



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN QUÍMICA APLICADA

Dirección de Posgrado

Con base en el *Artículo 50. Distinciones* del Reglamento vigente del Programa de **MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS**, el Posgrado, otorga a la estudiante:

ARIADNA IRAIS GONZÁLEZ NUÑEZ

DISTINCIÓN POR DESEMPEÑO EN INVESTIGACIÓN

Lo anterior en virtud de haber realizado un trabajo de investigación destacado y una defensa oral sobresaliente durante su Examen de Grado y haber sido así propuesto por el Jurado Calificador del trabajo de tesis titulado:

“Preparación de nanopartículas poliméricas a base de quitosano modificado con ácido fólico y aceites esenciales para su potencial uso como nanoacarreadores de agentes anticancerígenos”

Que fue desarrollado bajo la asesoría de la Dra. Rebeca Betancourt Galindo y el Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz.

La presente distinción se firma en la Ciudad de Saltillo Coahuila, a los 6 días del mes de Septiembre de 2024.

M.C. Gladys de los Santos Villarreal
Dirección de Posgrado



Dr. Claude St. Thomas
Presidente del Jurado Calificador



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CIOQA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN QUÍMICA APLICADA

Saltillo, Coahuila a 9 de septiembre de 2024

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 **ARIADNA IRAIS GONZÁLEZ NÚÑEZ** titulado Preparación de Nanopartículas Poliméricas a Base de Quitosano Modificado con Ácido Fólico y Aceites Esenciales para su Potencial uso como Nanoacarreadores de Agentes Anticancerígenos el cual fue presentado el día 06 de septiembre de 2024, 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

Dr. Claude St. Thomas
Presidente

Dra. María Esther Treviño Martínez
Secretario

Dra. Abril Fonseca García
Vocal

ASESORES

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

Dra. Rebeca Betancourt Galindo



TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: ARIADNA IRAIS GONZÁLEZ NÚÑEZ FIRMA



TITULO: Preparación de Nanopartículas Poliméricas a Base de Quitosano Modificado con Ácido Fólico y Aceites Esenciales para su Potencial uso como Nanoacarreadores de Agentes Anticancerígenos

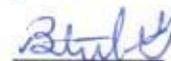
ASESORES: Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

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 06 de Septiembre de 2024


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

**Preparación de Nanopartículas Poliméricas a Base de Quitosano Modificado
con Ácido Fólico y Aceites Esenciales para su Potencial uso como
Nanoacarreadores de Agentes Anticancerígenos**

Presentada por:

ARIADNA IRAIS GONZÁLEZ NÚÑEZ

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

**Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz
Dra. Rebeca Betancourt Galindo**

SINODALES



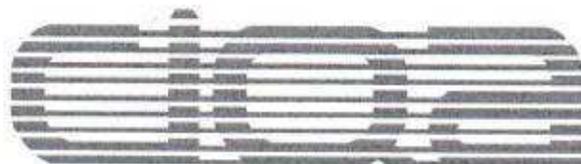
Dr. Claude St. Thomas
Presidente



Dra. María Esther Treviño Martínez
Secretario



Dra. Abril Fonseca García
Vocal



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

TESIS

**Preparación de Nanopartículas Poliméricas a Base de Quitosano Modificado
con Ácido Fólico y Aceites Esenciales para su Potencial uso como
Nanoacarreadores de Agentes Anticancerígenos**

Presentada por:

ARIADNA IRAIS GONZÁLEZ NÚÑEZ

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz
Dra. Rebeca Betancourt Galindo

Saltillo, Coahuila, México.

septiembre, 2024

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 6 de septiembre de 2024.



ARIADNA TRAIS GONZÁLEZ NÚÑEZ

Nombre y Firma

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



TESIS

**PREPARACION DE NANOPARTICULAS POLIMERICAS A
BASE DE QUITOSANO MODIFICADO CON ACIDO FOLICO Y
ACEITES ESENCIALES PARA SU POTENCIAL USO COMO
NANOACARREADORES DE AGENTES ANTICANCERIGENOS.**

MAESTRIA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

Presentado por:

Q.F.B. Ariadna Irais González Núñez

Asesor:

Asesor: Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

Co-asesor: Dra. Rebeca Betancourt Galindo

Departamento:

Procesos de polimerización y materiales avanzados

Saltillo, Coahuila

Septiembre 2024

“Sana a tu modo

Sin prisa sin carrera

Llora, patalea, enójate, sonríe, agradece, no todo puede ser malo

¿Quién dijo que sería fácil? Nadie lo dijo

Cose despacio y lentamente cada pedazo de ti, amalo y mímallo como a un niño pequeño.

Y cuando pienses que no hay futuro para ti, ve en tu presente por lo que vale la pena sonreír”

AIGN

DEDICATORIA

Quiero expresar mi profunda gratitud a **Dios**, quien ha sido mi guía constante en este camino, brindándome ayuda en cada paso, nunca soltándome, y colocando a las personas adecuadas en mi sendero durante esta travesía.

El amor, la dedicación y la paciencia inquebrantables de mis padres han sido fundamentales en este recorrido. Su apoyo diario me alentó a perseverar y concluir este trayecto que iniciamos juntos, una experiencia verdaderamente única.

A mis padres, les agradezco por ser los principales impulsores de mis sueños, por confiar en mí y en mis aspiraciones cada día, por sostenerme en los momentos difíciles y estar a mi lado en todo momento.

A mi hermano, le agradezco por demostrarme que la superación personal es posible cada día y que el futuro siempre puede brillar con esperanza.

A mis abuelos, les doy las gracias por ser una constante fuente de inspiración y amor incondicional. Siempre han creído en mí y han apoyado mis decisiones, incluso en mis momentos más extravagantes.

A mi novio, le agradezco por su constante aliento en este camino, por su sacrificio, amor y dedicación. A pesar de la distancia, hoy puedo afirmar con certeza que juntos hemos superado cualquier obstáculo.

A mis ti@s y prim@s, les agradezco por esas conversaciones reconfortantes cada vez que regresaba a casa, por brindarme su apoyo incondicional y amor sincero.

Finalmente, agradezco tanto los momentos felices como los desafiantes, ya que han contribuido a forjar la persona que soy hoy en día. Sin ellos, mi camino hacia este logro no sería completo.

IN MEMORIAM

En memoria de mi abuelo Juan Núñez Díaz, quien siempre creyó en mí. ¡Se logró!

Su espíritu sigue inspirándome cada día.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa la culminación de dos años de arduo esfuerzo, aprendizaje, dedicación y momentos memorables, durante los cuales recibí el apoyo invaluable de personas e instituciones excepcionales que facilitaron el desarrollo y conclusión de este proyecto.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y CONAHCYT-CIENCIA DE FRONTERA 2023, por proporcionar todas las facilidades y equipos necesarios para la realización de esta tesis (proyecto 6703 y 6725 CF-2023-G-472).

Agradezco profundamente al Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz, mi asesor, por su orientación experta, esfuerzo incansable, colaboración constante, infinita paciencia y liderazgo en este proceso. Sin su invaluable guía, este logro no habría sido posible.

A mis sinodales, el Dr. Claude St Thomas, la Dra. Esther Treviño y la Dra. Abril Fonseca, les agradezco sinceramente por sus valiosas recomendaciones y contribuciones que enriquecieron significativamente este trabajo. Especialmente al Dr. Claude St. Thomas, por su constante apoyo a mi desarrollo profesional y personal.

A la Dra. Julieta Torres González, por su apoyo incondicional para la culminación de esta tesis. Su orientación y compromiso fueron fundamentales para alcanzar este logro.

Expreso un profundo agradecimiento a José Manuel Martínez López de Química Tech CD. Juárez Chihuahua, por su invaluable ayuda en la visualización de las NPs marcadas con marcadores fluorescentes y sus palabras alentadoras.

Al Dr. Roberto Espinosa Neira, mi agradecimiento por sus sabios consejos, conversaciones enriquecedoras, valiosas enseñanzas y por confiar en mí para la realización de mi tesis, así como en los ensayos de citotoxicidad y fluorescencia.

A la QFB. Bertha Puente Urbina, M. en C. Gladis Yakeline Cortez Mazatán, I.Q. Beatriz Elvira Reyes Vielma, M. en C. Myrna Salinas Hernández, Lic. Ma. Guadalupe Méndez Padilla, LSC. Daniel Alejandro Alvarado Medrano y al Lic. Jesús Ángel Cepeda les estoy profundamente agradecida por su constante ayuda y asistencia en las diversas técnicas de laboratorio.

A los doctores Luis Ernesto Elizalde Herrera, Roberto Benavides Cantú, Héctor Ricardo López González y Omar Felipe Fabela Sánchez, mi más sincero agradecimiento por su apoyo continuo y orientación en la aplicación de diversas técnicas para la realización de esta tesis.

A mis amigos, quienes estuvieron siempre a mi lado en los buenos y malos momentos: M. en C. Brayan Quiriarte, M. en C. Maricarmen Damas, M. en C. Manuel Hernández, Dr. Roberto Espinosa, Esp. María del Carmen Macias, Lic. América Álvarez, sus hijos (Juan y Salvador) y su familia, Arleth Carrera, M. en C. Eleazar Damián, M. en C. Luis Rivera y M. en C. Iván Toledo (el compañero). Agradezco su amistad incondicional y los preciosos momentos compartidos a lo largo de estos dos años. En especial a Brayan, Maricarmen, Roberto, Manuel y Arleth, estaré eternamente agradecida con ustedes chicos, de verdad gracias por tantas aventuras, noches de estudio y desvelo, platicas intensas que penetran hasta el alma y cambian el sentido de la vida, por estar en los peores momentos y nunca dejarme caer, por alentarme aun cuando ya no me quería levantar y seguir. Ha terminado este capítulo en nuestras vidas, pero: ¿Qué paso en parras? que todo cambio...

*La ciencia, muchacho, está hecha de errores, pero de errores
útiles de cometer, pues poco a poco, conducen a la verdad.*

-Julio Verne

RESUMEN

En el presente proyecto de investigación, se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de quitosano (NPs de CS) modificado con ácido fólico (FA) (10 y 20 %). Estas NPs fueron cargadas con aceite de menta (AM) y aceite de clavo (AC) debido a sus propiedades terapéuticas antiinflamatorias, antioxidantes y actividad antitumoral, así como metotrexato (MTX) por su capacidad como fármaco anticancerígeno. El objetivo fue desarrollar un sistema de liberación para su uso como sistema de administración de fármacos con potencial actividad anticancerígena, aprovechando la selectividad hacia células cancerosas que sobre expresan receptores de FA.

En la primera etapa, se realizó la modificación del CS con FA bajo diversas condiciones de reacción (DMSO, FA, CS, volumen de ácido acético), obteniendo diferentes porcentajes de modificación. Estos compuestos fueron caracterizados mediante técnicas como la Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Difracción de Rayos X (XRD), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Para la producción de NPs, se trabajó con dos muestras de CS con diferente porcentaje de FA (10 y 20%), variando el porcentaje de Tripolifosfato de Sodio (TPP), seguido de su posterior carga con AM o AC y MTX.

En la tercera etapa, se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad para evaluar la viabilidad en dos líneas celulares (MDA-MB-231 y A-549).

Los resultados mostraron que las NPs de CS modificadas con FA fueron efectivamente sintetizadas. El espectro de FT-IR del CS modificado mostró una banda de amida –CONH en 1640 cm^{-1} y la flexión de –NH en 1570 cm^{-1} , indicando una conjugación exitosa del FA, mientras que en el espectro RMN, se observaron señales características de los protones aromáticos del FA, confirmando la modificación. Los estudios de TGA y DSC revelaron una mayor estabilidad térmica en las NPs modificadas, con una temperatura de descomposición a 289 °C para CS-FA_{20%}.

Finalmente, los estudios de citotoxicidad demostraron que las NPs de CS-FA cargadas con AM y MTX reducen significativamente la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cáncer de pulmón (A-549).

ABSTRACT

In the present research project, the synthesis of chitosan (CS) nanoparticles (NPs) modified with folic acid (FA) (10 and 20%) was carried out. These nanoparticles contain mint essential oil (MA) due to its anti-inflammatory therapeutic properties, antioxidant and antitumor activity, as well as methotrexate (MTX) for its capacity as an anticancer drug. The objective was to develop an MTX loading and release system for use as a drug delivery system with potential anticancer activity, taking advantage of the selectivity towards cancer cells that overexpress folic acid receptors.

In the first stage, the modification of CS with FA was performed under different reaction conditions (DMSO, FA, CS, volume of acetic acid), obtaining different modification percentages. These compounds were characterized by techniques such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), X-Ray Diffraction (XRD), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC).

In the second stage, two percentages of FA modification (10 and 20%) were used for the production of NPs, varying the percentage of Sodium Tripolyphosphate (TPP), followed by subsequent loading with AM and MTX.

In the third stage, cytotoxicity studies were carried out to evaluate cell viability in two cell lines (MDA-MB-231 and A-549).

The results demonstrate that the CS-FA NPs were successfully synthesized. The FT-IR spectrum of the modified CS showed an amide band ($-\text{CONH}$) at 1640 cm^{-1} and an $-\text{NH}$ bending vibration at 1570 cm^{-1} , indicating successful conjugation of FA. In the NMR spectrum, characteristic signals of the aromatic protons of FA were observed, confirming the modification.

TGA and DSC studies revealed enhanced thermal stability in the modified NPs, with a decomposition temperature of $289\text{ }^{\circ}\text{C}$ for CS-FA_{20%}.

Cytotoxicity studies further demonstrated that the CS-FA NPs loaded with AM and MTX significantly reduced cell viability in breast cancer (MDA-MB-231) and lung cancer (A-549) cell lines.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de tablas	13
Índice de figuras	14
Abreviaturas	16
1. Introducción.....	18
2. Antecedentes.....	20
2.1 Cáncer.....	20
2.2 Tratamientos convencionales	20
2.3 Fármacos anticancerígenos.....	22
2.4 Metotrexato y curcumina.....	23
2.5 Aceites esenciales.....	24
2.6 Nanotecnología para la administración de fármacos.....	25
2.6.2 Nps poliméricas.....	27
2.6.3 Nps basadas en polímeros naturales.....	27
2.6.4 Nps de cs	28
2.7 Técnicas de encapsulación.....	30
2.7.1 Gelación iónica.....	31
2.8 Uso del fa contra el cáncer	32
2.9 Nps de cs-fa cargados con fármacos anticancerígenos.....	34
3. Objetivos.....	38
3.1 Objetivo general	38

3.2	Objetivos específicos.....	38
4.	Justificación.....	39
6.	Hipótesis.....	41
7.	Metodología.....	41
7.1	Modificación de cs con fa.....	41
7.2	Preparación de nps de cs-fa	42
7.3	Determinación de la solubilidad del mtx-r&d en ae de menta y clavo.....	42
7.4	Preparación de nps de cs-fa cargadas con ae y mtx.....	43
7.5	Caracterización de nps.....	44
7.6	Estudio de liberación de mtx	44
7.7	Cultivo celular y tratamiento con mtx	45
7.8	Ensayo de viabilidad celular (cristal violeta)	45
7.9	Evaluación de la viabilidad celular inducida por las nps.....	46
8.	Resultados y discusión.	46
8.1	Modificación de cs con fa.....	46
8.1.1	Ft-ir.....	49
8.1.2	Rmn.....	50
8.1.3	Tga.....	51
8.1.4	Dsc.....	53
8.1.5	Xrd.....	54
8.2	Preparación de nps de cs con fa.....	55
8.2.1	Ft-ir.....	59

8.2.2	Sem.....	60
8.3	Preparación de nps de cs-fa cargadas con ae y mtx.....	62
8.3.1	Ft-ir.....	64
8.3.2	Tga.....	65
8.3.3	Dsc.....	66
8.3.4	Xrd.....	68
8.3.5	Sem y distribución de tamaños de partícula.....	69
8.4	Perfiles de liberación	73
8.5	Ensayos de viabilidad celular	74
7.5.1	Ensayo de viabilidad celular mtx (accord y r&d).....	75
7.5.2	Ensayo de viabilidad celular de nps cs-fa 10 y 20% cargadas con am-mtx (r&d).....	78
9.	Conclusión.....	82
10.	Referencias	84
11.	Anexos.....	98
10.1	Tga del am y mtx.....	98
10.2	Equipos utilizados para las diversas caracterizaciones	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diversos tratamientos contra el cáncer.	21
Tabla 2. Clasificación de los principales agentes neoplásicos según su mecanismo de acción ^[10-12]	22
Tabla 3. Compilación de estudios sobre NPs de CS cargadas con AE.	30
Tabla 4. Técnicas de encapsulación de fármacos ^[45,46]	30
Tabla 5. Compilación de reportes sobre NPs de CS-FA cargados con principio activo.	34
Tabla 6. Recopilación de estudios sobre NPs de CS-FA cargadas con extractos como tratamiento contra el cáncer.	37
Tabla 7. Diferentes porcentajes de modificación CS-FA variando diversos parámetros de reacción.	48
Tabla 8. Valores de Dp y potencial Z para NPs de CS-FA preparadas con diferente [TPP] y porcentaje de FA.	57
Tabla 9. Valores de Dp, potencial Z, EE y CC para NPs de CS-FA preparadas con diferente AE, [TPP] y porcentaje de FA.	62
Tabla 10. Concentraciones finales de MTX y porcentaje de DMSO sin Citotoxicidad en las células cancerígenas MDA-MB-231 y A549.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1. Nano acarreadores utilizados contra el cáncer ^[27-30]	25
FIG. 2. Estructura química del CS (unidad repetitiva).	28
FIG. 3. Representación esquemática del mecanismo de preparación de NPs por entrecruzamiento de CS con TPP usando gelación iónica ^[49]	32
FIG. 4. Representación de una NP modificada FA para ocasionar la muerte celular en células cancerosas.	33
FIG. 5. Representación de la modificación de CS con FA	42
FIG. 6. Representación de la reacción de modificación de CS con FA.....	48
FIG. 7. Espectros de FT-IR de CS, FA y CS-FA _{20%}	50
FIG. 8. Espectros de RMN ¹ H de CS (A), FA (B) y CS-FA _{20%} (C)	50
FIG. 9. Curvas de TGA de FA y CS.....	52
FIG. 10. Curvas de TGA del CS-FA con 20, 14 y 5 % de modificación.....	53
FIG. 11. Termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido para FA, CS y CS-FA con diferente contenido de FA.....	54
FIG. 12. XRD difractogramas del CS, FA y CS-FA con diferente porcentaje de modificación (20, 14 y 5 %).	55
FIG. 13. Esquema de la formación de NPs CS-FA.	57
FIG. 14. Unión de los grupos amino del CS con iones hidroxilo debilita la cadena y facilita la formación de enlaces intramoleculares con iones de ácido tripolifosfórico, dando lugar a la formación de NPs ^[86]	58
FIG. 15. Espectros de FT-IR de NPs CS-FA conteniendo 10 y 20% de FA con diferente contenido de TPP: a) 0.5, b) 0.3 y c) 0.2 %.	59
FIG. 16. Micrografía de SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA conteniendo 10% de FA preparadas con TPP al 0.5%.....	61
FIG. 17. Micrografía de SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA _{20%} con TPP al 0.5%.....	61
FIG. 18. Espectros de FT-IR de NPs CS-FA _{10% y 20%} sin (a y c) y con carga de AM (b y d).	65
FIG. 19. Curvas TGA de NPs CS-FA _{10 y 20%} , NPs CS-FA _{10 y 20%} AM y NPs CS-FA _{10 Y 20%} AM-MTX.....	66

FIG. 20. Termogramas de DSC de NPs CS-FA conteniendo 10 (a) y 20% (b) de FA cargadas con AM y AM-MTX.....	67
FIG. 21. Difractogramas de XRD conteniendo 10 (a) y 20% (b) de FA, en diferentes condiciones: sin carga, cargadas con AM, y cargadas con AM-MTX.	69
FIG. 22. Micrografía por SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA 10% AM.....	70
FIG. 23. Micrografía por SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA 20% AM.....	70
FIG. 24. Micrografía por SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA _{10%} AM-MTX.....	72
FIG. 25. Micrografía de SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de las NPs CS-FA _{20%} AM-MTX.....	72
FIG. 26. Citotoxicidad inducida por MTX- R&D Systems en células tumorales de pulmón A-549.	76
FIG. 27. Citotoxicidad inducida por MTX- R&D Systems en células tumorales de mama MDA-MB-231.	77
FIG. 28. Citotoxicidad inducida por MTX-Accord en células tumorales de pulmón A-549.	78
FIG. 29. Citotoxicidad inducida por MTX-Accord en células tumorales de mama MDA-MB-231.	78
FIG. 30. Efecto citotóxico de las NPs CS (a), AM (b), NPs CS-FA ₁₀ y 20% (c y d), NPs CS-FA ₁₀ y 20% AM (e y f) y NPs CS-FA ₁₀ y 20% AM-MTX (g y h). Las gráficas representan la media±SD de al menos 3 experimentos independientes.....	81
FIG. 32. Curvas de TGA de AM y MTX.....	99

ABREVIATURAS

NPs: Nanopartículas

NP: Nanopartícula

CS: CS

FA: FA

AE: Aceite Esencial

AM: Aceite esencial de menta

AC: Aceite esencial de clavo

CS-FA: CS modificado con FA.

MTX: Metotrexato

FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

RMN: Resonancia magnética nuclear

UV-vis: Espectroscopia ultravioleta-visible

TGA: Análisis termogravimétrico

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

XRD: Difracción de Rayos X

DOX: Doxorubicina

T_m: Temperatura de fusión

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer, persistiendo como una de las principales causas de mortalidad global, y continúa desafiando los avances en investigación debido a su complejidad y heterogeneidad ^[1]. Los enfoques terapéuticos convencionales, tales como la quimioterapia y la radioterapia, presentan limitaciones significativas al causar efectos adversos considerables tanto en células sanas como malignas. Esto subraya la necesidad imperiosa de estrategias terapéuticas más eficaces y específicas.

En este contexto, la nanotecnología emerge como una herramienta promisoría para combatir el cáncer. Las nanopartículas poliméricas (NPs), conformadas por polímeros biocompatibles y biodegradables, se investigan como agentes de transporte de fármacos en la terapia oncológica. Estas nanoestructuras pueden potenciar la efectividad terapéutica al dirigir agentes farmacológicos hacia células cancerosas específicas, mientras minimizan la toxicidad para las células sanas ^[2].

El quitosano (CS), un polisacárido derivado de la quitina presente en el exoesqueleto de crustáceos y otros organismos, ha destacado como material para la síntesis de NPs debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. La modificación del CS con ácido fólico (FA) ha emergido como una estrategia prometedora para la entrega selectiva de fármacos a células tumorales.

El FA, nutriente esencial para la síntesis de ADN y la división celular, exhibe una mayor demanda en células cancerosas en comparación con células normales, lo que las hace más susceptibles a agentes terapéuticos que se unen a este nutriente ^[3]. Por tanto, la conjugación de FA con CS puede incrementar la selectividad de las NPs hacia células cancerosas, mejorando la eficacia del tratamiento y reduciendo los efectos secundarios.

El metotrexato (MTX), un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo leucemias, linfomas y tumores sólidos, actúa como un antimetabolito al interferir con la vía del FA. Inhibe la enzima dihidrofolato reductasa y bloquea así la síntesis de nucleótidos de purina, lo que conduce a la interrupción del ciclo celular y la inducción de apoptosis en las células tumorales ^[4].

La conjugación del FA con NPs de CS en el contexto del transporte del MTX presenta una doble ventaja terapéutica. Por un lado, la selectividad de las NPs hacia las células cancerosas se ve potenciada gracias a la afinidad del FA por los receptores de membrana sobre expresados en estas células. Por otro lado, esta estrategia puede contribuir a reducir la toxicidad del metotrexato en las células sanas al dirigir de manera más específica el fármaco hacia las células malignas.

Además, los aceites esenciales (AE) como el aceite de menta (AM) y aceite de clavo (AC), son compuestos volátiles con propiedades aromáticas, han sido investigados por sus efectos antitumorales, presentando un potencial terapéutico en la lucha contra el cáncer ^[5].

En este estudio, se propone encapsular aceites esenciales de menta y clavo junto con el metotrexato en NPs CS-FA. Se probará su actividad citotóxica *in vitro* para determinar la viabilidad celular de las NPs en dos líneas celulares: MDA-MB-231 y A-549. Se anticipa que estas nanoestructuras permitirán una liberación controlada de los agentes terapéuticos, facilitando una distribución sostenida y prolongada del fármaco, lo que las posiciona como una plataforma promisoriosa para la entrega selectiva de agentes anticancerígenos a células tumorales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El término "cáncer" fue acuñado por primera vez en la época de Hipócrates, considerado el padre de la medicina, para describir un grupo de enfermedades que resultan en un crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo ^[6]. Estas células anormales inician un proceso de división y proliferación no controlada, formando una masa de tejido que no es propia del organismo o modificando la morfología de un órgano. A medida que esto ocurre, pueden invadir y dañar tejidos u órganos, y posteriormente propagarse a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o la linfa. A este proceso se le conoce como metástasis ^[103]. Existen diferentes tipos de cáncer, cada uno caracterizado por la rama celular que se vuelve cancerosa y el órgano o tejido donde se origina, como el cáncer de páncreas, de mama, de pulmón, de colon, entre otros ^[7,8].

Esta enfermedad puede afectar a personas de todas las edades, aunque el riesgo aumenta con la edad. Las causas del cáncer son diversas e incluyen factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. Algunos factores de riesgo conocidos para el cáncer son el tabaquismo, la exposición a sustancias químicas y radiación, una dieta poco saludable y la falta de actividad física.

