

---

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

## Síntesis y caracterización de nanocápsulas para aplicaciones potenciales en el tratamiento de cáncer de mama

Proyecto presentado por:

**Dra. Santos Adriana Martel Estrada.**

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

**Participantes:**

Santos Adriana Martel Estrada	Responsable, IADA UACJ
Claudia Lucía Vargas Requena	Participante, ICB UACJ
Florinda Jiménez Vega	Participante, ICB UACJ
Carlos Martínez Pérez	Participante, IIT UACJ
Elí Santos Rodríguez	Participante, MCTP UNACH
Dulce Azucena Salazar Vázquez	Estudiante, ICB UACJ
Karen Andrea Legarreta Arias	Estudiante, ICB UACJ
José Emmanuel Sánchez Serrano	Estudiante, ICB UACJ

---

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es una de las neoplasias malignas más frecuentes en la mujer. Al menos 4.7 millones de mujeres por año serán diagnosticadas con esta enfermedad, de las cuales, más de la mitad ocurrirá en países industrializados (Fernández Ortega, 2012). Entre las estrategias de lucha contra el cáncer de mama, la quimioterapia desempeña un papel crucial en la gestión y cura del cáncer. La quimioterapia es un tratamiento sistémico que afecta a todo el cuerpo y la mayoría de los pacientes con cáncer de mama sometidas a tratamiento de quimioterapia experimentan reacciones de toxicidad adversas graves tales como náuseas, vómitos, malestar general, fatiga, anorexia, aumento de peso, dolor de cabeza, etc. por lo tanto hay una necesidad de un enfoque eficaz que minimice o elimine los efectos secundarios por la orientación específicamente del agente quimioterapéutico solo a las células cancerosas (Banu et al., 2015).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, es necesario mejorar los métodos de administración de fármacos para maximizar los efectos terapéuticos, mientras se disminuyen las complicaciones asociadas debido a su respuesta no específica. Los avances en la nanomedicina, como la imagen y el diagnóstico, la administración de fármacos y la terapia génica han demostrado los beneficios de la terapia de nanocápsulas en el tratamiento de diversas patologías (Shimkunas et al., 2009).

La utilización de vehículos basados en nanopartículas para la entrega del fármaco quimioterapéutico puede servir como una tecnología ideal, ya que sus ventajas incluyen el hecho de que su pequeño tamaño induzca cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, la mejora de la captación celular, y fuerte capacidad de cargar grandes cantidades de medicamentos, lo que lleva a la reducción de la cantidad global del fármaco utilizado (Cui et al., 2016)

El uso de nanopartículas como los nanodiamantes, que son químicamente inertes y han sido utilizados como vehículos de liberación de fármacos (Li et al., 2010), en conjunto con quitosana, la cual ha sido demostrado que posee características que le permiten

---

funcionar como vehículo de fármacos, además de su biocompatibilidad y propiedades antibacteriales (Choi, Nam, & Nah, 2016). Por otro lado, ha sido demostrado los arabinogalactanos pueden ser utilizados para inhibir la angiogénesis en modelos murinos de cáncer pancreático (P. Wang et al., 2015). Por este motivo, el uso de un material compuesto de nanodiamantes, quitosana y arabinogalactanos de mimosa tenuiflora resulta prometedor para el tratamiento de cáncer de mama, por lo que se pretende a través de esta investigación realizar dicha demostración.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Nanodiamantes.**

Los nanomateriales basados en carbono, particularmente los diamantes, han atraído recientemente un gran interés en la biotecnología, la óptica y otros campos de la ciencia de materiales, debido a sus propiedades prometedoras. Los nanodiamantes (NDS) se conciben como partículas de tamaño de  $10^{-9}$  metros, que poseen propiedades excepcionales, incluyendo alta superficie específica, la capacidad de funcionalización de la superficie y la biocompatibilidad (Ostadossein et al., 2015; Quiroz, 2006). La nanotecnología ha permitido sintetizar películas de nanodiamantes con las características físicas, químicas y biológicas mejoradas para ser aplicados en áreas tecnológicas muy diferentes. Estos nanodiamantes crecidos en diversos sustratos tienen una capacidad particular para el estudio electroquímico ofreciendo alta sensibilidad, buena precisión y alta estabilidad en comparación con otros materiales como el carbón vítreo y el platino (Perchyonok, 2015).

