

**Desarrollo de una nano-plataforma basada en puntos de carbono co-  
dopados con N y Gd<sup>3+</sup> como potencial agente radio-sensibilizante**

**Michelle Dahyana Soto Florido**

**Práctica de Investigación**

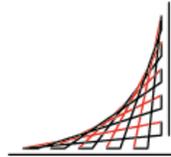
**Tutores**

**Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD**

**Alejandro Ondo Méndez, PhD**



**Universidad del  
Rosario**



**ESCUELA  
COLOMBIANA  
DE INGENIERÍA  
JULIO GARAVITO**

VIGILADA MINEDUCACIÓN

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO  
GARAVITOPROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA  
BOGOTÁ D.C

2021

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, doy gracias a mis padres Cristina Florido, Cristóbal Soto, Daniel Santana y Diana Rodríguez, y a mis hermanas Lina Florido y Stephany Soto, quienes con su fortaleza, paciencia, guía y amor me impulsan día a día. Doy gracias por las palabras de aliento, el tiempo dedicado a mí, la confianza, y el amor por la vida que me han sembrado. Todo lo que me define, he alcanzado y lograre, es y será gracias a ustedes.

Agradezco a Laura De Arco, Laura Téllez y Valeria Arias, por cada uno de los momentos vividos, por el apoyo, la dedicación, las alegrías y las angustias que compartimos a lo largo de esta hermosa carrera. Doy gracias a Juan Cárdenas y Adriana Avellaneda por estar siempre junto a mí, ser mis mejores amigos y mis más grandes confidentes.

Agradezco de corazón a mis tutores, la doctora Diana Consuelo Rodríguez Burbano y el doctor Alejandro Oyono Ondo Méndez, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia a su lado, por su continuo apoyo, por estimular mi curiosidad de conocimiento, por atender mis dudas, y por enseñarme el mundo de la investigación con tanta pasión. A Natalia Ochoa y Paula Wilches, por convertirse en un apoyo incondicional para la realización de este trabajo. A Sonia Perilla, Juan Guarín y a mis otros compañeros de Laboratorio de bioquímica, que con su tiempo y dedicación fueron partícipes de este hermoso proyecto.

Y por último a la Universidad del Rosario y a la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, por acogerme, y darme una excelente experiencia universitaria. A los administrativos, docentes y demás integrantes de cada institución, por todos los conocimientos impartidos y las oportunidades brindadas que me permitieron formarme como Ingeniera Biomédica.

## RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, y es tratado desde diferentes aproximaciones o tratamientos clínicos, buscando la eliminación o la disminución del tamaño del tumor. La radioterapia es uno de los tratamientos más usados, y tiene como objetivo inducir la muerte celular como consecuencia de las rupturas de la cadena de ADN producidas por radiación ionizante. No obstante, la radiación afecta tanto a células tumorales como a células sanas, generando efectos secundarios nocivos para el paciente. A pesar de los grandes avances en la generación de tecnologías para la radioterapia, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan concentrar la radiación en los tejidos tumorales y mitigar la interacción con los tejidos sanos. Estos efectos se pueden lograr a través del desarrollo de agentes radiosensibilizantes o radioprotectores respectivamente. Los puntos de carbono (PCs) son una opción al desarrollo de nuevas estrategias. Estas nanopartículas basadas en su mayoría por carbonos  $sp^2$  / $sp^3$  reportadas como biocompatibles, presentan estabilidad acuosa coloidal, exhiben fluorescencia, y pueden ser potencialmente usadas como base para el diseño de agentes radiosensibilizantes. Con el fin de incrementar la eficiencia de la radioterapia, en este trabajo se expone la síntesis, caracterización y estudios preliminares de citotoxicidad de una nano-plataforma basada en puntos de carbono co-dopados con N y  $Gd^{3+}$  (PC:N/ $Gd^{3+}$ ), como la fase inicial del desarrollo de un potencial agente radiosensibilizante. La incorporación del ion  $Gd^{3+}$  aumenta la densidad electrónica debido al alto número atómico de este ion y en consecuencia la probabilidad de interacción con los fotones de la radioterapia. Adicionalmente, la mayoría de los PCs exhiben una fluorescencia intrínseca en el rango UV-azul del espectro electromagnético, región donde varios fluoróforos endógenos de los tejidos humanos presentan altos coeficientes de absorción. Por tal razón se propone incluir fuentes orgánicas de nitrógeno en el proceso de síntesis, favoreciendo la generación de PCs capaces de emitir fluorescencia a mayores longitudes de onda donde la autofluorescencia de los tejidos es menor.

En este trabajo se desarrolla un protocolo de síntesis de puntos de carbono dopados con nitrógeno (PC:N) que presentan espectros de emisión desplazados a mayores longitudes de onda, alta estabilidad electrónica y por ende resistencia a la aglomeración. También este protocolo es la base para la síntesis de la nano-plataforma PC:N/ $Gd^{3+}$  para ser usada como potencial agente radio-sensibilizante, que posee propiedades ópticas similares a los PC:N. Adicionalmente, se realizan evaluaciones preliminares de citotoxicidad de los PC:N y PC:N/ $Gd^{3+}$ .

# Índice de Contenido

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1.1. Planteamiento del problema.....	7
1.2. Macroproyecto.....	8
1.3. Objetivos del Proyecto.....	8
1.3.1 Objetivo general.....	8
1.3.2 Objetivos específicos.....	8
1.4. Contribuciones.....	9
<b>2. MARCO TEORICO.....</b>	<b>10</b>
2.1 Radioterapia.....	10
2.2 Puntos de carbono.....	11
2.3 Técnicas de caracterización.....	13
Espectrofotometría UV-Vis.....	13
Espectrofotometría de fluorescencia.....	13
Potencial Z.....	13
Espectroscopía FTIR.....	14
Microscopia de fuerza atómica.....	14
Ensayo de citotoxicidad MTT.....	14
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
3.1 Síntesis y purificación de PC:N.....	15
3.2 Síntesis y purificación de los PC:N/Gd <sup>3+</sup> .....	16
3.3 Pruebas de caracterización de PC:N y PC:N/Gd <sup>3+</sup> .....	16
Espectrofotometría UV-Vis.....	16
Espectrofotometría de fluorescencia.....	17
Medición del Potencial Z.....	17
Espectroscopía FTIR.....	17
Ensayo de citotoxicidad MTT.....	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>19</b>
4.1 Síntesis y caracterización de PC:N.....	19
4.2 Síntesis y caracterización de los PC:N/Gd <sup>3+</sup> .....	24
4.3 Ensayo de Citotoxicidad MTT.....	27
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....</b>	<b>31</b>
6.1 Recomendaciones.....	31
6.2 Trabajos futuros.....	31
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>32</b>

## Índice de Ilustraciones

Figura 2.1: Diagrama sobre el fundamento de la fluorescencia y el comportamiento de los electrones al ser irradiados con un haz de fotones. ....	11
Figura 3.1: Diagrama de flujo de las etapas ejecutas para el desarrollo del proyecto. ....	15
Figura 3.2: Esquema resumen de la síntesis de los PC:N. ....	16
Figura 3.3: Esquema de la distribución de los pozos para la realización del ensayo de MTT..	18
Figura 4.1: a) Fluorescencia de PC:N sintetizados a diferentes temperaturas luego de los procesos de purificación al ser irradiados a una longitud de onda de 365 nm. b) Fluorescencia de PC:N a diferentes temperaturas redispersos en agua destilada a concentración de 50 µg/ml al ser irradiados a una longitud de onda de 365 nm. ....	19
Figura 4.2: Espectros de absorbancia de los PCs sintetizados a diferentes temperaturas. ....	20
Figura 4.3 Espectros de Emisión de los PCs sintetizados a diferentes temperaturas. ....	21
Figura 4.4: Espectros de absorbancia los PCs sintetizados a 140°C y 160°C redispersados en agua destilada a concentración de 50 µg/mL al ser irradiados con lampara de deuterio y halógeno. ....	22
Figura 4.5: Espectros de emisión de los PCs sintetizados a 140°C y 160°C redispersados en agua destilada a concentración de 50 µg/mL al ser irradiados con lampara de deuterio. ....	23
Figura 4.6: Espectroscopia FTIR de las muestras de urea, ácido cítrico y PC:N, con los grupos relacionados a cada mínimo. ....	24
Figura 4.7: Distribución de átomos que conforman los PC:N. ....	24
Figura 4.8: Espectro de absorbancia de los PC:N/Gd <sup>3+</sup> con diferentes concentraciones de Gd <sup>3+</sup> redispersados en agua destilada a concentración de 50 µg/mL al ser irradiados con lampara de deuterio y halógeno. ....	25
Figura 4.9: Espectro de emisión de los PC:N/Gd <sup>3+</sup> con diferentes concentraciones de Gd <sup>3+</sup> redispersados en agua destilada a concentración de 50 µg/mL al ser irradiados con lampara de deuterio. ....	26
Figura 4.10: Espectroscopia FTIR de las muestras de PC:N, ácido gadopentético y los PC:N/Gd <sup>3+</sup> con los grupos relacionados a cada mínimo. ....	27
Figura 4.11: Distribución de átomos de los PC:N/Gd <sup>3+</sup> ....	27
Figura 4.12: Resultados obtenidos del ensayo MTT en las líneas celulares HT29 y 3T3-L1 tras ser sometidas a la presencia de PC:N en un periodo de a) 24 horas y b) 48 horas de incubación. ....	28
Figura 4.13: Resultados obtenidos del ensayo MTT en las líneas celulares U87 y HT29 tras ser sometidas a la presencia de PC:N/Gd <sup>3+</sup> en un periodo de a) 24 horas y b) 48 horas de incubación. ....	29

## Índice de tablas

Tabla 2.1: Precursores usados como fuente de nitrógeno para la síntesis de PCs con propiedades fluorescentes en el rango amarillo-rojo del espectro electromagnético.....	12
Tabla 2.2: Precursores usados como fuente de $Gd^{3+}$ para la síntesis de PCs enfocados a aplicaciones de bioimagen, diagnóstico o tratamiento del cáncer.....	13
Tabla 2.3: Enlaces atribuidos a las diferentes frecuencias de una espectroscopia FTIR, adaptada de [54].....	14
Tabla 4.1: Valores del área bajo la curva del espectro de absorbancia para cada temperatura.....	20
Tabla 4.2: Valores del área bajo la curva de los espectros de emisión para cada temperatura.....	21
Tabla 4.3: Valores del área bajo la curva de los espectros de absorbancia de los PCs sintetizados a 140°C y 160°C redispersados en agua destilada a concentración de 50 µg/mL.....	22
Tabla 4.4: Valores del área bajo la curva de los espectros de emisión de los triplicados de los PCs sintetizados a 140°C y 160°C.....	23
Tabla 4.5: Valores del área bajo la curva de los espectros de absorbancia de los PC:N/ $Gd^{3+}$ con diferentes concentraciones de $Gd^{3+}$ .....	25
Tabla 4.6: Valores del área bajo la curva de los espectros de emisión de los PC:N/ $Gd^{3+}$ con diferentes concentraciones de $Gd^{3+}$ .....	26

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

Este capítulo presenta el contexto del proyecto, en donde se muestra la problemática de la radioterapia para el tratamiento del cáncer, los limitantes de la síntesis de los PCs, los objetivos planteados y las contribuciones de este trabajo.

### 1.1. Planteamiento del problema

El cáncer es una problemática de salud pública; según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad fue la segunda causa de muerte a nivel mundial para el año 2020 [1], registrando una incidencia de 19'292.789 y una mortalidad de 9'958.133, por otro lado, las cifras en Colombia fueron de 101.893 y 46.057 respectivamente [2]. Estas cifras a nivel mundial y nacional plantean un escenario que requiere de nuevos desarrollos técnicos o tecnológicos que potencialicen los procedimientos de diagnóstico y tratamiento.

El cáncer se desarrolla por alteraciones genéticas y/o moleculares que modifican las células, permitiéndole a las células cancerígenas evadir los procesos de regulación de crecimiento, división y muerte celular; lo que genera un aumento anormal en el número de células y da origen a los tumores[1][3].

El cáncer puede tratarse desde diferentes aproximaciones, todas con el objetivo de eliminar o disminuir el tamaño del tumor, o el de evitar el retorno de la enfermedad. Los principales tratamientos son la cirugía, usada para la extirpación total o parcial del tumor; la quimioterapia y radioterapia cuyo principal propósito es disminuir el tamaño del tumor y/o evitar el regreso del cáncer [4].

La radioterapia es un tratamiento realizado por lo menos una vez en más del 60% de los pacientes que padecen la patología [5]. En este tipo de tratamiento se deben tener en cuenta parámetros como dosis absorbida, dosis efectiva, tiempo de exposición e irradiación producida sobre el tejido sano circundante del tumor; los cuales condicionan la efectividad de la radioterapia [6].