Los síntomas del cáncer pueden variar según el tipo y la etapa en la que se encuentre. Algunos síntomas comunes incluyen fatiga, pérdida de peso inexplicable, fiebre, dolor persistente, cambios en la piel, tos persistente y dificultad para tragar. Sin embargo, es importante tener en cuenta que muchas personas con cáncer no experimentan ningún síntoma en las primeras etapas de la enfermedad. Además, cabe recalcar que, a pesar de los avances en la investigación y el tratamiento, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo ^[8].

2.2 Tratamientos convencionales

El tratamiento del cáncer se determina según el tipo de cáncer, la etapa de la enfermedad y salud general del paciente. Los tratamientos comunes para el cáncer, según el International Agency for Research on Cancer (IARC) y el National Cancer Institute (NCI), incluyen la cirugía, radioterapia, terapia hormonal y quimioterapia, entre otros. En los últimos años, se

han desarrollado nuevos tratamientos para el cáncer, como la terapia dirigida e inmunoterapia, que se enfocan en la identificación y el ataque de células cancerosas específicas. La Tabla 1 presenta los principales tratamientos convencionales contra el cáncer, así como sus ventajas y desventajas como método terapéutico [113].

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diversos tratamientos contra el cáncer.

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
<p>- Cirugía: Consiste en la extirpación del tumor y del tejido circundante.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cura algunos tipos de cáncer. - Reduce el tamaño del tumor y alivia los síntomas en estados avanzados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Complicaciones debido a la cirugía (infecciones, sangrado y daño a órganos cercanos). - No es efectivo para el cáncer que se ha diseminado a otras partes del cuerpo. - Dificultad en la extirpación de tumores debido a su ubicación o tamaño.
<p>- Radioterapia: Utiliza radiación de alta energía para destruir + las células cancerosas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cura algunos tipos de cáncer en estadios tempranos. - Reduce el tamaño del tumor y alivia síntomas en estadios avanzados. - Uso en combinación con otros tratamientos (cirugía y quimioterapia). 	<ul style="list-style-type: none"> - Efectos secundarios a corto y largo plazo. - Puede dañar tejidos y órganos cercanos. - No es efectivo en metástasis.
<p>- Quimioterapia: Utiliza medicamentos para destruir las células cancerosas por vía intravenosa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cura algunos tipos de cáncer en etapa temprana. - Reduce el tamaño del tumor. - Uso en combinación con otros tratamientos (cirugía y radioterapia). 	<ul style="list-style-type: none"> - Efectos secundarios a corto y largo plazo (nauseas, problemas de memoria). - Daña células sanas. - No es efectivo en metástasis.
<p>- Terapia dirigida Medicamentos que atacan a células cancerosas específicas, como aquellas que tienen ciertas proteínas en su superficie.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Más efectiva que la quimioterapia. - Menos efectos secundarios. 	<ul style="list-style-type: none"> - Costosa. - Efectos secundarios. - No efectiva para todos los tipos de cáncer.
<p>- Inmunoterapia: Tratamiento que estimula el sistema inmunológico del cuerpo para que ataque las células cancerosas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Menos efectos secundarios. - Efectiva para algunos tipos de cáncer que son difíciles de tratar con otros tratamientos. - Efecto duradero. 	<ul style="list-style-type: none"> - Costosa. - Efectos secundarios (fatiga, fiebre). - No efectiva para todos los tipos de cáncer.
<p>- Terapia hormonal: Bloquea la producción o los efectos de ciertas hormonas que hacen que las células cancerosas crezcan.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Efectiva en cáncer hormonal (mama, próstata). - Reduce el tamaño del tumor. - Administrada en forma de píldoras, inyecciones o implantes. - Menos efectos secundarios que otros tratamientos. 	<ul style="list-style-type: none"> - No es efectiva en cánceres que no dependen de hormonas. - Efectos secundarios (cambios de humor, sofocos). - Causa cambios en el nivel hormonal.

Es importante mencionar que cada tipo de tratamiento puede tener diferentes efectos secundarios dependiendo de cada paciente.

2.3 Fármacos anticancerígenos

Los fármacos anticancerígenos, también llamados antineoplásicos (que previenen la formación de neoplasias, es decir, proliferaciones que pueden volverse cancerosas), son agentes terapéuticos fundamentales en el tratamiento del cáncer. Tradicionalmente, su descubrimiento involucraba pruebas a gran escala de sustancias químicas sintéticas y productos naturales en modelos animales con tumores de rápida proliferación, principalmente leucemias murinas (Chabner y Roberts, 2005) [9]. Estos fármacos pueden administrarse por vía oral o intravenosa y tienen como objetivo específico las células cancerosas, ya sea destruyéndolas o deteniendo su crecimiento. Existen diversas clases de fármacos anticancerígenos, cada uno con un mecanismo de acción particular en el organismo. La Tabla 2 presenta una clasificación de estos fármacos, junto con ejemplos representativos. La práctica de los antineoplásicos en oncología ha experimentado cambios significativos en las últimas cuatro décadas, gracias a la identificación de tratamientos efectivos para varias enfermedades malignas que anteriormente eran consideradas incurables.

Tabla 2. Clasificación de los principales agentes neoplásicos según su mecanismo de acción [10-12].

Clasificación	Fármaco	Uso	Referencia
- Agentes Alquilantes: Unión cruzada con los haces de ADN.	- Carmustine - Melfalan	- Tumores cerebrales, enfermedad de Hodgkin, y Mieloma múltiple. - Cáncer de ovario y mama.	[10]
- Antimetabolitos: Interfieren en la construcción de las cadenas de ADN durante su síntesis.	- Gemcitabina - Metotrexato	- Cáncer de páncreas, mama, cabeza y cuello. - <u>Cáncer de mama, cabeza, cuello, vejiga y colorrectal.</u>	[11]
- Antibióticos antitumorales: Interfieren mediante un ADN intercalado, insertándose entre pares de bases de ADN impidiendo de este modo su replicación y la producción, por tanto, de ARNm o ambos.	- Bleomicina - Doxorrubicina	- Cáncer de cabeza y cuello. - Cáncer de mama, ovario, vejiga, próstata, páncreas, y endometrio.	[10]

- Agentes de huso mitocondrial	- Vinblastina - Paclitaxel	- Cáncer testicular, mama, útero y vejiga. - Cáncer de ovario, mama, próstata, vejiga, estómago y páncreas.	[11]
- Inhibidores de la topoisomerasa	- Etopósido - Irinotecán	- Cáncer gástrico, vesical, uterino y ovario. - Cáncer colorrectal metastásico, mama, y ovario.	[12]
Se unen a las proteínas micro tubulares e inhiben el ensamblaje de los microtúbulos (fase M del ciclo celular), de este modo inhibiendo la continuación en la producción celular.	Inhiben a las topoisomerasas 1 y 2 provocando rotura en sus cadenas y con ello la muerte celular.		

2.4 Metotrexato y curcumina

El metotrexato (MTX) es un fármaco ampliamente empleado en el tratamiento oncológico, así como en la terapia contra la artritis reumatoide y la psoriasis, como se ha mencionado previamente. Su mecanismo de acción radica en la inhibición de la síntesis de FA en las células, proceso crucial para la división celular. El MTX penetra en las células mediante el transportador de folato reducido, utilizando una vía endocítica activada por un receptor específico de folato, lo que en última instancia culmina en la supresión de la síntesis de ADN [114].

La curcumina es un polifenol natural derivado de la raíz de la planta *Curcuma longa*, ampliamente conocida por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. A lo largo de los años, la curcumina ha captado el interés científico debido a su capacidad para modular múltiples vías moleculares involucradas en la proliferación celular, apoptosis y angiogénesis, lo que la convierte en un candidato prometedor en la terapia contra el cáncer. Además, la curcumina ha demostrado una baja toxicidad en las células normales, lo que incrementa su atractivo como agente terapéutico. Su mecanismo de acción incluye la inhibición de factores de transcripción como NF- κ B, la regulación de citoquinas inflamatorias y la interferencia en las vías de señalización celular involucradas en la supervivencia de las células cancerosas [115-117].

En lo que respecta a la combinación de MTX y curcumina, varios estudios han investigado su posible sinergia en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, una investigación publicada en 2016 por Pimentel y colaboradores demostró que la combinación de MTX y curcumina generaba efectos sinérgicos en la inhibición del crecimiento de las células REH, una línea celular característica de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B ^[13]. Otro estudio, Xu, T. y colaboradores destacó las prometedoras propiedades de la curcumina en la prevención y tratamiento de la resistencia multidroga en diferentes tipos de cáncer ^[14]. Un estudio más reciente, llevado a cabo por Rudnik, L. y colaboradores, evidenció que la curcumina podía potenciar la eficacia del MTX en la línea celular de cáncer de pulmón Calu-3. Sus hallazgos sugieren que las nanocápsulas co-cargadas con curcumina y MTX podrían constituir una novedosa estrategia terapéutica para abordar el cáncer de pulmón de células no pequeñas ^[15].

2.5 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son compuestos aromáticos naturales presentes en las plantas, obtenidos mediante procesos de destilación o extracción. Estos compuestos están constituidos por una amplia variedad de moléculas orgánicas, tales como terpenos, alcoholes, aldehídos y ésteres, que les confieren propiedades terapéuticas y aromáticas. Durante siglos, los aceites esenciales han sido empleados en la medicina tradicional para tratar diversas dolencias. En la actualidad, se utilizan extensamente en la aromaterapia, una modalidad terapéutica alternativa que aprovecha los aromas de los aceites esenciales para mejorar la salud física y emocional ^[16].

Además de su aplicación en la aromaterapia, algunos AE han sido objeto de estudio por sus potenciales propiedades terapéuticas. Se ha comprobado que ciertos aceites esenciales poseen efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes y analgésicos, entre otros. Asimismo, se ha investigado su potencial para tratar una variedad de afecciones, como dolor, ansiedad, depresión, náuseas, insomnio y enfermedades de la piel ^[17,18].

En lo que respecta al cáncer, investigaciones han demostrado que ciertos AE podrían exhibir efectos anticancerígenos en células cancerosas. El AE de menta, derivado de la planta de menta, ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional debido a sus reconocidas propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antimicrobianas. Se ha evidenciado su

capacidad anticancerígena en células de cáncer de mama, próstata y pulmón ^[19]. De manera similar, el AE de clavo, extraído de los brotes secos de la flor del árbol de clavo, ha sido empleado durante siglos en la medicina tradicional por sus propiedades similares a las del AE de menta. Se ha constatado su potencial anticancerígeno en células de cáncer de próstata, hígado, colon y pulmón ^[20].

2.6 Nanotecnología para la administración de fármacos

La nanotecnología ha emergido como una herramienta prometedora en el ámbito de la administración de fármacos, posibilitando una liberación precisa y controlada de los agentes terapéuticos en el sitio de acción, lo cual puede mejorar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios asociados. En este contexto, diversos nanomateriales, como los nanotubos de carbono, las NPs poliméricas y los liposomas, se han empleado como sistemas de liberación de fármacos en el tratamiento del cáncer. Adicionalmente, estos nanomateriales pueden ser funcionalizados con ligandos específicos para dirigirse selectivamente a las células cancerosas, incrementando así la eficacia terapéutica ^[22]. En la Figura 1 se aprecia la evolución de la nanotecnología en el ámbito del cáncer a lo largo del tiempo.

FIG. 1. Nano acarreadores utilizados contra el cáncer ^[27-30].

Los métodos basados en la nanotecnología para la administración de fármacos se fundamentan en la utilización de nanoacarreadores con el propósito de mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad de los agentes terapéuticos, así como de reducir los efectos secundarios

sistémicos ^[21]. Los nanoacarreadores pueden ser clasificados en tres categorías principales: lipídicos, poliméricos e inorgánicos ^[22].

- Los nanoacarreadores lipídicos son partículas de lípidos diseñadas para encapsular fármacos antineoplásicos ^[23].
- Los nanoacarreadores poliméricos emplean polímeros sintéticos y naturales para encapsular los agentes terapéuticos ^[23].
- Los nanoacarreadores inorgánicos se basan en el empleo de materiales inorgánicos, como oro y hierro, para encapsular los fármacos ^[23].

La nanotecnología también ofrece nuevas estrategias para la administración local de fármacos antineoplásicos ^[24]. Un reciente estudio publicado en 2018 por Hossen, S. y colaboradores proporciona una revisión exhaustiva de los Sistemas Inteligentes de Administración de Fármacos (SDDs, por sus siglas en inglés), para la liberación de agentes antineoplásicos. En este estudio se describen distintos tipos de nanotransportadores y NPs utilizadas en la liberación de fármacos, abordando NPs lipídicas, poliméricas y de oro. Además, se discuten los desafíos y perspectivas que enfrenta la administración de fármacos en el campo de los SDDs contra el cáncer ^[25].

Moukhtari et al., 2021 detallaron el empleo de nanomedicina de lípidos orales en el tratamiento del cáncer. Los autores examinan a fondo el desarrollo histórico de las NPs lipídicas y su potencial para mejorar la eficacia terapéutica y reducir los costos en comparación con las formas convencionales de administración de fármacos, como la infusión intravenosa y la administración oral común ^[26].

2.6.1 NPs sintéticas

La nanotecnología abre nuevas perspectivas en el desarrollo de NPs sintéticas destinadas a la administración de fármacos antineoplásicos ^[31]. Estas NPs sintéticas presentan características específicas que las convierten en sistemas eficaces de liberación de fármacos, lo que potencialmente mejora la eficacia del tratamiento y reduce los efectos secundarios sistémicos. Entre los diversos tipos de NPs sintéticas se encuentran las de oro, plata, hierro, óxido de hierro, sílice, entre otras. Estas pueden ser diseñadas con una carga de fármaco

particular y una superficie modificada para optimizar la selectividad en la entrega de medicamentos. Además, la síntesis de estas NPs se puede llevar a cabo mediante diversos métodos, como la síntesis química, precipitación, emulsificación, evaporación y electro hidrodinámica. Dichos métodos permiten controlar el tamaño, la forma y la estabilidad de las NPs sintéticas [32].

2.6.2 NPs poliméricas

Las NPs poliméricas constituyen sistemas nanoestructurados empleados para la administración de fármacos, debido a su capacidad para mejorar la solubilidad, biodisponibilidad y eficacia terapéutica de los mismos [33]. Estas partículas se componen de un núcleo sólido o líquido rodeado por una capa polimérica, que puede ser diseñada para liberar el fármaco de manera controlada y específica. Además, las NPs poliméricas tienen la capacidad de mejorar la distribución de los fármacos en el cuerpo, ya que pueden acumularse selectivamente en tumores debido al efecto de Permeabilidad y Retención Mejoradas (EPR, por sus siglas en inglés). Asimismo, pueden ser funcionalizadas con ligandos específicos para una entrega dirigida y selectiva a las células cancerosas [34].

Para la síntesis de estas NPs se han utilizado diversos tipos de polímeros, como el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA, por sus siglas en inglés), el polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés), el CS, los poliésteres y los poliuretanos, entre otros. Cada tipo de polímero presenta ventajas y desventajas particulares en términos de estabilidad, biodegradabilidad, capacidad de carga de fármacos y toxicidad [35]. Algunas de las aplicaciones de las NPs poliméricas en el tratamiento del cáncer incluyen la administración de fármacos quimioterapéuticos, la terapia génica e inmunoterapia.

2.6.3 NPs basadas en polímeros naturales

Las NPs basadas en polímeros naturales emergen como una alternativa prometedora para la administración de fármacos, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y bajo costo. Estas NPs pueden ser sintetizadas a partir de polímeros naturales como el CS, ácido hialurónico, gelatina, entre otros.

Por ejemplo, el CS es un polisacárido natural derivado de la quitina, presente en los exoesqueletos de crustáceos, que se ha empleado en la síntesis de NPs para la administración

de fármacos debido a su capacidad para formar complejos con diversos agentes terapéuticos. Además, se ha constatado que las NPs de CS poseen propiedades antibacterianas y pueden mejorar la biodisponibilidad y eficacia de los fármacos antineoplásicos [36].

Otro ejemplo de polímero natural utilizado en la síntesis de NPs es el ácido hialurónico, un polisacárido presente en varios tejidos humanos. Las NPs de ácido hialurónico han sido empleadas en la administración de fármacos debido a su capacidad para interactuar con receptores específicos presentes en la superficie de las células tumorales, lo que facilita una mayor selectividad en la entrega de fármacos [37].

La gelatina, una proteína de origen animal, también ha sido utilizada en la síntesis de NPs para la administración de fármacos. Las NPs de gelatina pueden ser modificadas para albergar una carga específica de fármaco y mejorar la biodisponibilidad y selectividad en la entrega de agentes terapéuticos [38].

2.6.4 NPs de CS

Como se mencionó anteriormente, las NPs de CS representan una forma común de NPs poliméricas empleadas extensivamente como sistemas de administración de fármacos debido a sus propiedades singulares, como la biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad. En la Figura 2, se muestra su estructura química compuesta por monómeros de D-Glucosamina, unidos por enlaces β -(1-4)-2-deoxi-D-glucopiranosos (unidades desacetiladas), junto con pequeños residuos o no de N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas) [39].

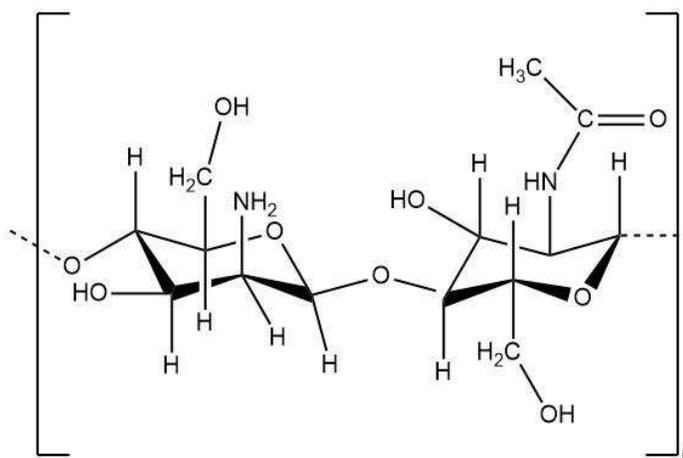


FIG. 2. Estructura química del CS (unidad repetitiva).

El grupo amino del CS se ioniza fácilmente en condiciones ácidas y neutras, generando una carga neta positiva. Esta característica hace que el CS sea soluble en agua y actúe como un bioadhesivo, ya que, una vez ionizado, puede unirse a las mucoproteínas que tienen carga negativa. Esta interacción prolonga el tiempo de permanencia de los medicamentos unidos a CS en la circulación sanguínea, lo que incrementa la biodisponibilidad del fármaco [22]. Debido a estas propiedades biológicas, el CS se utiliza ampliamente en la industria alimentaria, cosmética y médica.

Las NPs de CS pueden sintetizarse mediante diversos métodos, como la coacervación, emulsificación, gelificación iónica y microemulsión. Estas NPs pueden diseñarse para albergar una carga de fármaco específica y tener una superficie modificada para mejorar la selectividad en la entrega de fármacos [39].

En la literatura científica, abundan los estudios sobre el uso de NPs de CS para la administración de fármacos. Por ejemplo, Rostami Elham y col. (2021) realizó una clasificación de las NPs de CS, analizando sus tipos (anticuerpos, CS conjugado sensible al pH y magnético) para la entrega de fármacos [39]. Asimismo, Pacheco y colaboradores (2020) llevaron a cabo una revisión sobre las NPs de CS para la administración de fármacos en el cerebro, donde el CS destaca por su falta de toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades mucoadhesivas [40]. Por otro lado, Jain A. y colaboradores (2014) estudiaron las NPs de CS cargadas con docetaxel, las cuales demostraron una mayor eficacia anticancerígena en comparación con el docetaxel libre [41]. Además, las NPs de CS mostraron una mayor capacidad para reducir la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama y de colon.

Finalmente, Shetta y colaboradores (2019) sintetizaron NPs de CS por gelación iónica con AE de menta y AE de té verde. Concluyeron que las NPs con AE de té verde exhibieron mayor actividad antibacteriana y antioxidante frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en comparación con las NPs de AE de menta. La Tabla 3 proporciona más detalles sobre estudios relacionados con este tema [42].

Tabla 3. Compilación de estudios sobre NPs de CS cargadas con AE.

Nanopartícula	Aceite esencial (EO)	Método de obtención	Resumen	Referencia
CS	EO de Aegle marmelos	Gelación iónica	El EO cargado en CS dañó a las células de A549 (cáncer de pulmón) con células necróticas altas, condensación de cromatina y disminución de la división celular. Por lo tanto, todos los resultados de los experimentos in vitro indicaron claramente que los aceites esenciales cargados de CS son una opción alternativa más eficiente para inhibir las células cancerosas de A549.	2023 [43]
CS	EO de Zataria multiflora	Gelación iónica	Se realizaron estudios de las NPs en células de melanoma humano (A-375) y células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-468). Los resultados mostraron que las NPs de CS cargadas con el EO podrían considerarse para estudios previos in vivo o de medicina complementaria.	2022 [44]

2.7 Técnicas de encapsulación

Las técnicas de encapsulación son fundamentales en la nanotecnología para lograr una entrega eficaz de fármacos y otros compuestos bioactivos. Existen diversas técnicas disponibles, como la encapsulación en matriz polimérica, por emulsificación, precipitación, deshidratación, liofilización, entre otras. En la Tabla 4 se detallan las principales técnicas de encapsulación junto con sus características distintivas.

Tabla 4. Técnicas de encapsulación de fármacos ^[45,46].

Tipo de encapsulación	Características	Referencia
Matriz polimérica	El fármaco se dispersa en una solución polimérica y luego se forma una matriz sólida mediante la evaporación del solvente o la polimerización. Este método permite la liberación controlada del fármaco y la protección del fármaco contra la degradación enzimática y la eliminación del cuerpo.	[46]
Emulsificación	Los compuestos bioactivos se dispersan en una fase acuosa y se emulsionan con una fase orgánica que contiene un surfactante y el polímero. Luego, se forma una emulsión por medio de agitación y se elimina el disolvente orgánico para obtener NPs encapsuladas.	[46]
Precipitación	Se precipitan los compuestos bioactivos dentro de una solución polimérica en un disolvente no miscible. Esta técnica se utiliza comúnmente para encapsular compuestos hidrofóbicos en NPs poliméricas.	[46]

Deshidratación	Los compuestos bioactivos se mezclan con una solución de hidrogel y se liofilizan para eliminar el agua. Esto crea una matriz sólida que contiene el compuesto bioactivo.	[46]
Liofilización	En esta técnica de nanoencapsulación, los compuestos bioactivos se disuelven o dispersan homogéneamente en una solución polimérica adecuada. Esta mezcla se congela rápidamente para solidificar tanto el polímero como el compuesto activo, formando una matriz sólida uniforme. Posteriormente, el material congelado se somete a un proceso de liofilización, donde el solvente (generalmente agua) se elimina mediante sublimación bajo condiciones de baja temperatura y presión reducida. Este proceso da lugar a la formación de nanopartículas sólidas en las que el compuesto bioactivo queda encapsulado dentro de una matriz polimérica, protegiéndolo y mejorando su estabilidad y biodisponibilidad.	[46]
Gelación iónica	Implica la preparación de una solución de polímero y una solución de agente de reticulación (generalmente un ion divalente) en agua u otro disolvente. Cuando se mezclan, se produce una reacción de reticulación que forma partículas poliméricas sólidas.	[45]

2.7.1 Gelación iónica

La gelación iónica es una técnica de encapsulación que se basa en la formación de geles mediante la interacción entre iones cargados de una solución y polímeros iónicos, como el CS o el alginato ^[47]. El proceso de gelificación iónica se realiza mediante la formación de complejos entre polímeros iónicos y iones cargados presentes en una solución. Estos complejos se pueden generar al agregar soluciones de polímero iónico y soluciones de iones cargados en diferentes órdenes y proporciones, lo que permite un control sobre la estructura y las propiedades del gel resultante. En este contexto, la Figura 3 presenta un esquema detallado de la interacción del CS con el agente entrecruzante TPP ejemplificando la formación de dichos complejos.

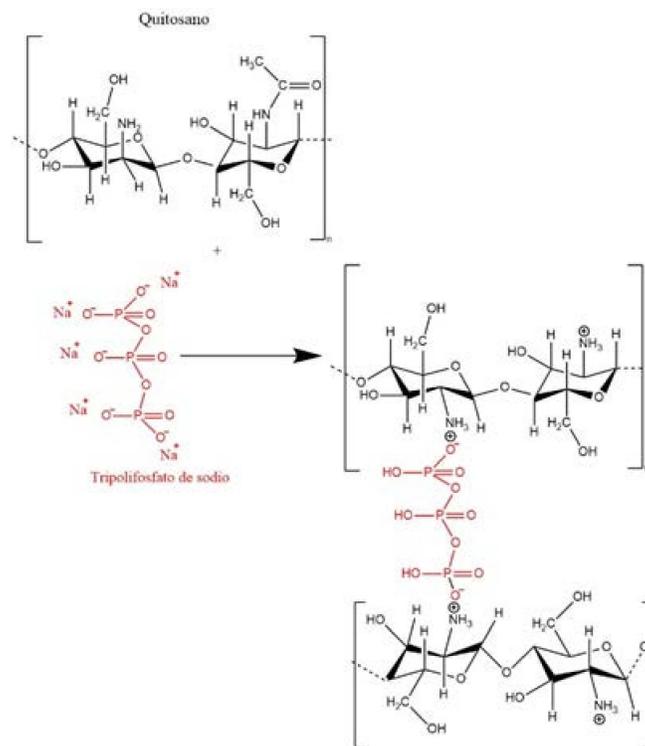


FIG. 3. Representación esquemática del mecanismo de preparación de NPs por entrecruzamiento de CS con TPP usando gelación iónica [49].

