



Universidad del
Rosario

**Protocolo de síntesis de puntos de carbono
con propiedades fluorescentes para la
detección en solución acuosa de L-lactato**

Ing. Jessica D. Sánchez Fonseca
Emma Martín Rodríguez, PhD
Álvaro David Orjuela Cañón, PhD
Oscar Julián Perdomo Charry, PhD
Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD,
INGENIERÍA BIOMÉDICA

15 de junio de 2023

Resumen

Los puntos de carbono (PC) son nanopartículas que poseen propiedades ópticas y fisicoquímicas que llaman la atención para su uso en aplicaciones biomédicas. Un ejemplo de esto es el desarrollo de biosensores ópticos, en donde la respuesta de intensidad de emisión o absorción varía en función de la concentración de un analito específico. El proyecto “Método alternativo para la detección de L-lactato en solución acuosa basado en la fluorescencia de los puntos de carbono” plantea el desarrollo de un biosensor para identificar la presencia de L-lactato a partir de las propiedades ópticas de los PC. El presente protocolo describe el proceso de síntesis de PC con propiedades fluorescentes para la detección en solución acuosa de L-lactato. Inicialmente se explica la síntesis de las nanopartículas por método solvotermal y posteriormente, se presenta la caracterización de sus propiedades ópticas en presencia de los diferentes analitos (Peróxido de hidrógeno y L-lactato,). Los resultados obtenidos a partir del desarrollo del procedimiento confirman la asociación de la variación de intensidad de fluorescencia de los PC con la concentración de los analitos presentes en la detección de L-lactato.

Índice

1. Proyecto relacionado	4
2. Glosario	4
3. Objetivos	5
3.1. General	5
3.2. Específicos	5
4. Metodología	5
4.1. Síntesis de los PC	6
4.2. Propiedades ópticas de los PC	7
4.3. Propiedades ópticas de los PC en presencia de los analitos	7
5. Resultados	7
5.1. Síntesis de los PC	7
5.2. Propiedades ópticas de los PC	9
5.3. Caracterización de los PC en presencia de los analitos	10
6. Protocolo	16
6.1. Síntesis puntos de carbono	16
6.2. Lavado puntos de carbono	17
6.3. Preparación de la muestra	17
7. Aspectos clave	17

Índice de figuras

1.	Producción de H_2O_2 a partir de la oxidación de L-lactato.	4
2.	Pasos en los métodos planteados para la remoción de impurezas de los PC.	6
3.	Espectros de emisión de las pruebas de lavado a diferentes concentraciones (a-c). Área bajo la curva (ABC) de los diferentes métodos utilizados por cada concentración (d).	8
4.	Espectros de emisión del método A, variando la concentración de los PC (a). Área bajo la curva (ABC) del método A variando la concentración de los PC (b).	9
5.	Espectros de emisión variando la longitud de onda de excitación de los PC del método A a una concentración de 0.1 mg/mL.	9
6.	Espectros de absorción y emisión de los PC del método A, variando su concentración en solución acuosa (a, c). Área bajo la curva de los espectros de absorción y emisión de los PC del método A (b, d).	10
7.	Emisión de PC en presencia de H_2O_2 , variando la concentración del analito en SA y PBS (a,c). Emisión de PC en presencia de L-lactato, variando la concentración del analito en SA y PBS (b,d).	11
8.	Área bajo la curva de los PC en presencia de H_2O_2 y L-lactato en solución acuosa (a). Área bajo la curva de los PC en presencia de H_2O_2 y L-lactato en solución PBS (b).	12
9.	Gráfica de la superficie de emisión de PC en presencia de H_2O_2 , variando la concentración del analito en SA y PBS (a,c). Gráfica de la superficie de emisión de PC en presencia de L-lactato, variando la concentración del analito en SA y PBS (b,d).	13
10.	Emisión de PC manteniendo constante 10mM de H_2O_2 , variando la concentración de L-lactato en SA y PBS (a,c). Emisión de PC manteniendo constante 10mM de L-lactato, variando la concentración de H_2O_2 en SA y PBS (b,d).	14
11.	Área bajo la curva de los PC variando los analitos en SA (a). Área bajo la curva de los PC variando los analitos en PBS (b).	15
12.	Gráfica de la superficie de emisión de PC manteniendo constante 10mM de H_2O_2 , variando la concentración de L-lactato en SA y PBS (a,c). Gráfica de la superficie de emisión de PC manteniendo constante 10mM de L-lactato, variando la concentración de H_2O_2 en SA y PBS (b,d).	16

1. Proyecto relacionado

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

El proyecto marco tiene como objetivo general desarrollar un método alternativo para la detección de L-lactato en solución acuosa basado en puntos de carbono y herramientas de visión por computador. El presente protocolo describe el proceso de la síntesis de los PC y como a partir de su fluorescencia se puede identificar la variación de la concentración de los diferentes analitos.

2. Glosario

- **L-lactato:** es un metabolito que se produce a partir del metabolismo anaeróbico de la glucosa, este es metabolizado en el cuerpo humano por medio de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) [1]. En condiciones normales se presenta cuando las células se ven privadas de oxígeno, el organismo está bajo condiciones de actividad extenuante o el proceso de respiración mitocondrial está bloqueado [2,3].
- **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2):** es un compuesto químico, altamente polar y electroquímicamente activo [4]. Este se genera a partir de la oxidación del L-lactato por medio de la enzima lactato oxidasa, la cual cataliza la reacción (figura 1).

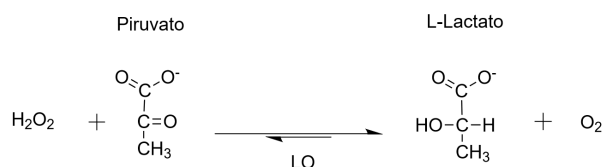


Figura 1: Producción de H_2O_2 a partir de la oxidación de L-lactato.

- **Puntos de carbono (PC):** son nanopartículas de diámetro usualmente inferior a 10 nm, están compuestas de carbono (principalmente de carácter sp^2 y, a veces, sp^3), aunque su estructura final depende de los precursores utilizados para la síntesis [5].
- **Buffer fosfato salino (PBS):** es una solución buffer, utilizada comúnmente para la suspensión y dilución de sustancias químicas o microorganismos [6]. Este presenta un pH de 7.2 y se utiliza en el laboratorio para la preparación de saliva artificial,

además de otros componentes [7].