Los nanodiamantes (NDS) son nanopartículas de carbono, que en los últimos años han cimentado su papel en los nanomateriales, debido a sus propiedades físicas únicas funcionales, así como las ventajas de los nanomateriales, tales como su pequeño tamaño, gran área superficial y alta adsorción. La nueva área de investigación ha sido creada debido a los numerosos informes de aplicación, basada en las películas de nanodiamantes para construir sistemas de administración de fármacos en la medicina (Mochalin, Shenderova, Ho, & Gogotsi, 2012). También tienen aplicaciones potenciales en tribología, bioimagen,

---

ingeniería de tejidos, así como imitadores de proteínas y material de relleno para los nanocompuestos (Lam et al., 2008).

A pesar de que la toxicidad de los nanomateriales de carbono depende en gran medida de la pureza, tamaño, masa y de la superficie de los grupos funcionales, los NDS han demostrado ser más biocompatibles que otras nanoestructuras de carbono, tales como los nanotubos de carbono y de carbono negro. Por ejemplo, aunque las películas de nanodiamante preparadas por deposición química de vapor pueden promover la función de las diversas entidades biológicas y dispositivos implantables, sus aplicaciones prácticas son limitadas debido a su alta rigidez (H.-D. Wang, Yang, & Niu, 2010).

Wang et. al. (2010) realizaron la funcionalización de partículas de nanodiamantes para aplicaciones de administración de proteínas en fármacos. Emplearon el N, O-Carboximetil quitosano para modificar las propiedades superficiales de las partículas de nanodiamantes.

También se ha informado sobre la unión covalente de la biotina sobre la superficie del nanodiamante de una manera sencilla y eficiente, que puede ser utilizada para el etiquetado, la administración de fármacos, y otras aplicaciones (Krueger, Stegk, Liang, Lu, & Jarre, 2008). La superficie del nanodiamante fue funcionalizado con paclitaxel, un agente que provoca la muerte celular, y se mantuvo como uno de los fármacos antitumorales más utilizados contra el cáncer de ovario y de mama por Ho y colaboradores (2008). Sin embargo, hasta el momento sólo ha habido unos pocos informes sobre el injerto de biopolímeros tales como polietilenglicol, quitosano y la celulosa en nanodiamantes (Krueger et al., 2008). *Liu et. al.* (2014) prestaron su atención en estos trabajos, debido a la mayor posibilidad para ciertos usos biomédicos concebibles. Entre todos los biopolímeros, poli (ácido L-láctico) (PLLA) y poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) derivados de la biomasa renovable han atraído el interés especial, debido a su biorreabsorbilidad y buenas propiedades físicas. Han sido ampliamente utilizados como tipos de biomateriales importantes en biomedicina, sutura quirúrgica, sistemas de administración de fármacos y la ingeniería de tejidos. Ellos proponen un nuevo método para la unión covalente del biopolímero al nanodiamante, esto para formar nanodiamante-injerto-PLLA (ND-g-PLLA) o ND-injerto-PCL (ND-g-PCL). Los híbridos del biopolímero injertado en el nanodiamante, puede optimizar simultáneamente la dispersión del nanodiamante y mejorar

---

la biocompatibilidad. Además, puede prometer diversas aplicaciones en sistemas médicos como bionanomateriales (Liu et al., 2014).

Las partículas de nanodiamantes preparadas mediante técnicas de detonación tienen más sitios de defectos en los límites de la superficie y de granos que en un solo cristal de diamante sintético natural o microcristalina. Así, los grupos funcionales pueden ser injertados sobre partículas de nanodiamantes al tomar la ventaja de los sitios de defecto en la superficie del nanodiamante. De hecho, la funcionalización del nanodiamante se ha convertido en un foco de investigación en los últimos años, y se ha informado de que el halógeno, amina, alquilo, ácidos carboxílicos fueron injertados en la superficie del nanodiamante. Los grupos epoxi se podrían utilizar como extendedor de cadena por reacciones de apertura de anillo y mejorar el rendimiento de los materiales. Sin embargo, no hay ningún informe disponible con respecto a la aplicación de grupos epoxi a diseñar nanodiamante, y es altamente deseable utilizar las propiedades de la funcionalización de la superficie del nanodiamante. Zhang et. al. (2011) presentan la primera síntesis de nanodiamantes-epoxi (ND-EP) injertando el monómero bisfenol A epoxi en la superficie del nanodiamante (X.-Q. Zhang et al., 2011). El ND-EP podría ser utilizado como un candidato ideal para preparar dispositivos de nanoingeniería, nanocompuestos poliméricos, materiales cerámicos y biomédicos avanzados (H. H. Zhang et al., 2011).

