



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN QUÍMICA APLICADA

Saltillo, Coahuila a 31 de agosto de 2023

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

Coordinación de Posgrado

Presente

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por CARLOS RUBÉN FLORES DE LA PEÑA titulado Desarrollo de nanopartículas de cobre y óxido de cobre funcionalizadas con quitosano para el encapsulamiento de un fármaco anticancerígeno el cual fue presentado el día 28 de agosto de 2023, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

SINODALES

Dra. Griselda Castruita de León
Presidente

Dra. Raquel Ledezma Rodríguez
Secretario

Dra. Gethzemani Mayeli Estrada Villegas
Vocal

ASESORES

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

Dra. Rebeca Betancourt Galindo

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: CARLOS RUBÉN FLORES DE LA PEÑA FIRMA 

TITULO: Desarrollo de nanopartículas de cobre y óxido de cobre funcionalizadas con quitosano para el encapsulamiento de un fármaco anticancerígeno

ASESORES: Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

FIRMA



Dra. Rebeca Betancourt Galindo

FIRMA



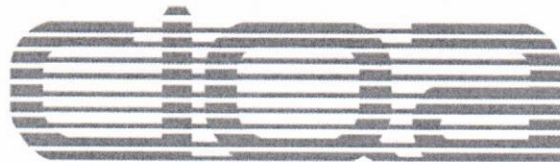
El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 28 de Agosto de 2023


Sello de la Institución


Dra. Julieta Torres González
Directora General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Desarrollo de nanopartículas de cobre y óxido de cobre funcionalizadas
con quitosano para el encapsulamiento de un fármaco anticancerígeno**

Presentada por:

CARLOS RUBÉN FLORES DE LA PEÑA

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorado por:

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz
Dra. Rebeca Betancourt Galindo

Saltillo, Coahuila. México.

Agosto, 2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Desarrollo de nanopartículas de cobre y óxido de cobre funcionalizadas con quitosano para el encapsulamiento de un fármaco anticancerígeno

Presentada por:

CARLOS RUBÉN FLORES DE LA PEÑA

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorado por:

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz
Dra. Rebeca Betancourt Galindo

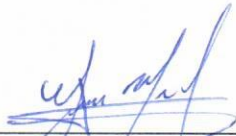
SINODALES



Dra. Griselda Castruita de León
Presidente



Dra. Raquel Ledezma Rodríguez
Secretario



Dra. Gethzemani Mayeli Estrada Villegas
Vocal

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 28 de agosto de 2023



CARLOS RUBÉN FLORES DE LA PEÑA

Nombre y Firma

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



TESIS

**DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y ÓXIDO DE
COBRE FUNCIONALIZADAS CON QUITOSANO PARA EL
ENCAPSULAMIENTO DE UN FÁRMACO ANTICANCERÍGENO**

Para obtener el grado en:

MAESTRO EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

Presentado por:

I.M. Carlos Rubén Flores de la Peña

Asesores:

Asesor: Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

Co-asesor: Dra. Rebeca Betancourt Galindo

Saltillo, Coahuila

Agosto 2023

“Y una vez que la tormenta termine, no recordarás como lo lograste, como sobreviviste. Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero una cosa si es segura. Cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entró en ella. De eso se trata esta tormenta”.

Haruki Murakami

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado para la realización del presente proyecto de investigación. Además de dar un cordial agradecimiento al proyecto CONAHCYT No. 6660 de la convocatoria CONACYT-CIENCIA DE FRONTERA 2019.

Así mismo me permito agradecerle al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) y a sus respectivos docentes quienes me han brindado la oportunidad de desarrollar conocimiento y habilidades en los diferentes campos de la ciencia de los polímeros.

Agradezco la asistencia y atenciones provistas por mis asesores, el Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz y la Dra. Rebeca Betancourt Galindo, que, gracias a sus consejos, así como sus diferentes puntos de vista, me ayudaron a tener un más amplio panorama de entendimiento sobre esta investigación, donde, sin su orientación, ayuda, comprensión, experiencia compartida y tiempo el presente trabajo no se hubiese podido llevar a cabo.

De igual manera, agradezco a mis sinodales, la Dra. Mayeli Estrada Villegas, la Dra. Griselda Castruita de León y la Dra. Raquel Ledezma por sus preguntas, comentarios y sugerencias en pro del enriquecimiento de este proyecto de investigación.

A la QFB. Bertha Puente Urbina, la MC. Gladis Cortez Mazatan, al Dr. Roberto Espinosa, Dr. Enrique Díaz Barriga, Lic. María Guadalupe Méndez, MC. Carmen Natividad Alvarado Canché por su disposición y soporte ante las dudas suscitadas a lo largo de la experimentación y caracterización, además agradezco el apoyo brindado por el laboratorio de cultivo celular para la realización de las pruebas pertinentes.

Al Dr. Luis Alfonso, M.C Aída García Valdez y Lic. Nancy Espinosa por su orientación en las cuestiones administrativas durante mi estancia en CIQA.

DEDICATORIAS

Le dedico este trabajo de investigación a mis padres, mis hermanos y mis abuelos quienes día con día me impulsan a innovar, superarme y cuestionarme en cada cosa que pienso y hago, gracias a sus atenciones, apoyo y amor.

A mis amigos que a lo largo de los años me han mostrado lo valioso de su amistad al aconsejarme, creer en mí y sobre todo estar a mi lado en cualquier circunstancia.

Y no menos importante, le dedico este esfuerzo a Dios y a la vida.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue sintetizar nanocompositos híbridos con respuesta a cambios en el pH conformados por nanopartículas de Cu (NPs Cu) y CuO (NPs CuO) funcionalizadas con quitosano para transportar doxorubicina (DOX) y observar su citotoxicidad en las líneas celulares de fibroblastos (1132SK) y cáncer de mama (MDA-MB-231). Las NPs de CuO se sintetizaron por el método de hidrólisis oxidativa, mientras que las NPs de Cu por descomposición térmica. La funcionalización con quitosano se realizó mediante el método de gelación iónica y se caracterizaron mediante las técnicas de difracción de rayos X (DRX), espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA) y microscopia electrónica de transmisión (TEM). Entonces, se eligieron dos materiales con diferentes porcentajes de injerto de quitosano: CuO (23 y 30%) y Cu (16 y 20%), para realizar los estudios de carga y liberación de DOX. La carga se llevó a cabo mediante la inmersión de las NPs en una solución acuosa de DOX con agitación constante, para después analizar su liberación a diferentes valores de pH (7.4 y 5.8) a 37 °C. Posterior a esto, se realizaron estudios de citotoxicidad para evaluar la viabilidad celular en dos diferentes líneas celulares correspondientes a MDA-MB-231 y 1132SK. Los resultados comprobaron que los nanocompositos pueden actuar como sistemas nanocarreadores de doxorubicina y liberarla de forma controlada por medio del pH. Además, estos nanocompositos presentaron citotoxicidad, la cual fue dependiente de la cantidad de NPs y DOX, ante las líneas celulares propuestas en este estudio.

Abstract

The objective of this research was to synthesize hybrid nanocomposites with response to changes in pH made up of Cu (Cu NPs) and CuO (CuO NPs) nanoparticles functionalized with chitosan to transport an anticancer drug called Doxorubicin (DOX) and to observe its cytotoxicity in cells. Cell lines corresponding to (fibroblast 1132SK) and breast cancer (MDA-MB-231). The CuO NPs were synthesized by the oxidative hydrolysis method, while the Cu NPs by thermal decomposition. Functionalization with chitosan was performed using the ionic gelation method and characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and transmission electron microscopy (TEM). Then, two reactions of each material with different functionalization percentages were chosen: CuO (23 and 30%) and Cu (16 and 20%), to carry out the DOX loading and release studies. The load was carried out by immersion in an aqueous DOX solution with constant restlessness, after that analyze its release at different pH values (7.4 and 5.8) at 37 °C. Subsequently, cytotoxicity studies were performed to assess cell viability in two different cell lines corresponding to MDA-MB-231 and 1132SK. The results verified that the nanocomposites could serve as drug nanocarriers in the controlled release of drugs, in addition to the fact that cytotoxicity dependent on the amount of NP and DOX to the cell lines proposed in this study.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. EL CÁNCER.....	3
2.1.1. <i>Tipos de cáncer</i>	4
2.1.1.1. Carcinomas	4
2.1.1.2. Sarcomas	5
2.1.1.3. Leucemias	5
2.1.1.4. Linfomas	5
2.1.2. <i>Tratamientos contra el cáncer</i>	5
2.1.2.1. Cirugía.....	5
2.1.2.2. Radioterapia	6
2.1.2.3. Quimioterapia	6
2.1.2.4. Otros tratamientos.....	7
2.1.3. <i>Medicamentos para tratar el cáncer</i>	7
2.1.3.1. Doxorrubicina	8
2.2. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	8
2.2.1. <i>Aplicaciones de las nanopartículas metálicas</i>	10
2.2.2. <i>Nanopartículas de cobre</i>	10
2.2.3. <i>Nano partículas de óxido de cobre</i>	11
2.2.4. <i>Síntesis de nanopartículas metálicas</i>	13
2.2.5. <i>Síntesis de nanopartículas de Cu por descomposición térmica</i>	14
2.2.6. <i>Síntesis de nanopartículas de CuO mediante el método hidrolisis oxidativa</i>	15
2.3. QUITOSANO.....	15
2.3.1. <i>Aplicación del quitosano</i>	17
2.4. GELACIÓN IÓNICA	18
2.5. LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS	18
2.6. NANOPARTÍCULAS DE CU Y CUO FUNCIONALIZADAS CON QUITOSANO EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS.	19

3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	22
6. PARTE EXPERIMENTAL	23
6.1. MATERIALES.....	23
6.1.1. Síntesis de NPs de CuO.....	23
6.1.2. Síntesis de NPs de Cu	23
6.1.3. Funcionalización de NPs	24
6.1.4. Carga y liberación de Fármaco.....	24
6.1.5. Evaluación de citotoxicidad.....	25
6.2. METODOLOGÍA.....	25
6.2.1. Síntesis de NPs de Cu mediante el método de descomposición térmica.....	25
6.2.2. Síntesis de NPs de CuO mediante el método de hidrólisis oxidativa	26
6.2.3 Síntesis de NPs de CuO recubiertas con quitosano.....	26
6.2.4. Pruebas de carga y liberación de DOX.....	27
6.2.5. Evaluación de pruebas de citotoxicidad.....	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE CUO.....	30
7.2. FUNCIONALIZACIÓN DE NPs CUO CON CS.....	31
7.2.1. Efecto de la concentración de TPP.....	32
7.2.2. Efecto de la concentración de CS.....	34
7.2.3. Efecto de la concentración de NPs	36
7.2.4. Efecto del tiempo de reacción.....	39
7.3 CARGA Y LIBERACIÓN DE DOX EN NPs DE CUO/CS	44
7.4. SÍNTESIS DE NPs DE CU	48
7.5. FUNCIONALIZACIÓN DE NPs CU CON CS.....	49
7.6. CARGA Y LIBERACIÓN DE DOX EN NPs DE CU/CS	54

7.7. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE NPs DE CuO/CS Y Cu/CS.....	56
7.7.1 Estudios de citotoxicidad in vitro de los nanocompositos basados en NPs de CuO ...	57
7.7.2 Estudios de citotoxicidad in vitro de los nanocompositos basados en NPs de Cu.....	60
8. CONCLUSIONES.....	64
9. REFERENCIAS.....	65

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 . Estructura química de la doxorubicina.....	8
Fig. 2. Representación de: A) NPs esféricas, B) NPs en forma de prisma, C) NPs en forma core-shell. ³¹	10
Fig. 3. Esquema de las diferentes estrategias utilizadas para la síntesis de NPs metálicas. ³⁰	13
Fig. 4. Ejemplificación grafica de las dos rutas de síntesis de NPs. ³⁹	14
Fig. 5. Representación de las estructuras de a) Quitina y b) Quitosano.	16
Fig. 6. <i>Interacción entre las cadenas de CS y las NPs con el TPP mediante gelación iónica.</i> ⁵¹ .	27
Fig. 7. Curva de calibración de DOX ⁵²	28
Fig. 8. Patrón de difracción de Rayos X de NPs de CuO obtenidas mediante el método de hidrólisis oxidativa y su estándar (carta JCPDS 48-1548).....	30
Fig. 9. a) Micrografía obtenida por TEM de las NPs de CuO y sus histogramas correspondientes a la distribución de b) largo y c) ancho de NPs.	31
Fig. 10. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de CuO/CS obtenidas variando la concentración de TPP de 1 a 6 mg/mL. a) DRX, b) FTIR y c) TGA.	34
Fig. 11. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de CuO/CS variando parámetros de concentración de CS. a) DRX, b) IR y c) TGA.	36
Fig. 12. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de CuO/CS variando parámetros de concentración de NPs. a) DRX, b) IR y c) TGA.	38
Fig. 13. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de CuO/CS variando el tiempo de reacción a) DRX, b) IR y c) TGA.....	40
Fig. 14. Micrografías TEM de NPs CuO/CS con un contenido de CS de a) 30 y b) 23 %.	43
Fig. 15. Cambio de coloración de la solución de DOX por la formación del complejo entre las NPs de CuO con DOX.	44
Fig. 16. Espectros de UV donde se muestra el desplazamiento batocrómico por parte de las diferentes soluciones remanentes de la carga de fármaco en los dos diferentes nanocompositos con diferente contenido de CS, NPs de CuO con DOX y NPs de CuO dispersas en agua.	45
Fig. 17. Perfiles de a) Carga y b) liberación de DOX de NPs sin modificar y modificadas con CS a diferentes pH (5.8 y 7.4).	47
Fig. 18. Comportamiento de la liberación de las NPs ante diferentes pH	48

Fig. 19. Patrón de difracción de Rayos X de NPs de Cu obtenidas mediante el método de descomposición térmica y su estándar (carta JCPDS 04-0836).....	48
Fig. 20. a) Micrografía de TEM y b) Histograma de la Distribución de tamaño de partícula de las NPs de Cu sintetizadas.....	49
Fig. 21. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de Cu/CS con 16 y 20 % de CS. a) DRX, b) IR y c) TGA.	52
Fig. 22. Micrografías de TEM de a) NPs Cu/CS ^{20%} y b) NPs Cu/CS ^{16%}	54
Fig. 23. a) Perfiles de carga de DOX en las diferentes NPs de Cu y b) Liberaciones de DOX de las NPs cargadas en diferentes pH (5.8 y 7.4).	56
Fig. 24. Viabilidad celular de NPs de CuO, CuO/CS y CuO/CS/DOX en a) fibroblastos y b) cáncer de mama.....	59
Fig. 25. Viabilidad celular de NPs de Cu, Cu/CS y Cu/CS/DOX en a) fibroblastos y b) cáncer de mama.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de NPs de CuO por hidrolisis oxidativa.....	23
Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis de NPs de Cu por descomposición térmica.....	23
Tabla 3. Reactivos y materiales empleados para la funcionalización de las NPs.....	24
Tabla 4. Reactivos y materiales empleados durante la carga y liberación de fármaco.....	24
Tabla 5. Reactivos y materiales empleados para las pruebas de citotoxicidad.....	25
Tabla 6. Pérdidas en peso (%) correspondientes a las cantidades de TPP empleadas en la funcionalización de las NPs.....	32
Tabla 7. Tamaños hidrodinámicos aproximados de los diferentes nanocompositos de CuO por la técnica DLS y potencial Z.....	41
Tabla 8. Tamaños hidrodinámicos de los nanocompositos de NPs de Cu/CS con diferente contenido de polímero.....	53
Tabla 9. Investigaciones previamente reportadas de nanomateriales de CuO y Cu con sus respectivas viabilidades celulares incluyendo los resultados obtenidos en esta investigación.....	63

ABREVIATURAS**DOX:** Doxorubicina**NPs:** Nanopartículas**CuO:** Óxido de cobre (II) u Óxido cúprico**Cu:** Cobre**Au:** Oro**Ag:** Plata**ZnO:** Óxido de zinc**CS:** Quitosano**TPP:** Tripolifosfato de sodio**SEM:** Microscopio electrónico de barrido**TEM:** Microscopio electrónico de transmisión**TGA:** Análisis termo gravimétrico**DRX:** Difracción de rayos X**FTIR:** Espectroscopia de infrarrojo**DLS:** Dispersión de luz dinámica**UV-Vis:** Espectroscopia ultravioleta-visible**ADN:** Ácido desoxirribonucleico**ARN:** Ácido ribonucleico**FCC:** Estructura cristalina centrada en las caras**pH:** Potencial de hidrogeno**pKa:** Logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil

CR: Rojo Congo

EBT: Negro eritocromo T

CEO: Aceite esencial de cedro indonesio

Q: Quercetina

MTT: Timidina marcada con tritio

CVS: Tinción de cristal violeta

ATP: Trifosfato de adenosina

CuCl₂: Cloruro de cobre

KNO₃: Nitrato de potasio

KOH: Hidróxido de potasio

CuSO₄: Sulfato de cobre

ATCC: American type culture collection

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

SDS: Dodecilsulfato de sodio

1. Introducción

En la actualidad el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos está siendo de gran interés por parte de la ciencia y la tecnología. Existen diferentes opciones para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos, entre las que se encuentran NPs con propiedades específicas que suplen las deficiencias de los sistemas terapéuticos y de diagnóstico que se utilizan en la actualidad ¹.

Particularmente, hoy en día se están buscando nuevas alternativas para mejorar la eficiencia terapéutica contra diversos padecimientos como es el cáncer, esto con la finalidad de disminuir los efectos secundarios y su invasión celular. Las amplias diferencias existentes entre el cáncer y su evolución con el tiempo a adquirir resistencia justifican la búsqueda de diversas opciones de tratamiento como lo son los sistemas de administración de agentes de liberación. Entre estos se incluyen complejos de liposomas y NPs que pueden ser formulados por diferentes materiales que incluyen polímeros, materiales cerámicos y NPs metálicas ².

El cobre es considerado un metal esencial porque se encuentra de manera natural en el cuerpo y el organismo lo elimina fácilmente, además resulta ser menos tóxico en comparación con metales que no forman parte del cuerpo como lo es el platino, elemento con el que se encuentran elaborados algunos sistemas terapéuticos ³. Por otro lado, el óxido de cobre (CuO) es un compuesto semiconductor con una estructura FCC (estructura cristalina centrada en las caras). Este compuesto ha atraído la atención en particular porque exhibe una amplia gama de propiedades físicas potencialmente útiles, tales como alta conductividad, efectos de electrones de correlación, dinámica de espín, entre otras ^{4,5}. Además, el CuO ha sido de gran interés debido a su aplicación como agente antimicrobiano ⁶⁻⁸. Existen varios métodos para la preparación de NPs de Cu y CuO que incluye la descomposición térmica de sales de cobre, síntesis alcotérmica, precipitación, entre otros. Recientemente, las NPs de CuO han sido utilizadas en diferentes aplicaciones biomédicas tales como el desarrollo de materiales antimicrobianos ^{9,10}, ingeniería de tejidos ¹¹, tratamiento de cáncer ¹²⁻¹⁴ así como también en catálisis ¹⁵ y adsorción y fotodegradación de colorantes ^{16,17}.

Por otra parte, el uso de materiales poliméricos como agentes de recubrimiento puede dar lugar a una variedad de aplicaciones potencialmente importantes en diferentes campos. Las partículas

desarrolladas con estos recubrimientos podrían tener una gran área superficial que le permitiría ser cargados con algún fármaco. En la actualidad, los polímeros de origen natural han sido utilizados ampliamente en la administración de fármacos, como es el caso de algunos polisacáridos como el quitosano (CS). El CS es un polisacárido con pH sensible cuya principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino. Este biopolímero es el más abundante encontrado en la naturaleza después de la celulosa y ha sido ampliamente utilizado en la industria de alimentos y farmacéutica debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad ¹⁸. Además, el CS puede conjugarse con varios compuestos debido a su capacidad como agente quelante y esta característica se puede aprovechar para la carga de fármacos en la superficie de las NPs. Por esta razón, el CS ha sido empleado en sistemas de administración de fármacos para medicamentos como doxorubicina (DOX) y paclitaxel (PTX) ^{19,20}. Además, la conjugación activa de fármacos a este tipo de materiales también puede maximizar la exposición de las células al fármaco por tiempo prolongado y mejorar la penetración de las barreras fisiológicas ayudando a reducir su toxicidad. Es importante mencionar que la efectividad de los sistemas de liberación está determinada por la interacción de las NPs-polímero-fármaco.

Por lo tanto, en este trabajo se plantea el desarrollo de NPs de Cu y CuO recubiertas con CS para su uso como sistema de liberación controlada de un agente anticancerígeno (DOX). Las NPs de Cu y CuO modificadas con CS y cargadas DOX fueron evaluadas en líneas celulares de cáncer correspondientes a cáncer de mama (MDA-MB-231) y fibroblastos (1132SK), para conocer el efecto citotóxico entre el fármaco y las NPs hacia este tipo de células.

2. Antecedentes

2.1. El cáncer

El cáncer es una enfermedad que se conoce desde hace mucho tiempo y en la cual existe un crecimiento celular descontrolado, esto en ocasiones por daños en el ADN de las células. Este daño genera un cambio en la estructura celular o mutación, al sufrir esta mutación la célula puede tomar dos caminos: el primero donde se auto destruye o la elimina nuestro sistema inmune y el segundo donde esta célula se reproduce a gran velocidad y de manera descontrolada, formándose una masa, que se conoce como crecimiento o tumor.

Existen dos tipos de tumores:

- **Tumores benignos:**

Estos no se extienden a otras partes del cuerpo y no implican un riesgo para la vida en la mayoría de los casos.

- **Tumores malignos:**

Estos son células de cáncer que se reproducen a gran velocidad sin un orden ni control.

El cáncer no solo es una enfermedad, si no que consiste en más de 200 enfermedades diferentes. No se tiene conocimiento de la causa específica del cáncer, pero si se tiene una certeza y es que no hay una causa única para el desarrollo de este. La mayor creencia entre los científicos es que la célula se daña con el tiempo y este daño se puede producir por el ambiente al que la persona está expuesta y el estilo de vida de la persona. Dependiendo del daño al que se expongan las células y los factores de riesgo a los que se exponga la persona, será la posibilidad de la formación de células tumorales malignas. Estos factores de riesgo aumentan las posibilidades de que una persona desarrolle esta enfermedad.

Estos factores dependen de:

- El historial familiar
- A qué se expone día a día (medio ambiente, radiación, ocupación, etc.)
- La forma en la que vive la persona (uso de tabaco, dieta, consumo de alcohol, actividad física, etc.)

El diagnóstico del cáncer únicamente se puede confirmar mediante la observación en un microscopio de las células mediante una biopsia, que consiste en tomar una pequeña muestra de las células y observar diferencias en tamaño y forma a comparación de células sanas.²¹

2.1.1. Tipos de cáncer

Como se mencionó anteriormente el cáncer consiste en más de 200 enfermedades que atacan al cuerpo humano en diferentes áreas del cuerpo. El tipo de cáncer es definido por su ubicación, es decir, en el órgano o tejido donde este se formó, cada uno alterando a las células de diferente manera.

Según el área donde se origina, se pueden definir como:

2.1.1.1. Carcinomas

Estos se forman a partir de células llamadas epiteliales, que se encargan de recubrir la superficie de los órganos y glándulas. Estos representan el 80% de los casos de cáncer, donde algunos ejemplos son:

- Cáncer de pulmón
- Cáncer de mama
- Cáncer de colon
- Cáncer de próstata
- Cáncer de páncreas
- Cáncer de estomago

2.1.1.2. Sarcomas

Este tipo de cáncer se forma a partir del tejido conectivo o conjuntivo, en el que se encuentran los músculos, huesos, cartílagos o el tejido graso. Los más comunes son los sarcomas óseos.

2.1.1.3. Leucemias

Este tipo de afección se origina en el tejido encargado de mantener la producción de glóbulos rojos, blancos y plaquetas, lo que se conoce como médula ósea. Los cambios en estas células derivan en anemia, infecciones y sangrados o trombosis.

2.1.1.4. Linfomas

Como su nombre hace referencia, se desarrollan a partir del tejido linfático, entre los cuales se encuentran los ganglios y órganos linfáticos.²²

2.1.2. Tratamientos contra el cáncer

Los tratamientos contra el cáncer principalmente se basan en la cirugía, radio terapia y quimioterapia. Aunque existen otros tratamientos como la hormonoterapia, inmunoterapia, los blancos terapéuticos no citotóxicos y el trasplante de médula ósea.

2.1.2.1. Cirugía

La cirugía es una forma tanto de tratar el cáncer como de diagnosticarlo mediante una biopsia, de igual manera sirve para determinar donde se encuentra, si se ha diseminado y si está afectando las funciones de otros órganos. Es una manera de extirpar el tumor de manera parcial o total, aunque en algunas ocasiones puede haber reincidencia de la afección.

Existen dos tipos principales de cirugías: la cirugía primaria o extirpación de tumor y la cirugía de mínima invasión que proporcionan un tiempo de recuperación más rápido, como es el caso de la endoscopia, cirugía laparoscópica, cirugía con láser, criocirugía y cirugía robótica.²³

2.1.2.2. Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento que emplea la energía que se obtiene de neutrones, rayos gamma, protones como rayos X que mediante un controlado manejo de su liberación pueden ser capaz de dañar y destruir tanto células cancerosas como regulares.

La radioterapia sirve para la reducción de tumores y existen dos tipos básicos la teleterapia o irradiación a distancia y la braquiterapia o irradiación en contacto, entre otros tipos de radioterapia se encuentran: Neoadyuvante y adyuvante.²⁴

2.1.2.3. Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento contra el cáncer que consiste en el uso de fármacos cuya acción química permite identificar o frenar el crecimiento de las células cancerosas que tienen un crecimiento descontrolado en el cuerpo. Este tratamiento se usa como primera opción para reducir el tamaño de los tumores, así como también se puede usar posteriormente a un procedimiento para eliminar las células cancerosas remanentes o para aliviar síntomas o molestias en pacientes con un cáncer avanzado.