2.8 Uso del FA contra el cáncer

El FA, una vitamina del complejo B (B9), ha sido extensamente investigado como un ligando para dirigir células cancerosas, debido a su alta afinidad por el receptor de folato (FR) que está sobre expresado en muchas células cancerosas. La utilización de FA como ligando para vehículos de liberación de fármacos ha demostrado mejorar la eficacia terapéutica de los agentes quimioterapéuticos [49, 50].

En la figura 4 se observa cómo las NPs son modificadas superficialmente con FA, y luego, se carga el fármaco, el cual circula por el torrente sanguíneo hasta alcanzar una célula cancerosa, donde se internaliza por endocitosis al citoplasma. Posteriormente, dentro del citoplasma, el fármaco y AE se libera activado por el pH del medio, teniendo dos vías principales para inducir la muerte celular en la célula cancerígena: internalización hacia el núcleo o bloqueo de los microtúbulos, provocando así apoptosis.

Varios estudios han empleado FA como ligando en diferentes sistemas de liberación de fármacos para mejorar la eficacia en el tratamiento del cáncer. En uno de ellos, se prepararon NPs de CS recubiertas con FA para administrar doxorubicina (DOX) y evaluar su especificidad de direccionamiento en células tumorales, resultando en una mayor internalización celular en comparación con las NPs sin recubrimiento [51]. En otro estudio, se utilizaron CS-FA cargadas con pirrolidineditiocarbamato (PDTC, por sus siglas en inglés) y DOX, observándose que esta combinación supera la resistencia al fármaco de DOX, sugiriendo implicaciones clínicas contra el cáncer de hígado [52].

El término "targeting" se refiere a la capacidad de una sustancia (como un fármaco) de dirigirse específicamente a ciertas células o tejidos en el cuerpo. En el contexto del uso de FA como ligando para dirigir los fármacos hacia las células cancerosas, se aprovecha su capacidad de unirse a los receptores de folato sobre expresados en muchas células de este tipo, lo que permite la entrega específica del fármaco a las células tumorales y reduce la toxicidad del fármaco hacia las células sanas.

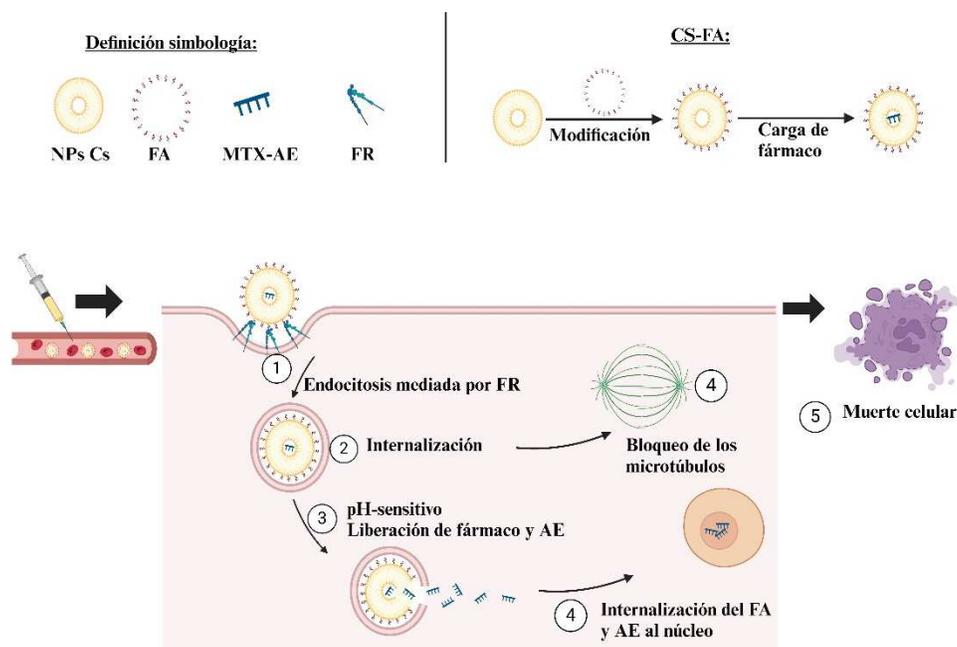


FIG. 4. Representación de una NP modificada FA para ocasionar la muerte celular en células cancerosas.

2.9 NPs de CS-FA cargados con fármacos anticancerígenos.

Las NPs de CS-FA cargadas con fármacos anticancerígenos representan sistemas de liberación de medicamentos prometedores en la lucha contra el cáncer, debido a su capacidad de selectividad y especificidad hacia las células cancerosas, así como a su capacidad para reducir la toxicidad sistémica de los fármacos [53].

A continuación, en la Tabla 5 se presenta una recopilación de estudios previamente reportados sobre NPs de CS-FA cargadas con fármacos anticancerígenos.

Tabla 5. Compilación de reportes sobre NPs de CS-FA cargados con principio activo.

Nanopartícula	Fármaco/Carga	Método de obtención	Resumen	Referencia
CS modificado con FA	Acido 5-aminolevulínico (5-ALA)	Gelación iónica	Los resultados mostraron que las líneas celulares HT29 y Caco-2 pueden absorber las NPs más fácilmente después de un período de absorción a corto plazo y sufren acumulación de PpIX (Protoporfirina IX). Por lo tanto, el conjugado de FA-CS parece ser un vector ideal para la administración colorrectal específica de 5-ALA para la detección endoscópica fluorescente.	2010 [55]
CS modificado con FA	Doxorrubicina (DOX)	Interacción electrostática	Se evaluó su especificidad de direccionamiento en células tumorales, marcadas con rodamina B. Las células cancerosas SMMC-7221 (cáncer de hígado) tratadas con estas NPs mostraron una capacidad de captación celular mucho mayor debido a la conocida endocitosis mediada por el receptor de folato, por lo tanto, proporcionan una forma	2013 [51]

potencial de mejorar el uso del fármaco.

CS modificado con FA	MTX	Atomización por electro pulverización coaxial	En este estudio se utilizó el diseño Box-Behnken para seleccionar 15 lotes de experimentos al azar de FA/CS y llevarlos en práctica. Finalmente demostraron que sus resultados sobre NPs de FACS-MTX eran activas contra las células de cáncer de cuello uterino epitelial humano (HeLa).	2017 [57]
GNRs modificado con TGA y encapsulados con COS, posteriormente modificado con FA -COS: Oligosacárido de CS -GNRs: Nano varillas de oro. -TGA: ácido ti glicólico (unirse a los GNRs)	Doxorrubicina (DOX)	Gelación iónica	Este estudio desarrolló un sistema de administración de fármacos para la terapia quimio foto térmica, en la región del infrarrojo cercano (NIR), para matar células tumorales. Los resultados presentados indican que bajo presencia de irradiación laser se extirparon los tumores y no recurrieron, mostrando que es una excelente terapia de combinación de tumores.	2013 [58]
CS/FA + antioxidantes	Resveratrol, genisteína y curcumina	Solución acuosa	La encapsulación de poli fenoles mejora la biodisponibilidad de estos micronutrientes en solución. La estabilidad y eficacia de carga de conjugados de poli fenol-polímero aumentó a medida que aumentaba el tamaño de las NPs CS-FA, de igual	2021 [59]

modo la encapsulación de poli fenoles altera la morfología del polímero. Cabe destacar que los nano portadores de FA-CS pueden entregar poli fenoles y mejorar la biodisponibilidad de estos micronutrientes dietéticos.

CS modificado con FA	5-fluorouracilo (5FU)	Gelación iónica	Se prepararon con éxito las NPs modificadas con FA y sin FA, lo cual demostró que las NPs con FA aumento el porcentaje de celular cancerígenas muertas de colon (Caco2) en comparación con las no modificadas.	2022 [60]
-----------------------------	-----------------------	-----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2.10 NPs de CS-FA cargadas con AE empleadas en el tratamiento de cáncer

El CS se utiliza como agente de carga, mientras que el FA actúa como un ligando de direccionamiento específico para las células cancerosas. Los AE, como el de orégano, poseen propiedades anticancerígenas y pueden ser encapsulados en NPs de CS-FA para mejorar su eficacia terapéutica. Diversos estudios han demostrado que estos nano complejos pueden reducir significativamente la viabilidad celular en distintas líneas celulares de cáncer, incluyendo cáncer de próstata y de mama.

Por ejemplo, Kalepu y colaboradores (2015) sintetizaron NPs por precipitación iónica de CS modificadas con FA, cargadas con AE de orégano ^[61]. Demostraron que estas NPs reducen significativamente la viabilidad celular en células de cáncer de próstata. En un estudio más reciente, Alirezaei y colaboradores (2022) sintetizaron NPs por evaporación de disolvente de emulsión simple de PLGA y CS modificadas con FA, cargadas con AE de Artemisia (AVEO) ^[62]. Estas NPs no mostraron toxicidad sobre células normales, pero sí sobre células de cáncer de colon, lo cual las convierte en candidatas prometedoras para futuros estudios en el tratamiento del cáncer. Además, se observaron efectos apoptóticos (muerte celular) y anti angiogénicos (reducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos).

En el mismo año, Moe San y colaboradores sintetizaron NPs de CS y alginato modificadas con FA por gelación iónica, cargadas con aceite de cúrcuma (TO) [63]. La liberación *in vitro* de este agente bioactivo mostró una liberación sostenida de TO siguiendo el modelo de Korsmeyer-Peppas, con un mecanismo de difusión de tipo Fickiano (difusión lineal en un sistema homogéneo y estable) a pH 5.5 y 7.4. Las NPs modificadas con FA mostraron una menor IC₅₀ (concentración inhibitoria) que las NPs sin FA y TO contra células de MDA-MB-231 y MCF-7 (cáncer de mama), sugiriendo que las NPs con FA pueden mejorar la actividad anticancerígena de TO mediante su orientación activa hacia los receptores de folato altamente expresados en el cáncer de mama.

Por último, Tabatabaei y colaboradores (2022) sintetizaron NPs de CS modificadas con FA y cargadas con AE de *Satureja khuzistanica* por el método de homogenización a alta presión. Sus resultados mostraron que estas NPs podían inhibir las células cancerosas activando la vía interna de la apoptosis y la interrupción del ciclo celular, lo cual las convierte en candidatas adecuadas para estudios preclínicos de cáncer [64].

En la Tabla 6 se presenta una recopilación de NPs de CS-FA cargadas con extractos vegetales como tratamiento contra el cáncer.

Tabla 6. Recopilación de estudios sobre NPs de CS-FA cargadas con extractos como tratamiento contra el cáncer.

Nanopartícula	Extracto (E)	Método de obtención	Resumen	Año
PLGA y CS modificado con FA	E de <i>Peganum harmala</i> (PSE)	Método de nano precipitación	Los resultados mostraron que podían inhibir las células cancerosas activando la vía interna de la apoptosis y la interrupción del ciclo celular. Las cuales pueden considerarse un agente terapéutico en estudios de cáncer.	2022 [65]
CS modificado con FA	E de arándano (proantocianidinas, PC)	Gelación iónica	Se estudió el efecto inhibitorio de las NPs sobre la hemólisis de glóbulos rojos (las NPs CS/FA fueron capaces de proteger a los eritrocitos (glóbulos rojos) de la hemólisis	2023 [66]

causada por el estrés oxidativo inducido por AAPH (diclorhidrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina (estudios de estrés oxidativo). Este trabajo indicó que las NPs tiene el potencial de ser aplicado en alimentos funcionales, medicina y otros productos.

Con base en los antecedentes mencionados, hasta la fecha no se ha reportado la combinación de AE con fármacos encapsulados en NPs de CS-FA. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se realizó la preparación de este tipo de NPs mediante el método de gelación iónica. Estas NPs fueron cargadas con AE de menta, el cual contiene un fármaco anticancerígeno (MTX) disuelto en él para su potencial uso como nanoacarreadores. Se estudió el efecto de diversos parámetros de síntesis sobre el tamaño de las NPs, así como el porcentaje de modificación del CS con FA. Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios de liberación bajo diferentes condiciones de pH. Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad de estas NPs.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Obtener NPs basadas en CS modificado con FA para ser empleados como sistemas de liberación controlada de un AE conteniendo MTX con potencial capacidad anticancerígena.

3.2 Objetivos específicos

- Modificar CS con FA mediante una reacción de amidación.
- Preparar NPs de CS-FA de tamaño nanométrico variando diferentes parámetros tales como concentración de tripolifosfato de sodio (TPP) y concentración de AE durante la preparación de las NPs.
- Cargar las NPs de CS-FA con AE de menta y AE de clavo conteniendo Metotrexato (MTX).
- Determinar el mecanismo de liberación empleando diversos modelos (orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer- Peppas).

- Caracterizar el CS-FA y sus correspondientes NPs preparadas mediante diversas técnicas fisicoquímicas tales como resonancia magnética (RMN), espectroscopia de infrarrojo (FT-IR), difracción de rayos X (XRD), espectrofotometría de ultravioleta-visible (UV-vis), análisis termo gravimétrico (TGA), microscopia electrónica de barrido (SEM), dispersión de luz (DLS) y potencial zeta.
- Evaluar la citotoxicidad de las NPs de CS-FA, NPs de CS-FA con AM y NPs CS-FA con AM y MTX, todas con una modificación del 10 y 20%.

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer representa uno de los mayores desafíos en la medicina contemporánea, demandando enfoques innovadores que potencien la eficacia de los tratamientos actuales. En este contexto, las NPs poliméricas han emergido como una estrategia prometedora para dirigir agentes anticancerígenos de forma específica. Dentro de los numerosos polímeros empleados, el CS modificado con FA (CS-FA) destaca por sus notables propiedades, como la biocompatibilidad, capacidad de carga de fármacos y selectividad hacia células cancerosas que sobre expresan FR.

La elección del AE de menta y de clavo como carga se fundamenta en su amplio espectro de propiedades terapéuticas, tales como su actividad antitumoral, antiinflamatoria y antioxidante, que pueden complementar los efectos de los agentes anticancerígenos convencionales.

La originalidad de este estudio radica en la combinación de tres elementos fundamentales: las NPs poliméricas de CS-FA, el AE y el fármaco anticancerígeno. El empleo de las NPs poliméricas permite la protección adecuada de los agentes anticancerígenos, mejorando su solubilidad, estabilidad y capacidad de liberación controlada en el sitio deseado. La inclusión de FA como recubrimiento en las NPs confiere ventajas adicionales, como la capacidad de dirigirse selectivamente a las células cancerosas, optimizando así la eficacia del tratamiento y reduciendo los efectos secundarios en los tejidos sanos. Por último, la incorporación de AE y MTX proporcionara beneficios terapéuticos adicionales debido a sus propiedades farmacológicas específicas.

Esta sinergia entre las tres entidades ofrece una plataforma versátil y prometedora para mejorar la efectividad de los tratamientos contra el cáncer.

5. REACTIVOS

Reactivo	Pureza (%)	Proveedor
Quitosano (bajo peso molecular)	-----	Sigma-Aldrich
Ácido Fólico	97%	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido	99.9%	Sigma-Aldrich
Acido Acético	99.7%	J.T.Baker
N-hidroxisucinimida	97%	Sigma-Aldrich
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida	98%	Sigma-Aldrich
Argón	UAP	Infra
Hidróxido de sodio	98%	Sigma-Aldrich
Fosfato de sodio monobásico	99%	Analytiyka
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado	98-102%	Sigma-Aldrich
Tripolifosfato de sodio	85%	Sigma-Aldrich
Agua Milli-Q	-----	Merck (obtenido en CIQA)
Tween 80	-----	Sigma-Aldrich
Metotrexato	90%	Accord Farma
Aceite de menta	-----	Sigma-Aldrich
Aceite de clavo	-----	Sigma-Aldrich
Diclorometano	99.08%	Sigma-Aldrich
Bolsa de diálisis (12,000-14,000 Da)	99.99%	Sigma-Aldrich
DMEM-F12	-----	Gibco
Cristal violeta	90%	Sigma-Aldrich
SDS (Dodecilsulfato	97%	Sigma-Aldrich

sódico)		
XTT	97%	Roche

6. HIPÓTESIS

Es posible la preparación de NPs de CS modificado con FA con un tamaño menor a 100 nm y capacidad de encapsular AE (clavo y menta) y MTX.

7. METODOLOGÍA

7.1 Modificación de CS con FA

Se realizó la modificación de CS con FA (Figura 5) de la siguiente manera: En un matraz Erlenmeyer se agregó FA (0.882, 0.5292 y 0.3528 g) y posteriormente se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) (20, 14 y 8 mL). La solución se dejó agitando por 24 h hasta su completa disolución. Por otro lado, se preparó una solución de CS (200, 1000 mg) en 100 mL de ácido acético al 1% y se dejó agitando por 24 h. A la solución de FA, se le agregó 0.23 g N-hidroxisucinimida (NHS) y 0.191 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) y posteriormente se dejó agitando a 30 °C en la obscuridad y atmósfera de argón durante 30 min. La solución de CS se reguló a un pH 4.5 y sucesivamente la solución de FA activada con NHS y EDAC se agregó lentamente a esta solución. La solución resultante se dejó agitando durante 24 h a 30 °C bajo atmósfera de argón en la obscuridad. Una vez terminada la reacción, se ajustó el pH a 9 usando hidróxido de sodio (NaOH) (1M). Entonces la solución se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. El precipitado se dializó durante 3 días en una solución buffer a pH 7.4 y 4 días en agua destilada. Posteriormente, se congeló y se liofilizó durante 3 días ^[67]. Consecutivamente, se caracterizó mediante RMN, FT-IR, TGA, DSC y XRD (Ver anexo 10.2).

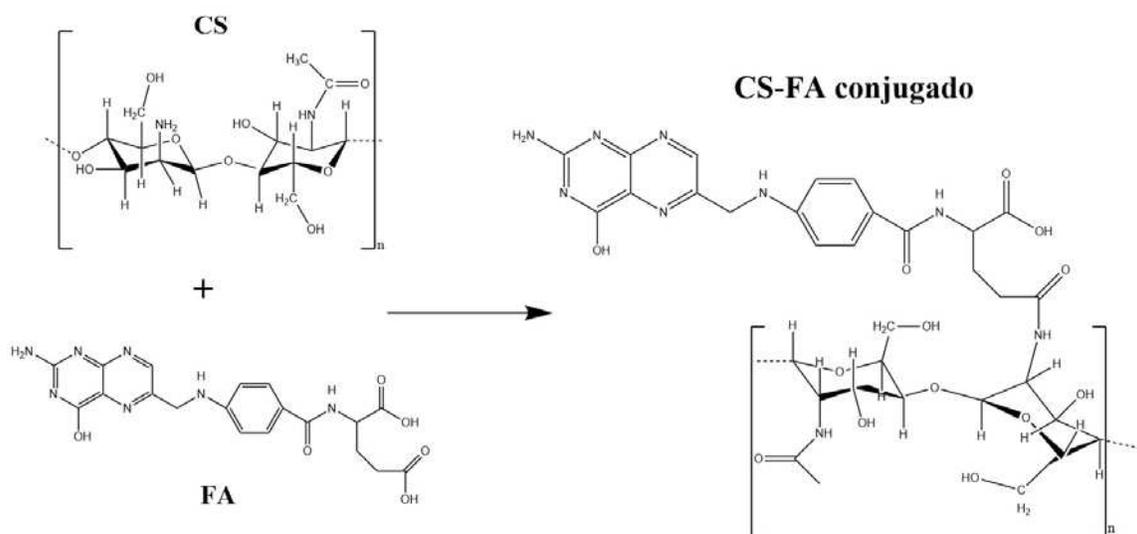


FIG. 5. Representación de la modificación de CS con FA

7.2 Preparación de NPs de CS-FA

Primeramente, se prepararon 10 mL de una solución de CS-FA (con 10 y 20 % de modificación, 100 mg) en ácido acético glacial (1% p/v). Por otro lado, se prepararon 10 mL de una solución acuosa de tripolifosfato de sodio (TPP) a diferentes concentraciones (0.2, 0.3, y 0.5%) empleando agua Milli-Q. La solución se sometió a ultra sonicación por 5 minutos y se dejó en agitación.

Posteriormente, a la solución de CS-FA se agregaron 100 mg de Tween 80 y se dejó en agitación durante 2 h a 45 °C. Para formar las NPs, se agregó la solución de TPP gota a gota lentamente en agitación continua. La suspensión se dejó agitando durante 2 h y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Las NPs se lavaron 3 veces con agua Milli-Q y se sonicaron entre cada lavado durante 5 min (40% de amplitud SONICS, vibra cell) para obtener una suspensión homogénea. Por último, la suspensión se liofilizó durante 3 días. En la Figura 5 se muestra una representación esquemática de la reacción de CS con FA.

7.3 Determinación de la solubilidad del MTX-R&D en AE de menta y clavo

Primeramente, una curva de calibración de MTX a diferentes concentraciones fue realizada como sigue: 10 mg de MTX-R&D se disolvieron en 10 mL de solución (1mg/mL) buffer pH

7.4 y se dejó agitando durante 72 h. Posteriormente, con esta solución madre se prepararon diferentes concentraciones y se analizaron mediante UV-vis a 310 nm. Una vez hecha la curva de calibración, se procedió a determinar la solubilidad del MTX en los aceites esenciales mediante el método de saturación *shake-flask* [68]. Los resultados mostraron que el MTX R&D no presentaba solubilidad en ningún aceite esencial.

7.4 Preparación de NPs de CS-FA cargadas con AE y MTX

Se prepararon dos soluciones con 24 h de antelación a la carga de las NPs con AE de menta y AE de clavo. La primera solución consistió en 10 mL de una disolución de CS-FA (1% p/v, 100 mg) en ácido acético, mientras que la segunda correspondió a una solución acuosa (10 mL de H₂O MiliQ) al 0.5% (p/v) de TPP, bajo agitación magnética. A los 10 mL de la solución de CS-FA se les añadieron 100 mg del surfactante Tween 80. Esta mezcla se mantuvo bajo agitación magnética durante 2 h a una temperatura de 45 °C.

Durante este periodo, se preparó una solución de AE de menta o AE de clavo (72 mg) en 1 mL de diclorometano. Después de las 2 h de reacción, la solución de CS-FA/Tween 80 fue vigorosamente agitada durante 40 min, momento en el cual se incorporó la solución de AE de menta. Posteriormente, se agregó la solución acuosa de TPP gota a gota bajo agitación mecánica y se dejó reposar durante 2 h para la preparación de las NPs de CS-FA, respectivamente.

Adicionalmente, la solución fue centrifugada a 5000 rpm durante 20 min a una temperatura de 4 °C. Las NPs fueron lavadas 3 veces con agua MiliQ y se re-dispersaron en agua mediante sonicación durante 5 min para obtener una suspensión homogénea. Esta suspensión se congeló y posteriormente se liofilizó.

De manera similar, se aplicó esta metodología para la preparación de las NPs cargadas con AE de menta y MTX. La diferencia radicó en la preparación del AE de menta (72 mg), al cual se le añadieron 20 µL de MTX (0.2 % p/v, DMSO) y 1 mL de diclorometano.

7.5 Caracterización de NPs

Las NPs fueron caracterizadas mediante la técnica de DLS para determinar el tamaño de las NPs y su distribución. De igual modo se realizó el estudio de potencial Z para evaluar la estabilidad de las NPs, el cual proporciona información sobre la carga eléctrica de las partículas y su tendencia a agregarse o repelerse entre sí. Por otro lado, se llevó a cabo la caracterización de las NPs mediante FT-IR (por sus siglas en inglés) con el propósito de identificar los grupos funcionales presentes en las NPs de CS y FA. Esto permitió confirmar la presencia de FA en las NPs modificadas, validando así el proceso de modificación. Además, las NPs cargadas con AE de menta, fueron caracterizadas también mediante FT-IR, se empleó esta técnica para determinar la presencia del AE de menta, gracias a los grupos funcionales específicos presentes en el mismo.

Adicionalmente, se emplearon otras técnicas avanzadas para su caracterización. El XRD (por sus siglas en inglés) se utilizó para analizar la estructura cristalina de las NPs, proporcionando información sobre la presencia de fases cristalinas específicas. El TGA (por sus siglas en inglés) permitió evaluar la estabilidad térmica y el comportamiento de descomposición de las NPs bajo diferentes condiciones de temperatura. El DSC (por sus siglas en inglés) se utilizó para estudiar las transiciones térmicas, como la temperatura de fusión y la descomposición, proporcionando información sobre la pureza y la estabilidad térmica de las NPs. Finalmente, se empleó SEM (por sus siglas en inglés) para examinar la morfología y la superficie de las NPs, permitiendo observar su forma y tamaño a nivel nanométrico.

7.6 Estudio de liberación de MTX

Una cantidad determinada de NPs CS-FA conteniendo AE de menta y MTX (20 mg), se colocó en una bolsa de diálisis (12,000-14,000 Da previamente lavada durante 3 días en agua Milli-Q), la cual contenía 2 mL del medio de liberación a probar (solución amortiguadora de fosfato, pH 7.4 o 5.8, según el caso). La bolsa de diálisis se sumergió en un 80 mL del medio de liberación a 37 °C bajo agitación constante. La liberación del agente bioactivo se monitoreó en intervalos de tiempo determinados mediante espectroscopía UV-Vis (a 223 nm para AE de menta) en un equipo JENWAY modelo 7305, tomando una alícuota de 2 mL. El experimento se realizó por triplicado.