Nanodiamantes, portadores de carbono 2-10 nm de diámetro de composición octaedro truncado, han emergido como prometedoras alternativas de materiales atrayendo considerables intereses de investigación en este sentido. Poseen una excelente biocompatibilidad y la diversidad de conjugados potenciales. La literatura y los estudios de Zhu et. al. de NDS prístinos han demostrado sus habilidades con iones metálicos y fármacos de moléculas pequeñas con un aumento de los resultados biológicos. En este trabajo, desarrollaron un polisacárido de alginato de sodio (ALG) NDS funcionalizados (FNDS) para la administración de fármacos de quimioterapia. Cis-diaminodicloroplatino (II) (cisplatino, DDP), uno de los agentes antitumorales más potentes, se revistió sobre la carga negativa en los grupos de la FNDS y se introduce en diversos tipos de células tumorales. El sistema de suministro de fármaco resultante basada en FNDS mejoró significativamente la acumulación del fármaco y la retención en las células tumorales, lo

---

que llevó a matar las células tumorales un efecto después de la liquidación del tratamiento farmacológico. Además, el tratamiento FNDS-DDP mejoró la seguridad del fármaco en comparación con el tratamiento DDP. Como tal, este nuevo sistema de administración basado en FNDS es una plataforma de administración de fármacos prometedores para su posterior aplicación (Cui et al., 2016).

### 3.2. Quitosano

El quitosano es un polisacárido [ $\alpha$  (1-4)2-amino 2-desoxi  $\beta$ -D glucano] obtenido por desacetilación de la quitina [(1-4)2-acetamido 2-desoxi  $\beta$ -D glucano], un producto de desechos de mariscos de la industria (conchas de los crustáceos, la cutícula y pared celular de insecto de los hongos), que se ha estudiado ampliamente como un biomaterial y como excipiente farmacéutico en formulaciones de fármacos (Amidi, 2010).

El quitosano es insoluble en agua a pH neutro, pero en condiciones ligeramente ácidas (pH<5) es soluble debido a la protonación de los grupos amino. Este polímero soluble, catiónico interactúa con las membranas celulares, así mismo aumenta la permeabilidad paracelular de los forros de células (Anbinder, Macchi, Amalvy, & Somoza, 2016). Los grupos primarios de amina, así como los hidroxilos del quitosano permiten derivatización química por la cual las propiedades de este polímero pueden modularse y ajustarse a la aplicación deseada. Esto ha resultado en una gran variedad de derivados de quitosano con diferentes propiedades físicas y biológicas, como la solubilidad, potenciación de la permeación, su uso como adyuvante, entre otros. Los cuales han sido estudiados para las formulaciones terapéuticas macromoleculares que mejoran la absorción (péptidos, proteínas terapéuticas y los antígenos, así como ADN de plásmido) y para atacar a los sistemas con la preparación de fármaco en partículas (van der Lubben, Verhoef, Borchard, & Junginger, 2001)

El quitosano se muestra prometedor para el uso seguro en productos para la salud, se puede encontrar en distintas formas que difieren en el tamaño (peso molecular medio; MW) y el grado de desacetilación (DD) (Kean & Thanou, 2010).

Un aspecto importante en el uso de polímeros como los sistemas de administración de fármacos es su destino metabólico en el cuerpo o la biodegradación, debe tener un

---

adecuado MW para el aclaramiento renal. Si el tamaño del polímero administrado es mayor, éste debe someterse a la degradación. La biodegradación (química enzimática) proporcionaría fragmentos adecuados para la depuración renal (Kean & Thanou, 2010)

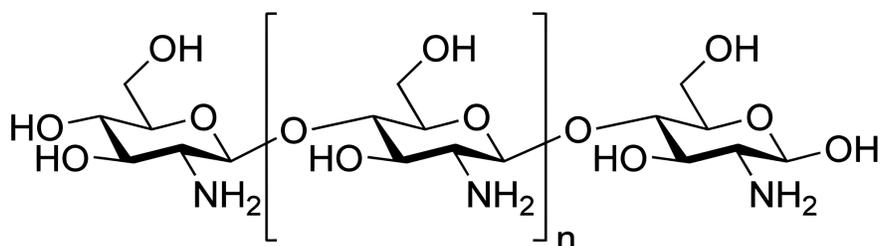


Figura 1.4. Estructura del quitosano.

