

SÍNTESIS DE PUNTOS DE CARBONO Y REVISIÓN DE SU CITOTOXICIDAD EN TUMORES DE MAMA

STTIFANY MARCELA BARRERA HOLGUIN

Trabajo Dirigido

Tutora

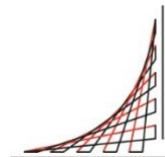
Diana Consuelo Rodríguez Burbano PhD

Cotutora

Sandra R. Ramírez Clavijo PhD



**Universidad del
Rosario**



**ESCUELA
COLOMBIANA
DE INGENIERÍA
JULIO GARAVITO**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2020**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primera instancia a Dios por permitirme llegar tan lejos en este camino, por todos los inconvenientes, situaciones de estrés, regalos, alegrías que han formado la persona que soy hoy en día. A mi padre Salvador Barrera Acosta y mi madre Yolanda Holguín Pérez por el voto de confianza, amor, enseñanzas, consejos, paciencia, apoyo incondicional y su esfuerzo, porque sin ello no hubiese alcanzado todos estos logros. A mis hermanas Zulay Barrera Holguín y Verónica Barrera Holguín por el apoyo emocional.

Gracias, de corazón a mi tutora de la Universidad del Rosario Diana Rodríguez Burbano, por su paciencia, dedicación, conocimiento, enseñanzas brindadas a lo largo del semestre y motivación para realizar y culminar con gusto y pasión este proyecto de investigación. A mi cotutora de la Universidad del Rosario Sandra Rocío Ramírez por su acompañamiento, consejos, conocimientos y enseñanzas brindadas en este proyecto de investigación. Finalmente, quiero agradecer a Sonia Perilla y a Juan Guarín, por su apoyo brindado en los distintos laboratorios, al laboratorio de bioquímica y a la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Rosario.

Quiero agradecer de manera personal a Santiago Prieto Rojas, por su apoyo incondicional, por los consejos, por su dedicación, esfuerzo, paciencia y apoyo emocional que me brindó. A mis amigas y a quienes estuvieron apoyándome de una manera u otra a lo largo de mi carrera.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	6
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 General	11
3.2 Específicos	11
4. METODOLOGÍA.....	12
4.1 Síntesis de puntos de carbono.....	12
4.1.1. Síntesis de puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico y etanol	13
4.1.2. Síntesis de puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico, etanol y formamida	13
4.2 Caracterización de las propiedades ópticas de los puntos de carbono	14
4.3 Revisión Literaria: Puntos de carbono y el cáncer de mama	14
5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANALISIS DE RESULTADOS	15
6. REVISIÓN LITERARIA: PUNTOS DE CARBONO Y EL CÁNCER DE MAMA	20
6.1 Procedimientos de síntesis y funcionalización de puntos de carbono obtenidos a partir de ácido cítrico por método solvo(hidro)termal.....	20
6.2 Obtención de imágenes <i>in vitro</i> de células de cáncer de mama usando puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico por método solvo(hidro)termal	22
6.3 Citotoxicidad	23
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	25
8. REFERENCIAS	26
ANEXO 1	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mamografía, examen con rayos X	7
Figura 2. Propiedades de absorción de agua y cromóforos importantes que se encuentran en la sangre (oxihemoglobina HbO ₂ y desoxihemoglobina Hb), epidermis y tejidos.....	9
Figura 3. Procedimiento de síntesis de puntos de carbono reportado por Fan et al.	12
Figura 4. Autoclave solvotérmico de acero inoxidable y recipiente de reacción.	13
Figura 5. Estructura molecular del ácido cítrico.....	15
Figura 6. Estructura molecular del etanol.	15
Figura 7. Solución resultante de la síntesis de los puntos de carbono, donde se usó como reactivo el ácido cítrico y como solvente el etanol durante 5 horas a 100°C.	16
Figura 8. Espectro de emisión de los puntos de carbono en función de la longitud de excitación sintetizados a partir de ácido cítrico y etanol.....	16
Figura 9. Estructura molecular de la formamida.....	17
Figura 10. Solución resultante de la síntesis de los puntos de carbono. Ácido cítrico se mantuvo como precursor orgánico y se una mezcla de etanol y formamida como solvente.	17
Figura 11. Espectro de absorción de los puntos de carbono sintetizados usando ácido cítrico, etanol y formamida.	18
Figura 12. Espectro de emisión de los puntos de carbono a diferentes longitudes de onda de excitación.....	19

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Temperaturas empleadas en la elaboración de la síntesis de los puntos de carbono a partir de ácido cítrico y etanol.	13
Tabla 2. Temperaturas empleadas en la elaboración de la síntesis de los puntos de carbono a partir de ácido cítrico, etanol y formamida.	14
Tabla 3. Resultados cualitativos (color de la reacción) obtenidos de las síntesis de puntos de carbono a partir ácido cítrico, etanol y formamida.	18
Tabla 4. Resumen de los datos reportados en la literatura sobre síntesis y caracterización óptica de puntos de carbono sintetizados a partir de la síntesis de ácido cítrico por método solvo(hidro)termal.	22

1. INTRODUCCIÓN

En esta sección se presentan generalidades del cáncer de mama. Estas incluyen la descripción de la epidemiología y el diagnóstico.

El cáncer es una enfermedad que siempre se encuentra en las listas de las principales causas de muerte a nivel mundial. A pesar de la extensa investigación y los diferentes frentes terapéuticos, aun no se ha logrado una solución que incluya diagnóstico y tratamiento con bajos costos, alta efectividad y mínimos efectos adversos [1].

Esta enfermedad aparece de improviso, tarda en ser evidente y está condicionada a un diagnóstico temprano para llegar a tener éxito con algún tratamiento. Es cierto que cada día hay más casos de supervivencia a la enfermedad, pero permanecen las desventajas, tales como la baja asequibilidad de los tratamientos a población con recursos limitados o la afectación de la calidad de vida tanto del enfermo como de su familia [2], [3].

El cuerpo humano consta de un conjunto de células que realizan diversas funciones como la división celular. Esta función está regulada mediante mecanismos de control los cuales indican a la célula cuándo comenzar a dividirse y cuándo detenerse. Si la célula sufre un daño que no puede ser reparado se lleva a cabo la autodestrucción o muerte celular, lo que impide que el daño sea heredado a las células descendientes [4], [5].

El cáncer es el crecimiento descontrolado de células. Cada célula independiente está programada para crecer y dividirse según las necesidades que presente el órgano o tejido. Con el fin de mantener los órganos y tejidos en funcionamiento, debe haber un equilibrio entre la tasa de división y la tasa de mortalidad de las células. No obstante, cuando esta regulación de la reproducción celular se pierde en una célula, se considera una célula cancerosa pues empezará a proliferar de forma irregular, de igual manera lo harán las nuevas células y así sucesivamente hasta generar un tumor [6].

Estos tumores pueden ser considerados benignos o malignos; se le llama benignos a aquellos que permanecen confinados en su lugar de origen y mediante cirugía son se pueden extraer por completo. Por otro lado, los tumores malignos son aquellos que logran propagarse más allá de su lugar de origen, esto se debe a que las células cancerosas tienen la capacidad de invadir el tejido adyacente, lo que se conoce como infiltración. Normalmente, esto lleva a las células cancerosas a entrar en vasos sanguíneos dando lugar a la metástasis, es decir, a propagarse por todo el cuerpo y como resultado, se obtienen tumores malignos en diversos órganos y tejidos. Un tratamiento localizado no será capaz tratar la enfermedad y, por lo tanto, la metástasis es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer [6], [7].

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. En el 2015, causó 8,8 millones de defunciones, casi uno de cada seis fallecimientos en el mundo se debe a esta enfermedad. También anunció que durante el año 2018 se registraron 18,1 millones de nuevos casos de cáncer y 9,6 millones de personas murieron por esta enfermedad [8].

Según el Observatorio Global de Cáncer cerca de la mitad de los casos nuevos y más de la mitad de las muertes por cáncer en 2018 se produjeron en Asia, en parte porque la región tiene casi el 60% de la población mundial. En Europa, se representó el 23,4% de los casos globales de cáncer y el 20.3 % de las muertes por la enfermedad, aunque sólo tiene el 9%

de la población mundial. Las Américas tienen el 13,3% de la población mundial y representan el 21% de incidencia y el 14,4% de mortalidad mundial [9]. El informe señala que el cáncer de pulmón, con un total de 2.093.876 (11,6%) y el de mama, con 2.088.849 (11,6%) casos, son los tipos de cáncer más frecuentes en los pacientes [10].

Cada año en las Américas, más de 462.000 mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama y casi 100.000 mueren a causa de esta enfermedad, si las tendencias actuales continúan, para el año 2030, se prevé que el número de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama aumente en un 34% [11]. De acuerdo con el Observatorio Global de Cáncer, en Colombia durante el año 2018 se registraron 13.380 nuevos casos y 3.702 muertes a causa del cáncer de mama, tanto para mujeres como para hombres [12].

Para detectar y diagnosticar el cáncer de mama, se utilizan tecnologías que permiten la adquisición de imágenes del tejido afectado. Entre estos exámenes de adquisición de imágenes se encuentran [13]-[17]:

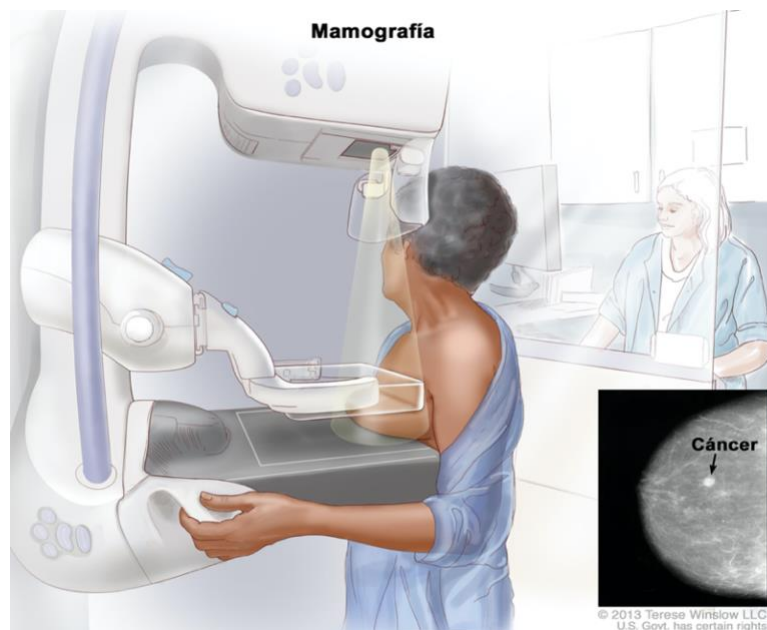


Figura 1. Mamografía, examen con rayos X [13].

