



Trabajo Fin de grado

Aplicaciones biomédicas del óxido de grafeno

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Cristina García Guirado



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Departamento de Química Inorgánica

TRABAJO FIN DE GRADO:

“Aplicaciones biomédicas del óxido de grafeno”

Revisión bibliográfica

Grado en Farmacia

Cristina García Guirado

Tutor/a: María Isabel Domínguez Leal

Cotutor/a: Svetlana Ivanova

Sevilla, 6 de julio de 2020.

RESUMEN:

El óxido de grafeno es un alótropo de carbono que resulta ser un material que posee propiedades intrínsecas únicas, como su gran ligereza, flexibilidad y capacidad de adsorción. Estas características permiten a este compuesto ser un material de gran versatilidad, pudiendo ser funcionalizado o utilizado como tal para multitud de aplicaciones biomédicas. Entre ellas, transportar moléculas biológicas, conjugarse con otras moléculas y fármacos para mejorar su efecto terapéutico o incluso detectar ADN, glucosa y células tumorales en muestras biológicas. Estas propiedades lo hacen un material extraordinario para ser usado en terapéutica, siendo útil en el abordaje del cáncer, la terapia antimicrobiana, la terapia fototérmica o la terapia génica. Aunque no todas sus aplicaciones se mueven en el ámbito de la medicina o la farmacología, resulta reseñable su gran auge en la investigación biomédica tras su aislamiento a partir del grafito en 2004, siendo una molécula englobada en muchas líneas de investigación que no dejan de mostrarnos beneficios y utilidades nuevas de este compuesto.

Palabras clave: Óxido de grafeno, cáncer, ADN, aplicaciones biomédicas.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Óxido de grafeno: origen y desarrollo	7
1.2. Estructura y síntesis	8
1.3. Aplicaciones biomédicas generales	10
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGÍA	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Óxido de grafeno y terapia antitumoral	16
4.1.1. Biodetección de células tumorales	16
4.1.2. Óxido de grafeno y doxorubicina: Mejoras en la eficacia y ensamblaje	17
4.1.3. Óxido de grafeno y terapia fototérmica	23
4.2. Óxido de grafeno y terapia antibacteriana	24
4.2.1. Óxido de grafeno y plata	24
4.2.2. Mecanismos de toxicidad bacteriana del óxido de grafeno	26
4.3. Papel del óxido de grafeno como biosensor	29
4.3.1. Detección de moléculas de ADN	29
4.3.2. Biosensor de glucosa	31
4.4. Óxido de grafeno y transporte de moléculas: beneficios en terapia génica	32
5. CONCLUSIONES	33
6. BIBLIOGRAFÍA	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Óxido de grafeno: Origen y desarrollo

El grafeno es un material constituido exclusivamente por carbono, de estructura bidimensional plana y policíclica que ha sido estudiado durante décadas y cuyo método de aislamiento a partir del grafito ha supuesto un gran avance en cuanto a su facilidad de obtención y la comprensión de su estructura y comportamiento. Tanto el alótropo puro como su forma oxidada son materiales de bajo coste, resistentes y de una elevada flexibilidad. Estas propiedades, junto con su fácil proceso de aislamiento y síntesis, los convierten en materiales versátiles y con potenciales aplicaciones en ámbitos muy diversos como la electrónica o la medicina.

Aunque el grafeno ha sido objeto de estudio durante varias décadas, se había considerado como un material teórico que se suponía imposible de encontrar en estado libre en la naturaleza (Ghany et al., 2017). No fue hasta 2004 cuando los físicos Andre Geim y Konstantin Novoselov, en una investigación llevada a cabo en la Universidad de Manchester, consiguieron desarrollar un sencillo método de aislamiento del grafeno a partir del grafito y por ello fueron merecedores del Nobel de Física en 2010 (Lee et al., 2016).

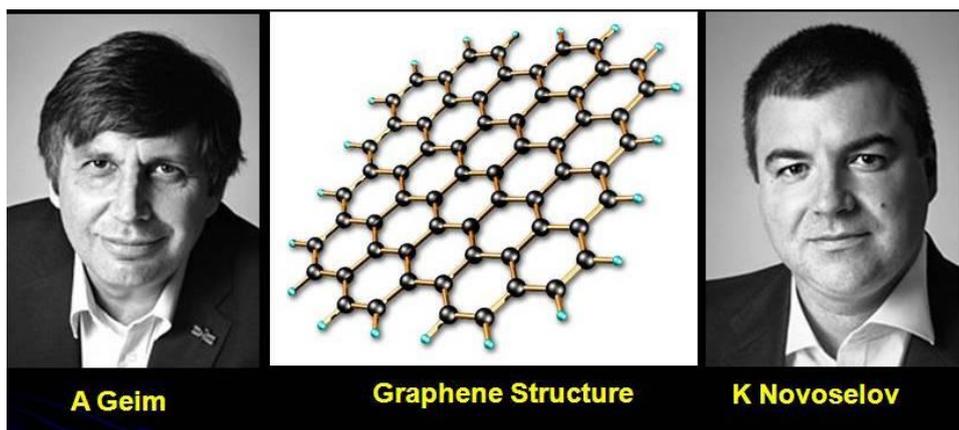


Figura 1. Andre Geim y Konstantin Novoselov junto a la estructura plana del grafeno (IITB Monash research academy, 2018).

Dado que el grafito se trata de un material barato, accesible y de fácil manipulación, a raíz de esta técnica de aislamiento comienza un notable avance en la investigación del

grafeno, conociéndose propiedades de gran importancia como su elevada área superficial y descubriéndose utilidades en muchos contextos nunca antes previstas como su utilidad en la transfección de genes en terapia génica, el abordaje terapéutico del cáncer o la detección de moléculas de ADN en una muestra (Lee et al., 2016). El óxido de grafeno (GO) surge, a raíz de este auge, como una de las muchas modificaciones del grafeno puro que han resultado ser de utilidad.

1.2. Estructura y síntesis

El grafeno como alótropo del carbono posee como característica estructural principal la disposición de anillos de 6 átomos de carbono interconectados constituyendo una red multihexagonal en forma de panal de abeja, esta estructura tan particular puede ser entendida conceptualmente como una macromolécula aromática bidimensional (Wang et al., 2011). La oxidación de este compuesto da lo que entendemos como óxido de grafeno, que posee una estructura mixta con varios átomos de oxígeno contenidos en grupos funcionales de distinta naturaleza como epóxidos, hidroxilos y carbonilos unidos a la estructura plana del grafeno, tal y como se muestra en la figura 2 (Singh et al., 2017).

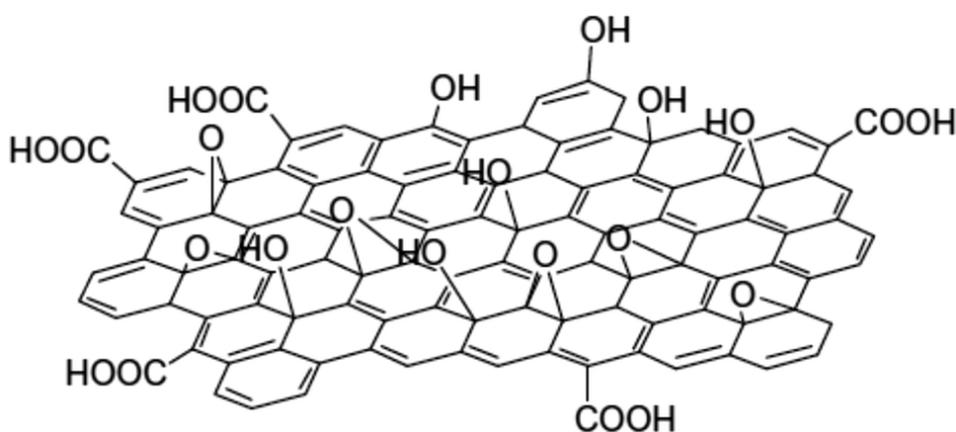


Figura 2. Estructura bidimensional plana del óxido de grafeno (Royal Society Of Chemistry, 2015).

Estos grupos funcionales unidos a la estructura del grafeno le confieren propiedades que son potencialmente útiles para su aplicación en muchos ámbitos del campo tecnológico, así como su utilización en investigación y práctica biomédica (Singh et al., 2017).

En cuanto a la obtención del óxido de grafeno, actualmente las técnicas de síntesis de este compuesto se engloban en dos grupos principales denominados “top down” y “bottom up” (Smith et al., 2019).

“Top down”

El recurso primario de obtención es el grafito, cuya transformación a óxido de grafeno se logra mediante técnicas que consiguen separar de este material las placas de grafeno que lo conforman. Las técnicas empleadas son la exfoliación mecánica con cinta adhesiva, la intercalación de iones entre las placas, la exfoliación en fase líquida o la deposición física o química de vapor (Smith et al., 2019; Murugan et al., 2019). Normalmente, la obtención del óxido de grafeno por esta vía se consigue a través de la oxidación del grafito a base de una mezcla de agentes oxidantes fuertes, que separan las capas de grafeno que conforman el grafito y resultan en una rotura parcial de su estructura híbrida sp^2 . Una vez realizado este paso, se requiere de un proceso de exfoliación en el que el óxido de grafito dispersado en agua deriva en lo que conocemos como óxido de grafeno (Lee et al., 2016).