- **Método solvotermal:** es un procedimiento para la síntesis de nanopartículas, que se basa en la transferencia de calor por conducción. Este método usualmente requiere de un recipiente de presión como el reactor autoclave y tiempos de reacción largos para conseguir la temperatura deseada [8].
- **Modelo polinomial:** Permite predecir una variable cuantitativa a partir de una variable predictora cuantitativa. La relación se modela como una función polinomial, esta permite agregar curvatura al modelo debido a los nuevos predictores que se obtienen al elevar los datos originales a distintas potencias.
- **Adj. R^2 :** El coeficiente de determinación refleja la bondad de ajuste de un modelo a la variable que se quiere describir. Es decir, es un indicador de que tanto se ajusta el modelo a los datos.

3. Objetivos

3.1. General

Desarrollar un protocolo experimental que permita determinar las curvas de calibración de la intensidad de emisión en función de la concentración de peróxido de hidrógeno y L-lactato.

3.2. Específicos

- Sintetizar y caracterizar las propiedades fluorescentes de los puntos de carbono obtenidos por método solvotermal.
- Evaluar las propiedades fluorescentes en solución acuosa y PBS de los puntos de carbono en presencia de peróxido de hidrógeno y L-lactato.
- Determinar las curvas de calibración de la emisión de fluorescencia en función de la concentración de peróxido de hidrógeno y L-lactato.
- Establecer un protocolo de síntesis para determinar la concentración de peróxido de hidrógeno y L-lactato a partir de los resultados obtenidos.

4. Metodología

Para el desarrollo del protocolo se plantearon cuatro etapas, la primera etapa consistió en establecer el proceso de síntesis y remoción de impurezas de los puntos de carbono (PC), a continuación se realizó la caracterización de las propiedades ópticas de las nanopartículas obtenidas y la caracterización de las propiedades fluorescentes en presencia de

peróxido de hidrógeno y L-lactato en solución acuosa y solución buffer. Finalmente, se definió el paso a paso a seguir para el desarrollo del protocolo experimental.

4.1. Síntesis de los PC

Los puntos de carbono (PC) son nanopartículas con propiedades ópticas que varían de acuerdo al método de síntesis y el proceso de remoción de impurezas [9]. Con el objetivo de identificar el procedimiento que permitiera la mayor intensidad de emisión, se planteó la evaluación de diferentes métodos para la remoción de impurezas de los PC, como se observa en la figura 2.

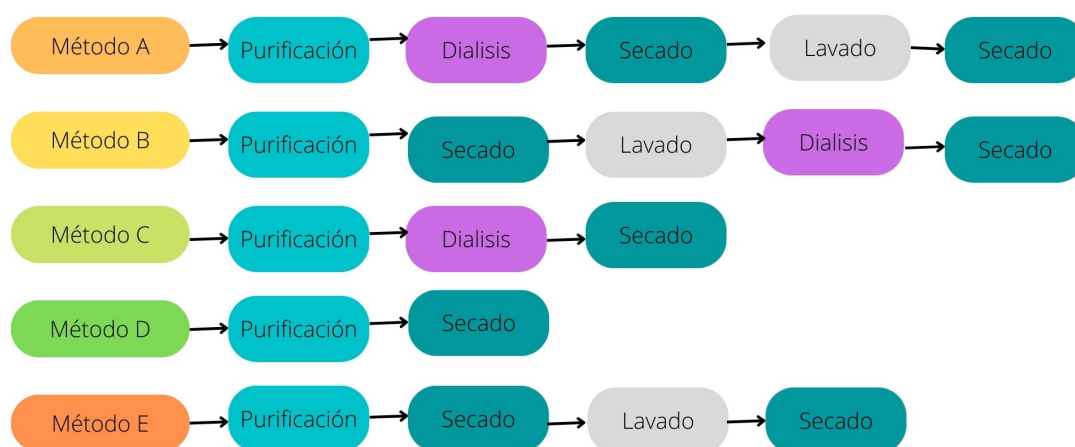


Figura 2: Pasos en los métodos planteados para la remoción de impurezas de los PC.

En general el proceso de síntesis y purificación inicial para todos los métodos fue el mismo. Se realizó la síntesis con el reactor solvotérmico, durante 12 horas a una temperatura de 160°C, teniendo como precursores orgánicos 1 g de ácido cítrico (Scharlau) y 1 g de urea (Sigma-Aldrich). Como solvente se tuvieron 15 mL de formamida (Sigma-Aldrich). Posterior a la síntesis se tuvo la etapa de purificación, para esto se hizo el respectivo proceso de centrifugación y filtrado para minimizar la presencia de productos secundarios y precursores sin reaccionar de diferentes tamaños y perfiles de dispersabilidad [10].

Una vez finalizo el proceso de purificación para los métodos B, D y E, se secaron los PC durante 12 horas. Para los métodos A y C se prosiguió con una etapa de diálisis, con el fin de eliminar pequeñas impurezas por medio de separación de moléculas a base de difusión, una vez se hizo la diálisis se procedió con el secado y lavado para el método A. El proceso de lavado consistió en adicionar etanol y acetona con el fin de eliminar el material insoluble que no contenía PC. Cuando se culminaron las etapas para cada método, se procedió a realizar una caracterización de las propiedades de emisión variando la concentración de los PC (0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 1 mg/mL). Los datos se procesaron

por medio del software MATLAB R2021a, en donde se halló el área bajo la curva de cada espectro de emisión y a partir de los resultados se seleccionó el método de remoción de impurezas.

4.2. Propiedades ópticas de los PC

Se realizó la caracterización de propiedades ópticas, haciendo uso de Espectrofotometría UV-Vis y fluorescencia. En el caso de los espectros de absorción, los datos se obtuvieron por medio del espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES, con el software Ocean View a temperatura ambiente y en un rango de longitud de onda desde 200 nm a 800 nm usando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Por otro lado, las mediciones de emisión inicialmente se tomaron en un Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek) variando la longitud de onda de excitación, con el fin de determinar aquella que produjera una mayor intensidad de emisión en los PC. Una vez definida la longitud de onda de excitación, se procedió a realizar las mediciones del espectro de fluorescencia por medio del espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES, en un rango de longitud de onda de 200 nm a 800 nm, haciendo uso un LED con la longitud de onda establecida en el paso anterior.

Los datos obtenidos de los espectros fueron tratados con el software MATLAB R2021a para obtener las gráficas de absorción y emisión en función de la longitud de onda y ver el comportamiento del área bajo la curva de los espectros en función de la concentración de puntos de carbono.