Las vías de administración pueden ser de forma oral, tópica, intravenosa, por inyecciones o colocación directa a través de una punción lumbar. En la gran mayoría de centros hospitalarios esta se aplica mediante un catéter central, mientras se suministran líquidos vía intravenosa y se obtienen muestras de sangre. La duración del tratamiento dependerá directamente del tipo de fármaco empleado, así como su reacción ante el cuerpo, efectos secundarios y dosis administrada. Por lo general, la quimioterapia se administra en ciclos para poder atacar cuando el tumor se encuentre vulnerable y de esta manera dejar pasar lapsos de tiempo para que las células sanas del cuerpo puedan recuperarse del daño sufrido.

Aunque este tratamiento ataca a las células del carcinoma, también afecta el crecimiento de otras células como las encargadas del crecimiento del cabello, boca, tracto gastrointestinal y médula ósea. El paciente tratado puede experimentar efectos secundarios como: náuseas, cambios en el

sentido del gusto, fatiga, llagas en la boca, cardiotoxicidad, pérdida de cabello, neuropatía, disfunción sexual y una disminución en los recuentos de células en la sangre.²⁵

2.1.2.4. Otros tratamientos

Existen otros tratamientos para el cáncer como los son: la hormonoterapia, la inmunoterapia, el uso de anticuerpos monoclonales, trasplante de medula ósea, terapia génica, fototerapia, hipertermia magnética y sistemas de nano acarreadores.

En estos tratamientos innovadores o diferentes a los convencionales el que más es de interés para este trabajo es el de nano acarreadores, que consisten en el uso de nanomateriales para el transporte de fármaco y así llevar a cabo la liberación de este de una manera controlada y direccionada. La función principal de los nanoacarreadores es proteger al fármaco de la degradación antes de llegar a su punto objetivo y mejorar su absorción en tejidos específicos como los dendrímeros, liposomas, micelas, NPs, etc.²⁶

2.1.3. Medicamentos para tratar el cáncer

En la actualidad existen diferentes tratamientos para atacar el cáncer los cuales se han reportado que carecen de selectividad, debido a que no solo atacan a las células enfermas sino también a la sanas, ya que los fármacos no distinguen entre ellas. Por esta situación, surge la necesidad de generar nuevos medicamentos que tengan una capacidad de selectividad efectiva. Al tratar el cáncer se distinguen distintos medicamentos que se pueden clasificar en: agentes alquilantes (se encargan de dañar directamente la información genética de las células evitando la reproducción celular), antimetabolitos (impiden el metabolismo celular e interfieren con la producción de ADN al igual que ARN al sustituir los elementos fundamentales de las moléculas), las antraciclinas (interfieren con las enzimas involucradas en la replicación del ADN) y los inhibidores mitóticos (se encargan de detener la mitosis o evitar que las enzimas produzcan las proteínas necesarias para la reproducción celular).²⁷

2.1.3.1. Doxorrubicina

La doxorrubicina (peso molecular de 543.52 g/mol) es uno de los agentes químicos más comunes empleados para tratar diferentes tipos de cáncer, es un compuesto antraclínico y un fármaco antineoplásico muy efectivo para el tratamiento de leucemia, cáncer (tiroides, mama, ovario, vejiga, estómago etc), sarcoma de Kaposi, linfoma de tipo Hodgkin's y no Hodgkin's y sarcomas de los tejidos blandos y osteogénicos. La estructura química de este agente químico se muestra en la Fig. 1.

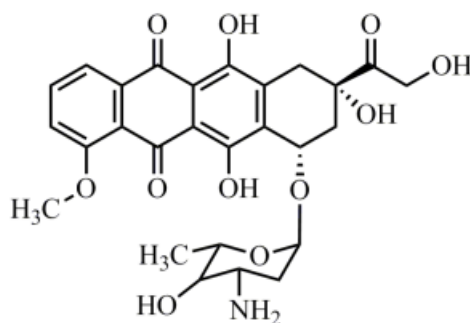


Fig. 1 . Estructura química de la doxorrubicina.

La dosis de DOX se calcula por lo general en base a la superficie corporal en mg/m^2 , donde se recomienda una dosis de entre 60 y 75 mg/m^2 de superficie corporal cada tres semanas cuando la DOX se usa como agente único. También, la implementación clínica de DOX está limitada por sus efectos adversos dosis dependiente, donde los más graves y relevantes son la disminución de la actividad de la médula ósea (mielosupresión) y la cardiotoxicidad, además de toxicidad hematológica, gastrointestinal, dermatológica y renal.^{28,29}

2.2. Nanopartículas metálicas

Las NPs son aquellas que sus dimensiones van de 1 a 100 nm, las cuales surgen a partir de la nanociencia, que busca reducir el tamaño de los materiales para modificar sus propiedades. Las NPs se clasifican en:

- Naturales
- Incidentales

- De ingeniería
- Amorphas
- Cristalinas
- Poliméricas
- Materiales compuestos

Debido a su química, las NPs predominantes son las no metálicas como es el caso de las basadas en carbono (poliméricas) y las metálicas como las de oro y plata. Las NPs pueden tener diferentes formas que adquieren relevancia en las aplicaciones que se le darán, podemos encontrar NPs de forma: esférica, cilíndrica, en barras y plaquetas.³⁰ Las NPs metálicas implican una reducción de tamaño de los compuestos metálicos para modificar sus propiedades, además, la mayoría de estas NPs presentan una estructura FCC.³¹

El estudio de las NPs adquiere gran interés ya que son consideradas una de las bases más importantes para construir sistemas a escala nanométrica. Además, estas tienen procesos de síntesis fáciles, reproducibles, sin agentes surfactantes y un control relativamente fácil de su tamaño.

Las NPs metálicas pueden ser preparadas y estabilizadas por métodos químicos como reducción química, técnicas electroquímicas, reducción fotoquímica y la pirolisis, físicos como descarga de arco, la condensación de vapor físico y biológico. Debido a la reducción de tamaño estas partículas presentan propiedades ópticas, térmicas, químicas y físicas inusuales, esto a causa de una alta proporción de átomos con superficie de alta energía a diferencia del material en escala macro. Pueden permanecer en un desecador durante meses si ningún cambio en su morfología, lo que facilita su almacenamiento.³²

La morfología de las NPs se ve influenciada por los parámetros de fabricación que presente, el flujo de material de crecimiento, la presencia de un sustrato, entre otros. Hay una gran variedad de formas que pueden adoptar las NPs con diferentes morfologías, como esferas, prismáticas, núcleo-coraza (core-shell), etc (Fig. 2). Entre las propiedades que poseen las NPs metálicas las más

relevantes son sus propiedades optoelectrónicas, térmicas, magnéticas y alta capacidad catalítica.

30

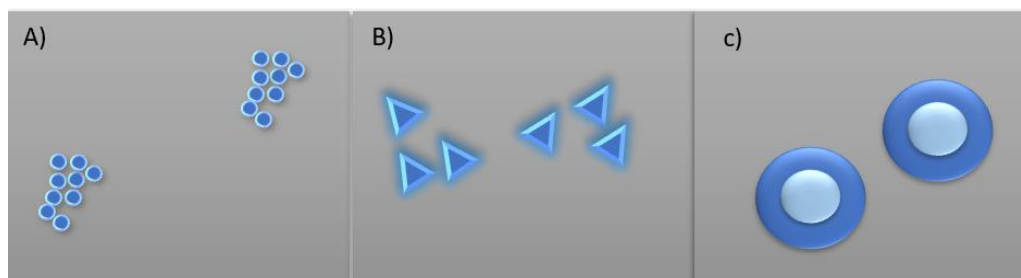


Fig. 2. Representación de: A) NPs esféricas, B) NPs en forma de prisma, C) NPs en forma core-shell. ³¹

2.2.1. Aplicaciones de las nanopartículas metálicas

Las NPs metálicas, tales como las NPs de Au, Ag, Cu, CuO y ZnO tienen una variedad de aplicaciones en diferentes campos, como la electrónica, cosméticos, revestimientos, envases y biotecnología. Además, tiene muchas aplicaciones potenciales como, por ejemplo: catalizadores, aditivos para lubricantes, nanofluidos de transferencia de calor, fabricación de dispositivos electrónicos y ópticos, tintas conductoras, materiales para conversión de energía solar, biosensores, agentes anti-incrustantes, agentes antimicrobianas, tratamientos de células cancerosas, etc. ^{32,33}

2.2.2. Nanopartículas de cobre

El cobre es considerado uno de los metales más importantes en las tecnologías actuales, como todo compuesto nano, al reducir su tamaño se consigue una gran área superficial respecto a su volumen esto hace que resalten las propiedades del cobre y cambien respecto a sus propiedades a escala macro.

Al igual que las NPs de plata, las NPs de cobre poseen características antimicrobianas y favorece la liberación de iones de cobre siendo más nocivo para microorganismos patógenos. ³⁴ Estas NPs pueden ser sintetizadas por diferentes métodos, con los cuales se puede controlar el tamaño y morfología de las NPs. Lo más importante a considerar es la relación molar, temperatura, pH,

velocidad de agitación, entre otros parámetros. Existen diferentes métodos de obtención de NPs como: microemulsión, deposición al vacío, método del polirol, descomposición térmica, etc.³⁵

Algunas de las aplicaciones de estas NPs están relacionadas con su uso en conjunto con polímeros. En 2020, Nguyen y col. usaron un compuesto de NPs de cobre-quitosano (CuCS) como agente antibacteriano para combatir una problemática causada por la bacteria *vibrio parahaemolyticus*. Los resultados confirmaron una eliminación total de la bacteria tras un periodo de incubación de 2 h.⁸ Por su parte, Mokhtar y col. de igual manera aprovecharon el potencial antibacteriano de un nanocomposito de Cu-NPs-magadiita/CS contra la *E. coli* y *S. aureus*.⁷

2.2.3. Nano partículas de óxido de cobre

El óxido de cobre (CuO) es un material semiconductor que posee una estructura FCC, además de contar con propiedades físicas como alta conductividad entre otras que lo hacen un material útil para potenciales aplicaciones.

El CuO es menos costoso que la plata, tiene facilidad de mezclado con polímeros y es relativamente estable tanto física como químicamente. Al igual que el cobre, es posible reducir su tamaño de partícula y cambiar su morfología al ser obtenido por diferentes métodos de síntesis tales como descomposición térmica de sales de cobre, síntesis alcotérmica y precipitación. De acuerdo con Pramanik y col. se han investigado varios compuestos de cobre por presentar actividad anticancerígena como CuO, Cu, etc.³⁶

Con el uso del método de precipitación para la preparación de NPs de CuO, se obtiene una buena dispersión y distribución de tamaño, obteniendo diferentes morfologías.³⁶ Existen diferentes trabajos relacionados con la aplicación de las NPs de CuO, algunos de ellos enfocados a la mezcla de las NPs con diferentes matrices poliméricas, como es el caso de algunas de las aplicaciones potenciales que recientemente se han estudiado para el conjunto CuO-CS que se mencionan a continuación:

- a) En 2017 Wahid y col. Prepararon una serie de nanocompositos con propiedades antibacterianas basados en carboximetilquitosano/CuO. Al ser caracterizados, se mostró

una buena distribución de las NPs en el hidrogel a través de las micrografías de SEM. Por otro lado, los patrones de DRX mostraron la formación de estructuras cristalinas monoclinicas de las NPs de CuO. Los hidrogeles con CuO mostraron mayor hinchamiento en comparación con el hidrogel puro. Estos nanocompositos se estudiaron contra *S. aureus* y *E. coli* demostrando buenas propiedades antibacterianas, haciendo de estos nanocompositos viables para aplicaciones biomédicas.⁶

- b) En 2019 Jayaramudu y col. sintetizaron películas antibacterianas de CSCuO-CS y CSCu-CS que mostraron una excelente actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *Bacillus*. Las NPs de CSCuO y el correspondiente nanocomposito (CSCuO-CS) mostraron una mayor actividad antimicrobiana en comparación con las NPs de CSCu y sus películas nanocompuestas (CSCu-CS).⁹
- c) Por su parte en 2021 Srivastava y col. investigaron la capacidad de adsorción de colorantes orgánicos presentes en aguas residuales utilizando perlas de CS inmovilizadas con NPs de CuO. Los colorantes empleados fueron el rojo congo (CR) y el negro eriocromo T (EBT). La incorporación de las NPs de CuO mejoró la eficacia de las perlas de CS para eliminar los colorantes de la solución acuosa.¹⁷
- d) En el 2021 Wardana y col. prepararon una película de CS con NPs de CuO cargadas con aceite esencial de cedro indonesio (CEO) para aplicaciones de empaque de alimentos con propiedades antifúngicas. La formulación de esta película constó de 0.8% de CS, 0.025% NPs de CuO y 0.5% de CEO. A través de técnicas de caracterización se determinó su biocompatibilidad, además de sus propiedades fisicoquímicas, se observó que al incorporar las NPs y el CEO, la película de CS sufre cambios en la transmisión de la luz, transparencia, viscosidad aparente y rugosidad. Además, se confirmó que al incorporar estos componentes al CS, se mejoraron sus propiedades antifúngicas contra *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*¹⁰.
- e) En 2021 Javed y col. Estudiaron la aplicación odontológica de NPs de CuO/CS, demostrando un buen efecto citotóxico en bacterias en comparación con las NPS de CuO. Llegaron a la conclusión de que son materiales con un potencial para ser utilizados en la administración de fármacos y la nanoteranóstica.³⁷

2.2.4. Síntesis de nanopartículas metálicas

Cuando se habla de distintas vías de obtención de NPs, existen muchos métodos disponibles, sin embargo, se elige un método adecuado para la demanda requerida de distribución de tamaño, morfología, cristalinidad y propiedades. Los métodos de síntesis se clasifican según su estrategia de síntesis, fuentes de energía y por la naturaleza del proceso como se puede observar en la Fig. 3.

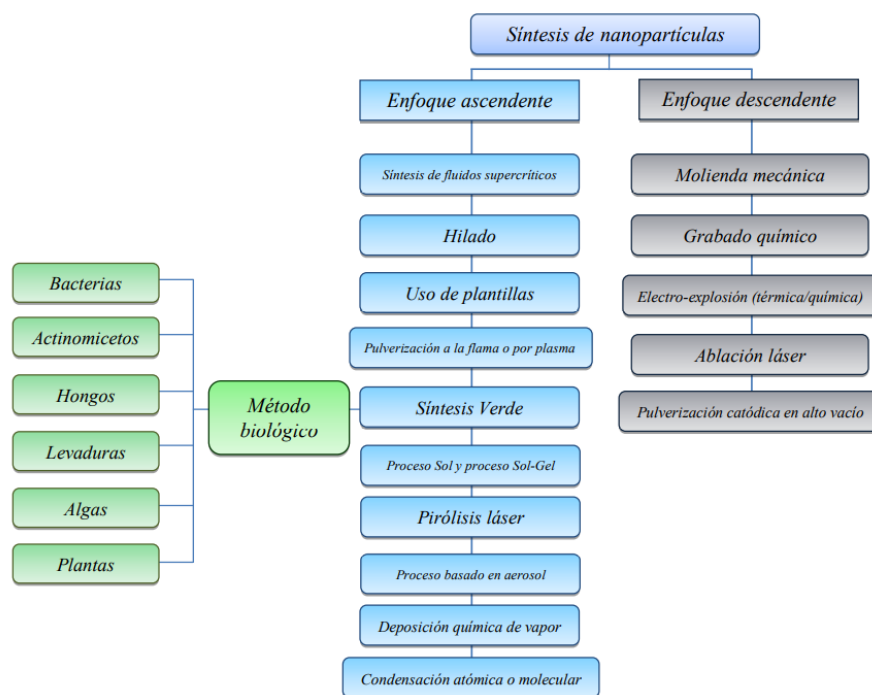


Fig. 3. Esquema de las diferentes estrategias utilizadas para la síntesis de NPs metálicas.³⁰

Existen diferentes rutas para la síntesis de NPs, dos de las grandes técnicas principales son las descendentes (top-down) que consiste en la reducción de tamaño de un material a escala macroscópica hasta llegar a la escala nanométrica empleando molienda, desgaste y/o métodos químicos. Por otro lado, las técnicas ascendentes (bottom-up) consisten en llegar a NPs con la habilidad de auto organizarse a través de la condensación de átomos en una fase gaseosa o en solución.³⁸

El conjunto de técnicas a emplear se puede de igual manera dividir en dos:

- **Métodos químicos:**

Estos implican la reducción o precipitación de elementos metálicos en presencia de agentes estabilizantes, estos métodos tienen mayor facilidad de implementación y un mayor control de tamaño de partícula, por lo tanto, son los más utilizados.

- **Métodos Físicos:**

Dentro de los métodos físicos tenemos la termólisis, sonoquímica y fotoquímica. La utilización de estos métodos consta de varias etapas: la vaporización por diversas técnicas de un sustrato, la condensación de los átomos para formar el núcleo inicial, el crecimiento del núcleo por la adición de más átomos y la coalescencia. Una representación gráfica de las dos rutas de síntesis de NPs se ejemplifica en la Fig. 4.

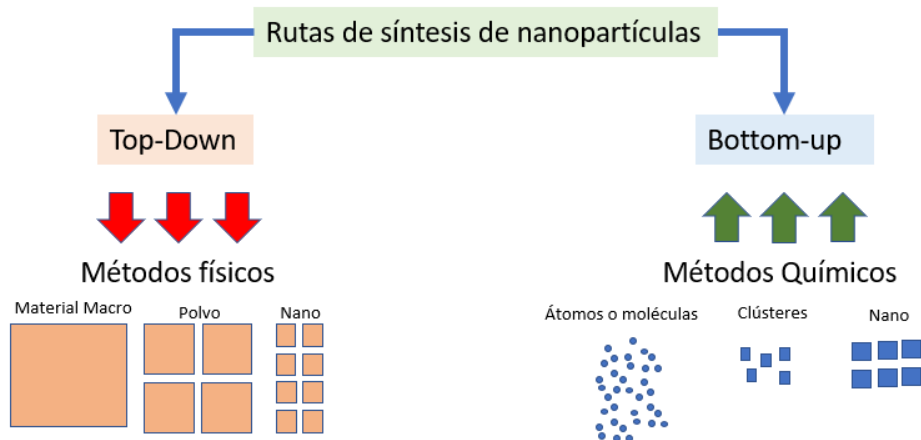


Fig. 4. Ejemplificación gráfica de las dos rutas de síntesis de NPs. ³⁹

2.2.5. Síntesis de nanopartículas de Cu por descomposición térmica

La descomposición térmica es una de las técnicas más comunes para obtener NPs de Cu con una morfología uniforme y una distribución de tamaño monodispersa.

La nucleación acontece cuando el material iniciador del metal se adiciona en una solución en presencia de un material tenso activo, mientras que a la temperatura más alta de reacción ocurre el crecimiento de la nanopartícula. Las NPs de cobre son muy susceptibles a la oxidación, así que se

usan agentes protectores que previenen la oxidación en la superficie de las NPs, además de controlar su crecimiento jugando un papel importante en el control de tamaño de las NPs.³⁶

2.2.6. Síntesis de nanopartículas de CuO mediante el método hidrolisis oxidativa

Una de las técnicas empleadas para la síntesis de NPs de CuO es el método de hidrolisis oxidativa. Por medio de este método se obtienen óxidos metálicos por reacciones heterogéneas en un medio acuoso superando los 100 °C en un sistema cerrado.

Para realizar este tipo de reacciones, por lo general, se ocupa un líquido como agua o disolventes orgánicos. Este método se utiliza para tener mejor disolución de los componentes dentro del sistema y así lograr una mejor disolución, debido a que se emplea un gradiente de temperatura que se encarga de llevar de un estado de mayor solubilidad a otro menor los productos de la reacción. Además, se pueden utilizar especies como hidróxidos, carbonatos, ácidos, oxidantes o reductores, entre otros los cuales aumentan la capacidad de disolución del agua.³⁶

2.3. Quitosano

Los polisacáridos están compuestos por varias unidades de monosacáridos. La unidad principal de los polisacáridos es la glucosa, por lo tanto, son moléculas largas compuestas por unidades de glucosa unidas entre sí.⁴⁰ El CS se caracteriza por ser un biopolímero con muy buena biodegradabilidad y biocompatibilidad, tiene propiedades antibacterianas y nula toxicidad, por lo que este se ha empleado en gran medida en el área biomédica, farmacéutica, agricultura y otros campos. Para poder aprovechar las propiedades que aporta el CS, se puede modificar con diversos grupos químicos en sitios estratégicos de la molécula, como es el caso de la presencia de grupos amina en la cadena polimérica del CS que aporta una gran versatilidad en el uso de este material, permitiendo realizar modificaciones como reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, además se usa para la obtención de películas entrecruzadas, etc.

El CS es de gran interés tanto científico como industrial por sus vastas aplicaciones potenciales, agregando la funcionalidad y reactividad de sus sustituyentes que lo hacen idóneo para recibir

modificaciones a lo largo de su cadena. Entre sus rutas de modificación, una de las más exitosas es incorporar o injertar covalentemente una cadena de polímero a la cadena del CS.

Este polímero tiene una estructura lineal y es obtenido por la desacetilación de la quitina. Para diferenciar el CS de la quitina el criterio más aceptado es la capacidad del CS de ser disuelto en disoluciones acuosas ácidas. Las estructuras de la quitina y el CS están representadas a continuación en la Fig. 5.

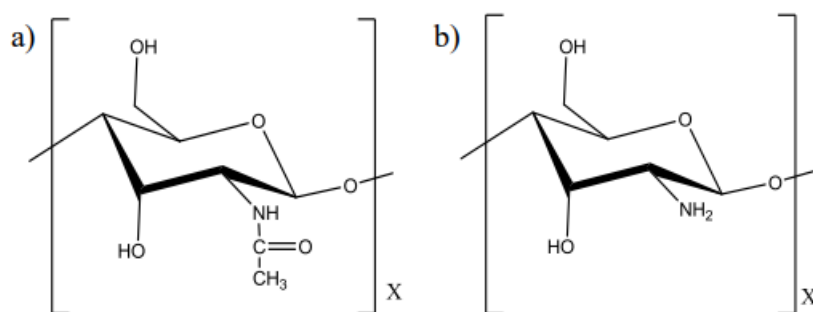


Fig. 5. Representación de las estructuras de a) Quitina y b) Quitosano.

La quitina se puede encontrar en la estructura esquelética de una gran variedad de grupos invertebrados como artrópodos, moluscos y constituye mayoritariamente la pared celular de los hongos y algas marinas, mientras que el CS, se puede encontrar en solo algunos hongos en menor proporción que la quitina.

Al transformar la quitina en CS, se modifican sus propiedades haciéndolo fácilmente soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos e inorgánicos con un pH menor a 6.5 e insoluble por encima de un pH de 7, esto indica una sensibilidad de parte del CS hacia los pH ácidos. El CS es más reactivo que la quitina, debido a que sus grupos amino pueden ser acilados, alcoholados y reaccionar con las bases de Schiff. La calidad del CS se evalúa en base a sus propiedades intrínsecas como pureza, masa molecular y su grado de desacetilación. Cuando el grado de desacetilación de la quitina alcanza el cincuenta por ciento, se hace soluble en medios ácidos

acuosos convirtiéndose en CS. Esta disolución ocurre por la protonación de grupo NH_2 en el carbono C2 de la unidad repetitiva.

2.3.1. Aplicación del quitosano

Este biopolímero de carácter catiónico es muy versátil y debido a su bajo costo y sus propiedades multifuncionales se conocen una amplia gama de aplicaciones en diferentes áreas, destacando las siguientes:

- **Biomedicina y farmacéutica:** membranas de hemodiálisis, sistemas de liberación de fármacos, suturas biodegradables, liberación de insulina, agentes cicatrizantes en quemaduras, sustitutos artificiales de piel, transporte de agentes anticancerígenos y paralizadores de hemorragias.
- **Tratamiento de aguas:** Floculante para clarificar el agua, reductor de olores y remoción de iones metálicos.
- **Industria alimenticia:** El CS es un reductor de colesterol, ya que captura grasas, además de ser una fibra no digerible para el cuerpo humano.
- **Agricultura y ganadería:** Sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo de alimento para animales, formulación de pesticidas, como recubrimiento de semillas para su almacenamiento, etc.
- **Industrial:** El CS se usa en la industria del papel, textiles, en la industria de alimenticia como soporte de inmovilización de enzimas, producción de maltosa, espesante de alimentos, agente de oxidación controlada y agente conservante.
- **Química analítica:** Tiene aplicaciones cromatográficas, en intercambio de iones, absorción de metales pesados y adsorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, etc.
- **Cosmética:** Se utiliza en la fabricación de espumas de afeitar, cremas para la piel y cuerpo.⁴¹

2.4. Gelación iónica

La gelación iónica es un método empleado usualmente para la preparación de NPs de CS. Otra forma con la que se conoce este método es reticulación iónica, que consiste en la unión entre el CS y otros elementos que contengan iones con carga opuesta o empleando un agente reticulante. Uno de los agentes reticulantes más usados es el tripolifosfato de sodio (TPP). Cuando este se adiciona continuamente por goteo a una solución de CS sometida a agitación constante y a temperatura ambiente, dos componentes con cargas contrarias se combinarán para formar NPs o derivar en un recubrimiento. El mecanismo de la gelación iónica ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa, con los grupos amino (NH_3^+) correspondientes al CS.