Otro factor para tener en cuenta es el tipo cáncer a tratar. La respuesta a la radiación se refleja en el tiempo de vida media asociado a cada tipo de cáncer. Por ejemplo, el cáncer de tiroides posee una supervivencia mayor a los 5 años de acuerdo la Sociedad Americana de Oncología Clínica, pero por otro lado, el glioblastoma un tipo cáncer bastante agresivo reporta una mediana de sobrevivencia de 9 a 12 meses [7], cada una de estas medias de vida fueron evaluadas a partir de un diagnóstico temprano. Es así, que se requiere el desarrollo de nuevas estrategias que aumenten la eficiencia del tratamiento y mitiguen la radiación sobre los tejidos sanos. Entre estas estrategias se encuentran los agentes radiosensibilizantes diseñados para aumentar la eficacia de los tratamientos de la radioterapia [8], entre estos desarrollos se encuentran los PCs.

Los PCs fueron observados por primera vez en 2004 [9], llamando la atención de la comunidad científica debido a sus propiedades ópticas de fluorescencia [10], [11], es decir, que al ser irradiados con luz UV-Vis absorben esta energía en forma de radiación electromagnética para posteriormente emitir luz de menor energía [12]. En la literatura existen un gran número de ejemplos de PCs que exhiben espectros de emisión en el ancho de banda de 475 nm a 550 nm (azul y verde) [13]. Sin embargo, las propiedades ópticas pueden modificarse en dependencia de los precursores usados en la síntesis, esta cualidad permite la

exploración del uso de los PCs en diferentes aplicaciones biomédicas como biodetección, bioetiquetado y bioimagen [14] donde se requieren emisiones en mayores longitudes de onda para evitar la autofluorescencia endógena de los tejidos. Estos desplazamientos en las emisiones de fluorescencia se logran con la incorporación de precursores orgánicos que posean especies nitrogenadas, debido a la adición de orbitales libres generados por la introducción del nitrógeno [11].

Los precursores usados en la síntesis no solo modifican las propiedades ópticas sino también las fisicoquímicas, es así como los PCs pasaron a ser parte del desarrollo de estrategias para potencializar los tratamientos contra el cáncer, como es el caso de Liao et al, que proponen dopar los PCs con Gadolinio ( $Gd^{3+}$ ) para ser usados en tratamientos de radioterapia guiada por resonancia magnética (IRM) [15].

En base a lo anterior en este proyecto se sintetizan PCs dopados con nitrógeno (N) que sean capaces de emitir fluorescencia a mayores longitudes de onda evitando así la autofluorescencia endógena de los tejidos. Y la síntesis de PCs codopados con N y  $Gd^{3+}$  (PC:N/ $Gd^{3+}$ ) que sean potencialmente viables para el desarrollo de nuevas estrategias que mejoren los efectos de la radioterapia.

## 1.2. Macroproyecto

Este trabajo hace parte del proyecto sobre ***“Estudios metabolómicos de cáncer de mama, gliomas y tiroides: una aproximación a la identificación de biomarcadores de riesgo y a la intervención con nanotecnología”*** perteneciente a la convocatoria 874 de Jóvenes Talento de MinCiencias. Este macroproyecto tiene 2 partes generales de trabajo, uno es el estudio de los perfiles metabolómicos de cáncer de mama, gliomas y tiroides. Y por otro lado el diseño de nanoplataformas como una estrategia de potencialización de los efectos de la radioterapia, además de un posible mecanismo para el tratamiento de los tipos de cáncer con alta radioresistencia o heterogeneidad. Es en el marco de esta segunda parte donde se genera el desarrollo de este proyecto.

## 1.3. Objetivos del Proyecto

### 1.3.1 Objetivo general

Desarrollar una nano-plataforma basada en puntos de carbono co-dopados con N y  $Gd^{3+}$  (PC:N/ $Gd^{3+}$ ), como fase inicial para el desarrollo de un agente radiosensibilizante que potencie la radioterapia.

### 1.3.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar y optimizar un protocolo de síntesis de puntos de carbono dopados con N (PC:N) por medio del método solvotermal.
2. Sintetizar puntos de carbono co-dopados con N y  $Gd^{3+}$  (PC:N/ $Gd^{3+}$ ) por medio del método solvotermal.
3. Caracterizar las propiedades ópticas y fisicoquímicas de los PC:N y PC:N/ $Gd^{3+}$ .
4. Realizar ensayos preliminares de citotoxicidad para evaluar la biocompatibilidad de los PC:N y PC:N/ $Gd^{3+}$  sintetizados.

#### 1.4. Contribuciones

En este trabajo se determinó que la síntesis por medio del método solvotermal, usando urea, ácido cítrico y formamida como precursores, permite la obtención de PCs con diferentes comportamientos en el espectro de emisión al variar la temperatura de reacción. Se comprueba que el protocolo de síntesis desarrollado, con temperatura de reacción de 160°C permite la obtención de PC:N con bandas de absorción de 200 nm a 600 nm, y bandas de emisión en el rango de 300 nm a 700 nm. Los PC:N poseen alta estabilidad electrónica, abriendo así nuevas posibilidades para el desarrollo de tecnologías enfocadas a bioimagen. Por otro lado, se estableció que la síntesis de PCs a partir del protocolo desarrollado y la incorporación del ion  $Gd^{3+}$ , es efectiva para obtención de PC:N/ $Gd^{3+}$  con bandas de absorción de 200 nm a 550 nm y bandas de emisión en el rango de 300 nm a 700 nm, que son una base para el desarrollo de un potencial agente radiosensibilizante. Adicionalmente, se evidencio la necesidad de realizar procesos de purificación rigurosos, para que los PCs puedan ser aplicados en el estudio de pruebas celulares *in vitro*.

## Capítulo 2

### MARCO TEORICO

Este capítulo se profundizan los conceptos relacionados a la radioterapia y las propiedades de los PCs. Se hace una revisión sobre los compuestos usados como fuente de N y el ion  $Gd^{3+}$  y las técnicas de caracterización de las propiedades ópticas y fisicoquímicas de los PCs.

#### 2.1 Radioterapia

El uso de la radiación ionizante como tratamiento para el cáncer está reportado desde principios del siglo XX [16]. La radioterapia convencional o de haz externo es un tratamiento basado en emitir un haz de alta energía en forma de fotones de rayos X o rayos Gamma o partículas como protones, electrones y neutrones sobre el tejido de interés, alterando de manera nociva las células tumorales [17].

La radioterapia tiene como objetivo afectar estas células por medio de tres fases [18] :

- La fase física, donde la radiación ionizante producida por el haz de alta energía excita los electrones de los átomos, separándolos de los orbitales atómicos [6].
- La fase fisicoquímica, que se da por medio de dos efectos. El efecto directo donde la radiación afecta directamente a la molécula de ADN generando rupturas en la cadena y el efecto indirecto donde la afectación se da principalmente sobre las moléculas de agua generando así radicales libres como el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) que posteriormente provocaran rupturas en la molécula de ADN.
- La fase biológica donde se desarrollan alteraciones en los tejidos biológicos a causa de las afectaciones en el ADN y se inician los procesos de muerte celular [19].

Este tratamiento no funciona en la misma proporción para todos los tipos de cáncer, la ley de Bergonié y Tribondeau introducen el termino de radiosensibilidad y a su vez el de radioresistencia. Estos términos son referentes al efecto que genera la radioterapia sobre los tejidos. La radioresistencia es característica de cada tejido y se determina por la cantidad de células eliminadas tras la radiación, el daño generado a la molécula de ADN y la capacidad de proliferación de las células remanentes [20], [21].

Por otro lado, la radioterapia se aplica teniendo en cuenta la dosimetría requerida. Este es el estudio de la distribución de la dosis que recibirá el paciente, teniendo en cuenta la dirección del haz de alta energía, el tamaño del tumor, los tiempos de exposición y las sesiones a realizar, con la finalidad de garantizar la mayor absorción por parte del tumor y minimizar la afectación a los tejidos circundantes [22].

Sin olvidar los mecanismos y nuevas tecnologías alrededor de este tipo de tratamiento, la radioterapia continúa presentando algunos limitantes. Se sigue presentando irregularidad en el tratamiento debido al agendamiento de las citas, estas sesiones pueden llegar a ser diarias y demandan mucho tiempo, se producen erupciones en la piel semejantes a quemaduras (toxicidad cutánea), daño en los tejidos sanos circundantes al tumor debido a la sobrexposición de la radiación y la irradiación que no interactúa con el tumor termina irradiando tejidos sanos ubicados detrás de este [23], [24]. En consecuencia, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que minimicen la radiación sobre los tejidos sanos y que garanticen la mayor irradiación en el tejido tumoral.

Los agentes radiosensibilizadores forman parte de los desarrollos que aumentan o potencializan los efectos de la radioterapia. Estos son principalmente medicamentos como el metronidazol y estrategias como la respiración de carbogen u oxígeno hiperbárico, que parten del hecho de que el oxígeno propicia la generación de peróxidos de hidrogeno y a su vez se garantiza mayor irradiación sobre los tejidos [8]. Dado que aún existen restricciones en el uso de este tipo de medicamentos por los efectos secundarios que generan. Por ende, las nanopartículas (principalmente estructuras basadas en zinc, silicio, oro y plata) surgen como una nueva mecanismo para la potencialización de aplicaciones como radioterapia y fotodinámica, abriendo nuevas bases para el desarrollo de estrategias que continúen reduciendo los limitantes que presentan estos tipos de tratamientos [25].

## 2.2 Puntos de carbono

Desde su descubrimiento los puntos de carbono (PCs) atrajeron el interés de la comunidad científica debido a sus propiedades fluorescentes. Fluorescencia es el fenómeno óptico exhibido por materiales que al ser irradiados con luz UV-Vis, los electrones ubicados en niveles de energía menor, absorben esta radiación electromagnética, generando transiciones hacia niveles desocupados de mayor energía, seguido de un periodo de relajación en el que vuelven a estados energéticos de menor energía. Es durante estas transiciones de retorno que la energía se libera en forma de fotón con longitud mayor de onda, como se observa en la Figura 2.1 [26].

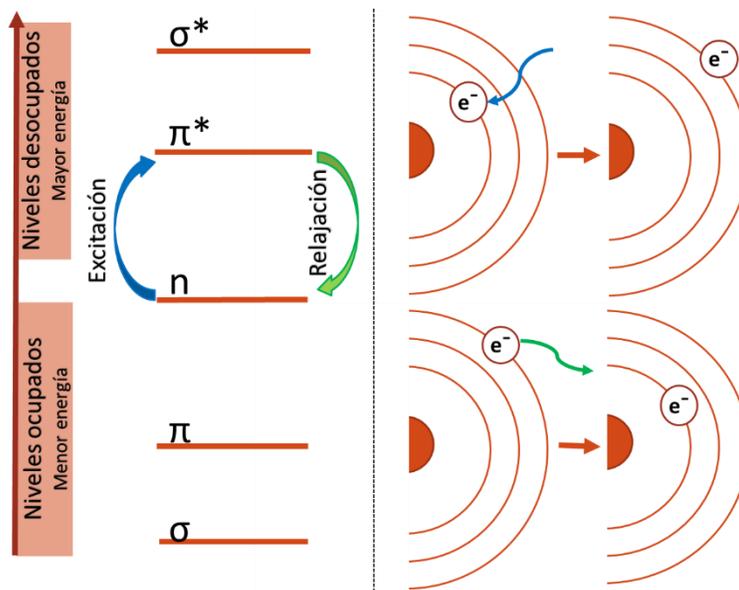


Figura 2.1: Diagrama sobre el fundamento de la fluorescencia y el comportamiento de los electrones al ser irradiados con un haz de fotones.

Además de sus propiedades ópticas de absorción y fluorescencia, los PCs son estructuras basadas en carbonos  $sp^2$  / $sp^3$  reportados por exhibir una alta biocompatibilidad, estabilidad fisicoquímica y una baja toxicidad [27]. Estos pueden ser sintetizados desde diferentes precursores y métodos. Uno de estos, es el método solvotermal que se basa en el uso de precursores orgánicos que reaccionan a altas temperaturas. Este es un método económico que permite obtener un volumen mayor de reacción con respecto a otros métodos [28].

En un principio la síntesis se enfocó en los PCs capaces de emitir en longitudes relacionadas al UV-azul y UV-verde, pero para los tratamientos o aplicaciones dependientes de la fluorescencia este rango de emisión es una limitante [29], debido a que en este ancho de banda se produce la autofluorescencia endógena de los tejidos [30]. En consecuencia, para

que los PCs sean la base para nuevos desarrollos en la obtención de biomágenes multimodales, bioetiquetado e incluso para nuevas tecnologías enfocadas al diagnóstico o el tratamiento del cáncer, es necesario modificar sus propiedades ópticas [31], y hacerlos capaces de emitir en diversas longitudes de onda, desde el UV hasta el infrarrojo cercano [32], [33]. Estas propiedades pueden obtenerse por medio del dopaje o la funcionalización de los PCs con diferentes elementos.

Entre estos elementos que modifican las propiedades ópticas de los PCs se encuentra el nitrógeno (N), que en concordancia con las transiciones asociadas a los enlaces C–N se generan desplazamientos en el espectro de emisión hacia longitudes de onda mayores a los 600 nm, disminuyendo así el efecto de la autofluorescencia endógena de los tejidos [11]. Haciendo una revisión en la literatura sobre síntesis de PCs con longitudes de onda en emisión ( $\lambda_{em}$ ) desplazados sobre los 600 nm. Se recopila la información mostrada en la Tabla 2.1, donde se determina que los precursores usados frecuentemente como fuentes de N son la urea y ácido cítrico.