4.3. Propiedades ópticas de los PC en presencia de los analitos

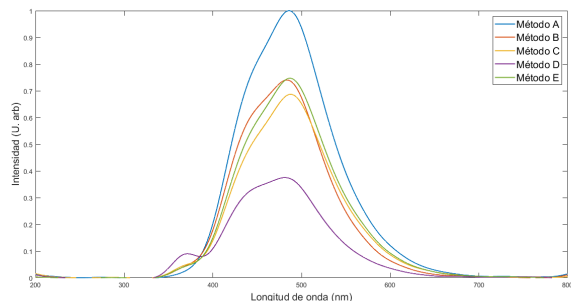
Primero se evaluaron los cambios de intensidad de la fluorescencia en presencia del peróxido de hidrógeno y L-lactato en solución acuosa y en solución buffer, se variaron las concentraciones de los analitos de 0mM a 45 mM. Luego, se mantuvo constante el peróxido de hidrógeno a 10mM y se varió la concentración de L-lactato entre 0 % y 200 % de 10mM, esto se realizó en solución acuosa y solución buffer. El procedimiento se repitió, manteniendo constante el L-lactato y variando la concentración de peróxido de hidrógeno. Los espectros se obtuvieron por medio del espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES, en un rango de longitud de onda de 200 nm a 800 nm, los datos se procesaron por medio del software MATLAB R2021a. Finalmente, con los datos adquiridos se construyeron curvas de calibración haciendo uso del área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia de los puntos de carbono en función de la concentración de los analitos.

5. Resultados

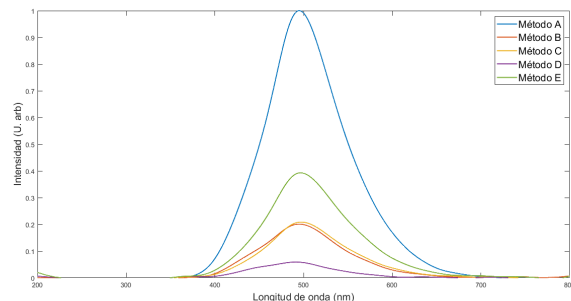
5.1. Síntesis de los PC

En las figuras 3 (a, b, c) se presentan los espectros de emisión a una concentración constante y variando el método de remoción de impurezas. En la figura 3(d) se puede

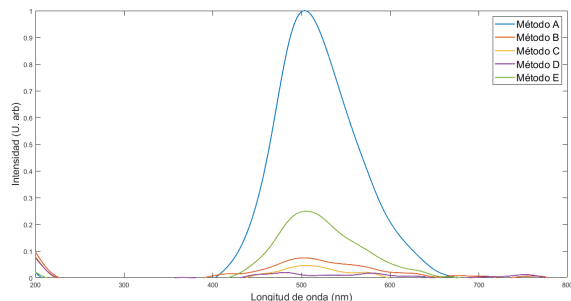
observar el área bajo la curva de cada método en las diferentes concentraciones. En general se obtuvo un área bajo la curva mayor para el método A en comparación con los otros métodos, el método cuya área fue menor en general fue el D, comprobando que las propiedades ópticas de los PC varían de acuerdo al método de remoción de impurezas.



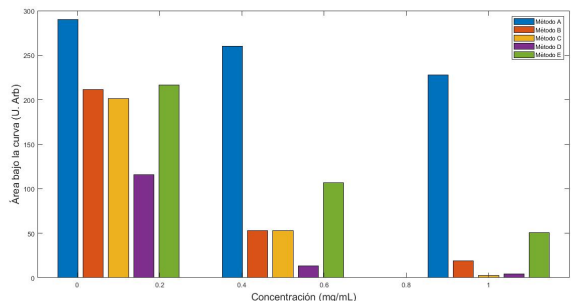
(a) PC a 0.1 mg/mL



(b) PC a 0.5 mg/mL



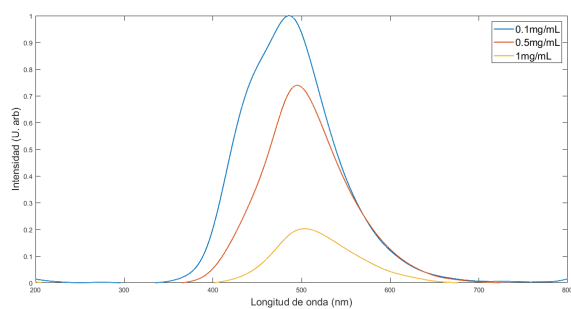
(c) PC a 1 mg/mL



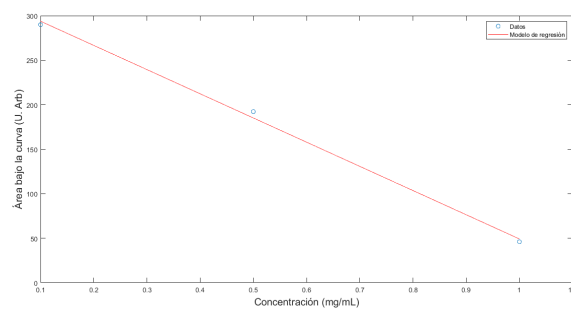
(d) ABC

Figura 3: Espectros de emisión de las pruebas de lavado a diferentes concentraciones (a-c). Área bajo la curva (ABC) de los diferentes métodos utilizados por cada concentración (d).

A partir de los resultados obtenidos se decide establecer como método de remoción de impurezas para el trabajo el A, por ser el que mayor intensidad de emisión presenta en comparación con los otros. En la figura 4(a) se pueden observar los espectros de emisión variando su concentración en solución acuosa. Por otro lado en la figura 4(b) se puede observar el área bajo la curva de cada uno de estos espectros. Se observa que a medida que aumenta la concentración disminuye el área bajo la curva de emisión.



(a) Método A



(b) ABC método A

Figura 4: Espectros de emisión del método A, variando la concentración de los PC (a). Área bajo la curva (ABC) del método A variando la concentración de los PC (b).

5.2. Propiedades ópticas de los PC

En la figura 5 se observan los espectros de emisión variando la longitud de onda de excitación. Se obtuvo que la mayor intensidad de emisión se presenta entre los 365 nm y 375 nm, es así que se decide usar un LED de 365 nm para irradiar las muestras y caracterizar la emisión de los PC.

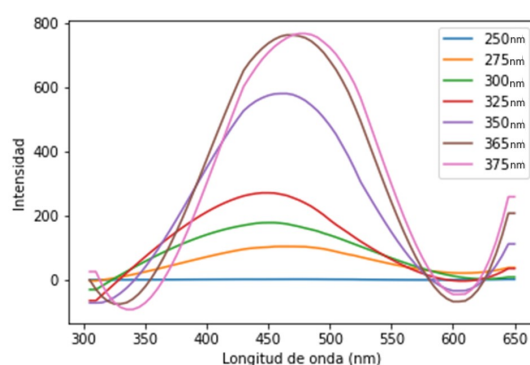


Figura 5: Espectros de emisión variando la longitud de onda de excitación de los PC del método A a una concentración de 0.1 mg/mL.