Este método aporta ventajas como evitar el uso de altas temperaturas, disolventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación. Además, el CS tiene una naturaleza poli catiónica que permite dar a estos sistemas la capacidad para asociar eficientemente macromoléculas terapéuticas, mantener su estabilidad y bioactividad contra su degradación.⁴²

2.5. Liberación controlada de medicamentos

Los sistemas de liberación controlada de medicamentos son una alternativa muy viable para el tratamiento de afecciones específicas, ya que el transportador tiene la capacidad para dirigir el fármaco a puntos objetivo, esto implica una ventaja sobre la ruta de administración de fármacos convencional. Estos sistemas tienen un papel importante en el tratamiento de enfermedades en las que el principio activo del fármaco es de alta toxicidad o que debido a su fisiopatología se presentan obstáculos que dificulten la llegada del principio activo a donde ejercerá su efecto terapéutico. El transportador del fármaco puede dirigir el fármaco hasta su sitio de acción y así administrar de forma correcta el agente. Una de las ventajas del uso de estos sistemas se ve reflejado al disminuir los efectos adversos del fármaco en el cuerpo humano durante su llegada a su sitio de acción. Otra ventaja posibilita controlar la velocidad con la que se administra el fármaco y así suministrar dosis adecuadas en un menor tiempo de tratamiento.

Estos sistemas de liberación controlada se han empleado en terapias donde el fármaco se usó para combatir el cáncer, agentes antiinflamatorios, factores de crecimiento, anticonceptivos, etc.^{43,44}

2.6. Nanopartículas de Cu y CuO funcionalizadas con quitosano en la liberación controlada de medicamentos.

Esta investigación se basa en la posibilidad de recubrir NPs de CuO y Cu con un biopolímero para la carga y liberación de un fármaco usado para combatir el cáncer (doxorubicina). Recientemente, se ha reportado el recubrimiento de NPs de CuO con algunos biopolímeros los cuales se describen a continuación:

- a) En 2020 Varukattu y col. sintetizaron NPs biocompatibles de CuO recubiertas de CS mediante un método de reducción de un solo paso, como un sistema polimérico inteligente de administración intracelular de DOX en células de cáncer de mama. Las NPs mostraron una liberación controlada del fármaco dependiente del pH. Los estudios de las NPs DOX-CS-CuO en células MCF-7 mostraron su buena capacidad para inducir la muerte celular al perder el potencial de la membrana mitocondrial en las células de cáncer de mama. Las pruebas anticancerígenas *in vitro* indicaron una mayor citotoxicidad de parte de las NPs cargadas con DOX que el fármaco por sí solo. En conclusión, se formularon NPs biocompatibles con una carga eficiente de fármacos, así como una liberación controlada de fármaco en pH ácido, haciéndolas ideales para la terapia del cáncer de mama.²⁰
- b) En 2021 Elsayed y col. sintetizaron NPs de CuO funcionalizadas con quercetina encapsulada como agente contra el cáncer de mama. Las pruebas *in vitro* e *in vivo* demostraron una potente actividad anti-cancerígena por parte de estas NPs en comparación con las NPs de CuO y quercetina por sí sola. Además, mostraron baja toxicidad en comparación con las NPs de CuO y quercetina, siendo este un prometedor agente quimioterapéutico para tratar el cáncer de mama.⁴⁵
- c) Por su parte en 2021 Wang y col. investigaron el efecto de las NPs de CuO sobre NPs magnéticas funcionalizadas con CS en carcinomas gástrico y de colon para determinar sus propiedades anticancerígenas. Se sometieron los nanocompositos de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@CS/CuO}$ ante diferentes líneas celulares de cáncer gástrico y cáncer de colon.

Los resultados mostraron que el nanocomposito $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@CS/CuO}$ obtuvo los mejores resultados contra el cáncer gastroduodenal en la línea celular HCT 116 en condiciones *in vitro*.¹²

- d) Por su parte en 2021 Shi y col. prepararon, caracterizaron e investigaron los efectos de Cu (II) sobre NPs magnéticas de Fe_3O_4 modificadas con CS, en línea celular de cáncer de pulmón. El compuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{/CS/Cu}$ (II) se sometió a pruebas biológicas como el estudio de sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Los resultados mostraron que la viabilidad celular se redujo y que fue dependiente de la dosis del nanocomposito de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{/CS/Cu}$ (II), demostrando que estos nanocompositos tienen una actividad anticancerígena adecuada para este tipo de cáncer.¹⁴
- e) En 2022 Xu y col. sintetizaron NPs de Cu con el uso de un hidrogel de CS/alginato formando un biocompuesto de Cu@CS/Alg a través de una preparación *in situ* ecológica y de bajo costo. Investigaron su citotoxicidad y propiedades antioxidantes contra el carcinoma lobulillar infiltrante de mama (UACC-3133), carcinoma inflamatorio de mama (UACC-732) y carcinoma metastásico (MDA-MB-453) además de ser evaluadas en líneas celulares normales (HUVEC). La viabilidad de las líneas de células mamarias malignas se redujo de forma dependiente de la dosis en presencia del nanocomposito. Los autores concluyeron que este nanocomposito es efectivo para ser utilizado para el tratamiento del carcinoma mamario en humanos.⁴⁶
- f) De igual forma en 2022 Dubey y col. estudiaron la aplicación de diferentes nanoportadores modificados con CS en cáncer de mama, entre los cuales se menciona el uso de NPs de CuO recubiertas con CS y cargadas con DOX. Como resultado de la síntesis, se obtuvieron NPs con morfologías esféricas y una distribución uniforme de tamaño. Estas NPs mostraron capacidad de cargar y liberar DOX, demostrando ser más citotóxicas para las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) que la DOX pura.⁴⁷
- g) En 2022 Madamsetty y col. En un apartado titulado “Quitósano para la inmunoterapia del cáncer de mama” se menciona que las NPs de CuO funcionalizadas con CS (CuO@CS), muestran una excelente actividad antibacteriana, antioxidante y citotóxica. El nanocomposito de CuO@CS demostró estimular al sistema inmunológico aumentando la respuesta inmunitaria en su presencia induciendo la eliminación de las células cancerosas.⁴⁸

- h) Recientemente en 2023, Sathiyavimal y col. sintetizaron NPs de CuO utilizando extracto acuoso de hojas de *Sida cordifolia* las cuales se usaron para preparar un nanocomposito de CuO/CS biofuncionalizado que demostró buena citotoxicidad contra líneas celulares de cáncer de mama y adenocarcinoma provocando apoptosis siendo este un biomaterial adecuado para aplicaciones médicas.⁴⁹

En base a estos antecedentes reportados y las propiedades anticancerígenas que presentan los nanocompositos metal-polímero, este proyecto de investigación contempla la funcionalización de NPs de CuO sintetizadas mediante hidrólisis oxidativa y NPs de Cu sintetizadas mediante descomposición térmica con CS por medio de gelación iónica para obtener sistemas de liberación controlada de un fármaco anticancerígeno (DOX), con la finalidad de realizar estudios de citotoxicidad mediante la técnica de tinción de cristal violeta(CVS) en líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos con el objetivo de observar el comportamiento en células sanas y enfermas por parte de los sistemas CuO/CS/DOX y Cu/CS/DOX.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Sintetizar y caracterizar materiales híbridos preparados a partir de NPs de CuO y Cu con quitosano (CS) para su empleo como sistemas de liberación de un agente anticancerígeno (DOX).

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar NPs de Cu y CuO mediante el método de descomposición térmica e hidrólisis oxidativa, respectivamente.
- Caracterizar las NPs mediante difracción de rayos X (DRX), espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Modificar las NPs de CuO y Cu con CS mediante el método de gelación iónica.
- Caracterizar las NPs de CuO y Cu modificadas con CS mediante DRX, FTIR, análisis termogravimétrico (TGA), dispersión de luz dinámica (DLS) y TEM.

- Cargar las NPs de CuO y Cu modificadas con CS con DOX y obtener los perfiles de liberación a diferentes condiciones de pH (7.4 y 5.5) a 37 °C.
- Evaluar las propiedades de citotoxicidad en una línea celular de cáncer, así como la sinergia entre las NPs de Cu y CuO con la DOX.

4. Justificación

La presente propuesta se justifica teniendo en cuenta el desarrollo de materiales biocompatibles preparados a base de polisacáridos, lo que permite ampliar el campo del conocimiento científico de frontera y que además se alinea a una propuesta de gran relevancia en la actualidad. La DOX es uno de los fármacos con alto índice terapéutico y exhibe potentes efectos quimioterapéuticos contra diferentes tipos de cáncer como es el de mama. Sin embargo, los efectos de citotoxicidad de estos fármacos hacia el tejido normal y la resistencia inherente a múltiples fármacos son limitados por la dosis máxima tolerante. Por lo tanto, es necesario desarrollar portadores de carga y liberación controlada contra células cancerosas, considerando una reducción de la citotoxicidad del fármaco.

5. Hipótesis

Se sugiere que la presencia de NPs de CuO y Cu recubiertas con CS y cargadas con DOX permitirá generar una alternativa que proporcione una mayor eficiencia terapéutica contra líneas celulares de cáncer debido a un efecto sinérgico entre las NPs metálicas y DOX.

6. Parte experimental

6.1. Materiales

6.1.1. Síntesis de NPs de CuO

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de NPs de CuO por hidrólisis oxidativa.

Reactivo	Formula	Proveedor	Pureza
Cloruro de cobre	CuCl ₂	Sigma-Aldrich	97%
Oleato de sodio	C ₁₈ H ₃₃ NaO ₂	Tokyo chemical industries	97%
Hexano	C ₆ H ₁₄	J.T. Baker	65%
Agua destilada	H ₂ O	-	-
Etanol	C ₂ H ₆ O	Jalmek	70%
Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Sigma-Aldrich	90%
Difenil eter	C ₁₂ H ₁₀ O	Sigma-Aldrich	99%

6.1.2. Síntesis de NPs de Cu

Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis de NPs de Cu por descomposición térmica.

Reactivo	Formula	Proveedor	Pureza
Sulfato de cobre II	CuSO ₄	Sigma-Aldrich	98%
Nitrato de potasio	KNO ₃	Fermont	99.8%
Hidróxido de potasio	KOH	Sigma-Aldrich	99.9%
Agua destilada	H ₂ O	-	-
Etanol	C ₂ H ₆ O	Jalmek	70%

6.1.3. Funcionalización de NPs

Tabla 3. Reactivos y materiales empleados para la funcionalización de las NPs.

Reactivo	Formula	Proveedor	Pureza
CS	$C_{56}H_{103}N_9O_{39}$	Sigma-Aldrich	Baja densidad (75-85% des acetilación)
NPs	Cu, CuO	-	-
TPP	$Na_5P_3O_{10}$	Sigma-Aldrich	85%
Ácido acético	CH_3COOH	Sigma-Aldrich	99.7%
Agua Milli-Q	H_2O	-	-

6.1.4. Carga y liberación de Fármaco

Tabla 4. Reactivos y materiales empleados durante la carga y liberación de fármaco.

Reactivo	Formula	Proveedor	Pureza
DOX	$C_{27}H_{29}NO_{11}$	Sigma-Aldrich	98.5%
NPs/CS	Cu/CS, CuO/CS	-	-
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	Sigma-Aldrich	99.5%
Fosfato disódico	Na_2HPO_4	Jalmek	98%
Agua Milli-Q	H_2O	-	-

6.1.5. Evaluación de citotoxicidad

Tabla 5. Reactivos y materiales empleados para las pruebas de citotoxicidad.

Reactivos
NPs, NPs/CS y NPs/CS/DOX
DMEM (Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco)
Suero bovino fetal al 5%
Penicilina estreptomycin al 1%
Tripsina 1x
Formaldehído al 4%
CVS (Tinción de cristal violeta)
SDS (Dodecilsulfato de sodio) al .1%

6.2. Metodología

6.2.1. Síntesis de NPs de Cu mediante el método de descomposición térmica

Primeramente, se realizó la formación de un complejo Cu-oleato, el cual se llevó a cabo de la siguiente manera: en un matraz de 3 bocas provisto de un sistema de reflujo y un termómetro se disolvieron 10 g (.0751 moles) de CuCl_2 y 90.57 g (.2979 moles) de oleato de sodio en una mezcla que contenía hexano (298 mL - 2.290 moles), agua desionizada (127 mL - 7.034 moles) y etanol (170 mL - 2.915 moles). La solución se calentó hasta $54\text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 h y una vez transcurrido el tiempo de reacción, la solución obtenida se colocó en un embudo de separación para eliminar la fase acuosa. Posteriormente, la solución que contenía el complejo Cu-oleato se lavó varias veces con una solución acuosa de etanol al 50% V/V. Después de los lavados, la mezcla obtenida se colocó en un cristizador con agitación constante durante 24 h para evaporar el hexano residual. En la segunda etapa del método de descomposición térmica, se colocaron 29 g del complejo obtenido en un matraz de tres bocas y se adicionaron 11.98 g (.0424 moles) de ácido oleico y 184 mL (1.621 moles) de difenil éter. La mezcla se calentó a $260\text{ }^\circ\text{C}$ y se mantiene a reflujo durante 2

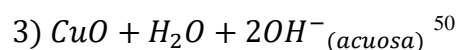
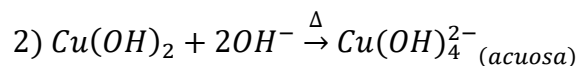
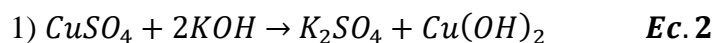
h. Al momento en el que se alcanzó la temperatura deseada, ocurrieron reacciones exotérmicas al mismo tiempo que la solución se tornó color oscuro formando un precipitado café, obteniendo así las NPs de Cu. El precipitado se centrifugó y se lavó tres veces con etanol. Posteriormente, las NPs se secaron a temperatura ambiente para su caracterización.³⁶

A continuación, en la Ecuación 1 se muestra la reacción para la obtención de NPs de Cu.



6.2.2. Síntesis de NPs de CuO mediante el método de hidrólisis oxidativa

En un reactor usado para mantener atmosfera inerte con nitrógeno, se colocaron 10 g (.0628 moles) de $CuSO_4$ y 70 mL (3.877 moles) de agua desionizada y entonces la solución se calentó durante 20 minutos a 90 °C con agitación magnética en atmósfera inerte de nitrógeno. De igual manera, se desgasificó una solución acuosa que contenía 0.8055 g (.0079 moles) de KNO_3 y 5.6144 g (.1002 moles) de KOH (120 mL). Esta solución se agregó por goteo durante 50 minutos a flujo constante y se dejó reaccionar durante 2 h como se muestra a continuación en la ecuación 2. Posteriormente, se procedió a lavar las NPs dejando reposar la solución obtenida en un vaso de precipitado esperando a que esta precipite para retirar el sobrenadante y adicionar agua destilada repitiendo el proceso en 5 ocasiones y entonces se realizó un último lavado con etanol. Las NPs se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos y se secaron a 60 °C durante un tiempo de 72 h para su posterior caracterización.³⁶



6.2.3 Síntesis de NPs de CuO recubiertas con quitosano

A 6 mL de una solución de CS disuelto en ácido acético al 1% V/V (2 mg/mL) se agregaron 20 mg de NPs de CuO. La dispersión resultante se sónico durante 10 min y se agitó con agitación magnética durante 15 min. Entonces 6 mL de una solución acuosa de tripolifosfato de sodio (TPP)

se añadió gota a gota bajo agitación magnética y la mezcla de reacción se dejó reaccionar durante una hora y media. Las NPs de CuO funcionalizadas con CS se obtuvieron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 min. Finalmente, se retiró el sobrenadante y las NPs se lavaron tres veces con agua milli-Q.⁴⁵ En esta etapa se estudió el efecto de diferentes parámetros de reacción: concentración de TPP (1 a 6 mg/mL), concentración de CS (0.5 a 4 mg/mL), concentración de NPs (0.83 a 3.33 mg/mL) y tiempo de reacción (0.375 a 3 h) sobre la cantidad de CS recubriendo a las NPs, así como sobre su morfología y tamaño de los materiales híbridos obtenidos. Las interacciones entre los componentes del material híbrido se muestran en la Fig. 6, donde se ejemplifica la interacción iónica entre las cadenas de CS y las NPs de CuO con el TPP que cumple la función de agente reticulante, para la funcionalización de las NPs.^{42,51,52}

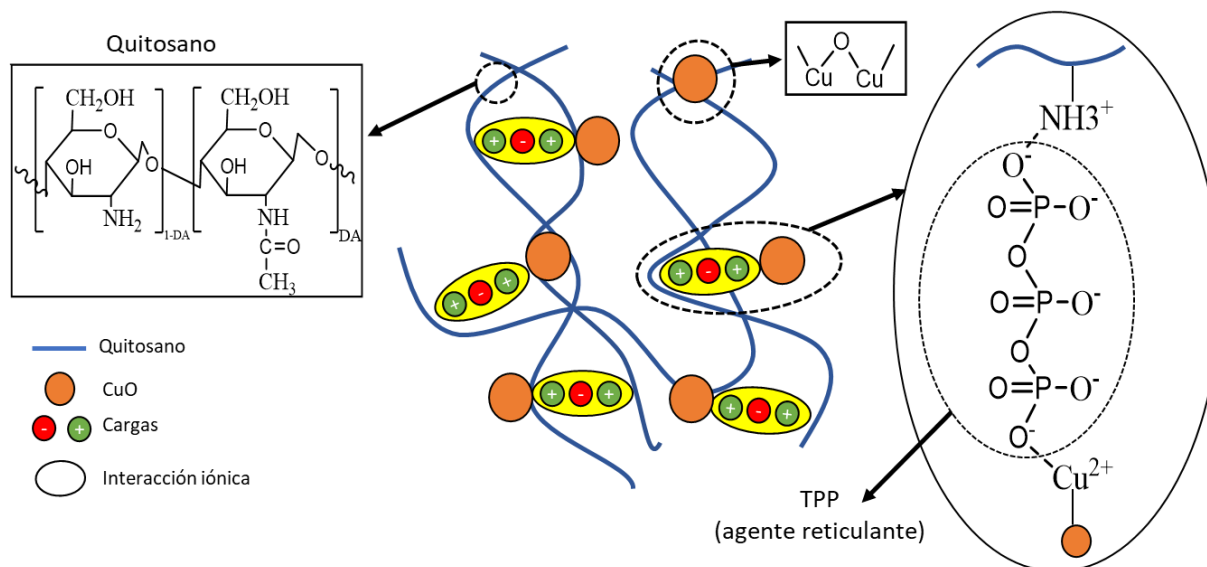


Fig. 6. Interacción entre las cadenas de CS y las NPs con el TPP mediante gelación iónica.⁵²

6.2.4. Pruebas de carga y liberación de DOX

Para poder determinar la cantidad de fármaco cargado y liberado en los nanocompositos, se utilizó una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de DOX (fig. 7), realizada por el equipo de trabajo anteriormente⁵³. Esta se construyó a partir de una solución madre de DOX a una concentración de 0.3 mg/mL, se midieron las absorbancias de las diferentes diluciones para

construir una gráfica de absorbancia contra concentración y se determinó la ecuación de la recta (ecuación 3) que fue de utilidad para determinar las concentraciones de carga y liberación de fármaco en cada nanocomposito.

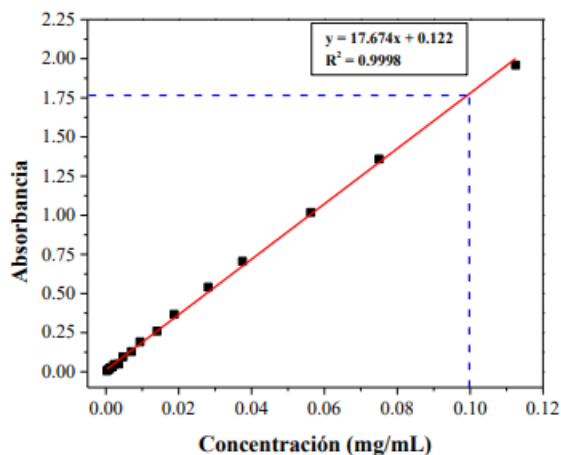


Fig. 7. Curva de calibración de DOX⁵³

$$y = 17.674x + 0.0122 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde “y” representa el valor de absorbancia de las diferentes muestras y “x” la concentración.

Para la carga de DOX, una muestra de NPs de CuO modificada con CS (previamente pesada, aproximadamente CuO 10 mg y Cu 20 mg) se sumergió en 8 mL de una solución de DOX (0.1 mg/mL) en tubos de centrifugado con agitación magnética continua, cubiertos por una cámara oscura. Entonces a determinados tiempos, se centrifugó durante 3 min a 5000 rpm, se tomó una alícuota y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro 7305 JENWAY (longitud de onda 512 nm). El proceso de carga terminó cuando no se observaron cambios en los valores de la absorbancia de la solución. Una vez obtenidos los valores de absorbancias a diferentes tiempos determinados, se realizó un gráfico de carga de mg DOX/mg NP contra tiempo, se despejó la ecuación 3 para obtener los mg/mL de DOX (“x”) sustituyendo “y” por los diferentes valores de absorbancia $x = \frac{y-0.0122}{17.674}$ Ec. 4, posterior a esto el resultado se multiplicó por la cantidad de mL de la solución de DOX para después dividirlo entre la cantidad de mg de NPs, así obteniendo la cantidad de mg Dox/mg NP.

Para los estudios de liberación, la muestra cargada previamente con DOX se sumergió en 8 mL de una solución amortiguadora (pH 7.4 y 5.8) a 37 °C. De igual forma que durante la carga, se mantuvo en agitación magnética continua y se centrifugó antes de cada medición durante 3 min. La liberación del fármaco se monitoreó a diferentes intervalos de tiempo dependiendo del comportamiento de liberación (5 a 60 min), determinados mediante UV-vis (512 nm) tomando una alícuota de 2 mL. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.²⁰

Para la elaboración del gráfico % de liberación contra tiempo se implementó de nueva cuenta la ecuación 3, el resultado se multiplicó por los mL de la solución buffer para después dividirse entre la cantidad de masa de DOX cargada (mg) y multiplicarse por 100 para obtener los distintos porcentajes de liberación.

6.2.5. Evaluación de pruebas de citotoxicidad

Se utilizaron las líneas celulares disponibles en el laboratorio de cultivos celulares: Una línea celular correspondiente a cáncer de mama (MDA-MB-231(htb-26)) y una línea celular correspondiente a fibroblastos (1132SK). El ensayo de citotoxicidad se realizó siguiendo la norma ISO 10993. Se cultivaron las células de adenocarcinoma mamario y fibroblastos en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal al 5% y penicilina estreptomycin al 1% en frascos de cultivo T75. Al llegar a la confluencia deseada, las células se separaron mediante digestión enzimática con tripsina 1x, para luego volver a cultivarse en una placa P48 con 7500 células por pocillo. Se analizó la viabilidad celular al terminar el tratamiento de los cultivos celulares. Los cultivos celulares fueron fijados con formaldehído al 4% y tratados con la tinción de cristal violeta (CVS). Posteriormente, se retiró el colorante, se realizaron lavados para retirar el exceso de colorante y se dejaron secar las células a temperatura ambiente. El colorante fue extraído usando dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1% y la absorbancia se midió a 570 nm. Estas pruebas de citotoxicidad fueron efectuadas con ayuda del doctor Roberto Espinosa encargado del laboratorio de cultivos celulares de CIQA, debido a su experiencia y conocimientos.

7. Resultados y discusión

7.1. Síntesis de nanopartículas de CuO

Las NPs de CuO se sintetizaron a partir de la reacción de hidrólisis oxidativa y se caracterizaron mediante la técnica de DRX. El difractograma mostró 3 picos principales a 35° , 38° y 48° de 2θ correspondientes a los planos (111), (022) y (202) como se muestra en la Fig. 7. Los resultados obtenidos se compararon con la carta JCPDS 48-1548 y con lo cual se pudo determinar que se obtuvo una estructura monoclinica.

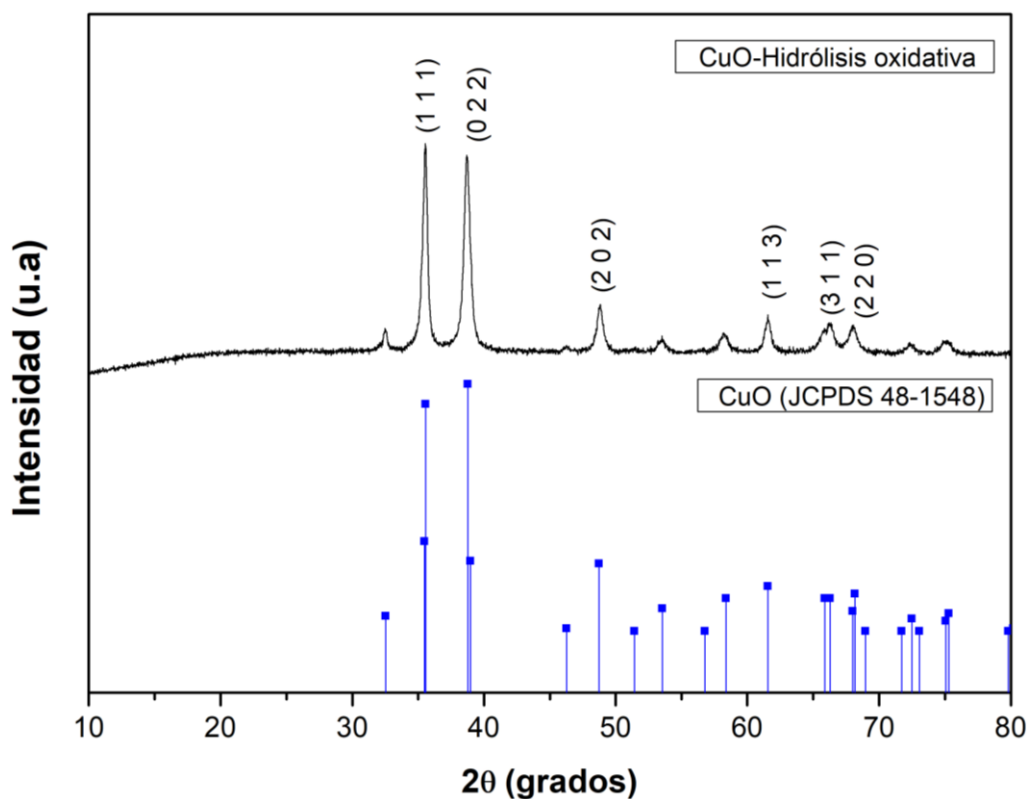


Fig. 8. Patrón de difracción de Rayos X de NPs de CuO obtenidas mediante el método de hidrólisis oxidativa y su estándar (carta JCPDS 48-1548).

