajes, se desea que la luz se distribuya homogéneamente y cause un efecto oxidante en las células irradiadas. Se pueden encontrar algunas fuentes de luz comerciales como el U-JIN LED de Goyang, Corea, con la cual se irradiaron queratinocitos y melanocitos emitiendo a diferentes longitudes de onda en rojo, verde y azul [38] o el HP450G-LED de Wuhan Ruihua Instrument and Equipment Co, LTD de China (figura 2.3.1 B.) con el cual se irradió luz azul (455nm) [30].

Otros montajes experimentales se realizaron con fuentes más simples de luz comerciales o realizadas para sus propios estudios (no comerciales), como lo son los paneles LED de tamaño 50×50cm fabricados por Wuxi Huazhaohong Optoelectronic Technology Co, Ltd., Wuxi, P. R. China [40] o un circuito compuesto de una matriz de 12 diodos emisores de luz ultravioleta, LED (por sus siglas en inglés) de 5 mm que emanan luz azul a 470nm y cuatro resistencias, conectadas en una protoboard (figura 2.3.1 A.) [41].

En el estudio que empleó el montaje experimental no comercial compuesto por el circuito de matriz de LED (figura 2.3.1 A.), se concluyó que la irradiación realizada con luz azul induce estrés oxidativo y daña las uniones paracelulares. Además, se comprobó que la fuente de luz usada para irradiar presenta resultados semejantes a los realizados con fuentes comerciales de irradiación [41]. Estos resultados se apoyan y están acorde con varios estudios previos que aseguran que el estrés oxidativo de las células producido por la exposición a la luz LED UV o luz azul provoca la activación del estrés del retículo endoplásmico e induce la respuesta de citocinas proinflamatorias [42], [43].

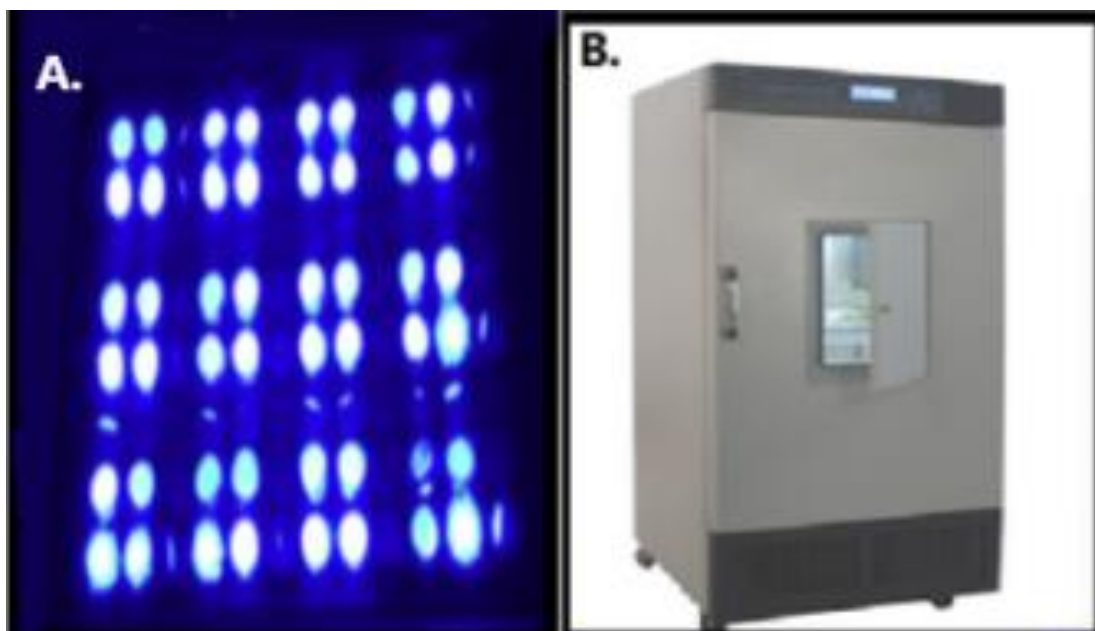


Figura 2.3.1 Montajes experimentales de irradiación. **A.** Circuito de matriz de LED. **B.** HP450G-LED. Adaptadas de [41], [44].

2.4. Prototipado rápido: Impresión 3D

La impresión 3D es una técnica de manufactura aditiva en la cual se genera un objeto sólido tridimensional a partir del desarrollo de un modelo geométrico digital realizado en un programa de diseño asistido por computadora CAD (por sus siglas en inglés) [45]. Actualmente, esta técnica de manufactura se encuentra en auge debido a la revolución industrial 4.0 y se ha convertido en una de las herramientas más poderosas de prototipado rápido y fabricación precisa. Además de ser económica, posee beneficios como: tiempo de fabricación relativamente rápido, escasa necesidad de post-procesamiento y capacidad de imprimir usando diferentes tipos de materiales [46], [47]. Al ser una tecnología de fabricación precisa, es cada vez más utilizada en la industria de manufactura, farmacéutica, ingeniería de tejidos y modelado de enfermedades. En la figura 2.4.1 se puede observar un resumen de las aplicaciones biomédicas y cómo se ha desarrollado la impresión 3D a lo largo del tiempo.

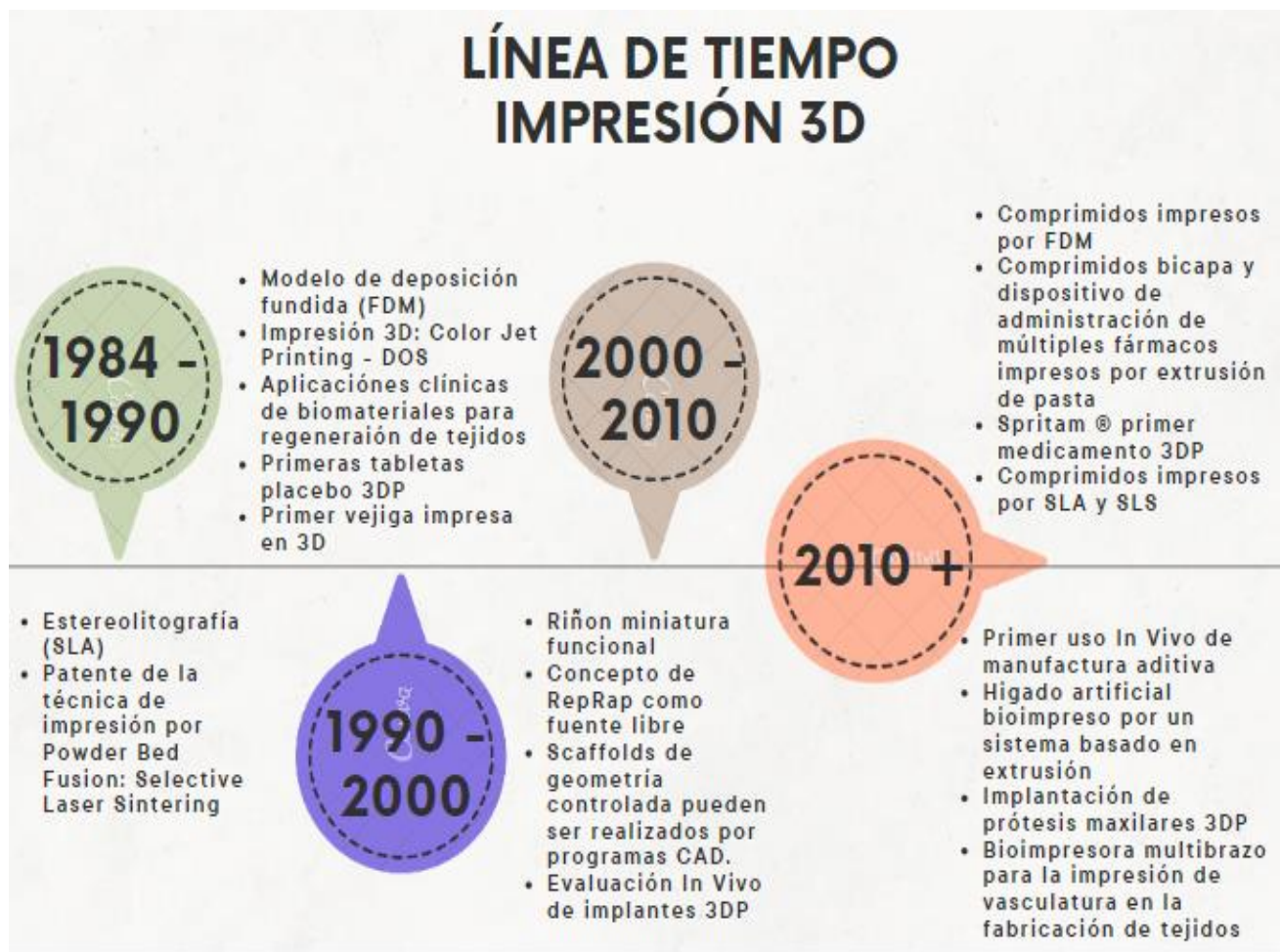


Figura 2.4.1 Línea del tiempo de los hitos más importantes de la impresión 3D y de sus aplicaciones biomédicas. Adaptado de [48].

2.4.1. Métodos de impresión 3D

Actualmente, existen diferentes métodos de impresión 3D dependiendo del material con el que se fabrica la pieza y de su nivel de producción. A continuación, se explican los métodos más usados y su funcionamiento.

- **POWDER BED FUSION (Fusión por lecho de polvo):** Está basada en la deposición de sucesivas capas de material en polvo, para luego ser fundidas con una fuente de energía térmica, usualmente láser. Una vez que la capa ha sido fundida, la base de trabajo desciende para la deposición de una nueva capa de polvo. El proceso se repite, capa a capa, hasta finalizar la pieza. Se caracteriza por hacer posible la producción de componentes en aleaciones metálicas, por lo que generalmente es necesario realizar un procedimiento de post-procesamiento, como sinterización, para obtener la pieza completamente finalizada [49].

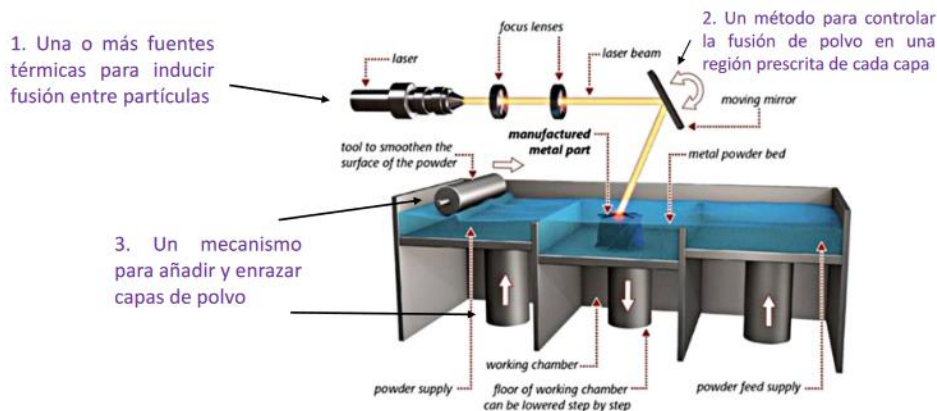


Figura 2.4.1.1 Mecanismo de impresión 3D con Powder Bed Fusion. Adaptada de [50]

- **BINDER JETTING:** El proceso es similar al de Powder Bed Fusion. Sin embargo, en vez de sintetizar con láser, se imprime o inyecta un aglutinante en un lecho de polvo para formar secciones transversales capa por capa. Las gotas del aglutinante forman aglomerados esféricos del líquido y partículas de polvo, además de brindar una unión junto con la capa previamente impresa. Luego de impresa la pieza se realiza un post-procesamiento de sinterización sola o junto con infiltración si es necesario eliminar algún material de la impresión para generar mayor pureza. Generalmente imprime materiales metálicos y cerámicos [51].