“Bottom up”

En este caso, se parte de varios compuestos orgánicos gaseosos que poseen carbono en su estructura, tales como el metano o el propano. Por tanto, es un proceso que depende directamente de la cantidad de material orgánico de la que se dispone, siendo éste un factor limitante (Murugan et al., 2019; Smith et al., 2019). Dado que los métodos bottom up demandan mucho tiempo y resultan poco ágiles, se opta principalmente por las técnicas top down por su facilidad y rapidez (Smith et al., 2019).

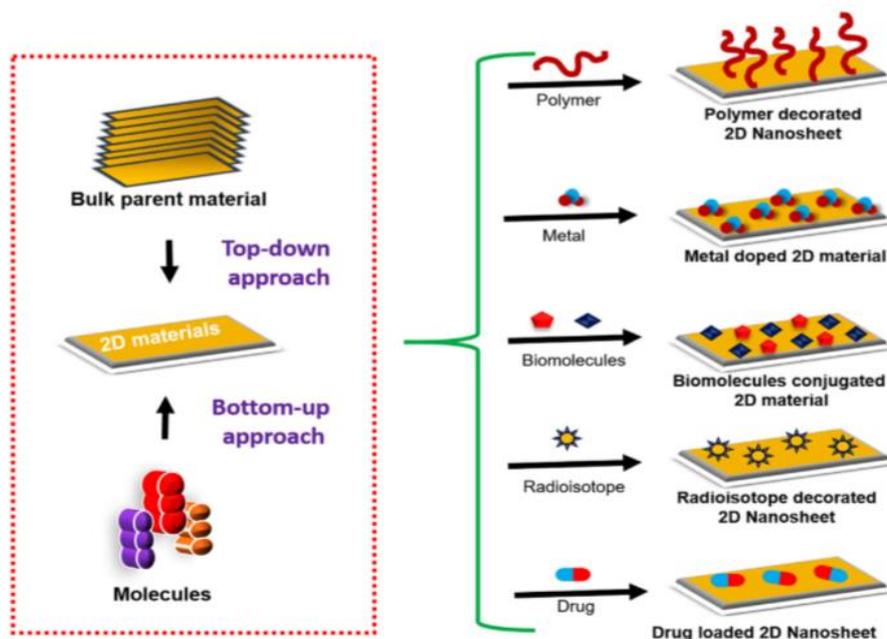


Figura 3. Esquema de métodos de obtención de óxido de grafeno y posibles usos posteriores (Murugan et al., 2019).

Una vez obtenidas las placas bidimensionales de óxido de grafeno, éste se puede manipular para formar diferentes estructuras, puede servir de base para transportar otras moléculas, puede combinarse con otras sustancias para mejorar su acción, entre otras aplicaciones (Murugan et al., 2019).

1.3. Aplicaciones biomédicas generales

El óxido de grafeno, gracias a su particular estructura y propiedades, ha demostrado ser de gran utilidad en diversas aplicaciones a nivel biomédico, siendo todavía un material en estudio en muchos campos que competen a la medicina, la farmacología o la bioquímica y que está demostrando ser muy prometedor en estas áreas.

En el ámbito farmacológico, algunas moléculas libres resultan ser inespecíficas o no logran permanecer un tiempo óptimo en la circulación sistémica, como consecuencia de ello, no logran ejercer su función de manera óptima en la diana y dan como resultado una baja eficiencia terapéutica. Es por ello que una de las aplicaciones más estudiadas y eficaces ha sido el uso de óxido de grafeno como transportador de fármacos para mejorar sus propiedades de transporte y biodisponibilidad (Song et al., 2019).

Como ésta, muchas otras aplicaciones han resultado de relevancia. Así, por ejemplo, el óxido de grafeno es conocido por ser un eficiente biosensor debido a su capacidad para marcar moléculas orgánicas que puedan ser detectadas por fluorescencia (Wang et al., 2011; Lee et al., 2016). Este material podría convertirse en un prometedor antitumoral y antibacteriano pudiendo además ser usado en combinación con algunos fármacos para elevar su potencia anticancerosa o convertirse en un excelente vector de ellos (Singh et al., 2017).

A lo largo de esta revisión bibliográfica, además de las citadas, conoceremos algunas de las aplicaciones más recientes que están en plena evolución y estudio y que además prometen revelar muchos usos de este compuesto que tendrán una utilidad práctica en pocos años.

2. OBJETIVOS

Los objetivos generales que se persiguen con la realización de esta revisión bibliográfica son analizar y conocer en profundidad las diferentes aplicaciones del óxido de grafeno en el ámbito médico-científico, así como observar el avance del estudio sobre este compuesto en los últimos 5 años

Como objetivos específicos se marcaron:

- Entender los mecanismos biosensitivos del óxido de grafeno para diferentes tipos de moléculas biológicas.
- Valorar el papel del óxido de grafeno en la terapia antibacteriana, sus efectos y posibles aplicaciones.
- Estudiar su utilidad en el transporte de fármacos a través de las diferentes membranas y entornos biológicos.
- Conocer el papel del óxido de grafeno en la terapia anticancerosa.
- Descubrir su rol en la mejora de la terapia génica.

3. METODOLOGÍA

La metodología empleada para la realización de esta revisión ha sido basada en la consulta y selección de información recogida en la literatura científica y recopilada a partir de artículos disponibles en tres bases de datos diferentes: Scopus, Scienedirect y Web of Science.

Al disponer de muchos recursos y resultados en cuanto al tema que hemos tratado, en primer lugar, se acotó la búsqueda a artículos de revisión, metanálisis y revisión sistemática publicados en los últimos 5 años, empleando el descriptor: “Graphene oxide biomedical applications”.

Usando estos criterios y acotaciones en las tres bases de datos se obtuvieron los siguientes resultados en cuanto a número de artículos disponibles en cada una (Figura 4):

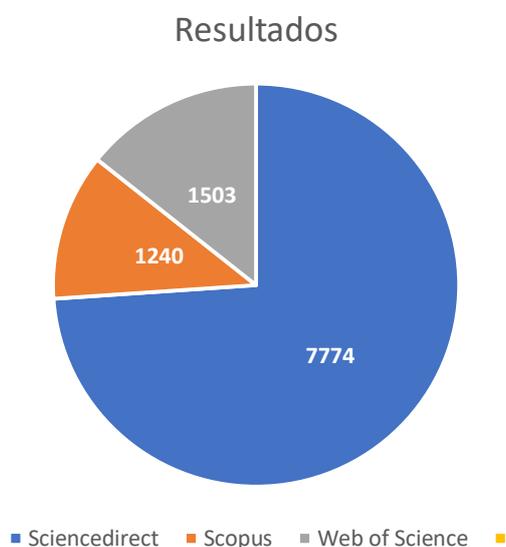


Figura 4. Resultados obtenidos en cada base de datos basándose en los criterios descritos.

Cabe destacar que en Scienedirect encontramos el mayor número de artículos, esto puede deberse a que esta base de datos recoge artículos pertenecientes a muchos más ámbitos que las otras dos, por lo que habrá mayor número de artículos al albergar un dominio más extenso.

Una vez seleccionados y revisados diferentes artículos, acotamos aún más la búsqueda para centrarnos en varios campos de investigación que se encontraron de relevancia, estos fueron: “Graphene oxide antibacterial”, “Graphene oxide biosensor”, “Graphene oxide drug delivery” y “Graphene oxide cancer”, obteniéndose el número de publicaciones que se recoge en la Tabla 2 y la Figura 5.

Tabla 2. Número de artículos disponibles en cada base de datos en función de las diferentes palabras clave utilizadas. GO: graphene oxide.

BUSCADOR	GO-antibacterial	GO-biosensor	GO- drug delivery	GO-cancer
Sciencedirect	3477	8803	6068	4016
Scopus	845	2090	1518	1055
Web of Science	1692	2973	2217	1209

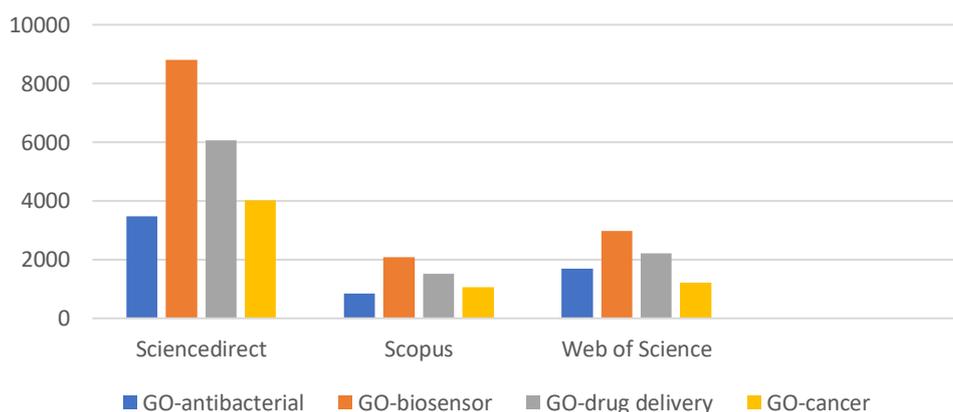


Figura 5. Número de artículos disponibles en cada base de datos en función de los diferentes marcadores. GO: graphene oxide.