Tabla 2.1: Precursores usados como fuente de nitrógeno para la síntesis de PCs con propiedades fluorescentes en el rango amarillo-rojo del espectro electromagnético.

$\lambda_{em}$ (nm)	Precursores	Solvente	Método de síntesis	Referencia
625	O-Fenilendiamina, selenourea	Agua Milli Q	Hidrotermal	[34]
530	Urea, ácido cítrico	HCl	Hidrotermal	[35]
620	Urea, ácido cítrico	N,N dimetilformamida	Solvotermal	[36]
550	Urea, ácido l-tartárico	N,N dimetilformamida	Solvotermal	[37]
600	Tiourea, ácido cítrico	N,N dimetilformamida	Solvotermal	[38]
510-620	Urea, ácido cítrico	N,N dimetilformamida	Solvotermal	[39]
540	Urea, ácido cítrico	H <sub>2</sub> O destilada	Microondas	[40]
630	Urea, ácido cítrico	Formamida	Solvotermal	[41]

Para potencializar la radioterapia, se requiere aumentar la probabilidad de interacción con los electrones y a su vez los efectos que esto conlleva. En concordancia con esto, los PCs permiten ser dopados con elementos que poseen un alto número atómico como lo es el gadolinio, un lantánido que es usado como elemento de contraste en resonancias magnéticas [42]. Se espera que el gadolinio aumente la densidad electrónica de los PCs garantizando una mayor absorción celular de la radiación y aumentando la radiosensibilidad de las células tumorales [43]. La Tabla 2.2. muestra algunos desarrollos basados en PCs dopados con Gd<sup>3+</sup> para generar comportamientos similares a los elementos de contraste en tratamientos contra el cáncer. Además, se identifica que el Gd<sup>3+</sup> es un elemento que se adiciona a los PCs en concentraciones del 2% al 25%.

Tabla 2.2: Precursores usados como fuente de  $Gd^{3+}$  para la síntesis de PCs enfocados a aplicaciones de bioimagen, diagnóstico o tratamiento del cáncer.

Fuente de $Gd^{3+}$	Precursores	Aplicación objetivo	Referencia
Nitrato de gadolinio hexahidratado	p-fenilendiamina Ácido cítrico	Mejorar la radioterapia en cáncer de pulmón	[43]
Nitrato de gadolinio (III)	p-fenilendiamina	Terapia fotodinámica guiada por IRM	[44]
Gadobutrol	Ácido cítrico, etilendiamina	Bioetiquetado de carcinoma por IRM	[45]
Ácido gadopentético	L-arginina	Mejora de la IRM	[46]
Cloruro de gadolinio	Ácido cítrico	IRM	[47]
Cloruro de gadolinio	Ácido cítrico, etanodiamina	Intervención cardiaca guiada por IRM	[48]
	Ácido cítrico, urea,	Fluorescencia roja e IRM	[49]
	Etilendiamina, Ácido dihidroxihidrocínamico	Uso en IRM, administración de fármacos y quimioterapia fototérmica	[50]
	N-acetil-L-cisteína, citrato de sodio	IRM y terapia de ablación fototérmica	[51]

### 2.3 Técnicas de caracterización

Para determinar las propiedades ópticas, fisicoquímicas y biológicas de los PCs se emplean diversas técnicas de caracterización. Que permiten establecer la diversidad de comportamientos fluorescentes y fisicoquímicos que presentan estas nanopartículas. Es importante tener en cuenta que en dependencia de los precursores y el método de síntesis usado los PCs, estos describen diferentes comportamientos y las técnicas mencionadas a continuación permiten recolectar información sobre dichas nanoestructuras. Algunas de esas técnicas y sus fundamentos son descritas a continuación:

#### Espectrofotometría UV-Vis

Es una técnica que mide las longitudes de ondas del espectro visible que son absorbidas por una muestra. La muestra se irradia de manera continua, y si parte de la radiación es absorbida, en el espectro residual se detectan vacíos o huecos esto se conoce como espectro de absorbancia. Esto ocurre solo si la energía del fotón que colisiona con la molécula coincide con la energía requerida para que sus electrones sean promovidos de sus orbitales basales hacia orbitales desocupados de mayor energía[52], [53].

#### Espectrofotometría de fluorescencia

Esta técnica mide la energía emitida de las moléculas cuando los electrones retornan a los orbitales basales tras haber sido irradiados por un haz de energía electromagnética, el equipo detecta la los fotones emitidos a diferentes longitudes de onda y de esta manera se genera el espectro de emisión [54].

#### Potencial Z

Se refiere a la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y las capas de iones que rodean a la partícula dispersa en un solvente, indicando el potencial que se requiere para desestabilizarla. Los valores obtenidos de esta medición ofrecen información sobre la estabilidad de las partículas y su tendencia a la aglomeración. El valor máximo determina el potencial de la superficie [55], [56].

## Espectroscopia FTIR

El análisis infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) usa longitudes de onda entre 2.500 nm y 25.000 nm para irradiar la muestra, parte de esta energía la atraviesa, y es recibida con algunas alteraciones. A esta alteración se le conoce como huella, y es específica de cada tipo de muestra. Los niveles de energía de la radiación coinciden con las frecuencias vibratorias de los enlaces en las moléculas covalentes [57].

Esta técnica es fuertemente usada para determinar la información estructural de la muestra, en la Tabla 2.3 se puede observar los enlaces atribuidos a cada frecuencia de vibración [53]. Esta información será la base para el análisis de este tipo de caracterización.

Tabla 2.3: Enlaces atribuidos a las diferentes frecuencias de una espectroscopia FTIR, adaptada de [53].

Enlace	Tipo de vibración	Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )
N-H	Primarias y secundarias de amidas y aminas	3500-3100 Streching 1640-1550 blending
O-H	Ácidos carboxílicos	3400-2400
C-H	Enlaces $\text{CH}_3$	1450-1375
C=O	Carbonilos	1800-1650
C=C	Aromáticos	1600 y 1475
C-O	Amidas Ácidos carboxílicos	1680-1630 1300-1000
C-N	Aminas	1350-1000

## Microscopia de fuerza atómica

Es una técnica de medida superficial que hace uso de un microscopio de fuerza atómica. Este instrumento tiene una punta afilada al final con un voladizo, que responde a la fuerza de atracción y repulsión de la superficie, es decir, se ve atraída hacia ella y se repele cuando se encuentra muy cerca. Los movimientos del voladizo se detectan por medio de la incidencia de un láser y un sensor fotosensible que recibe la señal reflejada por el voladizo. El instrumento se desplaza sobre la muestra para leer la topología de la misma y se obtiene la imagen con resolución a nano escala [58], [59].

## Ensayo de citotoxicidad MTT

Es una técnica que mide el metabolismo mitocondrial, el cual está altamente relacionado con la viabilidad celular. Las células son sometidas a la presencia del compuesto MTT (bromuro de 3,3,4-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio) el que es reducido por las mitocondrias y se generan cristales de formazan. Dichos cristales reflejan la densidad óptica, la cual está directamente relacionada con la viabilidad celular, permitiendo la evaluación de la citotoxicidad [60],[61].

## Capítulo 3

### METODOLOGÍA

Para el cumplimiento de los objetivos se plantean 3 etapas. En la Figura 3.1, se muestra el diagrama de flujo propuesto para el desarrollo del proyecto. En este se establece como primera etapa la síntesis de puntos de carbono dopados con N (PC:N), en esta etapa se optimiza la temperatura de reacción. Segundo, se inicia la síntesis de los puntos de carbono codopados con N y el ion gadolinio ( $Gd^{3+}$ ), variando la concentración de gadolinio. Posteriormente se caracterizan los PC:N y PC:N/ $Gd^{3+}$ , evaluando la afectación que produce la introducción del gadolinio en las propiedades ópticas y fisicoquímicas. Por último, se realizan los ensayos preliminares de citotoxicidad.

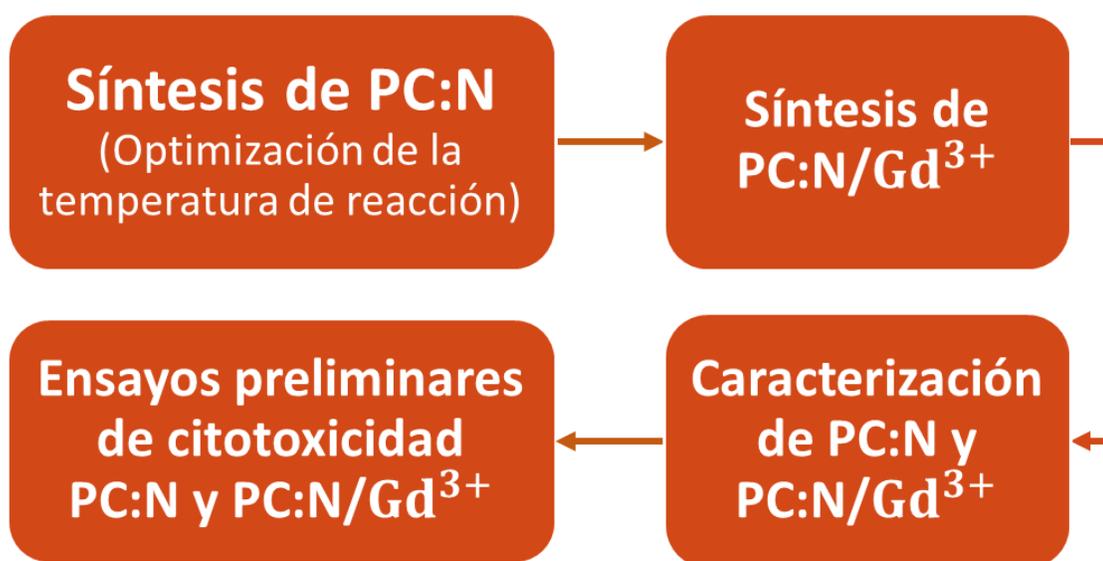


Figura 3.1: Diagrama de flujo de las etapas ejecutadas para el desarrollo del proyecto.

#### 3.1 Síntesis y purificación de PC:N

Los PC:N se sintetizan a partir del método solvotermal en un recipiente de teflón de 100 mL y una autoclave. Los precursores orgánicos son ácido cítrico (Sharlau) como fuente de carbono (C), urea (Sigma-Aldrich) como fuente de nitrógeno y formamida (Sigma-Aldrich) como solvente. En la Figura 3.2 se muestra el esquema de síntesis purificación propuesto para la preparación de los puntos de carbono dopados con N.

Para la síntesis de PC:N se dispersa urea y ácido cítrico en una relación en masa 1:1 en 15 mL de formamida [41]. Esta mezcla se homogeniza por sonicación por 10 min y luego se introduce al reactor por un periodo de 12 horas variando la temperatura de reacción. La temperatura óptima de reacción se determinó a partir de las propiedades ópticas de los PCs. Para esto se evaluaron las propiedades de absorción y fluorescencia de los PC obtenidos en un rango de temperatura de 100°C a 200°C. Al término de la reacción, el producto obtenido se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Para su purificación, la mezcla se centrifuga a 4000 rpm por 20 min seguido de dos procesos de centrifugado a 10000 rpm por 10 min, manteniendo el sobrenadante de la mezcla después de cada ciclo de centrifugado.

El sobrenadante se filtra (filtro de 0.20µm Sartorius, PTFE) y el filtrado se mezcla con agua ultrapura Milli-Q en una relación 1:1 (vol:vol). La homogenización de esta mezcla se realiza por sonicación. El filtrado se somete a un proceso de separación por cromatografía de columna, para separar los fluoróforos libres, los elementos que no fueron participes de la reacción y los elementos de mayor tamaño de los PCs. La columna se prepara en una pipeta Pasteur de 150mm (Brand), con lana de vidrio como tapón, gel de silica (Sigma-Aldrich) como fase estacionaria y una solución de agua ultrapura Milli Q y acetonitrilo (Sigma-Aldrich) en concentración 1:1 como eluyente [62]. La solución que pasa por la columna de cromatografía de 6 cm, se separa en diferentes recipientes, se seleccionan los recipientes de interés de acuerdo con la fluorescencia que presentan al ser irradiados a una longitud de onda de 365nm, y teniendo en cuenta que primero saldrán fluoróforos libres, luego los PCs y por último, los elementos de mayor tamaño o elementos que no reaccionaron. La solución correspondiente a los PC:N se filtra en un filtro de 0.20µm y se secan en un horno convencional a 100°C por 10 horas.