Para conocer la morfología, las NPs fueron analizadas mediante TEM. En la Fig. 8 a se aprecian las NPs de CuO, que presentan una morfología de tipo varilla⁵⁴. La distribución de tamaños de partícula se determinó como resultado de la medición de 122 partículas, el largo promedio de 173

nm, mientras que el ancho promedio de estas es de 30 nm, como se muestra en los histogramas presentes en la Fig. 8 b y 8 C, respectivamente.

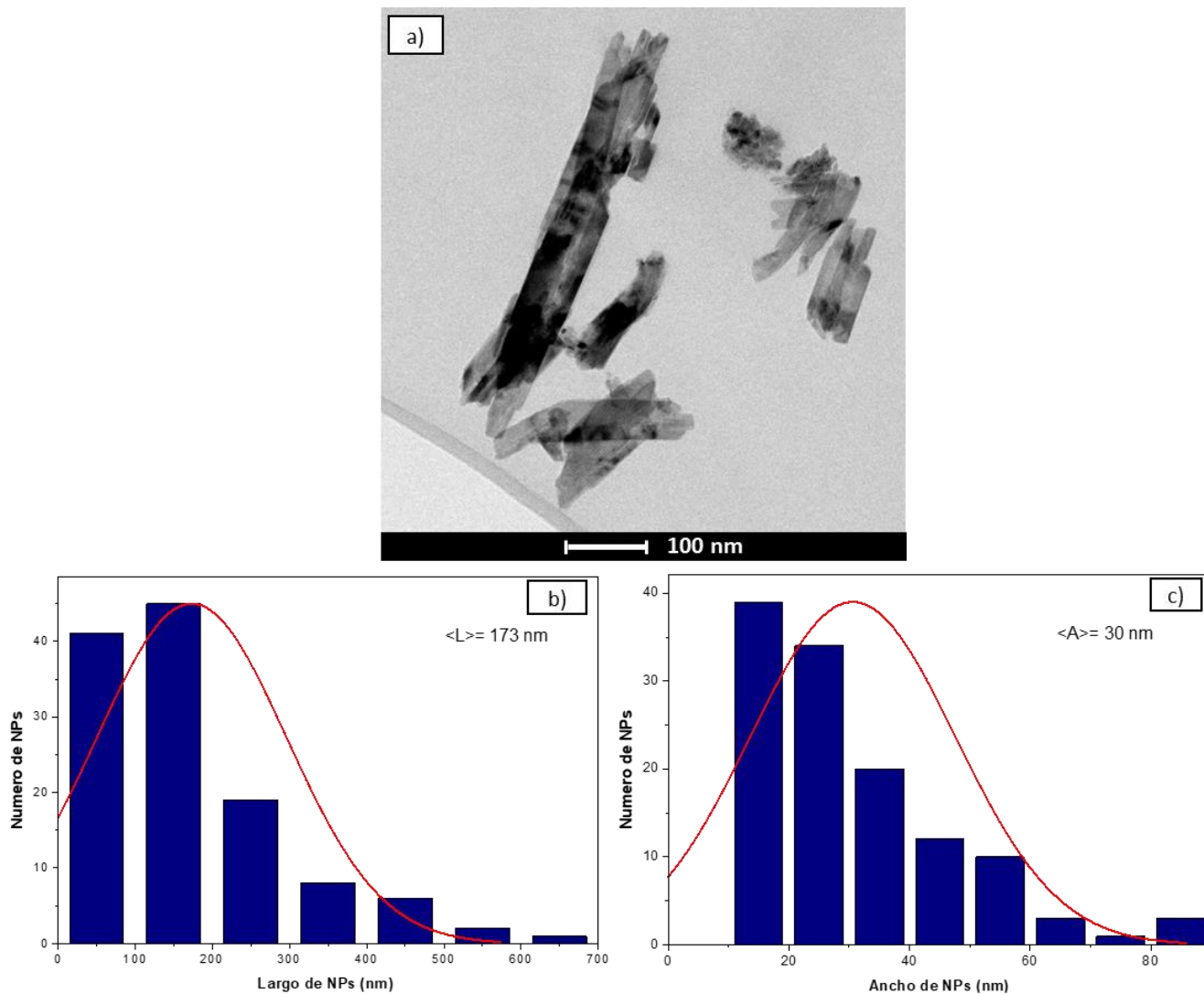


Fig. 9. a) Micrografía obtenida por TEM de las NPs de CuO y sus histogramas correspondientes a la distribución de b) largo y c) ancho de NPs.

7.2. Funcionalización de NPs CuO con CS

Se variaron las concentraciones de los siguientes parámetros: TPP, CS, NPs, así como el tiempo de reacción para determinar las condiciones adecuadas del recubrimiento de las NPs.

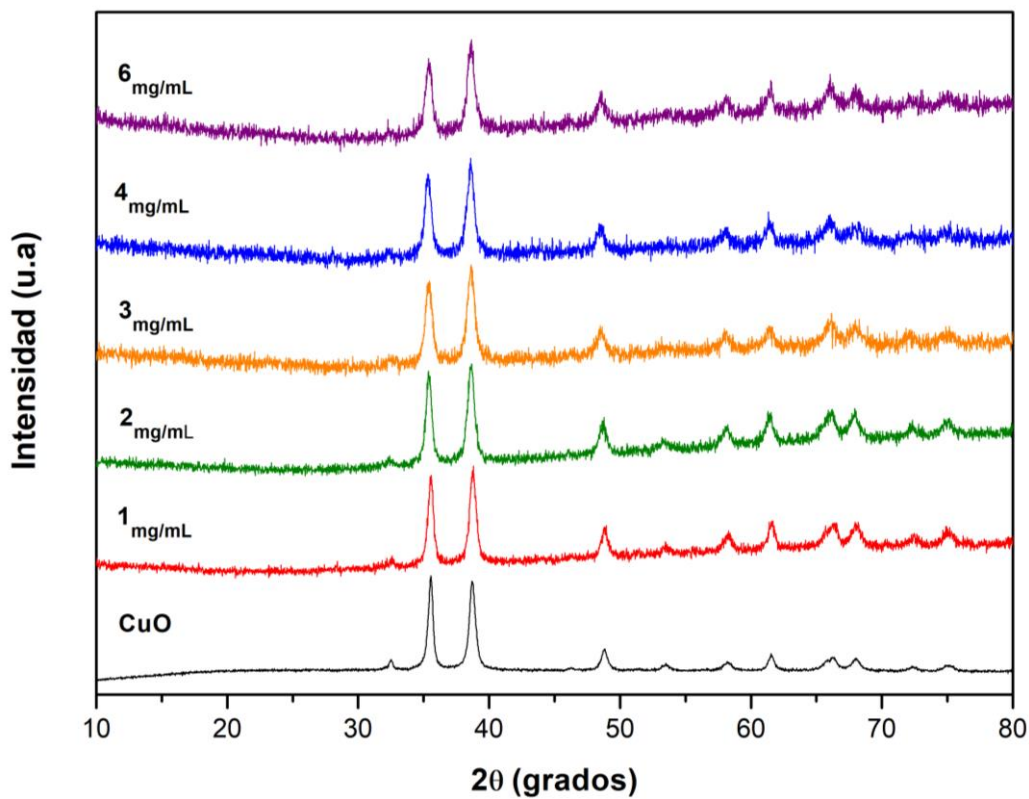
7.2.1. Efecto de la concentración de TPP

Los difractogramas de DRX de las NPs recubiertas con CS a diferente concentración de TPP mostraron los picos característicos correspondientes al CuO lo cual sugiere que dicha funcionalización no afectó la estructura cristalina de las NPs (Fig. 9 a). Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración de TPP, se observa una disminución en la intensidad y definición de las señales debido probablemente a un mayor contenido de material amorfo (CS) presente en las NPs. Por otro lado, en los espectros de FTIR se aprecian más agudas las señales características que corresponden principalmente a las bandas en 3362 y 3294 cm^{-1} debidas a los grupos NH_2 y estiramiento del grupo OH, en 2921 cm^{-1} estiramientos del enlace C-H y en 1031 cm^{-1} la tensión asimétrica del puente C-O-C (enlace glucosídico). Además, se pueden observar bandas en 1632 cm^{-1} debidas a la flexión NH_2 (amida I), a 1553 cm^{-1} correspondiente a la flexión del grupo $-\text{NH}_2$ (amida II) y en 1377 cm^{-1} propio de la amida III, (Fig. 9 b). El factor determinante para la selección de la concentración de TPP fueron los resultados obtenidos de TGA. Las curvas de TGA mostraron pérdidas de peso evidentes entre los 200-400 $^{\circ}\text{C}$, correspondiente a la descomposición del CS según el rango de temperatura reportado en la literatura.⁵⁵ Además, se observó una dependencia de pérdida de peso conforme se incrementa la cantidad de TPP presente, como se muestra en la tabla 6. Se observó que a mayor cantidad de TPP mayor presencia de CS en las NPs (Fig. 9 c). Conforme a los datos que se obtuvieron, se seleccionó la cantidad de 4 mg/mL, ya que a partir de una concentración de 3 mg/mL de TPP no se aprecia mucha diferencia en comparativa con el resto de las cantidades.

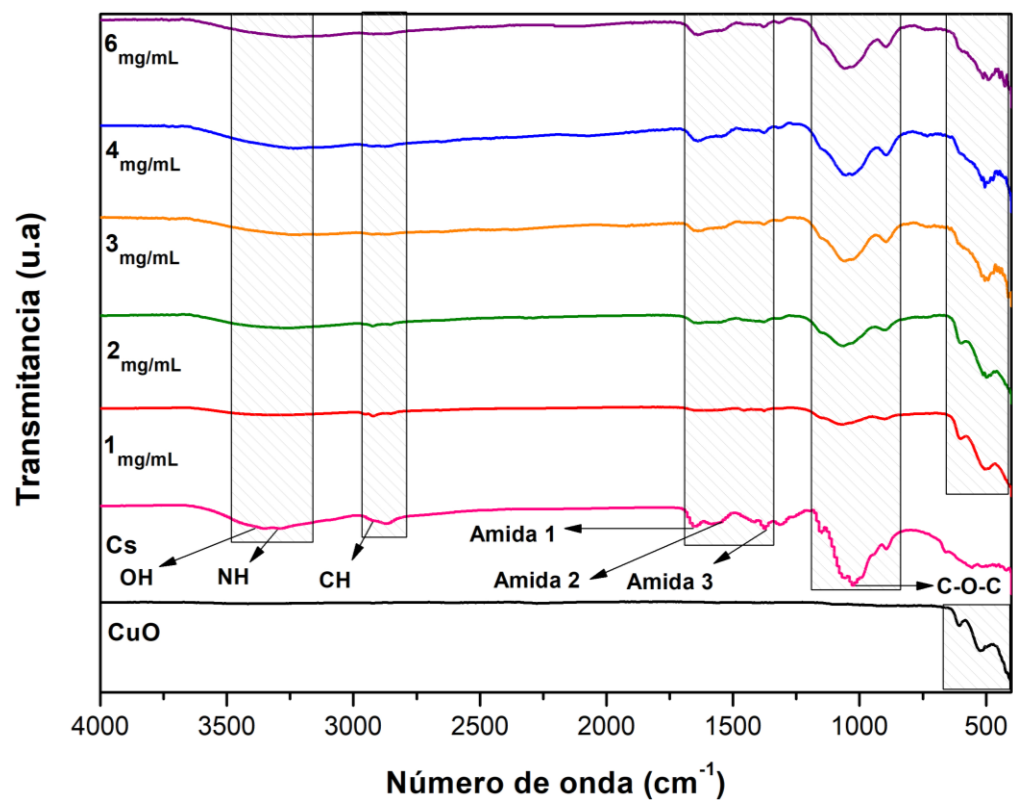
Tabla 6. Pérdidas en peso (%) correspondientes a las cantidades de TPP empleadas en la funcionalización de las NPs

TPP (mg/mL)	% de pérdida en peso
1	10
2	23
3	29
4	30
6	32

a)



b)



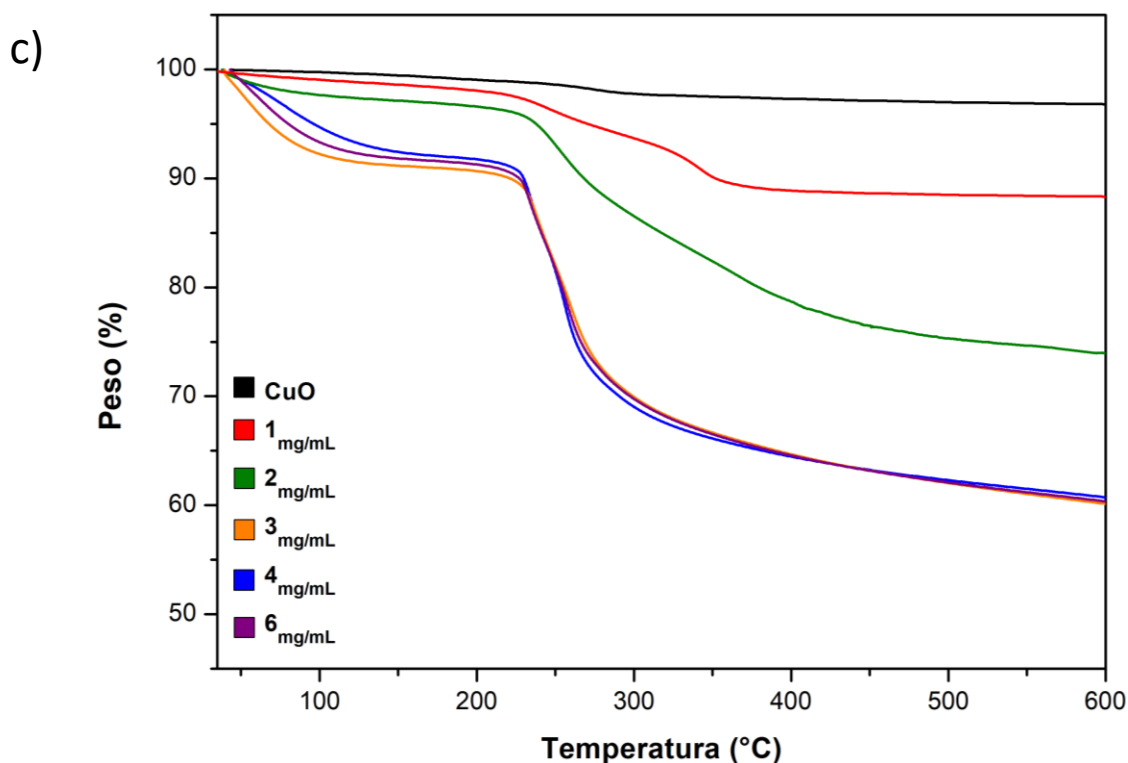
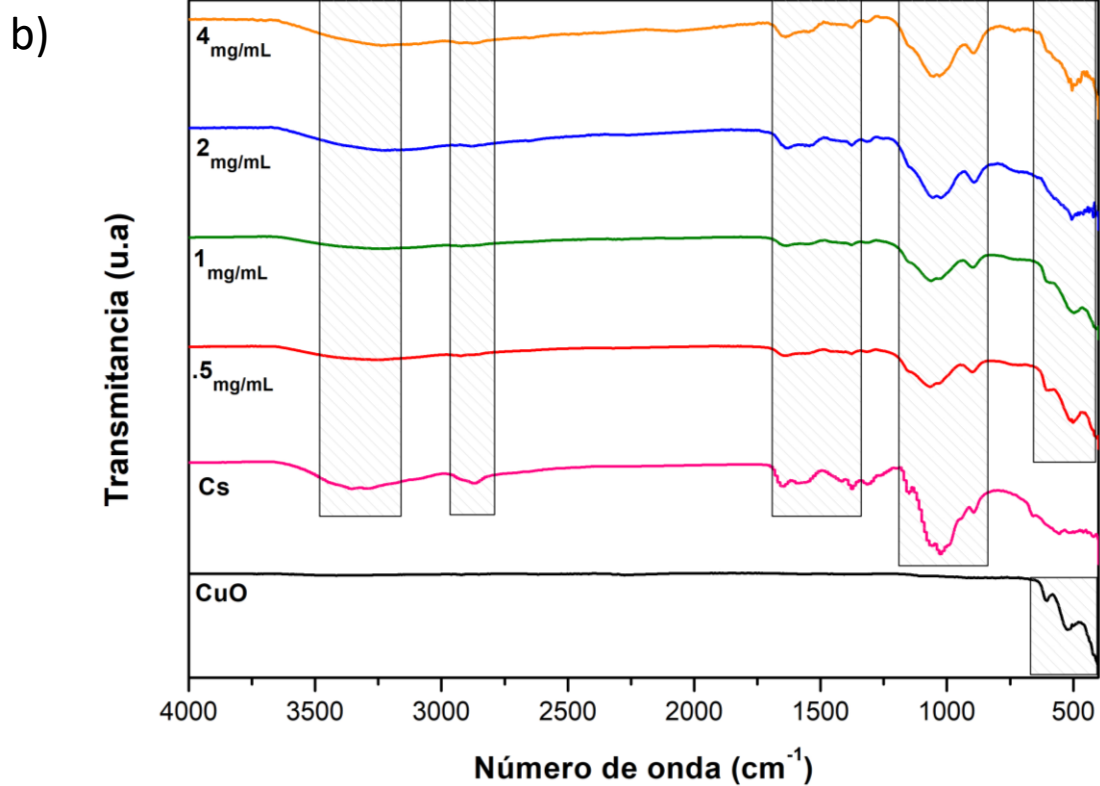
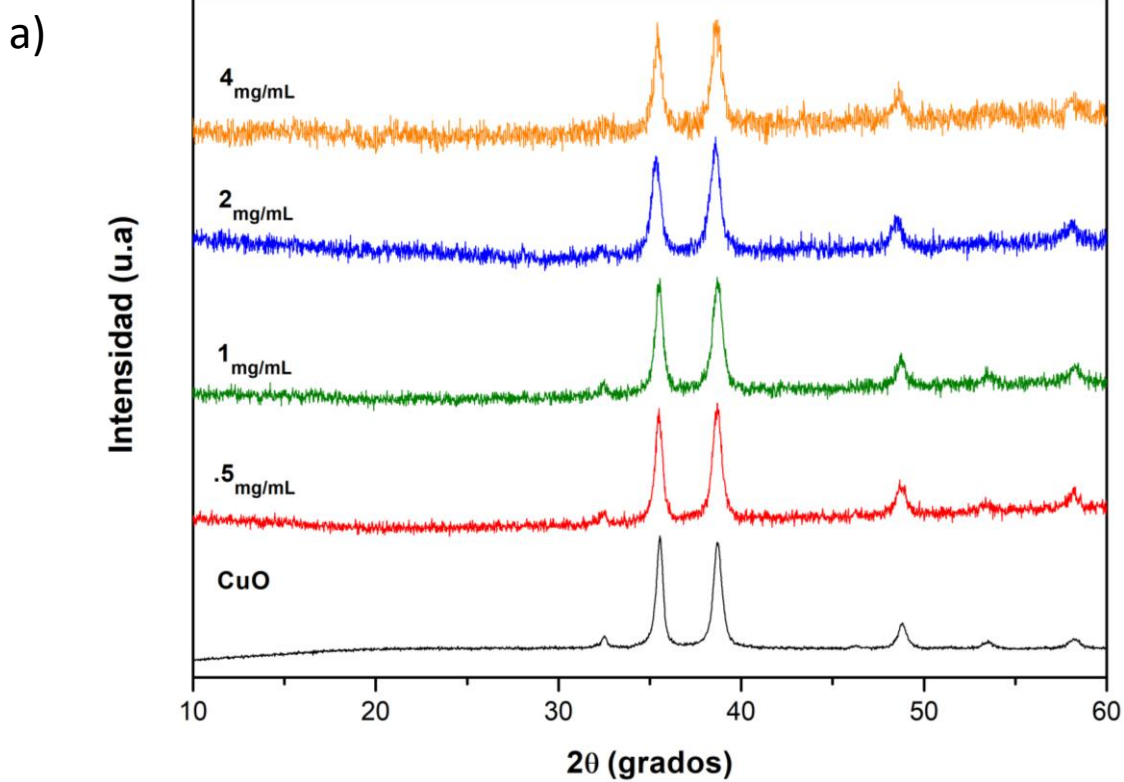


Fig. 10. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de CuO/CS obtenidas variando la concentración de TPP de 1 a 6 mg/mL. a) DRX, b) FTIR y c) TGA.

7.2.2. Efecto de la concentración de CS

Una vez definida la cantidad de TPP adecuada, el siguiente parámetro a considerar fue la concentración de CS. Se observó que, al incrementar la cantidad de CS, las señales en el difractograma de rayos X comenzaban a mostrarse menos definidas (Fig. 10 a) mientras que en los espectros de FTIR se observaba una mayor intensidad de bandas del CS debido a un mayor contenido de CS (Fig. 10 b). Esto fue corroborado mediante los termogramas de TGA logrando contenidos de CS hasta de 46 % para el nanocomposito preparado con una solución de CS de 4 mg/mL de CS (Fig. 10 c)).



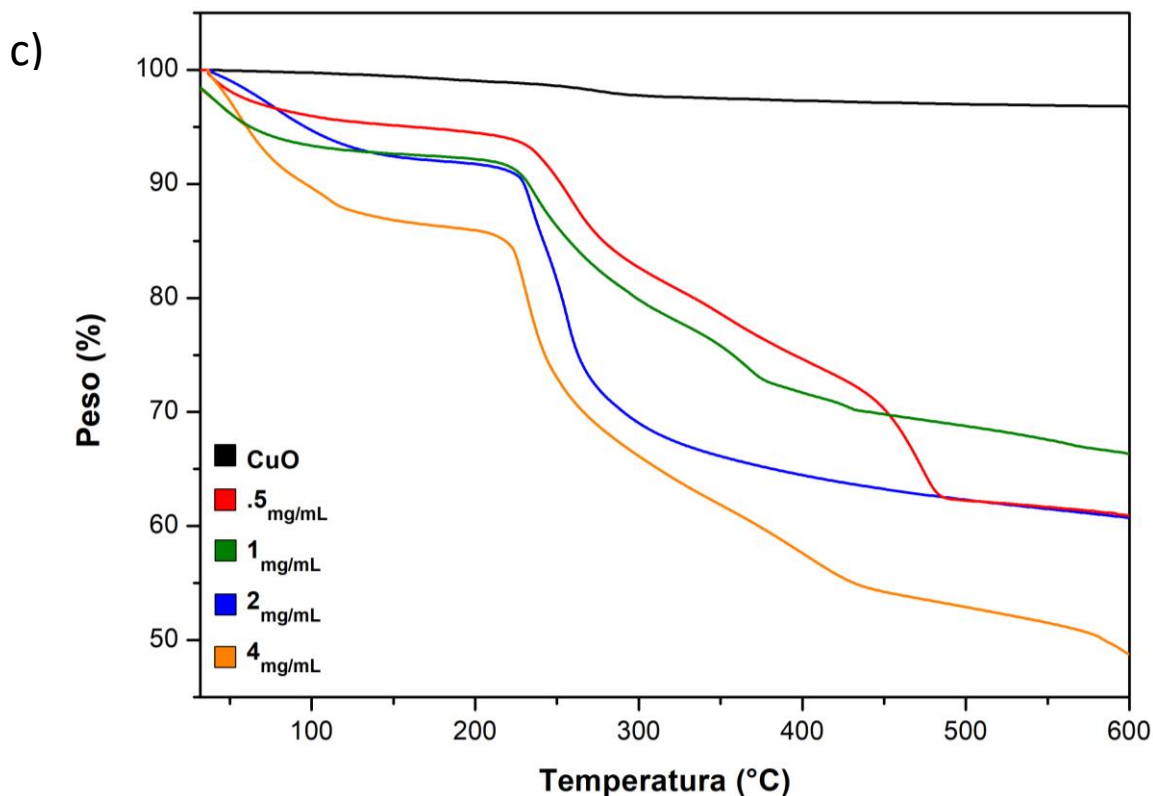


Fig. 11. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de CuO/CS variando parámetros de concentración de CS. a) DRX, b) IR y c) TGA.