En las tres bases de datos observamos que el marcador para el cuál se dispone de mayor número de resultados es para “Graphene oxide biosensor” pudiendo especularse que para esta aplicación el óxido de grafeno ha demostrado tener especialmente importancia o ha podido tener utilidad en procesos relacionados con esta aplicación.

Para entender mejor la importancia del óxido de grafeno en la investigación biomédica, observamos la progresión de artículos publicados en los últimos 5 años, usando las palabras clave “Graphene oxide biomedical applications” (Figura 6). No incluimos el

2020 puesto que, al encontrarnos a mitad de año en el momento de esta revisión, no tendríamos un dato anual y estaría en desproporción con los otros.

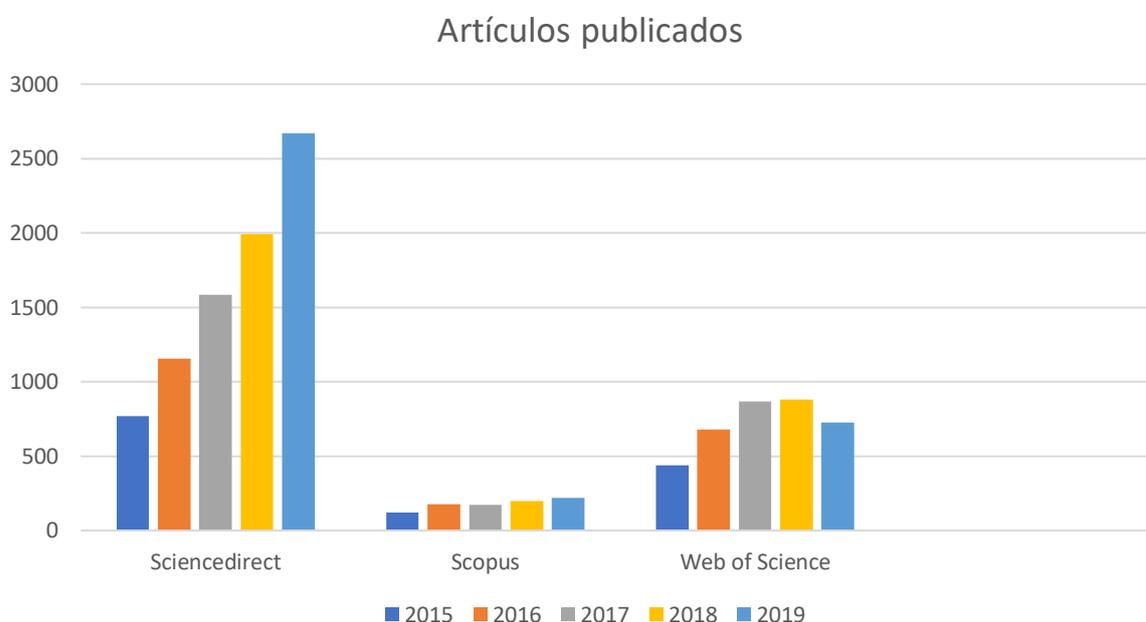


Figura 6. Número de publicaciones por año en cada base de datos consultada.

Observamos en la figura 6 una progresión en el número de publicaciones tanto en Scopus como en Sciencedirect, siendo en esta última más notable y clara. En cuanto a Web of Science, esta progresión también se hace patente hasta el año 2018, observándose una disminución en el número de publicaciones en el año 2019. Aun así, la visión global en cuanto a las tres es que el óxido de grafeno y sus aplicaciones biomédicas sigue siendo un tema notorio en la comunidad científica.

Partiendo de esta búsqueda, el procedimiento empleado se basó en la consulta de artículos encontrados primordialmente en Sciencedirect, ya que fue el buscador con más artículos disponibles, tanto en total, como en base a los marcadores empleados.

A partir de ahí, según la información que se iba obteniendo en este buscador, complementamos y comparamos estos recursos con los otros dos buscadores, teniendo en cuenta algunos parámetros como artículos duplicados o información adicional. Además de esto, para refinar aún más la búsqueda utilizamos palabras análogas a las

empleadas en los marcadores anteriores como: “Graphene oxide antitumoral”, “Graphene oxide sensor” o “Graphene oxide cellular delivery”.

Como complemento adicional a estos buscadores, además, se consultaron algunas páginas webs para obtener imágenes ilustrativas y diferentes recursos disponibles en la biblioteca de la Universidad de Sevilla.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Oxido de grafeno y terapia antitumoral

La terapia antitumoral es un ámbito que sigue en constante descubrimiento, desarrollo e investigación, puesto que el cáncer continúa siendo uno de los grandes problemas de salud de la era moderna. No es de extrañar entonces que siendo el óxido de grafeno un material con tantas ventajas, haya sido investigado en diferentes situaciones que engloban la terapia antitumoral. La funcionalización del óxido de grafeno (combinación de éste con moléculas reactivas), es el mecanismo fundamental en el que se basan las aplicaciones en terapia antitumoral.

4.1.1. Biodetección de células tumorales

Para entender la formación de metástasis a partir de un núcleo tumoral localizado es relevante conocer que las células tumorales se desplazan desde el núcleo a otras partes del cuerpo a través de la circulación sistémica, por lo que resulta vital detectar estas células para anticiparse al tratamiento y establecer un diagnóstico a tiempo (Pramanik et al., 2018; Safarpour et al., 2020).

Esta detección precoz de células tumorales en sangre se ve muy dificultada por dos hechos: la escasez de estas células (Yue et al., 2019) y los cambios que experimentan dichas células en su fenotipo, haciendo que los marcadores de membrana cambien y, por tanto, los métodos de aislamiento de éstas no sean 100% específicos y útiles en cada instante de vida de estas células. Por ello, el óxido de grafeno surge como uno de los nanomateriales emergentes que están resultando ser de utilidad en este contexto (Pramanik et al., 2018).

La utilidad del óxido de grafeno en esta aplicación radica en su estructura bidimensional y en la presencia de grupos funcionales que le confieren alta capacidad de adsorción de todo tipo de moléculas (Pramanik et al., 2018). En este ámbito, destaca su combinación con el octreótido (fármaco análogo a la somatostatina) marcado con una molécula fluorescente para detectar receptores de somatostatina tipo 2, abundantes en

células tumorales. La técnica se basa en que la molécula fluorescente pierde su fluorescencia al unirse con el grafeno (proceso conocido como quenching) y la recupera una vez unido al receptor. Así el GO junto con octreótido permiten la detección de células y la aplicación de una terapia (Singh et al., 2017). Veremos más adelante cómo el fenómeno de quenching también se usa en la detección de ADN monocatenario.

[4.1.2. Óxido de grafeno y doxorubicina: Mejoras en la eficacia y ensamblaje](#)

El óxido de grafeno es un excelente recurso para ser utilizado en la terapia anticancerosa en combinación con ciertos fármacos, produciéndose sinergias que aumentan la toxicidad en células tumorales (Singh et al., 2017; Zang et al., 2012).

Esta aplicación del óxido de grafeno se sustenta en el hecho de que la bioconjugación de este compuesto con otras moléculas como ácido fólico o alendronato (Zang et al., 2012; Pham et al., 2019) lo convierte en un excelente vehículo para antitumorales como la camptotecina o doxorubicina, haciendo que la citotoxicidad y la especificidad de estos fármacos sea mayor usando esta técnica que la que tendrían por separado (Zang et al., 2012).

La doxorubicina es un antitumoral que se ha visto bastante aventajado con esto ya que, a pesar de ser un fármaco muy usado, es una molécula insoluble en medio acuoso, lo que genera muchos problemas de biodisponibilidad (Song et al., 2019).

La efectividad de la combinación GO-doxorubicina se ha puesto de manifiesto en cánceres de mama, tumores sólidos y metástasis (Prabhakar Arun, 2020). En diversos artículos encontrados, podemos observar una disminución de células tumorales tanto *in vitro*, usando tejido humanos o murinos, como *in vivo* en ratones después de haber sido tratados con alguna bioconjugación de óxido de grafeno y doxorubicina.