- **FUSED FILAMENT FABRICATION:** Utiliza un filamento continuo de material termoplástico ubicado en una bobina para realizar la impresión. El filamento llega a un extrusor en donde por medio del calor se derrite y se deposita con la boquilla en una cama de trabajo o plataforma donde se va formando la pieza diseñada. Actualmente es el método de impresión 3D más usado a nivel mundial. Mediante el lenguaje de programación libre RepRap es posible brindar las instrucciones de movimiento al extrusor construyendo capa por capa hasta finalizar la pieza [52], [53].

Los materiales más utilizados para la impresión 3D por este método son el Acrilonitrilo Butadieno Estireno (ABS) y el Ácido Poliláctico (PLA).

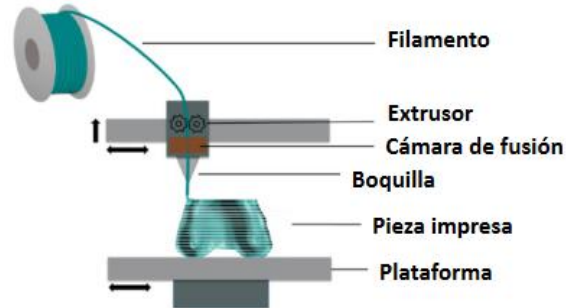


Figura 2.4.1.2 Proceso de impresión 3D con Fused Filament Fabrication. Adaptada de [54].

El material PLA es un biopolímero termoplástico que tiene como molécula precursora el ácido láctico, el cual le brinda una naturaleza biodegradable. Es sintetizado a partir de bio-recursos como el azúcar o maíz, por lo cual es sostenible y amigable con el medio ambiente. Su temperatura de procesamiento se encuentra entre los 60 y 125°C. Este material puede tener contacto directo con material biológico y ser esterilizado fácilmente. Adicionalmente, es resistente a la radiación de alta energía, incluidos los haces de electrones gamma (γ) y UV [55].

Así mismo, el PLA presenta propiedades mecánicas comparables con el ABS (el cual es un plástico proveniente del petróleo), tales como dureza, resistencia al impacto, resistencia química y rigidez. Una diferencia con el ABS es su baja elongación, lo cual es una ventaja al momento de imprimir, puesto que las dimensiones de la pieza impresa no disminuyen significativamente [56], [57].

Capítulo 3

METODOLOGÍA

En este proyecto se utiliza una metodología de cuatro fases como se observa en la figura 3.1.

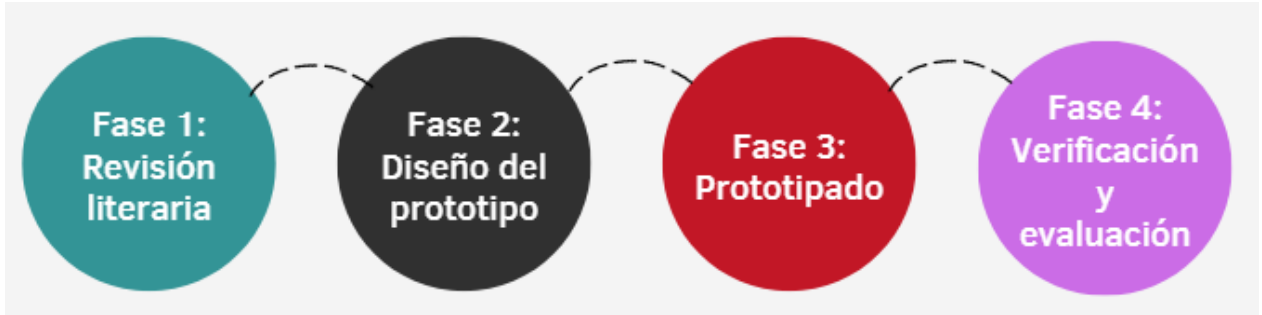


Figura 3.1. Diagrama de la metodología utilizada para el desarrollo del proyecto.

FASE 1: Se realiza una búsqueda de información para construir un marco teórico dividido en cuatro secciones: puntos de carbono, fototerapia, montajes experimentales de irradiación y prototipado rápido con impresión 3D. Para esto se utilizaron artículos de investigación y revisión publicados desde el año 2013, siendo la mayoría de estos publicados después del 2020. Las bases de datos utilizadas fueron PubMed, Nature Journals, SciELO y ScienceDirect.

Los criterios de inclusión fueron: artículos de investigación, artículos en inglés y español, artículos que describan en su metodología la forma de irradiación utilizada y los tiempos de exposición, artículos que describan las propiedades mecánicas del material PLA. Los criterios de exclusión fueron: capítulos de libro, libros, artículos en idiomas diferentes al inglés o español. Las ecuaciones de búsqueda utilizada se presentan a continuación:

1. *ROS AND (phototherapy OR light therapy OR photodynamic therapy) AND irradiation UV AND carbon dots*
2. *3D printing AND (FFF OR PBF OR Binder Jetting) AND (PLA OR ABS)*

FASE 2: Para el diseño del prototipo se plantean los requisitos técnicos que debe cumplir el dispositivo y a partir de ellos se realizan los planos del montaje físico en el programa CAD Autodesk Fusion 360 ®. El proceso llevado a cabo se introduce en la sección 3.1.

FASE 3: Se realiza la impresión 3D de las diferentes partes del dispositivo diseñado por medio de la técnica de manufactura aditiva Fused Filament Fabrication. Este montaje físico es ensamblado con el circuito eléctrico de la fuente de luz implementando los requisitos técnicos

mínimos establecidos para el correcto funcionamiento del prototipo. El ensamblaje se explica en la sección 3.2.

FASE 4: Aplicación de los métodos de verificación y evaluación del dispositivo. La evaluación se lleva a cabo por medio de un protocolo experimental en el cual se realiza la irradiación a puntos de carbono, disueltos en PBS y medio de cultivo celular. Posteriormente, se realiza la estimación de ROS producidas a partir de la intensidad de fluorescencia. Esta fase se complementa en la sección 3.3

3.1. Diseño del prototipo

Con el fin de explorar el potencial de los CD como agentes fotosensibilizadores, se desea determinar si tras la irradiación a estos con luz ultravioleta, se presenta formación de especies reactivas de oxígeno *in vitro*. Para ello, es imprescindible implementar un montaje de irradiación que elimine los factores de interferencia en las mediciones, por lo cual, en el diseño del dispositivo para irradiación se determinaron los siguientes aspectos como requisitos fundamentales a ser considerados:

- Manufactura en un material resistente.
- Facilidad de limpieza y esterilización en caso de que se contamine.
- El dispositivo debe mantener el contenido en completa oscuridad.
- La placa de pozos para cultivo celular debe mantenerse firme y poder ser extraída fácilmente.
- Fácil accesibilidad e interfaz amigable con el usuario.
- El dispositivo debe tener diferentes alturas que permitan variar la distancia de irradiación entre la fuente de luz y la placa de pozos.
- La fuente de luz debe ser focalizada e incidir homogéneamente en mínimo 12 pozos. La cantidad de pozos a irradiar se determina debido a la necesidad de realizar triplicados de pruebas biológicas y la cantidad de pozos de la placa de cultivo celular a usar (96).

Teniendo en cuenta estos aspectos, la idea de diseño se prototipa con cartulina y palos de paleta para una mejor comprensión de lo que se desea realizar. Este diseño se puede observar detalladamente en la figura 3.1.1. A continuación, se realiza el diseño en dos partes: diseño 3D del montaje físico y diseño eléctrico.

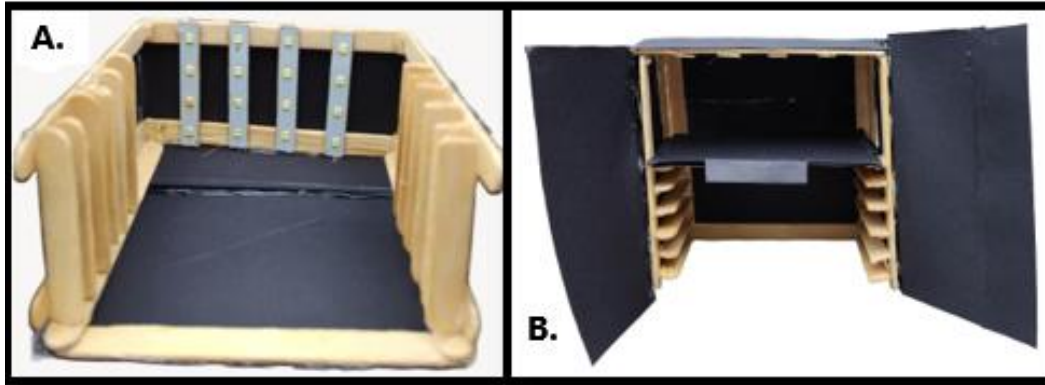


Figura 3.1.1 **A.** Vista inferior del prototipo. **B.** Vista frontal del prototipo.

3.1.1. Diseño 3D del montaje físico

El montaje físico se diseña en el software libre Autodesk Fusion 360[®] y el archivo realizado se guarda en formato **.stl** para posterior impresión. Con un calibrador pie de rey se acotan las dimensiones de la placa de pozos y se establecen cinco posiciones a diferentes distancias de la fuente de luz, en la cual la mayor distancia es de 22cm y la menor es de 2cm. La distancia entre cada altura es de 5cm para permitir el ingreso de la placa de pozos para cultivo celular.

En el momento de realizar los planos del dispositivo, se tomaron las dimensiones de la placa de pozos y se esquematizó teniendo en cuenta el margen de posible contracción del material, agregando dos milímetros en todas sus dimensiones. Por otra parte, en cada borde se añadió un refuerzo de 2mm en forma de cuña para mejor estabilidad. Adicionalmente, se tiene en cuenta el espacio ocupado por el cableado (2mm). Se asegura de que no exista fricción entre la placa de pozos y el dispositivo creando un soporte para la placa, dándole así facilidad de extracción, además, firmeza para que no exista movimiento durante la irradiación.

En total se diseñan seis partes para el dispositivo las cuales son:

- Estante: Contiene las paredes, piso y techo del dispositivo. También los rieles de soporte para cada altura y un canal en la parte de atrás por el cual introducir el cableado.
- Puerta y manija de la puerta: Para asegurar completa oscuridad durante la irradiación y fácil apertura del dispositivo.
- Bandeja para la fuente de luz: Planteada para establecer en ella la fuente de luz en las ubicaciones pertinentes.
- Soporte para la placa de pozos: En ella se posa la placa de pozos y se desliza en los rieles para ingresar y extraer la misma del dispositivo.
- Tapa para la caja de pozos: Diseñada para tapan el soporte con la placa de pozos y que no ingrese luz del ambiente que pueda afectar los resultados en caso de que el dispositivo se ubique apartado del equipo de medición de fluorescencia y se tenga que transportar la placa.