Después de llevar a cabo los ensayos de liberación, los resultados no pudieron ser analizados mediante diferentes modelos matemáticos para determinar el mecanismo de liberación del fármaco a través de la membrana (modelos de orden cero, de primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas), debido a que los cálculos indicaban más mg de AE de menta mayor al encapsulado. Esto podría deberse a que tanto el CS (229 nm) ^[69] como el FA (288 nm) ^[70] absorben cerca de las mismas longitudes de onda, lo que podría estar causando interferencias en las mediciones.

7.7 Cultivo celular y tratamiento con MTX

Las líneas celulares humanas de cáncer de mama (MDA-MB-231) y pulmón (A549) (ATCC) fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM-F12 (Corning, Mannassas, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Corning, USA) y solución de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich, USA) en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂, 95% de aire a 37°C.

Las células fueron sembradas 24 h antes del tratamiento en microplacas de 96 pozos (9500 células/pozo) y fueron tratadas con dosis crecientes de MTX inyectable (Accord Farma) (1, 10, 100, 1000 µM) e incubados durante 48 h. Tras el tiempo de tratamiento, la viabilidad celular se evaluó con la tinción de cristal violeta (Sigma-Aldrich, USA) ^[71]. En paralelo, cultivos de ambas líneas celulares fueron tratados con dosis crecientes de DMSO para determinar su citotoxicidad (ver Tabla 10).

7.8 Ensayo de viabilidad celular (Cristal violeta)

Las células (MDA-MB-231 y A549) fueron sembradas 24 h antes del tratamiento en microplacas de 96 pozos (9500 células/pozo) y tratadas con dosis crecientes de MTX inyectable (Accord Farma) (1, 10, 100, 1000 µM) e incubadas durante 48 h. Tras el tratamiento, los cultivos se fijaron con formaldehído al 4 % durante 15 min, se agregaron 40 µL de solución de cristal violeta al 0.25% durante 20 min. Enseguida, de cada pozo fue aspirado el colorante y las placas fueron lavadas con agua corriente para retirar el exceso. Las placas fueron secadas a temperatura ambiente (24 h). Posteriormente, se tomaron

fotografías de los pozos y se agregaron 200 μ L de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 1%. Las placas se agitaron durante 1 h y la densidad óptica se analizó a 570 nm.

7.9 Evaluación de la viabilidad celular inducida por las NPs

La línea celular humana de cáncer de pulmón (A549) (ATCC) fue cultivada en medio de cultivo DMEM-F12 (Corning, Mannassas, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Corning, USA) y solución de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich, USA) en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, 95% de aire a 37°C. Las células fueron sembradas 24 h antes del tratamiento en microplacas de 96 pozos (7500 células/pozo) y tratadas con dosis crecientes de AM, NPs CS, NPs CS-FA_{10y20%}, NPs CS-FA_{10y20%} AM y NPs CS-FA_{10 y20%} AM y MTX, incubándolas durante 48h. Tras el tiempo de tratamiento, la viabilidad celular se evaluó utilizando el método de XTT (Roche, USA) [105], para lo cual se añadieron 50 μ L de la mezcla de marcador XTT-PMS a cada pocillo, seguido de una incubación durante 3 h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire. Posteriormente, se midieron las absorbancias de la reducción del XTT en cada pocillo a 450 nm. Las absorbancias fueron convertidas a porcentaje de viabilidad celular según la siguiente formula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{OD_{450nm \text{ Exp}} \times 100}{OD_{450 \text{ Ctrl}}}$$

Donde:

- OD_{450nm Exp}: Es el valor de la densidad óptica de cada tratamiento experimental.
- OD_{450nm Ctrl}: Es el valor de la densidad óptica del control (blanco).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 Modificación de CS con FA

En esta reacción, el CS se conjugó con el FA a través de una reacción de amidación facilitada por los agentes activadores N-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) este mecanismo se puede observar en la figura 6.

1. Activación del Ácido Fólico:

- El FA tenía grupos carboxilo (-COOH) que necesitaban ser activados para reaccionar eficientemente con los grupos amino (-NH₂) del CS.
- La activación se realizó en dos pasos: primero, el EDAC reaccionó con el grupo carboxilo del FA, formando un intermediario O-acilurea.
- Este intermediario reactivo era inestable y se transformó rápidamente en un éster succinimidil cuando se añadió NHS. Esta transformación formó el éster de NHS activado, que era más estable y reactivo frente a los nucleófilos, como los grupos amino del CS.

2. Conjugación del FA activado con el CS:

- La solución de FA activado (FA-C(O)-NHS) se añadió lentamente a la solución de CS, manteniéndose bajo agitación constante.
- La reacción de amidación se llevó a cabo a 30 °C en la oscuridad y bajo una atmósfera de argón para prevenir la oxidación y la descomposición de los reactivos sensibles.
- Los grupos amino del CS atacaron nucleofílicamente al éster de NHS, formando un enlace amida y liberando NHS.

Explicación del Mecanismo de Reacción:

- EDAC actuó como un agente de acoplamiento que activo el grupo carboxilo del ácido fólico.
- NHS convirtió el intermediario reactivo en un éster succinimidil, que era más estable y reactivo.
- Los grupos amino del CS atacaron el éster activado, formando enlaces amida y liberando NHS, lo que resultó en la conjugación eficiente de FA a CS.

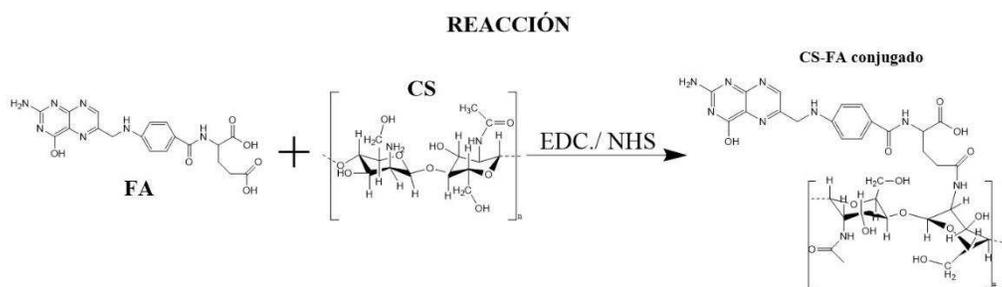


FIG. 6. Representación de la reacción de modificación de CS con FA.

A continuación, se muestran las diversas reacciones de modificación de CS con FA llevadas a cabo a diferentes condiciones de reacción, así como el porcentaje de modificación obtenido mediante el análisis de los diferentes RMN (Tabla 7).

Tabla 7. Diferentes porcentajes de modificación CS-FA variando diversos parámetros de reacción.

DMSO (mL)	FA (g)	Vol. Ac. Acético (mL)	CS (g)	Relación Másica CS: FA	Modificación (% mol)
20	0.88	100	0.2	1:4.4	20
14	0.88	100	0.2	1:4.4	14
8	0.88	100	0.2	1:4.4	5
20	0.52	100	0.2	1:2.6	13
20	0.35	100	0.2	1:1.7	1
20	0.88	200	0.4	2.2:1	10
20	0.88	200	1	1:0.88	5

De esta tabla, se observó que la relación en masa de los productos iniciales fue clave en el porcentaje de modificación del CS-FA, resultando en que a mayor contenido de FA se obtuvo un mayor porcentaje de modificación. Esto se debió a que el incremento en la cantidad de FA proporcionó más sitios reactivos disponibles para la conjugación con los grupos amino

del CS, lo que aumentó la probabilidad de interacción entre las moléculas de FA y CS. Por lo tanto, al tener más FA en la mezcla, se facilitó una mayor modificación del CS. Por otro lado, otro factor importante en este proceso de modificación fue el contenido de DMSO. Se ha reportado que el FA presenta baja solubilidad en disolventes orgánicos; sin embargo, con el DMSO presentó una solubilidad de 20 mg/mL a temperatura ambiente, debido a la polaridad de ambos. Por lo tanto, mientras más DMSO se agregó, disminuyó la acidez de la solución, permitiendo una mejor solubilidad del FA y obteniendo una mayor modificación.

8.1.1 FT-IR

En el espectro de FT-IR medido por ATR (reflexión total atenuada) del CS sin modificar (Figura 7), se observaron bandas alrededor de 3372 cm^{-1} , atribuidas a los estiramientos O-H y N-H. De igual modo, las bandas alrededor de 2920 cm^{-1} se atribuyeron a los enlaces C-H y $-\text{CH}_2$, la banda en 1640 cm^{-1} correspondió a una amida primaria [72] y por último se observó una banda en 991 cm^{-1} correspondiente al enlace o-glucosídico. Comparando con el espectro de CS, el espectro de CS-FA mostró una banda de amida $-\text{CONH}$ en 1640 cm^{-1} y la flexión de $-\text{NH}$ correspondiente a la amida formada entre el CS y el FA a 1570 cm^{-1} , por otro lado, se muestra una banda en 1700 cm^{-1} se asoció con la vibración de estiramiento del enlace C-O, estos resultados sugirieron la conjugación del $-\text{COOH}$ del FA con el grupo amino de CS [73].

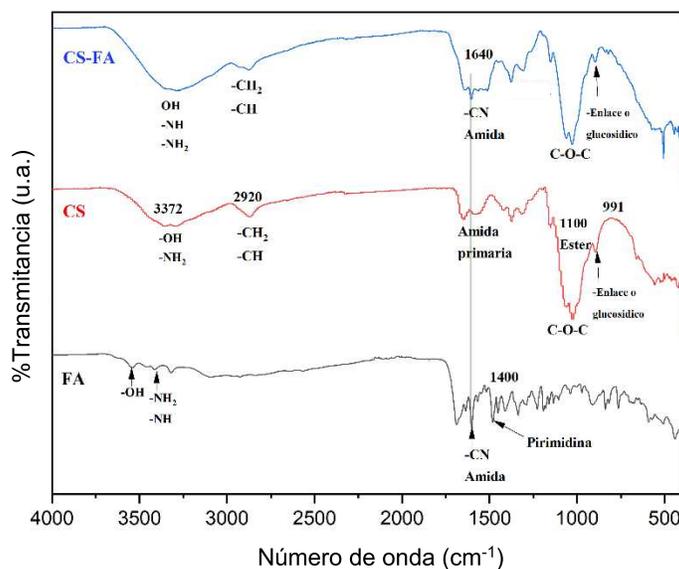


FIG. 7. Espectros de FT-IR de CS, FA y CS-FA_{20%}

8.1.2 RMN

Por otro lado, la caracterización del CS-FA_{20%} mediante ¹H RMN se utilizó para corroborar la incorporación del FA al CS. En el espectro de CS (figura 8a) las señales de 2 a 4 ppm fueron asignadas a los protones presentes en el anillo de glucosa del CS mientras que la señal observada en 5.4 ppm se asigna al protón sobre el carbono adyacente al enlace O-glucosídico [74]. En el espectro de FA (figura 8b) los picos de 6.8 y 7.7 ppm (e y d) se atribuyen a los protones aromáticos presentes en el FA. Por otro lado, una señal característica del FA es el protón presente en 8.7 ppm (a) del anillo de la pterina. En la figura 8c el espectro de CS-FA mostro señales que provenían de ambos productos iniciales, por último, la desaparición del protón del grupo ácido en 12 ppm confirma la formación de amida, lo que corroboraría la correcta modificación del CS con FA.

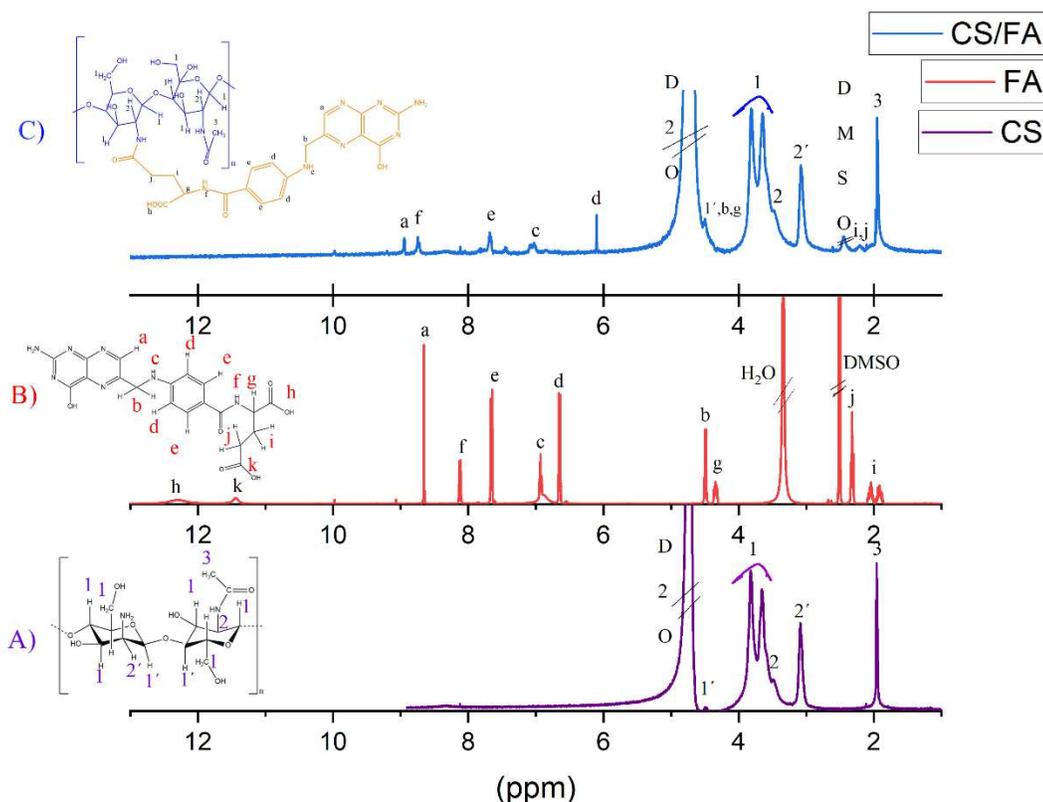


FIG. 8. Espectros de RMN ¹H de CS (A), FA (B) y CS-FA_{20%} (C)

El cálculo del porcentaje de modificación se realizó utilizando las áreas integradas de los

picos correspondientes a los protones del FA y el protón del CS. En la Figura 8c se identificaron los picos específicos correspondientes a los protones de FA y CS en el espectro de RMN. Estos picos se utilizaron para determinar el grado de modificación del CS con FA.

El porcentaje de modificación obtenido en la Tabla 7, se calculó a través de la ecuación que se muestra a continuación, siendo una adaptación al método proporcionado por el autor Báez E. José ^[112]:

$$\% \text{Modificación: } \left(\int H_a / \int H_{2'} \right) \times 100$$

Donde:

- $\int H_a$ representa el área integrada de los picos correspondientes al protón del anillo de pteridina del FA.
- $\int H_{2'}$ representa el área integrada del protón 2' en el anillo glucosídico del CS.

8.1.3 TGA

Así mismo, se realizó el análisis termogravimétrico (TGA) para conocer la pérdida de masa de las muestras de CS-FA con diferente % de modificación. En la figura 9 se observaron los termogramas del CS y FA sin modificar. En el termograma de CS se observó una primera pérdida de peso en el intervalo de 50 a 100 °C, correspondiente a la pérdida de humedad contenida en el CS. Posteriormente, se observó una segunda pérdida en un intervalo de 200-600 °C, la cual fue atribuida a la descomposición de la cadena principal del CS. Por otro lado, en el termograma de FA se observó una pérdida de peso de 50 a 107 °C, correspondiente a la pérdida de humedad contenida en el FA y posteriormente, se observó una segunda pérdida en 245 °C, que correspondió a la pérdida de ácido glutámico. Además, se observaron pérdidas de peso en un intervalo de 303-429 °C (27%), debidas al rompimiento del enlace entre el Carbono (b) y el Nitrógeno (c) (ver figura 8), produciendo una pterina y ácido ρ -amino benzoico. Por último, se observa al final de toda la reacción de descomposición, ocurrió una pérdida total de masa del ácido fólico ^[75].

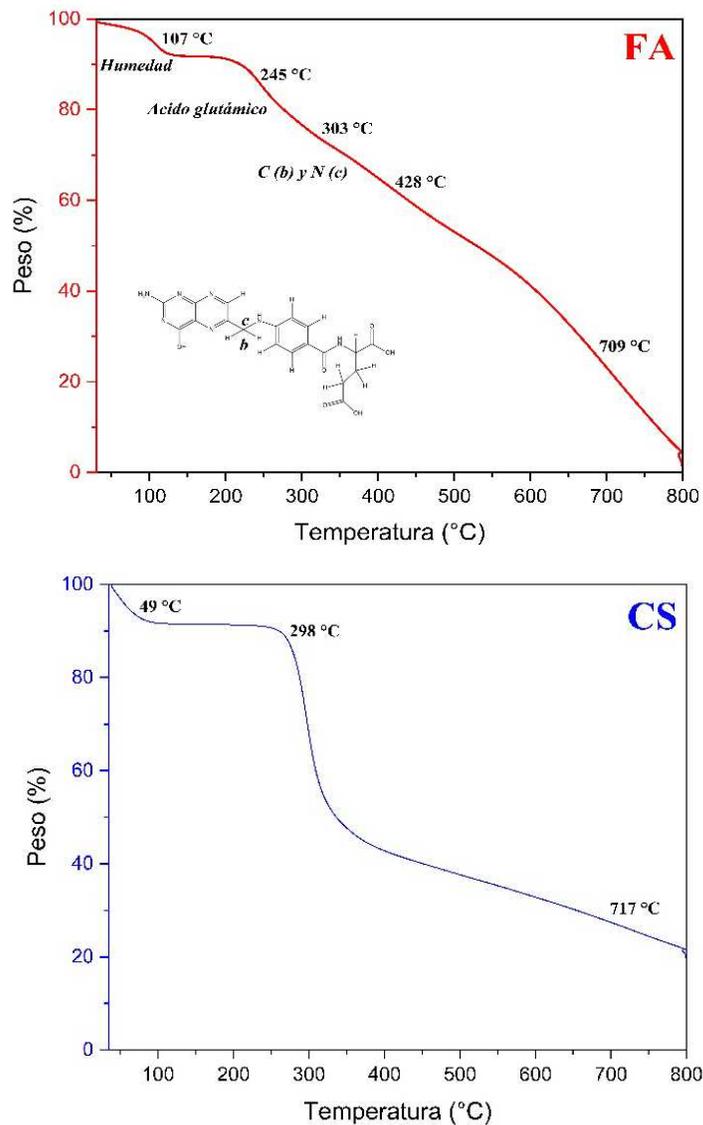


FIG. 9. Curvas de TGA de FA y CS.

En la Figura 10 se mostraron las curvas de TGA para el CS-FA con distintos porcentajes de modificación (20, 14 y 5%). En el termograma correspondiente al CS-FA 20%, se evidenció una primera pérdida de peso a 278 °C, atribuida a la descomposición de la cadena principal del CS y al ácido glutámico del FA. Además, se registró una masa residual del 32.66 % a 800 °C. En el caso del CS-FA 14%, la primera pérdida de peso a 29 °C se relacionó con la eliminación de la humedad presente en el CS, dado su carácter higroscópico. Posteriormente,

se observó una segunda caída a 264 °C, asociada a la descomposición de la cadena principal del CS y al ácido glutámico del FA, con una masa residual del 19.63% a 800 °C. Para el CS-FA 5%, la pérdida de humedad se registró a 20 °C, la cual fue precedente a una segunda caída a 262 °C, atribuida a la descomposición de la cadena principal del CS y al ácido glutámico del FA. La masa residual alcanzó el 14% a 800 °C.

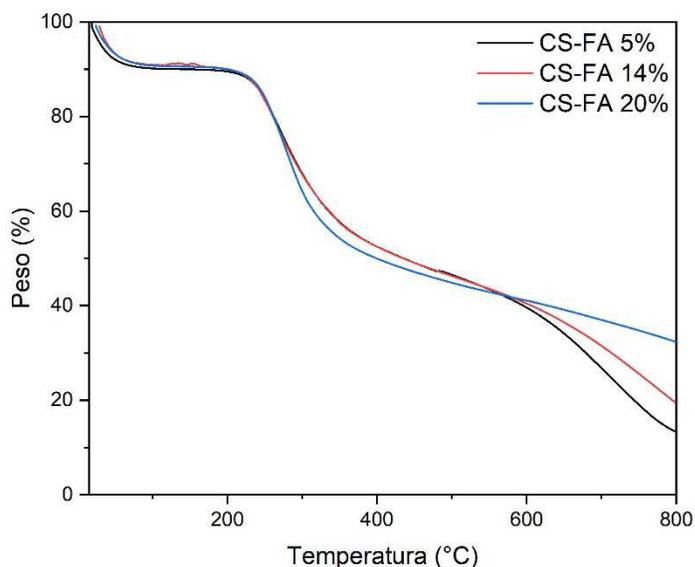


FIG. 10. Curvas de TGA del CS-FA con 20, 14 y 5 % de modificación

De la figura anterior, se pudo observar que los termogramas de CS-FA con diferente porcentaje de modificación presentaron un comportamiento más similar al CS que al del FA, aunque la temperatura de la segunda caída fue más cercana a la del FA. De igual modo, el mayor porcentaje de residuo carbonoso tendió a ser mayor conforme el porcentaje de modificación aumentó, debido a los grupos carbono del FA añadidos en la modificación de CS con FA.

Es importante resaltar que la estabilidad térmica del CS disminuyó al modificarlo con FA. Las temperaturas en las que se observó la primera pérdida significativa de peso (278, 264 y 262 °C para CS-FA conteniendo 20, 14 y 5% de FA, respectivamente) fueron menores a la temperatura en la cual el CS puro empezó a descomponerse. Estos resultados sugirieron la incorporación de FA en la estructura del CS [76].

8.1.4 DSC

Para el estudio del comportamiento térmico o la cantidad de calor que absorbió o liberó el CS modificado con FA se utilizó DSC [77]. En la Figura 11, se presentaron los termogramas de CS, FA y CS modificado con FA con diferente porcentaje de modificación. En el termograma de FA, se identificó un pico endotérmico que indicó la temperatura de fusión (T_m) a 188 °C, junto con una temperatura de degradación (T_d) a 307 °C. En contraste, el termograma de CS mostró una T_m a 99 °C y una T_d a 270 °C, lo que concuerda con lo reportado por Acosta y col. [78-79]. Al analizar los termogramas de CS-FA con diferentes porcentajes de modificación (5,14 y 20%), se destacó un pico endotérmico que reflejó la T_m alrededor de 97, 91 y 94 °C, con temperaturas de degradación de 335, 305 y 243 °C, respectivamente.

Se observó que la T_m correspondiente al FA no fue evidente en los termogramas de CS-FA, pero sí se apreció una influencia del FA en la T_m del CS. Este hallazgo sugirió que no se trataba simplemente de una mezcla de compuestos, ya que la T_m resultante debería ubicarse entre 99 y 188 °C. En cambio, la reducción de la T_m hacia temperaturas inferiores sugirió la formación de una nueva especie, destacando la influencia significativa del FA en las propiedades térmicas del CS [80].

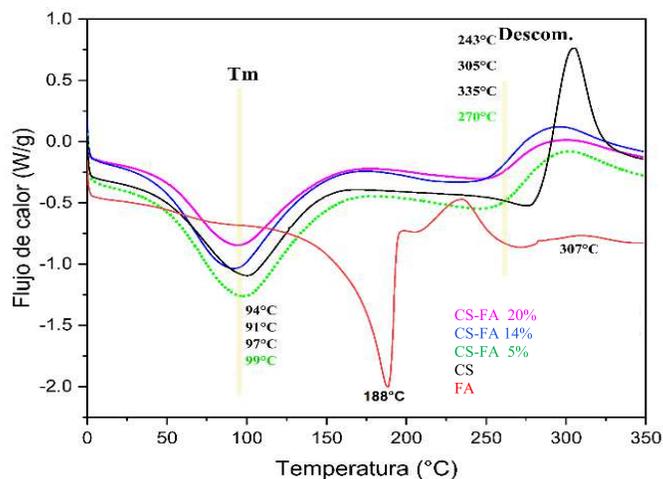


FIG. 11. Termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido para FA, CS y CS-FA con diferente contenido de FA.

8.1.5 XRD

Adicionalmente, se optó por emplear la técnica de difracción de rayos X (XRD) para indagar sobre el eventual impacto en la estructura cristalina del CS una vez modificado con FA. La Figura 12 exhibió los difractogramas de XRD de FA, CS, y CS-FA con diferentes porcentajes

de FA (5, 14 y 20%). Los difractogramas evidenciaron tanto la modificación con FA (A) como la semi-cristalinidad del CS (B) [81]. El CS exhibió sus respectivos planos cristalinos en los ángulos 2θ de 10.1° y 20.34° . Coincidentemente, Anbazhagan y col. reportaron un patrón de difracción similar para un CS (de la marca Sigma-Aldrich de bajo peso molecular 50,000 Da), evidenciando planos cristalinos en 10.32° y 19.94° [82]. Por otro lado, el difractograma de FA mostró picos pronunciados en los ángulos 11.2° , 13.4° , 27.1° y 28.16° . Finalmente, en los difractogramas de CS-FA conteniendo FA no se observó cambio en la semi-cristalinidad del CS durante el proceso de modificación.