Un ejemplo de ello es la utilización de doxorubicina para fijar de manera más específica el fármaco a las células tumorales por medio de una combinación de óxido de grafeno y ácido fólico. La fundamentación científica que sustenta este fenómeno se basa en la sobreexpresión de receptores de folato que acontece en células tumorales, receptores que se expresan de manera muy limitada en el resto de células somáticas. Por lo que

esta sobreexpresión de receptores de folato hace que se convierta en una de las localizaciones clave para fijar el fármaco y atacar a la célula. Esto se hace visible en la figura 7, en la que se observa cómo el óxido de grafeno funcionalizado con ácido fólico y bioconjugado con doxorubicina se une de manera específica al receptor de membrana, formándose un endosoma que introduce el fármaco en el interior por fagocitosis haciendo que, una vez dentro, la doxorubicina se libere y ataque a la célula (Figura 7) (Muñoz et al., 2019). No sólo es relevante el papel del óxido de grafeno combinado con ácido fólico para fijar el fármaco, sino que además se ha demostrado que la combinación de óxido de grafeno con doxorubicina también es capaz de elevar las especies reactivas de oxígeno intracelular, aumentando aún más el efecto tóxico en la célula y desintegrarla (Slekiene Snitka, 2020).

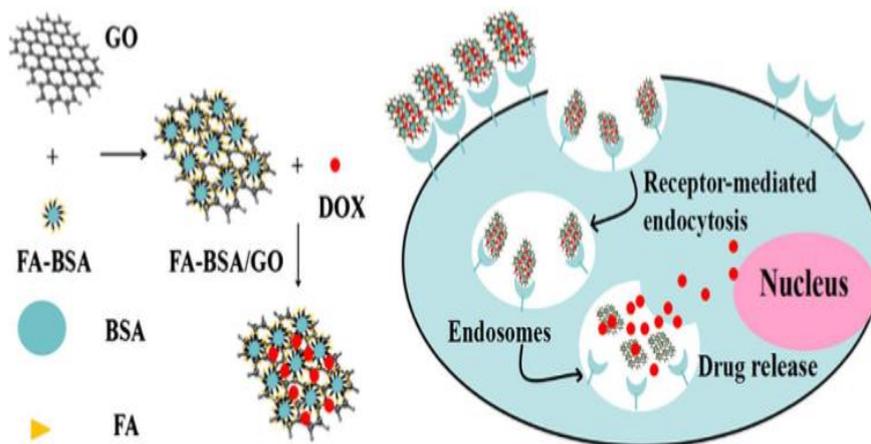


Figura 7. Esquema de la acción del óxido de grafeno y la doxorubicina sobre la célula (Muñoz et al., 2019).

Además de mejorar la llegada del fármaco y el anclaje a la célula, otra propiedad que hace muy efectivo el uso de óxido de grafeno conjugado se basa en que no solo mejora la fijación del fármaco en la célula, sino que favorece la acumulación de más moléculas de doxorubicina en la membrana. Esto, junto con la prolongación del tiempo que permanece el fármaco en la superficie celular, aumenta ampliamente su eficacia (Song et al., 2019). Esta mejora del efecto y fijación de doxorubicina usando óxido de grafeno se ha logrado también con moléculas como el k-carragenano y la biotina, que ha

demostrado su eficacia *in vitro* en cuanto a la disminución de la viabilidad de las células y un incremento en la fagocitosis del fármaco (Vinothini et al., 2019).

En uno de los artículos consultados, encontramos un estudio reciente que demuestra que, de igual manera que la bioconjugación óxido de grafeno-ácido fólico incrementa significativamente la adhesión de doxorubicina al tejido tumoral, la combinación de óxido de grafeno y este fármaco resulta exitosa también en las metástasis óseas (Pham et al., 2019).

Dada la complejidad del tejido óseo, su poca permeabilidad y su dureza, muchos tratamientos para el cáncer de hueso se ven obstaculizados debido a que no se trata de un tejido de fácil alcance, por lo que es importante fijar la atención en la búsqueda de ligandos eficaces que faciliten el acceso. El uso del óxido de grafeno en este ámbito mejora la fijación de la doxorubicina a las metástasis en tejido óseo. Esto se consigue mediante la conjugación de óxido de grafeno con alendronato, una molécula usada comúnmente para tratar afecciones como la hipercalcemia (Pham et al., 2019).

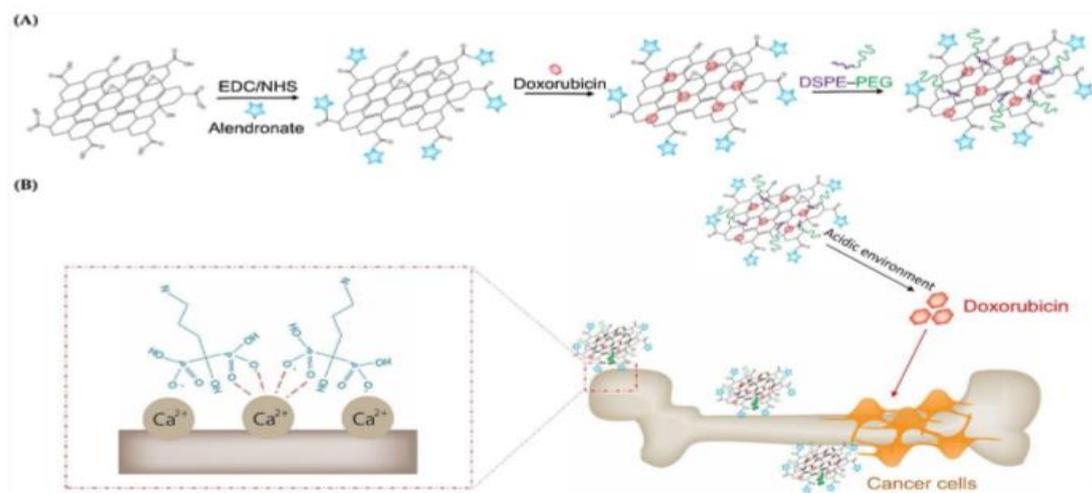


Figura 8. Esquema de la acción de doxorubicina y óxido de grafeno en metástasis óseas (Pham et al., 2019).

Este conjunto, mejora significativamente la adhesión del fármaco debido a su unión con el Ca^{2+} , resultando más estable y asegurando la fijación. Observamos este fenómeno en la figura 8, en la que muestra cómo el alendronato soportado en óxido de grafeno ayuda a vectorizar el fármaco hacia el hueso, quedando unido al tejido óseo debido a las interacciones del alendronato con los cationes de calcio presentes en él (Figura 8) (Pham et al., 2019).

Para demostrar esta eficacia se estudiaron distintas situaciones, en distintos entornos:

- 1) Capacidad de fijación al tejido óseo: Se usaron tres muestras, una muestra control, una muestra con óxido de grafeno conjugado con alendronato (NGO-AL) y otra con esa misma conjugación y doxorubicina (GO-AL-DOX). A cada uno de los pellets se les adicionó polvo de hidroxiapatita, componente principal del hueso, se centrifugó la muestra y se midió la absorbancia a 234 nm tras 1,2,3 y 4 horas (Figura 9) (Pham et al., 2019).

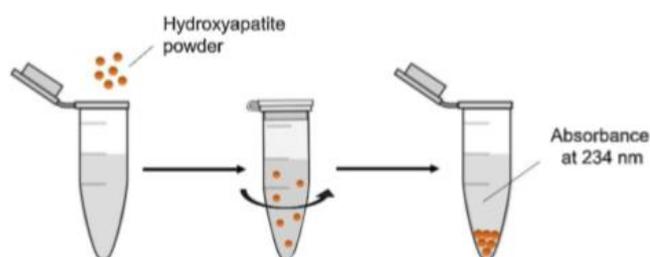


Figura 9. Preparación de muestras en pellets con hidroxiapatita (Pham et al., 2019).

- 2) Citotoxicidad *in vitro*: El polvo de hidroxiapatita esta vez se fijó en colágeno y se combinó con la línea celular MDA-MB-231, que simula células metastásicas de cáncer de mama (Figura 10). A este modelo se le adicionó una solución control, una solución DOX-PEG-NGO y otra solución DOX-PEG-NGO-AL. Para mejorar problemas de estabilidad, estas dos moléculas fueron conjugadas con polietilenglicol (PEG) (Pham et al., 2019).