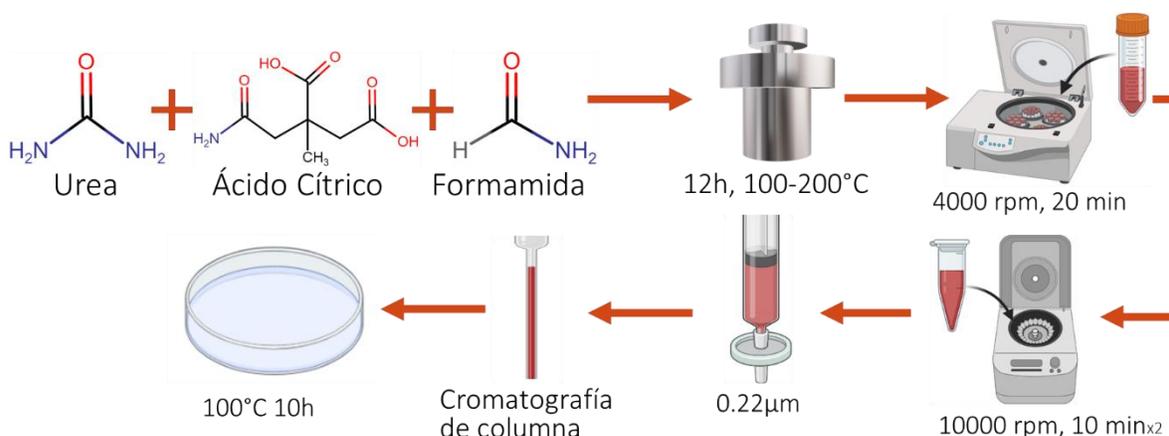


Figura 3.2: Esquema resumen de la síntesis de los PC:N.

### 3.2 Síntesis y purificación de los PC:N/Gd<sup>3+</sup>.

Los PC:N/Gd<sup>3+</sup> se sintetizan siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.1, se usan los mismos precursores y como fuente de Gd<sup>3+</sup> se introduce ácido gadopentético (Sigma-Aldrich), variando la concentración de este con respecto al peso del ácido cítrico en 5%, 10% y 20%, las diferentes concentraciones se varían con respecto a la revisión de la literatura sobre el dopado con Gd<sup>3+</sup>. La reacción se lleva a cabo a 160°C por 12 horas. Estas reacciones se purifican siguiendo los procesos de centrifugado, filtrado y cromatografía de columna, y posteriormente se secan por 10 horas a 100°C en un horno convencional, obteniendo así una masa conocida de PCs.

### 3.3 Pruebas de caracterización de PC:N y PC:N/Gd<sup>3+</sup>

#### Espectrofotometría UV-Vis

Cada reacción de PCs sintetizados secos se dispersan en agua destilada y filtrada a una concentración de 50 µg/mL (volumen total: 2 mL). Los espectros de absorción de estas muestras se miden usando un espectrofotómetro Flame-S-XR1-E y como fuentes de irradiación las lámparas de deuterio y halógeno. La muestra se ubica en una celda de cuarzo de paso de luz de 1 cm. Los datos se adquieren por el software Ocean View, y se procesan por medio del software OriginLab.

## **Espectrofotometría de fluorescencia**

Las soluciones dispersas se ubican en una celda de cuarzo y se irradian con una lámpara de deuterio, los espectros de emisión se miden por medio del espectrofotómetro Flame-S-XR1-ES, estas mediciones se realizan en un rango de longitud de onda de 200 nm a 800 nm. Los datos se adquieren por el software Ocean View, y procesan por medio del software Origin Lab.

Las caracterizaciones anteriores permitieron identificar que temperatura de reacción mostró las condiciones ópticas más favorables para la obtención de PCs dopados con N (PC:N). Y que concentración de  $Gd^{3+}$  indica la mayor introducción del ion en la nanoestructura (PC:N/ $Gd^{3+}$ ), a estas soluciones se les completa los esquemas de caracterización.

## **Medición del Potencial Z**

Se dispersan los PC:N sintetizados a 160°C secos a una concentración de 1 mg/mL en Agua destilada, y se realiza la medición por medio del equipo Gama Zetasizer Advance (Malvern Panalytical), la cual se realiza por triplicado y por último se interpretan los resultados.

## **Espectroscopía FTIR**

Los espectros infrarrojos de los PC:N y PC:N/ $Gd^{3+}$  y precursores de C y N se miden en un espectrómetro ThermoScientific Nicolet iS5 FTIR. Los datos son procesados con el software OMNIC y Origin Lab. Las muestras se analizan después del proceso de secado.

## **Ensayo de citotoxicidad MTT**

Se siembran células 3T3-L1 (fibroblastos), HT29 (células derivadas de cáncer de colon) y en una placa de 96 pozos (10000 células por pozo) y se incuban a 37°C en un ambiente de 5% de  $CO_2$ . Se realiza una solución madre con la disolución de medio (suero fetal bovino y DMEM) y PC:N a concentraciones de 50, 125, 250 y 500  $\mu g/mL$  de PC:N en un volumen total de 1.2 mL. Esta solución se divide en 6 pozos de la placa para realizar los ensayos por triplicado de cada línea celular. En dicha placa también se siembran los pozos de control negativo (células en medio), el Background (DMSO) (Figura 3.3), y en otra placa los controles positivos (células con peróxido 1.5% mv), Todas las células se incuban por un periodo de 24h. Luego se agrega 20  $\mu L$  de solución MTT y se incuban por 4h a 37°C. Pasado el tiempo se retira el MTT y se adiciona 200  $\mu L$  de DMSO (de acuerdo a Ran Chen [63]). Se mide el espectro de absorción (560-670 nm) de la placa por medio de un Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek), se repite el proceso anterior en líneas celulares que se incuban por un periodo de 48h.

La evaluación de los PC:N/ $Gd^{3+}$  se realiza siguiendo el proceso anterior, pero en las líneas celulares 3T3-L1 y U87 (células derivadas de glioblastomas), Los resultados se analizaron, teniendo en cuenta la relación directa entre la densidad óptica y la viabilidad celular.

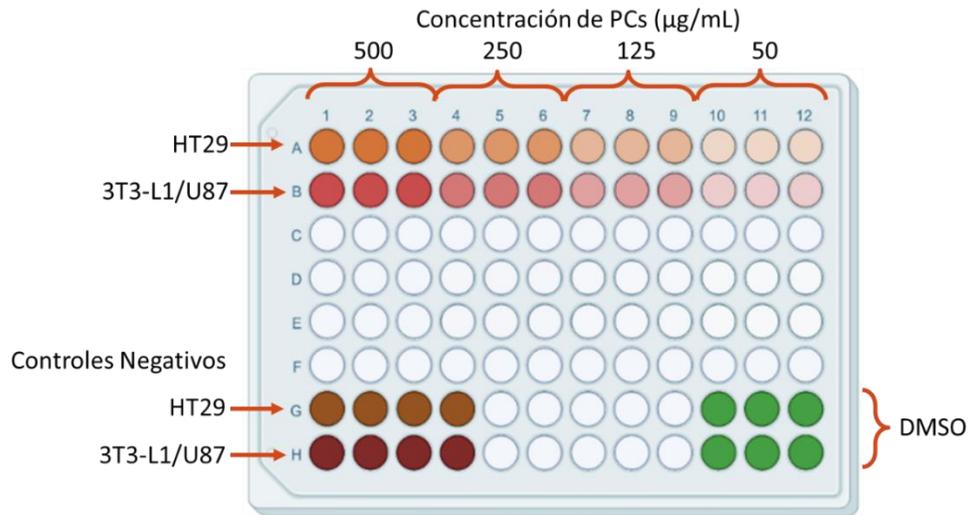


Figura 3.3: Esquema de la distribución de los pozos para la realización del ensayo de MTT.

## Capítulo 4

# RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se presentan los resultados de la síntesis y caracterización de los PC:N Y PC:N/Gd<sup>3+</sup> con sus respectivos análisis.

### 4.1. Síntesis y caracterización de PC:N

Para la síntesis de PC:N se varía la temperatura de reacción con el objetivo de determinar un protocolo óptimo para la obtención de PC:N con espectros de emisión desplazados hacia longitudes de onda mayores a los 600 nm. La variación de la temperatura de reacción representa cambios en los comportamientos ópticos de los PCs obtenidos. Como se observa en la Figura 4.1.a, donde las reacciones sintetizadas a diferentes temperaturas, tras el proceso de purificación muestran diferentes comportamientos ópticos al ser irradiadas a una longitud de onda de 365 nm. También en la misma figura se observa que al dispersar los PC:N en agua destilada a concentración de 50 µg/mL, todas las reacciones expresan fluorescencia azul (Figura 4.1.b) lo que nos está indicando la presencia significativa de partículas fluorescentes a base de carbono en cada una de las reacciones.

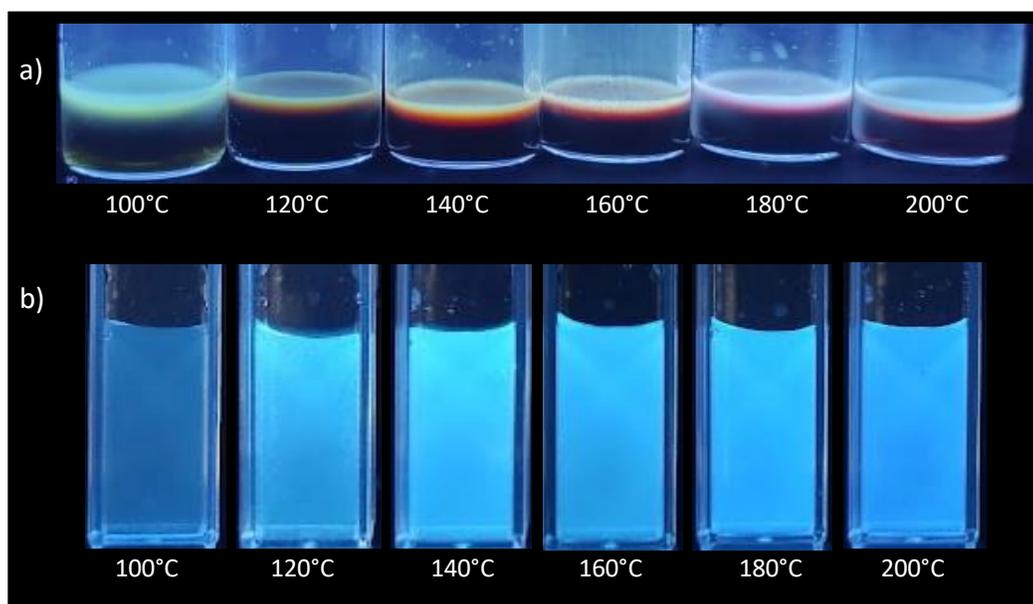


Figura 4.1: a) Fluorescencia de PC:N sintetizados a diferentes temperaturas luego de los procesos de purificación al ser irradiados a una longitud de onda de 365 nm. b) Fluorescencia de PC:N a diferentes temperaturas dispersos en agua destilada a concentración de 50 µg/mL al ser irradiados a una longitud de onda de 365 nm.

A las muestras dispersadas en agua destilada, de las diferentes temperaturas de reacción usadas, se le miden los espectros de absorción. Los resultados se muestran en la Figura 4.2 donde se puede observar todas las temperaturas presentan una banda de 200 nm a 300 nm, atribuida con la transición electrónica  $\pi \rightarrow \pi^*$ , transiciones asociadas al enlace C=C, característico de los PCs. En el rango de 300 a 400 nm, las muestras obtenidas a las temperaturas de 100 a 160°C presentan bandas atribuidas a transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  afines a los enlaces -C=O y -C.N, lo que confirma que a estas temperaturas se favorece la introducción de

especies atómicas de N y O a la nanoestructura. A temperaturas mayores a 160 no se evidencian bandas definidas asociadas a transiciones  $n \rightarrow \pi^*$ , las interacciones en estas temperaturas pueden ser menores y debido a esto el máximo de 300 a 400 nm no está definido.

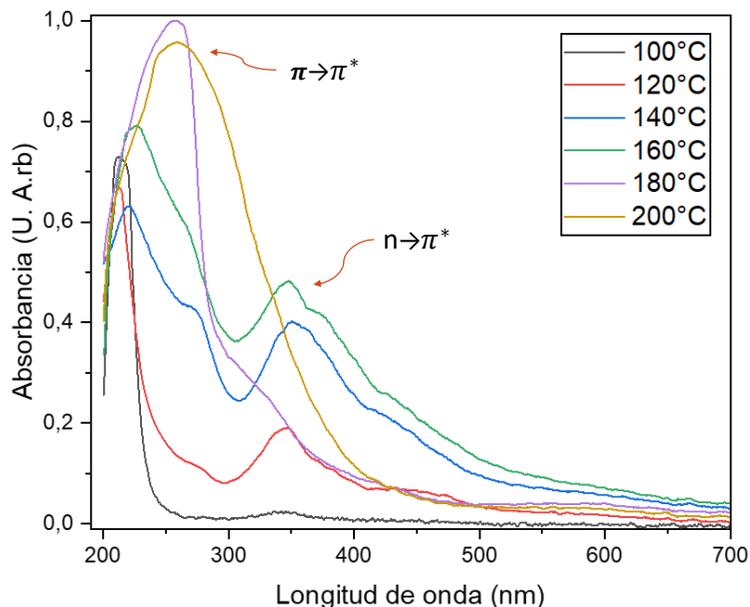


Figura 4.2: Espectros de absorción de los PC:N sintetizados a diferentes temperaturas dispersados en agua destilada a concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  al ser irradiados con lámpara de deuterio y halógeno.