En el análisis de las propiedades ópticas se variaron las concentraciones de los PC de 0.01 mg/mL a 0.1 mg/mL, dispersas en agua. En la figura 6 se muestran los espectros y áreas bajo la curva de absorción y emisión de los PC. Se evidenciaron bandas de absorción entre los 200 nm y 300 nm, los cuales se atribuyen a las transiciones electrónicas $\pi-\pi^*$, relacionadas al enlace $-C=C$ y bandas entre los 300 nm y 400 nm dadas por las transiciones $n-\pi^*$, relacionadas a los grupos funcionales basados en nitrógeno. Por otro lado, en emisión se observan bandas fluorescentes entre los 400 nm y 600 nm, en donde los puntos máximos se presentan aproximadamente en los 500 nm.

Con el fin de estudiar los comportamientos de absorción y emisión en función de la concentración de los PC, se realizaron curvas de calibración hallando el área bajo la curva

de cada uno. En cuanto a la absorción se observó una tendencia lineal con un R^2 del 0.96 lo que implica que hay un ajuste lineal que explica la variación de la absorbancia en función de la concentración de PC. Por otro lado, en la emisión se encontró que tiene un comportamiento cuadrático, el modelo presenta un R^2 del 0.99. Este comportamiento puede explicarse a partir del fenómeno de inhibición por agregados (aggregation-caused quenching ACQ) [9].

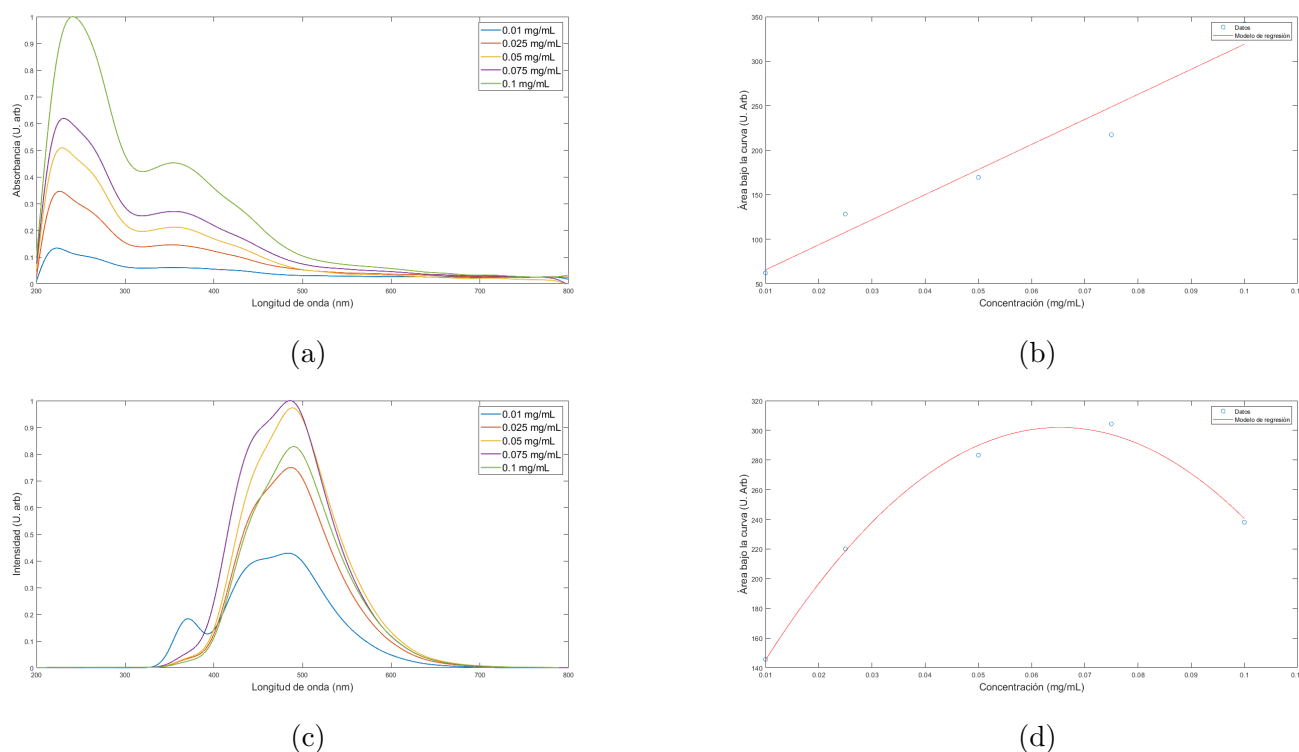
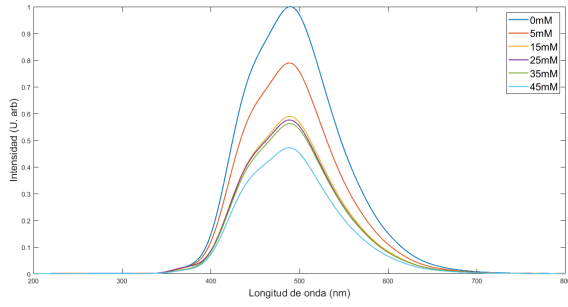


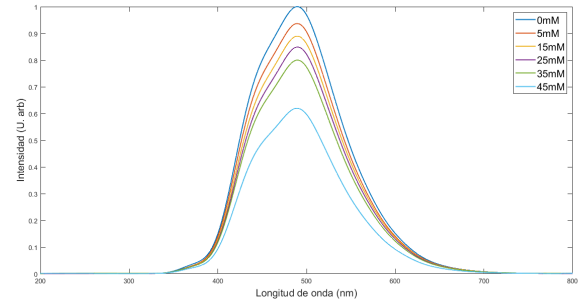
Figura 6: Espectros de absorción y emisión de los PC del método A, variando su concentración en solución acuosa (a, c). Área bajo la curva de los espectros de absorción y emisión de los PC del método A (b, d).

5.3. Caracterización de los PC en presencia de los analitos

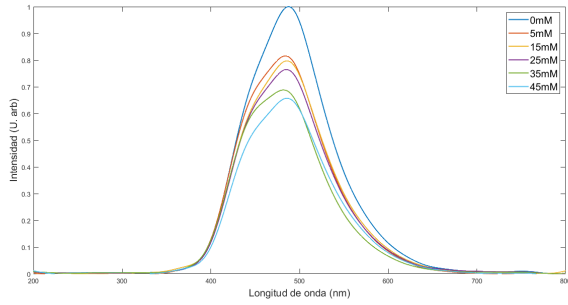
Para las pruebas en presencia de H_2O_2 y L-lactato se mantuvo constante la concentración de PC en 0.75 mg/mL y se fue variando la concentración de los analitos en solución acuosa y PBS. En la figura 7 se observan los espectros de emisión de las concentraciones 0 mM, 5 mM, 15 mM, 25 mM, 35 mM y 45 mM. Se muestra como a medida que aumenta la concentración de H_2O_2 y L-lactato disminuye la intensidad de emisión en la solución bajo una irradiación de 365 nm. En general se observan bandas fluorescentes entre los 400 nm y 600 nm, las mismas que se observaron en ausencia de los analitos (figura 6-c).