Se han propuesto tres mecanismos como una explicación a las propiedades antimicrobianas del quitosano (Martinez-Camacho et al., 2013). En la primera, las cargas positivas presentes en la cadena polimérica de quitosano, su grupo amino interactúa con las cargas negativas de los residuos de macromoléculas (lipopolisacáridos y proteínas) en las membranas de las células microbianas, interfiriendo con el intercambio de nutrientes entre el exterior y el interior de la célula. Estas cargas también pueden competir con el calcio para los sitios electronegativos en la membrana, lo que compromete su integridad, causando la liberación de material intracelular resultando en la muerte celular (Martínez-Camacho et al., 2010).

El segundo mecanismo propone que el quitosano actúa como un agente quelante, la creación de compuestos de trazas de metales esenciales para la célula. El tercer mecanismo establece que el quitosano de bajo peso molecular es capaz de entrar al núcleo de la misma célula e interactuar con el ADN, lo que interfiere con la síntesis de ARN mensajero, que afecta a la síntesis de proteínas y la inhibición de la acción de diversas enzimas (Martínez-Camacho et al., 2010).

### 3.3. *Mimosa tenuiflora*.

*Mimosa tenuiflora* (Willd). Poret, conocido tradicionalmente como “tepescohuite”, es un arbusto indeciduous perenne de la familia *Mimosaceae*, ampliamente extendido en América Central y del sur. De acuerdo con la etnomedicina tradicional mexicana el material de corteza seca y en polvo se aplica directamente a las lesiones de la piel, o como extractos acuosos. Sin embargo, la información de menor importancia es disponible sobre la

---

bioactividad de los compuestos aislados. Los altos contenidos de saponinas y taninos en el material de la corteza se dice que son los responsables de los posibles efectos de curación de heridas, debido a los antimicrobianos, anti-inflamatoria y los efectos cicatrizantes (Zippel, Deters, & Hensel, 2009).

En México, *M. tenuiflora* es una planta con actividad osteogénica, que puede ser fácilmente adquirido, es accesible y económico. La corteza de *M. tenuiflora* se ha utilizado durante décadas como un remedio en el tratamiento de heridas y quemaduras de la piel debido a su capacidad de curar, anti-inflamación y actividad antimicrobiana. La acción de los componentes de la corteza en el tejido epitelial han demostrado su potencial para estimular la proliferación de fibroblastos y células epiteliales. Debido a los compuestos orgánicos que contiene, es posible que esta es la razón de su reacción al tejido de la piel (Rivera-Arce et al., 2007).

Debido a que los fibroblastos y osteoblastos son las líneas celulares similares, *M. tenuiflora* podría activar la proliferación de osteoblastos, como lo hace con los fibroblastos. La incorporación de corteza de *M. tenuiflora* al quitosano se podría obtener un material compuesto que contiene las propiedades beneficiosas de los dos componentes (Martel-Estrada et al., 2014).

De acuerdo a todo lo anterior, es posible considerar que los nanodiamantes unidos a moléculas de arabinogalactanos de mimosa *tenuiflora* podrán tener actividad citotóxica en el tratamiento de cáncer. Por este motivo, la presente investigación tiene como finalidad de evaluación de la toxicidad de capsulas de quitosana recubriendo arabinogalactanos de *Mimosa Tenuiflora* con nanodiamantes.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la citotoxicidad in vitro de nanocapsulas de nanodiamantes/ arabinogalactanos de *Mimosa tenuiflora* para conocer el efecto sobre fibroblastos.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 
- 
- Aislar los arabinogalactanos de la *Mimosa Tenuiflora*.
  - Sintetizar y evaluar las partículas de nanodiamantes con arabinogalactanos de *Mimosa Tenuiflora* recubiertas poliméricamente.
  - Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas en cultivos de fibroblastos.
  - Evaluar la cinética de liberación de los nanodiamantes y los arabinogalactanos de *Mimosa Tenuiflora*.

## 6. AVANCE DE LAS METAS

- Obtención de nanopartículas con potencial para ser aplicadas en el tratamiento de cáncer de mama. **100 %**
- Participación en un congreso internacional para presentar los resultados de la investigación **100 %**
- Escritura de un artículo de calidad internacional que será enviado a su arbitraje al finalizar el periodo de esta investigación. **100 %**

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Obtención de los Arabinogalactanos de la planta de *Mimosa tenuiflora*.