- I. La mamografía, es un tipo de examen con rayos X que se usa para examinar la mama, consiste en exponer los senos a una pequeña cantidad de radiación ionizante para obtener imágenes del interior de la mama, como se puede observar en la figura 1.
- II. La ecografía es un procedimiento que hace uso del ultrasonido. Esta técnica consiste en utilizar ondas sonoras para generar imágenes del interior de los senos. Esto se logra haciendo rebotar ondas de sonido de alta energía en los tejidos u órganos internos a fin de producir ecos, los cuales forman una imagen de los tejidos del cuerpo que se llama ecograma. El ultrasonido puede capturar imágenes de áreas de la mama que podrían ser difíciles de ver con una mamografía. También ayuda a determinar si un bulto en la mama es una masa sólida o un quiste.

- III. Imágenes por resonancia magnética (RMN), en este método de diagnóstico, se hace incidir en la región del cuerpo donde se sospecha la presencia de la lesión, un pulso de radiofrecuencia y la generación de un potente campo magnético con el fin de generar imágenes dependientes de la concentración de agua en el interior del tejido mamario. RMN es útil para evaluar los bultos en la mama que no se puede visualizar con una mamografía o un ultrasonido, particularmente en las mujeres con tejido mamario denso.
- IV. Tomografía por emisión de positrones – Tomografía computada (PET/CT, por sus siglas en inglés), se combina las exploraciones por PET y TC con el fin de generar imágenes que identifiquen la ubicación anatómica de la actividad metabólica anormal de la mama. La exploración por CT brinda información detallada de los órganos y tejidos del interior del cuerpo, mientras que la exploración por PET brinda información acerca de la actividad anormal del cuerpo. El procedimiento de las dos exploraciones puede detectar el cáncer de mama y determinar su diseminación además de evaluar la eficacia del tratamiento. Este procedimiento consiste en aplicar una inyección, con una cantidad reducida de sustancia radioactiva, en donde las zonas que usan mayor energía (células cancerígenas), recogen una mayor dosis que las células sanas, ya que tienden a usar más energía que las células sanas. Finalmente, la exploración por PET indica la posición en la que se encuentra la sustancia radioactiva, mientras que la exploración por CT toma imágenes desde diferentes ángulos del interior del cuerpo.
- V. Centellografía mamaria, también conocida como imágenes por medicina nuclear de la mama, consiste en un examen que se puede utilizar para investigar una anomalía de la mama que ha sido descubierta en una mamografía. El procedimiento consiste en inyectarle al paciente en el torrente sanguíneo una radiosonda o droga que emite radioactividad. Este material se acumula en la mama y emite energía en forma de rayos gamma la cual es percibida por cámaras especiales que elaboran la imagen detallada de la estructura. El hecho de que una radiosonda se acumule en forma diferente en distintos tipos de tejidos puede ayudar a los médicos a determinar si el cáncer está presente, ayudando así a establecer si se necesita una biopsia o un seguimiento adicional.

El desarrollo de diferentes técnicas de obtención de imágenes como la mamografía, ecografía, RMN, PET/CT han permitido incrementar la eficiencia de los procesos de diagnóstico y realizar detecciones más tempranas del cáncer de mama [18]. Sin embargo, en algunas de estas técnicas se hace uso de energías ionizantes con el fin de generar imágenes, lo cual tiene potenciales efectos secundarios negativos. Son técnicas costosas y muchas de ellas no pueden ser usadas con una alta frecuencia. Algunas posibles alternativas para la obtención de imágenes han surgido en el potencial de los materiales cuyas dimensiones se encuentran en la escala nanométrica, estos reciben el nombre de nanomateriales. Algunos de estos materiales poseen propiedades ópticas de interés biológico y biomédico. La capacidad de generar fluorescencia en una escala de tamaño similar o menor a la de los cuerpos subcelulares, abre la posibilidad de investigar y desarrollar una estrategia de adquisición de imágenes a menor costo y evitando el uso de energías ionizantes.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obtención de imágenes por fluorescencia es una técnica no invasiva que consiste en la excitación de moléculas fluorescentes (fluoróforo) usando luz visible con una longitud de onda específica a las propiedades de absorción del fluoróforo [19]. En la actualidad, la definición de fluoróforo se ha extendido para incluir nanopartículas fotoluminiscentes ya que, estas pueden cumplir la misma función [20]. Esta técnica de adquisición de imágenes se ha usado para visualizar y estudiar procesos de interés bioquímico y biológicos en varios niveles que van desde los compartimientos subcelulares hasta modelo animal [21], [22].

Mientras que algunas de las técnicas de obtención de imágenes para diagnóstico de cáncer de mama requieren de energías ionizantes, fluorescencia se basa en irradiaciones que abarcan desde el UV hasta el infrarrojo del espectro electromagnético. Así, potenciales efectos negativos asociados a estas energías ionizantes son eliminados. Otra ventaja de evitar este tipo de energías abre la posibilidad de tener observación directa y un tiempo de análisis más corto a lo largo de los procedimientos quirúrgicos, monitoreo repetitivo, estudios de progresión de enfermedades y evaluación de eficacia de los tratamientos [23]. Adicionalmente, el diseño e ingeniería de sistemas de imágenes ópticas fluorescentes con alta sensibilidad, ha resultado en configuraciones con una relativa facilidad de operación de menor costo en comparación a las usadas actualmente [24].

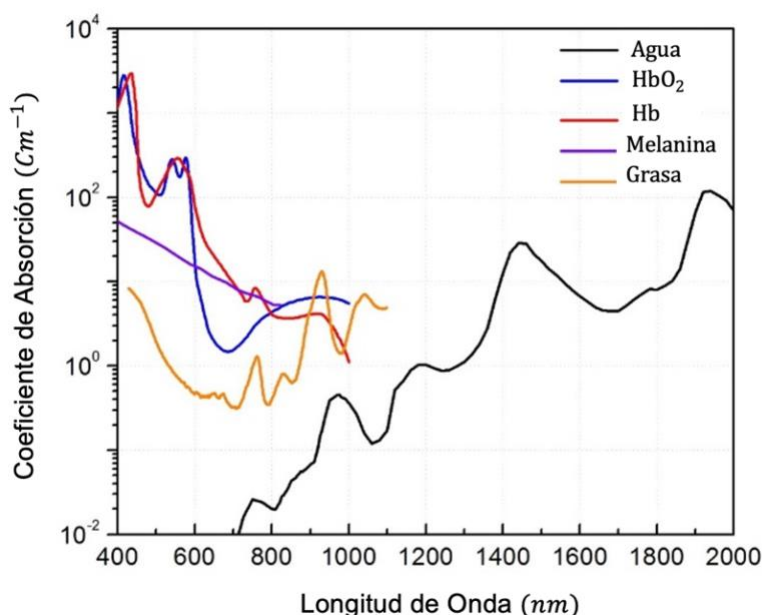


Figura 2. Propiedades de absorción de agua y cromóforos importantes que se encuentran en la sangre (oxihemoglobina HbO₂ y desoxihemoglobina Hb), epidermis y tejidos [44].

Imágenes por fluorescencia a nivel subcelular pueden ser obtenidas utilizando las propiedades ópticas de algunos fluoróforos endógenos (ej. flavinas, colágeno, elastina, lipopigmentos, melanina) [25]. Sin embargo, al incrementar la complejidad del cuerpo del que se obtiene imágenes, la emisión en conjunto de todas las especies endógenas dificulta la identificación singular de cada una. Esto se debe a que la mayoría de estas poseen altos coeficientes de absorción en la región UV-Vis del espectro electromagnético (Figura 2) [24].

Para reducir este efecto, la ciencia de nanomateriales ha orientado sus esfuerzos en desarrollar fluoróforos exógenos que absorban luz en la región de 650 a 1350 nm. En este rango del espectro electromagnético el agua y fluoróforos endógenos presentan valores significativamente menores de coeficientes de absorción (Figura 3) [24]. Esta zona se conoce como la ventana óptica de transparencia biológica [26].

Los fluoróforos exógenos deben ser biocompatibles, selectivos y que existan sistemas a nivel comercial para la excitación y la detección de la luz emitida por el fluoróforo [27]. Una alternativa a fluoróforos exógenos son las moléculas orgánicas fluorescentes. Estos son sistemas moleculares con una estructura química definida con altos coeficientes molares de absorción [28]. A pesar del uso generalizado de estos, existen muchas deficiencias en su uso. Una limitación considerable está relacionada con su baja fotoestabilidad que resulta en una respuesta óptica reducida [20], [29]. Adicionalmente, los fluoróforos orgánicos carecen de las propiedades estructurales necesarias para construir un sistema que imparta funcionalidades multimodales (localización, diagnóstico y terapéutico) sin afectar sus propiedades ópticas. Además, se ha informado que algunos de los colorantes orgánicos pequeños, como el isotiocianato de fluoresceína, son fototóxicos. Tras la irradiación de estas sondas, se pueden formar especies reactivas de oxígeno, lo que desencadena la oxidación no deseada de los componentes biológicos en el sistema en estudio [30].

Los materiales de escala nanométrica permiten interacciones únicas con los sistemas biológicos. Los materiales a escala nanométrica poseen propiedades que los distinguen de los materiales a granel [20], [31]. Las nanopartículas son un conjunto de átomos. A medida que disminuye el tamaño, hay una disminución importante en el volumen que los átomos constituyentes de las nanopartículas pueden ocupar, por lo tanto, la mayoría de los átomos se encuentran en la superficie. Las nanopartículas exhiben grandes áreas de superficie con alta energía superficial debido a la presencia de enlaces colgantes. La necesidad de reducir esta energía superficial favorece la adición de restos que proporcionan o mejoran la dispersabilidad de las nanopartículas en ambientes acuosos [32]. Además, dependiendo de la naturaleza de la superficie modificada, se puede lograr la introducción de varias funcionalidades tales como agentes de direccionamiento (por ejemplo, ácido fólico, anticuerpos y péptidos) y agentes terapéuticos (por ejemplo, derivados de doxorubicina y porfirina) [33]. con una funcionalización de superficie bien diseñada y optimizada, se puede lograr un reconocimiento selectivo y específico de los receptores ubicados en la membrana celular, así como una mayor internalización celular [34].

Existen nanomateriales que poseen propiedades ópticas que le permiten ser usados como fluoróforos exógenos. Entre estas se encuentran los '*quantum dots*', puntos de carbono y materiales inorgánicos dopados con lantánidos [35]. Los puntos de carbono, descubiertos en 2004, sobresalen dentro de estos por sus tamaños inferiores a 10 nm, las diversas rutas de síntesis, diferentes posibilidades de modificación de su superficie [36].