7.2.3. Efecto de la concentración de NPs

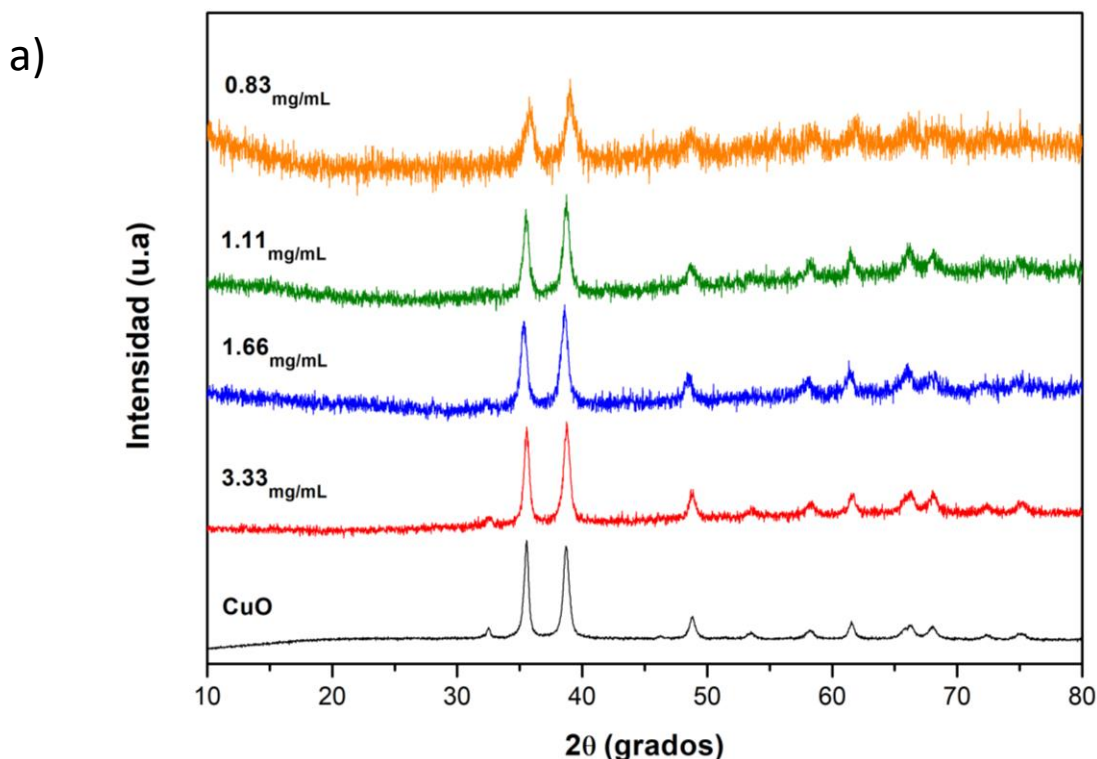
El tercer parámetro que se varió fue la concentración de NPs presentes durante la reacción. Para esto se usó una concentración de CS de 2 mg/mL y una concentración de TPP de 4 mg/mL así como una cantidad de 20 mg de NPs. Se variaron las concentraciones de NPs al variar los mL de las soluciones de TPP y CS presentes en la reacción, obteniéndose 4 concentraciones: 0.83, 1.11, 1.66 y 3.33 mg/mL. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante DRX (Fig. 11 a) se observa que al disminuir la concentración de NPs, las señales se vuelven menos agudas y definidas debido a la menor presencia de NPs. En cambio, para la muestra conteniendo una concentración de NPs de 3.33 mg/mL, el difractograma fue muy similar al espectro de las NPs de CuO sin recubrimiento.

En el caso del análisis mediante FTIR (Fig. 11 b), se observa un incremento en cuanto a presencia de las bandas características del CS conforme disminuye el número de NPs de CuO presentes

durante la reacción. Esto se debe a que en la concentración de 0.83 mg/mL hay menor cantidad de nanopartículas y mayor contenido de TPP y CS a diferencia de la concentración de 3.33 mg/mL.

Respecto al análisis de TGA (Fig. 11 c) las NPs de CuO no presentaron pérdidas de peso relevantes, en cambio se observaron pérdidas de material orgánico de 33 y 29 % a concentraciones de NPs 0.83 y 3.33 mg/mL respectivamente, lo cual concuerda con los resultados observados en los análisis de FTIR y XRD respecto a la dependencia en la concentración de NPs con el contenido de CS en los nanocompositos.

En base a los resultados anteriores, se eligió la concentración de 1.66 mg/mL la cual corresponde a usar 6 mL de las soluciones de TPP y CS. Estas cantidades son adecuadas ya que dan como resultado alrededor de un 30 % de CS presente en las NPs de CuO/CS. Este porcentaje es adecuado para la preparación de nanocompositos.⁵⁶



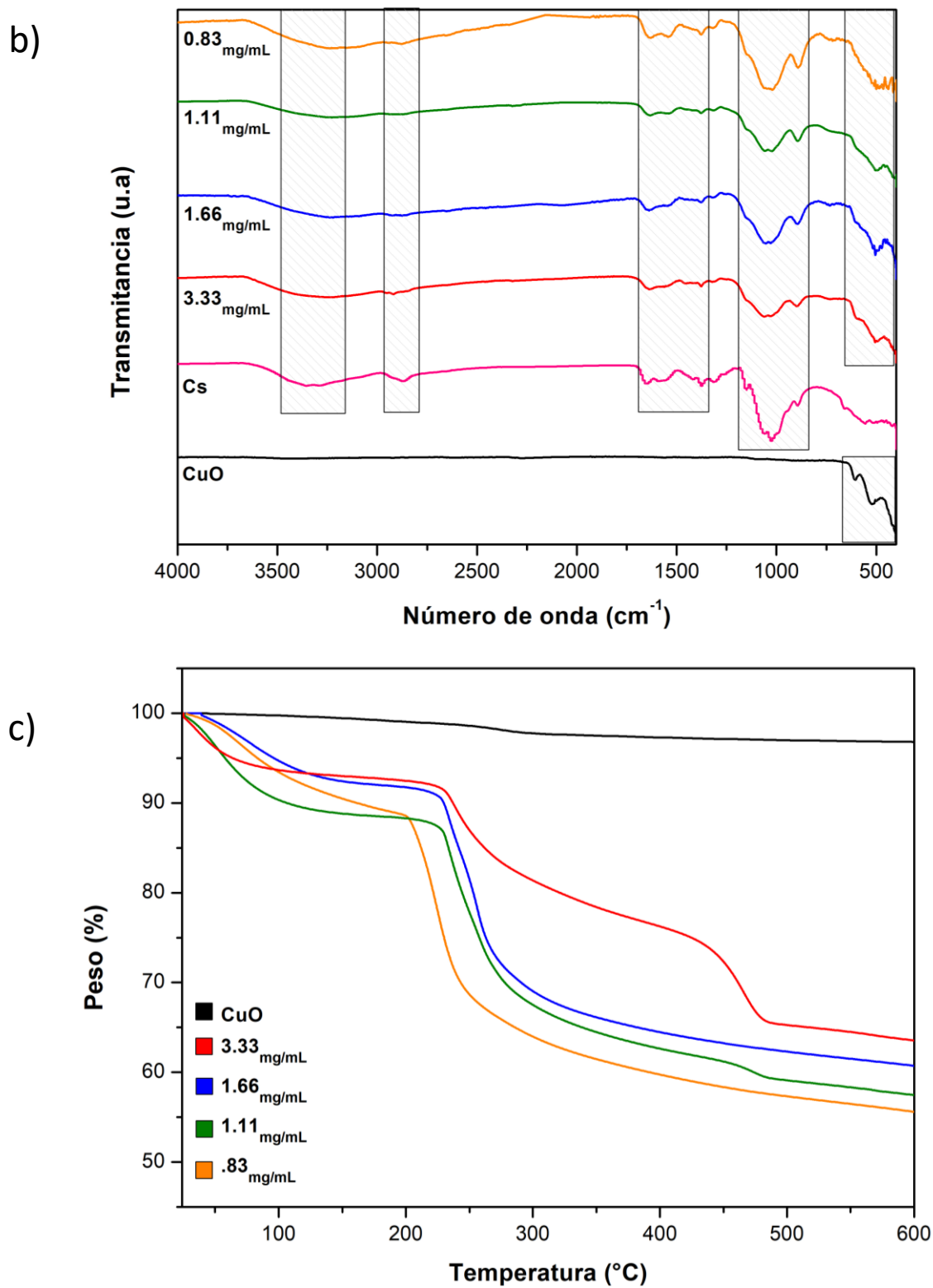


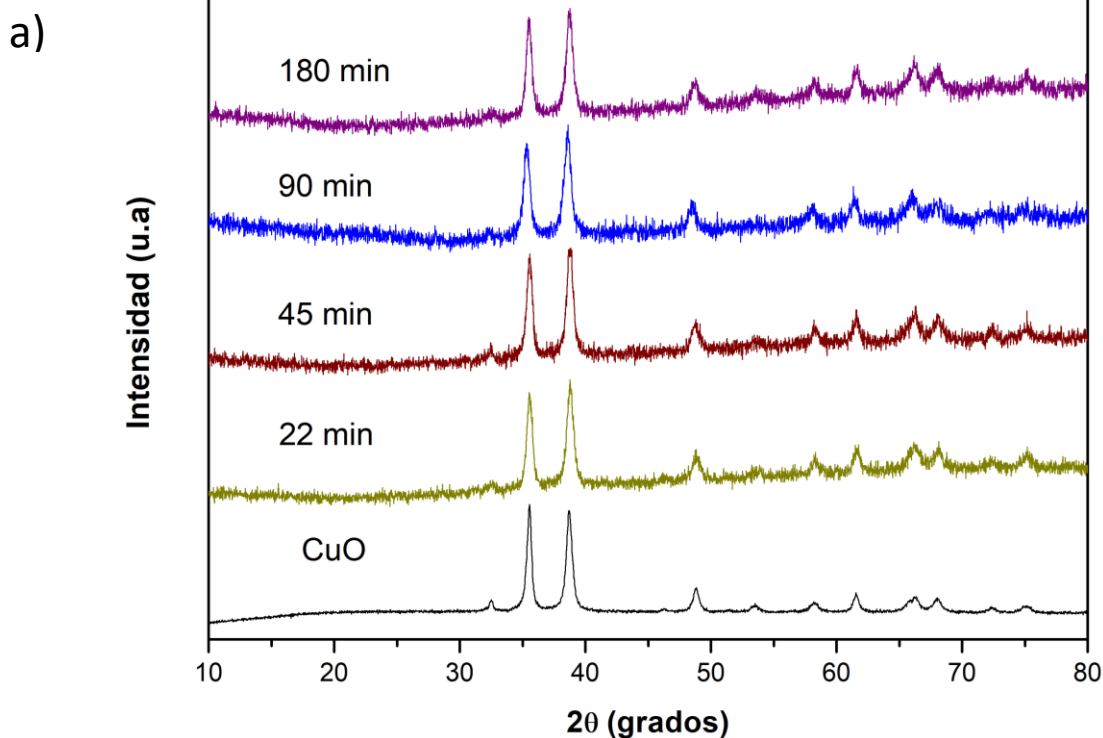
Fig. 12. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de CuO/CS variando parámetros de concentración de NPs. a) DRX, b) IR y c) TGA.

7.2.4. Efecto del tiempo de reacción

El último parámetro que se estudió fue el tiempo de reacción. En cuanto a la caracterización mediante DRX presentada en la Fig. 12 a, no se observó una diferencia en cuanto a la interferencia producida por el material amorfo presente en las NPs al variar el tiempo de reacción de 22 minutos a 180 minutos.

De igual forma en los resultados por FTIR (Fig. 12 b) no se apreció una diferencia en cuanto a la presencia de bandas características correspondientes al CS.

Respecto al análisis TGA (Fig. 12 c) no se observó un cambio en el contenido de CS dependiente del tiempo de reacción, por lo tanto, se decidió usar como parámetro el tiempo estipulado en un principio de 90 minutos (1 h 30 min), determinando que el tiempo de reacción no es un parámetro de mucha relevancia para este estudio.



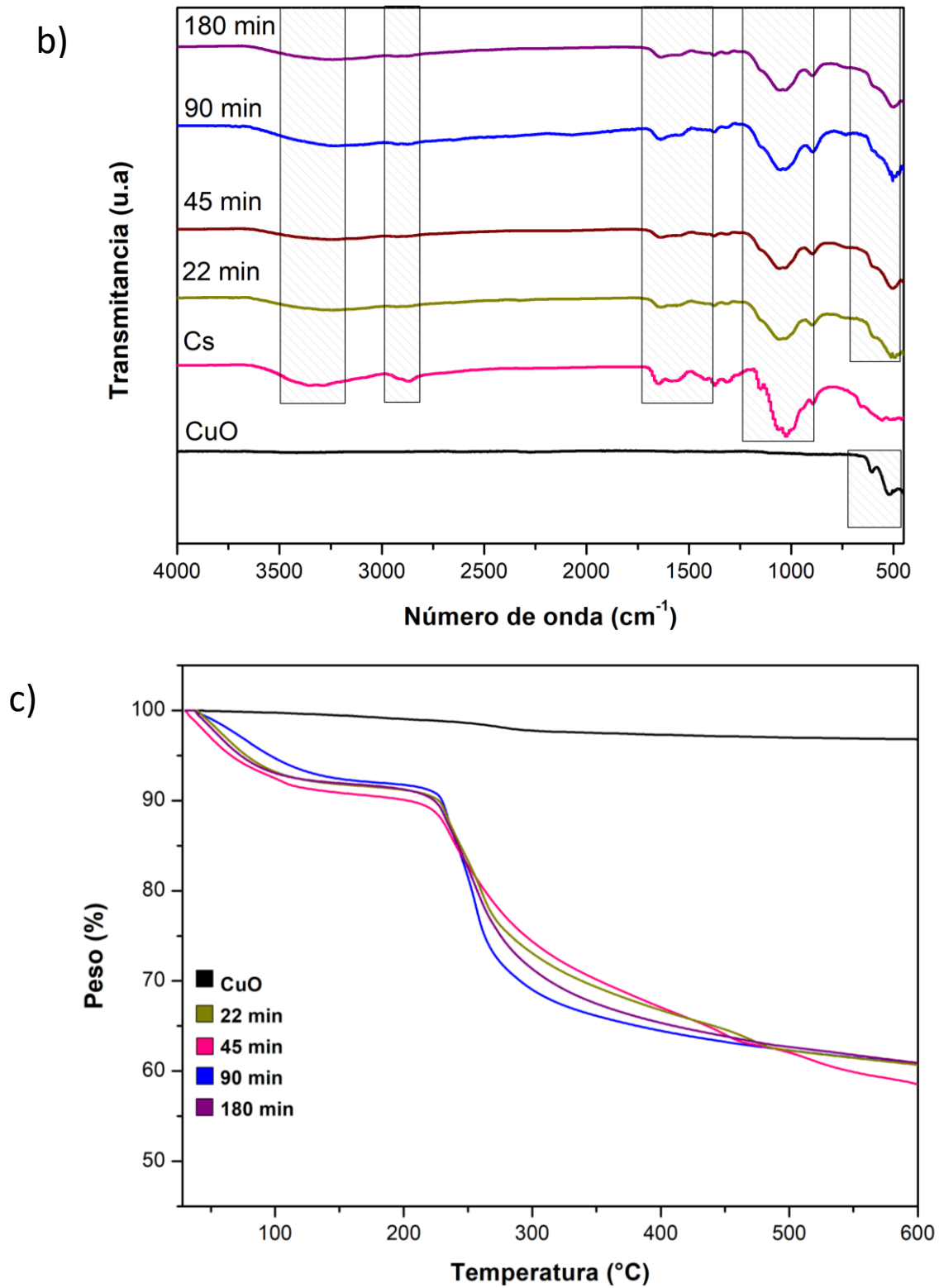


Fig. 13. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de CuO/CS variando el tiempo de reacción a) DRX, b) IR y c) TGA.

En base a esto, los parámetros que se seleccionaron como los más adecuados en la preparación de NPs de CuO/CS fueron los siguientes: concentración de TPP y CS de 4 y 2 mg/mL respectivamente, así como 20 mg de NPs CuO dispersas en un volumen de 12 mL de los cuales en una relación volumétrica de TPP/CS de 1:1 con un tiempo de reacción de 1.5 h. Para conocer el tamaño hidrodinámico de las NPs sin modificar y modificadas con CS se realizó la caracterización mediante DLS. De manera general, se observó un incremento en el tamaño hidrodinámico de las NPs al aumentar la cantidad de CS presente en la muestra. Las NPs de CuO sin modificar presentaron un tamaño de 259 nm, mientras que las NPs de CuO/CS preparadas con los parámetros mencionados arriba presentaron un tamaño promedio de 314 nm (ver tabla 7). Además, se observa que el tamaño hidrodinámico aumenta conforme se incrementa la concentración inicial de CS y TPP.

Tabla 7. Tamaños hidrodinámicos aproximados de los diferentes nanocompositos de CuO por la técnica DLS y potencial Z.

Tamaño de NPs						
NPs CuO					259(±28)	-41(±0.7)
Parámetros				Contenido	Tamaño	Potencial Z
TPP	CS	mL de solución TPP y CS	NPS	de CS (%)	(nm)	(mV)
(mg/mL)	(mg/mL)	(mL)	(mg/mL)			
1	2	6 y 6	1.66	10	274(±14)	-63.8(±1.5)
2	2	6 y 6	1.66	23	295(±177)	-58.2(±0.5)
3	2	6 y 6	1.66	29	331(±99)	-42.9(±6.1)
4	2	6 y 6	1.66	30	314(±34)	-37.4(±0.06)
6	2	6 y 6	1.66	32	335(±212)	-24.1(±2)
4	0.5	6 y 6	1.66	26	299(±13)	-59.8(±1)
4	1	6 y 6	1.66	26	365(±34)	-46.5(±1.1)
4	2	6 y 6	1.66	30	314(±34)	-37.4(±0.06)
4	4	6 y 6	1.66	46	363(±111)	-48.6(±0.4)
4	2	3 y 3	3.33	29	289(±21)	-44.9(±2.4)
4	2	6 y 6	1.66	30	314(±34)	-37.4(±0.06)
4	2	9 y 9	1.11	31	310(±66)	-56.7(±2.1)
4	2	12 y 12	0.83	33	346(±33)	-61.2(±1.1)

Otro aspecto importante que se tiene que evaluar al respecto de las NPs es su potencial Z, que se refiere a la densidad de cargas que poseen las NPs en su superficie y esta a su vez está influenciada por la composición de las NPs y el medio de dispersión en el que se encuentran.¹⁰

Los valores de potencial Z de las diferentes NPs de CuO/CS preparadas bajo diferentes condiciones de reacción se reportan en la tabla 1. De esta tabla se puede observar valores negativos en todas las muestras, lo cual puede ser atribuido a la formación de grupos hidroxilos en la superficie de las NPs por estar dispersas en agua.^{20,45} Sin embargo, las muestras fueron dispersadas en agua milli-Q que tiene un pH de 8.4, el CS se protona por debajo de 6.5 por lo tanto esta puede ser una explicación para la obtención de cargas negativas en la medición de potencial Z en las muestras. Los valores cumplen con el criterio de estabilidad ya que si el potencial Z es mayor a +30 e inferior a -30 mV esto resulta en una solución físicamente estable debido a la repulsión electrostática, lo que da mayor estabilidad a las NPs por un tiempo prolongado; el comportamiento opuesto supondrá la agregación o aglomeración de las NPs.¹⁰

Se sabe que las NPs por su tamaño tienden a aglomerarse, por lo tanto además de la caracterización DLS, las NPs se analizaron mediante TEM para observar su tamaño, así como su recubrimiento. Se optó por analizar mediante esta técnica dos de los nanocompositos obtenidos bajo diferentes condiciones de reacción que se mencionan a continuación, nanocomposito uno: 4 mg/mL TPP, 2 mg/mL CS, 20 mg de NPs, tiempo de reacción de 1.5 h con un porcentaje de CS de 30 y nanocomposito dos: 2 mg/mL TPP, 2 mg/mL CS, 20 mg de NPs, tiempo de reacción de 1.5 h un porcentaje de CS de 23. Como se puede observar en la Fig. 13 las NPs de CuO se encuentran recubiertas por una capa de material amorfo (CS) con un espesor de recubrimiento de 6 nm aproximadamente, lo cual confirma el recubrimiento de estos materiales con CS mediante la metodología empleada en este trabajo, en la Fig. 13b se observa de igual manera las NPs de CuO con presencia del recubrimiento provisto por el material amorfo para la muestra con una proporción de 77% NPs y 23% de CS con un espesor de recubrimiento promedio de CS de 3 nm aproximadamente.

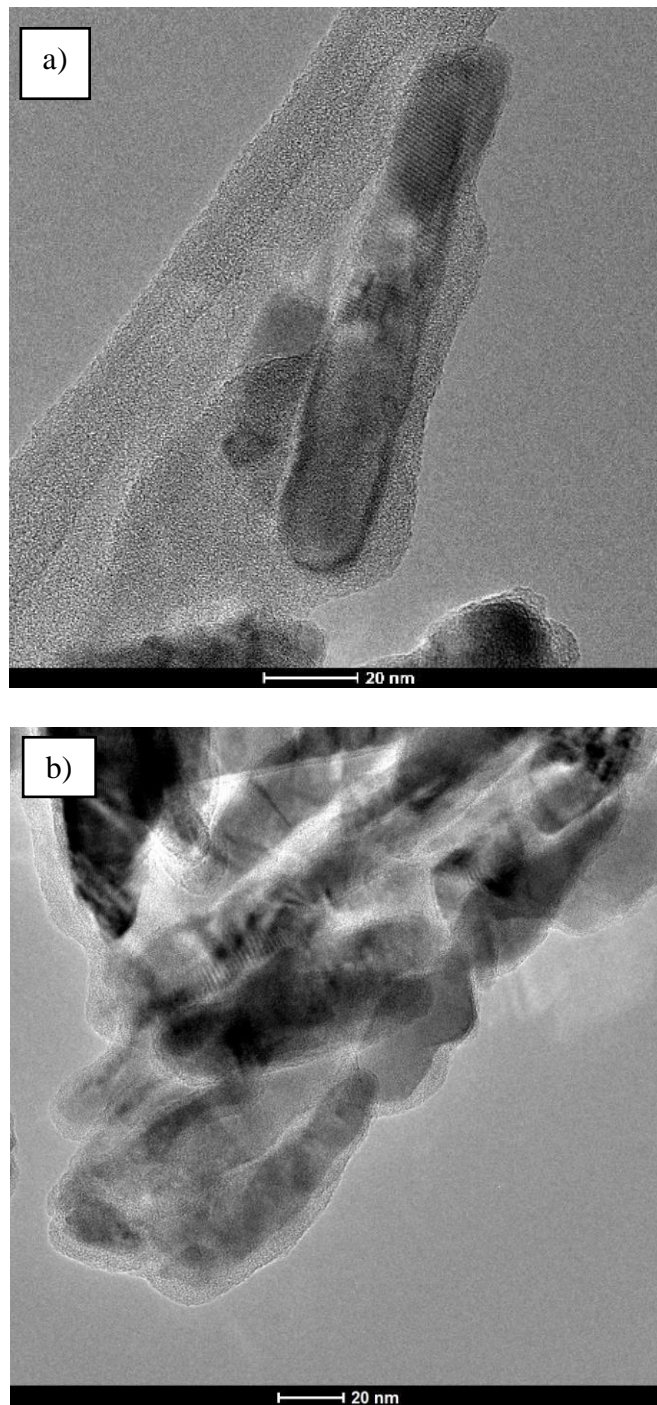


Fig. 14. Micrografías TEM de NPs CuO/CS con un contenido de CS de a) 30 y b) 23 %.

7.3 Carga y liberación de DOX en NPs de CuO/CS

Para la carga y liberación de DOX se seleccionaron dos nanocompositos de NPs de CuO/CS y NPs de CuO sin funcionalizar para poder tener una comparativa de resultados y apreciar cual reacción tenía un mejor comportamiento durante la carga y la liberación. Las muestras seleccionadas fueron aquellas conteniendo 30 y 23 % de CS.

Durante la carga, se buscó un método para mejorar la capacidad de carga, así como reducir su tiempo. Las primeras cargas tenían una duración de 72 h, esto cambió al visualizar el método y tiempos de carga que emplearon Varukattu et al.²⁰ reduciendo los tiempos de carga a 6 h. Sin embargo se optó por dejar las muestras durante 24 h en la solución de DOX para asegurar una carga completa. Durante el proceso de carga, la solución de DOX que originalmente era color naranja se tornó color violeta (Fig. 14), esto debido a que hubo un desplazamiento batocrómico a longitudes de onda de menor energía⁵⁷ del pico característico de DOX (de 480 a 512 nm) como se muestra en la Fig. 15. En esta figura no se aprecia una absorbancia por parte de las NPs de CuO de manera individual dispersas en agua milli-Q, lo que sí es notorio, es el desplazamiento en la longitud de onda (de 480 a 512 nm) de las soluciones de DOX conteniendo ambos nanocompositos, así como de las NPs de CuO cargadas con DOX. Este desplazamiento se debe a la formación de un complejo resultado de la interacción entre el CuO y la DOX. Este comportamiento confirma la carga por parte de las NPs además de concordar con lo reportado por Varukattu et al.²⁰

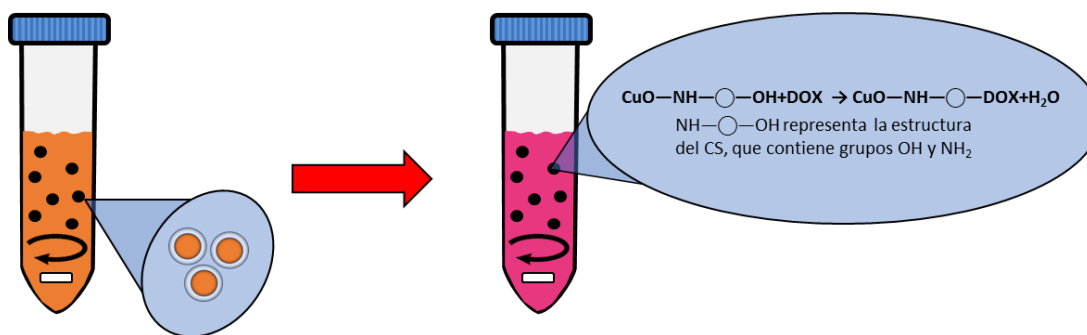


Fig. 15. Cambio de coloración de la solución de DOX por la formación del complejo entre las NPs de CuO con DOX.