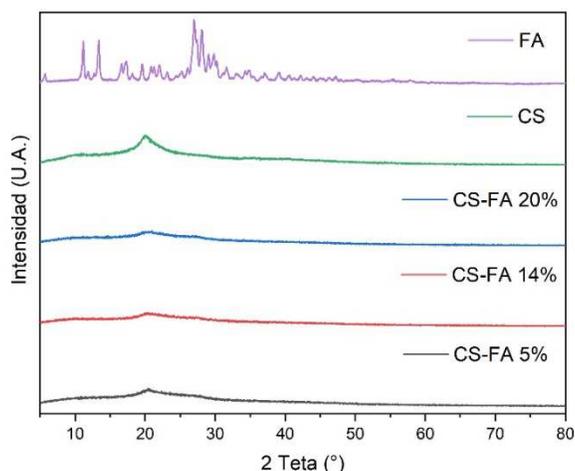


FIG. 12. XRD difractogramas del CS, FA y CS-FA con diferente porcentaje de modificación (20, 14 y 5 %).

8.2 Preparación de NPs de CS con FA

Para la preparación de NPs de CS-FA se escogieron las muestras de CS-FA conteniendo 10 y 20 % de modificación. Durante la formación de las NPs de CS-FA mediante la adición de TPP, ocurrieron varios procesos clave:

1. Interacciones Electroestáticas:

- Los grupos amino del CS estaban protonados en la solución ácida, lo que les confería una carga positiva (NH_3^+).
- El TPP, por otro lado, contenía múltiples grupos fosfato cargados negativamente ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$).

2. Reticulación Iónica:

- Al añadir la solución de TPP gota a gota a la solución de CS-FA, los grupos fosfato del TPP interactuaron electrostáticamente con los grupos amino protonados del CS.
- Estas interacciones electrostáticas indujeron la formación de enlaces cruzados iónicos entre las cadenas de CS.
- La formación de estos enlaces cruzados creó una red polimérica tridimensional que resultó en la formación de NPs.

3. **Estabilización de NPs:**

- La presencia de Tween 80 en la solución actuó como un agente estabilizador, reduciendo la tensión superficial y evitando la aglomeración de las NPs durante su formación.
- Esto ayudó a obtener una dispersión homogénea y estable de las NPs en la solución.

Resumen del Proceso

- **Protonación de Grupos Amino:** Los grupos amino del CS se protonaron con la solución ácida.
- **Adición de TPP:** Se añadió TPP, cuyos grupos fosfato cargados negativamente interactuaron con los grupos amino protonados del CS.
- **Reticulación Iónica:** Se formaron enlaces cruzados iónicos entre las cadenas de CS, creando una red polimérica tridimensional.
- **Formación de Nanopartículas:** Se formaron núcleos de NPs que crecen y se estabilizan, resultando en NPs homogéneas y estables.

La formación de NPs de CS-FA mediante la adición de TPP fue un proceso de reticulación iónica que resulto en la creación de una red polimérica estabilizada y controlada.

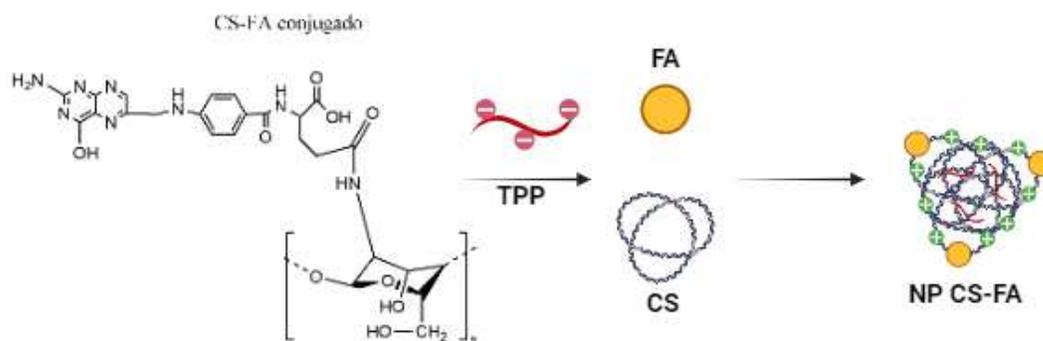


FIG. 13. Esquema de la formación de NPs CS-FA.

El CS se utilizó como materia prima para sintetizar NPs de tamaño nanométrico ^[83], las cuales son biodegradables y pueden actuar como sistemas de liberación controlada ^[84]. Se prepararon NPs de CS-FA basados en el método de Calvo et al. ^[85] (Gelación iónica trópica) variando la cantidad de TPP a partir de CS (0.2 y 0.4 g ver tabla 7) y los resultados son mostrados en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de Dp y potencial Z para NPs de CS-FA preparadas con diferente [TPP] y porcentaje de FA.

Contenido de FA (% mol)	[TPP] (% p/p)	Dp (nm)	Potencial Z (mV)
20	0.5	297	-47.2
20	0.3	280	+9.5
20	0.2	154	+8.4
10	0.5	208	+29.1
10	0.3	190	+25.9
10	0.2	97	+27.3

En la tabla 8, se observó que un mayor contenido de FA y una mayor concentración de TPP condujeron a NPs más estables y de mayor tamaño. Estos resultados fueron consistentes con los hallazgos de Kaloti y col. (2010), quienes destacaron que las moléculas de CS se unen

selectivamente al TPP, generando una serie de complejos intra e intermoleculares. Ellos demostraron que a bajas concentraciones de CS (<0.5 mg/mL) y una relación de mezcla CS/TPP <2 , los iones tripolifosfato impulsan al sistema hacia la coacervación natural mediante la formación de enlaces intermoleculares entre el TPP (grupos fosfato) y el CS (grupos amino). Bajo estas condiciones, no se observó la formación de NPs. Sin embargo, a medida que la concentración de polímero excedía los 0.5 mg/mL y la relación de mezcla CS/TPP era > 2 , las NPs se formaron preferentemente, con un diámetro en el rango de 150 a 350 nm ^[86].

Este cambio en el comportamiento, se atribuyó a las interacciones intermoleculares entre los iones hidroxilo en solución y los grupos amino presentes en el CS (NH_3^+), y los iones de ácido Tripolifosfato ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$, $\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}^{3-}$, $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$). Estas interacciones electrostáticas facilitaron el entrecruzamiento del polímero, induciendo el plegamiento de la cadena y la formación de NPs ^[86] (Figura 14).

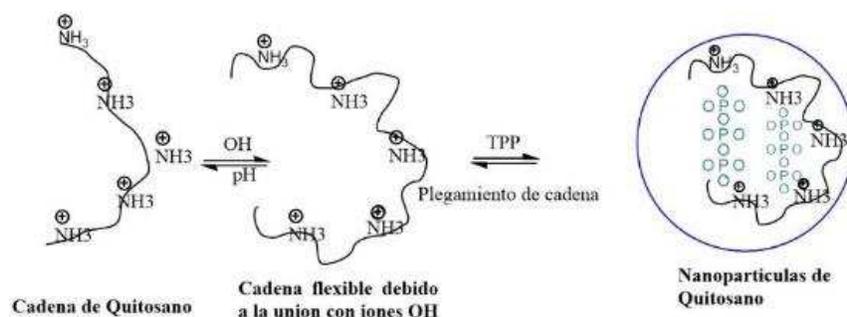


FIG. 14. Unión de los grupos amino del CS con iones hidroxilo debilita la cadena y facilita la formación de enlaces intramoleculares con iones de ácido tripolifosfórico, dando lugar a la formación de NPs ^[86].

Por lo tanto, se sugirió que el tamaño y la estabilidad de las NPs dependían significativamente de la relación CS-FA 20% /TPP. Un mayor contenido de CS-FA 20% y una concentración más alta de TPP condujeron a una mayor estabilidad y un tamaño de partícula más grande. Por otra parte, al observar los valores de tamaño obtenidos mediante DLS de las NPs, surgió un cambio en el potencial Z de + a -. Esto se debió al predominio de los grupos carboxilato (COO^-) provenientes del FA sobre los grupos aminos positivos del CS. Estos grupos carboxilato tuvieron una carga negativa a pH fisiológico. La introducción de estos grupos carboxilato desplazó la carga superficial neta de las NPs hacia lo negativo. Esto ocurrió porque los grupos carboxilato neutralizaron los grupos aminos positivos del CS y, adicionalmente, contribuyeron con cargas negativas propias. Esto mismo fue observado por Yang y col. ^[87], destacando la importancia de ajustar cuidadosamente la relación entre los

componentes en la preparación de NPs de CS para aplicaciones específicas. Observando los resultados obtenidos se decidió proseguir con el porcentaje de TPP 0.5% para lograr obtener el mayor contenido de AM, AC y MTX en las NPs.

8.2.1 FT-IR

Por otro lado, se realizó la caracterización mediante FT-IR para corroborar la formación de las NPs de CS-FA con diferente contenido de FA: 20 y 10% (CS-FA_{20%} y CS-FA_{10%}).

Los espectros de FT-IR de ambas NPs de CS-FA variando la cantidad de TPP (0.2%, 0.3% y 0.5%) se presentaron en la Figura 14. Los espectros exhiben una banda de absorción amplia en 3372 cm^{-1} , atribuida a la vibración de los grupos NH_2 y OH presentes en el CS, así como una banda en 2920 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento de los grupos CH y CH_2 . Por otro lado, se observa una banda de amida bien definida con dos picos a 1640 cm^{-1} y 1570 cm^{-1} , asociados a la vibración de estiramiento de los enlaces amida ($\text{C}=\text{O}$) y la flexión de $-\text{NH}$, respectivamente, característicos del FA. Además, se identifica una banda pequeña en 1400 cm^{-1} , atribuible al anillo de pirimidina presente en el FA y un enlace α -glucosídico en 991 cm^{-1} . Además, se observa una banda a 1292 cm^{-1} , que representa la vibración de estiramiento del enlace $\text{P}=\text{O}$ de los grupos fosfato del TPP, la cual se intensifica con el aumento del contenido de TPP en las NPs [88]. Estos hallazgos indicaron la formación de las NPs de CS-FA.

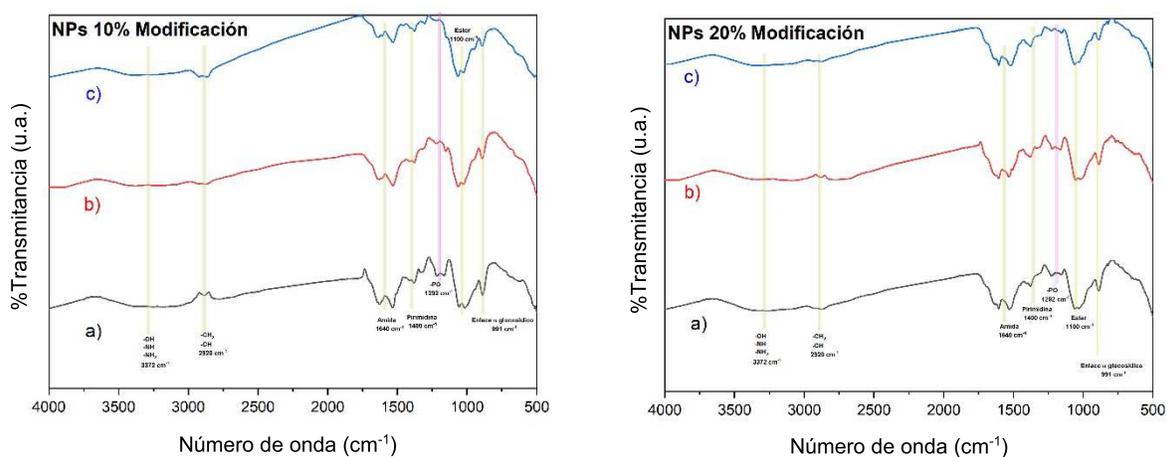


FIG. 15. Espectros de FT-IR de NPs CS-FA conteniendo 10 y 20% de FA con diferente contenido de TPP: a) 0.5, b) 0.3 y c) 0.2 %.

8.2.2 SEM

Se sabe que las NPs por su tamaño tienden a aglomerarse, por lo tanto, se decidió caracterizarlas mediante SEM (microscopio electrónico de barrido). Esta caracterización se realizó no solo para observar su tendencia a la aglomeración, sino también para analizar su formación y morfología, así como para estimar su tamaño. El uso de SEM permitió obtener imágenes detalladas de la superficie de las NPs, proporcionando información crucial sobre su estructura y dimensiones, lo cual es esencial para evaluar la efectividad del proceso de síntesis y la calidad de las NPs obtenidas. La micrografía de SEM proporcionó una visualización detallada de la morfología y el tamaño de las NPs de CS-FA conteniendo 10 y 20% de FA.

Las Figuras 16 y 17 mostraron micrografías obtenidas mediante SEM de las NPs CS-FA conteniendo 10 y 20% de FA respectivamente. Estas imágenes revelan detalles sobre la morfología y distribución de tamaño de las NPs. En las micrografías figura 16a y 17a se pueden observar que las NPs presentaron una morfología semiesférica, aunque con ciertas irregularidades inherentes al CS como biopolímero. La distribución visual de tamaño confirma que las partículas están en el rango nanométrico, lo cual fue corroborado por el análisis estadístico posterior (medición de tamaño usando software ImageJ). El histograma de las NPs CS-FA_{10%} (Figura 16b) mostró un rango de tamaño entre aproximadamente 52 y 192 nm. La mayoría de las NPs se encuentran en el rango de 87 a 104 nm, con un pico de frecuencia alrededor de los 107 nm, indicando que la mayor parte de las NPs tienen un tamaño cercano a 100 nm.

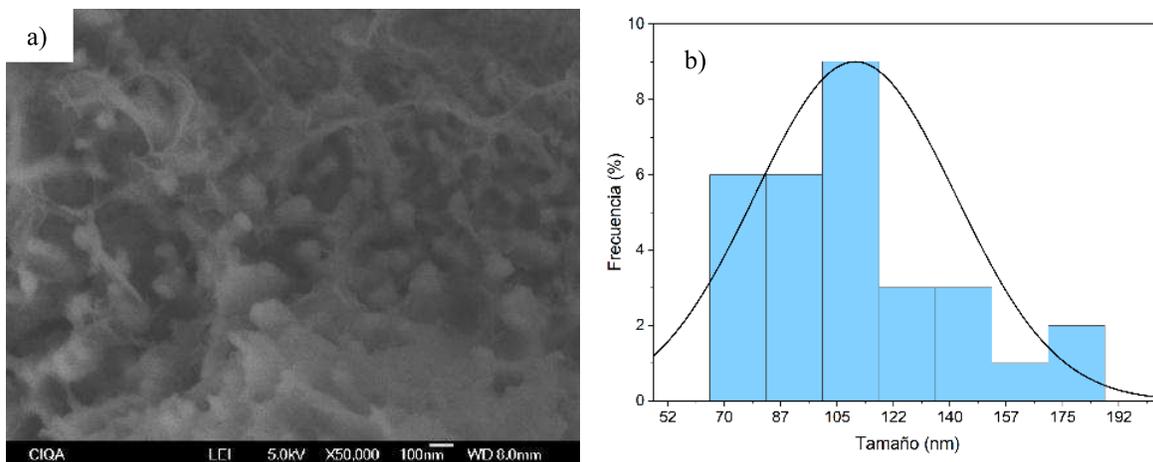


FIG. 16. Micrografía de SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA conteniendo 10% de FA preparadas con TPP al 0.5%

En comparativa, el histograma de las NPs CS-FA_{20%} (figura 17b) mostró que el tamaño de las NPs variaba entre aproximadamente 60 y 200 nm y que la mayoría de las NPs se encontraban en el rango de 80 a 100 nm, con un pico de frecuencia cercano al 6% alrededor de los 100 nm. Esta alta frecuencia en el rango cercano a 100 nm fue ideal para aplicaciones biológicas y farmacéuticas, donde el tamaño uniforme es crucial. La diferencia en los tamaños observados por SEM y DLS se debe a que las NPs analizadas por SEM estaban liofilizadas, lo que causa una contracción o colapso parcial, resultando en tamaños más pequeños (alrededor de 100 nm). En cambio, el análisis por DLS (apartado 7.2) se realizó en solución, donde las NPs estaban completamente hidratadas y dispersas, reflejando su tamaño hidrodinámico completo (208 nm (NPs CS-FA_{10%}) y 297 nm (NPs CS-FA_{20%})). Wang y col. observaron el mismo comportamiento, donde su formulación de NPs liofilizada analizadas mediante SEM tenían un tamaño menor que aquellas observadas mediante DLS [89].

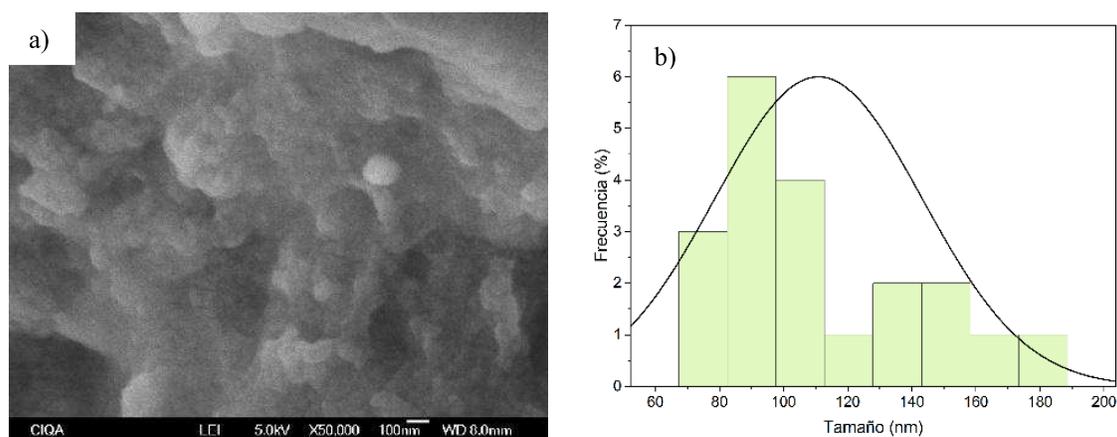


FIG. 17. Micrografía de SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA_{20%} con TPP al 0.5%

La integración de los datos obtenidos de las micrografías de SEM, los histogramas así como la tabla de características fisicoquímicas en la sección 7.2 ofrecieron una comprensión exhaustiva de las propiedades de las NPs de CS-FA con porcentajes de modificación del 10 y 20%. Los resultados indicaron que el tamaño de las NPs puede ser ajustado mediante la concentración de TPP, lo cual es crucial para aplicaciones que requieren un control preciso del tamaño de las NPs. El análisis del potencial zeta de las NPs muestra valores tanto

positivos como negativos para las formulaciones con 10 y 20% de FA y diversas concentraciones de TPP, lo que sugirió una buena estabilidad coloidal. Esta estabilidad es fundamental para aplicaciones en sistemas de liberación de fármacos, ya que influye directamente en la eficacia y la seguridad de los nanotransportadores.

8.3 Preparación de NPs de CS-FA cargadas con AE y MTX

Una vez preparadas y caracterizadas las NPs de CS-FA, se procedió a la preparación y caracterización de NPs de CS-FA cargadas con AM o AC, mediante la variación de varios parámetros de síntesis. El objetivo fue identificar las condiciones adecuadas para la formación de NPs con un tamaño en la escala nanométrica, así como una eficiencia de encapsulamiento (EE) y capacidad de carga (CC) adecuadas. La Tabla 10 mostro los resultados del encapsulamiento de las nanopartículas sintetizadas empleando diferente concentración de TPP y porcentajes de modificación de FA, con el fin de observar su efecto en los valores de EE y CC. Esta información fue crucial para determinar las mejores condiciones de síntesis que maximizaran la eficacia y la funcionalidad de las NPs en aplicaciones biológicas y farmacéuticas.

Tabla 9. Valores de Dp, potencial Z, EE y CC para NPs de CS-FA preparadas con diferente AE, [TPP] y porcentaje de FA.

Modificación (%mol)	Aceite	TPP (% p/p)	Dp (DLS) (nm)	Potencial Z (mV)	EE (%)	CC (%)
10	AM	0.40	377	+5	56.18	31.85
20	AM	0.40	231	+7.1	95.60	59.68
10	AM	0.50	368	-12.6	68.74	44.04
20	AM	0.50	336	-20.6	87.29	38.79
10	AC	0.40	459	+4.4	12.15	7.11
20	AC	0.40	523	-7.9	12.70	4.60

Los resultados presentados en la Tabla 9 proporcionan una comparación detallada de cómo la variación en la concentración de TPP y el tipo AE influye en el diámetro de partícula (Dp), el potencial Z, EE, y CC de las NPs de CS-FA.

Se observó que las NPs preparadas con AM exhibieron diámetros de partícula menores en comparación con aquellas preparadas con AC. Específicamente, al aumentar la concentración de TPP de 0.40% a 0.50%, las NPs cargadas con AM mostraron una disminución en el tamaño de partícula (de 377 nm a 336 nm para AM 20%), lo que sugiere que una mayor concentración de TPP puede conducir a una mayor reticulación y, por lo tanto, a NPs más compactas. En contraste, las NPs con AC experimentaron un aumento en el tamaño de partícula, lo que podría indicar una menor eficiencia en la formación de enlaces cruzados entre el TPP y el CS, posiblemente debido a la menor compatibilidad entre el AC y la matriz de CS-FA ^[90].

El potencial Z es un indicador clave de la estabilidad coloidal de las NPs. Las muestras con AM mostraron un potencial Z más negativo a medida que la concentración de TPP aumentaba, especialmente en las muestras con 20% de AM, donde el valor alcanzó -20.6 mV. Este aumento en la carga superficial negativa puede mejorar la repulsión electrostática entre las partículas, contribuyendo a una mayor estabilidad coloidal. En comparación, las NPs con AC mostraron una menor carga negativa e incluso valores positivos en concentraciones de TPP más bajas, sugiriendo una estabilidad coloidal inferior, esto concordó con estudios previos (Sotelo y col. ^[91]; Khoobel y col. ^[88]) que relacionan estas variaciones con la presencia de moléculas de AE en la superficie de las partículas. Este comportamiento podría deberse a las diferentes propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales, donde el AM puede estar promoviendo una mejor distribución de carga sobre la superficie de las NPs.

La EE fue significativamente mayor en las NPs cargadas con AM en comparación con las cargadas con AC, independientemente de la concentración de TPP. Por ejemplo, las NPs con 20% de AM y 0.40% de TPP lograron una EE del 95.60%, mientras que las NPs con AC en condiciones similares solo alcanzaron una EE del 12.70%. Esto sugiere que el AM tiene una mayor afinidad por la matriz de CS-FA, posiblemente debido a su mejor solubilidad y la formación de interacciones más fuertes (como enlaces de hidrógeno) con los grupos funcionales del CS. La mayor EE observada en las NPs con AM podría estar relacionada con una mejor compatibilidad del AM con la red polimérica de CS, lo que favorece su encapsulación eficiente ^[90].

Cabe destacar que la EE se obtuvo utilizando la fórmula:

$$EE = \left(\frac{\text{Masa de aceite cargado en NPs}}{\text{Masa total de aceite}} \right) \times 100$$

En cuanto a la CC, las NPs con AM también mostraron valores más altos, alcanzando hasta un 59.68% en las condiciones de mayor concentración de TPP y AM. Esto contrasta con las NPs con AC, que presentaron una CC significativamente menor, con valores que no superan el 7.11%. La mayor CC observada en las NPs con AM refuerza la idea de que este AE es más adecuado para ser encapsulado en matrices de CS-FA debido a su mejor integración en la estructura polimérica.

La CC se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$CC = \left(\frac{\text{Masa de aceite cargado en NPs}}{\text{Peso de NPs obtenidas}} \right) \times 100$$

En resumen, los datos de la Tabla 9 mostraron que tanto la concentración de TPP como el tipo de AE utilizado tuvieron un impacto significativo en la eficiencia de encapsulamiento y la capacidad de carga de las NPs de CS-FA. Basado en estos resultados, se decidió proseguir con las NPs CS-FA cargadas con AM para su posterior adición con MTX, debido a su mayor EE y CC.

8.3.1 FT-IR

La caracterización mediante FT-IR se llevó a cabo para validar la incorporación del AM en las NPs de CS-FA con diferente contenido de FA (20 y 10%). En la Figura 18 se observó un ensanchamiento en la región 3372 cm^{-1} , atribuida a los enlaces de hidrógeno de los grupos -OH y -NH de las NPs de CS-FA. Comparando las muestras a y c (sin carga de AM) con las muestras b y d (con carga de AM), se notó que la señal en 3372 cm^{-1} es más estrecha en las muestras con AM, indicando interacciones y encapsulamiento con el AM. Además, se identificó un pico alargado y definido en 2920 cm^{-1} debido a la presencia de componentes del AM. Estos resultados confirman la formación de las NPs de CS-FA cargadas con AM y sugirieron la interacción efectiva entre los componentes del AM y la matriz de CS-FA.

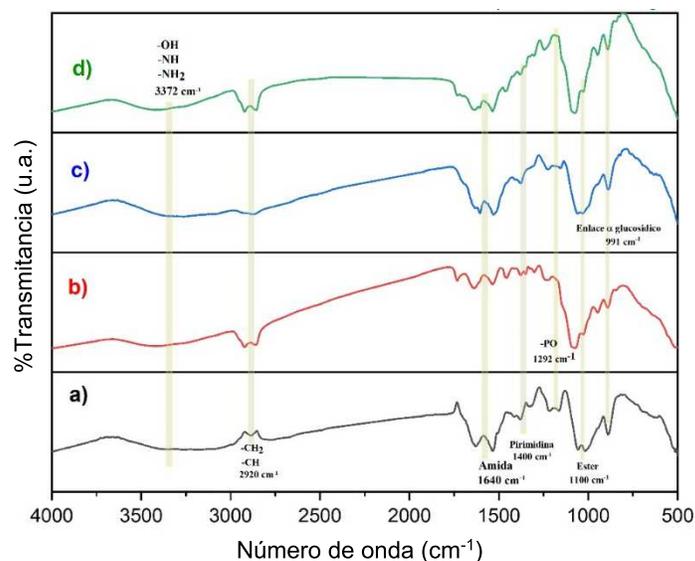


FIG. 18. Espectros de FT-IR de NPs CS-FA_{10%} y 20% sin (a y c) y con carga de AM (b y d).