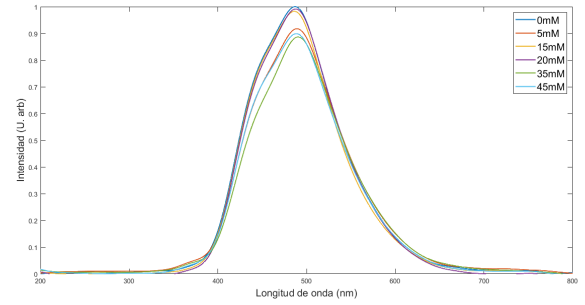
(a) H_2O_2 en SA



(b) L-lactato en SA



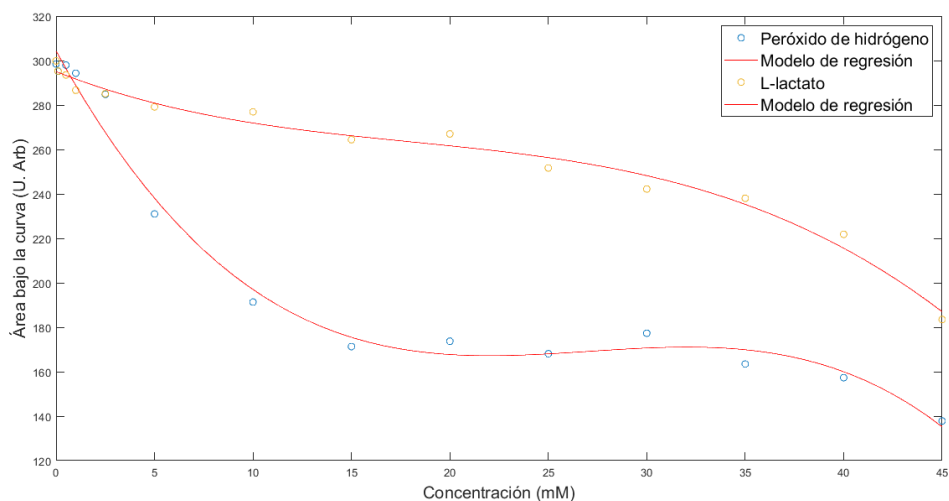
(c) H_2O_2 en PBS



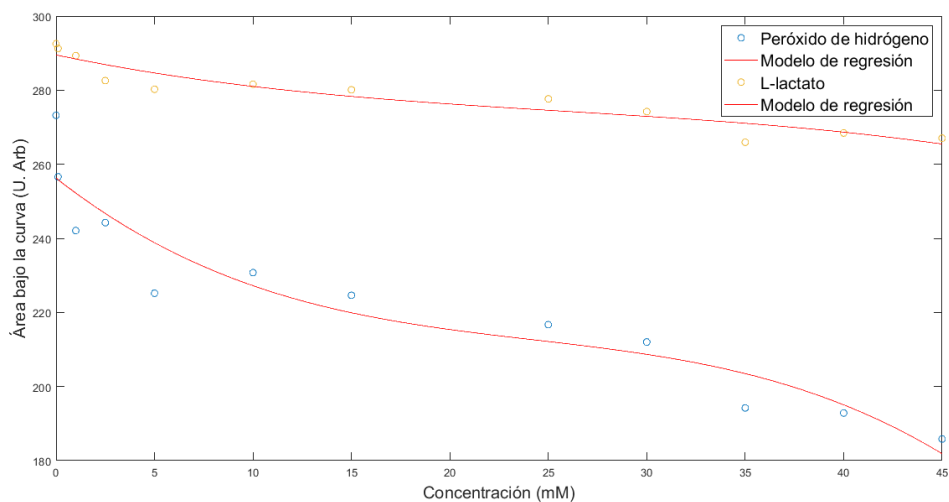
(d) L-lactato en PBS

Figura 7: Emisión de PC en presencia de H_2O_2 , variando la concentración del analito en SA y PBS (a,c). Emisión de PC en presencia de L-lactato, variando la concentración del analito en SA y PBS (b,d).

Con el fin de determinar el modelo que mejor describe el comportamiento de la intensidad de emisión, se halló el área bajo la curva de cada espectro y se utilizaron modelos de ajuste polinomial para describir la intensidad de emisión en función de la concentración de los analitos, como se observa en la figura 8. En general los PC presentan una disminución de área bajo la curva de la intensidad de emisión en presencia de H_2O_2 y L-lactato en SA y PBS. Además, se halló el R^2 de cada uno de los modelos, para identificar que tan bien se ajustan a los datos, estos pueden observarse en la tabla 1. Aquellos modelos que presentan un mayor ajuste a los datos son los de H_2O_2 y L-lactato que están en solución acuosa.



(a) SA



(b) PBS

Figura 8: Área bajo la curva de los PC en presencia de H_2O_2 y L-lactato en solución acuosa (a). Área bajo la curva de los PC en presencia de H_2O_2 y L-lactato en solución PBS (b).

Cuadro 1: Valores de R^2 de los modelos polinomiales encontrados para las áreas bajo la curva de los PC en presencia de los analitos.

PC	R^2	Modelo polinomial
H_2O_2 en SA	0.987	$-0.007x^3 + 0,619x^2 - 16x + 304$
H_2O_2 en PBS	0.902	$-0.002x^3 + 0,144x^2 - 3,494x + 295$
L-lactato en SA	0.983	$-0.002x^3 + 0,146x^2 - 4,16x + 256$
L-lactato en PBS	0.895	$-0.003x^3 + 0,03x^2 - x + 289$

Para observar como es el comportamiento de los espectros en función de la longitud de onda y la concentración de los analitos se realizaron gráficos de superficie de los datos

(figure 9). En la parte derecha de las gráficas se evidencia la escala de colores utilizada, en donde 1 es la mayor intensidad de emisión que se puede presentar en los datos. Las graficas que presentan un mayor comportamiento de disminución de intensidad en función de la concentración son las de los PC en presencia del H_2O_2 .