3.1.2. Diseño eléctrico

Teniendo en cuenta la revisión literaria de montajes de irradiación expuesta en 2.3, se toma como referencia la fuente de irradiación no comercial compuesta de 12 LED para construir el diseño eléctrico del dispositivo. Los LED se conectan por medio de un circuito en paralelo que permita el fácil reemplazo de uno solo, en caso de ser necesario, y que los otros sigan funcionando.

Se conectan a un módulo regulador de voltaje, el cual evita que haya una sobrecarga de voltaje y que los LED se quemen, unido en circuito en serie a un interruptor, que permita encender y apagar la fuente de luz, y a un adaptador AC-DC que se pueda conectar a un tomacorriente estándar de 120V AC para facilidad de obtención de voltaje.

3.2. Prototipado

El prototipado del dispositivo diseñado se realiza también en dos partes que posteriormente fueron ensambladas. Para la manufactura del montaje físico se utilizó la técnica de prototipado rápido por impresión 3D con Fused Filament Fabrication, con apoyo de los laboratorios UR Emprende de la Universidad del Rosario y sus impresoras 3D. Se fabrica utilizando el material biodegradable PLA de color negro. La impresora 3D utilizada fue la Fused Form 300 (FF300) que se observa en la figura 3.2.1.

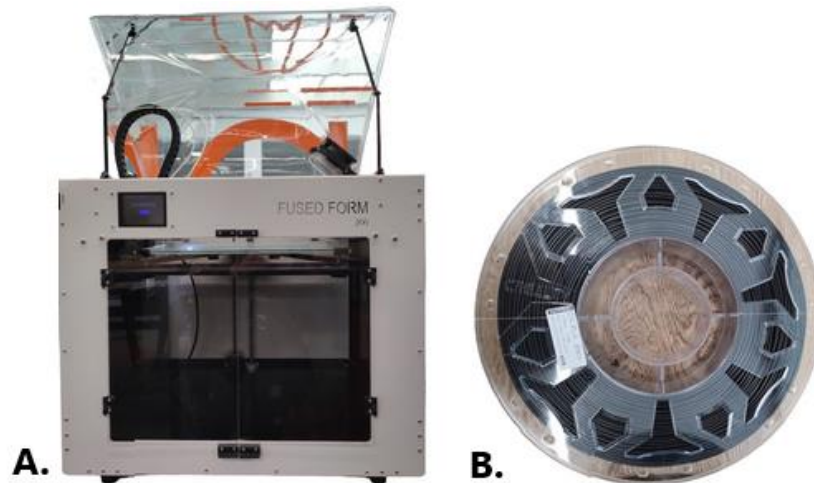


Figura 3.2.1 **A.** Impresora Fused Form 300 utilizada en la impresión 3D del dispositivo. **B.** Filamento de PLA negro utilizado.

Los parámetros de impresión establecidos son: velocidad 45mm/s, 20% de relleno y patrón Grid, con una boquilla, a temperatura de impresión de 215°C y temperatura de plataforma de 50°C. Se debe tener en cuenta que para evitar que el material se pegue a la plataforma, se realiza una limpieza de esta antes de imprimir y se aplica una capa de laca en aerosol.

La realización de la impresión 3D de cada pieza se da conectando a la impresora una memoria SD con el archivo **.stl** de cada plano. Cada pieza tiene un tiempo diferente de impresión dependiendo de su tamaño, por lo cual la impresión total del dispositivo se realiza en diferentes

días y el tiempo total de impresión fue de 33 horas. Al final de cada impresión se debe esperar por lo menos 2 minutos para que enfríe el material y no se deforme la pieza. Para el ensamble puertamanija se usa pegamento en frío de ciano-acrilato.

Para la implementación de la fuente de luz, se utilizan 12 LED UV con emisión a 365nm de longitud de onda con funcionamiento a 3V, de alta potencia (3W) con su respectivo disipador de calor, un adaptador de corriente AC-DC de 5V y paso de corriente hasta 2A, un módulo de regulación de voltaje LM2596 y un switch. El módulo regulador de voltaje tiene incluido un LED rojo que se enciende cuando está en funcionamiento, es decir, cuando hay paso de corriente a través de él.

Primero los LED se unen al disipador de calor por medio de soldadura con estaño líquido. Los LED son conectados entre sí en un circuito en paralelo por medio de cables de cobre unidos por soldadura con estaño, para después ser conectados al módulo regulador de voltaje. El módulo es soldado a su vez en un circuito en serie con el switch y el adaptador AC-DC que finalmente será conectado al tomacorriente.

El ensamblaje total del dispositivo se realiza abriendo un orificio de 1mm por medio de calor en la parte de atrás del estante impreso para pasar los cables del circuito y se adhiere el módulo regulador a la parte posterior del mismo. Para fijar las posiciones de irradiación, se mide exactamente la posición del pozo a irradiar en la placa y se alinea a 90° con el LED en la bandeja para ser adherido a la misma con pegamento en frío de ciano-acrilato.

3.3. Evaluación y verificación del prototipo

La verificación del dispositivo se implementa de tres maneras. La primera es midiendo continuidad con el multímetro en las conexiones entre cada elemento eléctrico. La segunda se realiza conectando el adaptador AC-DC al tomacorriente y realizando dos pruebas: antes de ensamblar totalmente el dispositivo, se conectan los LED a una fuente de voltaje de 3V por medio de cables caimán, para observar si encienden, y luego al finalizar el ensamblado, al encender el interruptor, se debe encender el LED del módulo regulador de voltaje y al mismo tiempo los LED UV.

El LED del módulo regulador de voltaje se implementa como tercera forma de verificación debido a que, al irradiar, el dispositivo está en completa oscuridad, por lo que la única forma de determinar si la fuente de luz dentro del dispositivo está encendida es cuando este LED también se encuentre encendido. En cuanto a la validación de la fuente de luz, se realiza una espectrofotometría de fluorescencia a los LED UV, mediante el espectrofotómetro Flames-S-XR1-ES y el software OceanView, para determinar el rango de longitud de onda que están emitiendo.

3.3.1. Protocolo experimental de irradiación

Se plantea la realización de un protocolo experimental para evaluar la funcionalidad del prototipo. Dicho protocolo se compone de dos partes: La primera es la síntesis de puntos de carbono que presenten emisión de luz azul al ser irradiados con luz UV a 365nm de longitud de

onda y la segunda son las pruebas de irradiación para posterior cuantificación de ROS de los puntos sintetizados dispersados en PBS y en medio de cultivo celular.

3.3.1.1 Síntesis de puntos de carbono

La síntesis de los puntos de carbono se realiza en tres etapas: reacción, purificación y secado. Estas se desarrollan de la siguiente forma:

- Para la reacción, se dispersan 0.5g de ácido cítrico como precursor de carbono en una solución de 3mL de dimetilformamida (DMF) y 3mL de etanol (figura 3.3.1.1.1 A). Esta mezcla se homogeniza por medio de sonicación y agitación vórtex (figura 3.3.1.1.1 B) para posteriormente ser llevada al reactor microondas MONOWAVE 50 (Anton Paar, Austria) durante 5 minutos a una temperatura de 175°C en la configuración As Fast As Posible - AFAP (figura 3.3.1.1.1 C).
- Se extrae el resultante de la reacción (6 mL) y se filtra (filtro de 0.22µm) para remover partículas que tengan un tamaño mayor al calibre del filtro. Posteriormente se centrifuga a 10000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (figura 3.3.1.1.1 D). El sobrenadante se somete a un proceso de diálisis en agua destilada durante 24 horas (figura 3.3.1.1.1 E).
- Finalmente, los puntos de carbono se introducen en recipientes eppendorf de 2mL para ser secados en el equipo Centrivap centrifugadora-IR Labconco™ durante 24 horas a 65°C (figura 3.3.1.1.1 F). Una vez seca la muestra, se diluyen los puntos de carbono en PBS para su futuro uso.

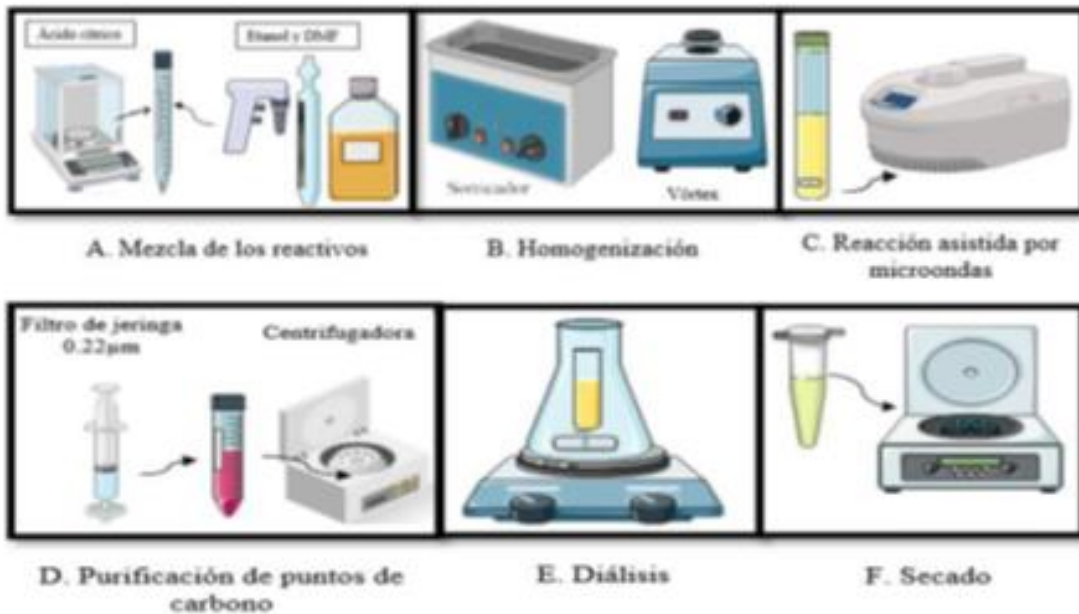


Figura 3.3.1.1.1 Proceso de síntesis de puntos de carbono por medio de reacción asistida por microondas.

3.3.1.2 Pruebas de irradiación y cuantificación de ROS

El carboxy-H₂DFFDA o DFFH-DA (carboxi-acetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína) es una forma químicamente reducida y acetilada de la fluoresceína que se utiliza como sonda fluorescente indicadora de especies reactivas del oxígeno en las células. Esta sonda es hidrolizada a su forma desacetilada cuando atraviesa la membrana celular y las esterasas intracelulares eliminan los grupos acetato, pasando a diclorofluoresceína (DCFH), que en presencia de ROS se convierte a su forma oxidada (DCF) que es fluorescente [58]–[60].

La fluorescencia azul que producen los puntos de carbono sintetizados al ser irradiados con luz ultravioleta puede favorecer la producción de ROS. Estas especies reactivas, como anteriormente fue descrito, al entrar en contacto con la sonda DFFH-DA la oxida a DCF fluorescente. A partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por la sonda después de la irradiación con luz UV, es posible estimar la concentración de ROS.