8.3.2 TGA

Así mismo, se realizó TGA para conocer la pérdida de masa de las muestras de CS-FA con diferentes porcentajes de modificación y cargas. En la Figura 19 se presentaron los termogramas de NPs de CS-FA_{10%} y 20% cargadas con AM y MTX (CS-FA_{10%} AM-MTX, CS-FA_{20%} AM-MTX).

En los termogramas de la serie para las NPs de CS-FA_{10%} (Figura 19a), se observó que todas las muestras presentaron una pérdida de peso significativa alrededor de los 300 °C, característico de la degradación térmica del CS y sus derivados. Las NPs de CS-FA_{10%} mostraron una degradación significativa comenzando cerca de los 250 °C y continuando hasta aproximadamente 600 °C mientras que la curva de las NPs de CS-FA_{10%} AM mostró una mayor estabilidad térmica en comparación con la muestra CS-FA_{10%}. La adición de MTX pareció mejorar aún más la estabilidad térmica, con una degradación menos pronunciada en comparación con las muestras de CS-FA_{10%} y CS-FA_{10%} AM.

En la figura 19b, correspondiente a la serie de termogramas de las muestras de CS-FA_{20%}, se observaron características de degradación similar, pero con algunas diferencias notables. Las NPs de CS-FA_{20%} mostraron una degradación que inicia cerca de los 300 °C y se extiende hasta los 700 °C. La adición de AM mejora la estabilidad térmica, mostrando una pérdida de peso más gradual mientras que la combinación de AM-MTX proporcionó una mayor estabilidad térmica.

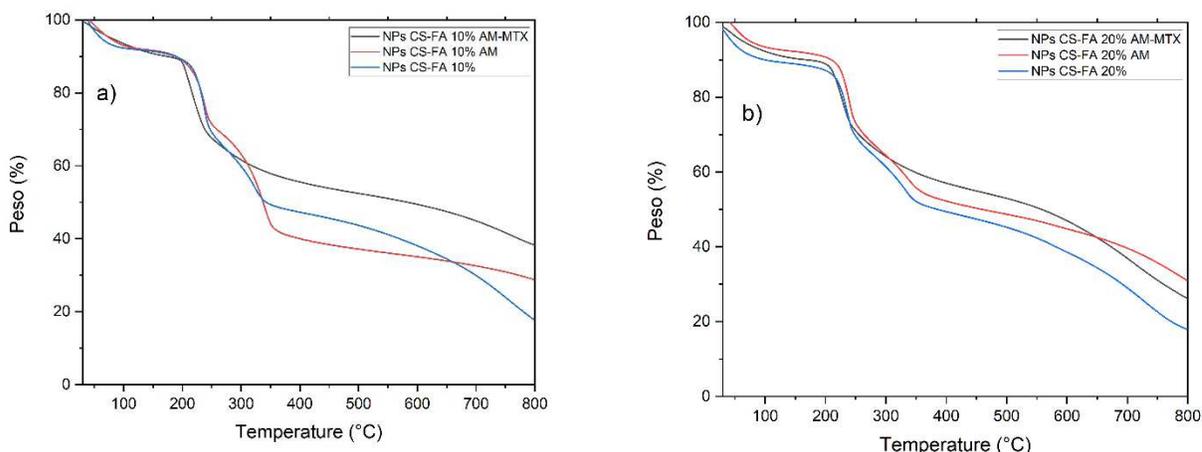


FIG. 19. Curvas TGA de NPs CS-FA 10 y 20%, NPs CS-FA 10 y 20% AM y NPs CS-FA 10 y 20% AM-MTX.

Al comparar los dos porcentajes de modificación de FA, se observó que las muestras CS-FA 20% mostraron una mayor estabilidad térmica en general, con la degradación comenzando a temperaturas más altas y extendiéndose a lo largo de un rango más amplio. Además, la carga de AM incrementó la estabilidad térmica en ambas muestras, pero el efecto es más pronunciado en la serie con CS-FA_{20%}. La adición de MTX contribuye a una mayor estabilidad térmica, especialmente en las formulaciones CS-FA_{20%}. Estos hallazgos sugirieron que tanto la concentración de FA como la carga de AM y MTX afectan significativamente la estabilidad térmica de las NPs de CS-FA. Los correspondientes TGA del AM y MTX fueron mostrados en el Anexo 10.1.

8.3.3 DSC

Las NPs de CS-FA con diferentes porcentajes de modificación y cargas mostraron variaciones en sus propiedades térmicas. Para el estudio del comportamiento térmico y la cantidad de calor que absorbieron o liberaron, las NPs de CS-FA fueron caracterizadas mediante DSC.

En la Figura 20, se presentaron los termogramas de DSC de las muestras CS-FA_{10%MA}, CS-FA_{20%MA}, CS-FA_{10%MA-MTX}, y CS-FA_{20%MA-MTX}. La figura 20a mostró la serie de termogramas para las muestras conteniendo 10 % de FA.

Las muestras de CS-FA_{10%}AM y CS-FA_{10%}AM-MTX mostraron un T_m en 96 y 91 °C respectivamente. El desplazamiento de T_m en la muestra CS-FA_{10%}AM sugirió una interacción significativa entre el AM y la matriz polimérica, incrementando la T_m. Estudios previos sobre microcápsulas de AE de canela han demostrado que la interacción entre el aceite y la matriz polimérica pudo aumentar la estabilidad térmica y la temperatura de fusión del sistema ^[92]. Por otro lado, la presencia de MTX pareció no afectar significativamente el T_m en comparación con la muestra sin carga.

En la figura 20b, se observaron picos endotérmicos a diferentes T_m: 98 °C para CS-FA_{20%}, 111 °C para CS-FA_{20%}AM y 102 °C para CS-FA_{20%}AM-MTX. En esta serie, destacó un aumento

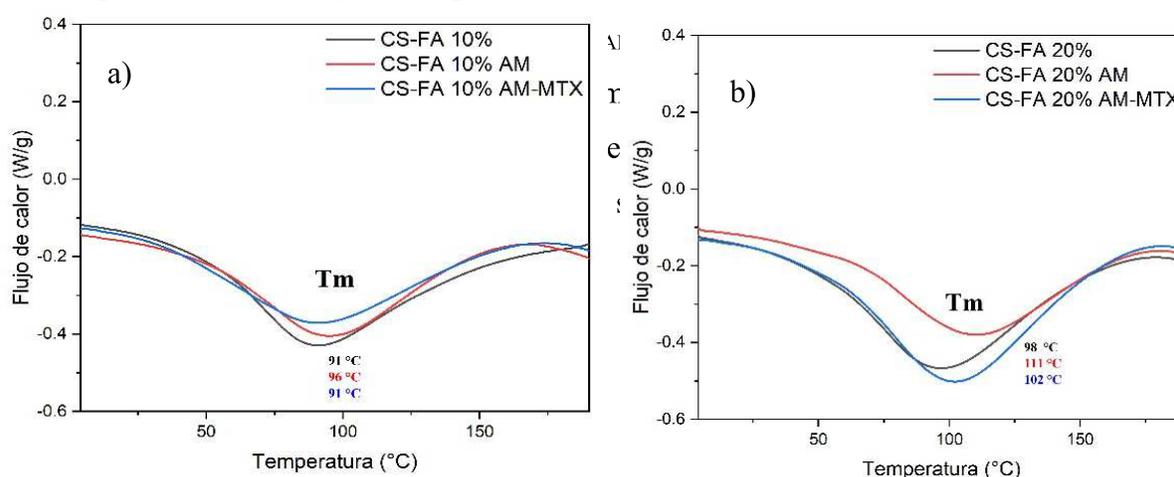


FIG. 20. Termogramas de DSC de NPs CS-FA conteniendo 10 (a) y 20% (b) de FA cargadas con AM y AM-MTX.

Al comparar las dos concentraciones de folato, las muestras con 20 % de FA mostraron un T_m más alto que las correspondientes muestras con 10 %, indicando una mayor estabilidad térmica con el aumento de la concentración de FA. Esto puede deberse a la presencia de más grupos carboxilato del FA y pudo aumentar las interacciones intermoleculares entre enlaces de hidrógeno entre los grupos amino del CS y los grupos carboxilato del FA, como los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas, dentro de la matriz del CS-FA.

Estos hallazgos sugirieron que tanto la concentración de folato como la carga de AM y MTX afectaron significativamente las propiedades térmicas de las NPs de CS-FA. Un mayor contenido de FA aumentó la estabilidad térmica, y la adición de AM mejora aún más esta estabilidad. La incorporación de MTX también contribuyó a un aumento en la T_m , especialmente en las formulaciones con mayor contenido de FA.

8.3.4 XRD

Se optó por emplear la técnica de XRD para investigar el eventual impacto de la modificación del CS con FA en la estructura cristalina resultante del CS. En la Figura 21 se presentaron los difractogramas de XRD de las NPs de CS-FA_{10%} AM, CS-FA_{20%} AM, CS-FA_{10%} AM-MTX, y CS-FA_{20%} AM-MTX.

En el difractograma de las NPs de CS-FA_{10%}, se observó un pico ancho alrededor de $2\theta = 20^\circ$, característico del CS en su forma semi-cristalina^[93] mientras que los difractogramas de las NPs de CS-FA_{10%} AM y CS-FA_{10%} AM-MTX presentaron patrones similares, con ligeras diferencias en la intensidad y la posición del pico, lo que sugirió una interacción entre el AM y el MTX con la matriz de CS. La presencia de un patrón difuso indicó que las NPs conservan una estructura predominantemente amorfa, aunque la inclusión de AM y MTX pareció inducir una leve reorganización en la matriz polimérica^[94].

En la segunda gráfica, correspondiente a las NPs de CS-FA conteniendo 20% de FA, se observaron patrones de difracción similares con un pico principal alrededor de $2\theta = 20^\circ$. Las muestras conteniendo AM y AM-MTX mostraron un aumento en la intensidad del pico, lo que indica una mayor organización estructural en presencia de estas cargas. La combinación de AM y MTX pareció tener un efecto sinérgico, aumentando la cristalinidad relativa de las NPs de CS-FA. El FA y el MTX tienen estructuras químicas similares, lo que facilita la formación de interacciones moleculares estables cuando se incorporan en las NPs de CS-FA. Estas interacciones pueden mejorar la organización y disposición molecular dentro de las NPs, aumentando así su cristalinidad relativa. Esta observación es consistente con lo reportado por estudios previos que mostraron una mejora en la cristalinidad cuando se incorporan agentes activos como en este caso MTX y AM^[88].

Al comparar las dos muestras de NPs con diferente contenido de FA, se observó que las muestras con 20% mostraron una mayor cristalinidad en comparación con las muestras con 10%. La carga de AM y MTX incrementó aún más esta cristalinidad, sugiriendo que estas cargas inducen una mejor organización en la estructura de CS. De acuerdo con Ruman y col. la modificación con agentes activos puede mejorar la organización estructural y la cristalinidad de las NPs de CS, lo cual es crucial para aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos [88].

Estos hallazgos sugirieron que tanto el porcentaje de FA como la carga de AM y MTX afectan significativamente la estructura cristalina de las NPs de CS-FA. Un mayor contenido de FA y la inclusión de estos agentes activos contribuyeron a una mayor organización estructural, lo cual es crucial para aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos donde la cristalinidad puede influir en la liberación y estabilidad del fármaco.

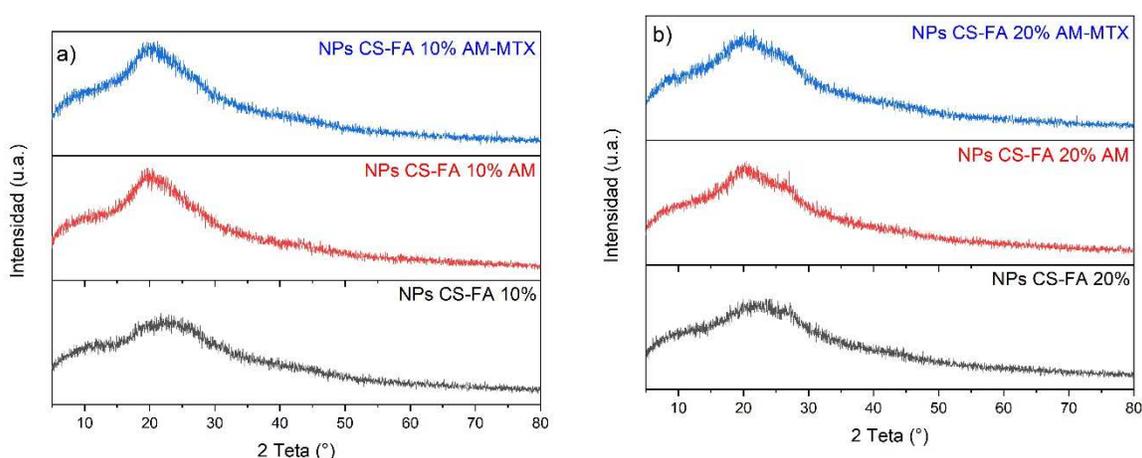


FIG. 21. Difractogramas de XRD conteniendo 10 (a) y 20% (b) de FA, en diferentes condiciones: sin carga, cargadas con AM, y cargadas con AM-MTX.

8.3.5 SEM y distribución de tamaños de partícula.

Posteriormente, para investigar la morfología y el tamaño de las NPs de CS-FA₁₀ y 20% AM, se llevaron a cabo estudios mediante SEM. En la micrografía de las NPs de CS-FA₁₀ AM (figura 22a), se observaron partículas esféricas con una distribución homogénea y bien dispersas, sin signos significativos de agregación. Esto sugirió una buena distribución del AM en la matriz polimérica. El histograma correspondiente (figura 22b) mostró un tamaño promedio de NPs



alrededor de 142 nm, con un rango de aproximadamente 71 a 267 nm. La distribución fue estrecha, indicando una buena uniformidad en el tamaño de las partículas.

FIG. 22. Micrografía por SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA_{10%AM}

Por otro lado, la micrografía de las NPs de CS-FA_{20%AM} (figura 23a) también mostró partículas esféricas, pero con una ligera tendencia a formar agregados. La morfología fue similar a la observada en las NPs conteniendo 10% de FA, aunque con una mayor variabilidad en el tamaño de las partículas. Por otro lado, el histograma (figura 23b) mostró una distribución de tamaño de partículas centrada alrededor de 110 nm, con un rango de aproximadamente 60 a 140 nm. La distribución fue más amplia en comparación con la muestra de CS-FA_{10%AM}, sugiriendo una mayor variabilidad en el tamaño de las partículas.

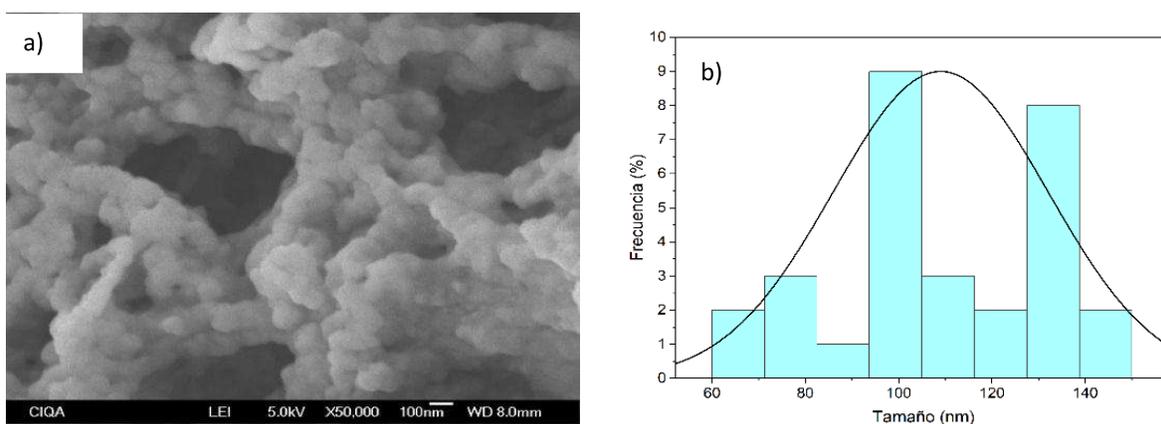


FIG. 23. Micrografía por SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA_{20%AM}

Al comparar las dos concentraciones de CS-FA, se observó que las NPs de CS-FA_{10%AM} tienen una distribución de tamaño de partículas más uniforme y menos agregación en

comparación con las NPs CS-FA_{20%}AM. El análisis de SEM reveló además que tanto la concentración de CS-FA como la carga de AM afectaron la morfología y la distribución de tamaño de las NPs. Las NPs CS-FA_{10%}AM presentaron una distribución más uniforme y menor tendencia a la agregación en comparación con las NPs de CS-FA_{20%}AM. La menor tendencia a la agregación en las NPs de CS-FA_{10%}AM se debe a la menor concentración de FA, que reduce las interacciones intermoleculares excesivas entre el CS y el FA, y a una carga moderada de AM, que mejora la estabilidad coloidal. En contraste, las NPs de CS-FA_{20%}AM, con mayor concentración de FA, tienen más sitios para interacciones intermoleculares entre el CS y el FA, lo que aumenta la agregación.

Estudios previos han demostrado que la modificación de NPs de CS con diferentes agentes activos puede influir significativamente en su morfología y distribución de tamaño. Negi y col. realizaron un estudio sobre la encapsulación de AE en NPs de CS y mostraron una distribución de tamaño uniforme y una morfología esférica, similar a la observada en este trabajo de tesis [95].

Por último, se decidió obtener las micrografías de SEM de las NPs cargadas con AM y MTX. En la micrografía de las NPs CS-FA_{10%}AM-MTX (figura 24a), se observó partículas esféricas con una buena dispersión, aunque con una ligera tendencia a la agregación. Las partículas presentan una distribución más heterogénea en comparación con las NPs de CS-FA_{10%}AM (figura 22a). Por otro lado, la micrografía de las NPs CS-FA_{20%}AM-MTX (figura 25a) también mostró partículas esféricas, pero con una mayor tendencia a formar agregados en comparación con la muestra al 10%. La dispersión es menos uniforme, lo que indica una mayor interacción entre las partículas.

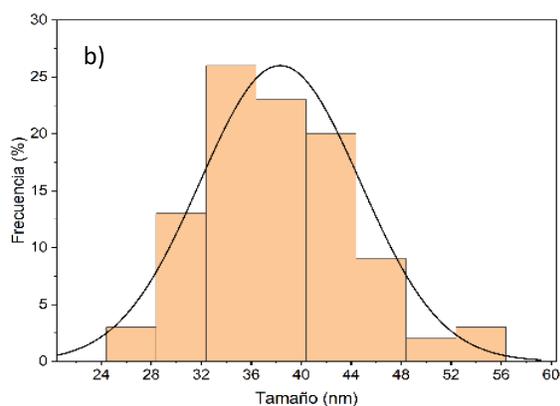
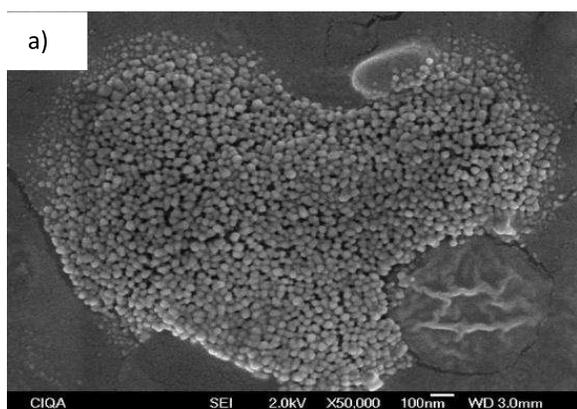


FIG. 24. Micrografía por SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de NPs CS-FA_{10%} AM-MTX

El histograma correspondiente a las NPs de CS-FA_{10%} AM-MTX (figura 24b) mostró una distribución de tamaño de partículas centrada alrededor de 36 nm, con un rango que variaba de aproximadamente 24 a 60 nm. La distribución fue relativamente estrecha, pero mostró mayor variabilidad en comparación con las NPs cargadas solo con AM. En contraste, el histograma de las NPs CS-FA_{20%} AM-MTX (figura 25b) mostró una distribución de tamaño de partículas centrada alrededor de 40 nm, con un rango de aproximadamente 30 a 90 nm. La distribución fue más amplia, indicando una mayor variabilidad en el tamaño de las partículas en comparación con las NPs conteniendo 10% de FA.

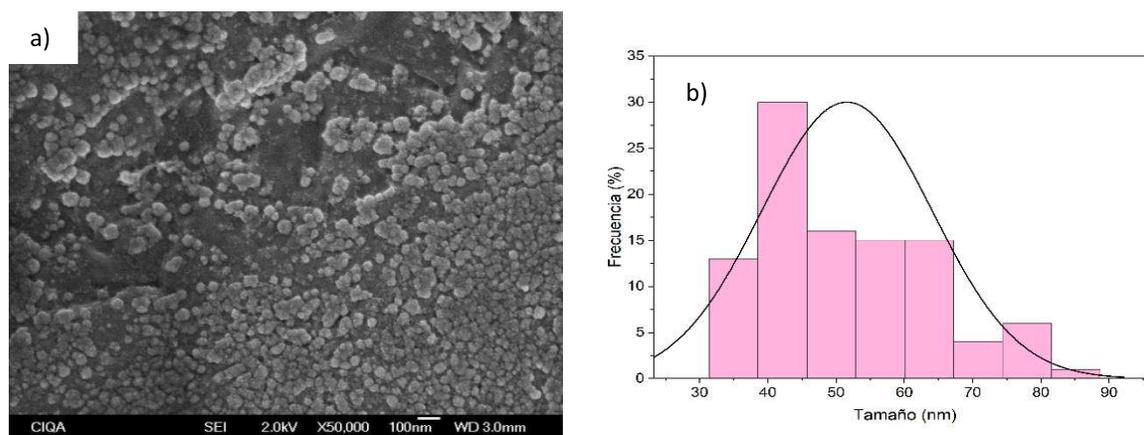


FIG. 25. Micrografía de SEM (a) y distribución de tamaño de partículas (b) de las NPs CS-FA_{20%} AM-MTX

Al comparar las muestras de CS-FA_{10%} AM-MTX y CS-FA_{20%} AM-MTX se observó que las NPs CS-FA_{10%} AM-MTX tienen una distribución de tamaño de partículas más uniforme y menos agregación en comparación con las CS-FA_{20%} AM-MTX. La mayor concentración de FA pareció inducir una mayor variabilidad en el tamaño de las partículas y una ligera tendencia a la agregación. Esto se pudo atribuir a la mayor cantidad de grupos funcionales en la superficie de las NPs, que aumenta las interacciones entre partículas, promovió la formación de agregados [96].

El análisis de SEM y los histogramas revelaron que tanto el contenido de FA como la carga de AM y MTX afectan significativamente la morfología y la distribución de tamaño de las NPs. Las NPs CS-FA_{10%}AM-MTX presentaron una distribución más uniforme y menor tendencia a la agregación en comparación con las NPs CS-FA_{20%}AM-MTX, esto podría deberse a una mejor integración del AM en la matriz polimérica, mientras que a una mayor concentración (20%) podría causar una saturación, lo que incrementa la tendencia a la agregación. La mayor concentración de FA y la adición de MTX incrementaron la variabilidad en el tamaño de las partículas y la tendencia a la agregación, lo cual fue crucial para el diseño y aplicación de estas NPs en sistemas de liberación controlada de fármacos [97].

Estos hallazgos subrayaron la importancia de optimizar la concentración de FA y la carga de agentes activos en el desarrollo de NPs para aplicaciones biomédicas, aseguraron una distribución de un tamaño uniforme y una estabilidad coloidal adecuada para su eficacia en sistemas de liberación de fármacos.

8.4 Perfiles de Liberación

Se realizaron ensayos de liberación utilizando NPs de CS-FA encapsuladas con AM y MTX. Se observaron valores de absorción más altos de lo esperado, indicando más mg de AE de menta liberados que los encapsulados. La absorción del FA, CS y MTX cerca de la misma longitud de onda (223 nm) pudo causar interferencias. Según estudios, el FA tiene picos de absorción a 280 y 350 nm, mientras que el MTX también absorbe en el rango de 310 nm, lo que pudo superponerse con las mediciones del AE de menta (223 nm). La fotodegradación del FA bajo exposición UV es un fenómeno bien documentado. La irradiación UV causa la ruptura del enlace C9-N10 en el FA, produciendo p-aminobenzoyl-L-acido glutámico y 6-formyl pteridina, que pueden interferir en las mediciones [98].

En el contexto de la liberación de fármacos utilizando NPs de CS-FA, fue crucial considerar cómo diferentes condiciones de pH pudieron afectar la estabilidad de las NPs. Los estudios han demostrado que tanto condiciones altamente ácidas (pH < 4) como muy básicas (pH > 9) pueden desestabilizar las NPs al afectar los enlaces amida que unen el FA al CS. En condiciones de pH extremas, los enlaces amina que conectan el FA con el CS pueden sufrir

hidrólisis. Esto ocurre debido a la protonación excesiva de los grupos amina en medios ácidos o a la deprotonación en medios básicos, lo que compromete la integridad estructural de las NPs y puede llevar a su desintegración prematura y a la liberación de los compuestos encapsulados.