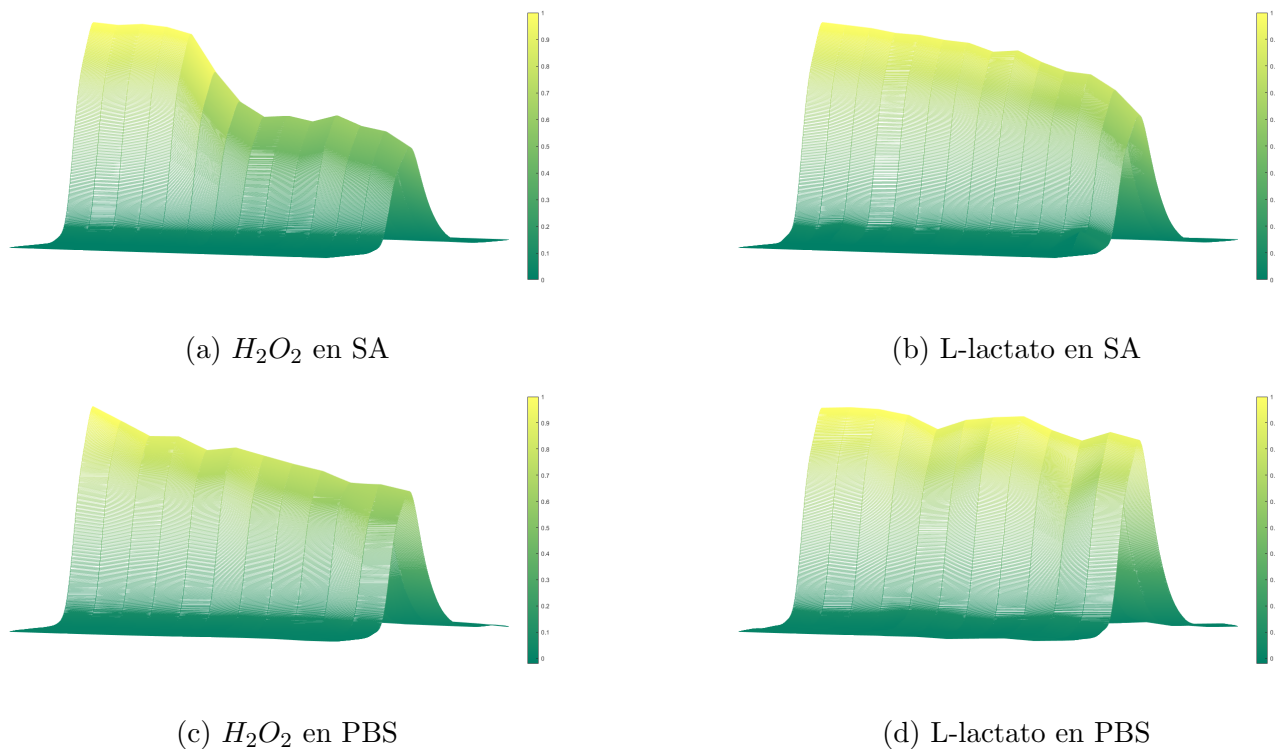
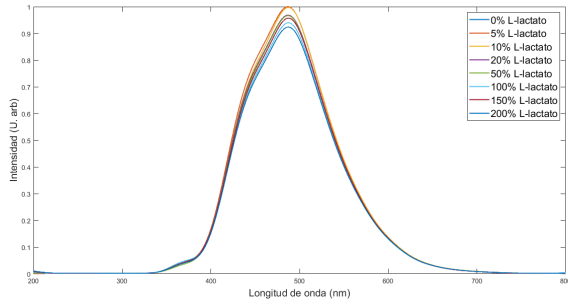
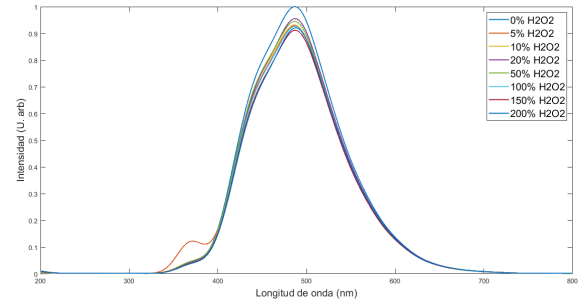


Figura 9: Gráfica de la superficie de emisión de PC en presencia de H_2O_2 , variando la concentración del analito en SA y PBS (a,c). Gráfica de la superficie de emisión de PC en presencia de L-lactato, variando la concentración del analito en SA y PBS (b,d).

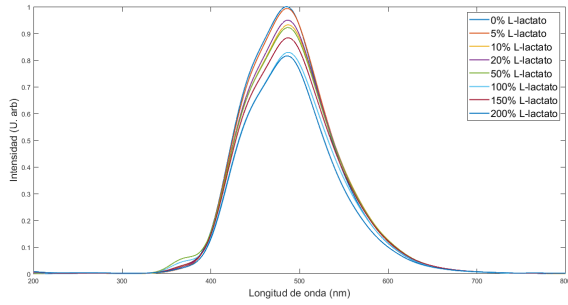
Una vez se realizó la caracterización de los PC en presencia de los analitos, se procedió a estudiar como variando un analito se afectaba la intensidad de emisión del otro manteniéndolo constante. Inicialmente se mantuvo el H_2O_2 a 10 mM y se variaron concentraciones de L-lactato (0% a 200% de 10 mM) en SA y PBS (figura 10 a-c). Así mismo, se tomaron los datos manteniendo el L-lactato en 10 mM, variando la concentración de H_2O_2 (0% a 200% de 10 mM) en SA y PBS (figura 10 b-d). En general se observa una disminución en la intensidad de emisión al variar los analitos.