Este proyecto tiene como objetivo determinar la ruta sintética de puntos de carbono que cumplan con las condiciones ópticas deseadas para un fluoróforo exógeno. Es decir, que sus propiedades ópticas puedan incluirse dentro de la ventana óptica de transparencia biológica. La obtención de este nanomaterial sentará la base para futuras proyecciones de otras modalidades como detección, diagnóstico y terapéuticos. Adicionalmente, se lleva a cabo una primera revisión literaria sobre reportes de síntesis, funcionalización, adquisición de imágenes *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama por fluorescencia y citotoxicidad de puntos de carbono que hayan sido obtenidos por procedimientos similares a los reportados en este trabajo.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Exploración de síntesis de puntos de carbono con emisión multicolor y revisión bibliográfica sobre su citotoxicidad en cáncer de mama.

3.2 Específicos

- I. Sintetizar puntos de carbono con emisión luminiscente multicolor por método solvotermal.
- II. Caracterizar las propiedades ópticas de los puntos de carbono obtenidos por método solvotermal.
- III. Realizar una revisión bibliográfica de los resultados reportados sobre la citotoxicidad de los puntos de carbono en el cáncer de mama desde el año 2017 hasta la actualidad.

4. METODOLOGÍA

En esta sección se describen los procesos que se emplearon para la síntesis de puntos de carbono multicolor y la caracterización de sus propiedades de absorción y fluorescencia. Adicionalmente se explican los parámetros de referencia para la revisión literaria propuesta.

4.1 Síntesis de puntos de carbono

Los métodos sintéticos de puntos de carbono reportados a continuación se basaron en el procedimiento reportado por Fan et al [37] (Figura 3). Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) fue utilizado como precursor orgánico. Etanol (CH_3CH_2OH) y formamida (CH_3NO) fueron empleados como solventes. Todos los reactivos fueron comprados en Sigma Aldrich y se usaron directamente sin purificación adicional.

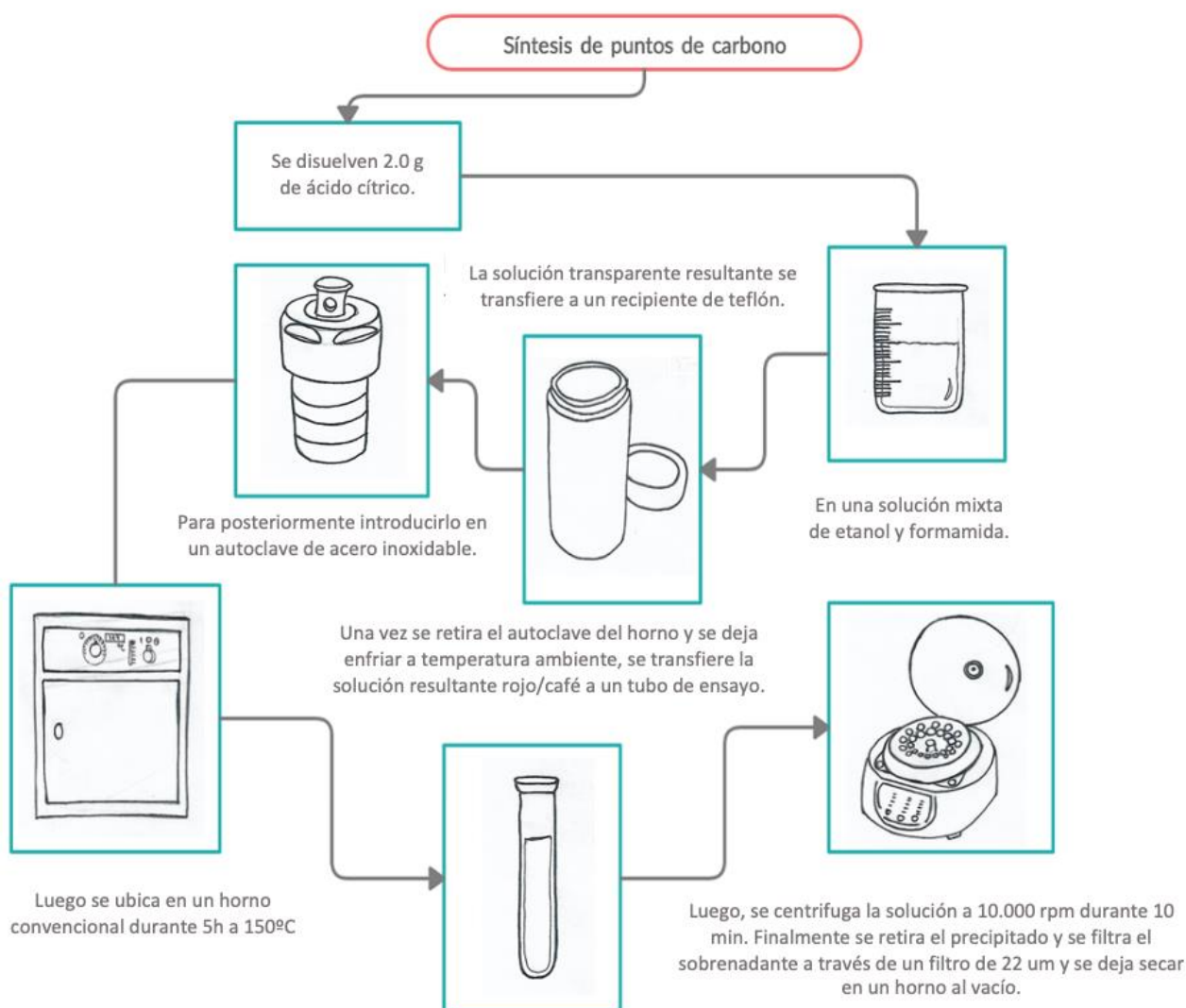


Figura 3. Procedimiento de síntesis de puntos de carbono reportado por Fan et al [37].

Para sintetizar los puntos de carbono se propusieron dos rutas sintéticas en las cuales se tuvieron en cuenta parámetros de síntesis como selección del solvente, temperatura de reacción y el equipo de calentamiento. La determinación de estos parámetros permite obtener puntos de carbonos con propiedades ópticas, en especial de fluorescencia que abarquen un amplio rango de la parte visible del espectro electromagnético.

4.1.1. Síntesis de puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico y etanol



Figura 4. Autoclave solvotérmico de acero inoxidable y recipiente de reacción.

En este procedimiento, 2.0 g de ácido cítrico se dispersan en 25 mL de etanol seguido de un proceso de sonicación (aprox. 3 min). La solución transparente resultante se transfiere a un recipiente de teflón de 100 ml con un agitador magnético. El recipiente se selló en una autoclave de acero inoxidable (Figura 4). La solución se calentó haciendo uso de una plancha de calentamiento con agitación magnética durante 5 horas a 300 rpm. Al término del tiempo de reacción, el sistema se dejó enfriar naturalmente hasta temperatura ambiente. La temperatura de reacción fue variada de acuerdo con lo indicado en la Tabla 1.

Tabla 1. Temperaturas empleadas en la elaboración de la síntesis de los puntos de carbono a partir de ácido cítrico y etanol.

Temperatura (°C)	100	125	150	175
Tiempo (h)	5			
Solvente	Etanol 99%			
Fuente de calentamiento	Plancha de calentamiento con agitación			

4.1.2. Síntesis de puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico, etanol y formamida

En este procedimiento, 1 g de ácido cítrico se dispersó en una mezcla de 12,5 mL de etanol y 12,5 mL de formamida seguido de un proceso de sonicación por 3 minutos. La solución transparente resultante se transfirió a una botella de teflón de 100 ml sellada en una autoclave de acero inoxidable. La mezcla se calentó en un horno convencional durante 5 horas. Al término del tiempo de reacción, el sistema se dejó enfriar naturalmente hasta

temperatura ambiente. La temperatura de reacción fue variada de acuerdo con lo indicado en la Tabla 2.

Tabla 2. Temperaturas empleadas en la elaboración de la síntesis de los puntos de carbono a partir de ácido cítrico, etanol y formamida.

Temperatura (°C)	100	125	150	175
Tiempo (h)	5			
Solvente	Etanol 99% y Formamida 99%			
Fuente de calentamiento	Horno convencional – sin agitación			

La solución obtenida del proceso de síntesis se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos con el fin de separar el material de tamaño mayor no estables en dispersión acuosa. El sobrenadante se recolecta y se filtra a través de un filtro de 0.22 μm . Finalmente, el producto purificado se secó en un horno de vacío durante 12 horas.

4.2 Caracterización de las propiedades ópticas de los puntos de carbono

Los espectros de absorción UV-Vis de los puntos de carbono sintetizados dispersos en agua destilada se midieron en un espectrofotómetro FLAME MODELO FLAMES-S-XR1-ES OCEAN OPTICS a temperatura ambiente. Las mediciones se tomaron en un rango de longitud de onda desde 200 nm a 1000 nm usando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Espectros de fluorescencia se midieron en un Cytation 3 el cual permite la lectura de múltiples espectros a través del uso de placas. Las mediciones del espectro de fluorescencia se realizaron sobre las mismas soluciones empleadas en la obtención de los espectros de absorción. Se realizó un estudio de la fluorescencia generada en función de la longitud de onda de excitación.

4.3 Revisión Literaria: Puntos de carbono y el cáncer de mama

Se realizó la revisión de publicaciones que reportaran procedimientos de síntesis y funcionalización con fines de diagnóstico o terapéuticos y que utilizaran ácido cítrico como precursor orgánico y el método solvothermal. Se revisaron referencias desde el año 2017 hasta la actualidad. La finalidad de esta revisión no sólo sirve de guía de relación de resultados experimentales obtenidos, sino que permite evaluar la rigurosidad de los experimentos en citotoxicidad reportados. El estudio completo de efectos citotóxicos de los puntos de carbono sin modificaciones es fundamental para futuras construcciones más complejos basados en estos.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANALISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se presentarán, describirán y analizarán los resultados de síntesis y caracterización de las propiedades ópticas de los procedimientos experimentales obtenidos antes de la declaración de cuarentena nacional.

El método de síntesis solvotermal, es un procedimiento que opera a presión y temperatura por encima del punto crítico del solvente. El uso del solvente en este estado permite que la solubilidad de los precursores se incremente, favoreciendo la velocidad a la que las nanoestructuras se forman [38]. Partiendo de una ruta 'Bottom up', basada en este método de síntesis, el ácido cítrico fue escogido como el precursor de carbono. Este es un ácido débil tricarboxílico (Figura 5). La presencia de los grupos -COOH, jugará un papel fundamental en las propiedades ópticas de los puntos de carbono resultantes del uso de este ácido como fuente de carbono.

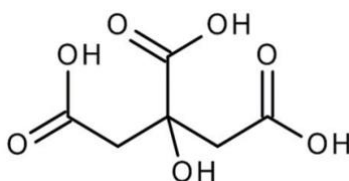


Figura 5. Estructura molecular del ácido cítrico.

Inicialmente, se siguió el procedimiento de síntesis descrito en el numeral 4.1.1. Cabe resaltar que en este diseño experimental el único solvente que se usó fue etanol (Figura 6), de forma que en la reacción solo se involucran especies atómicas de carbono, oxígeno e hidrógeno y por tanto se infiere que la composición final de los puntos de carbono se compondrá sólo de estos elementos.