Para las pruebas de detección y cuantificación de ROS, primero se prepara un abastecimiento de 5mL de puntos de carbono disueltos en PBS con concentraciones de 10,100 y 500 µg/mL. Luego se prepara el reactivo carboxy-H₂DFFDA de Invitrogen™ disolviéndolo en una solución de metanol anhídrido en una concentración de 20mM. En el Anexo 1 se describe el proceso de secado del metanol.

De este metanol, se extraen 169.8µL para disolver el reactivo carboxy-H₂DFFDA y obtener la concentración 20mM o 20X. Esta solución se deposita en un eppendorf completamente cubierto con papel aluminio para evitar oxidar la sonda con la luz del ambiente. La sonda se prepara con una dilución 1mM del reactivo en metanol por lo cual se diluye 50µL de esta en 4.8mL de PBS.

Seguido de la preparación de la sonda, en una placa para fluorescencia de 96 pozos se depositan los CD y la sonda, ambos disueltos en PBS, en relación 1:1, agregando 75µL de cada solución. Al realizar esta dilución, los CD quedan en una concentración final de 5,50 y 250 µg/mL. La placa de pozos queda finalmente con la distribución que se puede observar en la figura 3.3.1.2.1.

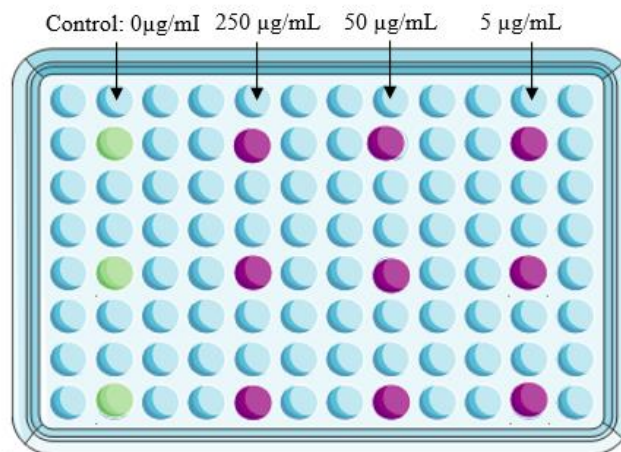


Figura 3.3.1.2.1 Distribución de las muestras de puntos de carbono a diferentes concentraciones en la placa de pozos.

La placa se ingresa al dispositivo de irradiación prototipado y se expone el contenido durante 5 minutos, luego de esto se realiza la medición de la fluorescencia en el lector multimodal Cytation™ 3 (Biotek) con 480nm de excitación y 530nm de emisión. Este procedimiento se realiza cinco veces, una para cada altura del dispositivo, las cuales corresponden a una distancia de 2, 7, 12, 17 y 22cm desde el punto focal de luz hasta la placa de cultivo, como se observa en la figura 3.3.1.2.2. Se repite el proceso, pero con la sonda disuelta en 4.9mL de medio de cultivo celular.

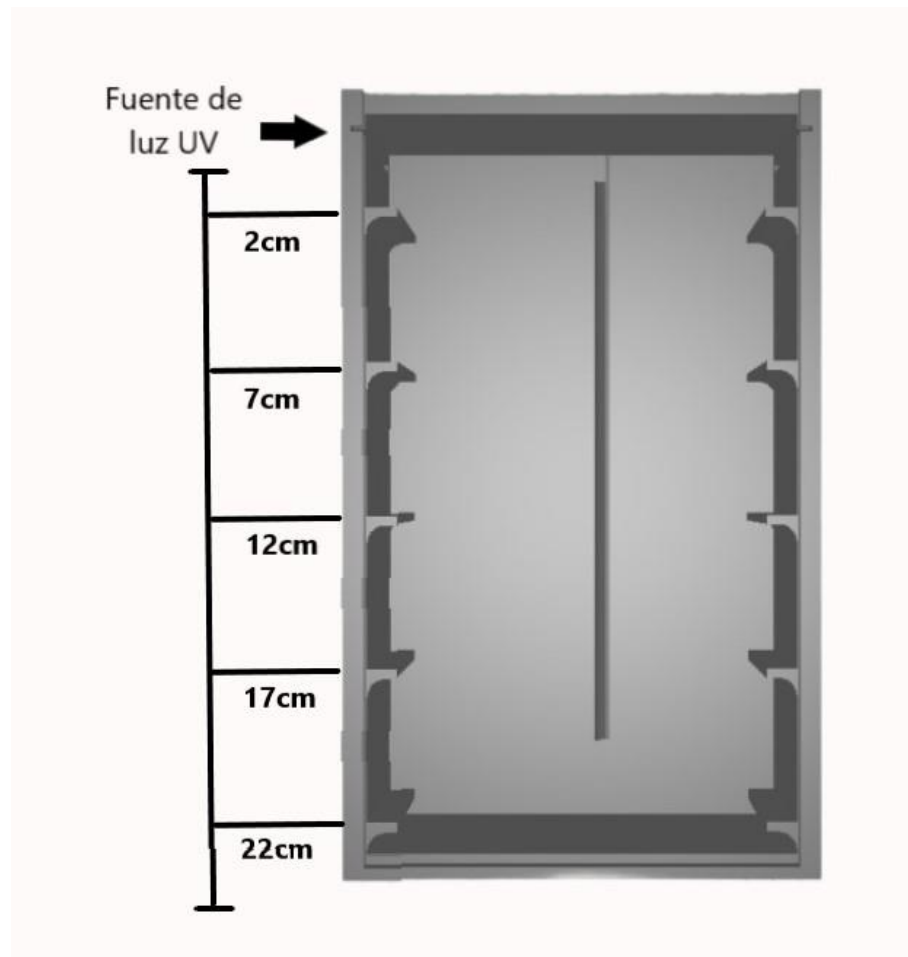


Figura 3.3.1.2.2 Esquema de distancias con respecto a la fuente de luz para cada altura del dispositivo.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diseño y prototipado

Los diseños individuales de cada pieza se pueden observar en la figura 4.1.1 y sus dimensiones en la tabla 4.1-1. El diseño de la bandeja para LED y la del soporte para la caja de pozos, es el mismo. Esto para facilitar la ubicación de los LED y alinearlos correctamente a cada pozo que se desea irradiar, solamente se aumentaron las dimensiones exteriores para que la bandeja para LED quede fija acoplándose al estante. Además, este diseño permite extraer la bandeja lo cual brinda una ventaja en caso de ser necesaria alguna reparación o cambio de los LED.

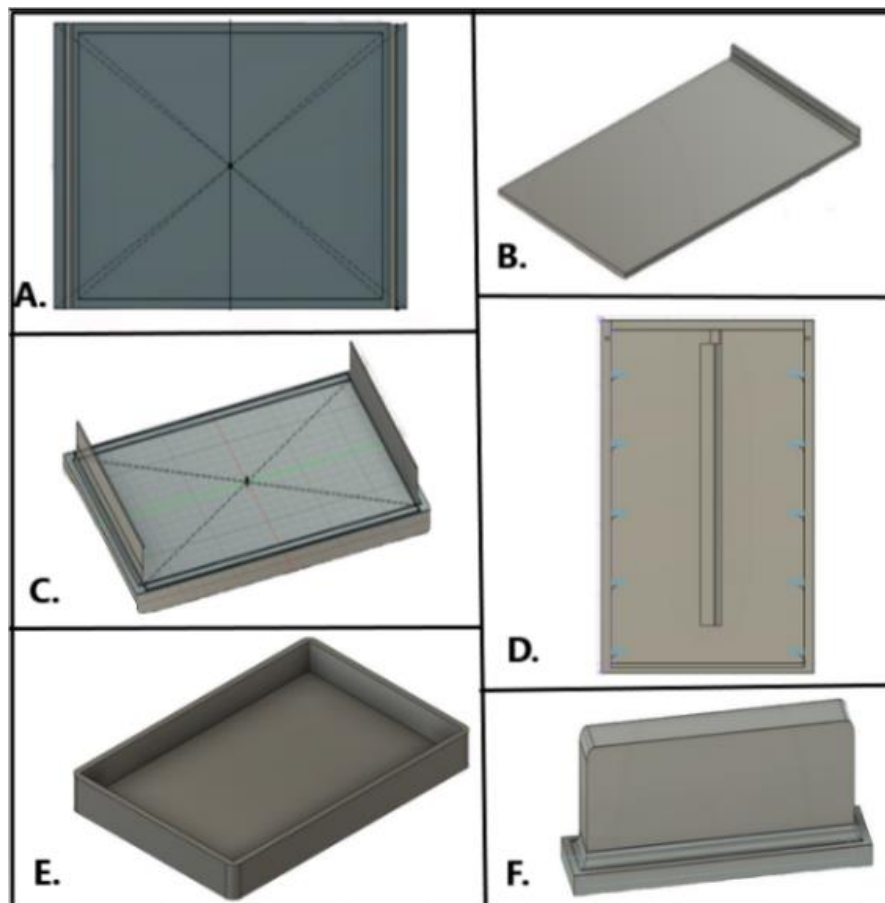


Figura 4.1.1 Planos CAD de cada parte del dispositivo. A. Bandeja para LED. B. Puerta. C. Soporte para la placa de pozos. D. Estante con rieles a diferentes alturas. E. Tapa para la placa de pozos. F. Manija para la puerta.

Tabla 4.1-1 Dimensiones de cada parte del dispositivo diseñado.

Parte	Alto (cm)	Ancho (cm)	Largo (cm)	Grosor (mm)
Bandeja para LED	0.927	14.76	9.15	5.70
Puerta	24.80	14.75	-	3.00
Soporte para la placa de pozos	0.927	13.50	8.90	3.00
Estante	25.40	15.40	11.00	7.00
Tapa para la placa de pozos	1.74	12.80	8.50	3.00
Manija	1.80	7.80	2.00	10.00

El proceso de impresión del estante se puede observar en la figura 4.1.2, en ella se detalla el patrón de impresión, el crecimiento de cada capa de los rieles y del canal para el cableado.

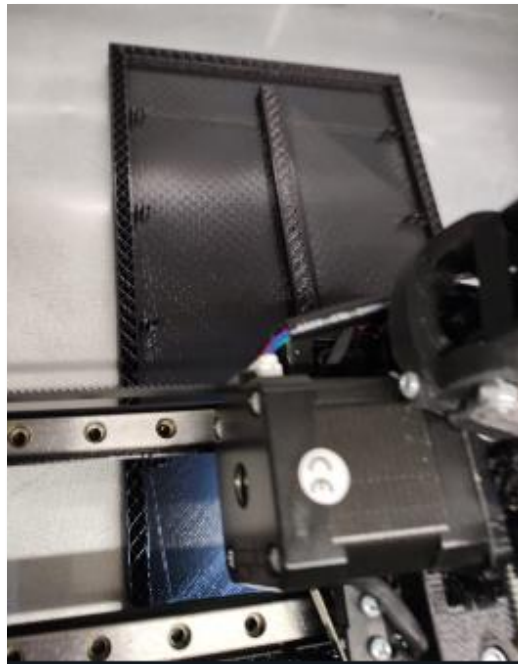


Figura 4.1.2 Proceso de impresión por FFF del estante, con patrón grid y crecimiento vertical de la pieza.