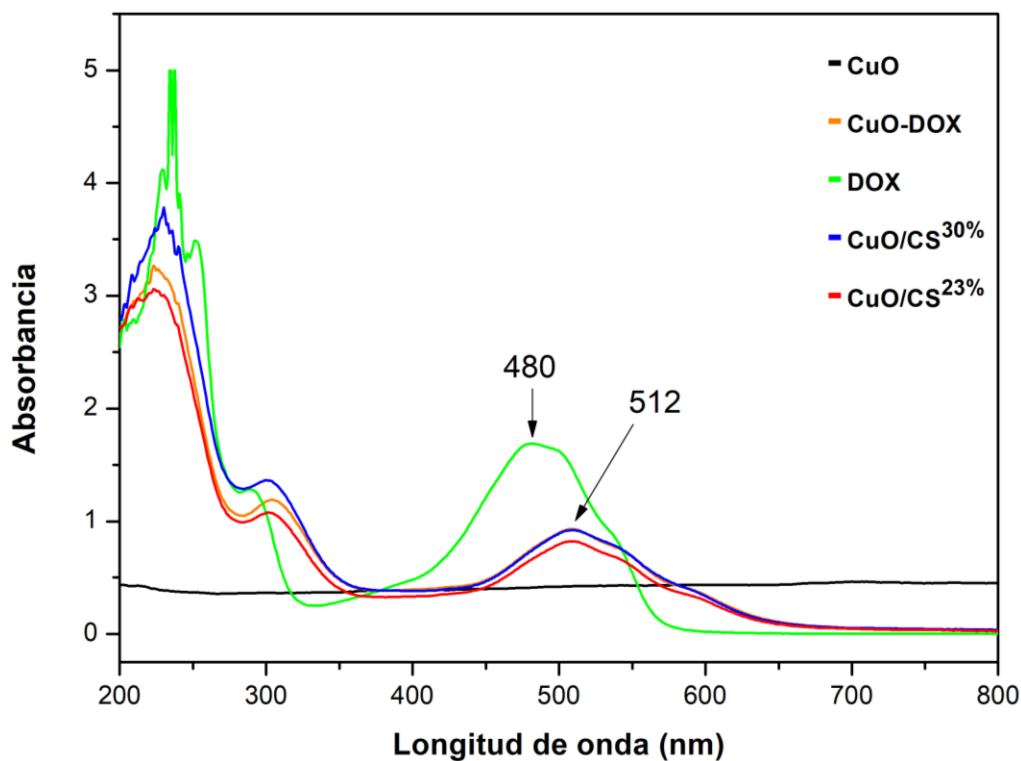


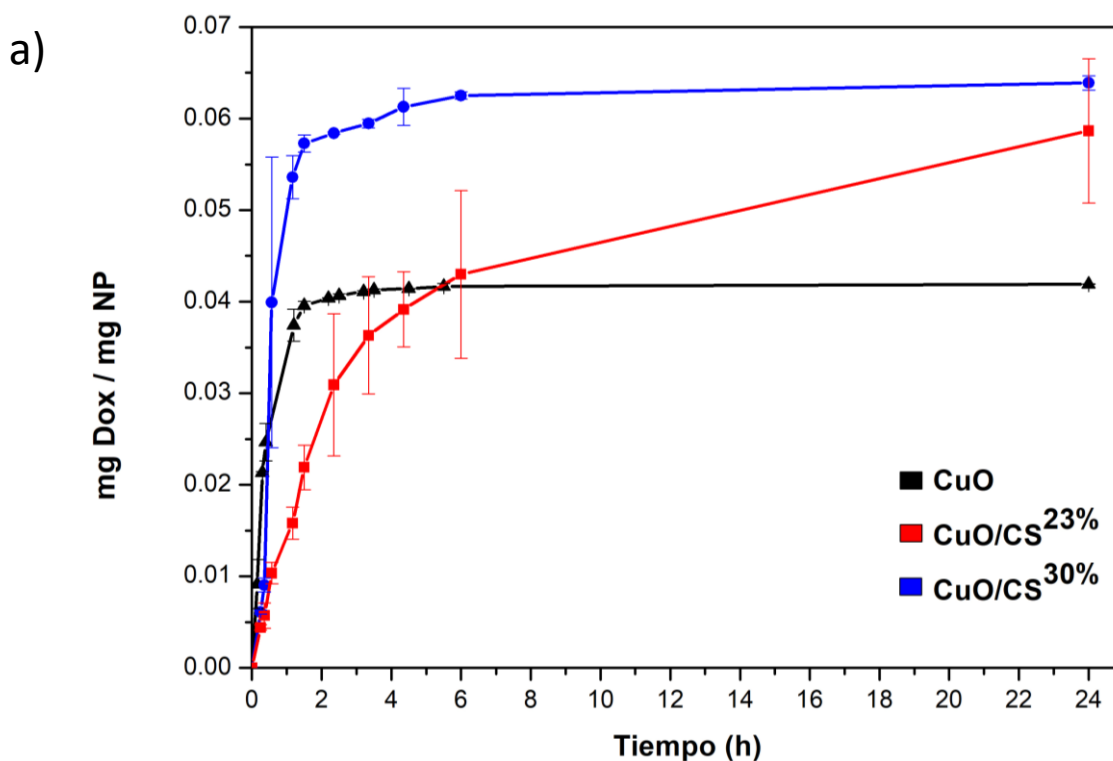
Fig. 16. Espectros de UV donde se muestra el desplazamiento batocrómico por parte de las diferentes soluciones remanentes de la carga de fármaco en los dos diferentes nanocompositos con diferente contenido de CS, NPs de CuO con DOX y NPs de CuO dispersas en agua.

En la Fig. 16a se observan los perfiles de carga de DOX en las NPs de CuO, NPs CuO/CS-23% y NPs CuO/CS-30%. Las NPs de CuO presentan carga de fármaco debido a que tienen grupos OH en la superficie de la NP que pueden interaccionar con los grupos NH₂ de la DOX, por otro lado en los nanocompositos con diferentes concentraciones de CS se aprecia que un incremento en el contenido de CS permite una mayor absorción del fármaco (DOX). Esto se debe a que al incrementar el contenido de CS hay más grupos amino que pueden interaccionar con las moléculas de DOX²⁰.

Por otro lado, durante la liberación se optó por monitorear durante un periodo de 48 h a 37 °C a diferentes pH (5.8 y 7.4). Los resultados de la liberación de DOX de las diferentes NPs, mostraron que a pH 5.8 ocurre una mayor liberación (hasta 45%) que a pH 7.4 (<5%) (Fig. 16 b). Esto es debido a que el CS es un polímero pH sensible que se comporta de diferente manera según los

niveles de pH. El CS tiene un pKa de 6.5⁴¹ y por debajo de este valor ocurre una protonación de los grupos amino, permitiendo la apertura de sus cadenas y así la posibilidad de que el fármaco sea expulsado.

Además, se observó que las NPs de CuO sin modificar aparentemente se comienzan a disolver a pH de 5.8 durante la liberación tornando la solución de color azul. De acuerdo con Yi-Huang Hsueh y col.⁵⁸, las NPs de CuO son solubles a pH ácido (pH de 5). Esto puede sugerir que el recubrimiento con CS ayuda a evitar esto, además de permitir que las NPs carguen una mayor cantidad de DOX.



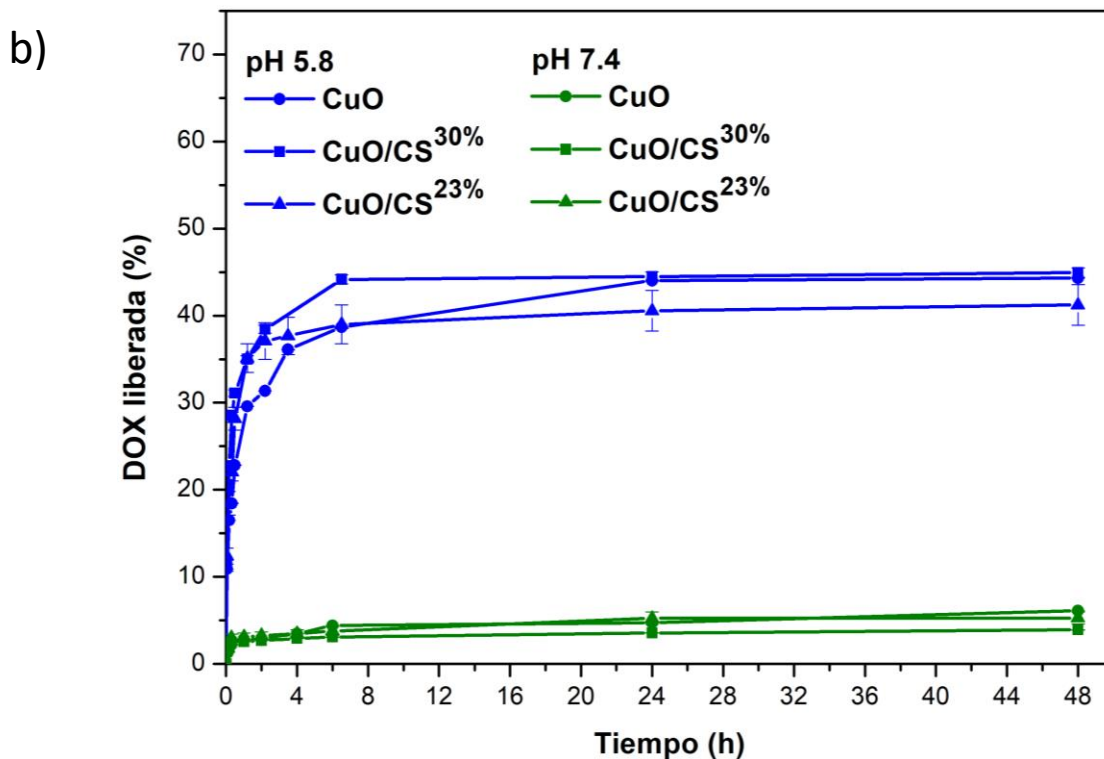


Fig. 17. Perfiles de a) Carga y b) liberación de DOX de NPs sin modificar y modificadas con CS a diferentes pH (5.8 y 7.4).

En 2020 Varukattu *et al.*²⁰ estudiaron NPs de CuO/CS sintetizadas *in situ* cargadas con DOX llevando a cabo estudios de liberación a 2 pH (7 y 5) muy similares a los empleados en esta investigación (7.4 y 5.8). En la investigación, se sintetizaron nanocompositos con diferente contenido de CS. Ellos observaron que la cantidad de fármaco liberado dependió del pH así como del contenido de CS en el nanocomposito obteniendo porcentajes de liberación de 26.5 hasta 51 a pH de 7 y de 73 a 93 a pH de 5.

De igual manera, en este trabajo se observa que la liberación del fármaco fue dependiente del pH, esto se debe a que a un pH inferior a 6.5, las cadenas de CS se protonan permitiendo su apertura y así posibilitando la liberación del fármaco. Por otro lado, a un pH por encima de 6.5 en un caso contrario, no ocurre la liberación del fármaco como se ejemplifica en el esquema de la Fig. 17. Esto explica porque al tener menor cantidad de CS presente en las NPs hay una menor carga de fármaco y por lo tanto una menor liberación en el entorno ácido.

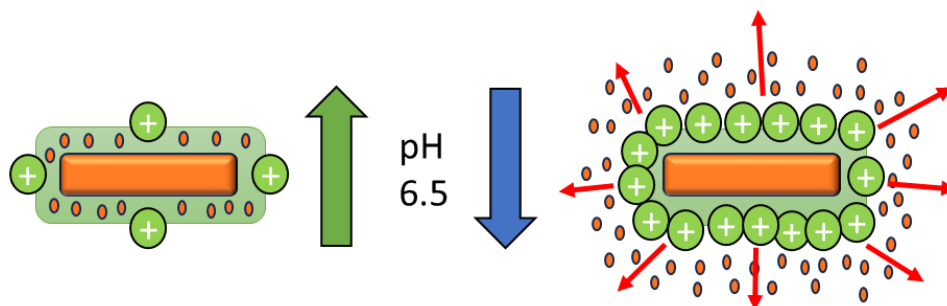


Fig. 18. Comportamiento de la liberación de las NPs ante diferentes pH

7.4. Síntesis de NPs de Cu

Las NPs de Cu se sintetizaron a partir de la reacción de descomposición térmica y se caracterizaron primeramente mediante DRX. En el difractograma se aprecian 3 picos principales a 43, 50 y 74° correspondiente a los planos (111), (200) y (220) respectivamente (Fig. 18). Los resultados obtenidos se compararon con la carta JCPDS 04-0836 lo cuales indicaron que se obtuvo una estructura FCC, correspondiente al Cu.

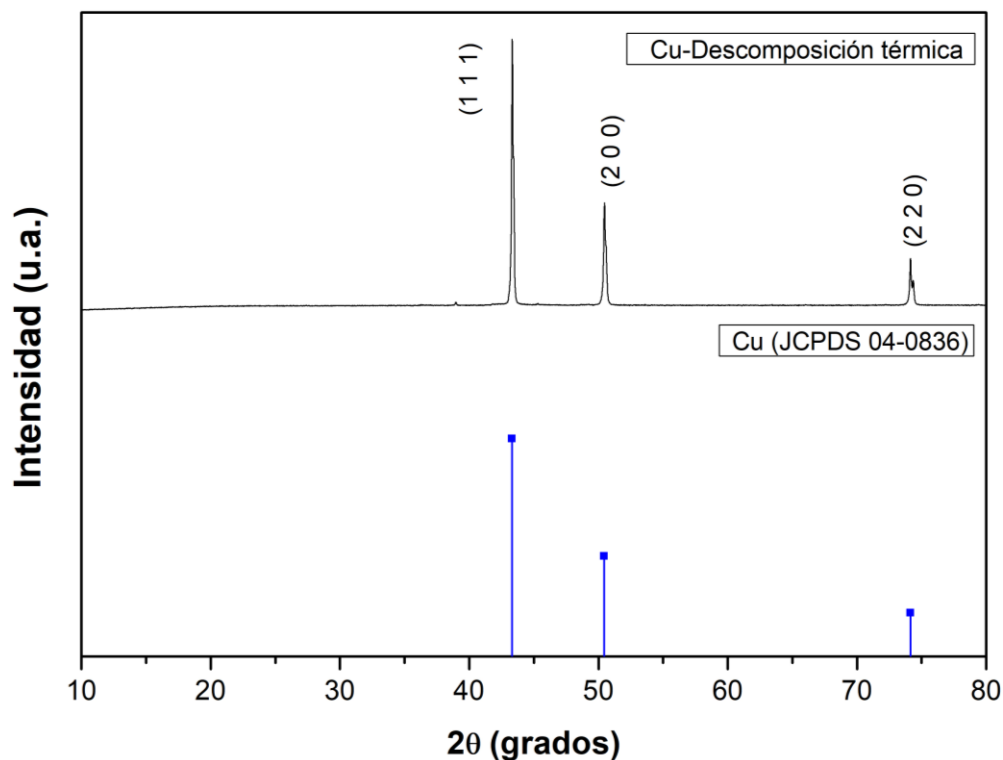


Fig. 19. Patrón de difracción de Rayos X de NPs de Cu obtenidas mediante el método de descomposición térmica y su estándar (carta JCPDS 04-0836).

Una vez confirmada la obtención de Cu a través de DRX se realizó la caracterización mediante TEM para apreciar la morfología y tamaño de partícula de las NPs (Fig. 19 a). De esta Fig. se puede apreciar que las NPs sintetizadas presentaron una morfología esférica. Además, se realizó la medición de estas partículas para observar la frecuencia de tamaños y obtener un histograma, el cual mostró tamaños de 1 a 9 nm con un promedio de 5.1 nm (Fig. 19 b). Estos tamaños de partícula fueron los esperados según lo reportado en investigaciones anteriores donde se emplea el mismo método de síntesis donde se obtuvieron tamaños entre los 4 y 19 nm con un tamaño promedio de 9 nm.⁵⁹

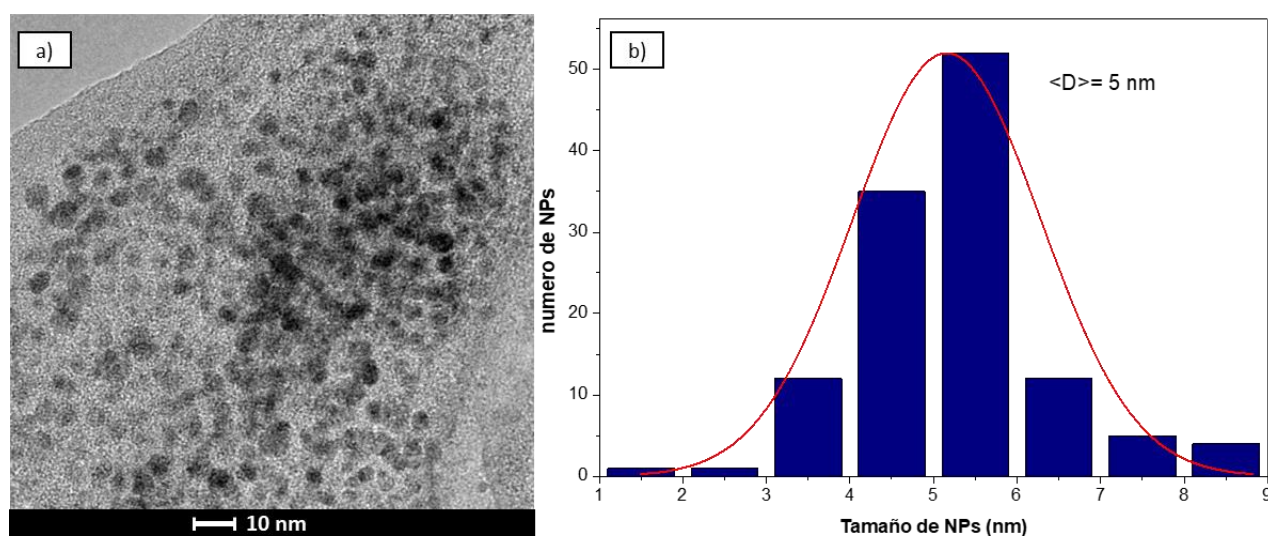
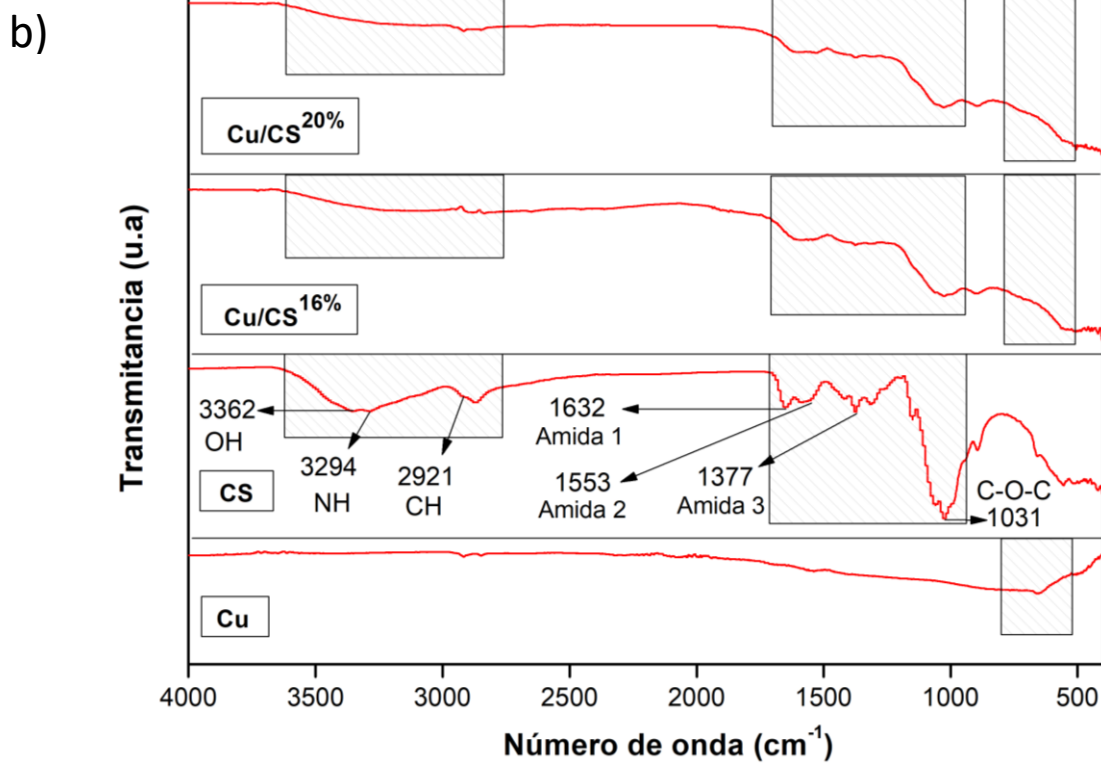
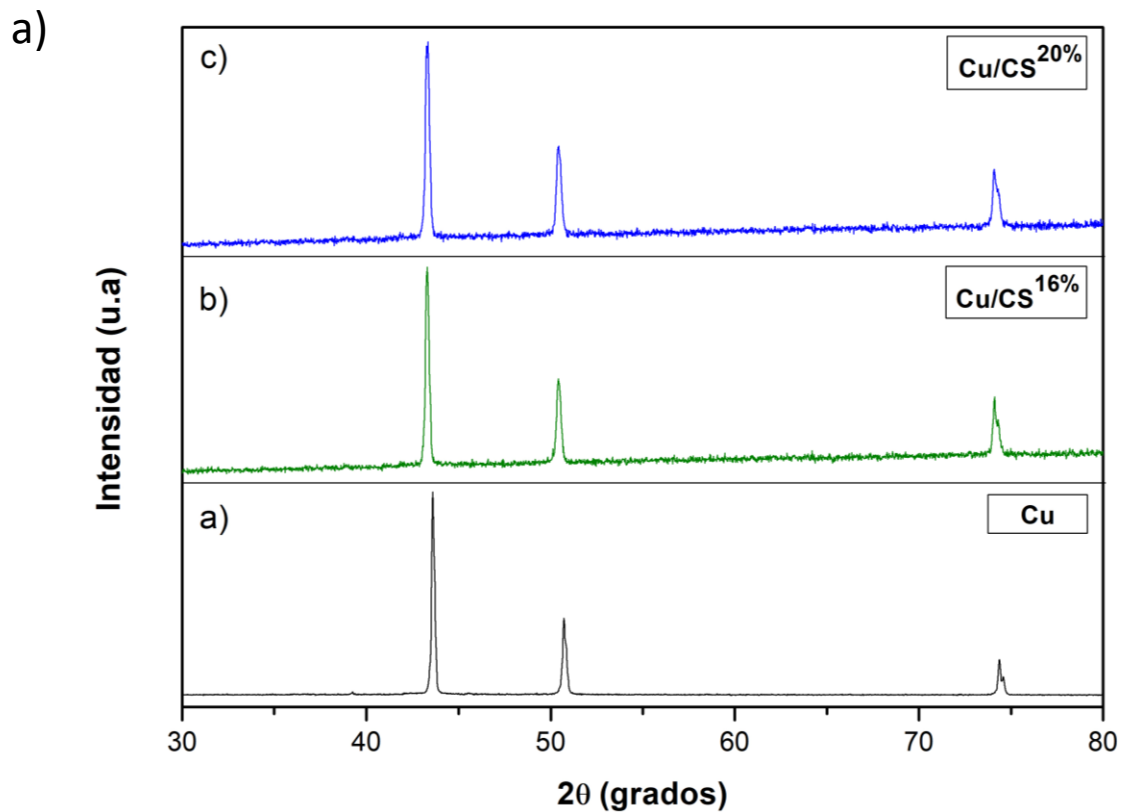


Fig. 20. a) Micrografía de TEM y b) Histograma de la Distribución de tamaño de partícula de las NPs de Cu sintetizadas.

7.5. Funcionalización de NPs Cu con CS

Una vez definidos los parámetros de funcionalización de las NPs de CuO, se aplicaron los mismos para la funcionalización de NPs de Cu con CS. Los parámetros fueron 4 mg/mL TPP, 2 mg/mL CS, 20 mg de NPs, tiempo de reacción de 1.5 h y 2 mg/mL TPP, 2 mg/mL CS, 20 mg de NPs, tiempo de reacción de 1.5 h. Las NPs sintetizadas bajo estas condiciones dieron como resultado NPs de Cu/CS⁶⁰ con dos diferentes contenidos de CS: 16 y 20 % respectivamente. Al caracterizar las NPs mediante DRX, IR y TGA se observaron resultados similares a los obtenidos para las NPs de CuO/CS. En el caso de DRX se observó un incremento en la interferencia del difractograma DRX al aumentar el contenido de CS debido a la presencia del material amorfo (Fig. 20 a).

Respecto al análisis de FTIR (Fig. 20 b) de igual forma se observó la presencia de bandas propias del CS en las NPs modificadas. Se observaron bandas en 3362 y 3294 cm^{-1} combinación de los grupos de NH_2 y a las vibraciones de estiramiento del grupo OH del CS, a 2921 cm^{-1} estiramientos del enlace C-H. Así mismo, se distingue a 1031 cm^{-1} una señal perteneciente a la tensión asimétrica del puente C-O-C (enlace glucosídico), a 1632 cm^{-1} se puede asignar a la flexión NH_2 (amida I), a 1553 cm^{-1} correspondiente al doblaje del grupo $-\text{NH}_2$ (amida II) y 1377 cm^{-1} propio de la amida III. En la caracterización mediante TGA (Fig. 19c) se observó un comportamiento similar al que se presentó en las NPs de CuO donde los dos nanocompositos con el cambio de la concentración de TPP arrojaron dos diferentes concentraciones presentes de CS en las muestras. En la Fig. 20 c se observa el termograma del CS donde se aprecia una pérdida significativa en el porcentaje en peso entre los 200 a 400 $^{\circ}\text{C}$, en ambos nanocompositos con diferentes contenidos de TPP se observaron pérdidas en este rango de temperatura, adicional a esto la reacción con 2 mg/mL de TPP denota otra pérdida arriba de los 450 $^{\circ}\text{C}$ por el posible entrecruzamiento de polímero permitiendo incrementar su estabilidad térmica. En el caso de la reacción donde se emplearon 2 mg/mL de TPP se aprecia un 16% de CS, mientras que en la reacción donde se usaron 4 mg/mL un 20% de CS.