El área bajo la curva es un parámetro que nos indica que temperatura es la que presenta mayor interacción de fotones de luz UV-Vis con los PC:N. La Tabla 4.1 contiene el valor de este parámetro para cada temperatura calculado por medio del software OriginLab, allí se puede determinar que las temperaturas con mayores interacciones y el máximo definido en el ancho de banda de 300 nm a 400 nm son la de 140°C y 160°, con un valor de 252,92 y 321,57 respectivamente.

Tabla 4.1: Valores del área bajo la curva del espectro de absorción para cada temperatura.

Temperatura (°C)	Área bajo la curva
100	47,97
120	112,35
140	252,92
160	321,57
180	250,62

Los espectros de emisión de los PC:N sintetizados a diferentes temperaturas se muestran en la Figura 4.3, donde el aumento de la temperatura refleja un aumento de la intensidad en el espectro de emisión, además se observa que la temperatura de 160° es la que muestra mayor intensidad. Por otro lado, a medida que se aumenta la temperatura también se observa un corrimiento en la banda de emisión hacia valores superiores a los 600 nm. Indicando la generación de fotones en longitudes de onda superiores donde la absorción de los fluoróforos endógenos es mínima.

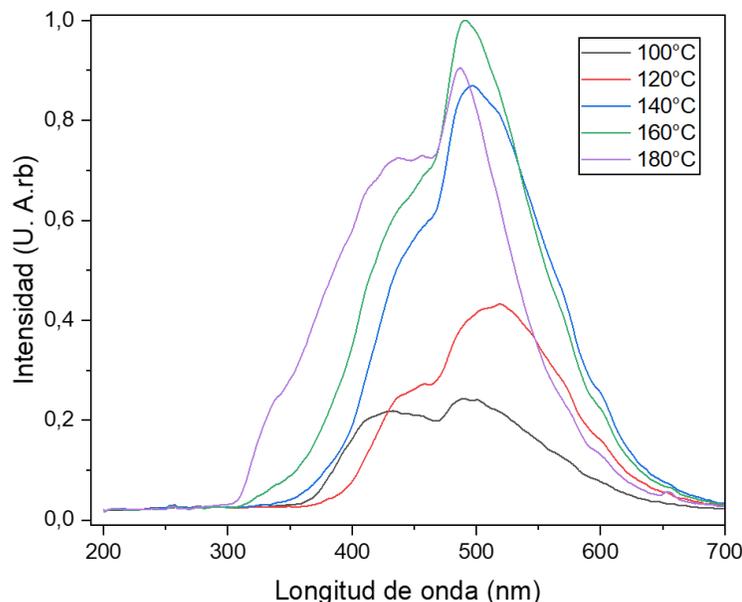


Figura 4.3 Espectros de Emisión de los PCs sintetizados a diferentes temperaturas dispersados en agua destilada a concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  al ser irradiados con lampara de deuterio.

Las reacciones de 140°C y 160°C muestran mayor intensidad de fluorescencia por lo que se mide el área bajo la curva dada en unidades arbitrarias, para determinar la temperatura que presenta mayor intensidad total de emisión (Tabla 4.2). Aunque la temperatura de reacción de 180°C muestra mayor área total bajo la curva, esta temperatura de reacción no presenta desplazamiento significativo hacia las longitudes de onda mayores a los 600 nm. Es así como se determina que las reacciones a temperaturas de 140 °C y 160°C son las que presentan las condiciones más favorables para la síntesis de PCs dopados con N, debido a que poseen áreas bajo la curva de 132,68 y 149,78 respectivamente, y por muestran los mayores desplazamientos del espectro de emisión a longitudes de onda superiores a los 600 nm.

Tabla 4.2: Valores del área bajo la curva de los espectros de emisión para cada temperatura.

Temperatura (°C)	Área bajo la curva
100	49,81
120	73,26
140	132,68
160	149,78
180	153,49

De acuerdo con los resultados anteriores se procedió a realizar el triplicado de las reacciones a temperatura de 140°C y 160°C, debido a que presentan los comportamientos ópticos más favorables para la obtención de PC:N. Como los espectros de los triplicados mostraron comportamientos similares se procede a evaluar el gráfico que muestra la mayor absorción e intensidad en el espectro de emisión. En la Figura 4.4 se observa que persiste la presencia de especies nitrogenadas en ambas temperaturas de reacción, dado que se encuentra el máximo en el ancho de banda de 300 nm a 400 nm relacionado a las transiciones electrónicas  $n \rightarrow \pi^*$ . La evaluación del área bajo la curva se hace dividiendo los

datos en 5 áreas para establecer cuál de estas reacciones posee mayor absorción de luz UV-Vis en el ancho de banda de 300 a 400 nm. En la Tabla 4.3 se muestra que la temperatura de reacción de 160°C es la que posee mayor interacción en dicho ancho de banda con un valor de área bajo la curva de 61,46.

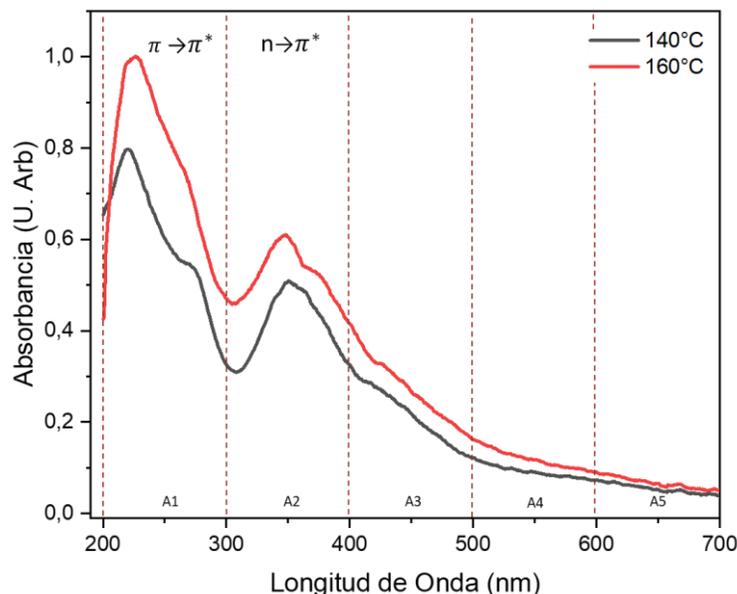


Figura 4.4: Espectros de absorción los PCs sintetizados a 140°C y 160°C dispersados en agua destilada a concentración de 50 µg/mL al ser irradiados con lámpara de deuterio y halógeno.

Tabla 4.3: Valores del área bajo la curva de los espectros de absorción de los PCs sintetizados a 140°C y 160°C dispersados en agua destilada a concentración de 50 µg/mL.

Área bajo la curva					
Temperatura (°C)	A1	A2	A3	A4	A5
140	60,23	40,77	21,60	9,17	5,38
160	77,10	61,46	27,28	11,89	6,65

Por otro lado, los espectros de emisión (Figura 4.5) muestran un desplazamiento a longitudes de ondas mayores a 600 nm, y un máximo sobre los 500 nm, indicando la presencia de especies nitrogenadas y estructuras basadas en carbono respectivamente, la evaluación del área bajo la curva (Tabla 4.4) denota que la temperatura de reacción de 160°C posee mayor intensidad en el espectro de emisión con un valor de 146,71. A partir de los resultados obtenidos en la medición de las propiedades ópticas se determina que la temperatura de síntesis que posee las condiciones ópticas favorables para la obtención de PC:N, que tenga propiedades fluorescentes desplazadas a longitud de onda mayores a los 600 nm, es la de 160°C.

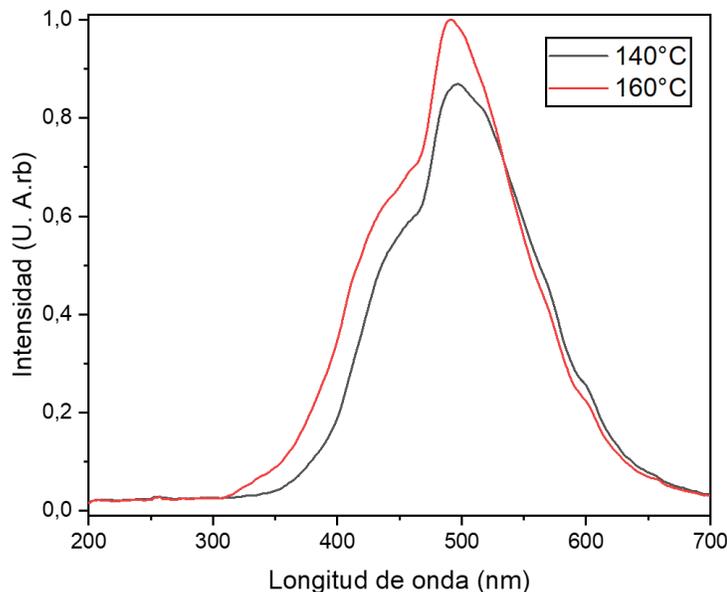


Figura 4.5: Espectros de emisión de los PCs sintetizados a 140°C y 160°C dispersados en agua destilada a concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  al ser irradiados con lampara de deuterio.

Tabla 4.4: Valores del área bajo la curva de los espectros de emisión de los triplicados de los PCs sintetizados a 140°C y 160°C.

Temperatura (°C)	Área bajo la curva
140	130,53
160	146,71

A los PCs con 160°C como temperatura de reacción (PC:N). Se les realiza la medición del potencial Z, se obtuvo un valor de  $-34,6 \pm 3,48$  mV, este valor indica la alta estabilidad eléctrica de los PC:N y la resistencia que presentan a aglomerarse o flocularse. Además de la presencia de pares de electrones libres en la superficie como nitrógeno u oxígeno.

En la Figura 4.6 se muestran los espectros de FTIR de los PC:N y los precursores usados en el proceso sintético, se observan las vibraciones atribuidas a los grupos funcionales  $-N-H$ ,  $-C=O$  y  $-C-N$  característicos de la urea con anchos de banda en  $3431,07\text{ cm}^{-1}$  (oscilación de estiramiento de los grupos amida),  $1590,02\text{ cm}^{-1}$  y  $1148,4\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, Para el ácido cítrico se definen las oscilaciones y sus anchos de banda atribuidas a  $-C-H$  ( $3014,67\text{ cm}^{-1}$ ),  $-C=O$  ( $1721,64\text{ cm}^{-1}$ ),  $-C-O$  ( $1412,08\text{ cm}^{-1}$ ) relacionado con los ácidos carboxílicos y  $-C-N$  ( $1204,81\text{ cm}^{-1}$ ) perteneciente a los grupo amina del precursor. En concordancia con estos resultados se observa oscilaciones referentes a los mismos enlaces en la muestra de PC:N. También se pronuncia una banda en  $3182,62\text{ cm}^{-1}$  que hace referencia al enlace  $-O-H$  que podría estar en la superficie. Además, se ven los picos representativos de los enlaces  $C=C$  en  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1475\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a los enlaces  $-C=N$ , siendo otro posible indicador de la presencia de las especies nitrogenadas.

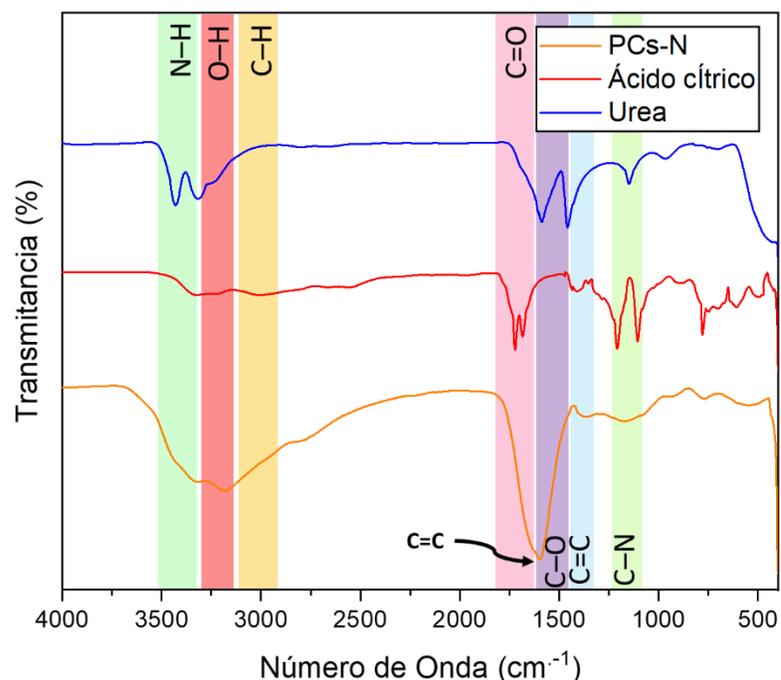


Figura 4.6: Espectroscopia FTIR de las muestras de urea, ácido cítrico y PC:N, con los grupos relacionados a cada mínimo.