Los tiempos se pueden disminuir aumentando la velocidad de impresión, sin embargo, esto puede afectar la calidad del resultado y/o causar que las piezas no se manufacturen correctamente. En el proceso se determina que, si se aumenta mucho la velocidad de impresión, debido a la rapidez con la que se mueve el extrusor, no se alcanza a ensamblar el material en el lugar correcto, siendo más rápida la velocidad de impresión que la velocidad con la que el material se deposita en su lugar correspondiente. Finalmente, las piezas impresas se pueden observar en la figura 4.1.3.

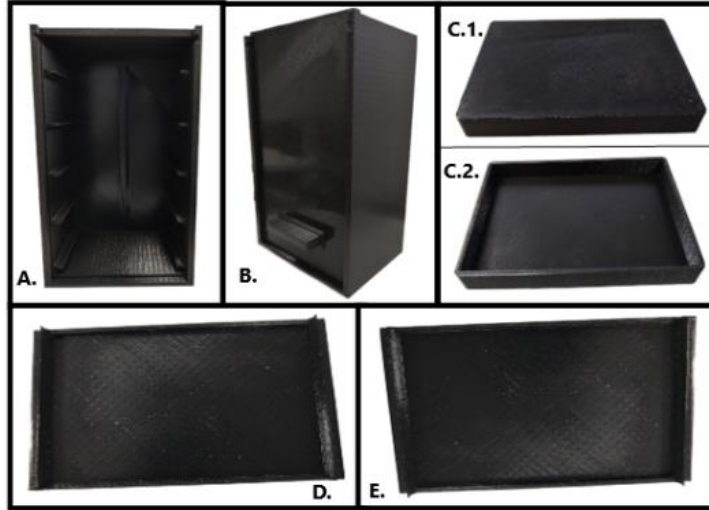


Figura 4.1.3 Piezas del dispositivo impresas en 3D por FFF. **A.** Estante **B.** Estante con la puerta y la manija **C.1.** Vista superior de la tapa para la placa de pozos **C.2.** Vista inferior de la tapa para la placa de pozos **D.** Soporte para la placa de pozos **E.** Bandeja para LED

Antes de empezar la construcción del circuito eléctrico de la fuente de luz, se validó que los LED UV si emitieran fotones en la longitud de onda adecuada para la irradiación de los puntos de carbono, la cual es 365nm. Para ello se midió el espectro de emisión, en la que se determinó que los LED adquiridos presentan una emisión de luz UV entre los 365 y 370nm de longitud de onda (figura 4.1.4)

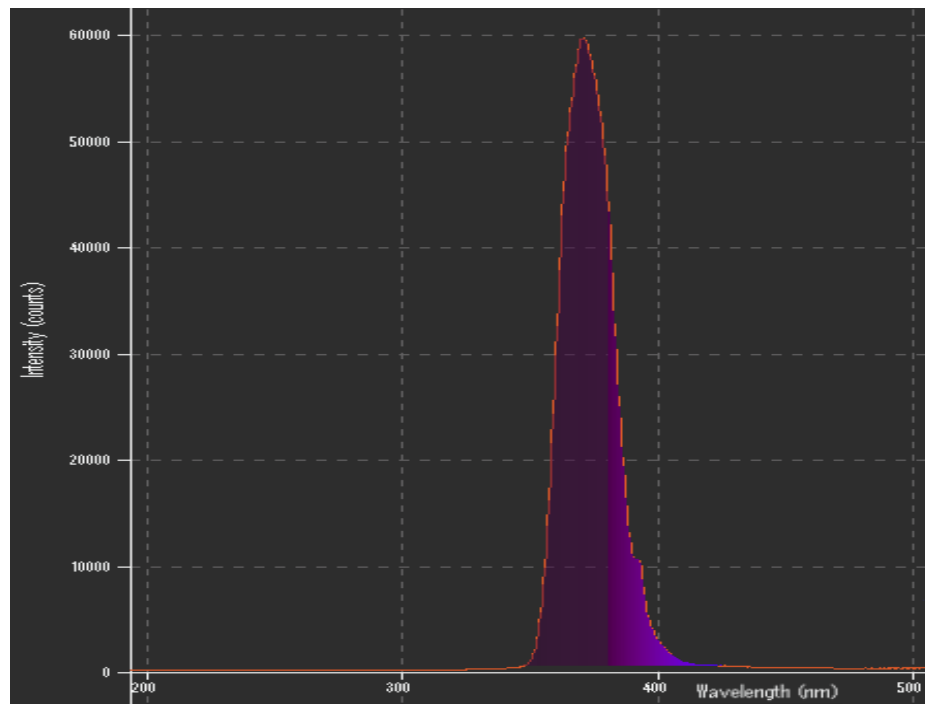


Figura 4.1.4 Espectro de fluorescencia de los LED UV adquiridos y utilizados como fuente de luz en el dispositivo.

Los disipadores absorben el calor, por tal razón, se utiliza estaño líquido para facilitar el proceso de soldadura a los LED. Luego de esto, se forma con los LED un circuito en paralelo y se verifica el funcionamiento de estos. Posteriormente se adhieren los disipadores de calor a la bandeja de LED formando la fuente de luz del dispositivo como se muestra en la figura 4.1.5.

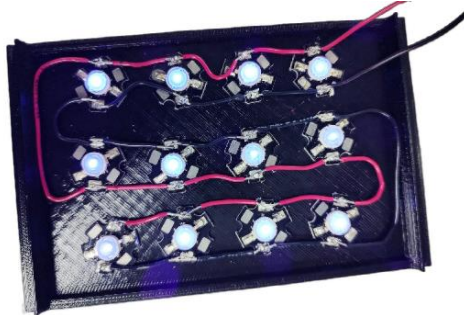


Figura 4.1.5 Fuente de luz del dispositivo correctamente funcionando al ser conectada al tomacorriente.

El diseño del dispositivo mantiene el contenido sin incidencia de fuentes externas de luz cuando está encendida la fuente de luz UV al no ser necesaria la implementación de algún sistema de unión puerta-estante como el de bisagras, ni la manufactura de las estructuras internas por aparte para luego ser ensambladas. Esto gracias a la puerta corrediza y la impresión 3D completa del estante.

El soporte para la placa de pozos permite ingresarla y extraerla del dispositivo fácilmente por su baja fricción riel-soporte y al mismo tiempo la mantiene fija evitando movimiento. El sistema de suministro de corriente le proporciona al dispositivo una fácil manipulación ya que permite que se use en cualquier lugar sin necesidad de un tomacorriente específico y solamente prendiendo y apagando el switch. Adicionalmente, el LED rojo de verificación que incluye el módulo regulador de voltaje, le da al usuario seguridad de que los LED UV están irradiando sin necesidad de abrir el dispositivo (figura 4.1.6 B.), lo que puede ocasionar filtraciones de luz del ambiente y que los resultados se vean afectados. En la figura 4.1.6 A. se observa el dispositivo en funcionamiento.

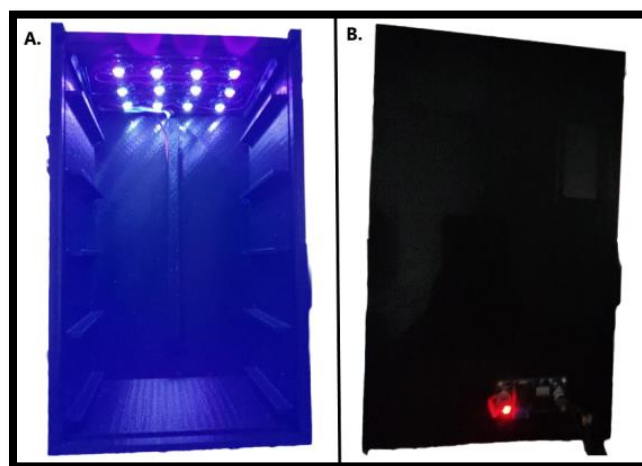


Figura 4.1.6 A. Dispositivo con la fuente de luz encendida. B. Led rojo de verificación encendido cuando el dispositivo está en funcionamiento.

4.2. Aplicación de las pruebas de evaluación

Las propiedades ópticas de los puntos de carbono sintetizados siguiendo la metodología descrita en la sección 3.1.1.1, fueron reportados por Degiovanni [61]. Los CD exhiben una emisión fluorescente en el rango de 300 a 400nm al ser excitados con una irradiación de 365nm (figura 4.2.1).



Figura 4.2.1 Emisión de los puntos de carbono sintetizados, diluidos en PBS (izquierda) y secos (derecha), bajo irradiación de 365nm.

Se prepararon soluciones de CD disueltos en PBS a tres diferentes concentraciones (10, 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se depositan los CD y la sonda disuelta en PBS, en relación 1:1, agregando 75 μL de cada solución en un pozo de la placa para fluorescencia con la distribución que se puede observar en la figura 3.3.1.2.1, utilizando en total 12 pozos. La concentración final de los CD es de 5.50 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La caja de pozos con la solución CD-Sonda se irradia con el dispositivo en cada altura de este por 5 minutos. Las distancias de cada altura con respecto a la fuente de luz se muestran en la figura 3.3.1.2.2 de la sección 3.3.1.2. La prueba de irradiación se establece en función de la concentración de CD, por lo tanto, el control establecido equivale a la solución sin puntos de carbono (concentración de cero $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Con la irradiación UV, la energía emitida activa el proceso de fluorescencia de los puntos de carbono, desencadenando que los fotones estimulen la producción de ROS. Luego estas ROS que se generen causarían la oxidación de la sonda, la cual emite la fluorescencia medida. A partir de dichos valores de intensidad de fluorescencia se estima la cantidad de ROS producidas, debido a que estas dos variables presentan una relación directamente proporcional. Los valores obtenidos de fluorescencia de la sonda se reportan en la figura 4.2.2.

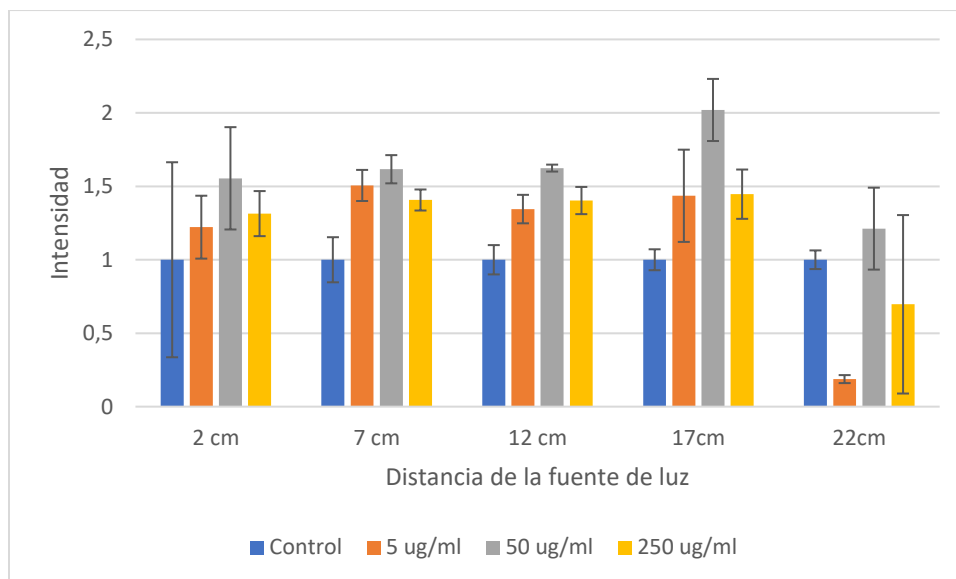


Figura 3.3.1.2.2 Intensidad de fluorescencia producida por cada concentración de CD disueltos en PBS en cada altura del dispositivo.