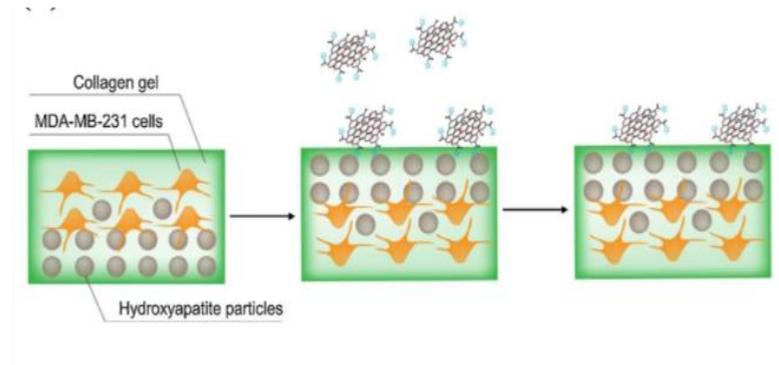
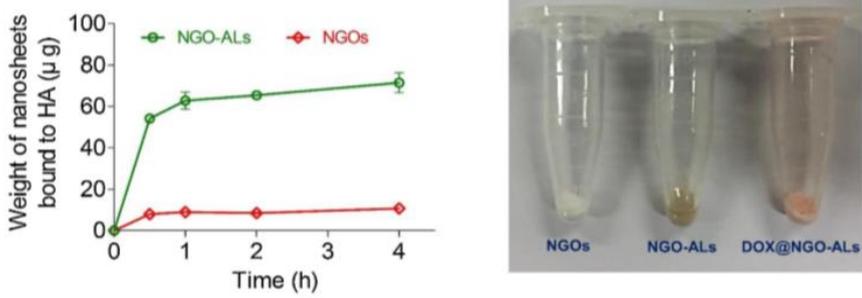
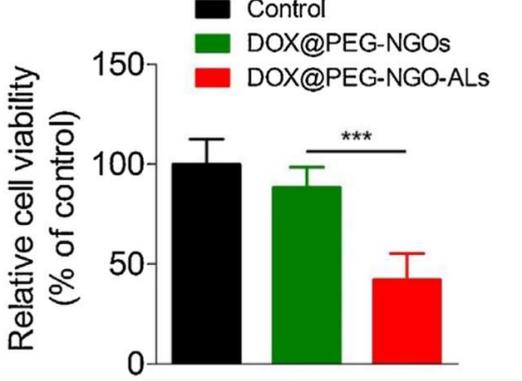
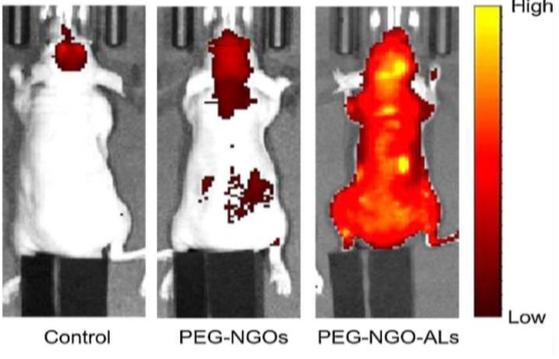


Figura 10. Ensayo para determinar la citotoxicidad *in vitro* (Pham et al., 2019).

- 3) Distribución *in vivo*. Se utilizaron tres ratones, a cada uno de ellos se les inyectó un tipo de muestra: control, PEG-NGO, PEG-NGO-AL y por bioluminiscencia se determinó la distribución de cada una (Pham et al., 2019).

Una parte de los resultados y conclusiones obtenidos en este estudio se presentan de forma resumida en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados y conclusiones obtenidos tras el estudio del óxido de grafeno en las situaciones mencionadas (Pham et al., 2019).

<p>Fijación al tejido óseo</p>	 <p>Figura 11. Resultados del ensayo de fijación a hidroxiapatita (Pham et al., 2019)</p> <p>La acumulación de NGO-AL en la hidroxiapatita se hace evidente no solo en cuanto a la medida de la absorbancia, sino que también se observa cambio de color en la propia muestra (Pham et al., 2019).</p>
<p>Toxicidad <i>in vitro</i></p>	 <p>Figura 12. resultados del ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> (Pham et al., 2019)</p> <p>El modelo tratado con PEG-NGO-AL presenta una evidente disminución de la viabilidad celular con respecto a los otros dos (Pham et al., 2019).</p>
<p>Distribución <i>in vivo</i></p>	 <p>Figura 13. Resultados del ensayo de distribución <i>in vivo</i> (Pham et al., 2019)</p> <p>Se hace evidente una mejor biodistribución del fármaco en el ratón tratado con PEG-NGO-AL que en los otros dos (Pham et al., 2019).</p>

Al tratarse de un estudio reciente (abril 2019) podríamos esperar que esta aplicación siga avanzando y que, en los próximos años, se optimice.

4.1.3 Óxido de grafeno y terapia fototérmica

La terapia fototérmica es un procedimiento empleado mayormente para el tratamiento del cáncer, basado en la emisión de radiación NIR (infrarrojo cercano) hacia un núcleo tisular localizado, en este caso, tejido tumoral al que previamente se le han introducido moléculas que absorban esa radiación. Esta radiación consigue elevar la temperatura de las moléculas introducidas, logrando la destrucción de la célula de manera no invasiva (Song et al., 2019). Para llevar a cabo este procedimiento se necesitan materiales biocompatibles cuya región espectral de absorción se sitúe en el infrarrojo cercano, siendo el óxido de grafeno uno de ellos. Además, este último cuenta con muchas más ventajas como ser un material biocompatible que permite ser introducido en las células sin muchas interferencias (Song et al., 2019) y un material fototérmico con alta capacidad de absorción, excitación y movimiento de electrones, facilitada por su estructura bidimensional (Murugan et al., 2019).

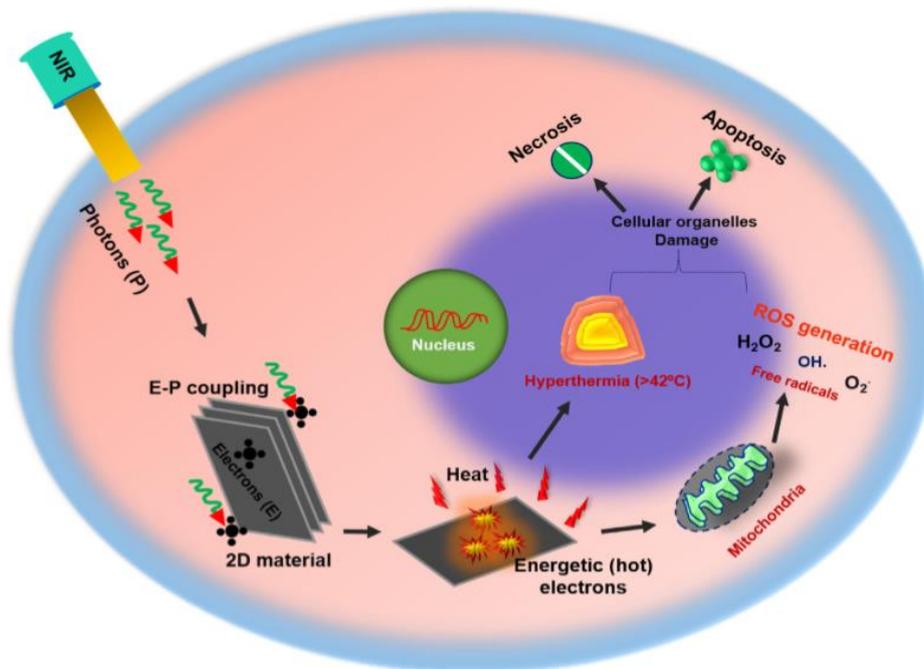


Figura 14. Resumen gráfico del mecanismo de la terapia fototérmica (Murugan et al., 2019).

El proceso bioquímico que fundamenta la fototerapia se basa en que la radiación absorbida por el óxido de grafeno se traduce en energía térmica, proceso que deriva en una cascada de reacciones pro-apoptóticas que culminan en la muerte celular (Figura 14) (Murugan et al., 2019). Por un lado, la hipertermia generada, cuando supera los 43 °C, consigue que se liberen especies reactivas de oxígeno que oxidan moléculas celulares endógenas facilitando la muerte celular. Además de esto, el aumento de la temperatura celular promueve la acción de moléculas inductoras de apoptosis, como la activación de las proteínas bcl-2, que actúan en la mitocondria haciendo que sea posible la liberación de citocromo C, una pequeña proteína que genera la formación de un complejo denominado apoptosoma, que activa directamente a la caspasa-3 y la caspasa-9, cuya función es inducir la apoptosis (Murugan et al., 2019; Chen et al., 2016).

[4.2. Óxido de grafeno y terapia antibacteriana](#)

En la misma línea de investigación sobre las aplicaciones biomédicas de este compuesto, encontramos en varios artículos evidencia de actividad antibacteriana, tanto por separado como adicionando otras moléculas a su estructura (generalmente nanopartículas metálicas como plata o cobre), o en otras técnicas paralelas que contribuyen a que la terapia antibacteriana sea más eficaz. Por ello, es interesante profundizar en este ámbito, dado que la terapia antibacteriana es una de las grandes preocupaciones de la medicina actual, debido a que la generación de resistencias es cada vez mayor y supone la escasez de antibióticos eficaces para todas las cepas.

[4.2.1. Óxido de grafeno y plata](#)

La eficacia del óxido de grafeno en cuanto a sus cualidades bactericidas y bacteriostáticas se ha comprobado tanto por separado, dado que esta molécula posee estas propiedades *per se* (Menazea Ahmed, 2020), como en combinación con nanopartículas de plata. La formación de este híbrido aumenta de manera significativa el efecto antibacteriano, siendo eficaz tanto en bacterias Gram (+) como en Gram (-) (Singh et al., 2017; Menazea Ahmed, 2020). Esta técnica, aunque resulta algo complicada ya que fabricar un híbrido de óxido de grafeno y plata conlleva la dificultad

intrínseca de trabajar con materiales de un tamaño muy reducido (Menazea Ahmed, 2020) y con suficientes cationes de plata agregados a la estructura del óxido de grafeno, resulta bastante exitosa ya que el efecto sinérgico que ofrece esta combinación muestra una excelente eficacia a dosis más bajas que la que se utilizaría para los compuestos por separado (Singh et al., 2017; Xiong et al., 2019).