Para cerrar esta sección, con la información espectroscópica recopilada, se propone la distribución de átomos que conforman los PC:N (Figura 4.7). Estos PCs fueron sintetizados por medio del método solvotermal, usando precursores orgánicos como urea, ácido cítrico y formamida, y temperatura de reacción de 160°C. Este modelo facilita el desarrollo de nuevas tecnologías, ya sea por medio de la funcionalización o el dopado de los PCs.

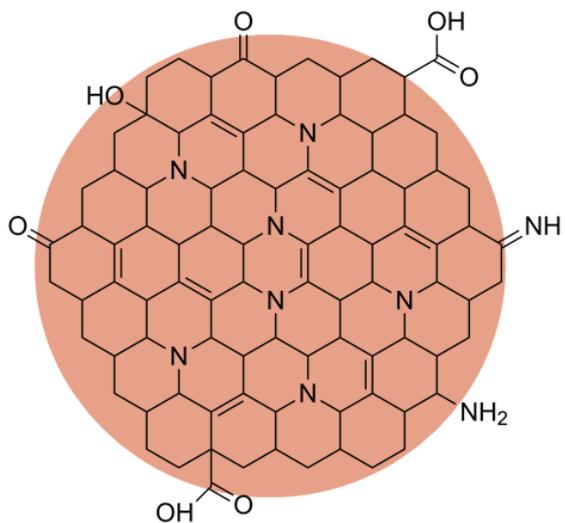


Figura 4.7: Distribución de átomos que conforman los PC:N.

#### 4.2. Síntesis y caracterización de los PC:N/Gd<sup>3+</sup>

El paso siguiente al desarrollo del protocolo para la síntesis de PC:N es hacer la introducción del ion de gadolinio en ese protocolo de síntesis con temperatura de reacción optimizada. La adición del Gd<sup>3+</sup> se realiza por medio del ácido gadopentético que es usado

como agente de contraste para resonancias magnéticas. La introducción de este elemento se hace variando la concentración en masa con respecto al peso del ácido cítrico, para de esta manera evaluar los impactos que genera el  $Gd^{3+}$  en las propiedades de los PC:N, y evaluar los PC:N/ $Gd^{3+}$  obtenidos como base para el desarrollo de un potencial agente radiosensibilizante.

La evaluación de espectrofotometría UV-vis de los PC:N/ $Gd^{3+}$  se analiza de la misma manera que los anteriores, en la Figura 4.8 se observa que las diferentes reacciones presentan una banda de 200 nm a 300 nm, atribuida con la transición electrónica  $\pi \rightarrow \pi^*$ , transiciones características del enlace -C=C presentes en los PCs. Los PC:N con 0% $Gd^{3+}$  presentan un máximo en la banda de 300 a 400 nm característico de las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$ . Los PC:N/ $Gd^{3+}$  sintetizados con diferentes concentraciones de  $Gd^{3+}$  no presentan este máximo, pero si muestran absorbancia en el mismo ancho de banda. La disminución en la intensidad de esta banda de absorbancia puede atribuirse a la incorporación del ion  $Gd^{3+}$  en la nanoestructura, ocupando espacios donde los átomos de N se ubicaron en la síntesis de PC:N. La reacción de 5%  $Gd^{3+}$  posee la mayor absorbancia entre los PCs codopados, como se muestra en los valores del área bajo la curva ubicados en la Tabla 4.5.

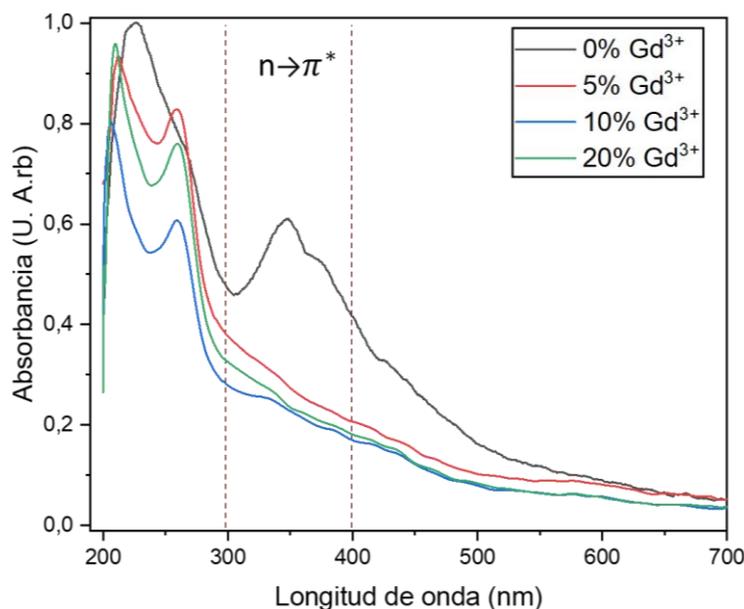


Figura 4.8: Espectro de absorción de los PC:N/ $Gd^{3+}$  con diferentes concentraciones de  $Gd^{3+}$  dispersados en agua destilada a concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  al ser irradiados con lámpara de deuterio y halógeno.

Tabla 4.5: Valores del área bajo la curva de los espectros de absorción de los PC:N/ $Gd^{3+}$  con diferentes concentraciones de  $Gd^{3+}$ .

Concentración $Gd^{3+}$	Área bajo la curva
0%	103,05
5%	78,34
10%	44,96
20%	54,45

Por otro lado, la introducción de iones  $Gd^{3+}$  no muestra cambios evidentes en la fluorescencia exhibida por los  $PC:N/Gd^{3+}$  en comparación con los  $PC:N$ . En la Figura 4.9 se muestran los espectros de emisión de los  $PC:N/Gd^{3+}$  en función de la concentración de  $Gd^{3+}$ . Allí se observa que los  $PC:N/Gd^{3+}$  poseen espectros de emisión con comportamientos similares a los  $PC:N$ . Mostrando que la solución realizada con el 10%  $Gd^{3+}$  es la que presenta la mayor intensidad de emisión con un calor del área bajo la curva total de 136,30 (Tabla 4.6). A partir de estos resultados se plantea la posibilidad de usar los  $PC:N/Gd^{3+}$  con 20%  $Gd^{3+}$  como la base para el desarrollo del potencial agente radiosensibilizante.

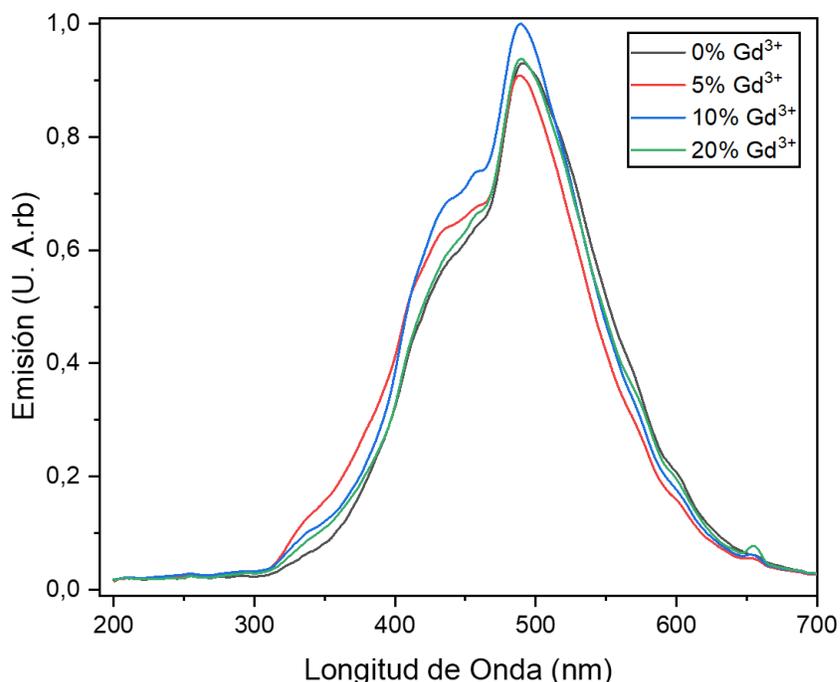


Figura 4.9: Espectro de emisión de los  $PC:N/Gd^{3+}$  con diferentes concentraciones de  $Gd^{3+}$  dispersados en agua destilada a concentración de  $50 \mu g/mL$  al ser irradiados con lámpara de deuterio.

Tabla 4.6: Valores del área bajo la curva de los espectros de emisión de los  $PC:N/Gd^{3+}$  con diferentes concentraciones de  $Gd^{3+}$ .

Concentración $Gd^{3+}$	Área bajo la curva
0%	128,18
5%	129,72
10%	136,30
20%	113,04

En la Figura 4.10 se relacionan los espectros de FTIR de las muestras del ácido gadopentético,  $PC:N$  y  $PC:N/Gd^{3+}$ . El quelato de gadolinio posee oscilaciones relacionadas a los grupos funcionales  $-C-O$  y  $-C-N$  en los anchos de banda de  $1571,81 \text{ cm}^{-1}$  y  $1396,3 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente. En conjunto con las vibraciones de los  $PC:N$  explicados anteriormente (Figura 4.6), se puede observar cómo los  $PC:N/Gd^{3+}$  exhiben oscilaciones relacionadas a  $-N-H$ ,  $-O-H$ ,  $-C=O$ ,  $-C-O$  y  $-C-N$ , relacionados a los grupos amidas y ácidos carboxílicos. Comparando los comportamientos de los  $PC:N$  y  $PC:N/Gd^{3+}$ , se evidencia la afectación de la introducción del ion  $Gd^{3+}$  al pronunciar las oscilaciones relacionadas a  $C-N$  del grupo amina presente en el ancho de banda de  $1377,90 \text{ cm}^{-1}$  y la relacionada a  $C=C$  en  $1475 \text{ cm}^{-1}$ .

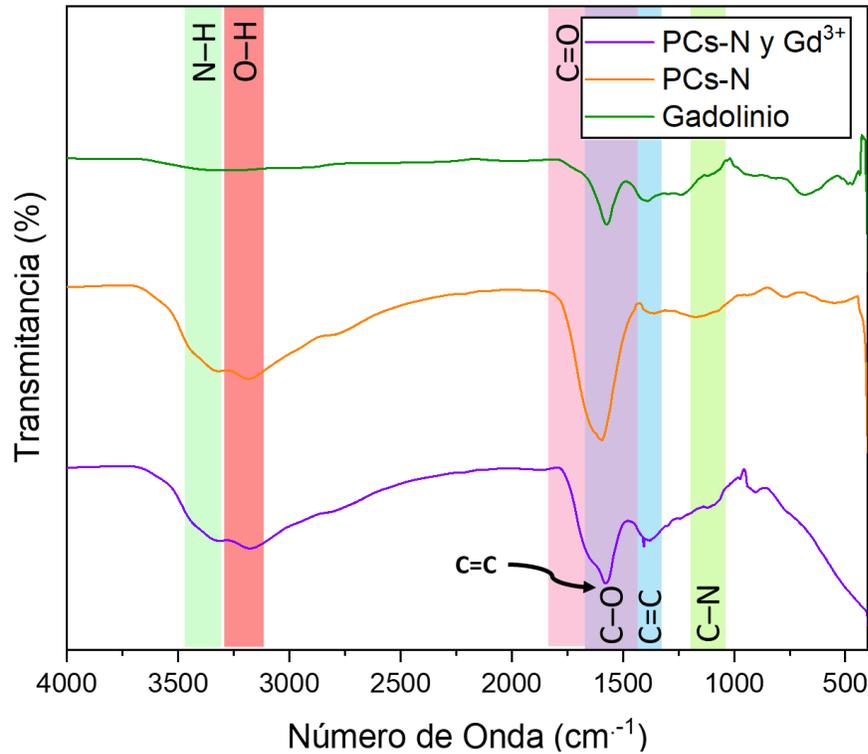


Figura 4.10: Espectroscopia FTIR de las muestras de PC:N, ácido gadopentético y los PC:N/Gd<sup>3+</sup> con los grupos relacionados a cada mínimo.

Este análisis nos ofrece información sobre la estructura de los PC:N/Gd<sup>3+</sup> sintetizados en este proyecto. Es así como se propone la estructura para los PC:N/Gd<sup>3+</sup> (Figura 4.11). La cual ofrece la base para el desarrollo de mecanismos de funcionalización como paso siguiente del macroproyecto.