En la figura 4.2.2 se observa que, tras la irradiación, los pozos en donde hay presencia de CD se emite una intensidad de fluorescencia mayor con respecto al control, independientemente de la concentración. Siendo la intensidad directamente proporcional a las ROS producidas, se establece que los CD irradiados si estimulan la formación de ROS.

Se evidencia que, con la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hay mayor fluorescencia que la emitida cuando la concentración es de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, al aumentar la concentración de CD a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la intensidad baja hasta niveles similares a los emitidos con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este comportamiento observado se puede presentar debido a que, al aumentar la concentración de CD, en este caso a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la solución se satura y los fotones irradiados favorecen otros procesos de transferencia de energía no radiativos, como, por ejemplo, la disipación de calor. Este comportamiento de tendencia no lineal en los procesos radiativos de fluorescencia es conocido como efecto de quenching.

Este comportamiento no lineal presenta tendencia en todas las distancias menores o iguales a 17cm, permitiendo estimar que la mayor producción de ROS se da cuando la concentración de CD es de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Adicionalmente, el valor más alto de intensidad con esta concentración se presenta cuando la placa se encuentra a 17cm de distancia de la fuente de irradiación.

La fluorescencia dada en la distancia más lejana de la fuente de luz (22cm), muestra un comportamiento anormal con respecto a la tendencia de las otras distancias. Esto se puede explicar por el fenómeno de difracción de la luz, el cual se extiende en el espacio definido por la apertura de irradiación de los LED, causando que los fotones presenten interferencia y no se distribuyan de manera homogénea en los pozos de la placa de cultivo. Sin embargo, es recomendable realizar nuevamente las mediciones de fluorescencia, con las mismas condiciones

experimentales, para descartar algún otro factor que haya interferido y corroborar la razón del rompimiento de la tendencia.

Debido a que el dispositivo fue planteado para irradiar líneas celulares en placas de cultivo, se procede a realizar una experimentación preliminar en medio de cultivo celular. Esto manteniendo las condiciones que se tuvieron en cuenta para la experimentación en PBS (figura 4.2.3). Los resultados de esta prueba se reportan en la figura 4.2.4.

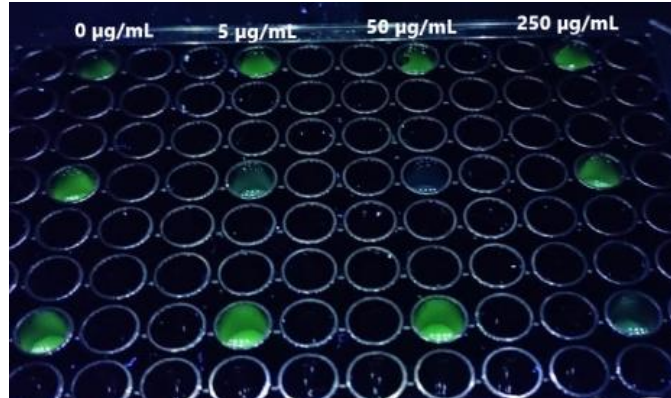


Figura 4.2.3 Placa de cultivo celular con la solución CD-sonda en medio de cultivo celular emitiendo fluorescencia al ser irradiada a 365nm con la fuente de luz UV del dispositivo.

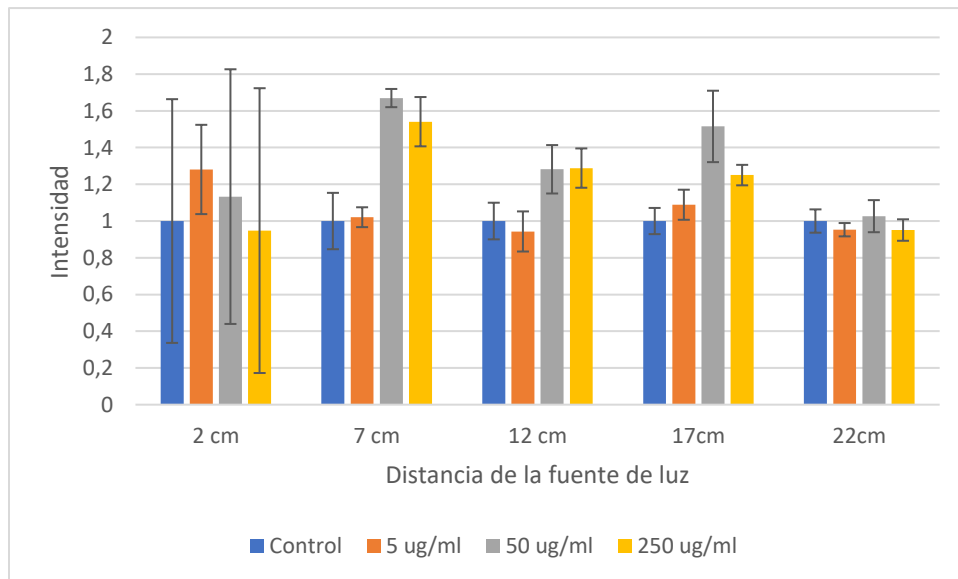


Figura 4.2.4 Intensidad de fluorescencia producida en cada altura del dispositivo para cada concentración de CD disueltos en medio de cultivo celular.

Al analizar la gráfica 4.2.4, se puede observar que el comportamiento de la fluorescencia es similar al presentado en la condición experimental con PBS, ya que, también presenta el efecto

de quenching en la concentración de 250µg/mL y la mayor producción de ROS se da cuando la concentración de CD es de 50 µg/mL.

No obstante, cuando la distancia entre la fuente de irradiación y la placa de cultivo es de 2cm, la concentración de 5 µg/mL reporta la mayor intensidad de fluorescencia entre todas las concentraciones. Este rompimiento en la tendencia de comportamiento y la alta desviación estándar de las mediciones se puede atribuir a que, a esta distancia, la cercanía existente posiblemente provoca que los haces de luz incidentes, por la velocidad a la que viajan, reboten al hacer contacto con los pozos de la placa de cultivo y exista mayor reflejo de fluorescencia por su difracción.

Por otra parte, la fluorescencia reportada en la distancia más lejana de la fuente de luz (22cm), a diferencia que en PBS, muestra un comportamiento igual a la tendencia de las otras distancias. Al analizar los posibles motivos de esta diferencia, se encuentra que, el medio de cultivo celular tiene como componente un indicador de pH dado por el rojo fenol. Este componente presenta un espectro de absorbancia entre los 350 y 600nm con picos diferentes a lo largo de dicha banda dependiendo del nivel de pH en el que se encuentre (figura 4.2.5. B.) [62].

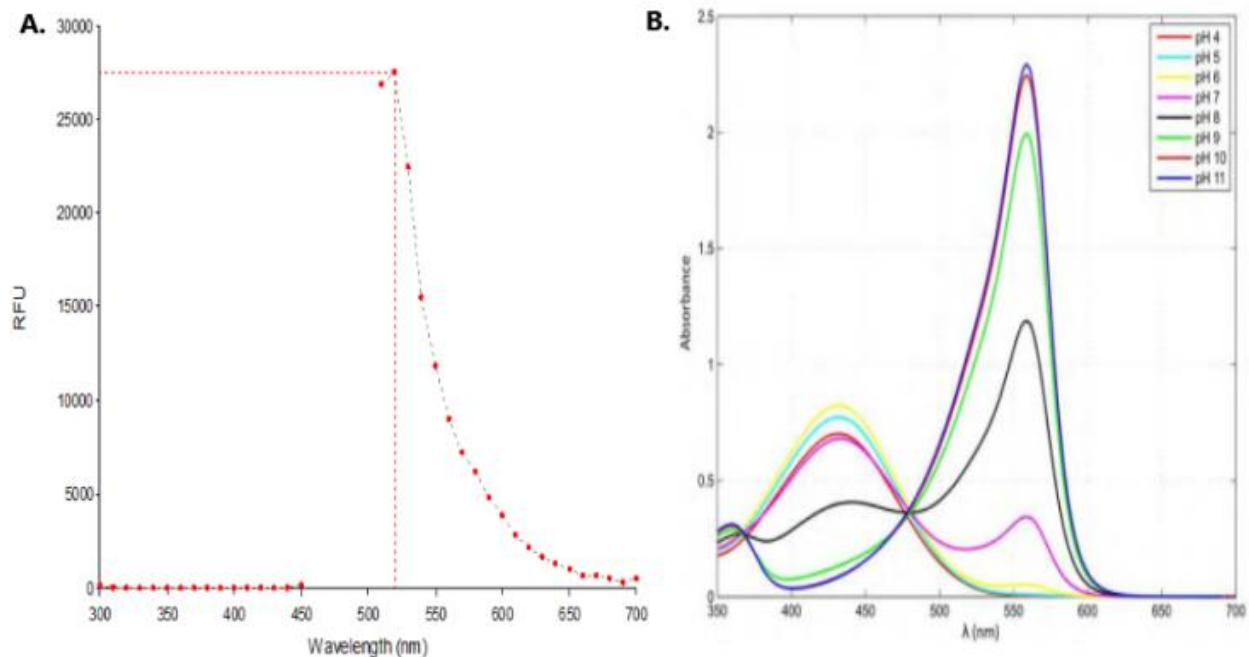


Figura 4.2.5 **A.** Espectro de emisión de fluorescencia del rojo fenol obtenido con el lector multimodal Cytation™ 3 (Biotek) **B.** Espectro de absorbancia del rojo fenol a diferentes niveles de pH [62].

Para corroborar si este componente si está emitiendo fluorescencia en la experimentación, se midió el espectro de emisión de fluorescencia de la solución compuesta por medio de cultivo y PBS sin sonda ni CD, en relación 1:1, en el lector multimodal Cytation™ 3 (Biotek) con 480nm de excitación. El espectro medido se observa en la figura 4.2.5. A.

Se puede comprobar que el rojo fenol presenta absorbancia cuando es excitado a 480nm y posteriormente emite fluorescencia a 530nm. Por tanto, la intensidad de fluorescencia medida para la condición experimental que incluye el medio de cultivo celular está mostrando tanto la fluorescencia de la sonda oxidada como la del rojo fenol. Para corregir esta superposición de fluorescencias, es importante corregir los valores obtenidos con un valor blanco que correspondería a la fluorescencia del medio de cultivo celular sin CD ni sonda o utilizando un medio de cultivo que no contenga rojo fenol.

Con respecto al trabajo de Rueda Parra [21], en el cual la cuantificación de ROS no fue concluyente debido a las condiciones experimentales (uso de una sola lámpara UV a 365nm para irradiar toda la placa de cultivo a una distancia de a 20cm (figura 4.2.6)), se concluye que el dispositivo diseñado disminuye el área de difracción de la luz debido al uso de un LED por cada pozo utilizado, elimina posibles interferencias externas de luz al presentar un ambiente completamente cerrado y permite obtener señal de intensidad de fluorescencia para la estimación de producción de ROS con una distancia máxima de irradiación de 17cm. Se recomienda usar distancias mayores a 2cm debido a que su alta desviación estándar no permite que las mediciones sean reproducibles.