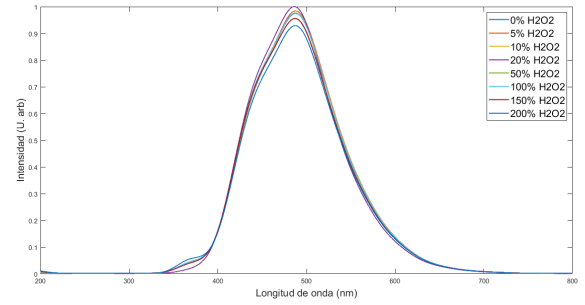
(a) SA



(b) SA



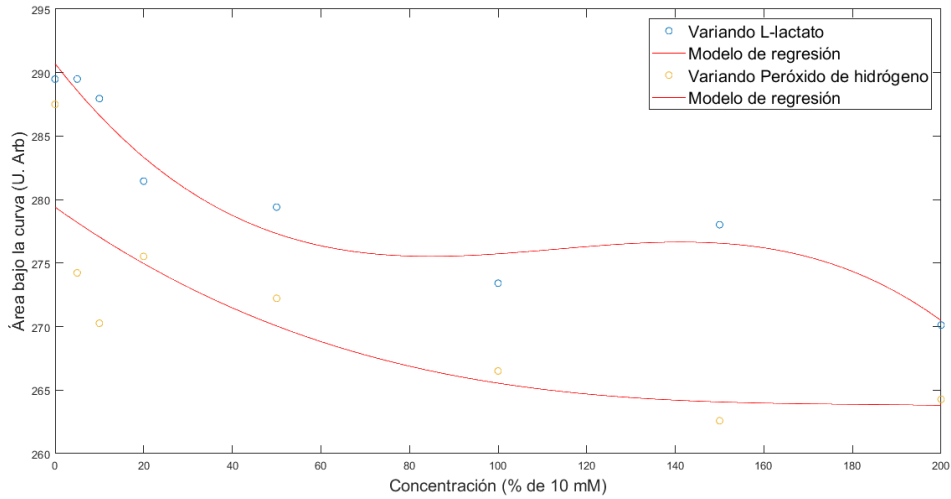
(c) PBS



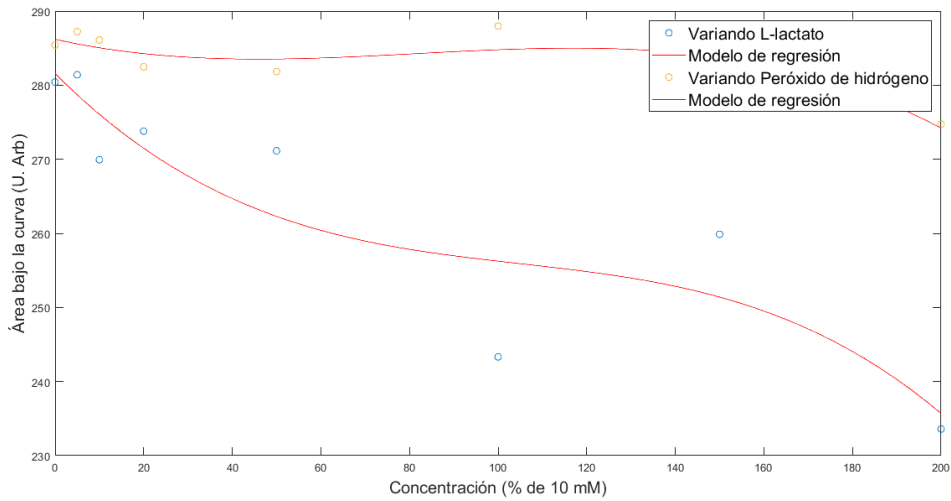
(d) PBS

Figura 10: Emisión de PC manteniendo constante 10mM de H_2O_2 , variando la concentración de L-lactato en SA y PBS (a,c). Emisión de PC manteniendo constante 10mM de L-lactato, variando la concentración de H_2O_2 en SA y PBS (b,d).

A pesar de que en los espectros de emisión se observa en general una disminución de emisión, esta no es tan evidente como cuando se realizó para cada uno de los analitos. Es así que se decide analizar el área bajo la curva de cada uno de los espectros y hallar un modelo polinomial para verificar que tan predecibles son los datos. En la figura 11 se puede observar que los datos tienen una tendencia a disminuir a medida que aumenta la concentración del analito que se está variando. De acuerdo a los valores de $Adj. R^2$ de la tabla 2 el modelo que mejor se ajusta a los datos es en el que se mantiene constante el H_2O_2 y se varían las concentraciones de L-lactato en SA. Para los otros modelos se obtuvieron valores de $Adj. R^2$ por debajo de 0.85 lo que implica que los modelos a pesar de tener la misma tendencia de los datos no se ajustan tan bien como lo hicieron en el análisis de los analitos por separado.



(a) SA



(b) PBS

Figura 11: Área bajo la curva de los PC variando los analitos en SA (a). Área bajo la curva de los PC variando los analitos en PBS (b).

Cuadro 2: Valores de R^2 y modelos polinomiales encontrados para las áreas bajo la curva de los PC en presencia de los analitos.

PC	R^2	Modelo polinomial
Variando L-lactato en SA	0.948	$-0.0001x^3 + 0,004x^2 - 0,447x + 290$
Variando L-lactato en PBS	0.690	$-0.0002x^3 + 0,0013x^2 - 0,2477x + 279$
Variando H_2O_2 en SA	0.824	$-0.001x^3 + 0,005x^2 - 0,59x + 281$
Variando H_2O_2 en PBS	0.800	$-0.0008x^3 + 0,002x^2 - 0,134x + 286$

Con el fin de analizar el comportamiento de los espectros en función de la longitud de onda y la concentración de los analitos se realizaron gráficos de superficie de los datos, como se observa en la figura 12. Basándonos en la escala de colores ubicada a la derecha

de cada uno de los gráficos, se observan pequeños cambios en la intensidad de emisión de los espectros.