Un estudio publicado por Frigaard y col. destacó que los cambios en el pH del medio pueden influir significativamente en la estabilidad de las NPs de CS. Se observó que bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 4$) y básicas ($\text{pH} > 9$), las NPs mostraron una tendencia aumentada a la desintegración debido a la alteración de los enlaces químicos que mantienen la estructura de las NPs ^[99]. Otro artículo publicado por Off y col. explicó cómo el FA es susceptible a la degradación cuando se expone a la radiación UV. Aunque el estudio se centró en la degradación por UV, también menciona que las condiciones del medio, incluido el pH, pudieron influir en la estabilidad de los enlaces químicos dentro del FA, lo que fue consistente con la observación de que el pH extremo puede desestabilizar las NPs de CS-FA. La densidad de potencia utilizada en este trabajo ($8.39 \times 10^{-71} \text{ mW/cm}^2$ a 223 nm en un equipo JENWAY modelo 7305) fue considerablemente baja y, según el trabajo reportado por Off y col. ^[98], no debería ser suficiente para causar una fotodegradación significativa de los compuestos en las NPs de CS-FA. Sin embargo, las señales pudieron superponerse debido a la proximidad de las longitudes de onda de absorción del FA, CS, AM y MTX, lo que pudo complicar las mediciones precisas en el equipo de UV-Vis utilizado. Para resolver este problema, se recomienda considerar métodos alternativos como HPLC para separar y cuantificar individualmente los componentes antes de la medición.

8.5 Ensayos de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular son una herramienta fundamental en la investigación biomédica y farmacológica. Estos ensayos se desarrollaron para evaluar la citotoxicidad de diversos compuestos químicos en células vivas, permitiendo determinar su potencial terapéutico o tóxico. A lo largo de los años, la metodología ha evolucionado, incorporando técnicas avanzadas como la citometría de flujo, la microscopía de fluorescencia y los análisis colorimétricos, que han mejorado la precisión y la capacidad de estos ensayos para cuantificar la viabilidad celular ^[100].

En el contexto de la terapia con NPs, los ensayos de viabilidad celular permiten evaluar la

eficacia y seguridad de las NPs cargadas con fármacos. En esta sección, se presentan los resultados de los ensayos realizados para determinar la eficiencia del MTX y del DMSO como diluyente, así como la efectividad de las NPs de CS-FA en líneas celulares tumorales. Estos estudios son cruciales para comprender cómo las diferentes formulaciones y componentes afectan la viabilidad de las células, permitiendo optimizar las condiciones de tratamiento para obtener resultados terapéuticos más efectivos y seguros.

La evaluación de la viabilidad celular no solo proporciona información sobre la citotoxicidad de los compuestos, sino que también ayuda a identificar las concentraciones óptimas de los fármacos. Con esta herramienta, se puede mejorar el diseño y la funcionalidad de las NPs para aplicaciones específicas en terapia anticancerígena, contribuyendo significativamente al desarrollo de tratamientos más precisos y eficientes ^[101].

7.5.1 Ensayo de viabilidad celular MTX (Accord y R&D)

Para evaluar la viabilidad celular de las NPs de CS-FA₁₀ y 20%, CS-FA₁₀ y 20% AM y cargadas con AM-MTX (R&D) se llevaron a cabo una serie de ensayos preliminares. En primer lugar, se analizaron dos variantes comerciales de MTX, R&D y Accord, con el objetivo de determinar la dosis óptima para la carga en las NPs CS-FA. Paralelamente, se examinó la citotoxicidad del DMSO, utilizado como agente diluyente del MTX-R&D, en líneas celulares tumorales de pulmón (A549) y de mama (MDA-MB-231). Se prepararon curvas de dosis-respuesta para ambas variantes de MTX. El MTX-R&D se disolvió en DMSO en dos soluciones stock: 10.54 μM y 800 μM . La Tabla 10 detalla la preparación de los tratamientos de MTX-R&D disueltos en DMSO, junto con el porcentaje de DMSO utilizado por mL para cada concentración (1, 10, 100 μM).

Tabla 10. Concentraciones finales de MTX y porcentaje de DMSO sin Citotoxicidad en las células cancerígenas MDA-MB-231 y A549.

[MTX]final μM	[MTX]final μM	DMSO final (en 1 mL, %v/v)	MTX (mg)
1	1.25 (stock 800 μM)	0.125%	0.027
10	0.95 (stock 10.54 μM)	0.095%	0.020
100	9.5 (stock 10.54 μM)	0.95%	0.204

En la Figura 26, se presentaron las células tumorales de pulmón A549 tratadas durante 24 h con diferentes dosis de MTX-R&D (1, 10 y 100 μM). En el inciso a) (Variación en la concentración de MTX- R&D sobre celulares tumorales A549), se observó la falta de efecto citotóxico del MTX-R&D en todas las concentraciones comparadas contra con el control sin tratamiento. Además, en el inciso b), se mostró un acercamiento digital (5X) en campos aleatorios de cada concentración de la curva. La morfología de las células tumorales A549 en cada concentración de MTX-R&D fue similar a la del control, lo que sugiere que el tratamiento no tuvo efecto sobre las células y concuerda con la falta de citotoxicidad del inciso a).

En las Figuras 27a y 27b, se observó que el tratamiento con MTX-R&D en células tumorales de mama, MDA-MB-231, tampoco afectó la viabilidad ni la morfología celular. Estos resultados indicaron que el tratamiento con MTX-R&D no alteró la viabilidad celular ni la morfología de las líneas celulares tumorales A549 y MDA-MB-231. Además, se observó que el porcentaje final de DMSO utilizado para preparar cada una de las concentraciones (1, 10 y 100 μM) no afectó la viabilidad celular ni la morfología (ver Tabla 10). Estos resultados están respaldados por estudios donde evaluaron la citotoxicidad del DMSO y determinaron que concentraciones de DMSO inferiores al 2% no afectan la viabilidad celular en diferentes líneas celulares de leucemia ^[102]. Asimismo, en líneas celulares tumorales de origen epitelial, se ha demostrado que el efecto citotóxico del DMSO es a partir del 1.3% de concentración final ^[103].

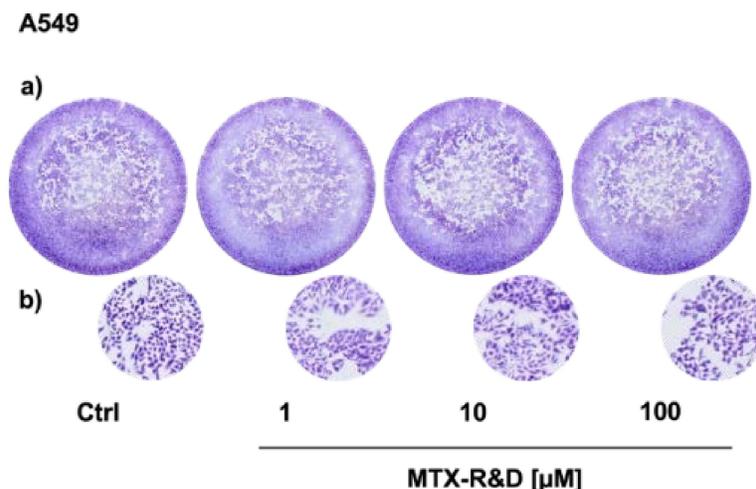


FIG. 26. Citotoxicidad inducida por MTX- R&D Systems en células tumorales de pulmón A-549.

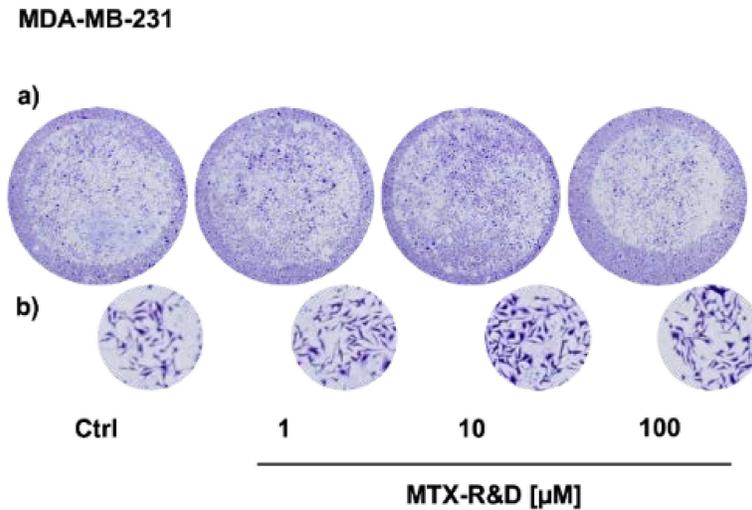


FIG. 27. Citotoxicidad inducida por MTX- R&D Systems en células tumorales de mama MDA-MB-231.

Para complementar el análisis, se usó MTX-Accord (presentación inyectable) para tratar las células A549 y MDA-MB-231 utilizando las concentraciones determinadas anteriormente (1, 10, 100 y 1000 μM) durante 24 h. En la Figura 28, se apreció que la viabilidad celular en las células A549 disminuyó con el tratamiento de MTX-Accord en todas las concentraciones: aproximadamente 77.98, 68.95, 68.95 y 72.31% a 1, 10, 100 y 1000 μM respectivamente (Figura 28, inciso c). Del mismo modo, en el inciso b), se observó que la morfología de las células A549 no se ve afectada por los tratamientos en comparación con el control.

En contraste, el tratamiento de las células MDA-MB-231 con MTX-Accord, a las mismas concentraciones (1, 10, 100 y 1000 μM), no mostró efectos citotóxicos sobre la viabilidad celular en comparación con el control (Figura 29, inciso a y c). De igual forma, la morfología en cada concentración utilizada no presentó modificaciones respecto al control (Figura 29, inciso b).

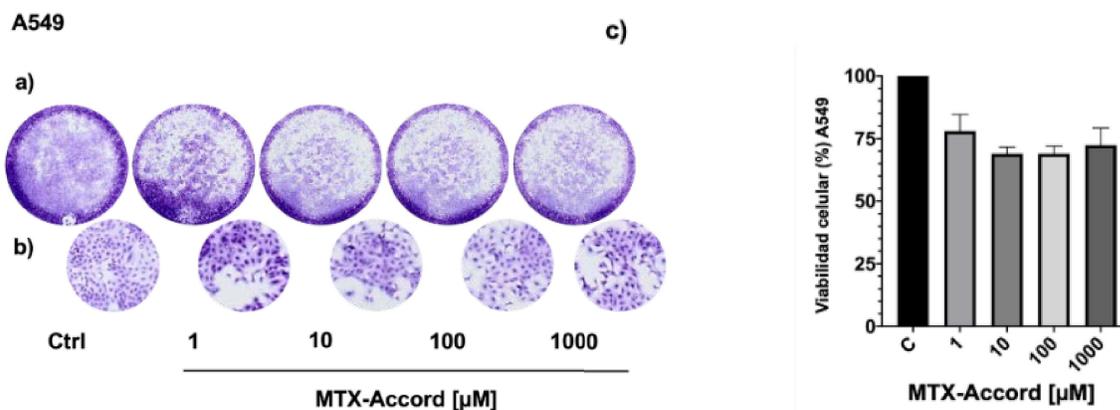


FIG. 28. Citotoxicidad inducida por MTX-Accord en células tumorales de pulmón A-549.

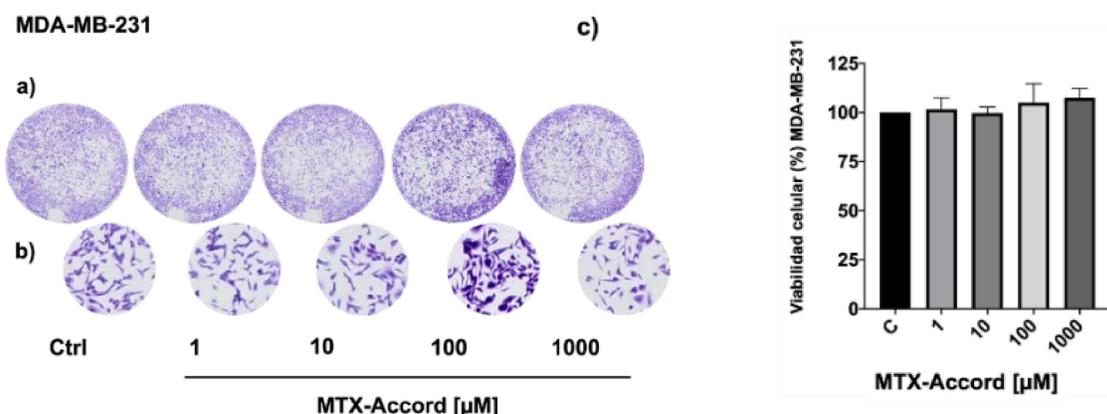


FIG. 29. Citotoxicidad inducida por MTX-Accord en células tumorales de mama MDA-MB-231.

Los resultados obtenidos en los tratamientos con MTX-R&D, en contraste con MTX-Accord, sugieren que el primero perdió su efecto biológico, como se observa en los tratamientos en células A549 y MDA-MB-231 (Figuras 26 y 27). Aunque el MTX-Accord no mostró efectos citotóxicos sobre las células MDA-MB-231 (Figura 29), sí afectó la viabilidad celular en las células A549 (Figura 28), donde se observaron niveles de citotoxicidad de aproximadamente el 20% en todos los tratamientos de la curva.

7.5.2 Ensayo de viabilidad celular de NPs CS-FA₁₀ y 20% cargadas con AM-MTX (R&D).

Se evaluó la viabilidad celular en cultivos de células tumorales A549 tratadas con NPs de CS-FA_{10%} y 20%, NPs de CS-FA_{10%} y 20% AM y NPs de CS-FA_{10%} y 20% AM-MTX. Las curvas dosis-respuesta mostraron el efecto citotóxico de cada una de las NPs (figura 30).

A continuación, se presenta un análisis detallado de los resultados obtenidos:

- **NPs de CS**

Se pudo observar que la viabilidad celular no se vio afectada aproximadamente en todas las concentraciones (2.25, 4.5, 9 y 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura a). Este comportamiento sugirió que el CS por sí solo no tuvo un efecto citotóxico significativo. Los resultados obtenidos son consistentes con estudios previos que reportaron baja citotoxicidad del CS [104].

- **AM**

El tratamiento de las células A549 con AM (imagen b) demostró baja citotoxicidad en todas las concentraciones de la curva dosis-respuesta, siendo la concentración de 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la que más afectó la viabilidad celular de la línea tumoral ($\sim 90\%$). Este resultado indicó una baja citotoxicidad del AM, lo cual concordó con estudios previos que demostraron la seguridad del AM a bajas concentraciones [105].

- **NPs CS-FA₁₀ y 20%**

En la gráfica de las NPs de CS-FA _{10%} y _{20%} (imágenes c y d) se observó una baja citotoxicidad inducida por ambas NPs. En todas las concentraciones de la curva dosis-respuesta de ambas NPs se observó una alta viabilidad celular ($\sim 85\%$). Esto sugirió que una mayor modificación con FA pudo incrementar ligeramente la citotoxicidad, probablemente debido a una mayor presencia de grupos carboxilato y su capacidad para formar interacciones más fuertes con las membranas celulares [106].

- **NPs CS-FA₁₀ y 20%AM**

En las figuras e y f, las NPs de CS-FA_{10%} AM se observó una reducción máxima de la viabilidad celular en 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (obteniendo $\sim 70\%$ viabilidad celular); sin embargo, a 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó un ligero incremento de la viabilidad celular ($\sim 15\%$). Del mismo modo, las NPs con 20% de modificación mostraron una tendencia similar a las del 10% teniendo una máxima citotoxicidad a concentraciones de 4.5 y 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Así mismo, las NPs CS-FA_{20%AM} demostraron un incremento de la viabilidad celular a 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto se ha demostrado en estudios previos donde la encapsulación de AE en matrices de CS mejora el efecto terapéutico, disminuyendo la viabilidad celular [106].

- NPs CS-FA₁₀ y 20%AM-MTX

En la figura 30 incisos g y h se observaron las NPs cargadas con AM-MTX, ambas mostraron una viabilidad celular menor con respecto a las NPs CS-FA₁₀ Y 20% y NPs CS-FA₁₀ Y 20% AM (~60% de viabilidad celular) a una concentración de 9 µg/mL, por lo tanto la citotoxicidad que presentaron estas NPs CS-FA₁₀Y20% AM-MTX fue alrededor del 40%; sin embargo en la concentración de 18 µg/mL se observó un ligero incremento de la viabilidad celular (~20%), esto comparado con las NPs CS-FA₁₀ Y 20% y NPs CS-FA₁₀ Y 20% AM . Esto sugirió que el MTX encapsulado indujo una reducción de la viabilidad celular y un incremento en la citotoxicidad con respecto a las NPs CS-FA₁₀ Y 20% AM. Estos resultados sugirieron que estas NPs podrían tener potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer ^[107].

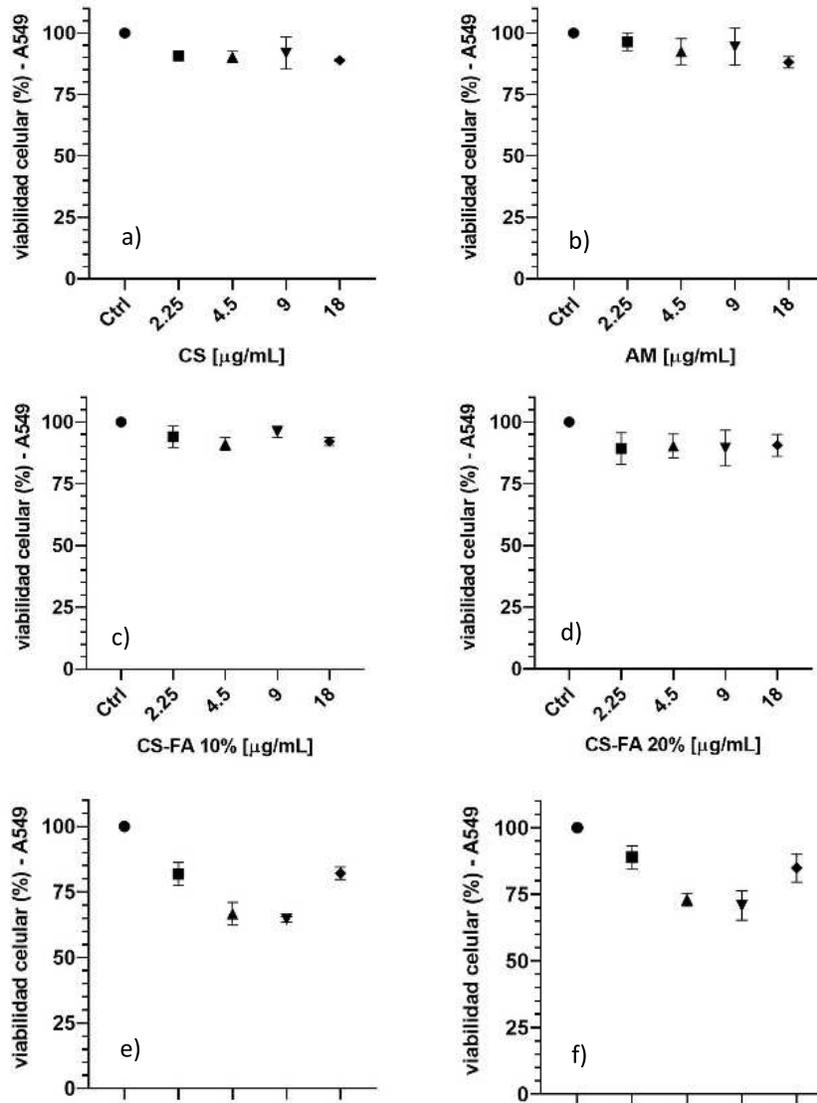


FIG. 30. Efecto citotóxico de las NPs CS (a), AM (b), NPs CS-FA_{10 y 20%} (c y d), NPs CS-FA_{10 y 20%} AM (e y f) y NPs CS-FA_{10 y 20%} AM-MTX (g y h). Las gráficas representan la media±SD de al menos 3 experimentos independientes.

Estos resultados, apoyados por estudios previos, demuestran el potencial de las NPs de CS-FA modificadas y cargadas con AM y MTX como una plataforma efectiva para la administración de agentes anticancerígenos ^[104-107].

9. CONCLUSIÓN

En esta tesis se exploró la síntesis y caracterización de NPs CS-FA cargadas con AE-MTX para su potencial uso como nanoacarreadores de agentes anticancerígenos. Se logró la modificación del CS con FA, confirmada mediante diversas técnicas de caracterización (FT-IR, RMN, TGA, XRD y DSC), evidenciando la incorporación efectiva del FA en la estructura del CS. La concentración de FA y DMSO influyó significativamente en el porcentaje de injerto de FA. A mayores concentraciones de ambos, se obtuvieron mayores porcentajes de modificación.

Las NPs de CS-FA fueron preparadas mediante el método de gelación iónica, utilizando CS modificado con FA al 10 y 20% obteniéndose NPs estables y homogéneas. Las NPs de CS-FA_{20%} demostraron una mayor estabilidad térmica en comparación con las NPs CS-FA_{10%}, y una alta capacidad de carga tanto para el AM como para el MTX.

Adicionalmente, se encontró que el AC se encapsuló en menor medida que el AM y que la concentración de TPP tuvo una influencia notable en la formación de las NPs. Además, se observó que a mayores concentraciones de TPP resultaron en valores mayores de EE y CC,

debido a una red polimérica más densa y estable formada por los enlaces cruzados iónicos entre los grupos fosfato del TPP y los grupos amino del CS.

Las imágenes obtenidas mediante SEM revelaron que las NPs de CS-FA presentan una forma esférica y una distribución de tamaño homogénea. Particularmente, las NPs CS-FA20% presentaron un tamaño promedio menor y una distribución más estrecha en comparación con las NPs CS-FA10%, lo que se atribuye a una mayor densidad de reticulación iónica con el TPP. Las NPs CS-FA_{10%AM} exhibieron una morfología esférica y una distribución homogénea en tamaño, sin agregación significativa. En contraste, las NPs CS-FA_{20%AM} presentaron una tendencia a la agregación y un aumento en el tamaño de las NPs, atribuible al porcentaje de FA.

Las NPs CS-FA_{10%AM-MTX} mostraron una morfología esférica con tendencia a la agregación y una variabilidad en el tamaño de las NPs en comparación con las NPs CS-FA_{10%AM} y 20%_{AM}. Por otro lado, las NPs CS-FA_{20%AM-MTX} exhibieron una tendencia a la agregación y una mayor variabilidad en el tamaño, atribuida a la concentración de FA y las interacciones intermoleculares entre CS con AM y MTX.

Se identificaron desafíos relacionados con las interferencias en las mediciones UV-Vis y la foto degradación de los compuestos bajo exposición UV. Además, el pH del medio afectó la estabilidad de las NPs, lo que influyó en la precisión de las mediciones.

Los estudios de citotoxicidad en línea celular de cáncer de pulmón demostraron actividad anticancerígena de las NPs de CS-FA cargadas con AE y MTX, reduciendo significativamente la viabilidad celular.

Finalmente, las NPs de CS-FA cargadas con AE y MTX representan una plataforma prometedora para la administración selectiva y controlada de agentes anticancerígenos. Es necesario continuar investigando para optimizar las condiciones liberación, así como para minimizar las interferencias en las mediciones, con el fin de mejorar la precisión y efectividad de estos sistemas nanoestructurados. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en el desarrollo de terapias más eficaces y seguras para el tratamiento del cáncer.

10. REFERENCIAS

1. Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70659-x](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70659-x).
2. Van Bavel, N., Issler, T., Pang, L., Anikovskiy, M., & Prenner, E.J. (2023). A Simple Method for Synthesis of Chitosan Nanoparticles with Ionic Gelation and Homogenization. *Molecules*, 28, 4328. <https://doi.org/10.3390/molecules28114328>.
3. Pieroth, R., Paver, S., Day, S., & Lammersfeld, C. (2018). Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Current Nutrition Reports*, 7(3), 70-84. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0237-y>.
4. Koźmiński, P., Halik, P.K., Chesori, R., & Gniazdowska, E. (2020). Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3483. <https://doi.org/10.3390/ijms21103483>.
5. Zhao, Y., Pan, H., Liu, W., Liu, E., Pang, Y., Gao, H., He, Q., Liao, W., Yao, Y., Zeng, J., & Guo, J. (2023). Menthol: An Underestimated Anticancer Agent. *Frontiers*

- in Pharmacology*, 14, 1148790. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1148790>.
6. Salaverry, O. (n.d.). La etimología del cáncer y su curioso curso histórico. Recuperado de <https://www.getty.edu>.
 7. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.
 8. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
 9. Chabner, B. A., & Roberts, T. G. (2005). Chemotherapy and the War on Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 65–72. <https://doi.org/10.1038/nrc1529>.
 10. Oncología Médica y Cuidados Paliativos. Estudio de Campo. Ponencia VIII Congreso de SEOM, Valencia 2002; pp121. Camps Herrero, C., & Blasco Cordellat, A. Agentes Antineoplásicos: Dosis, Indicaciones y Efectos Secundarios.
 11. Spain, V.V. (2023). Clasificación ATC-I01: Antineoplásicos. *Vademecum.es*. Recuperado de <https://www.vademecum.es/atc-i01>.
 12. Benedí, J., & Gómez del Río, M. Á. (2006). Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional*, 20(2), 60–65. [https://doi.org/10.1016/s0188-8145\(06\)70011-4](https://doi.org/10.1016/s0188-8145(06)70011-4).
 13. Pimentel-Gutiérrez, H. J., Bobadilla-Morales, L., Barba-Barba, C. C., Ortega-De-La-Torre, C., Sánchez-Zubieta, F. A., & Corona-Rivera, J. R. (2016). Curcumin Potentiates the Effect of Chemotherapy Against Acute Lymphoblastic Leukemia Cells via Downregulation of NF-κB. *Oncology Letters*, 12(5), 4117–4124. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5217>.
 14. Xu, T., Guo, P., He, Y., Pi, C., Wang, Y., Feng, X., & Wei, Y. (2020). Application of Curcumin and Its Derivatives in Tumor Multidrug Resistance. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.6694>.
 15. Rudnik, L. A. C., Farago, P. V., Manfron Budel, J., Lyra, A., Barboza, F. M., Klein, T., & Zanin, S. M. W. (2020). Co-Loaded Curcumin and Methotrexate Nanocapsules Enhance Cytotoxicity Against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Molecules*, 25(8), 1913. <https://doi.org/10.3390/molecules25081913>.
 16. Boehm, K., Büssing, A., & Ostermann, T. (2012). Aromatherapy as an Adjuvant Treatment in Cancer Care – A Descriptive Systematic Review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 9(4), 503-518. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i4.7>.