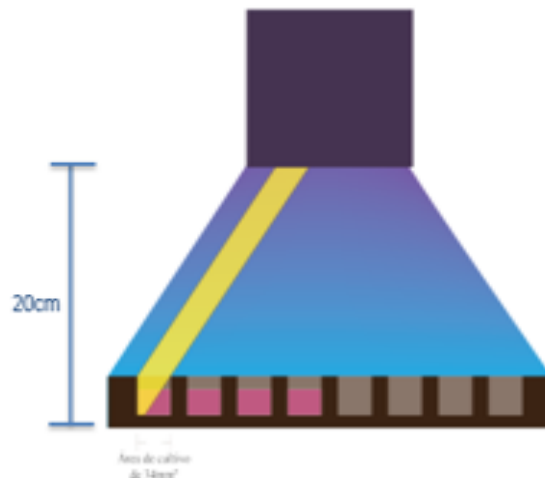


Figura 4.2.6 Lámpara UV irradiando una placa de 96 pozos de cultivo celular. Adaptada de [21].

Capítulo 5

CONCLUSIONES

A partir de la necesidad de implementar un montaje experimental de irradiación ultravioleta que permita obtener mediciones concluyentes de producción de ROS, se diseñó un dispositivo de irradiación cuyas decisiones de diseño eléctrico y estructural, tomadas a partir de los requerimientos técnicos estipulados, fueron efectivas al momento de garantizar el ambiente necesario para la experimentación y seguridad para el usuario. Además, el diseño permite simular el mismo montaje experimental en diferentes distancias de irradiación, lo cual brinda la posibilidad de exploración y comparación de sus resultados para encontrar los parámetros óptimos de experimentación.

Para el proceso de prototipado, el uso del material PLA en la impresión 3D del dispositivo presenta ventajas de manufactura debido a su baja elongación, lo cual conlleva a menor desperdicio del material y mayor exactitud con las medidas establecidas en los planos CAD. De la misma manera, sus propiedades mecánicas de resistencia química y resistencia a la radiación UV permiten que el dispositivo manufacturado sea fácil de limpiar y esterilizar. El dispositivo completamente ensamblado es verificado en su funcionamiento y su fuente de luz UV es validada a 365nm de longitud de onda.

Del protocolo experimental de evaluación, se concluye que el dispositivo diseñado disminuye el área de difracción de la luz debido al uso de un LED por cada pozo utilizado, elimina posibles interferencias externas de luz al presentar un ambiente completamente cerrado y los rieles dispuestos a diferentes distancias de la fuente de luz permitieron establecer que, a las distancias menores o iguales a 17cm es posible obtener señal de intensidad de fluorescencia para la estimación de producción de ROS. Para distancias mayores a 17cm los LED se comportan como una fuente de luz con foco no coherente debido a la interferencia de emisión lumínica entre ellos. Esta variable se puede controlar implementando un sistema de lentes focales en la fuente de luz que mejore su incidencia.

Capítulo 6

RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

En cuanto al dispositivo prototipado, se recomienda enriquecer su diseño en el área de la experiencia del usuario y estética. Esto se puede realizar diseñando una forma de cubrir el módulo regulador de voltaje que no cubra el LED rojo y que permita la fijación del switch para mayor accesibilidad del usuario, además de proteger el módulo de daños ocasionados por el ambiente y evitar que el sistema de entrada de corriente se vea afectado. Se propone crear un sistema de canales en el estante o implementar un sistema de lentes focales, que evite la interferencia de luz entre los LED, individualizando aún más la fuente de luz asegurando que cada LED irradia solamente a un pozo. Adicionalmente, introducir un método de alerta que avise al usuario cuando está fallando solamente un LED.

Para complementar el estudio realizado de cuantificación de ROS, a corto plazo se recomienda realizar nuevamente las mediciones en medio de cultivo celular corrigiendo los valores obtenidos con un valor blanco, este correspondería a la fluorescencia del medio de cultivo celular sin CD ni sonda. También se propone utilizar un medio de cultivo sin rojo fenol. A posteriori realizar un estudio estadístico que permita evaluar si los resultados obtenidos de concentración de ROS, en PBS y medio de cultivo celular, son significativos.

A mediano y largo plazo, se plantea evaluar la biocompatibilidad de otros puntos de carbono diferentes a los sintetizados en este trabajo, que tengan un espectro de absorción que incluya en su rango 365nm de longitud de onda. Posteriormente, realizar la cuantificación de ROS en diferentes líneas celulares para que, finalmente, se pueda continuar con la creación de una nanoplataforma basada en puntos de carbono como potencial agente fotosensibilizante. Asimismo, se podría explorar otras longitudes de onda de excitación como la luz infrarroja (IR).

Bibliografía

- [1] “Terapia fotodinámica.” <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/radioterapia/terapia-fotodinamica.html> (accessed Oct. 21, 2022).
- [2] A. C.-H. Chen, Y.-Y. Huang, P. R. Arany, and M. R. Hamblin, “Role of reactive oxygen species in low level light therapy,” *Mechanisms for Low-Light Therapy IV*, vol. 7165, p. 716502, Feb. 2009, doi: 10.1117/12.814890.
- [3] B. Li, S. Zhao, L. Huang, Q. Wang, J. Xiao, and M. Lan, “Recent advances and prospects of carbon dots in phototherapy,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 408, p. 127245, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.CEJ.2020.127245.
- [4] H. Shi and P. J. Sadler, “How promising is phototherapy for cancer?,” *British Journal of Cancer* 2020 123:6, vol. 123, no. 6, pp. 871–873, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41416-020-0926-3.
- [5] Y. Wan *et al.*, “Conquering the Hypoxia Limitation for Photodynamic Therapy,” *Advanced Materials*, vol. 33, no. 48, p. 2103978, Dec. 2021, doi: 10.1002/ADMA.202103978.
- [6] J. M. Dąbrowski and L. G. Arnaut, “Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment,” *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 14, no. 10, pp. 1765–1780, Sep. 2015, doi: 10.1039/C5PP00132C.
- [7] G. Victoria Roblero-Bartolón, E. Ramón-Gallegos, P. Adolfo López Mateos, E. Ramón-Gallegos Wilfrido Massieu, and esq A. cda Manuel Stampa Zacatenco Del Guatavo Madero, “Use of nanoparticles (NP) in photodynamic therapy (PDT) against cancer GACETA MÉDICA DE MÉXICO REVIEW ARTICLE Correspondence,” p. 151, 2015, Accessed: Jan. 09, 2023. [Online]. Available: www.anmm.org.mx
- [8] S. Y. Lim, W. Shen, and Z. Gao, “Carbon quantum dots and their applications,” *Chem Soc Rev*, vol. 44, no. 1, pp. 362–381, Dec. 2014, doi: 10.1039/C4CS00269E.
- [9] “¿Qué es el cáncer? - NCI.” <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> (accessed Oct. 21, 2022).
- [10] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [11] J. Ferlay *et al.*, “Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods,” *Int J Cancer*, vol. 144, no. 8, pp. 1941–1953, Apr. 2019, doi: 10.1002/ijc.31937.
- [12] “Incidencia del cáncer se redujo en los últimos 3 años.” <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Incidencia-del-cancer-se-redujo-en-los-ultimos-3-anos.aspx> (accessed Oct. 21, 2022).
- [13] “33 mil personas al año mueren de Cáncer en Colombia.” <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/33-mil-personas-al-a%C3%B1o-mueren-de-C%C3%A1ncer-en-Colombia.aspx> (accessed Oct. 21, 2022).
- [14] J. Zhai, H. Yang, Z. Wang, Y. Li, and C. Ning, “Multifunctional nanomaterials-enhanced synergistic sono-phototherapy: Breaking the limitation of monotherapy,” *Smart Mater Med*, vol. 3, pp. 315–328, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.SMAIM.2022.03.002.

- [15] J. Villarreal *et al.*, “Lámpara de Fototerapia LED de elaboración propia y su uso para el tratamiento de ictericia, comparada con otras tecnologías,” *Maskay*, vol. 10, no. 1, pp. 38–43, Dec. 2020, doi: 10.24133/MASKAY.V10I1.1473.
- [16] M. Lan *et al.*, “Carbon Dots as Multifunctional Phototheranostic Agents for Photoacoustic/Fluorescence Imaging and Photothermal/Photodynamic Synergistic Cancer Therapy,” *Adv Ther (Weinh)*, vol. 1, no. 6, p. 1800077, Oct. 2018, doi: 10.1002/ADTP.201800077.
- [17] S. Zhao *et al.*, “Lysosome-targetable carbon dots for highly efficient photothermal/photodynamic synergistic cancer therapy and photoacoustic/two-photon excited fluorescence imaging,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 388, p. 124212, May 2020, doi: 10.1016/J.CEJ.2020.124212.
- [18] X. Li, S. Zhao, B. Li, K. Yang, M. Lan, and L. Zeng, “Advances and perspectives in carbon dot-based fluorescent probes: Mechanism, and application,” *Coord Chem Rev*, vol. 431, p. 213686, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.CCR.2020.213686.
- [19] P. Namdari, B. Negahdari, and A. Eatemadi, “Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 87, pp. 209–222, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2016.12.108.
- [20] A. Alaghmandfar *et al.*, “Recent advances in the modification of carbon-based quantum dots for biomedical applications,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 120, p. 111756, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.MSEC.2020.111756.
- [21] C. A. Rueda Parra, “Evaluación de las propiedades fotodinámicas de puntos de carbono sintetizados a partir de isoleucina y ácido cítrico como posible agente fototerapéutico,” Universidad del Rosario - Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, Bogotá DC, 2022.
- [22] B. Geng *et al.*, “Near-infrared phosphorescent carbon dots for sonodynamic precision tumor therapy,” *Nature Communications 2022 13:1*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, Sep. 2022, doi: 10.1038/S41467-022-33474-8.
- [23] H. Wu, L. F. Pang, M. J. Fu, X. F. Guo, and H. Wang, “Boron and nitrogen codoped carbon dots as fluorescence sensor for Fe³⁺ with improved selectivity,” *J Pharm Biomed Anal*, vol. 180, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.JPBA.2019.113052.
- [24] S. Dugam, S. Nangare, P. Patil, and N. Jadhav, “Carbon dots: A novel trend in pharmaceutical applications,” *Ann Pharm Fr*, vol. 79, no. 4, pp. 335–345, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.PHARMA.2020.12.002.
- [25] B. bin Chen, M. L. Liu, C. M. Li, and C. Z. Huang, “Fluorescent carbon dots functionalization,” *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 270, pp. 165–190, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.CIS.2019.06.008.
- [26] S. Sagbas and N. Sahiner, “Carbon dots: Preparation, properties, and application,” *Nanocarbon and its Composites: Preparation, Properties and Applications*, pp. 651–676, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-08-102509-3.00022-5.
- [27] R. M. El-Shabasy, M. F. Elsadek, B. M. Ahmed, M. F. Farahat, K. M. Mosleh, and M. M. Taher, “Recent Developments in Carbon Quantum Dots: Properties, Fabrication Techniques, and Bio-Applications,” *Processes 2021, Vol. 9, Page 388*, vol. 9, no. 2, p. 388, Feb. 2021, doi: 10.3390/PR9020388.
- [28] D. R. Hernández Espinosa *et al.*, “El papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas,” *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, vol. 62, no. 3, pp. 6–19, May 2019, doi: 10.22201/FM.24484865E.2019.62.3.03.