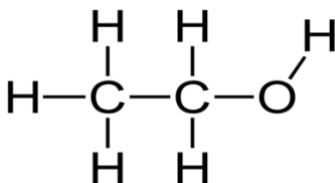


Figura 6. Estructura molecular del etanol.

Las soluciones resultantes, y a pesar de no evidenciar un cambio de color después del tratamiento térmico, fueron expuestas a luz ultravioleta. La solución obtenida a 100°C al ser irradiada con una longitud de onda de 254 nm exhibe una fluorescencia azul (Figura 7). Esto indica la posible generación de especies fluorescentes a base de carbono. Por otro lado, las reacciones que fueron sintetizadas a temperaturas de 125°C, 150°C y 175°C no emitieron fluorescencia. Esto nos lleva a postular que el incremento de la temperatura por encima de los 100 °C en el método solvotérmico para el sistema ácido cítrico-etanol no favorece la formación de especies fluorescentes a base de carbono.

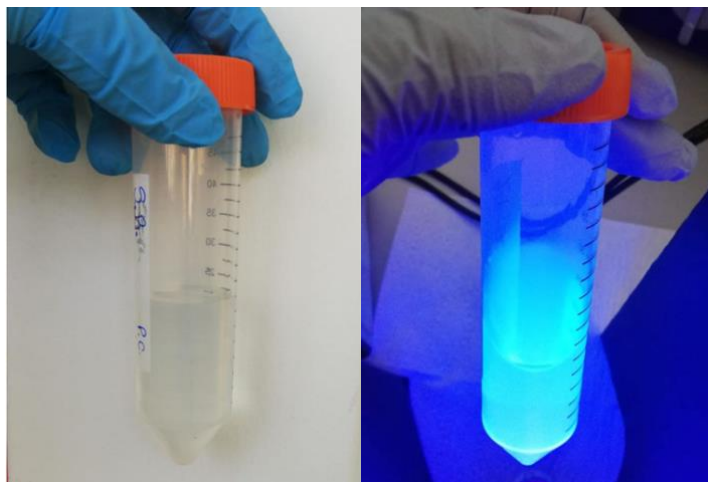


Figura 7. Solución resultante de la síntesis de los puntos de carbono, donde se usó como reactivo el ácido cítrico y como solvente el etanol durante 5 horas a 100°C. En la figura se puede observar la solución resultante en ausencia (izquierda) y bajo radiación con luz UV (derecha).

El espectro de emisión de los puntos de carbono obtenidos a 100°C siguiendo el procedimiento experimental descrito en la sección 4.1.1. se muestra en la figura 8. Usando una longitud de excitación de 350 nm se observa una banda de emisión con un máximo de 420 nm, lo cual concuerda con la luminiscencia observada bajo la irradiación con luz UV. Excitando las especies fluorescentes de carbono con longitud de onda mayores, la eficiencia de generación de luz disminuye. El procedimiento sintético seguido y las propiedades fluorescentes observadas y caracterizadas son congruentes con lo que se ha reportado en la literatura [73]-[82].

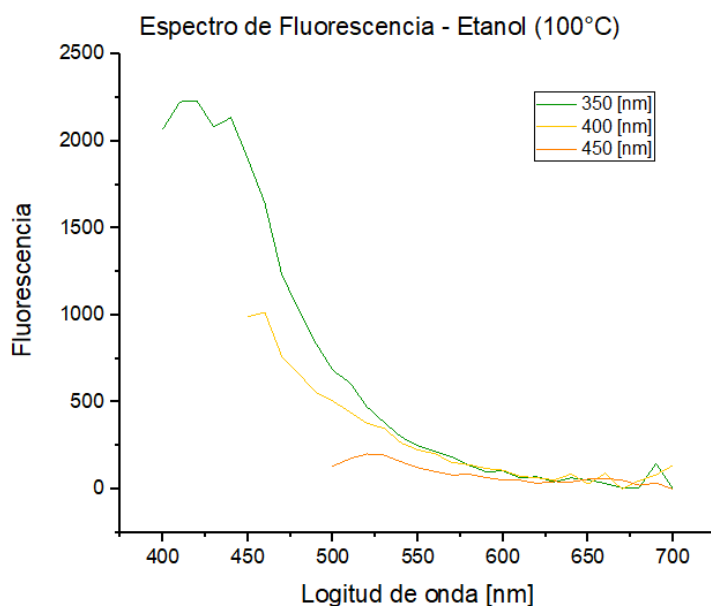


Figura 8. Espectro de emisión de los puntos de carbono en función de la longitud de excitación sintetizados a partir de ácido cítrico y etanol.

Ya que existe una dependencia entre la longitud de onda de excitación y emisión con respecto a la composición del tejido, es importante generar puntos de carbono con luminiscencia en longitudes de onda mayores. A pesar de tener claro un procedimiento para la obtención de puntos de carbono con propiedades fluorescentes en el rango de 400 nm a 500 nm (azul-verde), se replanteó y modificó el procedimiento sintético para lograr emisiones dentro de la ventana óptica de transparencia biológica. La descripción de este procedimiento se encuentra en la sección 4.1.2.

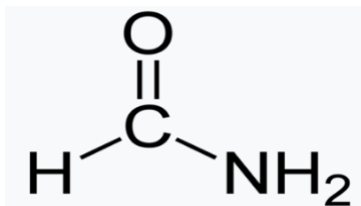


Figura 9. Estructura molecular de la formamida.

En la literatura se reporta que la introducción de heteroátomos como N, S y B tienen un impacto significativo en las propiedades ópticas de los puntos de carbono [37]. Esta es la razón por la cual se propuso incluir formamida como solvente y fuente de átomos de nitrógeno. Su estructura molecular se muestra en la figura 9.

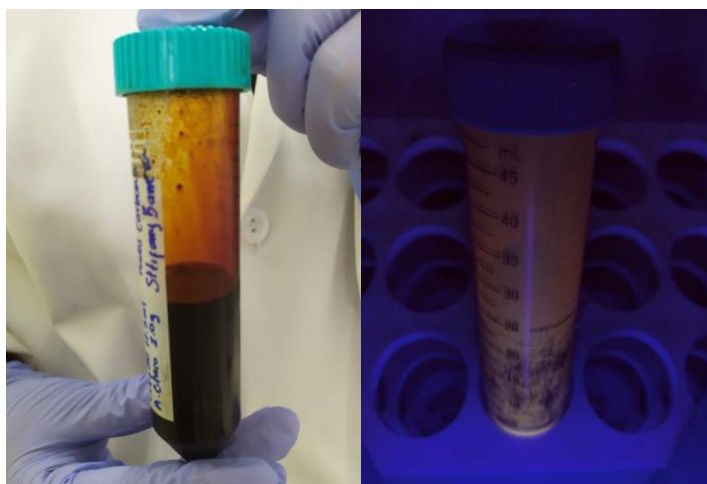


Figura 10. Solución resultante de la síntesis de los puntos de carbono. Ácido cítrico se mantuvo como precursor orgánico y se usó una mezcla de etanol y formamida como solvente. Imágenes tomadas después de un tiempo de reacción de 5 horas y una temperatura de reacción de 175°C. La solución resultante se muestra en ausencia (izquierda) y bajo la luz UV (derecha).

Se llevaron a cabo 4 reacciones en las que se varió la temperatura de reacción. Las soluciones obtenidas presentaron un color que mostró una tendencia de cambio a medida que se incrementaba la temperatura de reacción. Las observaciones cualitativas de color se presentan en la Tabla 3. En la figura 10, se observa la reacción que fue sintetizada a una temperatura de 175°C en ausencia y bajo irradiación con luz ultravioleta ($\lambda_{exc} = 254\text{ nm}$). La exposición a la luz ultravioleta de esta muestra fue realizada inmediatamente después de recoger la reacción, previo al proceso de purificación. A pesar de esto, se evidencia la tonalidad roja/negro en ausencia de irradiación y una fluorescencia naranja opaca bajo irradiación con luz ultravioleta.

Tabla 3. Resultados cualitativos (color de la reacción) obtenidos de las síntesis de puntos de carbono a partir de ácido cítrico, etanol y formamida.

Temperatura	100°C	125°C	150°C	175°C
Color	Naranja claro	Morado claro	Marrón	Rojo/Negro

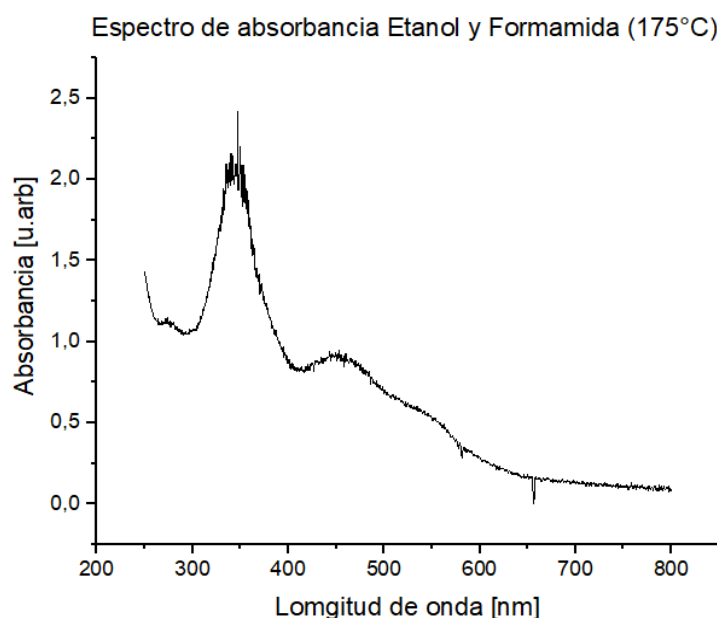


Figura 11. Espectro de absorción de los puntos de carbono sintetizados usando ácido cítrico, etanol y formamida.

Después de realizar el proceso de purificación de la muestra obtenida a 175°C, se midió el espectro de absorción de los puntos de carbono obtenidos a partir de ácido cítrico y la mezcla de solventes (Figura 11). Esta muestra fue escogida para caracterizar ya que cualitativamente evidenciaba más intensidad en su fluorescencia al ser expuesto a luz ultravioleta. En el espectro de absorción se observan dos bandas con máximos en 346 nm y 445 nm. Estas bandas se atribuyen a transiciones relacionadas al enlace -C=O de los grupos carboxílicos aportados por el ácido cítrico y al enlace -C-N del grupo amida de la formamida. Estos resultados están de acuerdo con los reportados en la literatura [39]. Futura confirmación de la presencia de grupos funcionales -OH , -COOH o -NH_2 debe realizarse por espectroscopia infrarroja.