17. Koulivand, P. H., Ghadiri, M. K., & Gorji, A. (2013). Lavender and the Nervous System. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 681304. <https://doi.org/10.1155/2013/681304>.
18. Mahdavian, S., Fallahi, M., & Khatony, A. (2021). Comparing the Effect of Aromatherapy with Peppermint and Lavender Essential Oils on Fatigue of Cardiac Patients: A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 9925945. <https://doi.org/10.1155/2021/9925945>.
19. McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619–633. <https://doi.org/10.1002/ptr.1936>.
20. Haro-González, J. N., Castillo-Herrera, G. A., Martínez-Velázquez, M., & Espinosa-Andrews, H. (2021). Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. *Molecules*, 26(21), 6387. <https://doi.org/10.3390/molecules26216387>.
21. Van Bavel, N., Issler, T., Pang, L., Anikovskiy, M., & Prenner, E.J. (2023). A Simple Method for Synthesis of Chitosan Nanoparticles with Ionic Gelation and Homogenization. *Molecules*, 28, 4328. <https://doi.org/10.3390/molecules28114328>.
22. Nirmala, M. J., Kizhuveetil, U., Johnson, A., Nagarajan, R., & Muthuvijayan, V. (2023). Cancer Nanomedicine: A Review of Nano-Therapeutics and Challenges Ahead. *RSC Advances*, 13(13), 8606-8629. <https://doi.org/10.1039/d2ra07863e>.
23. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 751-760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>.
24. Mohammed, S. M., Mohammed, A., & Al-Rawi, K. F. (2022). Novel Combination of Multi-Walled Carbon Nanotubes and Gold Nanocomposite for Photothermal Therapy in Human Breast Cancer Model. *Steroids*, 186, 109091. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109091>.
25. Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., & Uddin, M. J. (2018). Smart Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy and Toxicity Studies: A Review. *Journal of Advanced Research*.

- <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.005>.
26. El Moukhtari, S. H., Rodríguez-Nogales, C., & Blanco-Prieto, M. J. (2021). Oral Lipid Nanomedicines: Current Status and Future Perspectives in Cancer Treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 173, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.004>.
 27. Chamundeeswari, M., Jeslin, J., & Verma, M. L. (2019). Nanocarriers for Drug Delivery Applications. *Environmental Chemistry Letters*, 17(2), 849–865. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00841-1>.
 28. Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., & Maiti, P. (2018). Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3, 7. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>.
 29. Quader, S., & Kataoka, K. (2017). Nanomaterial-Enabled Cancer Therapy. *Molecular Therapy*, 25(7), 1501-1513. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.026>.
 30. Alshehri, S., Imam, S. S., Rizwanullah, M., Akhter, S., Mahdi, W., Kazi, M., & Ahmad, J. (2020). Progress of Cancer Nanotechnology as Diagnostics, Therapeutics, and Theranostics Nanomedicine: Preclinical Promise and Translational Challenges. *Pharmaceutics*, 13(1), 24. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010024>.
 31. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*, 33(10), 2373-2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>.
 32. Borja-Borja, J. M., & Rojas-Oviedo, B. S. (2020). Nanomateriales: Métodos de Síntesis. *Polo del Conocimiento: Revista Científico - Profesional*, 5(8), 426-445. <https://doi.org/10.23857/pc.v5i8.1597>.
 33. Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., & Alcudia, A. (2020). Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials*, 10(7), 1403. <https://doi.org/10.3390/nano10071403>.
 34. Xu, X., Ho, W., & Zhang, X. (2016). Berberine-Loaded Polymeric Nanoparticles with Sustained Release for the Treatment of Colon Cancer. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(33), 43797.

35. Bhavsar, Z., & Raval, A. (2019). Biodegradable Polymeric Nanoparticles: A Review on Fabrication, Characterization and Therapeutic Applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101138.
36. Ibrahim, H. M., Farid, O. A., Samir, A., & Mosaad, R. M. (2018). Preparation of Chitosan Antioxidant Nanoparticles as Drug Delivery System for Enhancing of Anti-Cancer Drug. *Key Engineering Materials*, 759, 92–97. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.759.92>.
37. Fernández, M. J. A. (2003, 20 junio). WO2004112758A1 - NPs de ácido hialurónico - Google Patents. Recuperado de <https://patents.google.com/patent/WO2004112758A1/es>.
38. Jain, R. A. (2015). The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable Poly (Lactide-co-Glycolide) (PLGA) Devices. *Biomaterials*, 21(23), 2475-2490. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00115-0).
39. Mikušová, V., & Mikuš, P. (2021). Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9652. <https://doi.org/10.3390/ijms22179652>.
40. Fan, W., Yan, W., Xu, Z., Ni, H., Chen, Q., & Zhu, J. (2021). Chitosan-Based Nanocarriers for the Enhanced Delivery of Methotrexate in Cancer Therapy: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 220-234.
41. Pacheco, C. C., Sousa, F., & Neves, J. (2020). Chitosan-Based Nanomedicine for Brain Delivery: Where Are We Heading? *Reactive & Functional Polymers*, 146, 104430. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104430>.
42. Roberts, T. W. (1975). The Pathology of Cancer. *Journal of the National Medical Association*, 67(5), 368–371. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511816642.003>.
43. Govindan, R., Kadaikunnan, S., Ramachandran, G., Chackaravarthi, G., Chelliah, C. K., Maruthupandy, M., Natesan, M., Quero, F., & Li, W. J. (2023). Anti-Cancer Ability of Chitosan Nanoparticles Loaded Plant Essential Oil Evaluated Against A549 Human Lung Cancer Cells Through In Vitro Approaches. *Journal of King Saud University - Science*, 35(4), 02598. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102598>.
44. Alipanah, H., Yarian, F., Rasti, F., Safari, M., Hatami, S., & Osanloo, M. (2022). Cytotoxic Effects of Chitosan Nanoparticles Containing Zataria multiflora Essential

- Oil Against Human Breast and Melanoma Cells. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00241-z>.
45. Martín, V., Morales, H., Me, G., & Lara, V. Y. R. (s/f). ARS Pharmaceutica ISSN: 0004-2 <http://farmacia.ugr.es/ars/>. Recuperado el 12 de mayo de 2023, de <https://core.ac.uk/download/pdf/268374884.pdf>.
 46. Mu, W., Chu, Q., Liu, Y., & Zhang, N. (2020). A Review on Nano-Based Drug Delivery System for Cancer Chemoimmunotherapy. *Nanomicro Letters*, 12(1), 142. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-00482-6>.
 47. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
 48. Chabner, B. A., & Roberts, T. G. (2005). Chemotherapy and the War on Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 65–72. <https://doi.org/10.1038/nrc1529>.
 49. Sudimack, J., & Lee, R. J. (2000). Targeted Drug Delivery via the Folate Receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41(2), 147-162. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(99\)00062-9](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(99)00062-9). Zwicke GL, Mansoori GA, Jeffery CJ. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Rev.* 2012;3. doi: 10.3402/nano.v3i0.18496. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23240070; PMCID: PMC3521101.
 50. Song, H., Su, C., Cui, W., Zhu, B., Liu, L., Chen, Z., & Zhao, L. (2013). Folic acid-chitosan conjugated nanoparticles for improving tumor-targeted drug delivery. *Biomed Research International*, 2013, 723158. <https://doi.org/10.1155/2013/723158>. PMID: 24282819; PMCID: PMC3825055.
 51. Fan, L., Li, F., Zhang, H., Wang, Y., Cheng, C., Li, X., Gu, C.H., Yang, Q., Wu, H., & Zhang, S. (2010). Co-delivery of PDTC and doxorubicin by multifunctional micellar nanoparticles to achieve active targeted drug delivery and overcome multidrug resistance. *Biomaterials*, 31(21), 5634-5642. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.066>. PMID: 20430433.
 52. Kesharwani, P., Jain, K., & Jain, N. K. (2014). Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 39(2), 268-307. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005>.

53. Chanphai, P., & Tajmir-Riahi, H. A. (2021). Folic Acid-Chitosan Nanomaterials for Delivery of Dietary Polyphenols. *Journal of Nanotechnology and Nanomaterials*, 2(2), 57-66. <https://doi.org/10.33696/Nanotechnol.2.021>.
54. Yang, S. J., Lin, F. H., Tsai, K. C., Wei, M. F., Tsai, H. M., Wong, J. M., & Shieh, M. J. (2010). Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 21(4), 679-689. <https://doi.org/10.1021/bc9004798>.
55. Xu, B., Jiang, G., Yu, W., Liu, D., Liu, Y., Kong, X., & Yao, J. (2017). Preparation of poly(lactic-co-glycolic acid) and chitosan composite nanocarriers via electrostatic self-assembly for oral delivery of insulin. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 420-428. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.113>. PMID: 28576004.
56. Naghibi Beidokhti, H. R., Ghaffarzagdegan, R., & Mirzakhanelouei, S. (2017). Preparación, caracterización y optimización de NPs de núcleo y cubierta de FA, CS y MTX mediante el diseño de Box-Behnken para la administración de fármacos dirigidos a tumores. *AAPS PharmSciTech*, 18(1), 115–129. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0445-3>.
57. Panchanathan, M., Jun, S. W., Nguyen, V. T., Thanh, P. T. N., Hoang, G., Mondal, S., & Oh, J. (2018). Multifunctional near-infrared laser-triggered drug delivery system using folic acid conjugated chitosan oligosaccharide encapsulated gold nanorods for targeted chemo-photothermal therapy. *Journal of Materials Chemistry B*. <https://doi.org/10.1039/c8tb02823k>.
58. Chanphai, P., & Tajmir-Riahi, H. A. (2021). Folic Acid-Chitosan Nanomaterials for Delivery of Dietary Polyphenols. *Journal of Nanotechnology and Nanomaterials*, 2(2), 57-66. <https://doi.org/10.33696/Nanotechnol.2.021>.
59. Ullah, S., Azad, A. K., Nawaz, A., Shah, K. U., Iqbal, M., Albadrani, G. M., Al-Joufi, F. A., Sayed, A. A., & Abdel-Daim, M. M. (2022). 5-Fluorouracil-Loaded Folic-Acid-Fabricated Chitosan Nanoparticles for Site-Targeted Drug Delivery Cargo. *Polymers*, 14(10), 2010. <https://doi.org/10.3390/polym14102010>.
60. Kalepu, S., & Nekkanti, V. (2015). Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 442-453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.

61. Alirezaei, M., Ghobeh, M., & Es-haghi, A. (2022). Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based nanoparticles modified with chitosan-folic acid to delivery of *Artemisia vulgaris* L. essential oil to HT-29 cancer cells. *Process Biochemistry*, *121*, 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.06.034>.
62. San, H. H. M., Alcantara, K. P., Bulatao, B. P. I., Sorasitthiyankarn, F. N., Nalinratana, N., Suksamrarn, A., Vajragupta, O., & Rojsitthisak, P. (2022). Folic Acid-Grafted Chitosan-Alginate Nanocapsules as Effective Targeted Nanocarriers for Delivery of Turmeric Oil for Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, *15*(1), 110. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010110>. PMID: 36678739; PMCID: PMC9862360.
63. Tabatabaeain, S. F., Karimi, E., & Hashemi, M. (2022). *Satureja khuzistanica* Essential Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Modified With Chitosan-Folate: Evaluation of Encapsulation Efficiency, Cytotoxic and Pro-apoptotic Properties. *Frontiers in Chemistry*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.904973>.
64. Homayouni Tabrizi, M. (2022). Fabrication of folic acid-conjugated chitosan-coated PLGA nanoparticles for targeted delivery of *Peganum harmala* smoke extract to breast cancer cells. *Nanotechnology*, *33*(49). <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac8e0a>. PMID: 36121718.
65. Ding, Z., Chen, W., Jiang, F., Mo, M., Bi, Y., & Kong, F. (2023). Synthesis, characterization and in vitro digestion of folate conjugated chitosan-loaded proanthocyanidins nanoparticles. *Food Research International*, *163*, 112141. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112141>.
66. Bano, S., Afzal, M., Waraich, M. M., Alamgir, K., & Nazir, S. (2016). Paclitaxel loaded magnetic nanocomposites with folate modified chitosan/carboxymethyl surface; a vehicle for imaging and targeted drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *513*(1–2), 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.051>.
67. Baka, E., Comer, J. E. A., & Takács-Novák, K. (2008). Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *75*(4), 709-717.
68. González-Martínez, J. R., Magallanes-Vallejo, A. G., López-Oyama, A. B., Madera Santana, T. J., Anaya-Garza, K., Rodríguez-González, E., Barfusson-Domínguez, F.,

- & Gámez-Corrales, R. (2023). Improved mechanical, optical, and electrical properties of chitosan films with the synergistic reinforcing effect of carbon nanotubes and reduced graphene oxide for potential optoelectronic applications. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2725043/v1>.
69. Baibarac, M., Smaranda, I., Nila, A., & Serbschi, C. (2019). Optical properties of folic acid in phosphate buffer solutions: The influence of pH and UV irradiation on the UV-VIS absorption spectra and photoluminescence. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50721-z>.
70. Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Methods in Molecular Biology*, *141*, 143-151. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3087-8_11.
71. Cusihamán Noa, S., Talavera Núñez, M. E., Arenas Chávez, C., Pacheco Salazar, D. G., & Vera Gonzales, C. (2018). Caracterización por técnicas espectroscópicas del O-CarboximetilCS obtenido por derivatización del CS. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *84*(2), 204-216.
72. Cheng, L., Ma, H., Shao, M., Fan, Q., Lv, H., Peng, J., & Zong, X. (2017). Synthesis of folate-chitosan nanoparticles loaded with ligustrazine to target folate receptor positive cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *16*(2), 1101–1108. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6740>.
73. Paiva, D., Ivanova, G., Do Carmo Pereira, M., & Rocha, S. (2013). Chitosan conjugates for DNA delivery. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *15*(32), 11893–11899. <https://doi.org/10.1039/c3cp50417k>.
74. Vora, A., Riga, A., Dollimore, D., & Alexander, K. (2004). Thermal stability of folic acid in the solid-state. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *75*(4), 709-717.
75. Nguyen, V. T., Nguyen, T. H., Dang, L. H., Vu-Quang, H., & Tran, N. Q. (2019). Folate-Conjugated Chitosan-Pluronic P123 Nanogels: Synthesis and Characterizations towards Dual Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*, *2019*, 1067821. <https://doi.org/10.1155/2019/1067821>.
76. Suriñach, S., Baró, M. D., Bordas, S., Clavaguera, N., & Clavaguera-Mora, M. T. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, *31*(1), 11-17.

<https://ddd.uab.cat/record/9923>.

77. Sigma-Aldrich. (s.f.). Chitosan Low Molecular Weight 9012-76-4. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/448869>.
78. Acosta-Ferreira, S., Castillo, O. S., Madera-Santana, J. T., Mendoza-García, D. A., Núñez-Colín, C. A., Grijalva-Verdugo, C., Villa-Lerma, A. G., Morales-Vargas, A. T., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2020). Production and physicochemical characterization of chitosan for the harvesting of wild microalgae consortia. *Biotechnology Reports*, 28, e00554. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00554>.
79. Essa, D., Kondiah, P. P. D., Kumar, P., & Choonara, Y. E. (2023). Design of Chitosan-Coated, Quercetin-Loaded PLGA Nanoparticles for Enhanced PSMA-Specific Activity on LnCap Prostate Cancer Cells. *Biomedicines*, 11(4), 1201. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041201>.
80. Maji, K., Dasgupta, S., Pramanik, K., & Bissoyi, A. (2016). Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biomaterials*, 2016, 9825659. <https://doi.org/10.1155/2016/9825659>.
81. Sathiyaseelan, A., Saravanakumar, K., Mariadoss, A. V. A., & Wang, M. H. (2021). Antimicrobial and Wound Healing Properties of FeO Fabricated Chitosan/PVA Nanocomposite Sponge. *Antibiotics*, 10(5), 524. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050524>. PMID: 34063621; PMCID: PMC8147619.
82. Divya, K., & Jisha, M. S. (2017). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0670-y>.
83. Genestier, L., Paillot, R., Quemeneur, L., Izeradjene, K., & Revillard, J. P. (2000). Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 247-257. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(00\)00189-4](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(00)00189-4).
84. Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4).

85. Kaloti, M., & Bohidar, H. B. (2010). Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.006>.
86. Yang, C., Chen, J., Wei, K., Chen, J., Huang, C., & Liao, Z. (2017). Release of Doxorubicin by a Folate-Grafted, Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticle. *Nanomaterials*, 7(4), 85. <https://doi.org/10.3390/nano7040085>.
87. Ruman, U., Buskaran, K., Masarudin, M. J., Fakurazi, S., & Hussein, M. Z. (2021). Synthesis and Characterization of Chitosan-Based Nanodelivery Systems to Enhance the Anticancer Effect of Sorafenib Drug in Hepatocellular Carcinoma and Colorectal Adenocarcinoma Cells. *Nanomaterials*, 11(2), 497. <https://doi.org/10.3390/nano11020497>.
88. Wang, F., Wang, Y., Ma, Q., Cao, Y., & Yu, B. (2016). Development and characterization of folic acid-conjugated chitosan nanoparticles for targeted and controlled delivery of gemcitabine in lung cancer therapeutics. *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, 45(8), 1530-1538. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1260578>.
89. Al-Hilifi, S. A., Al-Ali, R. M., & Petkoska, A. T. (2022). Ginger Essential Oil as an Active Addition to Composite Chitosan Films: Development and Characterization. *Gels*, 8(6), 327. <https://doi.org/10.3390/gels8060327>.
90. Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.055>.
91. Liu, H., Zhao, Z., Xu, W., Cheng, M., Chen, Y., Xun, M., Liu, Q., & Wang, W. (2023). Preparation, Characterization, Release and Antibacterial Properties of Cinnamon Essential Oil Microcapsules. *Coatings*, 13(6), 973. <https://doi.org/10.3390/coatings13060973>.
92. Genestier, L., Paillot, R., Quemeneur, L., Izeradjene, K., & Revillard, J. P. (2000). Mechanisms of Action of Methotrexate. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 247-257.

- [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(00\)00189-4](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(00)00189-4).
93. Al-Nemrawi, N., Altawabeyeh, R., Darweesh, R. S., & Alnabulsi, S. (2024). Coating Methotrexate-PLGA Nanoparticles with Folic Acid-Chitosan Conjugate for Cancer Targeting. *Pharmacia*, *71*, 1-9. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.71.e120072>.
 94. Negi, A., & Kesari, K. K. (2022). Chitosan Nanoparticle Encapsulation of Antibacterial Essential Oils. *Micromachines*, *13*(8), 1265. <https://doi.org/10.3390/mi13081265>.
 95. Ibrahim, M. A. I., Othman, R., Chee, C. F., & Fisol, F. A. (2023). Evaluation of Folate-Functionalized Nanoparticle Drug Delivery Systems—Effectiveness and Concerns. *Biomedicines*, *11*(7), 2080. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11072080>.
 96. Nasra, S., Bhatia, D., & Kumar, A. (2022). Recent Advances in Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Rheumatoid Arthritis Treatment. *Nanoscale Advances*, *4*(17), 3479-3494. <https://doi.org/10.1039/d2na00229a>.
 97. Off, M. K., Steindal, A. E., Porojnicu, A. C., Juzeniene, A., Vorobey, A., Johnsson, A., & Moan, J. (2005). Ultraviolet Photodegradation of Folic Acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *80*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.03.001>.
 98. Frigaard, J., Jensen, J. L., Galtung, H. K., & Hiorth, M. (2022). The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan-Based Nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 880377. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.880377>.
 99. Sukumaran, A., Sweety, V. K., Vikas, B., & Joseph, B. (2023). Cytotoxicity and Cell Viability Assessment of Biomaterials. En *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.111822>.
 100. Cell Viability Assays. (2023). En *Methods in Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3052-5>.
 101. Hajighasemi, F., & Tajik, S. (2017). Assessment of Cytotoxicity of Dimethyl Sulfoxide in Human Hematopoietic Tumor Lines. *Iranian Journal of Blood and Cancer*, *9*(2), 48-53.
 102. Truong Nguyen, S., Thi-Lam Nguyen, H., & Dinh Truong, K. (2020).

- Comparative Cytotoxic Effects of Methanol, Ethanol and DMSO on Human Cancer Cell Lines. *Biomedical Research and Therapy*, 7(7), 3855-3859.
103. Taşkonak, B., Aylaz, G., Andac, M., Güven, E., Ozkahraman, B., Perçin, I., & Süloğlu, A. K. (2023). Hypericin-Loaded Chitosan Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy in A549 Lung Cancer Cells. *BioNanoScience*, 13(2), 352-364. <https://doi.org/10.1007/s12668-023-01099-w>.
104. Liu, Z., Li, C., Mu, L., Hu, H., & Qin, X. (2023). Menthol Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation and Migration of Nonsmall Cell Lung Carcinoma In Vitro and In Vivo Through Akt Pathway. *The Clinical Respiratory Journal*, 17(12), 1265-1275. <https://doi.org/10.1111/crj.13713>.
105. Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., & Muchtaridi, M. (2023). Cytotoxicity Enhancement of α -Mangostin with Folate-Conjugated Chitosan Nanoparticles in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Molecules*, 28(22), 7585. <https://doi.org/10.3390/molecules28227585>.
106. Elshami, F. I., Shereef, H. A., El-Mehasseb, I. M., Shaban, S. Y., & van Eldik, R. (2023). Hydroxychloroquine-Loaded Chitosan Nanoparticles Induce Anticancer Activity in A549 Lung Cancer Cells: Design, BSA Binding, Molecular Docking, Mechanistic, and Biological Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14103. <https://doi.org/10.3390/ijms241814103>.
107. Gonzalez, T., Muminovic, M., Nano, O., & Vulfovich, M. (2024). Folate Receptor Alpha—A Novel Approach to Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1046. <https://doi.org/10.3390/ijms25021046>.
108. Shoepf, U., Marecos, E., Melder, R., Jain, R., & Weissleder, R. (1998). Intracellular Magnetic Labeling of Lymphocytes for In Vivo Trafficking Studies. *BioTechniques*, 24(4), 642-650.
109. Weissleder, R., Cheng, H. C., & Bogdanova, A. (1997). Magnetically Labeled Cells Can Be Detected by MR Imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 7(2), 258-263. <https://doi.org/10.1002/jmri.1880070214>.
110. Lee, R., Kim, P. H., Choi, J. W., Oh-Joon, K., Kim, K., Kim, D., Yun, C. O., & Yoo, K. H. (2010). Capacitance-Based Real Time Monitoring of Receptor-Mediated Endocytosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12), 1325-1332.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.11.017>.

111. Báez, J. E. (2010). Cómo Obtener un Polímero Degradable en el Laboratorio: Síntesis de la Poli(*d,l*-Lactida) y Caracterización por RMN *1H*. *Educación Química*, *21*(2), 170–177. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(18\)30168-x](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(18)30168-x).
112. National Cancer Institute. (s.f.). *Treatment for Cancer*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>.
113. De Ronderos, M. P. S. (s/f). *Ácido Fólico: Nutriente Redescubierto*. Recuperado de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000100002.
114. Goel, A., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin as "Curecumin": From Kitchen to Clinic. *Biochemical Pharmacology*, *75*(4), 787-809. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016>.
115. Aggarwal, B. B., Kumar, A., & Bharti, A. C. (2003). Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research*, *23*(1A), 363-398.
116. Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2013). Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS Journal*, *15*(1), 195-218. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9432-8>.

11. ANEXOS

10.1 TGA del AM y MTX

El análisis TGA del MTX (Figura 32 b) solo mostró una pérdida de peso significativa alrededor de los 341 °C, con una degradación que continúa hasta los 600 °C y dejó una masa residual del 34.29%. Por otro lado, el análisis TGA del AM (figura 32 a) mostró una pérdida de peso significativa en torno a los 161°C, con una casi completa degradación hasta los 700 °C, dejando una masa residual mínima del 0.66%. Estos datos indicaron que tanto el MTX como el AM contribuyeron a la estabilidad térmica general de las NPs, tal como se observó en los termogramas de las NPs de CS-FA cargadas (Figura 19).