- [29] E. C. Cheung and K. H. Vousden, “The role of ROS in tumour development and progression,” *Nature Reviews Cancer* 2022 22:5, vol. 22, no. 5, pp. 280–297, Jan. 2022, doi: 10.1038/s41568-021-00435-0.
- [30] D. Wang *et al.*, “Phototherapy and optical waveguides for the treatment of infection,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 179, p. 114036, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.ADDR.2021.114036.
- [31] P. Koutsogiannis, E. Thomou, H. Stamatis, D. Gournis, and P. Rudolf, “Advances in fluorescent carbon dots for biomedical applications,” *Adv Phys X*, vol. 5, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1080/23746149.2020.1758592.
- [32] K. O. Boakye-Yiadom *et al.*, “Carbon dots: Applications in bioimaging and theranostics,” *Int J Pharm*, vol. 564, pp. 308–317, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2019.04.055.
- [33] “Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo.” https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091 (accessed Oct. 31, 2022).
- [34] L. Meñaca-Guerrero, A. Suarez-Causado, A. J. Díaz-Caballero, L. Meñaca-Guerrero, A. Suarez-Causado, and A. J. Díaz-Caballero, “Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y su relación con la destrucción tisular en periodontitis,” *CES Odontol*, vol. 33, no. 2, pp. 112–127, Dec. 2020, doi: 10.21615/CESODON.33.2.10.
- [35] Y. Yang *et al.*, “Switching the NIR upconversion of nanoparticles for the orthogonal activation of photoacoustic imaging and phototherapy,” *Nature Communications* 2022 13:1, vol. 13, no. 1, pp. 1–11, Jun. 2022, doi: 10.1038/S41467-022-30713-W.
- [36] Y. Wang *et al.*, “Dually enhanced phototherapy by gambogic acid and hyperthermia-activated chemotherapy for synergistic breast cancer treatment,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 452, p. 139108, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.CEJ.2022.139108.
- [37] Q. Sun *et al.*, “Phototherapy and anti-GITR antibody-based therapy synergistically reinvigorate immunogenic cell death and reject established cancers,” *Biomaterials*, vol. 269, p. 120648, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.120648.
- [38] H. Cho *et al.*, “Photochemical reaction to increase melanogenesis using *Buddleja officinalis* and blue light-emitting diode irradiation in B16F10,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 35, p. 102456, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.PDPDT.2021.102456.
- [39] Y. Du, J. Sun, Z. Tian, Y. Cheng, and C. an Long, “Effect of blue light treatments on *Geotrichum citri-aurantii* and the corresponding physiological mechanisms of citrus,” *Food Control*, vol. 145, p. 109468, Mar. 2023, doi: 10.1016/J.FOODCONT.2022.109468.
- [40] M. Shao, W. Liu, C. Zhou, Q. Wang, and B. Li, “Alternation of temporally overlapped red and blue light under continuous irradiation affected yield, antioxidant capacity and nutritional quality of purple-leaf lettuce,” *Sci Hort*, vol. 295, p. 110864, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.SCIENTA.2021.110864.
- [41] E. K. Ozkaya, G. Anderson, B. Dhillon, and P. O. Bagnaninchi, “Blue-light induced breakdown of barrier function on human retinal epithelial cells is mediated by PKC- ζ over-activation and oxidative stress,” *Exp Eye Res*, vol. 189, p. 107817, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.EXER.2019.107817.
- [42] S. Omri *et al.*, “PKC ζ Mediates Breakdown of Outer Blood-Retinal Barriers in Diabetic Retinopathy,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e81600, Nov. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0081600.

- [43] I. Jaadane *et al.*, “The activation of the atypical PKC zeta in light-induced retinal degeneration and its involvement in L-DNase II control,” *J Cell Mol Med*, vol. 19, no. 7, pp. 1646–1655, Jul. 2015, doi: 10.1111/JCMM.12539.
- [44] “Incubadora LED, Wuhan Ruihua Instrument Equipment Co., Ltd.” <http://www.ruihua.cn/Page/PList.aspx?Cid=47&Page=1> (accessed Jan. 10, 2023).
- [45] A. Aimar, A. Palermo, and B. Innocenti, “The Role of 3D Printing in Medical Applications: A State of the Art,” *J Healthc Eng*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/5340616.
- [46] J. Zhu, Q. Zhang, T. Yang, Y. Liu, and R. Liu, “3D printing of multi-scalable structures via high penetration near-infrared photopolymerization,” *Nature Communications 2020 11:1*, vol. 11, no. 1, pp. 1–7, Jul. 2020, doi: 10.1038/S41467-020-17251-Z.
- [47] D. A. J. Brion and S. W. Pattinson, “Generalisable 3D printing error detection and correction via multi-head neural networks,” *Nature Communications 2022 13:1*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, Aug. 2022, doi: 10.1038/S41467-022-31985-Y.
- [48] W. Jamróz, J. Szafraniec, M. Kurek, and R. Jachowicz, “3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges,” *Pharm Res*, vol. 35, no. 9, pp. 1–22, Sep. 2018, doi: 10.1007/S11095-018-2454-X/FIGURES/11.
- [49] R. Casati, J. Lemke, and M. Vedani, “Microstructure and Fracture Behavior of 316L Austenitic Stainless Steel Produced by Selective Laser Melting,” *J Mater Sci Technol*, vol. 32, no. 8, pp. 738–744, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.JMST.2016.06.016.
- [50] T. Özel, A. Altay, B. Kaftanoglu, R. Leach, N. Senin, and A. Donmez, “Focus variation measurement and prediction of surface texture parameters using machine learning in laser powder bed fusion,” *Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME*, vol. 142, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1115/1.4045415.
- [51] M. Ziaee and N. B. Crane, “Binder jetting: A review of process, materials, and methods,” *Addit Manuf*, vol. 28, pp. 781–801, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.ADDMA.2019.05.031.
- [52] M. Sadaf, M. Bragaglia, and F. Nanni, “A simple route for additive manufacturing of 316L stainless steel via Fused Filament Fabrication,” *J Manuf Process*, vol. 67, pp. 141–150, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.JMAPRO.2021.04.055.
- [53] S. C. Altıparmak, V. A. Yardley, Z. Shi, and J. Lin, “Extrusion-based additive manufacturing technologies: State of the art and future perspectives,” *J Manuf Process*, vol. 83, pp. 607–636, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.JMAPRO.2022.09.032.
- [54] F. Burkhardt *et al.*, “Pandemic-Driven Development of a Medical-Grade, Economic and Decentralized Applicable Polyolefin Filament for Additive Fused Filament Fabrication,” *Molecules 2020, Vol. 25, Page 5929*, vol. 25, no. 24, p. 5929, Dec. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25245929.
- [55] S. Farah, D. G. Anderson, and R. Langer, “Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 107, pp. 367–392, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.ADDR.2016.06.012.
- [56] A. Milovanovic *et al.*, “Comparative analysis of printing parameters effect on mechanical properties of natural PLA and advanced PLA-X material,” *Procedia Structural Integrity*, vol. 28, pp. 1963–1968, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.PROSTR.2020.11.019.
- [57] O. Olejnik, A. Masek, and J. Zawadzillo, “Processability and Mechanical Properties of Thermoplastic Polylactide/Polyhydroxybutyrate (PLA/PHB) Bioblends,” *Materials 2021, Vol. 14, Page 898*, vol. 14, no. 4, p. 898, Feb. 2021, doi: 10.3390/MA14040898.

- [58] Cell Biolabs Inc, "OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Green Fluorescence)," p. 9, 2014.
- [59] Invitrogen, "Invitrogen-Molecular Probes Manual: H2DCFDA Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents," *Molecular Probes, invitrogen detection technologies*, pp. 1–5, 2006, [Online]. Available: https://www.idexx.com/pdf/en_us/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf
- [60] M. Perata, "Efectos del Alcohol y la deficiencia de hierro en cultivos de astrocitos," Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay, 2017.
- [61] S. Degiovanni Morales, "Modificación de nanopartículas de hidroxiapatita con puntos de carbono para la fabricación de scaffolds multiescala," Universidad del Rosario - Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, Bogotá DC, 2021. Accessed: Dec. 18, 2022. [Online]. Available: <https://repositorio.escuelaing.edu.co/flip/index.jsp?pdf=/bitstream/handle/001/1525/DegiovanniMorales-Stefania-2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- [62] L. Rovati *et al.*, "Plastic Optical Fiber pH Sensor Using a Sol-Gel Sensing Matrix," *Fiber Optic Sensors*, Feb. 2012, doi: 10.5772/26517.

Anexos

Anexo 1: Obtención del metanol anhidrido

La obtención del metanol anhidrido se logra al secar 20mg de Sulfato de sodio (Na_2SO_4) depositados en una caja de Petri (figura 1 A), introduciéndolo en el horno a $100^{\circ}C$ (figura 1 B), pesándolo cada 15 minutos hasta que su peso no varíe. Esto se realiza para evaporar toda el agua que pueda contener el Na_2SO_4 (figura 1 C). Luego este es disuelto en 1mL de metanol y se almacena a temperatura ambiente durante 24 horas para que el sulfato de sodio absorba el agua que contenga el metanol y así volverlo anhidrido (figura 1 D). Después de las 24 horas se filtra el sobrenadante con una jeringa y filtro de $0.22\mu m$ depositándolo en un eppendorf (figura 1 E).

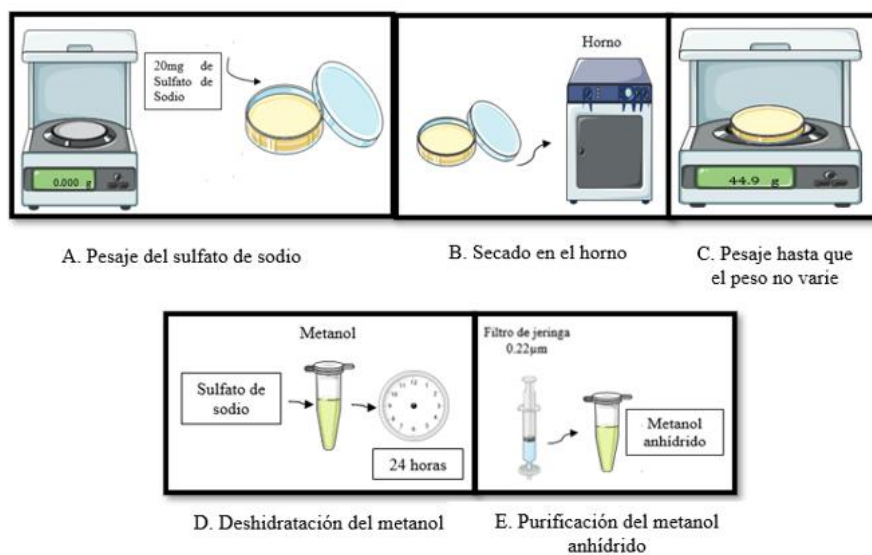


Figura 1. Obtención del metanol anhidrido.