En cuanto al mecanismo que sustenta esta actividad, cabría entender que el uso de esta combinación conlleva varias ventajas:

a) El óxido de grafeno disminuye la agregación de las nanopartículas de plata, propiedad que favorece el efecto sinérgico (Menazea Ahmed, 2020; Song et al., 2016).

b) Los cationes de plata cargados positivamente y los grupos funcionales del óxido de grafeno interaccionan electrostáticamente con los lípidos de membrana y afectan a la integridad de la membrana celular, ocasionando cambios en la permeabilidad y la consecuente desorganización de la matriz bacteriana (Song et al., 2016).

Para observar este efecto, es de gran utilidad fijar la atención en la variación de la morfología de las especies bacterianas afectadas por este híbrido, como las que se exponen en la figura 15.

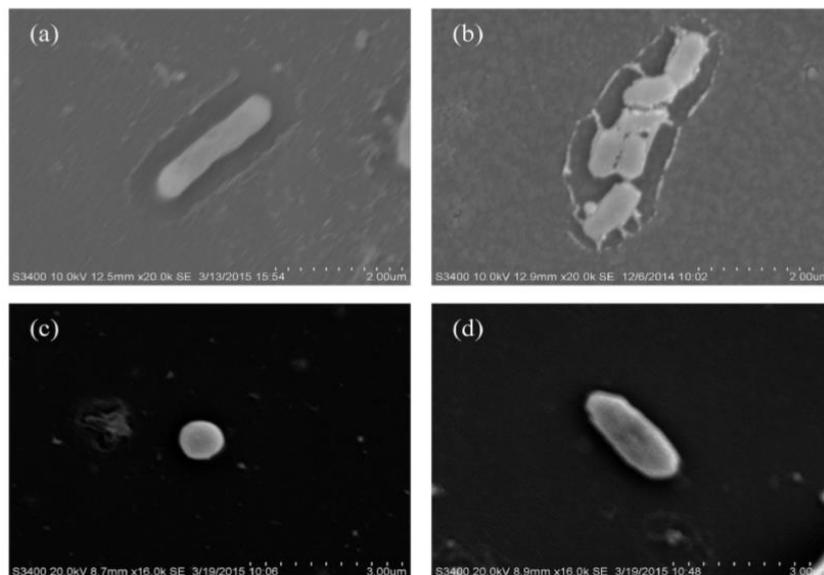


Figura 15. Cambios observados en la conformación de la membrana de *Escherichia coli* (a) y *Staphylococcus aureus* (e) tras la exposición al óxido de grafeno y plata (Song et al., 2016).

Estas bacterias fueron aisladas de una muestra de agua que contenía patógenos que afectan al hombre, en este caso *E. coli* y *S. Aureus*. En este ejemplo se hace bastante evidente el cambio de conformación que experimentan estas dos bacterias al ser tratadas con óxido de grafeno en combinación con nanopartículas de plata. (Song et al., 2016).

c) La elevada área superficial del óxido de grafeno, su estructura flexible, su alta capacidad para albergar nanopartículas en su estructura y su biocompatibilidad, lo convierten en un material idóneo para encontrarse estable en el entorno biológico tanto de la bacteria como del ser humano, sin variación estructural o química y con una acción eficaz (Menazea Ahmed, 2020).

4.2.2 Mecanismos de toxicidad bacteriana del óxido de grafeno

Además de la funcionalización del óxido de grafeno con partículas metálicas, existen otros mecanismos que o bien producen la muerte celular, o bien detienen el crecimiento de las bacterias, tratándose principalmente de tres métodos, los cuales se resumen de manera gráfica en la figura 16.

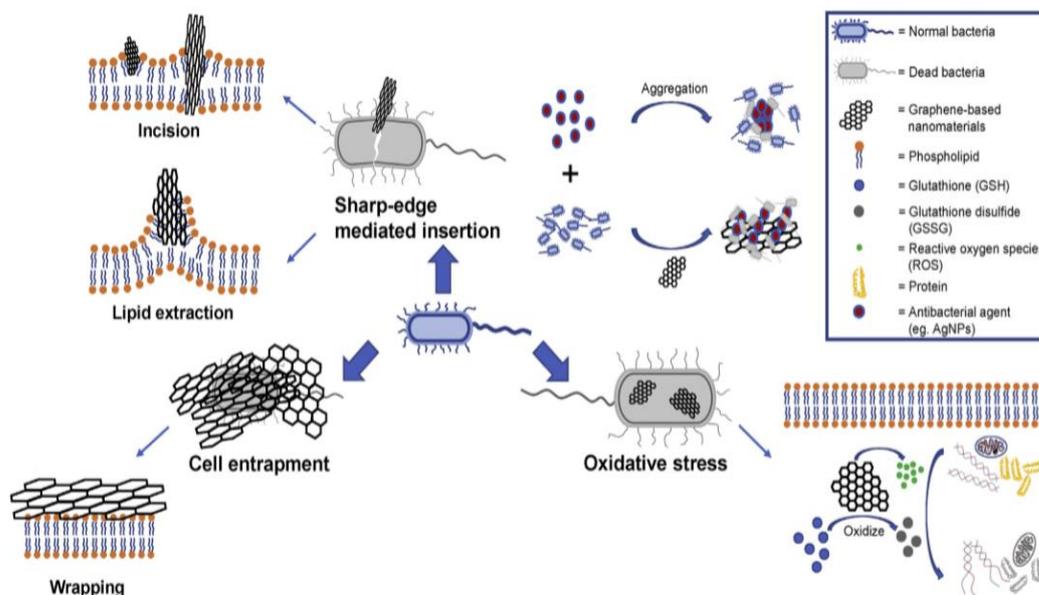


Figura 16. Resumen gráfico de los mecanismos antimicrobianos mediados por óxido de grafeno (Xia et al., 2019).

Estrés oxidativo

El óxido de grafeno aumenta las especies reactivas de oxígeno intracelular. Estas especies reactivas juegan un papel fundamental en el estrés oxidativo, ya que generan una descompensación entre las moléculas oxidantes y antioxidantes de una célula, interfiriendo en el funcionamiento normal del metabolismo bacteriano y generando la destrucción estructural de la bacteria. Este estrés oxidativo general desemboca en la oxidación de ácidos grasos, cuya consecuencia directa es la destrucción de la membrana y, por tanto, la muerte de la bacteria (Xia et al., 2019).

Atrapamiento celular

Otro mecanismo que ha demostrado ser útil en la terapia antibacteriana es el atrapamiento celular, que consiste en usar una lámina de óxido de grafeno en la que la bacteria se encuentre aislada del resto del entorno, impidiendo así su interacción con otras células y el acceso a nutrientes (Xia et al., 2019).

Incisión mecánica

Este mecanismo se basa en un procedimiento mecánico muy sencillo, los extremos afilados de la lámina bidimensional del óxido de grafeno pueden ejercer una presión mecánica sobre la membrana celular, como si se cortara con una cuchilla afilada, haciendo que el daño físico causado destruya la célula. Su efectividad estará limitada por factores como el grosor de la lámina o el ángulo con el que se ejerce la presión (Xia et al., 2019).

Otros mecanismos

Se han observado otros mecanismos en ensayos sobre bacterias multirresistentes que afectan al hombre, siendo los más interesantes los recogidos en la tabla 4.

Tabla 4. Efectos de la exposición a óxido de grafeno en distintos patógenos de interés.

<i>Escherichia coli</i>	La exposición de <i>E.coli</i> a una lámina de óxido de grafeno ha demostrado una asombrosa efectividad del 98.5% en la reducción de la viabilidad celular, además de una considerable disminución de biofilms (Xia et al., 2019).
<i>Staphylococcus aureus</i>	El óxido de grafeno ha demostrado un aumento de la proliferación de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , facilitando el efecto antagónico sobre <i>S.aureus</i> , sugiriendo que la manipulación de la microbiota puede ser considerada como una estrategia antibacteriana más procedente del óxido de grafeno(Xia et al., 2019).
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Debido a que esta bacteria afecta primordialmente al tejido gingival, siendo un gran problema en las enfermedades periodontales, se ha estudiado el óxido de grafeno como posible material agregado a implantes dentarios. Se ha evidenciado la mejora en el éxito de la cirugía, así como la disminución de la proliferación de esta bacteria y del daño tisular que genera (Xia et al., 2019).
<i>Salmonella typhimurium</i>	Esta bacteria difiere de las demás en que produce biofilms muy resistentes que resultan más difíciles de eliminar. El óxido de grafeno ha demostrado ser un gran coadyuvante en la lucha contra esta bacteria en combinación con otros antimicrobianos. Además, en esta bacteria, el óxido de grafeno produce efectos sobre el potencial de membrana, reduciéndolo e inhibiendo el crecimiento bacteriano (Xia et al., 2019).
<i>Candida albicans</i>	Se ha observado que la unión de óxido de grafeno al polímero polimetil metacrilato (PMMA) consigue una inhibición fúngica de, al menos, 28 días de duración. Pudiendo ser también esta combinación usada en la fabricación de materiales para empastes dentarios. Se encontraron también mejoras reduciendo la proliferación de biofilms (Xia et al., 2019).