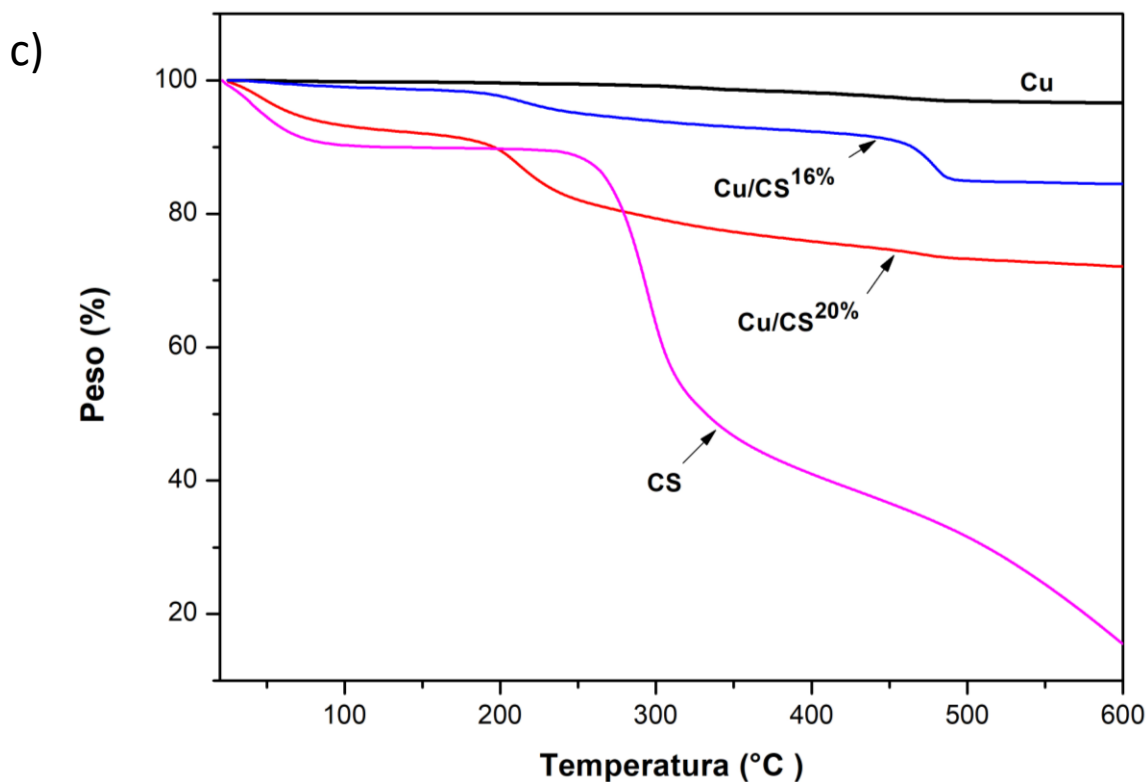


Fig. 21. Diferentes caracterizaciones realizadas a las NPs de Cu/CS con 16 y 20 % de CS. a) DRX, b) IR y c) TGA.

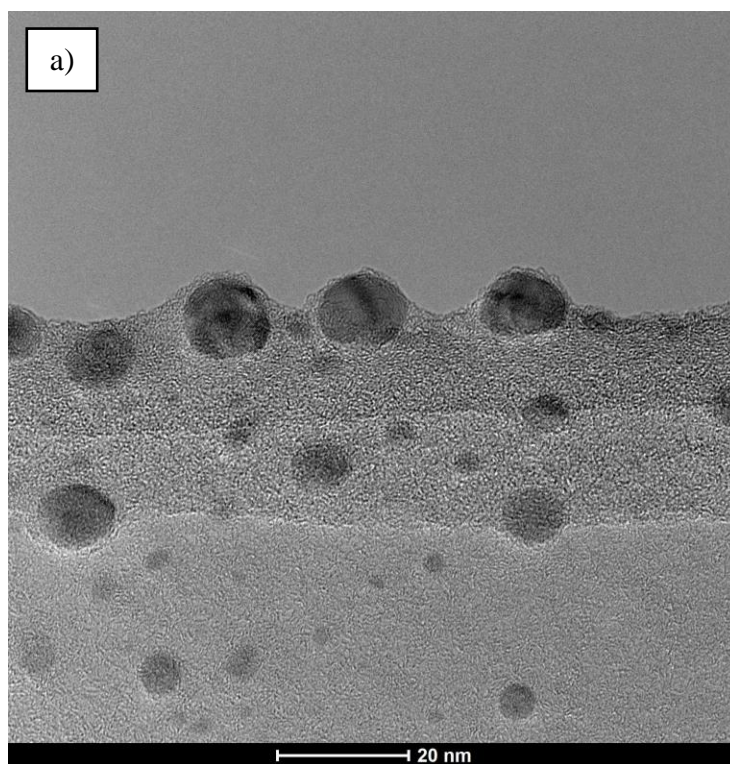
De igual forma para determinar el diámetro de las NPs modificadas con CS, estas se caracterizaron mediante DLS. Las NPs de Cu sin modificar mostraron un tamaño hidrodinámico de 51 nm mientras que las NPs de Cu/CS con porcentajes de polímero de 16 y 20% mostraron un diámetro de 141 y 250 nm respectivamente (tabla 9). Adicionalmente, se evaluó el potencial Z de estas NPs. Se puede apreciar que las NPs presentaron una buena estabilidad, ya que los valores de potencial Z estuvieron por debajo de un valor de -30 mV lo que nos indica que las NPs podrán estar suspendidas sin aglomerarse por un tiempo prolongado.¹⁰

Tabla 8. Tamaños hidrodinámicos de los nanocompositos de NPs de Cu/CS con diferente contenido de polímero.

Tamaño de NPs			
NPs Cu	-	50(\pm 8)	-38.8(\pm 5.1)
Nanocompositos	Contenido de CS (%)	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
NPs Cu/CS	16	141(\pm 12)	-58(\pm 1.7)
	20	250(\pm 49)	-63.7(\pm 0.6)

De igual forma se realizó un análisis TEM para corroborar la incorporación del CS a las NPs de Cu. Las imágenes de TEM mostraron que, en comparación con las NPs de CuO, los nanocompositos de NPs de Cu se presentan como una matriz polimérica con NPs de Cu embebidas

A continuación, se muestran las micrografías por la técnica de TEM correspondientes a los nanocompositos de Cu con diferentes porcentajes de CS (Fig. 21).



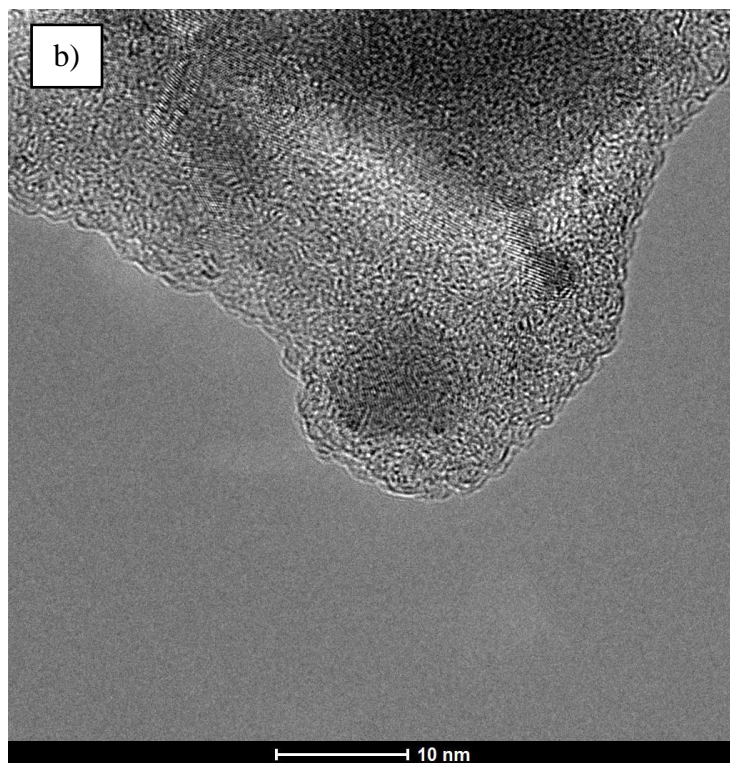


Fig. 22. Micrografías de TEM de a) NPs Cu/CS^{20%} y b) NPs Cu/CS^{16%}

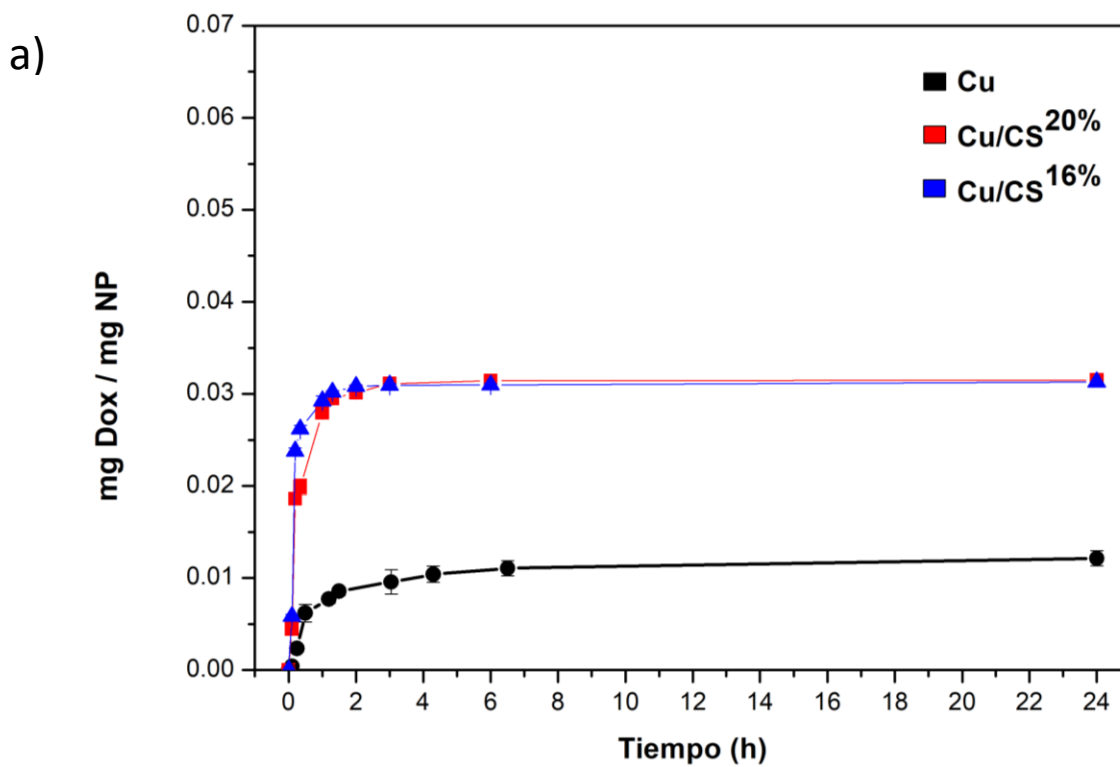
7.6. Carga y liberación de DOX en NPs de Cu/CS

Para la carga de DOX en las NPs de Cu/CS, se implementaron las mismas condiciones que en el caso de las NPs de CuO. Las NPs de Cu modificadas con CS mostraron un comportamiento similar al aquel obtenido por el nanocomposito de CuO/CS, el cual mostró un incremento en la cantidad de DOX cargada conforme aumenta el contenido de CS (Fig. 22 a). Para el caso de las NPs de Cu sin modificar, estas presentaron una carga menor (0.01213 mg DOX/mg NP) a las que presentaron las NPs de CuO (0.04191 DOX/mg NP). Esto se debe probablemente a que las NPs de CuO contienen grupos hidroxilos en la superficie de la NP los cuales favorecen la interacción con moléculas de DOX, a diferencia de las NPs de Cu las cuales no presentan dichos grupos en su superficie. Al igual que en el caso de las NPs de CuO, la solución tomo una coloración violeta durante la carga, debido a la formación de un complejo resultado de la interacción entre el Cu y la DOX.

Por otro lado, en los estudios de la liberación se observó una dependencia de la liberación del fármaco con respecto al pH, ocurriendo una mayor liberación (57%) a pH de 5.8 en comparación

a pH 7.4 (40%). Esto es debido a como se comentó anteriormente, las cadenas de CS se encuentran protonadas a valores de pH ácido lo cual provoca un hinchamiento de estas cadenas ocurriendo una mejor liberación del fármaco (ver Fig. 16). En el caso de las liberaciones a pH 7.4, se observó una liberación superior al 10% posiblemente debido a que la cantidad de CS era menor a la requerida en este material para actuar como una barrera que evite en su mayoría la liberación de fármaco. Pese a esto cabe recalcar que esta liberación a pH 7.4 sigue siendo inferior a la obtenida a pH ácido de 5.8, pudiendo apreciar de igual modo la respuesta al pH por parte de los nanocompositos (ver Fig. 22 b).

En la literatura no hay mucha información con respecto al uso de nanocompositos de Cu/CS/DOX, no obstante, en 2019 Pramanik et al. Estudiaron la liberación de dos nanocarreadores de Cu encapsulado en CS, uno conjugado con ácido fólico (CSF) mientras que el otro conjugado con ácido esteárico (CSP). Las liberaciones se llevaron a cabo por un lapso de 24 h en pH ácido obteniendo como resultado: 55 % (CSF) y 60% (CSP). Estos valores de liberación fueron similares al reportado en esta investigación a pH ácido (57 %), comprobando el comportamiento pH dependiente del CS.



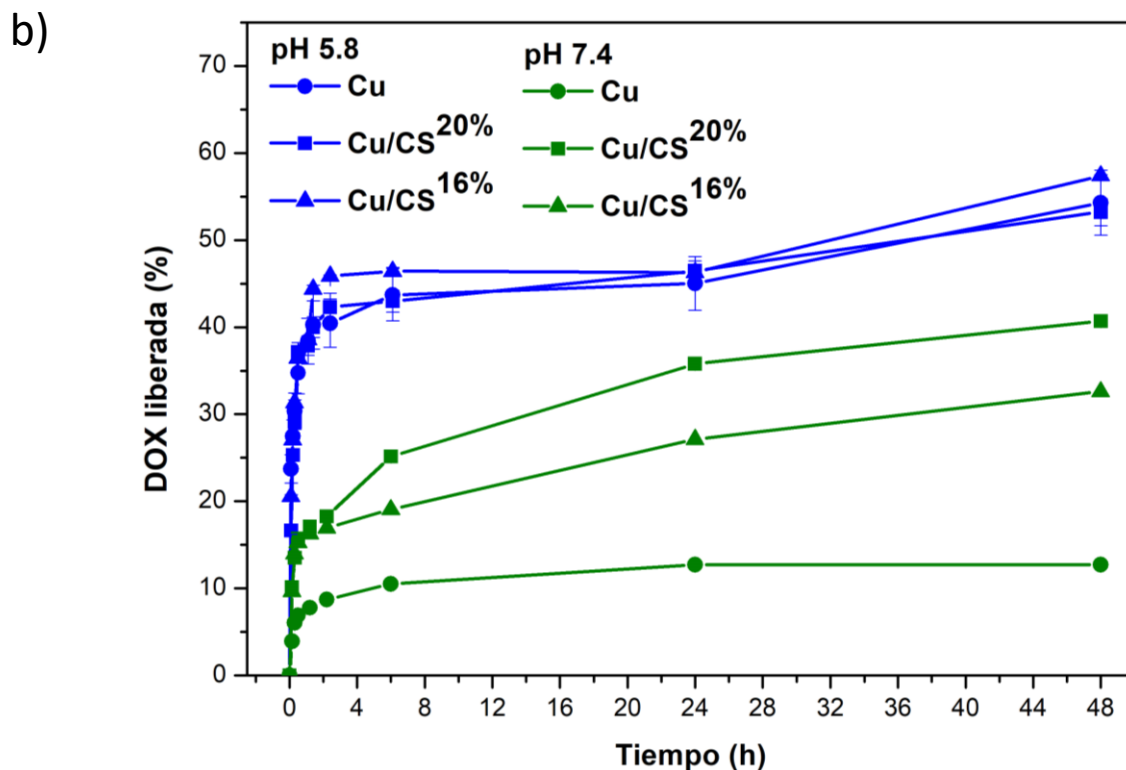


Fig. 23. a) Perfiles de carga de DOX en las diferentes NPs de Cu y b) Liberaciones de DOX de las NPs cargadas en diferentes pH (5.8 y 7.4).

7.7. Evaluación de citotoxicidad de NPs de CuO/CS y Cu/CS

La citotoxicidad es definida como la toxicidad causada en las células vivas por acción de agentes quimioterapéuticos.⁶¹ Es importante evaluar la citotoxicidad en NPs para determinar su posible aplicación biomédica, esto va ligado con la viabilidad celular que se basa en el número de células sanas presentes en una muestra. Este valor se consigue mediante los ensayos de viabilidad celular que se usan para examinar la respuesta a un fármaco o agente químico por parte de las células mediante ensayos *in vitro* de citotoxicidad mediada por células para controlar la proliferación celular.^{62,63}

La citotoxicidad y viabilidad celular en ocasiones involucran el uso de tintes para apreciar la diferencia de células en función de la cantidad de células vivas o muertas.⁶³ Algunas células presentan la característica de ser adherentes y una de las variables para la apreciación de la muerte

celular y observar la tasa de proliferación ante agentes citotóxicos es mediante el desprendimiento de células adherentes de las placas de cultivo durante la muerte celular.⁶⁴

Un método sencillo y rápido para detectar la adherencia de las células es el ensayo de cristal violeta (CVS). Este ensayo está clasificado como colorimétrico, el tinte cristal violeta (colorante de acumulación nuclear) se combina con las proteínas y ADN de células viables por lo que las células adheridas se tiñen de este tinte.^{65,66} Durante la muerte, las células pierden su adherencia y posteriormente ocurre un descenso en la población celular, lo que conduce a la disminución de tinción en el cultivo.⁶⁷

En los ensayos de citotoxicidad realizados en esta investigación, se evaluaron las NPs de CuO y Cu sin modificar y modificadas en dos diferentes líneas celulares. Para apreciar su respuesta ante células sanas se seleccionó la línea celular 1132SK correspondiente a fibroblastos ya que son células abundantes en el cuerpo humano encargadas de la reparación de los tejidos⁶⁸. Por otro lado, la línea celular seleccionada para observar la respuesta de los nanocompositos cargados con fármaco la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) fue seleccionada. El motivo para escoger este tipo de células cancerígenas es debido a que en mujeres es uno de los cánceres más invasivos y representa alrededor del 11.6% del total de los tipos de cáncer existentes, además, de que actualmente se buscan diferentes terapias para poder tratarlo con el uso de materiales similares a los empleados en esta investigación, con participación del fármaco seleccionado para ser portado por los nanocompositos postulados.^{20,45,49}

7.7.1 Estudios de citotoxicidad *in vitro* de los nanocompositos basados en NPs de CuO

En la Fig. 23 se muestran los resultados de las pruebas de citotoxicidad por parte de las NPs de CuO, CuO/CS y CuO/CS/DOX llevadas a cabo en fibroblastos (Fig. 23 a) y cáncer de mama (Fig. 23 b) a 24 h y diferente concentración de NPs (3, 6, 12, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

De la Fig. 23 a y b, se puede apreciar que en general, al incrementarse la concentración de NPs la viabilidad celular disminuye. La menor viabilidad celular a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se obtuvo por parte de las NPs de CuO (43%) y CuO/DOX (42%), mientras que los nanocompositos de CuO/CS y CuO/CS/DOX con diferentes porcentajes de CS mostraron un comportamiento muy

similar dando porcentajes de viabilidad celular de 86 a 90%. Por otro lado el estándar de DOX libre presento una viabilidad del 72%

Respecto al comportamiento citotóxico de los nanocompositos ante la línea celular de cáncer de mama (Fig. 23 b) a una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$; Las NPs de CuO, CuO/DOX y DOX libre presentaron viabilidades de 36 a 48% a una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$, mostrando un comportamiento muy similar en comparación con los demás nanocompositos. Respecto a las NPs de CuO/CS ambos nanocompuestos con 23 y 30% de CS presentaron comportamientos parecidos de 83 y 87% respectivamente, este incremento en la viabilidad celular se debe a la presencia de CS que funge como una barrera entre los nanocompositos y las células, mientras que las NPs de CuO/CS/DOX con diferentes porcentajes de CS (23 y 30%) presentan porcentajes muy similares de 76 y 77% respectivamente, aquí se observó una disminución en la viabilidad celular por la presencia de DOX, que al liberarse tiene un efecto citotóxico adicional sobre las células en comparación con los nanocompositos sin fármaco. Estos resultados son coherentes ya que cabe resaltar que la DOX libre mostró un comportamiento citotóxico muy similar al de las NPs de CuO y CuO/DOX lo cual quiere decir que al estar cargada en los nanocompositos recubiertos con CS disminuye su toxicidad permitiendo una mejor viabilidad para emplearse como agente anticancerígeno de liberación controlada.

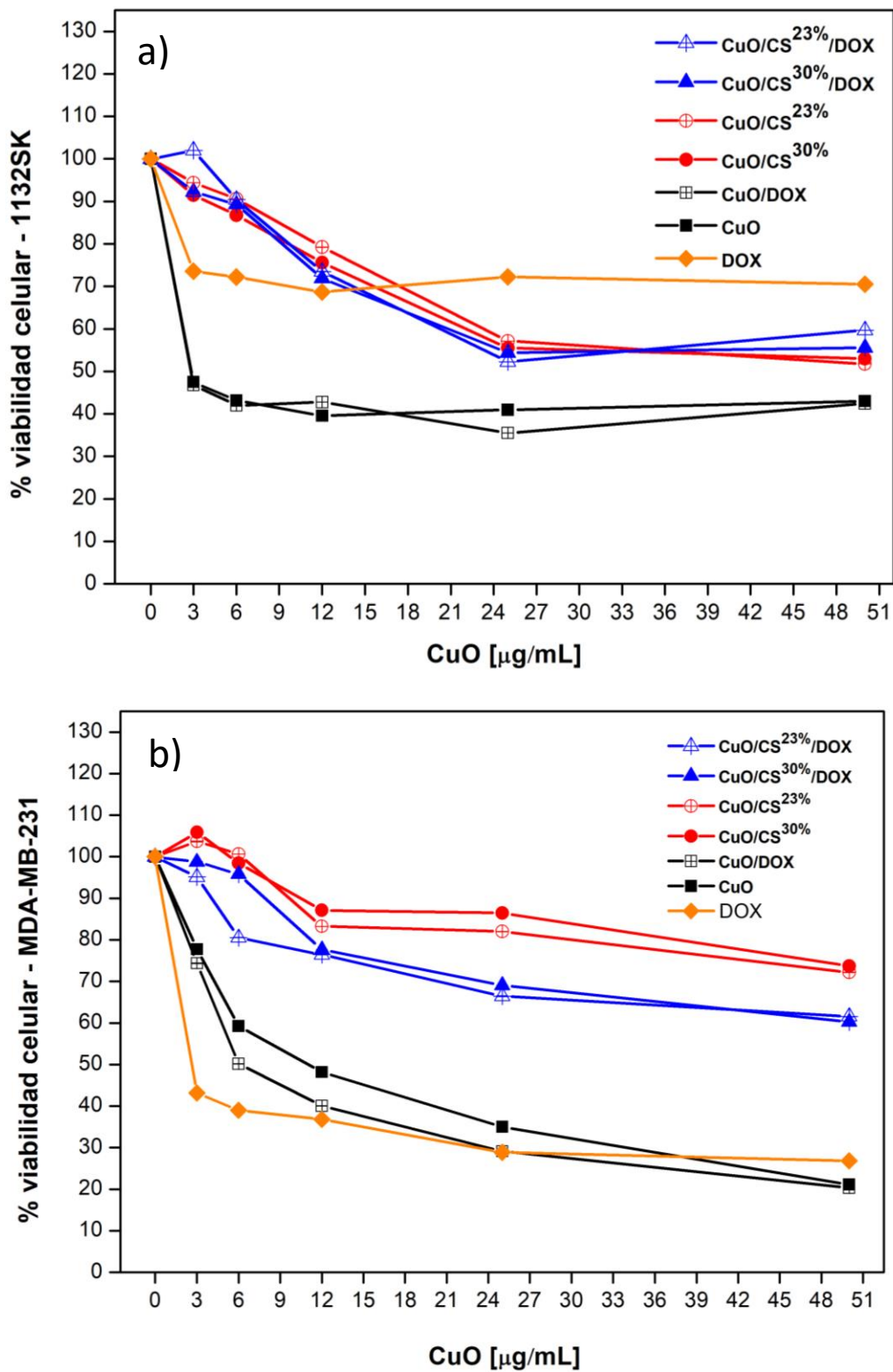


Fig. 24. Viabilidad celular de NPs de CuO, CuO/CS y CuO/CS/DOX en a) fibroblastos y b) cáncer de mama.

7.7.2 Estudios de citotoxicidad *in vitro* de los nanocompositos basados en NPs de Cu

En la Fig. 24 se muestran los resultados de las pruebas de citotoxicidad por parte de las NPs de Cu, Cu/CS y Cu/CS/DOX en fibroblastos (Fig. 24 a) y cáncer de mama (Fig. 24 b) a 24h variando la concentración del contenido de NPs de 3 a 50 $\mu\text{g/mL}$.