La extracción del extracto etanólico del polvo de la planta *Mimosa tenuiflora* se efectuara de acuerdo a la metodología realizada en Zippel, *et al.*, 2009, con los siguientes pasos:

Filtrado en Frio:

Se pesarán 20 g del polvo de corteza de la planta *Mimosa tenuiflora*, posteriormente se agregarán 80 ml de agua destilada, y se pondrán en agitación constante a una temperatura

---

---

de 4°C durante 24 horas. La solución final se filtrará, obteniendo el extracto acuoso; y se realizarán otras dos filtraciones agregando 80 ml al precipitado cada 24 hrs.

Concentración de la solución:

La solución del filtrado obtenida se concentrará en un horno con vacío durante 24 hrs, sin pasar una temperatura de 40°C; eliminando un 50% aproximadamente del líquido inicial al finalizar la extracción del agua.

Precipitación en Etanol:

La solución obtenida después de la concentración se tratará con 400 ml de etanol al 96% en hielo durante 20 min. La solución final se centrifugó a 300 rpm por 10 min en tubos *ependorf* de 50mL. Los precipitados obtenidos se disolvieron en 15 ml de agua destilada.

Diálisis:

La diálisis se realizará con una membrana de celulosa (Snake Skin Dialysis Tubing 3.5K MwCO, 16mm); y como solvente se utilizará agua destilada. Se cortará la membrana a la longitud adecuada, conteniendo la solución concentrada del precipitado. En un matraz de 600 ml se agregará agua destilada con un agitador magnético. Se colocará la membrana en el agua destilada, sumergiéndolo completamente por 24 hrs, realizando 2 lavados intermedios.

Liofilización:

La solución obtenida de la diálisis se liofilizará durante 24 hrs, para eliminar el agua del extracto, obteniendo el peso final.

## **7.2. Prueba Cualitativa para la identificación de Arabinogalactanos presentes en el extracto etanólico.**

---

Se realizará una prueba cualitativa utilizando el reactivo de Yariv ( $\beta$ -D-Glucosyl Yariv Reagent, Biosupplies) para la identificación de Arabinogalactanos (AGPs) presentes en el extracto final etanólico del polvo de corteza de la planta *Mimosa tenuiflora*.

Se utilizará la técnica de difusión de agar radial (Gannabathula *et al.*, 2015), preparando una solución al 1% de agarosa, conteniendo 0.15 M de cloruro de sodio, 0.02% de acida sódica y 0.002% del reactivo de Yariv. La solución final se vertirá en una placa Petri de 80 mm y se dejará solidificar a temperatura ambiente. Posteriormente se realizarán orificios en la superficie del gel para contener las muestras. Como control positivo se utilizará una solución de goma arábiga (0.01g en 1 ml) y como control negativo agua destilada. La placa se dejará en incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante 2 a 4 días, hasta obtener el halo de precipitación de las glucoproteínas.

### **7.3. Purificación de las glucoproteínas: Arabinogalactanos.**

Se utilizará una columna de intercambio aniónico para la purificación de la glucoproteína, basado en la metodología descrita por Zippel, *et al.*, 2009, técnica fundamentada en la separación de las moléculas utilizando sus cargas parciales y su interacción con la matriz cargada.

Para preparar la matriz aniónica se pesarán 50 g de celulosa DEAE (Exchanger, microgranular from: preswollen, Sigma), y se hidratará en agua destilada durante 24 hrs con agitación constante. A continuación, se dejará sedimentar para retirar el líquido sobrenadante y se le agregará una solución de fosfatos de un pH 7 con 0.2 M de NaCl y se mantuvo en agitación constante durante 6 hrs.

Posteriormente, se empaquetará la matriz hidratada en una columna de 20 cm x 2.5 cm y se dejará sedimentar durante 24 hrs. Se pasará el extracto etanólico (15 ml) a una velocidad de flujo de 0.5ml/min. Se realizarán cuatro corridas con 5 diferentes eluyentes con 300 ml cada uno y una velocidad de flujo de 0.5 ml/min: agua destilada, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mol/L de solución de fosfato a pH 6.

---

Después de obtener las muestras fraccionadas en tubos de vidrio, se medirá la absorbancia a una longitud de onda a 560 nm en un espectrofotómetro de luz UV-visible (Genesys 2, TermoSpectronic), para obtener los picos característicos de la glucoproteína en las diferentes fracciones. Posteriormente, a la fracción F2 y F3, se medirá la absorbancia a una longitud de onda a 280 nm. Por último se realizará la prueba cuantitativa con la técnica de difusión de agar radial, para la cuantificación de AGPs presentes en el extracto etanólico y en las fracciones obtenidas de la cromatografía.