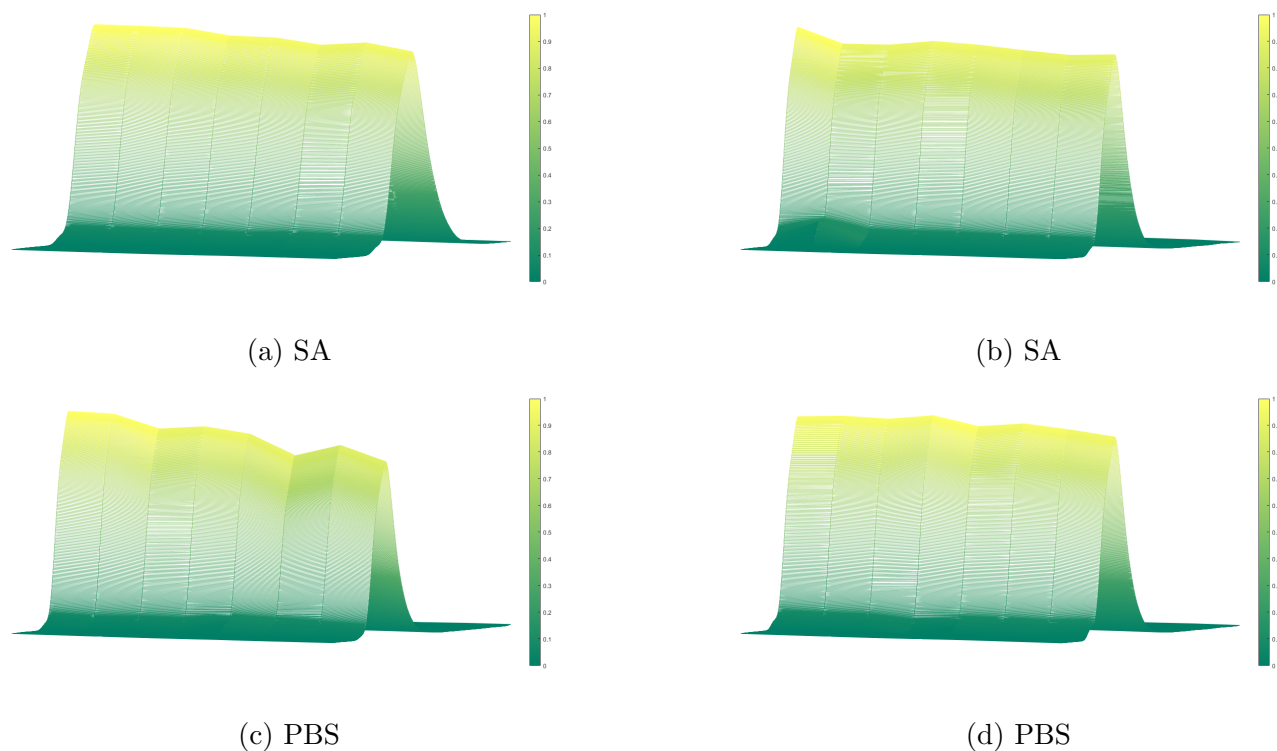


Figura 12: Gráfica de la superficie de emisión de PC manteniendo constante 10mM de H_2O_2 , variando la concentración de L-lactato en SA y PBS (a,c). Gráfica de la superficie de emisión de PC manteniendo constante 10mM de L-lactato, variando la concentración de H_2O_2 en SA y PBS (b,d).

6. Protocolo

6.1. Síntesis puntos de carbono

- Agregue 15 mL de formamida (Sigma-Aldrich), 1 g de ácido cítrico (Scharlau) y 1 g de urea (Scharlau) en un falcon de 50 mL.
- Durante 5 minutos sonique la muestra.
- Una vez sonicada, agregue la solución en el teflon del reactor solvotérmico y deje la reacción durante 12 horas a una temperatura de 160°C.
- Centrifugue la solución resultante a 4000 rpm por 20 minutos en tubos falcon de 50 mL.
- Retire el sobrenadante y centrifúguelo nuevamente en tubos eppendorf a 10000 rpm por 10 minutos, repita este paso una vez más.
- Filtre el sobrenadante resultante, haciendo uso de un filtro de jeringa.
- Proceda a realizar dialisis por 48 horas de la solución resultante.
- Finalizado el tiempo de dialisis, seque la muestra por 12 horas a 100°C en cajas petri.

6.2. Lavado puntos de carbono

- Agregue 10 mL de agua a la caja petri que contiene la muestra.
- Extraiga la solución resultante y sonique durante 5 minutos.
- Agregue 5 mL de etanol y agite durante 5 minutos, centrifugue la muestra durante 15 minutos y repita el proceso una vez más.
- A la muestra resultante agregue 5 mL de acetona y agite durante 5 minutos, centrifugue la muestra durante 15 minutos.
- Finalizado este proceso, seque la muestra por 12 horas a 100°C en cajas petri.

6.3. Preparación de la muestra

- Extraiga y pese de la caja petri los puntos de carbono sintetizados.
- Realice diluciones de los puntos de carbono a concentraciones de 0.75 mg/mL.
- Agregue a la muestra la solución con la cantidad de analito correspondiente.
- Deje reposar la muestra durante 48 horas.
- Tome espectros de emisión haciendo uso de una longitud de onda específica de 365 nm.
- Halle el área bajo la curva del espectro y use este valor con el modelo polinomial correspondiente para saber la concentración del analito.

7. Aspectos clave

De acuerdo a los resultados del protocolo previamente descrito, se sugiere:

- Realizar la síntesis de los PC por medio del método solvotermal y la remoción de impurezas siguiendo los pasos del método A, para lograr una mayor intensidad de emisión.
- Hacer uso de un LED de 365 nm, pues de acuerdo a los resultados de intensidad de emisión al variar la longitud de onda de irradiación con este se logra una mayor intensidad de emisión.
- Utilizar una concentración constante de PC de 0.75 mg/mL para caracterizar los PC en presencia de los analitos.
- Una preparada la muestra con los puntos de carbono y el peróxido de hidrógeno esperar durante al menos 48 horas para tomar el espectro de emisión.
- Hacer uso de modelos polinomiales para describir el comportamiento de la intensidad de emisión en presencia de los analitos y basarse en los valores de $Adj. R^2$ para verificar que tan bien se ajusta a los datos.

Referencias

- [1] L. Gladden, "Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium," *The Journal of physiology*, vol. 558, no. 1, pp. 5–30, 2004.

- [2] F. Baigorri-González and J. L. Balanza, “Oxigenación tisular y sepsis,” *Medicina intensiva*, vol. 29, no. 3, pp. 178–184, 2005.
- [3] L. Rassaei, W. Olthuis, S. Tsujimura, E. J. Sudhölter, and A. van den Berg, “Lactate biosensors: current status and outlook,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 406, no. 1, pp. 123–137, 2014.
- [4] I. Shitanda, M. Mitsumoto, N. Loew, Y. Yoshihara, H. Watanabe, T. Mikawa, S. Tsujimura, M. Itagaki, and M. Motosuke, “Continuous sweat lactate monitoring system with integrated screen-printed mgo-templated carbon-lactate oxidase biosensor and microfluidic sweat collector,” *Electrochimica Acta*, vol. 368, p. 137620, 2021.
- [5] A. Alaghmandfard, O. Sedighi, N. T. Rezaei, A. A. Abedini, A. M. Khachatourian, M. S. Toprak, and A. Seifalian, “Recent advances in the modification of carbon-based quantum dots for biomedical applications,” *Materials Science and Engineering: C*, p. 111756, 2020.
- [6] B. P. B. Saline, “Bdtm phosphate buffered saline (ph 7.2) bdtm saline solution (0.9%),”
- [7] J. Mystkowska, H. Car, J. R. Dabrowski, J. Romanowska, M. Klekotka, and A. J. Milewska, “Artificial mucin-based saliva preparations—physicochemical and tribological properties,” *Oral Health Prev. Dent*, vol. 16, pp. 183–193, 2018.
- [8] C. O. Kappe, “Controlled microwave heating in modern organic synthesis,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 43, no. 46, pp. 6250–6284, 2004.
- [9] J. D. Sánchez Fonseca, “Prueba de concepto para la detección de l-lactato en solución acuosa basado en la fluorescencia de los puntos de carbono,” 2021.
- [10] J. B. Essner, J. A. Kist, L. Polo-Parada, and G. A. Baker, “Artifacts and errors associated with the ubiquitous presence of fluorescent impurities in carbon nanodots,” *Chemistry of Materials*, vol. 30, no. 6, pp. 1878–1887, 2018.