De las Fig. 24 a y b, se puede apreciar que en general, al incrementarse la concentración de NPs la viabilidad celular disminuye. Respecto a la citotoxicidad en fibroblastos, las NPs de Cu (60%) presentaron la menor viabilidad celular a una concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 24 a), mientras que la DOX libre (72%) y Cu/DOX (76%) presentaron porcentajes similares. Por otro lado respecto a los nanocompositos con 16% de CS, no se observó un cambio significativo en la viabilidad entre los nanocompositos cargados y sin fármaco dando como resultado una viabilidad de 73%. En cuanto a los nanocompositos con 20% de CS se observó una menor viabilidad al implementar la carga de fármaco (80%) en comparación con los nanocompositos con ausencia de fármaco (96%), También se puede apreciar la disminución en la citotoxicidad de la DOX al estar presente en los nanocompositos gracias a la presencia de CS.

En el caso de la línea celular correspondiente a cáncer de mama en una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$. (Fig. 24 b) la DOX libre resalta como la más citotóxica en esta prueba ya que alcanza porcentajes de viabilidad celular del 36%. En cuanto a las NPs de Cu (67%) y los nanocompositos de Cu/CS^{16%} (70 %) y de Cu/CS^{16%}/DOX (65 %) de nuevo mostraron un comportamiento similar respecto a su viabilidad celular, esto debido al bajo porcentaje de CS presente, no obstante, se marca una diferencia entre la DOX del resto de las NPs. Las NPs de Cu/DOX (78%), los nanocompositos Cu/CS^{20%} (84%) y Cu/CS^{20%}/DOX (81%) presentaron viabilidades celulares similares.

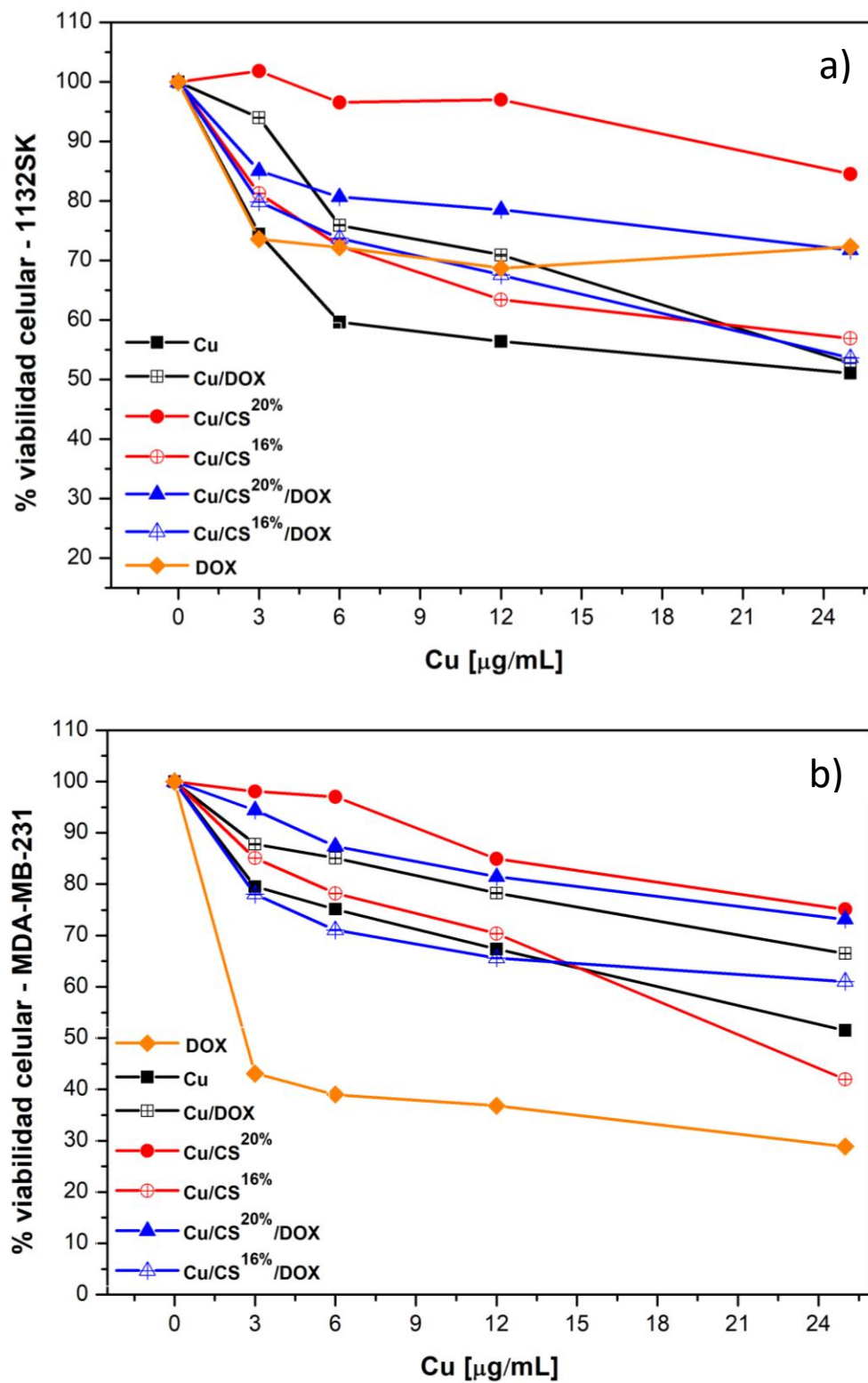


Fig. 25. Viabilidad celular de NPs de Cu, Cu/CS y Cu/CS/DOX en a) fibroblastos y b) cáncer de mama.

La viabilidad celular de NPs CuO/CS/DOX reportada en trabajos anteriores como el realizado por Varukattu y col. fue de 80% en concentraciones de 30 $\mu\text{g/mL}$ demostrando citotoxicidad dependiente de la dosis.²⁰

Otra investigación donde de igual forma se emplean nanocompositos similares a los utilizados en este estudio con aplicación en cáncer de mama, es reportada por Elsayed y col. quienes reportaron el efecto de un fármaco denominado Quercetina. Ellos obtuvieron viabilidades arriba de 80% en el caso de las NPs de CuO/CS a una concentración aproximada de 15 $\mu\text{g/mL}$ disminuyendo a un 75% con la adición del fármaco.⁴¹

Los resultados obtenidos en esta investigación varían en comparación con los estudios mencionados anteriormente en cuanto a la concentración para obtener una viabilidad del 80%, ya que las pruebas obtenidas en los ensayos de citotoxicidad de este estudio dieron como resultado un 80% de viabilidad celular en concentraciones que rondan los 6 a 12 $\mu\text{g/mL}$.

Adicional a los dos trabajos mencionados anteriormente, a continuación, en la tabla 10 se muestran nanomateriales a base de NPs de CuO y Cu con su concentración en $\mu\text{g/mL}$, línea de cáncer de mama en la que se estudiaron y porcentaje de viabilidad celular obtenido. A primera vista se puede observar una mayor citotoxicidad por parte de las NPs de CuO, incrementando al incorporar DOX a una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con las NPs de Cu. En el caso de los nanocompositos de CuO/CS la mayor citotoxicidad es alcanzada al ser cargados con DOX. La menor viabilidad celular a una menor concentración de nanocompositos de CuO/CS es alcanzada por los nanocompositos evaluados en este estudio. Respecto a los nanocompositos de Cu/CS de igual forma la menor viabilidad celular a una menor concentración, es obtenida por los nanocompositos Cu/CS/DOX propuestos en este estudio.

Tabla 9. Investigaciones previamente reportadas de nanomateriales de CuO y Cu con sus respectivas viabilidades celulares incluyendo los resultados obtenidos en esta investigación.

Nanomaterial	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad celular (%)	Línea celular	Referencia
NPs CuO	12	48	MDA-MB-231	Este trabajo
CuO/DOX	12	40	MDA-MB-231	Este trabajo
CuO/CS^{23%}	12	83	MDA-MB-231	Este trabajo
CuO/CS^{30%}	12	87	MDA-MB-231	Este trabajo
NPs CuO/CS	2	50	MDA-MB-231	49
NPs CuO/CS	50	81	MCF-7	13
CuO/CS^{23%}/DOX	12	76	MDA-MB-231	Este trabajo
CuO/CS^{30%}/DOX	12	77	MDA-MB-231	Este trabajo
NPs CuO/CS/DOX	30	80	MCF-7	20
NPs CuO/CS/Q	15	75	MCF-7	45
NPs Cu	12	67	MDA-MB-231	Este trabajo
Cu/DOX	12	78	MDA-MB-231	Este trabajo
Cu/CS^{16%}	12	70	MDA-MB-231	Este trabajo
Cu/CS^{20%}	12	84	MDA-MB-231	Este trabajo
NPs Cu/CS	12	85	MCF-7	69
NPs Cu/CS/Alg	297	50	MDA-MB-453	46
Cu/CS^{16%}/DOX	12	65	MDA-MB-231	Este trabajo
Cu/CS^{20%}/DOX	12	81	MDA-MB-231	Este trabajo

8. Conclusiones

- Se prepararon NPs de CuO (morfología de barras) y Cu (morfología esférica) mediante el método de hidrólisis oxidativa y el método de descomposición térmica respectivamente.
- La obtención de los materiales híbridos de ambas NPs (CuO y Cu) fue posible por el método de gelación iónica, observándose que a mayor concentración de TPP y CS, así como menor concentración de NPs, estas presentaban mayor recubrimiento de CS.
- Se observó una mayor adherencia de CS en las NPs de CuO en comparación con las NPs de Cu.
- La capacidad de carga de las NPs se ve delimitada por el tipo de material empleado ya que se aprecia una diferencia significativa en cuanto a la carga de fármaco por parte de las NPs de CuO respecto a las NPs de Cu, de igual forma se ve afectada por la cantidad de CS presente en las NPs funcionalizadas.
- Los materiales híbridos mostraron una liberación dependiente del pH, siendo más notoria la diferencia en el porcentaje de fármaco liberado para las NPs de CuO.
- Las NPs de ambos materiales evaluados en las líneas celulares de fibroblastos y cáncer de mama elucidan un comportamiento citotóxico el cual fue dependiente de su concentración.
- Las NPs recubiertas con CS mostraron una mayor viabilidad celular en ambas células.
- Las NPs de CuO con diferentes porcentajes de CS, no presentan una diferencia significativa en cuanto a los valores de viabilidad celular en ambas líneas celulares, no obstante, al adicionar el fármaco la citotoxicidad aumenta en las células cancerosas.
- Las NPs de Cu modificadas con CS (16%) presentaron una viabilidad celular muy similar a las NPs sin recubrimiento.
- Los nanocompositos de CuO en comparación con los de Cu, presentan mejor viabilidad celular en fibroblastos, así como buena citotoxicidad en cáncer de mama, por lo cual los hace potencialmente buenos para emplearse como sistemas de liberación controlada de fármaco.

9. Referencias

1. Noh MS, Lee S, Kang H, et al. Target-specific near-IR induced drug release and photothermal therapy with accumulated Au/Ag hollow nanoshells on pulmonary cancer cell membranes. *Biomaterials*. 2015;45:81-92. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.12.036
2. López RG, Saade H. *Nanoestructuras Cargadas Con Fármacos Para El Tratamiento de Cáncer. Hacia Una Puesta En Perspectiva*. Centro de Investigación en Química Aplicada; 2020.
3. L. Ruiz. Fármaco anticancerígeno a base de cobre . Unamglobal.unam.mx .
4. Cava RJ. Structural Chemistry and the Local Charge Picture of Copper Oxide Superconductors. *Science* (1979). 1990;247(4943):656-662. doi:10.1126/science.247.4943.656
5. Tranquada JM, Sternlieb BJ, Axe JD, Nakamura Y, Uchida S. Evidence for stripe correlations of spins and holes in copper oxide superconductors. *Nature*. 1995;375(6532):561-563. doi:10.1038/375561a0
6. Wahid F, Wang HS, Lu YS, Zhong C, Chu LQ. Preparation, characterization and antibacterial applications of carboxymethyl chitosan/CuO nanocomposite hydrogels. *Int J Biol Macromol*. 2017;101:690-695. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.132
7. Mokhtar A, Djelad A, Bengueddach A, Sassi M. CuNPs-magadiite/chitosan nanocomposite beads as advanced antibacterial agent: Synthetic path and characterization. *Int J Biol Macromol*. 2018;118:2149-2155. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.058
8. Nguyen NY, An BN., Le M V., Hoang HA. Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles-Chitosan Composite against *Vibrio parahaemolyticus*. *Biocontrol Sci*. 2020;25(3):159-165.
9. Jayaramudu T, Varaprasad K, Pyarasani RD, et al. Chitosan capped copper oxide/copper nanoparticles encapsulated microbial resistant nanocomposite films. *Int J Biol Macromol*. 2019;128:499-508. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.145
10. Wardana AA, Kingwascharapong P, Tanaka F, Tanaka F. CuO nanoparticles/Indonesian cedarwood essential oil-loaded chitosan coating film: characterisation and antifungal improvement against *Penicillium* spp. *Int J Food Sci Technol*. 2021;56(9):4224-4238. doi:10.1111/ijfs.15195
11. Kumari S, Singh BN, Srivastava P. Effect of copper nanoparticles on physico-chemical properties of chitosan and gelatin-based scaffold developed for skin tissue engineering application. *3 Biotech*. 2019;9(3). doi:10.1007/s13205-019-1624-9

12. Wang Y, El-Kott AF, El-Kenawy AE, Xue L. Decorated CuO nanoparticles over chitosan-functionalized magnetic nanoparticles: Investigation of its anti-colon carcinoma and anti-gastric cancer effects. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021;14(7). doi:10.1016/j.arabjc.2021.103201
13. Dey A, Manna S, Kumar S, Chattopadhyay S, Saha B, Roy S. Immunostimulatory effect of chitosan conjugated green copper oxide nanoparticles in tumor immunotherapy. *Cytokine*. 2020;127. doi:10.1016/j.cyto.2019.154958
14. Shi Z, Mahdavian Y, Mahdavian Y, et al. Cu immobilized on chitosan-modified iron oxide magnetic nanoparticles: Preparation, characterization and investigation of its anti-lung cancer effects. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021;14(8). doi:10.1016/j.arabjc.2021.103224
15. Guo Y, Dai M, Zhu Z, Chen Y, He H, Qin T. Chitosan modified Cu₂O nanoparticles with high catalytic activity for p-nitrophenol reduction. *Appl Surf Sci*. 2019;480:601-610. doi:10.1016/j.apsusc.2019.02.246
16. Bakhsh EM, Ali F, Khan SB, Marwani HM, Danish EY, Asiri AM. Copper nanoparticles embedded chitosan for efficient detection and reduction of nitroaniline. *Int J Biol Macromol*. 2019;131:666-675. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.095
17. Srivastava V, Choubey AK. Investigation of adsorption of organic dyes present in wastewater using chitosan beads immobilized with biofabricated CuO nanoparticles. *J Mol Struct*. 2021;1242. doi:10.1016/j.molstruc.2021.130749
18. Naskar S, Sharma S, Kuotsu K. Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019;49:66-81.
19. Montha W, Maneeprakorn W, Buatong N, Tang IM, Pon-On W. Synthesis of doxorubicin-PLGA loaded chitosan stabilized (Mn, Zn)Fe₂O₄ nanoparticles: Biological activity and pH-responsive drug release. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;59:235-240. doi:10.1016/j.msec.2015.09.098
20. Varukattu NB, Vivek R, Rejeeth C, et al. Nanostructured pH-responsive biocompatible chitosan coated copper oxide nanoparticles: A polymeric smart intracellular delivery system for doxorubicin in breast cancer cells. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020;13(1):2276-2286. doi:10.1016/j.arabjc.2018.04.012
21. Sarah Brown. El cáncer: información básica. Carbone Cancer Center.
22. D. P. Navarro, Y. J. Pariona. *Factores de Riesgo de Cáncer En Pacientes Del Hospital Departamental "ZACARÍAS CORREA VALDIVIA" de Huancavelica*. Universidad Nacional de Huancavelica; 2018.
23. J. G. de la Garza, P.J. Sánchez. *El Tratamiento Del Cáncer*. primera edición.; 2014.

24. G. Espinoza, R. Fray. *Efectos Secundarios al Tratamiento de Radioterapia En Pacientes Con Cáncer de Mama*. Universidad Nacional Federico Villarreal; 2018.
25. M.S. Belmont. *Resiliencia y Calidad de Vida Relacionada Con La Salud En Pacientes Adultos Que Reciben Quimioterapia*. Universidad de Lima; 2018.
26. V. R. Hernandez. *Nanoacarreadores: Una Alternativa Más Para La Administración Tópica/Transdérmica de Fármacos*. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
27. A. Morfin. *Síntesis y Caracterización de Nanomateriales Híbridos Para Su Uso Como Sistemas de Carga y Liberación de Fármacos*. Centro de investigación en química aplicada.; 2020.
28. M. B. Pizarro. *Cardiotoxicidad Por Doxorubicina: Efecto Sobre La Autofagia Basal*. Universidad de Chile; 2016.
29. J. S. Pérez. *Farmacocinética Clínica de Doxorubicina En Pacientes Diagnosticados de Linfoma No Hodgkin*. Universidad de Salamanca; 2016.
30. M. P. Hernández. *Síntesis de Nanopartículas de Plata Biológicamente Asistida Con Opuntia Sp. y Su Incorporación En Membranas Poliméricas Nanofibrosas*. Centro de Investigación en Química Aplicada; 2013.
31. R. Zanella. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. Mundo nano. *Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*. 2012;5(1):69-81.
32. M. Garduño. *Fabricación de Nanopartículas Metálicas Para Aplicaciones Fotovoltaicas*. Instituto Politécnico Nacional; 2011.
33. C.Arenas. *Síntesis de Nanopartículas Metálicas a Partir de Extractos de Raspo de Uva*. Universitat Politècnica de Catalunya; 2017.
34. Dr. G. Cardenas. *Síntesis de Nanopartículas Metálicas y Estudio de Sus Aplicaciones*. Centro de Investigación en Química Aplicada; 2021.
35. D. A. Trepiana. *Síntesis de Suspensiones de Nanopartículas de Cobre y Quitosano, y Evaluación de Sus Propiedades Antimicrobianas Frente a Streptococcus Mutans*. Universidad de Chile; 2015.
36. P. Y. Reyes. *Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Cobre y Óxido de Cobre y Su Incorporación En Una Matriz Polimérica y El Estudio de Sus Propiedades Antibacterianas*. Centro de Investigación en Química Aplicada; 2012.
37. Javed R, Rais F, Kaleem M, et al. Chitosan capping of CuO nanoparticles: Facile chemical preparation, biological analysis, and applications in dentistry. *Int J Biol Macromol*. 2021;167:1452-1467. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.099

38. Pramanik A, Laha D, Dash SK, et al. An in-vivo study for targeted delivery of copper-organic complex to breast cancer using chitosan polymer nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*. 2016;68:327-337. doi:10.1016/j.msec.2016.05.014
39. W: I: Ricra. *Nanopartículas Metálicas*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
40. A. Carbajal. *Hidratos de Carbono*. Universidad Complutense de Madrid; 2013.
41. O. García. *Síntesis Del Copolímero de Injerto de Estireno Anhídrido Maleico Por NMRP En Quitosano, Usando CO2 Supercrítico Como Medio de Reacción*. Centro de Investigación en Química Aplicada; 2010.
42. N: E: Calderon. *Obtención y Caracterización de Nanopartículas de Quitosano Por El Método de Gelación Iónica*. Universidad nacional de San Agustín; 2015.
43. V. A. Machain. *Desarrollo de Sistemas Biopoliméricos Para Liberación Controlada de Doxorubicina: Elección de La Matriz y Ensayos de Liberación*. Universidad Nacional de La Plata; 2013.
44. P. Mendoza. *Nuevos Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos Con Nanopartículas Magnéticas*. Universidad Complutense; 2017.
45. Elsayed AM, Sherif NM, Hassan NS, Althobaiti F, Hanafy NAN, Sahyon HA. Novel quercetin encapsulated chitosan functionalized copper oxide nanoparticles as anti-breast cancer agent via regulating p53 in rat model. *Int J Biol Macromol*. 2021;185:134-152. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.085
46. Xu D, Li E, Karmakar B, et al. Green preparation of copper nanoparticle-loaded chitosan/alginate bio-composite: Investigation of its cytotoxicity, antioxidant and anti-human breast cancer properties. *Arabian Journal of Chemistry*. 2022;15(3):103638. doi:10.1016/j.arabjc.2021.103638
47. Dubey SK, Bhatt T, Agrawal M, et al. Application of chitosan modified nanocarriers in breast cancer. *Int J Biol Macromol*. 2022;194:521-538. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.11.095
48. Madamsetty VS, Tavakol S, Moghassemi S, et al. Chitosan: A versatile bio-platform for breast cancer theranostics. *Journal of Controlled Release*. 2022;341:733-752. doi:10.1016/j.jconrel.2021.12.012
49. Sathiyavimal S, Vasantharaj S, Kaliannan T, et al. Bio-functionalized copper oxide/chitosan nanocomposite using *Sida cordifolia* and their efficient properties of antibacterial, anticancer activity against on breast and lung cancer cell lines. *Environ Res*. 2023;218:114986. doi:10.1016/j.envres.2022.114986
50. Cudennec Y, Lecerf A. The transformation of Cu(OH)₂ into CuO, revisited. *Solid State Sci*. 2003;5(11-12):1471-1474. doi:10.1016/j.solidstatesciences.2003.09.009

51. Figiela M, Wysocki M, Galinski M, Jesionowski T, Stepniak I. Synthesis and characterization of novel copper oxide-chitosan nanocomposites for non-enzymatic glucose sensing. *Sens Actuators B Chem.* 2018;272:296-307. doi:10.1016/j.snb.2018.05.173
52. Gierszewska M, Ostrowska-Czubenko J. EQUILIBRIUM SWELLING STUDY OF CROSSLINKED CHITOSAN MEMBRANES IN WATER, BUFFER AND SALT SOLUTIONS. *Prog Chem Appl Chitin Deriv.* 2016;21:55-62. doi:10.15259/PCACD.21.05
53. M.C. Jorge Luis Sánchez Orozco. *Síntesis de Nanocompuestos Cerámico-Poliméricos Sensibles a Temperatura y PH Para Su Uso Como Sistemas de Liberación Controlada de Doxorubicina*. Centro de Investigación en Química Aplicada; 2021.
54. Revathi T, Thambidurai S. Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of copper oxide incorporated chitosan-neem seed biocomposites. *Int J Biol Macromol.* 2019;139:867-878. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.214
55. Qu X, Wirsén A, Albertsson AC. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives. *Polymer (Guildf).* 2000;41(13):4841-4847. doi:10.1016/S0032-3861(99)00704-1
56. Singh N, Sallem F, Mirjolet C, et al. Polydopamine Modified Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Multifunctional Nanocarrier for Targeted Prostate Cancer Treatment. *Nanomaterials.* 2019;9(2):138. doi:10.3390/nano9020138
57. Bononi FC, Chen Z, Rocca D, et al. Bathochromic Shift in the UV–Visible Absorption Spectra of Phenols at Ice Surfaces: Insights from First-Principles Calculations. *J Phys Chem A.* 2020;124(44):9288-9298. doi:10.1021/acs.jpca.0c07038
58. Hsueh YH, Tsai PH, Lin KS. pH-Dependent Antimicrobial Properties of Copper Oxide Nanoparticles in *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4):793. doi:10.3390/ijms18040793
59. Betancourt-Galindo R, Reyes-Rodriguez PY, Puente-Urbina BA, et al. Synthesis of Copper Nanoparticles by Thermal Decomposition and Their Antimicrobial Properties. *J Nanomater.* 2014;2014:1-5. doi:10.1155/2014/980545
60. Hongfeng Z, El-Kott A, Ezzat Ahmed A, Khames A. Synthesis of chitosan-stabilized copper nanoparticles (CS-Cu NPs): Its catalytic activity for C-N and C-O cross-coupling reactions and treatment of bladder cancer. *Arabian Journal of Chemistry.* 2021;14(10):103259. doi:10.1016/j.arabjc.2021.103259
61. B. Ruiz. *Evaluación de La Genotoxicidad y Citotoxicidad de Nanopartículas de Plata En Linfocitos Humanos*. Universidad autónoma de baja california; 2020.
62. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front.* 2020;1(3):332-349. doi:10.1002/fft2.44

63. Mukherjee PK. Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs. In: *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. Elsevier; 2019:515-537. doi:10.1016/B978-0-12-813374-3.00013-2
64. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(4):pdb.prot087379. doi:10.1101/pdb.prot087379
65. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTech; 2018. doi:10.5772/intechopen.71923
66. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, et al. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155772. doi:10.1371/journal.pone.0155772
67. C. B. Ojeda. *Caracterización Del Perfil de Sensibilidad de Un Panel de Líneas Celulares Tumoraes Humanas, Para La Valoración Citotóxica in Vitro de Extractos Vegetales y Metabolitos Secundarios, Mediante El Ensayo de Tinción Con Violeta Cristal*. Universidad Técnica Particular de Loja.; 2010.
68. Plikus M V., Wang X, Sinha S, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. 2021;184(15):3852-3872. doi:10.1016/j.cell.2021.06.024
69. El-Sheshtawy HS, Hefni HHH, Aboutaleb WA, Elaasser MM, Mady MF, El-Shiekh HH. Green Synthesis of Chitosan Bio-Nanocomposites and Investigation of their Antimicrobial and Antitumor Effects. *Iran J Sci Technol Trans A Sci*. 2021;45(4):1247-1261. doi:10.1007/s40995-021-01147-8