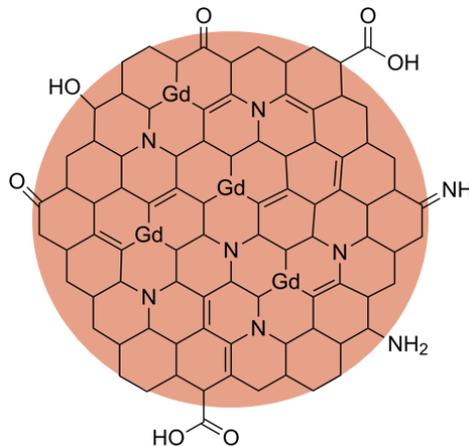


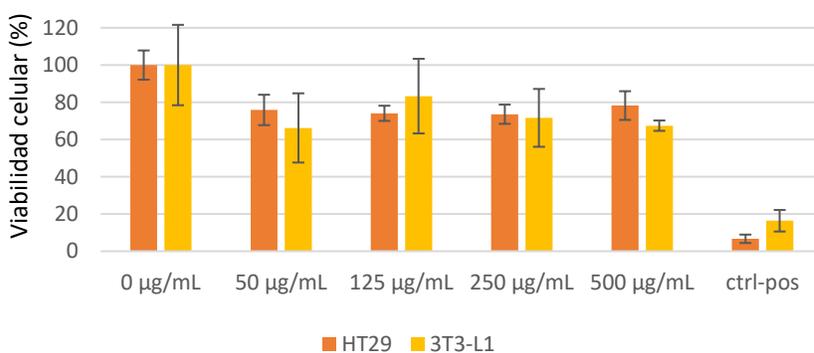
Figura 4.11: Distribución de átomos de los PC:N/Gd<sup>3+</sup>

### 4.3. Ensayo de Citotoxicidad MTT

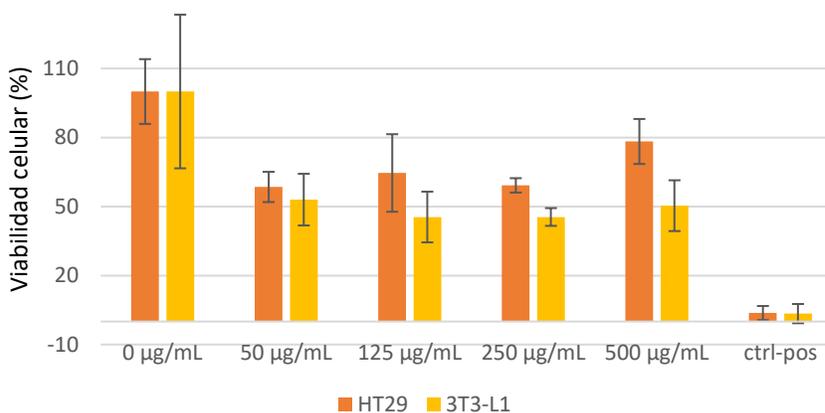
La evaluación de la citotoxicidad para los PC:N se realizó en las líneas celulares 3T3-L1 y HT29, de esta manera se obtiene más información sobre la interacción de los PC:N con células cancerígenas y células sanas. En la Figura 4.12.a se observa los resultados obtenidos del ensayo de MTT para los PC:N, donde la viabilidad es representada por las barras. Los

resultados obtenidos tras el periodo de 24 h, muestran viabilidades del 73-78% para las células HT29 y entre 65-83% para las 3T3-L1 para las diferentes concentraciones de PCs-N. Para el periodo de 48 h (Figura 4.12), los rangos disminuyen a valores entre el 58-78% y 45-53% para las células de HT29 y 3T3-L1 respectivamente, ambos resultados en comparación a la viabilidad de las células de control negativo (0 µg/mL), nos están indicando citotoxicidad. Esto puede deberse a la evaporación incompleta del solvente o a la naturaleza de los PCs sintetizados.

Por otro lado, se observa una alta variabilidad en los datos, esto puede deberse a la inexactitud en la cantidad de células por pozo. Es importante repetir este proceso de tal manera que se garantice la eliminación del solvente de los PCs y el estado de los cultivos, para minimizar los elementos externos que pueden variar los resultados.



a)



b)

Figura 4.12: Resultados obtenidos del ensayo MTT en las líneas celulares HT29 y 3T3-L1 tras ser sometidas a la presencia de PC:N en un periodo de a) 24 horas y b) 48 horas de incubación.

Los PC:N/Gd<sup>3+</sup> se lavaron con acetona para eliminar el solvente y de esta manera reducir la citotoxicidad de las nanopartículas. La formamida presenta una alta solubilidad en la acetona lo que permitirá una rápida evaporación de este solvente y minimizará el efecto de este en los resultados de la citotoxicidad. Este lavado consiste en adicionar 2 mL de acetona en la solución de PC:N/Gd<sup>3+</sup> dispersos en agua destilada, realizar shaking por 5 min y centrifugar a 9000 rpm por 15 min, manteniendo el sobrenadante de las mezclas, este proceso se repite 3 veces. Por último, se secan en un horno convencional y se obtienen una masa definida de PC:N/Gd<sup>3+</sup>

Los PC:N/Gd<sup>3+</sup> se evaluaron en los cultivos celulares U87 y 3T3-L1, La Figura 4.13 muestra los resultados obtenidos, donde la línea celular U87 presenta la mayor viabilidad (mayor 77%) en la concentración de PCs más baja usada, en el periodo de 24 h, y viabilidades superiores al 80% en el periodo de 48h. Para la línea celular 3T3-L1 los PCs muestran citotoxicidad tras 24 h de cultivo con viabilidades menores al 62% y se observa que en los resultados obtenidos a las 48 h el comportamiento de esta línea celular no es uniforme, lo que puede deberse al mal estado del cultivo o al error en la cantidad de células por pozo. Además, la alta variabilidad de los datos también puede relacionarse con las 2 variables antes descritas.

En efecto los PC:N/Gd<sup>3+</sup> presentan citotoxicidad en las líneas celulares U87 y 3T3-L1 al obtener viabilidades menores al 80% tras un periodo de 24 h de cultivo, y la variabilidad de los datos obtenidos a las 48 h hace pertinente repetir dicho ensayo.

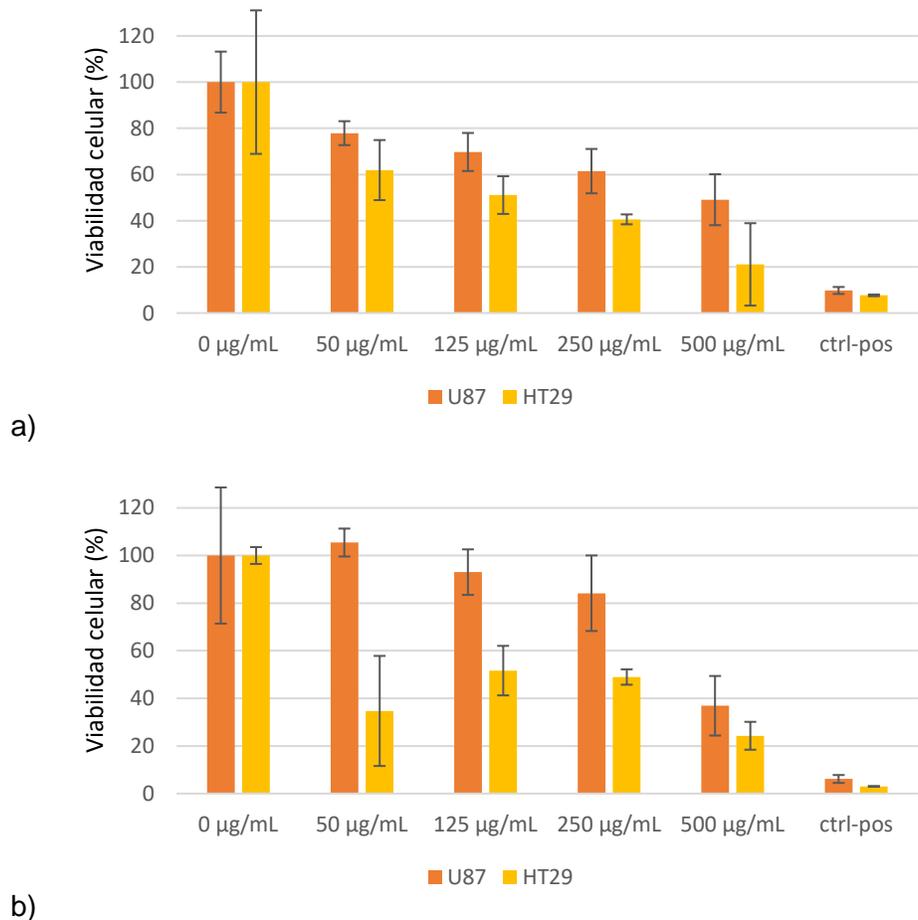


Figura 4.13: Resultados obtenidos del ensayo MTT en las líneas celulares U87 y HT29 tras ser sometidas a la presencia de PC:N/Gd<sup>3+</sup> en un periodo de a) 24 horas y b) 48 horas de incubación.

Sin embargo, los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad indican que es necesario evaluar la concentración de trabajo que deben usarse determinar si en efecto se disminuye la citotoxicidad mostrada por las diferentes líneas celulares.

## Capítulo 5

# CONCLUSIONES

Se logró sintetizar PC:N por medio del método solvotermal, con temperatura de reacción de 160°C, y usando precursores orgánicos como urea, ácido cítrico y formamida, que exhiben absorbancia en el ancho de banda de 200 nm a 600nm, y un espectro de emisión con longitudes de onda de 300 nm a 700 nm, logrando emitir en el ancho de banda donde la autofluorescencia de los tejidos endógenos es mínima. Los PC:N poseen alta estabilidad electrónica y resistencia a la aglomeración y transiciones asociadas a los enlaces -C=C características de los PCs. Los PC:N ofrecen una base para el desarrollo de tecnologías enfocadas a aplicaciones como bioimagen. Por otro lado, se sintetizaron PC:N/Gd<sup>3+</sup>, que poseen bandas de absorción de 200 nm a 550 nm y bandas de emisión en el rango de 300 nm a 700 nm. Además presentan estructuras químicas similares a los PC:N y ofrecen una base viable para el desarrollo de un potencial agente radiosensibilizante.

Los ensayos de MTT muestran citotoxicidad de los PC:N y de los PC:N/Gd<sup>3+</sup>, esto puede ser debido a la posible contaminación de ambos puntos de carbono con el solvente. Sin embargo, es pertinente repetir estos ensayos para determinar si la citotoxicidad es por un agente externo o por la naturaleza de los puntos, y así reevaluar las concentraciones de trabajo.

## Capítulo 6

# RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

### 6.1 Recomendaciones

Para aumentar la información sobre el comportamiento de los PCs sintetizados. Se recomienda realizar la dispersión de los PCs en diferentes solventes y de esta manera determina si las propiedades fluorescentes de estos son dependientes del solvente. Además de indagar sobre otras técnicas de purificación que aseguren la no transferencia de solvente al trabajo con células.

Adicionalmente, se propone evaluar la citotoxicidad por medio de otras técnicas como el azul tripán, con el fin de obtener más información sobre la biocompatibilidad de las nanopartículas.

### 6.2 Trabajos futuros

Corto plazo: Analizar los resultados de los PC:N y PC:N/Gd<sup>3+</sup> correspondientes a las pruebas de microscopia de fuerza atómica que fueron enviados al laboratorio de MetCore, realizar la medición del potencial Z de los PC:N/Gd<sup>3+</sup>. Y revisar los ensayos celulares de MTT evaluando la viabilidad de los PC:N y PC:N/Gd<sup>3+</sup> y las concentraciones usadas en las pruebas *in vitro*.

Mediano plazo: Realizar otros ensayos de citotoxicidad como el ensayo de azul tripan para obtener más información sobre el comportamiento de los PC:N y PC:N/Gd<sup>3+</sup> en estudios *in vitro*.

Largo plazo: Se propone poner en marcha los ensayos clorogénicos para analizar si se genera un aumento de los efectos de la radioterapia al irradiar las células con rayos X. Además, buscar mecanismos que permitan funcionalizar los puntos de carbono con el objetivo de lograr el aumento de los efectos de la radioterapia o iniciar los procesos de muerte celular cuando los puntos de carbono se encuentren en contacto con las células cancerígenas.

## REFERENCIAS

- [1] “Cancer.” [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Accessed: 06-Jun-2021].
- [2] “Cancer Today, International Agency for Research on Cancer.” [Online]. Available: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-treemap?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&group\\_cancer=1](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-treemap?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1). [Accessed: 06-Jun-2021].
- [3] S. Rivera Rivera, German Calderillo Ruiz, and M. Quintana Quintana, “Oncología General Para profesionales de salud de primer contacto.” [Online]. Available: [https://www.smeo.org.mx/wp-content/uploads/2018/11/Libro\\_Oncologia\\_Basica\\_SMeO\\_.pdf](https://www.smeo.org.mx/wp-content/uploads/2018/11/Libro_Oncologia_Basica_SMeO_.pdf). [Accessed: 02-Nov-2021].
- [4] “Tipos de tratamiento - Instituto Nacional del Cáncer.” [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>. [Accessed: 02-Nov-2021].
- [5] P. Zhang, A. Darmon, J. Marill, N. M. Anesary, and S. Paris, “Radiotherapy-Activated Hafnium Oxide Nanoparticles Produce Abscopal Effect in a Mouse Colorectal Cancer Model,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, p. 3843, 2020, doi: 10.2147/IJN.S250490.
- [6] M. Beyzadeoglu, G. Ozyigit, and C. Ebruli, “Basic radiation oncology,” *Basic Radiat. Oncol.*, pp. 1–575, 2010, doi: 10.1007/978-3-642-11666-7.
- [7] “Glioblastoma multiforme cerebral hemisférico: análisis de sobrevida de 65 casos tratados en el Departamento de Oncología del Hospital de Clínicas, desde 1980 a 2000.” [Online]. Available: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-03902012000400003](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902012000400003). [Accessed: 02-Nov-2021].
- [8] J. Raviraj, V. K. Bokkasam, V. S. Kumar, U. S. Reddy, and V. Suman, “Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators,” *Indian J. Dent. Res.*, vol. 25, no. 1, p. 83, 2014, doi: 10.4103/0970-9290.131142.
- [9] D. Gao, H. Zhao, X. Chen, and H. Fan, “Recent advance in red-emissive carbon dots and their photoluminescent mechanisms,” *Materials Today Chemistry*, vol. 9. Elsevier Ltd, pp. 103–113, 01-Sep-2018, doi: 10.1016/j.mtchem.2018.06.004.
- [10] R. Jelinek, *Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties and Applications - Raz Jelinek - Google Libros*. Switzerland 2017: Springer international Publishing, 2017.
- [11] M. Liu, “Optical Properties of Carbon Dots: A Review,” *Nanoarchitectonics*, vol. 1, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2020, doi: 10.37256/nat.112020124.1-12.
- [12] “Fluorescencia - Química LibreTexts.” [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Radiative\\_Decay/Fluorescence](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Radiative_Decay/Fluorescence). [Accessed: 03-Nov-2021].