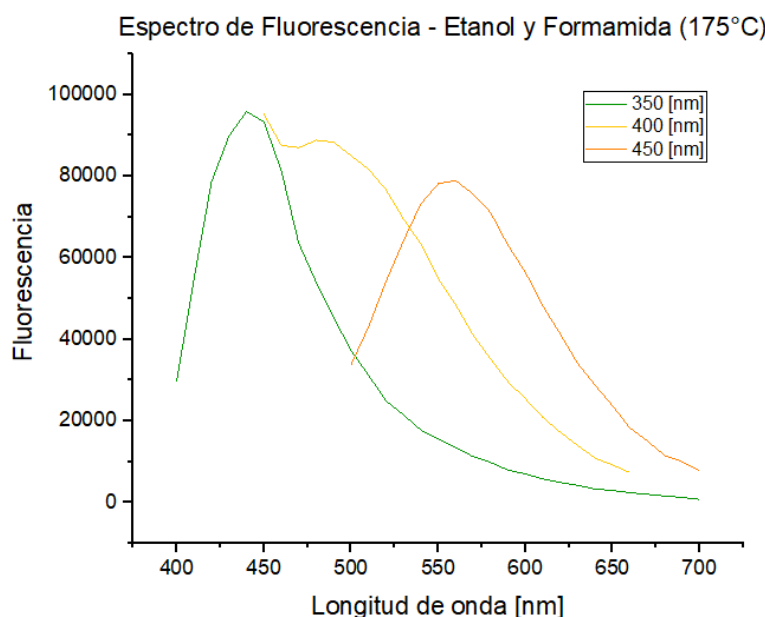


Figura 12. Espectro de emisión de los puntos de carbono a diferentes longitudes de onda de excitación.

En la figura 12, se muestra el espectro de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación de los puntos de carbono sintetizados en la mezcla de solventes. Del espectro de absorción se puede inferir que el material tiene la capacidad de interactuar y generar luz con varias longitudes de onda. Se evidencia que el comportamiento de la emisión es dependiente de la longitud de onda de excitación. A medida que se aumenta la longitud de excitación se observa un corrimiento del máximo de emisión hacia la zona roja de la porción visible del espectro electromagnético. Adicionalmente, Se observa una débil disminución de la intensidad de luz con el incremento de la longitud de onda de excitación. Esto nos permite concluir que se ha obtenido un fluoróforo cuyo máximo de intensidad puede ser controlado por la selección de longitud de onda de excitación. Así, se confirma la obtención de puntos de carbono con propiedades fluorescentes multicolores. Se debe completar estudios de propiedades de fluorescencia usando excitaciones de longitud de onda mayores a 500 nm.

6. REVISIÓN LITERARIA: PUNTOS DE CARBONO Y EL CÁNCER DE MAMA

En esta sección se presenta la revisión de estudios que reportan procedimientos de síntesis y funcionalización con fines de diagnóstico o terapéuticos para cáncer de mama y que utilizan ácido cítrico como precursor orgánico y el método solvotermal.

Los puntos de carbono (CD, por sus siglas en inglés) se definen como partículas cuasi esféricas cuya distribución de tamaño se promedia en los 10 nm. Este nanomaterial fue descubierto en 2004. La principal propiedad que hace a estas nanopartículas tan atractivas para los investigadores es su fluorescencia, la cual se ha demostrado ser dependiente de la longitud de onda de excitación y las condiciones del medio en el que se encuentren dispersados [40]–[44]. Estas propiedades los han hecho llamativos para el desarrollo de diferentes aplicaciones biomédicas que involucran biodetección, liberación controlada de medicamentos terapéuticos y obtención de imágenes *in vivo* e *in vitro* [45]–[50].

En la literatura se reporta que son biocompatibles, lo que permite que organismos o células continúen viviendo de manera sostenible pese a las altas concentraciones de los CD. Asimismo, los CD muestran buena dispersabilidad y estabilidad en medio acuoso. Se han desarrollado varios métodos de síntesis para su obtención dentro de los que se destaca procedimientos por microondas y solvo(hidro)termo. No son tóxicos y hay una gran variedad de precursores orgánicos de los que puede ser generados, lo que se traduce en bajos costos y una potencial producción en masa.

6.1 Procedimientos de síntesis y funcionalización de puntos de carbono obtenidos a partir de ácido cítrico por método solvo(hidro)termal

El rápido crecimiento que ha tenido la nanotecnología ha causado que se desarrollen diversos métodos de síntesis para la producción de nanomateriales. Estas estrategias de síntesis se pueden clasificar en dos grandes grupos: los métodos '*Top-Down*' y los métodos '*Bottom-up*'. En el primer grupo, las técnicas hacen uso de energía química, mecánica u otro tipo de energía para descomponer un material en piezas más pequeñas hasta conseguir la escala nanométrica. En el segundo grupo se sintetizan los nanomateriales a partir de la agregación de átomos o moléculas mediante reacciones químicas, de forma que crezcan en tamaño o gradualmente se ensamblen estructuras hasta conseguir el tamaño en la dimensión nanométrica. Un ejemplo para identificar mejor estos procesos, consiste en utilizar el jugo de limón como precursor orgánico para generar puntos de carbono ('*Top-Down*') o en utilizar el ácido cítrico, uno de los componentes con mayor concentración en el jugo de limón para también producir los puntos de carbono ('*Bottom-up*') [51].

A partir de la revisión literaria realizada se encontró que entre todos los protocolos disponibles ya sea por *Bottom-up* o *Top-Down*, los métodos asistidos por microondas (*Bottom-up*) son los más eficientes, ya que estos son ahorradores de tiempo, rentables, amigables con el medio ambiente y de tamaño estrecho dispersados a través del calentamiento homogéneo. Hui-Fen Wu *et al.*, sintetizan puntos de carbono a partir de un calentamiento asistido por un microondas doméstico, usando el ácido cítrico como molécula precursora de los puntos de carbono en presencia de bromuro de tetraoctilamonio en medio acuoso. La solución se calentó y se observó que tuvo un cambio en su color, pasó de transparente a rojo amarillento. Los resultados obtenidos sugirieron que se obtuvieron puntos de carbono que al ser irradiados con luz UV, presentan una fluorescencia azul [52].

Una de las estrategias más comunes utilizadas para preparar nanomateriales con formas y tamaños distintos es conocido como el método solvothermal. Es un método basado en soluciones cuyas reacciones se realizan en un recipiente a presión de acero inoxidable, también conocido como autoclave con unos reactivos dispersos en medio acuoso o un medio polar (solvente). Es un método que permite tener control de distintas características como el tamaño y la distribución de la forma de las nanopartículas. Estas propiedades dependen de los parámetros experimentales como la temperatura de la reacción, el tipo de disolvente o el tipo de precursor [51].

Por otro lado, Rogach *et al.* por medio del procedimiento hidrotermal, sintetizó tres tipos de puntos de carbono empleando ácido cítrico y tres fuentes distintas de nitrógeno: etilendiamina (E-CDs), hexametilentetramina (H-CDs) y trietanolamina (T-CDs), a una temperatura de 200°C durante 5 horas. La selección de estos se realizó con el fin de obtener puntos de carbono dopados con nitrógeno, sulfuro y fósforo. Esta decisión se basó en que se ha demostrado que la presencia de dopantes tienen un impacto en las propiedades ópticas, logrando mejorar su rendimiento fotoluminiscente [53].

Su estudio concluyó que, al enfocarse en las propiedades de absorción y emisión, hay una diferencia evidente entre las muestras compuestas principalmente por puntos de carbono (T-CDs) y aquellas con derivados de ácido citrazinico (E-CDs, H-CDs). El rendimiento más alto de fotoluminiscencia con 53% lo obtuvieron los puntos de carbono dopados con etilendiamina. Los E-CDs al ser excitados con una longitud de onda de 320 nm exhibían una emisión azul fluorescente. Para los H-CDs, su cantidad de nitrógeno es ligeramente menor a los E-CDs, pero su rendimiento cae significativamente a 17% representando una fluorescencia leve. Finalmente, los T-CDs solo presentaron un rendimiento del 7% dado que la amina terciaria impidió la formación de derivados de ácido citrazinico dando como resultado una emisión fluorescente prácticamente nula [53].

Zhe *et al.*, sintetizaron puntos de carbono usando el método hidrotermal debido a su simplicidad, bajo costo y condiciones de reacción controladas. Los investigadores reportan la preparación de puntos de carbono disolviendo ácido cítrico y etilendiamina como precursores orgánicos en agua desionizada. Posteriormente transfirieron la mezcla a una autoclave para reaccionar a 200°C durante 5 horas. Al término de la reacción, se reporta la obtención de una solución de puntos de carbono color marrón-negro. Con respecto a los espectros de absorción y fluorescencia, las longitudes de onda de absorción y emisión máximas se ubicaron a 360 y 450 nm respectivamente. Después de procesos de purificación, la dispersión acuosa de puntos de carbono se describe de color amarillo. Al ser irradiada con luz UV, la solución exhibía una fuerte luminiscencia azul. Reportes de síntesis hidrotérmicas y obtención de resultados similares se encuentran en las referencias [54]-[63].

Tabla 4. Resumen de los datos reportados en la literatura sobre síntesis y caracterización óptica de puntos de carbono sintetizados a partir de la síntesis de ácido cítrico por método solvo(hidro)termal.

Literatura	Precursor(es) orgánico(s)	Solvente	Método de reacción	Temperatura	Color de emisión
Hui-Fen Wu <i>et al</i>	Ácido Cítrico	Bromuro de tetraoctilamonio	Solvothermal	-	Fluorescencia azul
Rogach <i>et al</i>	Ácido Cítrico	Etilendiamina Hexametilentetramina Trietanolamina	Hidrotermal	200°C	Azul Fluorescente Fluorescencia leve Fluorescencia nula
Zhe <i>et al</i>	Ácido Cítrico	agua desionizada	Hidrotermal	200°C	Luminiscencia azul

6.2 Obtención de imágenes *in vitro* de células de cáncer de mama usando puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico por método solvo(hidro)termal

Los puntos de carbono cuentan con características especiales en cuanto a las propiedades fluorescentes, de estabilidad química, solubilidad y biocompatibilidad. Esto los hace llamativos en amplias aplicaciones de diferentes campos, tales como la administración de fármacos, biosensores, la obtención de imágenes celulares, entre otros.

Para el estudio de la obtención de imágenes *in vitro* de células de cáncer de mama se encontró un informe en el que estudiaban la capacidad de transporte de fármacos de los puntos de carbono (CDs) altamente fluorescentes para la administración de doxorrubicina (DOX). Zhu *et al.*, reportaron el comportamiento de internalización y la distribución intracelular de puntos de carbono con doxorrubicina (CDs-DOX) y doxorrubicina simple en células cancerígenas de mama MCF-7. Imágenes generadas por la fluorescencia de los CDs-DOX fueron obtenidas usando microscopio confocal de escaneo láser [54].