#### **7.4. Procedimiento de elaboración de nanocápsulas**

Las nanocápsulas a base de quitosana se prepararán siguiendo el protocolo desarrollado por Santander [18]. Brevemente, se disolverán 20 mg de lecitina en 250 L de etanol, a continuación, 62,5 L de Miglyol 812® serán añadidos, seguido de la adición de 4,75 ml de acetona. Inmediatamente después, esta fase orgánica se vierte en 10 ml de una solución que contiene quitosano acuosa (0,5 mg / ml) en 5% de exceso estequiométrico de ácido acético. Inmediatamente después de la adición de la fase orgánica, la disolución de quitosano se volverá lechosa. La acetona, etanol y una porción del volumen de agua se evaporarán en un rotavapor a 40 ° C durante ~ 8 min, dando un volumen final que corresponde a un tercio de la original. Como referencia, una nanoemulsión sin recubrimiento se preparará bajo un protocolo idéntico que el usado para las nanocápsulas de quitosano-revestido, pero sin incluir quitosano en la fase acuosa

#### **7.5. Caracterización de las nanocápsulas**

##### **7.5.1. Morfología de las nanocápsulas: SEM**

La morfología de las nanocápsulas se evaluará utilizando el SEM por medio de la señal de electrones secundarios (SE) a distintas magnificaciones. Las muestras se recubrirán de oro y se observarán usando una aceleración de voltaje de 10 kV.

---

### 7.5.2. Propiedades Térmicas; TGA Y DSC

Con el fin de conocer las propiedades térmicas de las nanocápsulas se analizarán por medio de TGA/DSC. La rampa de calentamiento será de 10 °C/min hasta los 750°C para todas las muestras.

### 7.5.3. Caracterización con FTIR

Con el fin de observar los grupos funcionales de la composición de las nanocápsulas quitosano/ND/Arabinogalactanos de Mimosa Tenuiflora, se analizarán por FT-IR (Nicolet 6700).

### 7.5.4. Degradación Enzimática

Se realizará una solución de PBS disolviendo 80 g de cloruro de sodio NaCl, 2 g de cloruro de potasio KCl, 14.4 g de potasio disodico Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2.4 g de fosfato de potasio monobásico KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, en 1000 ml de agua destilada.

La degradación enzimática *in vitro* se desarrollará en tubos para centrifuga (Corning) estériles de 20ml, con 5ml una solución amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.4; con la enzima lisozima en relación a los valores correspondientes al suero humanos; y por último incubados a 37°C a 1,3, 7 y 14 días. Después de cada periodo de tiempo, la degradación enzimática será evaluada con el cambio de pH de la solución, y la liberación del fármaco por medio de espectroscopía por UV Visible.

### 7.5.5. Cultivos celulares

Para realizar el cultivo de células de cáncer de mama de la línea MDA-MB-231, se descongelarán las células, poniéndolas en agua destilada a 60°C hasta que se forme la primera gota y en seguida se incubaran a 37°C. Una vez que las células esten atemperadas, se tomará 1 mL de éstas y se colocará en un frasco de cultivo con 6 mL del medio DMEM

---

(Dulbecco's Modified Eagle Medium), el cual se suplementará con suero fetal bovino (SFB) al 10% y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomicina), todo el proceso se realizará en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar. El frasco se incubará en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% a temperatura y atmósfera de humedad controlada a 37°C por 48 horas, tiempo necesario para que haya una confluencia del 70 al 80%, es decir, éste porcentaje de células adheridas al frasco y así realizar un pase, para lo cual se lavará el cultivo con 2 mL de PBS y se tirará. Se volverá a lavar el frasco, añadiendo 2 mL más de PBS y 300 µL de acutasa (para desprender las células) y se incubará por 3 minutos a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido éste tiempo, se añadirán 2 mL del medio DMEM. Se tomará el cultivo colocándolo en tres tubos eppendorf (1.43 mL), los cuales se centrifugaran a 2500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descartará y el pellet se resuspenderá con 1 mL del medio DMEM, y se colocará en un frasco de cultivo con 6 mL del medio preparado DMEM, incubándolo por 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **7.5.6. Evaluación de la citotoxicidad**