4.3 Papel del óxido de grafeno como biosensor

La capacidad de una molécula de detectar otras moléculas biológicas activas es una propiedad muy apreciada, que resulta relevante en diversos procesos. Las propiedades intrínsecas del óxido de grafeno suponen una excelente oportunidad para ser usado como biosensor, ya que tanto la presencia de grupo funcionales que contienen oxígeno, como su conformación bidimensional y su biocompatibilidad, hacen de él una molécula con una elevada afinidad por moléculas biológicas, facilitando la detección de éstas (Singh et al., 2017).

Cabe recordar que, en esta revisión bibliográfica, la aplicación para la que encontramos mayor número de resultados en las tres bases de datos consultadas resultó ser esta, ya que el óxido de grafeno tiene funcionalidad como biosensor en multitud de biomoléculas, por lo que esta propiedad ha sido objeto de análisis para muchas aplicaciones.

4.3.1. Detección de moléculas de ADN

Este uso del óxido de grafeno es uno de lo más útiles ya que la detección de ADN en una muestra resulta relevante tanto en ciencias forenses como en multitud de ámbitos de la bioquímica (Singh et al., 2017). La determinación de la presencia de ADN en una muestra utilizando el óxido de grafeno como principal recurso se basa en un proceso que combina la técnica de “quenching” y la alta capacidad de adsorción de este material. En presencia de grafeno se produce una disminución, o incluso la anulación completa, de la fluorescencia de un material marcado con una molécula emisora de fluorescencia (en este caso el ADN) al adsorberse sobre la superficie del óxido de grafeno (Singh et al., 2017; Liu et al., 2016). Este fenómeno se da gracias a que las moléculas aromáticas del ADN tienen capacidad de interactuar con los electrones π del grafeno y quedan enlazadas de manera reversible a él (Zhang et al., 2017). El proceso que demuestra que esta aplicación resulta efectiva es bastante sencillo y ha sido extensamente estudiado y mejorado, por lo que se conoce el mecanismo de manera clara y se refleja en un gran número de publicaciones recogidas en la literatura científica.

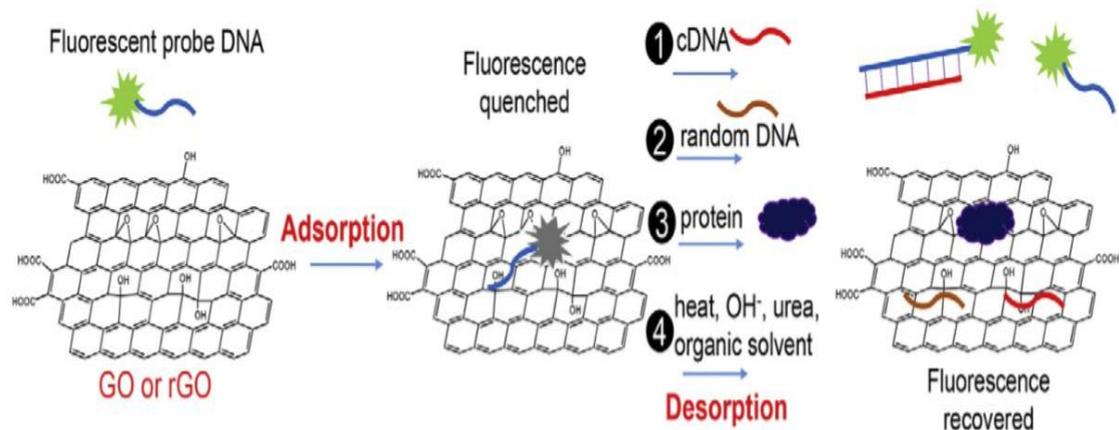


Figura 17. Esquema del mecanismo de detección de ADN monocatenario mediado por óxido de grafeno (Liu et al., 2016).

Para iniciar esta técnica de detección es importante que la muestra de ADN monocatenario se encuentre marcada por una molécula emisora de fluorescencia, tal y como se muestra en la figura 17. Esta molécula suele ser generalmente el isotiocianato de fluoresceína (Singh et al., 2017; Lee et al., 2016). La propiedad que hace que el ADN quede adsorbido en el óxido de grafeno es la fuerte capacidad de este compuesto para interactuar con los nucleótidos, ya que la presencia de sus diferentes grupos funcionales le permite la formación de enlaces π y puentes de hidrógeno con ellos (Lee et al., 2016). En cuanto a los factores que limitan este proceso, hay que tener presente que el pH, la longitud de la hebra y la presencia de cationes afectan a la adsorción, siendo un proceso que se ve favorecido por hebras cortas, pH bajo y una elevada fuerza iónica (Singh et al., 2017).

Esta adsorción de ADN es reversible por lo que, se puede recurrir a un proceso de desorción, que libere esta molécula y haga que recupere la fluorescencia (Figura 17), siendo además un proceso altamente eficaz. En los artículos consultados, la desorción fue prácticamente del 100 %, quedando el óxido de grafeno funcional y las moléculas de ADN libres en el medio (Singh et al., 2017; Liu et al., 2016).

Esta desorción de la molécula de ADN ha sido probada con diferentes métodos que quedan recogidos de manera visual en la figura, tales como usar la hebra complementaria del ADN adsorbido, una hebra de ADN al azar, algunos tipos de proteína o diferentes métodos físicos y químicos, como el aumento de la temperatura o la

utilización de diferentes disolventes (Liu et al., 2016). Tal y como se muestra en la figura 17, el método de desorción más eficaz es el uso de la hebra complementaria del ADN adsorbido, ya que consigue la desorción casi de la totalidad de las cadenas de ADN monocatenario. Aunque cabe destacar que este método de desorción no es del todo ventajoso, ya que la presencia de hebras complementarias de ADN en la matriz de la muestra puede interferir en la cantidad de hebras de ADN que se adsorben al óxido de grafeno (Zhang H et al., 2017).

4.3.2. Biosensor de glucosa

Al ser la diabetes una de las enfermedades crónicas más prevalentes, cabía esperar que el óxido de grafeno hubiese sido también estudiado en este ámbito. Ha sido ensayado como biosensor de glucosa en sangre, mediante la fabricación de un electrodo enzimático en base a la unión covalente de los grupos carboxilo del óxido de grafeno y las aminas de la enzima glucosa oxidasa, que cataliza la oxidación de glucosa liberando H_2O_2 , poniendo de manifiesto la glucosa presente en una muestra de suero mediante su deposición en el electrodo (Figura 18) (Singh et al., 2017).

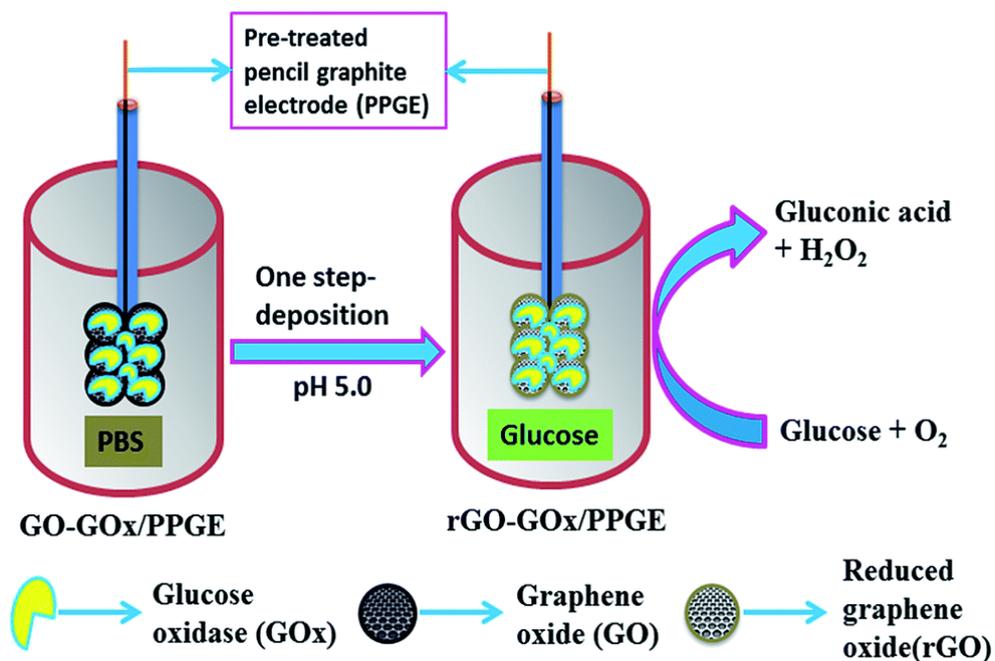


Figura 18. Mecanismo de electrodo enzimático de glucosa (Viyaraj et al., 2016).