Los resultados reportaron que los núcleos celulares previamente teñidos con DAPI se señalaron en las imágenes mediante una fuerte fluorescencia azul. Por otro lado, los puntos de carbono emitieron fluorescencia verde; estos se observaron tanto en el núcleo como en el citoplasma después de un cultivo de 4 horas. Además, mostraron una tendencia de acumulación nuclear, lo que confirmó que los puntos de carbono podrían ser internalizados por las células MCF-7 logrando penetrar en los núcleos celulares. No obstante, los DOX libres con fluorescencia roja se encontraban bien distribuidos en los núcleos celulares y regiones citoplasmáticas. Cabe resaltar, que los CDs-DOX al igual que los grupos DOX libres, mostraron emisiones rojas en las regiones nucleares de las células, aunque la intensidad de los CDs-DOX era más fuertes. Por consiguiente, se demostró que los complejos CDs-DOX podrían entregar DOX de manera más efectiva en el núcleo celular [75].

Por otro lado, He *et al.*, reportaron la obtención de imágenes *in vitro* de las células de cáncer de mama 4T1 (células carcinoma de mama) a partir de la síntesis de puntos de carbono modificados con ácido hialurónico y cargados con doxorubicina (CDs-HA-DOX), en donde se estudiaron los puntos de carbono modificados como vehículo para la administración de fármacos dirigidos a CD44. Este es un receptor de adhesión a la superficie celular, el cual se expresa en muchos tipos de cáncer [64].

El ensayo de imagen celular se realizó mediante microscopia confocal de escaneo láser. Se estudiaron dos grupos: DOX libre y CDs-HA-DOX. Los estudios reportaron que se observó un proceso de endocitosis dinámico en el grupo CDs-HA-DOX en comparación con los DOX libres. También se observó que la absorción celular aumento gradualmente de 1 a 4 horas en el grupo CDs-HA-DOX y alcanzó su punto máximo a las 4 horas mientras que los DOX libres alcanzaron su punto máximo en la primera hora. Los resultados obtenidos a partir de microscopia de escaneo láser confocal, reportaron que las nanopartículas cargadas con DOX fueron internalizadas por las células 4T1 a través del efecto de direccionamiento CD44 mediado por el ácido hialurónico. Otros estudios relevantes se encuentran en las referencias [64]-[68].

6.3 Citotoxicidad

Con el fin de reconocer la manera en la que se relacionan las células cancerígenas de mama y los puntos de carbono se revisó en los artículos reportados en el numeral 2.3, si los autores habían realizado estudios de citotoxicidad.

El estudio desarrollado por Zhu *et al.*, registró que las células cancerosas de mama MCF-7 fueron tratadas con puntos de carbono (CDs) durante 24 y 48 horas a concentraciones de $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estos CDs contaban con una toxicidad muy baja y las células presentaron viabilidades superiores al 90% en todas las dosis estudiadas. Así mismo, investigaron la actividad farmacéutica de DOX libre y CDs-DOX en las células MCF-7 de incubación de 24 y 48 horas. Se pudo observar que la viabilidad de las células MCF-7 era superior al 80% a una dosis de DOX libre de $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de un cultivo de 24 horas. Mientras que en los CDs-DOX se observó una reducción alrededor del 70% en la supervivencia celular [54].

Posteriormente, se incrementó la concentración del fármaco libre a $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde se redujo la tasa de supervivencia celular. Donde al comparar la viabilidad celular con respecto a los CDs-DOX, el medicamento libre tuvo mejor resultado. Esto indica que se requiere mayor cantidad de fármaco libre para obtener un resultado positivo. La capacidad de funcionalizar un mayor número de moléculas de DOX por nanopartícula, permite reducir las dosis requeridas de medicamento [54].

Para el estudio de citotoxicidad de los puntos de carbono reportados por el grupo de Qin He, se realizó un ensayo MTT, una prueba colorimétrica para evaluar la actividad metabólica celular, con el fin de evaluar la citotoxicidad de las células 4T1 en diferentes condiciones, en donde se informó que la viabilidad celular se mantuvo generalmente por encima del 90%, después de la incubación con ácido hialurónico y cargados con doxorubicina (CDs-HA-DOX) durante 24 horas, se observó una citotoxicidad reducida al 40% cuando las células se expusieron a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DOX [64].

Los resultados mostraron mayor citotoxicidad en el grupo de DOX libre que en grupo de CDs-HA-DOX estudiándolos en las mismas condiciones. Se reportó que probablemente el grupo DOX libre podía atravesar fácilmente la membrana celular mediante difusión libre,

mientras que la liberación de DOX a partir del grupo CDs-HA-DOX dependía del enlace mediado por el ácido hialurónico [64].

Dado que el diseño de las nanopartículas y su respectivo ensayo para la adquisición de imágenes por fluorescencia *in vitro* depende de los rangos de concentración y tiempos de incubación, es importante recopilar la información que ha sido reportada en la literatura en torno a esto. Así mismo, esta información establece una ruta de partida para la elaboración de nanoplateformas más complejas y multifuncionales. Adicionalmente, es importante caracterizar el posible impacto en la viabilidad celular que cada componente de la nanoplateforma pueda tener.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se logró sintetizar puntos de carbono con emisión multicolor a través del método solvotermal. Se añadió formamida al sistema de reacción, logrando modificar la emisión luminiscente azul obtenida a partir de la síntesis de ácido cítrico y etanol. Esto significa que el nitrógeno procedente de la formamida es la base para lograr modificar las propiedades fluorescentes de los puntos de carbono. La longitud de excitación utilizada determina la emisión obtenida.

A partir de la revisión literaria realizada, se encontró una investigación en la cual, células cancerígenas de mama fueron tratadas con puntos de carbono modificados en su superficie, logrando mostrar una alta toxicidad. Sin embargo, con el fin de conocer los procesos citotóxicos a profundidad se hace necesario realizar una caracterización completa de todos los componentes que hace parte en la construcción de una nanoplateforma teranóstica. Los reportes se concentran en estudiar la capacidad de transporte de fármacos de los puntos de carbono mas no se considera la citotoxicidad intrínseca de este material. Con el fin de construir nanoplateformas más complejas basadas en puntos de carbono, es importante caracterizar el efecto de cada componente en la viabilidad celular.

Los alcances de esta investigación se vieron limitados dada la crisis que está enfrentado el mundo producto del COVID-19, debido a esto no fue posible evaluar la citotoxicidad de los puntos de carbono sintetizados sobre las líneas celulares de cáncer de mama. Dicho esto, es importante que para futuras investigaciones se complemente la información de este documento en dos aspectos: *i)* completar la caracterización de los puntos de carbono obtenidos con otras técnicas de caracterización que permitan determinar su tamaño, morfología, composición y características superficiales como microscopía de transmisión electrónica, espectroscopia infrarroja y potencial zeta; *ii)* realizar los experimentos de viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama en presencia de los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico, etanol y formamida por método solvotermal en función de la concentración.

8. REFERENCIAS

- [1] N. A. NA, A. S. Kasper, and S. J. Ferguson, *Breast Cancer: Society Shapes an Epidemic*. Palgrave Macmillan US, 2016.
- [2] V. Lostaunau, C. Torrejón, and M. Cassaretto, "Estrés, afrontamiento y calidad de vida relacionada a la salud en mujeres con cáncer de mama," *Actual. en Psicol.*, vol. 31, no. 122, p. 75, 2017, doi: 10.15517/ap.v31i122.25345.
- [3] L. Nunney, "Size matters: Height, cell number and a person's risk of cancer," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 285, no. 1889, 2018, doi: 10.1098/rspb.2018.1743.
- [4] J. García-Foncillas, E. Bandrés, V. Catalán, F. G. Amigot, and N. Zabalegui, "Conceptos básicos en biología molecular del cáncer. Susceptibilidad genética Basic concepts in the molecular biology of cancer. Genetic susceptibility," *An. Sis San Navarra*, vol. 24, pp. 31–52, 2001.
- [5] D. S. Chen and I. Mellman, "Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point," *Nature*, vol. 541, no. 7637, pp. 321–330, 2017, doi: 10.1038/nature21349.
- [6] G. M. Cooper, *The Cancer Book: A Guide to Understanding the Causes, Prevention, and Treatment of Cancer*. Jones and Bartlett, 1993.
- [7] C. Wittekind and M. Neid, "Cancer invasion and metastasis," *Oncology*, vol. 69, no. SUPPL. 1, pp. 14–16, 2005, doi: 10.1159/000086626.
- [8] OMS, "Cáncer," 2018. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [9] J. Maragall, "La OMS estima que en el 2018," 2018. <https://elmedicointeractivo.com/la-oms-estima-que-en-2018-se-superaran-los-18-millones-de-casos-nuevos-de-cancer-y-96-millones-falleceran-por-cancer/>.
- [10] G. 2018, "WORLD," 2019. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>.
- [11] OPS, "Cáncer de mama," 2018. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5041:2011-breast-cancer&Itemid=3639&lang=es.
- [12] EL_TIEMPO, "¿Cuántas muertes se registran en Colombia al año por cáncer de seno?," 2015, [Online]. Available: <https://www.eltiempo.com/salud/cifras-del-cancer-del-seno-en-colombia-y-el-mundo-283162>.
- [13] J. K. Erban, B. L. Smith, A. G. Taghian, and C. R. Thomas, *Breast Cancer: A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Management*. Springer Publishing Company, 2009.
- [14] M. Friedrich, F. H. W. Heuck, and E. A. Sickles, *Radiological Diagnosis of Breast Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [15] N. R. Council et al., *Mammography and Beyond: Developing Technologies for the Early Detection of Breast Cancer*. National Academies Press, 2001.
- [16] D. Ikeda and K. K. Miyake, *Breast Imaging: The Requisites E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2016.
- [17] W. A. Berg and J. W. T. Leung, *Diagnostic Imaging: Breast E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2019.
- [18] C. Nabuurs, M. Bart, and H. Romeny, "Physical Principles in Medical Imaging," no. October 2003, 2005.
- [19] R. Weissleder and V. Ntziachristos, "Shedding light onto live molecular targets," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 123–128, 2003, doi: 10.1038/nm0103-123.