Se evaluará la citotoxicidad de las nanopartículas de nanodiamantes/quitosano con extracto etanólico de *Mimosa tenuiflora* en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y fibroblastos humanos. En 6 Microplacas (Benchmark Plus™ BioRAD) (3 para cada línea celular) de 96 se colocaran 5 mil células por pozo, las cuales se contarán utilizando la cámara de Neubauer, y se incubará durante 48 horas. A las células se adicionaran 1, 10, 50, 100, 150 y 200 µg/mL de las nanocápsulas, y se incubará a distintos tiempos 24, 48 y 72 horas a 37°C, con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al terminar el tiempo de incubación a cada pozo se añadirán 20µL de MTT a 5mg/mL en PBS, y se incubará en la oscuridad por 1 hora a 37°C. El medio se decantará, dejando sólo los cristales de formazán adheridos al fondo de cada pozo; y a cada pozo se agregaran 100µL de DMSO para la disolución de los cristales. Después se tomará lectura de absorbancia a 570nm en un espectrofotómetro de luz UV-visible (Genesys 2, ThermoSpectronic).

---

---

## 9. IMPACTO DEL PROYECTO

Este proyecto permitirá continuar con la investigación que se ha venido desarrollando conjuntamente con el MCTP de la UNACH, pero principalmente fortalecerá el grupo del cuerpo académico de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa para que tengan la formación y experiencia necesaria para operar el modelo educativo y desarrollar las actividades de docencia e investigación y difusión de acuerdo al proyecto académico de los departamentos que integran a estas instituciones. Y por último fortalecerá el conocimiento adquirido para poder desarrollar biomateriales que permitan mejorar la calidad de vida de las personas que padezcan cáncer de mama a través de investigación original, actual y de alto impacto involucrando estudiantes para formación de recursos humanos y fortalecimiento de los programas académicos.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Identificación de AGPs

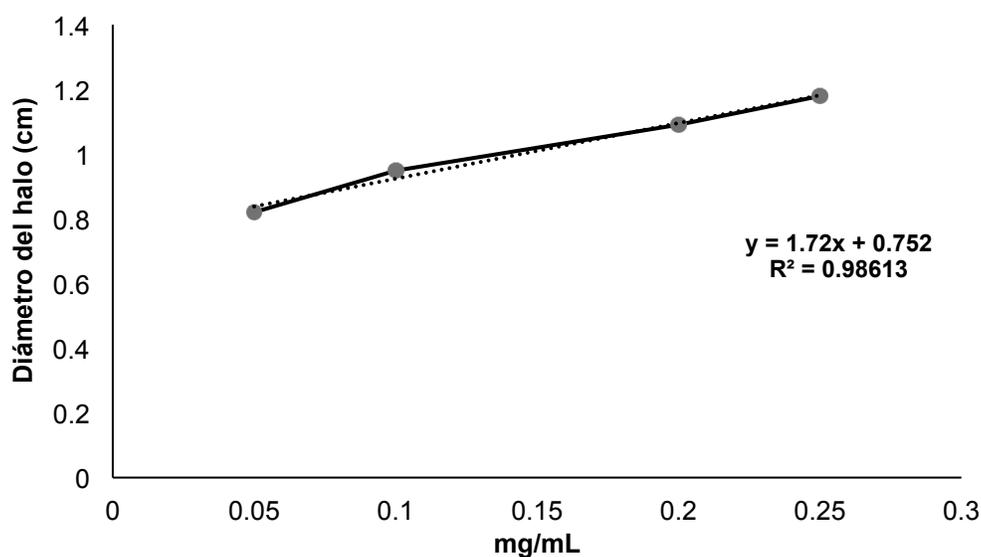
Tras realizarse el extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora*, según la metodología establecida por Zippel y colaboradores (2009), se procedió a identificar la presencia de AGPs mediante la técnica de difusión radial utilizando el reactivo de Yariv ( $\beta$ -galactosil). Este reactivo permite la identificación de dichas proteínas glucosiladas al unirse específicamente al enlace  $\beta$ -1,3-glucosa, formando halos rojo pardo (Kitazawa *et al.*, 2013). Como referencia positiva de la presencia de AGPs, se utilizaron soluciones estándar de goma arábiga a concentraciones de 1, 0.25, 0.2, 0.1 y 0.05 mg/mL (Gannabathula *et al.*, 2015). Este procedimiento permitió observar la formación de halos rojo pardo al cabo de los tres días de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad (Figura 1). A dichos

halos se les midió el diámetro, el cual se interpreta como proporcional a la concentración de AGPs y se utilizaron dichos valores para la creación de la curva de calibración (Figura 2).