- [13] D. Gao, H. Zhao, X. Chen, and H. Fan, "Recent advance in red-emissive carbon dots and their photoluminescent mechanisms," *Mater. Today Chem.*, vol. 9, pp. 103–113, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.MTCHEM.2018.06.004.
- [14] X. Shi *et al.*, "Red emissive carbon dots with dual targetability for imaging polarity in living cells," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 306, p. 127582, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.SNB.2019.127582.
- [15] H. Liao, Z. Wang, S. Chen, H. Wu, X. Ma, and M. Tan, "One-pot synthesis of gadolinium(III) doped carbon dots for fluorescence/magnetic resonance bimodal imaging," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 82, pp. 66575–66581, Aug. 2015, doi: 10.1039/C5RA09948J.
- [16] "Principios de radioterapia oncológica | Manual de Oncología, 6e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical." [Online]. Available: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2306&sectionid=180361666>. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [17] American Cancer Society, "The Science Behind Radiation Therapy."
- [18] E. Herranz Heredia, "Estudio de técnicas de imagen, radiaciones ionizantes y us aplicaciones en radioterapia.," Universidad Politécnica de Madrid.
- [19] R. Baskar, J. Dai, N. Wenlong, R. Yeo, and K. W. Yeoh, "Biological response of cancer cells to radiation treatment," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 1, no. NOV. Frontiers Media S.A., 17-Nov-2014, doi: 10.3389/fmolb.2014.00024.
- [20] G. Vogin and N. Foray, "The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 89, no. 1, pp. 2–8, Jan. 2013, doi: 10.3109/09553002.2012.717732.
- [21] H. AH and R. BE, "Radiosensitivity and rate of cell division: 'law of Bergonié and Tribondeau,'" *Science*, vol. 163, no. 3873, pp. 1338–1339, 1969, doi: 10.1126/SCIENCE.163.3873.1338.
- [22] "Dosimetría Clínica — Radioterapia HM." [Online]. Available: <http://www.radioterapiahm.com/dosimetra-clnica>. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [23] "Efectos secundarios de la radioterapia | Cancer.Net." [Online]. Available: <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atención-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/radioterapia/efectos-secundarios-de-la-radioterapia>. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [24] "Radioterapia para el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [25] P. Juzenas *et al.*, "Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 15, p. 1600, Dec. 2008, doi: 10.1016/J.ADDR.2008.08.004.
- [26] C. A. Combs and H. Shroff, "Fluorescence microscopy: A concise guide to current imaging methods," *Curr. Protoc. Neurosci.*, vol. 2017, pp. 2.1.1-2.1.25, Apr. 2017, doi: 10.1002/CPNS.29.
- [27] S. Huang, E. Yang, J. Yao, Y. Liu, and Q. Xiao, "Red emission nitrogen, boron, sulfur co-doped carbon dots for 'on-off-on' fluorescent mode detection of Ag<sup>+</sup> ions and L-cysteine in complex biological fluids and living cells," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1035, pp. 192–202, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.06.051.

- [28] Y. Wang and A. Hu, "Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications," *J. Mater. Chem. C*, vol. 2, no. 34, pp. 6921–6939, Sep. 2014, doi: 10.1039/C4TC00988F.
- [29] L. Gu *et al.*, "In vivo time-gated fluorescence imaging with biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles," *Nat. Commun.* 2013 41, vol. 4, no. 1, pp. 1–7, Aug. 2013, doi: 10.1038/ncomms3326.
- [30] Y. Shimojo, T. Nishimura, H. Hazama, T. Ozawa, and K. Awazu, "Measurement of absorption and reduced scattering coefficients in Asian human epidermis, dermis, and subcutaneous fat tissues in the 400- to 1100-nm wavelength range for optical penetration depth and energy deposition analysis," *J. Biomed. Opt.*, vol. 25, no. 04, p. 1, Apr. 2020, doi: 10.1117/1.jbo.25.4.045002.
- [31] S. Miao, K. Liang, J. Zhu, B. Yang, D. Zhao, and B. Kong, "Hetero-atom-doped carbon dots: Doping strategies, properties and applications," *Nano Today*, vol. 33, p. 100879, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.NANTOD.2020.100879.
- [32] F. Radnia, N. Mohajeri, and N. Zarghami, "New insight into the engineering of green carbon dots: Possible applications in emerging cancer theranostics," *Talanta*, vol. 209, p. 120547, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.TALANTA.2019.120547.
- [33] B. Bin Chen, M. L. Liu, and C. Z. Huang, "Recent advances of carbon dots in imaging-guided theranostics," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 134, p. 116116, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.TRAC.2020.116116.
- [34] Y. Hu, Z. Gao, and J. Luo, "Fluorescence detection of malachite green in fish tissue using red emissive Se,N,Cl-doped carbon dots," *Food Chem.*, vol. 335, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2020.127677.
- [35] Z. M. Marković *et al.*, "Highly efficient antioxidant F- And Cl-doped carbon quantum dots for bioimaging," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 43, pp. 16327–16338, Nov. 2020, doi: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.0C06260.
- [36] Y. Fang, L. Zhou, J. Zhao, Y. Zhang, M. Yang, and C. Yi, "Facile synthesis of pH-responsive gadolinium(III)-doped carbon nanodots with red fluorescence and magnetic resonance properties for dual-readout logic gate operations," *Carbon N. Y.*, vol. 166, pp. 265–272, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.CARBON.2020.05.060.
- [37] Z. Sun *et al.*, "A yellow-emitting nitrogen-doped carbon dots for sensing of vitamin B12 and their cell-imaging," *Dye. Pigment.*, vol. 176, p. 108227, May 2020, doi: 10.1016/J.DYEPIG.2020.108227.
- [38] H. Li *et al.*, "Design of Red Emissive Carbon Dots: Robust Performance for Analytical Applications in Pesticide Monitoring," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 4, pp. 3198–3205, Feb. 2020, doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.9B04917.
- [39] A. Sharma, V. Panwar, V. Chopra, J. Thomas, S. Kaushik, and D. Ghosh, "Interaction of Carbon Dots with Endothelial Cells: Implications for Biomedical Applications," *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 2, no. 9, pp. 5483–5491, Sep. 2019, doi: 10.1021/ACSANM.9B01080.
- [40] R. M. S. Sendão *et al.*, "Insight into the hybrid luminescence showed by carbon dots and molecular fluorophores in solution," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 21, no. 37, pp. 20919–20926, 2019, doi: 10.1039/C9CP03730F.
- [41] K. Holá *et al.*, "Graphitic Nitrogen Triggers Red Fluorescence in Carbon Dots," *ACS Nano*, vol. 11, no. 12, pp. 12402–12410, Dec. 2017, doi: 10.1021/ACSNANO.7B06399/SUPPL\_FILE/NN7B06399\_SI\_001.PDF.

- [42] P. Ascenzi *et al.*, “Rare earth elements (REE) in biology and medicine,” *Rendiconti Lincei*, vol. 31, no. 3. Springer, pp. 821–833, 01-Sep-2020, doi: 10.1007/s12210-020-00930-w.
- [43] X. Ma *et al.*, “Image-guided selection of Gd@C-dots as sensitizers to improve radiotherapy of non-small cell lung cancer,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12951-021-01018-9/FIGURES/9.
- [44] H. Chen *et al.*, “Gadolinium-Encapsulated Graphene Carbon Nanotheranostics for Imaging-Guided Photodynamic Therapy,” *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 36, Sep. 2018, doi: 10.1002/ADMA.201802748.
- [45] F. Maghsoudinia, M. B. Tavakoli, R. K. Samani, H. Motaghi, S. H. Hejazi, and M. A. Mehrgardi, “Bevacizumab and folic acid dual-targeted gadolinium-carbon dots for fluorescence/magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 61, p. 102288, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.JDDST.2020.102288.
- [46] S. Zheng *et al.*, “Preparation of gadolinium doped carbon dots for enhanced MR imaging and cell fluorescence labeling,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 511, no. 2, pp. 207–213, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.BBRC.2019.01.098.
- [47] C. Yu *et al.*, “Gadolinium-doped carbon dots with high quantum yield as an effective fluorescence and magnetic resonance bimodal imaging probe,” *J. Alloys Compd.*, vol. 688, pp. 611–619, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2016.07.226.
- [48] Y. Li, B. Li, X. Wang, Y. Meng, L. Bai, and Y. Zheng, “Safe and efficient magnetic resonance imaging of acute myocardial infarction with gadolinium-doped carbon dots,” *Nanomedicine*, vol. 15, no. 24, pp. 2385–2398, Sep. 2020, doi: 10.2217/NNM-2020-0160/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE7.JPEG.
- [49] Y. Fang, L. Zhou, J. Zhao, Y. Zhang, M. Yang, and C. Yi, “Facile synthesis of pH-responsive gadolinium(III)-doped carbon nanodots with red fluorescence and magnetic resonance properties for dual-readout logic gate operations,” *Carbon N. Y.*, vol. 166, pp. 265–272, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.CARBON.2020.05.060.
- [50] Q. Jiang *et al.*, “NIR-laser-triggered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging, drug delivery and combined photothermal chemotherapy for triple negative breast cancer,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12951-021-00811-W/TABLES/1.
- [51] G. Gedda, Y. Y. Yao, S. H. Chen, A. V. Ghule, Y. C. Ling, and J. Y. Chang, “Facile synthesis of gold/gadolinium-doped carbon quantum dot nanocomposites for magnetic resonance imaging and photothermal ablation therapy,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 31, pp. 6282–6291, Aug. 2017, doi: 10.1039/C7TB01139C.
- [52] “Espectroscopía UV-Vis: principio, fortalezas y limitaciones y aplicaciones | Redes de tecnología.” [Online]. Available: <http://www.news-courier.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>. [Accessed: 07-Nov-2021].
- [53] P. Lampman, K. Vyvyan, D. L. Pavia, and G. S. Kriz, *Spectroscopy 4th Ed.* 1973.
- [54] “Espectro de emisión: qué es y cómo se produce - Curiosoando.” [Online]. Available: <https://curiosoando.com/espectro-de-emision>. [Accessed: 07-Nov-2021].
- [55] “potencial zeta como una herramienta para determinar la ... - BVSDE.” [Online]. Available: <https://www.yumpu.com/es/document/view/33312216/potencial-zeta-como-una-herramienta-para-determinar-la-bvsde>. [Accessed: 07-Nov-2021].

- [56] “Potencial Zeta | PDF | Coloide | Química.” [Online]. Available: <https://www.scribd.com/document/466310772/potencial-zeta>. [Accessed: 07-Nov-2021].
- [57] “Guía sobre espectroscopía FT-IR | Bruker.” [Online]. Available: <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>. [Accessed: 07-Nov-2021].
- [58] “Principio AFM - ¿Cómo funciona un microscopio de fuerza atómica?” [Online]. Available: <https://afm.oxinst.com/outreach/how-does-an-afm-microscope-work>. [Accessed: 07-Nov-2021].
- [59] “Principio del microscopio de fuerza atómica | Escaneo AFM | Cómo funciona AFM.” [Online]. Available: <https://www.parksystems.com/medias/nano-academy/how-afm-works>. [Accessed: 07-Nov-2021].
- [60] “MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>. [Accessed: 07-Nov-2021].
- [61] J. van Meerloo, G. J. L. Kaspers, and J. Cloos, “Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay,” 2011, pp. 237–245.
- [62] V. Hinterberger, C. Damm, P. Haines, D. M. Guldi, and W. Peukert, “Purification and structural elucidation of carbon dots by column chromatography,” *Nanoscale*, vol. 11, no. 17, pp. 8464–8474, Apr. 2019, doi: 10.1039/C9NR01029G.
- [63] R. Chen, “MTT Assay of Cell Numbers after Drug/Toxin Treatment,” *BIO-PROTOCOL*, vol. 1, no. 7, 2011, doi: 10.21769/BIOPROTOC.51.