4.4. Óxido de grafeno y transporte de moléculas: beneficios en terapia génica

El óxido de grafeno es un material flexible, con grupos funcionales capaces de ser conjugados con diferentes moléculas y con una elevada área superficial, esto permite que sea un recurso versátil y modificable para transportar moléculas con fines terapéuticos y establecer una conexión menos impedida con la célula diana. Vectorizar fármacos y moléculas de forma controlada proporciona varias ventajas de interés, como la mejora de la potencia y la eficacia terapéutica. Además, al controlar el transporte y hacer que la molécula se vea menos impedida en su transcurso hacia la diana, hace que se traduzca incluso en un mejor control de la dosis administrada, ya que supone una menor pérdida de biodisponibilidad (Singh et al., 2017).

Uno de los ámbitos que se ve muy beneficiado de esta aplicación es la terapia génica, en la que se modifica material genético de la célula del paciente para tratar enfermedades como el Parkinson o el cáncer. Esto se consigue mediante lo que llamamos transfección de genes, es decir, la introducción de material genético directamente en el núcleo celular. Para que pueda ocurrir de manera eficaz, se necesita un transportador que no someta al ADN a degradación, traspase las barreras celulares de manera segura y no se vea afectado por degradación enzimática (Singh et al., 2017; Zang et al., 2012). Este transportador se consigue combinando óxido de grafeno con polímeros como la polietirimida (Singh et al., 2017).

La polietirimida es un polímero catiónico de bajo peso molecular, cuya utilidad en la mejora de la transfección de un gen es máxima, pero presenta los inconvenientes de su toxicidad intrínseca y su baja estabilidad, por lo que su unión al óxido de grafeno se utiliza como una estrategia para aprovechar sus capacidades y eliminar sus efectos tóxicos (Song et al., 2019). Además de generar un beneficio en la llegada del gen a su diana, esta combinación admite transportar secuencias génicas mucho más grandes que la de otros transportadores ya que el óxido de grafeno, como hemos visto anteriormente, interacciona con los nucleótidos haciendo que queden unidos de manera reversible a su estructura por adsorción electrostática (Singh et al., 2017).

5. CONCLUSIONES

Tras la revisión y consulta de una serie de artículos científicos acerca de las aplicaciones biomédicas del óxido de grafeno podemos concluir:

-El aislamiento del óxido de grafeno en 2004 supuso una apertura de la comunidad científica a líneas de investigación muy diversas acerca de este compuesto, que siguen abiertas y avanzando de manera favorable.

-El óxido de grafeno es una molécula de gran versatilidad, de fácil obtención y con cualidades únicas que ofrecen diversas ventajas aplicables a multitud de ámbitos.

-La capacidad del óxido de grafeno de ser conjugado con moléculas reactivas es una propiedad altamente ventajosa en el tratamiento del cáncer con doxorubicina.

-Existe evidencia científica que fundamenta el uso de óxido de grafeno en el tratamiento de las metástasis óseas, habiéndose demostrado tanto la fijación de la molécula al hueso, como la disminución de la viabilidad celular y la distribución del fármaco *in vivo*.

-La terapia fototérmica se ve favorecida por el uso de óxido de grafeno como material absorbente de radiación NIR.

-La terapia antibacteriana es uno de los ámbitos más beneficiados por el uso de óxido de grafeno.

-Los mecanismos de detección de moléculas biológicas en los que se encuentra implicado el óxido de grafeno son procedimientos sencillos, eficaces y altamente sensibles.

-El uso de óxido de grafeno en terapia génica supone una mejora relevante en la transfección de genes, clave en el desarrollo de este método terapéutico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Chen Y, Su Y, Hu S, Chen S. Functionalized graphene nanocomposites for enhancing photothermal therapy in tumor treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016; 105: 190-204.
- Ghany NA, Elsherif SA, Handal HT. Revolution of Graphene for different applications: State-of-the-art. *Surf. Interfaces.* 2017; 9: 91-106.
- IITB Monash Research Academy [internet] 2018 [Consultado en abril de 2020] Disponible en: <http://www.iitbmonash.org/research-stories-archives/story-55/>
- Lee J, Kim J, Kim S, Min DH. Biosensors based on Graphene oxide and its biomedical application. *Ad. Drug Deliv. Rev.* 2016; 105: 275-287.
- Liu B, Salgado S, Maheshwari V, Liu J. DNA absorbed on graphene and graphene oxide: Fundamental interactions, desorption and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2016; 26: 41-49.
- Menazea AA, Ahmed MK. Synthesis and antibacterial activity of graphene oxide decorated by silver and copper oxide nanoparticles. *J. Mol. Struct.* 2020; 1218: 1-14.
- Muñoz R, Singh DP, Kumar R, Matsuda A. Graphene oxide for drug delivery and cancer therapy. En: Swain SK, Jawaid M, editor. *Nanostructured polymer composites for biomedical applications*. 1ª Edición. Estados Unidos: Elsevier; 2019. 447-488.
- Murugan C, Sharma V, Murugan RK, Malaimengu G, Sundaramurthy A. Two-dimensional cancer theranostic nanomaterials: Synthesis, surface functionalization and applications in photothermal therapy. 2019; 299: 1-20.
- Pham T, Nguyen H, Phung C, Pathak S, Regmi S, Ha D et al. Targeted delivery of doxorubicin for the treatment of bone metastasis from breast cancer using alendronate-functionalized graphene oxide nanosheets. *J IND ENG CHEM.* 2019; 76: 310-317.
- Prabhakar O, Arun K. Recent progresses and challenges in graphene based nanomaterials for advanced therapeutical applications: A comprehensive review. *Mater. Today Commun.* 2020; 22: 1-9.

- Pramanik A, Jones S, Gao Y, Sweet C, Vangara A, Begum S et al. Multifunctional hybrid graphene oxide for circulating tumor cell isolation and analysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018; 125: 21-35.
- Royal society of chemistry [Internet] 2015 [Consultado en abril de 2020] Disponible en: [.http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2015/ra/c4ra12552e](http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2015/ra/c4ra12552e)
- Safarpour H, Dehghani S, Nosrati R, Zebardast N, Alibolandi M, Mokhtarzadeh A et al. Optical and electrochemical-based nano-aptasensing approaches for the detection of circulating tumor cells (CTCs). *BIOSENS BIOELECTRON.* 2020; 148: 1-19.
- Singh D, Herrera CE, Singh B, Singh S, Singh RK, Kumar R. Graphene oxide: An efficient material and recent approach for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng.* 2017; C(86): 173-197.
- Slekiene N, Snitka V. Impact of graphene oxide functionalized with doxorubicin on viability of mouse hepatoma MH-22A cells. *Toxicol. In Vitro.* 2020; 65: 1-7.
- Smith AT, Lachance AM, Zeng S, Liu B, Sun L. Synthesis, properties, and applications of Graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. *J. Nanomater.* 2019; 1: 31-47.
- Song B, Zhang C, Zeng G, Gong J, Chang Y, Jiang Y. Antibacterial properties and mechanism of graphene oxide-silver nanocomposites as bactericidal agents for water disinfection. 2016; 604: 167-176.
- Song S, Shen H, Wang Y, Chu X, Xie J, Zhou N et al. Biomedical applications of Graphene: From drug delivery, tumor therapy to theranostics. *Colloids Surf.* 2019; 185: 1-18.
- Vijayaraj K, Hong SW, Jin SH, Chang SC, Park DS. Fabrication of a novel disposable glucose biosensor using an electrochemically reduced graphene oxide-glucose oxidase biocomposite. *Anal. Methods.* 2016; 8: 6974-6981.
- Vinothini K, Rajendran N, Munusamy M, Alarfaj A, Rajan M. Development of biotin molecule targeted cancer cell drug delivery of doxorubicin loaded k-carrageenan grafted graphene oxide nanocarrier. *MAT SCI ENG C-MATER.* 2019; C (100): 676-687.

- Wang Y, Li Z, Wang J, Li J, Lin Y. Graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends Cell Biol.* 2011; 29 (5): 205-212.
- Xia M, Xie Y, Yu C, Chen G, Li Y, Zhang T et al. Graphene based nanomaterials: the promising active agents for antibiotics-independent antibacterial applications. *J Control Release.* 2019; 307: 16-31.
- Xiong K, Liang Y, Ou-Yang Y, Wu D, Fu R. Nanohybrids of silver nanoparticles grown in-situ on a graphene oxide silver ion salt: simple synthesis and their enhanced antibacterial activity. *NEW CARBON MATER.* 2019; 34 (5): 426-433.
- Yue W, Tan Z, Li X, Liu F, Wang C. Micro/nanofluidic technologies for efficient isolation and detection of circulating tumor cells. *TRAC-TREND ANAL CHEM.* 2019; 117: 101-115.
- Zang Y, Nayak TR, Hong H, Cai W. Graphene: a versatile nanoplatform for biomedical applications. *Nanoscale.* 2012; 4: 3833-3842.
- Zhang H, Zhang H, Aldalbahi A, Zuo X, Fan C, Mi X. Fluorescent biosensors enabled by graphene and graphene oxide. *BIOSENS BIOELECTRON.* 2017; 89: 96-106.