- [20] D. Jaque, C. Richard, B. Viana, K. Soga, X. Liu, and J. García Solé, "Inorganic nanoparticles for optical bioimaging," *Adv. Opt. Photonics*, vol. 8, no. 1, p. 1, 2016, doi: 10.1364/aop.8.000001.
- [21] H. Xu *et al.*, "Nanoscale optical probes for cellular imaging," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 8, pp. 2650–2661, 2014, doi: 10.1039/c3cs60309a.
- [22] J. S. Jaffe, "Underwater Optical Imaging: The Past, the Present, and the Prospects," *IEEE J. Ocean. Eng.*, vol. 40, no. 3, pp. 683–700, 2015, doi: 10.1109/JOE.2014.2350751.
- [23] T. Etrych, H. Lucas, O. Janoušková, P. Chytil, T. Mueller, and K. Mäder, "Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 226, pp. 168–181, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.022.
- [24] D. C. Rodríguez, "Development of CaS : Eu²⁺ / Dy³⁺ + Persistent and NIR Photo-Stimulated Nanophosphors Diana Consuelo Rodríguez Burbano in The Department of Chemistry and Biochemistry Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctorate of Phi," 2017.
- [25] W. Krause, *Contrast Agents II: Optical, Ultrasound, X-Ray and Radiopharmaceutical Imaging*. Springer Berlin Heidelberg, 2003.
- [26] A. M. Smith, M. C. Mancini, and S. Nie, "Bioimaging: Second window for in vivo imaging," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 11, pp. 710–711, 2009, doi: 10.1038/nnano.2009.326.
- [27] A. M. Ibarra-Ruiz, D. C. Rodríguez Burbano, and J. A. Capobianco, "Photoluminescent nanoplateforms in biomedical applications," *Adv. Phys. X*, vol. 1, no. 2, pp. 194–225, 2016, doi: 10.1080/23746149.2016.1165629.
- [28] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann, "Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels," *Nat. Methods*, vol. 5, no. 9, pp. 763–775, 2008, doi: 10.1038/nmeth.1248.
- [29] M. Chen, X. He, K. Wang, D. He, X. Yang, and H. Shi, "Inorganic fluorescent nanoprobe for cellular and subcellular imaging," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 58, pp. 120–129, 2014, doi: 10.1016/j.trac.2014.03.003.
- [30] P. L. Choyke *et al.*, "Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: Literature review," *Mol. Imaging*, vol. 8, no. 6, pp. 341–354, 2009, doi: 10.2310/7290.2009.00031.
- [31] K. Chatterjee, S. Sarkar, K. Jagajjani Rao, and S. Paria, "Core/shell nanoparticles in biomedical applications," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 209, pp. 8–39, 2014, doi: 10.1016/j.cis.2013.12.008.
- [32] H. Gleitman, "Colloidal Upconverting Nanoparticle Systems for Integration in Targeting, Therapeutics and Imaging Applications," 2012.
- [33] A. Verma and F. Stellacci, "Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions," *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 12–21, 2010, doi: 10.1002/smll.200901158.
- [34] R. Mout, D. F. Moyano, S. Rana, and V. M. Rotello, "Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2539–2544, 2012, doi: 10.1039/c2cs15294k.
- [35] M. J. Ruedas-Rama, J. D. Walters, A. Orte, and E. A. H. Hall, "Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 751, pp. 1–23, 2012, doi: 10.1016/j.aca.2012.09.025.
- [36] J. R. Macairan, I. Zhang, A. Clermont-Paquette, R. Naccache, and D. Maysinger, "Ratiometric pH Sensing in Living Cells Using Carbon Dots," *Part. Part. Syst. Charact.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–7, 2020, doi: 10.1002/ppsc.201900430.

- [37] D. Gao *et al.*, "Exploring of multicolor emissive carbon dots with novel double emission mechanism," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 277, no. July, pp. 373–380, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.09.031.
- [38] M. V. DaCosta, S. Doughan, Y. Han, and U. J. Krull, "Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 832, pp. 1–33, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.04.030.
- [39] J. Manioudakis *et al.*, "Effects of nitrogen-doping on the photophysical properties of carbon dots," *J. Mater. Chem. C*, vol. 7, no. 4, pp. 853–862, 2019, doi: 10.1039/c8tc04821e.
- [40] Y. Song, S. Zhu, and B. Yang, "Bioimaging based on fluorescent carbon dots," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 52, pp. 27184–27200, 2014, doi: 10.1039/c3ra47994c.
- [41] Z. L. Wu, Z. X. Liu, and Y. H. Yuan, "Carbon dots: Materials, synthesis, properties and approaches to long-wavelength and multicolor emission," *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 21, pp. 3794–3809, 2017, doi: 10.1039/c7tb00363c.
- [42] H. Wang *et al.*, "Excitation wavelength independent visible color emission of carbon dots," *Nanoscale*, vol. 9, no. 5, pp. 1909–1915, 2017, doi: 10.1039/c6nr09200d.
- [43] K. Jiang *et al.*, "Red, Green, and Blue Luminescence by Carbon Dots: Full-Color Emission Tuning and Multicolor Cellular Imaging," *Angew. Chemie*, vol. 127, no. 18, pp. 5450–5453, 2015, doi: 10.1002/ange.201501193.
- [44] D. Li *et al.*, "Near-Infrared Excitation/Emission and Multiphoton-Induced Fluorescence of Carbon Dots," *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 13, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1002/adma.201705913.
- [45] H. Wang *et al.*, "A novel mechanism for red emission carbon dots: Hydrogen bond dominated molecular states emission," *Nanoscale*, vol. 9, no. 35, pp. 13042–13051, 2017, doi: 10.1039/c7nr03570e.
- [46] M. L. Liu, B. Bin Chen, C. M. Li, and C. Z. Huang, "Carbon dots: Synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications," *Green Chem.*, vol. 21, no. 3, pp. 449–471, 2019, doi: 10.1039/c8gc02736f.
- [47] J. Zhang and S. H. Yu, "Carbon dots: large-scale synthesis, sensing and bioimaging," *Mater. Today*, vol. 19, no. 7, pp. 382–393, 2016, doi: 10.1016/j.mattod.2015.11.008.
- [48] S. Qu *et al.*, "Toward Efficient Orange Emissive Carbon Nanodots through Conjugated sp²-Domain Controlling and Surface Charges Engineering," *Adv. Mater.*, vol. 28, no. 18, pp. 3516–3521, 2016, doi: 10.1002/adma.201504891.
- [49] X. Sun and Y. Lei, "Fluorescent carbon dots and their sensing applications," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 89, pp. 163–180, 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.02.001.
- [50] F. Yuan, S. Li, Z. Fan, X. Meng, L. Fan, and S. Yang, "Shining carbon dots: Synthesis and biomedical and optoelectronic applications," *Nano Today*, vol. 11, no. 5, pp. 565–586, 2016, doi: 10.1016/j.nantod.2016.08.006.
- [51] N. KUMAR and S. KUMBHAT, *ESSENTIALS IN NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY*. Canada, 2016.
- [52] M. L. Bhaisare, A. Talib, M. S. Khan, S. Pandey, and H. F. Wu, "Synthesis of fluorescent carbon dots via microwave carbonization of citric acid in presence of tetraoctylammonium ion, and their application to cellular bioimaging," *Microchim. Acta*, vol. 182, no. 13–14, pp. 2173–2181, 2015, doi: 10.1007/s00604-015-1541-5.
- [53] J. Schneider *et al.*, "Molecular fluorescence in citric acid-based carbon dots," *J. Phys. Chem. C*, vol. 121, no. 3, pp. 2014–2022, 2017, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b12519.
- [54] T. Kong, L. Hao, Y. Wei, X. Cai, and B. Zhu, "Doxorubicin conjugated carbon dots as a drug

- delivery system for human breast cancer therapy," *Cell Prolif.*, vol. 51, no. 5, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1111/cpr.12488.
- [55] W. Lu, X. Gong, M. Nan, Y. Liu, S. Shuang, and C. Dong, "Comparative study for N and S doped carbon dots: Synthesis, characterization and applications for Fe³⁺ probe and cellular imaging," *Anal. Chim. Acta*, vol. 898, pp. 116–127, 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.09.050.
- [56] X. Miao *et al.*, "Synthesis of Carbon Dots with Multiple Color Emission by Controlled Graphitization and Surface Functionalization," *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1002/adma.201704740.
- [57] Y. Wang *et al.*, "Carbon dots of different composition and surface functionalization: Cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging," *Exp. Biol. Med.*, vol. 236, no. 11, pp. 1231–1238, 2011, doi: 10.1258/ebm.2011.011132.
- [58] R. J. Fan, Q. Sun, L. Zhang, Y. Zhang, and A. H. Lu, "Photoluminescent carbon dots directly derived from polyethylene glycol and their application for cellular imaging," *Carbon N. Y.*, vol. 71, pp. 87–93, 2014, doi: 10.1016/j.carbon.2014.01.016.
- [59] Z. Yang *et al.*, "Nitrogen-doped, carbon-rich, highly photoluminescent carbon dots from ammonium citrate," *Nanoscale*, vol. 6, no. 3, pp. 1890–1895, 2014, doi: 10.1039/c3nr05380f.
- [60] G. G. Naik *et al.*, "Multi-Functional Carbon Dots from an Ayurvedic Medicinal Plant for Cancer Cell Bioimaging Applications," *J. Fluoresc.*, vol. 30, no. 2, pp. 407–418, 2020, doi: 10.1007/s10895-020-02515-0.
- [61] J. Gong, X. An, and X. Yan, "A novel rapid and green synthesis of highly luminescent carbon dots with good biocompatibility for cell imaging," *New J. Chem.*, vol. 38, no. 4, pp. 1376–1379, 2014, doi: 10.1039/c3nj01320k.
- [62] S. L. D'Souza, B. Deshmukh, J. R. Bhamore, K. A. Rawat, N. Lenka, and S. K. Kailasa, "Synthesis of fluorescent nitrogen-doped carbon dots from dried shrimps for cell imaging and boldine drug delivery system," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 15, pp. 12169–12179, 2016, doi: 10.1039/c5ra24621k.
- [63] E. F. C. Simões, J. M. M. Leitão, and J. C. G. E. da Silva, "Carbon dots prepared from citric acid and urea as fluorescent probes for hypochlorite and peroxydinitrite," *Microchim. Acta*, vol. 183, no. 5, pp. 1769–1777, 2016, doi: 10.1007/s00604-016-1807-6.
- [64] J. Li *et al.*, *Facile strategy by hyaluronic acid functional carbon dot-doxorubicin nanoparticles for CD44 targeted drug delivery and enhanced breast cancer therapy*, vol. 578. Elsevier B.V., 2020.
- [65] M. X. Liu, S. Chen, N. Ding, Y. L. Yu, and J. H. Wang, "A carbon-based polymer dot sensor for breast cancer detection using peripheral blood immunocytes," *Chem. Commun.*, vol. 56, no. 20, pp. 3050–3053, 2020, doi: 10.1039/c9cc10016d.
- [66] S. M. Ardekani, A. Dehghani, M. Hassan, M. Kianinia, I. Aharonovich, and V. G. Gomes, "Two-photon excitation triggers combined chemo-photothermal therapy via doped carbon nanohybrid dots for effective breast cancer treatment," *Chem. Eng. J.*, vol. 330, pp. 651–662, 2017, doi: 10.1016/j.cej.2017.07.165.
- [67] N. Esfandiari, Z. Bagheri, H. Ehtesabi, Z. Fatahi, H. Taviana, and H. Latifi, "Effect of carbonization degree of carbon dots on cytotoxicity and photo-induced toxicity to cells," *Heliyon*, vol. 5, no. 12, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02940.
- [68] P. Kumar, R. Meena, R. Paulraj, A. Chanchal, A. K. Verma, and H. B. Bohidar, "Fluorescence behavior of non-functionalized carbon nanoparticles and their in vitro applications in imaging and cytotoxic analysis of cancer cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 91, no. 1, pp. 34–40, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.034.

ANEXO 1

Las referencias descritas a continuación fueron la base para la revisión literaria presentada en este documento. Con el fin de someter a la revista *Universitas Scientiarum* se ampliará a otros procedimientos de síntesis, funcionalización y reportes de citotoxicidad en otras líneas celulares.

Puntos de carbono	[40] Y. Song, S. Zhu, and B. Yang, "Bioimaging based on fluorescent carbon dots," <i>RSC Adv.</i>, vol. 4, no. 52, pp. 27184–27200, 2014, doi: 10.1039/c3ra47994c. [41] Z. L. Wu, Z. X. Liu, and Y. H. Yuan, "Carbon dots: Materials, synthesis, properties and approaches to long-wavelength and multicolor emission," <i>J. Mater. Chem. B</i>, vol. 5, no. 21, pp. 3794–3809, 2017, doi: 10.1039/c7tb00363c. [42] H. Wang <i>et al.</i>, "Excitation wavelength independent visible color emission of carbon dots," <i>Nanoscale</i>, vol. 9, no. 5, pp. 1909–1915, 2017, doi: 10.1039/c6nr09200d. [43] K. Jiang <i>et al.</i>, "Red, Green, and Blue Luminescence by Carbon Dots: Full-Color Emission Tuning and Multicolor Cellular Imaging," <i>Angew. Chemie</i>, vol. 127, no. 18, pp. 5450–5453, 2015, doi: 10.1002/ange.201501193. [44] D. Li <i>et al.</i>, "Near-Infrared Excitation/Emission and Multiphoton-Induced Fluorescence of Carbon Dots," <i>Adv. Mater.</i>, vol. 30, no. 13, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1002/adma.201705913. [45] H. Wang <i>et al.</i>, "A novel mechanism for red emission carbon dots: Hydrogen bond dominated molecular states emission," <i>Nanoscale</i>, vol. 9, no. 35, pp. 13042–13051, 2017, doi: 10.1039/c7nr03570e. [46] M. L. Liu, B. Bin Chen, C. M. Li, and C. Z. Huang, "Carbon dots: Synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications," <i>Green Chem.</i>, vol. 21, no. 3, pp. 449–471, 2019, doi: 10.1039/c8gc02736f. [47] J. Zhang and S. H. Yu, "Carbon dots: large-scale synthesis, sensing and bioimaging," <i>Mater. Today</i>, vol. 19, no. 7, pp. 382–393, 2016, doi: 10.1016/j.mattod.2015.11.008. [48] S. Qu <i>et al.</i>, "Toward Efficient Orange Emissive Carbon Nanodots through Conjugated sp²-Domain Controlling and Surface Charges Engineering," <i>Adv. Mater.</i>, vol. 28, no. 18, pp. 3516–3521, 2016, doi: 10.1002/adma.201504891. [49] X. Sun and Y. Lei, "Fluorescent carbon dots and their sensing applications," <i>TrAC - Trends Anal. Chem.</i>, vol. 89, pp. 163–180, 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.02.001. [50] F. Yuan, S. Li, Z. Fan, X. Meng, L. Fan, and S. Yang, "Shining carbon dots: Synthesis and biomedical and
--------------------------	---

	optoelectronic applications," <i>Nano Today</i> , vol. 11, no. 5, pp. 565–586, 2016, doi: 10.1016/j.nantod.2016.08.006.
Síntesis y funcionalización de los puntos de carbono	[51] N. KUMAR and S. KUMBHAT, <i>ESSENTIALS IN NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY</i>. Canada, 2016. [52] M. L. Bhaisare, A. Talib, M. S. Khan, S. Pandey, and H. F. Wu, "Synthesis of fluorescent carbon dots via microwave carbonization of citric acid in presence of tetraoctylammonium ion, and their application to cellular bioimaging," <i>Microchim. Acta</i>, vol. 182, no. 13–14, pp. 2173–2181, 2015, doi: 10.1007/s00604-015-1541-5. [53] J. Schneider <i>et al.</i>, "Molecular fluorescence in citric acid-based carbon dots," <i>J. Phys. Chem. C</i>, vol. 121, no. 3, pp. 2014–2022, 2017, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b12519. [54] T. Kong, L. Hao, Y. Wei, X. Cai, and B. Zhu, "Doxorubicin conjugated carbon dots as a drug delivery system for human breast cancer therapy," <i>Cell Prolif.</i>, vol. 51, no. 5, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1111/cpr.12488. [55] W. Lu, X. Gong, M. Nan, Y. Liu, S. Shuang, and C. Dong, "Comparative study for N and S doped carbon dots: Synthesis, characterization and applications for Fe³⁺ probe and cellular imaging," <i>Anal. Chim. Acta</i>, vol. 898, pp. 116–127, 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.09.050. [56] X. Miao <i>et al.</i>, "Synthesis of Carbon Dots with Multiple Color Emission by Controlled Graphitization and Surface Functionalization," <i>Adv. Mater.</i>, vol. 30, no. 1, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1002/adma.201704740. [57] Y. Wang <i>et al.</i>, "Carbon dots of different composition and surface functionalization: Cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging," <i>Exp. Biol. Med.</i>, vol. 236, no. 11, pp. 1231–1238, 2011, doi: 10.1258/ebm.2011.011132. [58] R. J. Fan, Q. Sun, L. Zhang, Y. Zhang, and A. H. Lu, "Photoluminescent carbon dots directly derived from polyethylene glycol and their application for cellular imaging," <i>Carbon N. Y.</i>, vol. 71, pp. 87–93, 2014, doi: 10.1016/j.carbon.2014.01.016. [59] Z. Yang <i>et al.</i>, "Nitrogen-doped, carbon-rich, highly photoluminescent carbon dots from ammonium citrate," <i>Nanoscale</i>, vol. 6, no. 3, pp. 1890–1895, 2014, doi: 10.1039/c3nr05380f. [60] G. G. Naik <i>et al.</i>, "Multi-Functional Carbon Dots from an Ayurvedic Medicinal Plant for Cancer Cell Bioimaging Applications," <i>J. Fluoresc.</i>, vol. 30, no. 2, pp. 407–418, 2020, doi: 10.1007/s10895-020-02515-0. [61] J. Gong, X. An, and X. Yan, "A novel rapid and green synthesis of highly luminescent carbon dots with good biocompatibility for cell imaging," <i>New J. Chem.</i>, vol. 38, no.

	4, pp. 1376–1379, 2014, doi: 10.1039/c3nj01320k. [62] S. L. D'Souza, B. Deshmukh, J. R. Bhamore, K. A. Rawat, N. Lenka, and S. K. Kailasa, "Synthesis of fluorescent nitrogen-doped carbon dots from dried shrimps for cell imaging and boldine drug delivery system," <i>RSC Adv.</i>, vol. 6, no. 15, pp. 12169–12179, 2016, doi: 10.1039/c5ra24621k. [63] E. F. C. Simões, J. M. M. Leitão, and J. C. G. E. da Silva, "Carbon dots prepared from citric acid and urea as fluorescent probes for hypochlorite and peroxyxynitrite," <i>Microchim. Acta</i>, vol. 183, no. 5, pp. 1769–1777, 2016, doi: 10.1007/s00604-016-1807-6.
Obtención de imágenes <i>in vitro</i> de células de cáncer de mama	[64] J. Li et al., <i>Facile strategy by hyaluronic acid functional carbon dot-doxorubicin nanoparticles for CD44 targeted drug delivery and enhanced breast cancer therapy</i>, vol. 578. Elsevier B.V., 2020. [65] M. X. Liu, S. Chen, N. Ding, Y. L. Yu, and J. H. Wang, "A carbon-based polymer dot sensor for breast cancer detection using peripheral blood immunocytes," <i>Chem. Commun.</i>, vol. 56, no. 20, pp. 3050–3053, 2020, doi: 10.1039/c9cc10016d. [66] S. M. Ardekani, A. Dehghani, M. Hassan, M. Kianinia, I. Aharonovich, and V. G. Gomes, "Two-photon excitation triggers combined chemo-photothermal therapy via doped carbon nanohybrid dots for effective breast cancer treatment," <i>Chem. Eng. J.</i>, vol. 330, pp. 651–662, 2017, doi: 10.1016/j.cej.2017.07.165. [67] N. Esfandiari, Z. Bagheri, H. Ehtesabi, Z. Fatahi, H. Tavana, and H. Latifi, "Effect of carbonization degree of carbon dots on cytotoxicity and photo-induced toxicity to cells," <i>Heliyon</i>, vol. 5, no. 12, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02940. [68] P. Kumar, R. Meena, R. Paulraj, A. Chanchal, A. K. Verma, and H. B. Bohidar, "Fluorescence behavior of non-functionalized carbon nanoparticles and their in vitro applications in imaging and cytotoxic analysis of cancer cells," <i>Colloids Surfaces B Biointerfaces</i>, vol. 91, no. 1, pp. 34–40, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.034.
Citotoxicidad	[64] J. Li et al., <i>Facile strategy by hyaluronic acid functional carbon dot-doxorubicin nanoparticles for CD44 targeted drug delivery and enhanced breast cancer therapy</i>, vol. 578. Elsevier B.V., 2020. [65] M. X. Liu, S. Chen, N. Ding, Y. L. Yu, and J. H. Wang, "A carbon-based polymer dot sensor for breast cancer detection using peripheral blood immunocytes," <i>Chem. Commun.</i>, vol. 56, no. 20, pp. 3050–3053, 2020, doi: 10.1039/c9cc10016d. [66] S. M. Ardekani, A. Dehghani, M. Hassan, M. Kianinia, I. Aharonovich, and V. G. Gomes, "Two-photon excitation

	triggers combined chemo-photothermal therapy via doped carbon nanohybrid dots for effective breast cancer treatment," <i>Chem. Eng. J.</i>, vol. 330, pp. 651–662, 2017, doi: 10.1016/j.cej.2017.07.165. [67] N. Esfandiari, Z. Bagheri, H. Ehtesabi, Z. Fatahi, H. Tavana, and H. Latifi, "Effect of carbonization degree of carbon dots on cytotoxicity and photo-induced toxicity to cells," <i>Heliyon</i>, vol. 5, no. 12, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02940. [68] P. Kumar, R. Meena, R. Paulraj, A. Chanchal, A. K. Verma, and H. B. Bohidar, "Fluorescence behavior of non-functionalized carbon nanoparticles and their in vitro applications in imaging and cytotoxic analysis of cancer cells," <i>Colloids Surfaces B Biointerfaces</i>, vol. 91, no. 1, pp. 34–40, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.034.
--	--