Esto permitió identificar que en 1 mg/mL del extracto etanólico los AGPs se encuentran en una concentración menor a 0.05 mg/mL; y que a las concentraciones de 0.25 y 0.2 mg/mL no es posible identificar a los AGPs, indicando que la cantidad de éstos está por debajo del límite de detección de la técnica.



**Figura 1.** Determinación de AGPs, en goma arábica (GA) y extracto etanólico de *M. tenuiflora* (EPC), por difusión radial en gel de agarosa al 1% con reactivo de Yariv. GA a 1, 0.25, 0.2, 0.1 y 0.05 mg/mL y EPC a 1, 0.25 y 0.2 mg/mL.



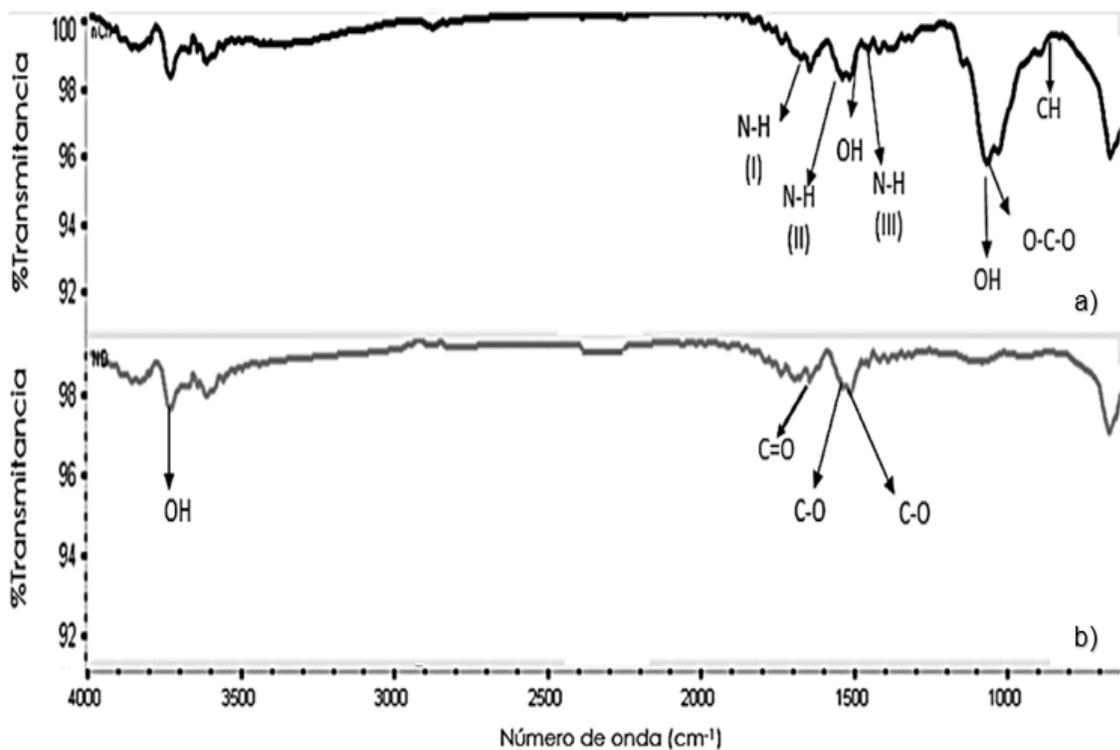
---

**Figura 2.** Curva de calibración en mg/mL de AGPs presentes en las concentraciones 0.1, 0.2, 0.25 y 1mg/mL de la solución de goma arábica.

El rendimiento del EPC obtenido de a partir de 25g de la corteza de *Mimosa tenuiflora*, fue de 0.0825g; considerablemente inferior a lo reportado por Zippel y colaboradores (2009), quienes obtuvieron 0.02g de EPC a partir de 5g de polvo de la corteza. Esta diferencia pudiese deberse a la etapa de desarrollo del tejido, así como a la región en donde se realizó la misma. Se reporta que el EPC está principalmente compuesto por carbohidratos como galactosa, arabinosa y manosa en 24.6, 21.2 y 16.4 % respectivamente; los cuales se reporta forman parte de la estructura de las AGPs (Hernández *et al.*, 2009; Walls, 2001). En el extracto obtenido, en este estudio, de *M. tenuiflora* se identificó mediante el uso del reactivo de Yariv ( $\beta$ -galactosil), (Kitazawa *et al.*, 2013), que posee menor a 0.05 mg/mL de AGPs, los cuales se utilizaron en la realización de éste estudio.

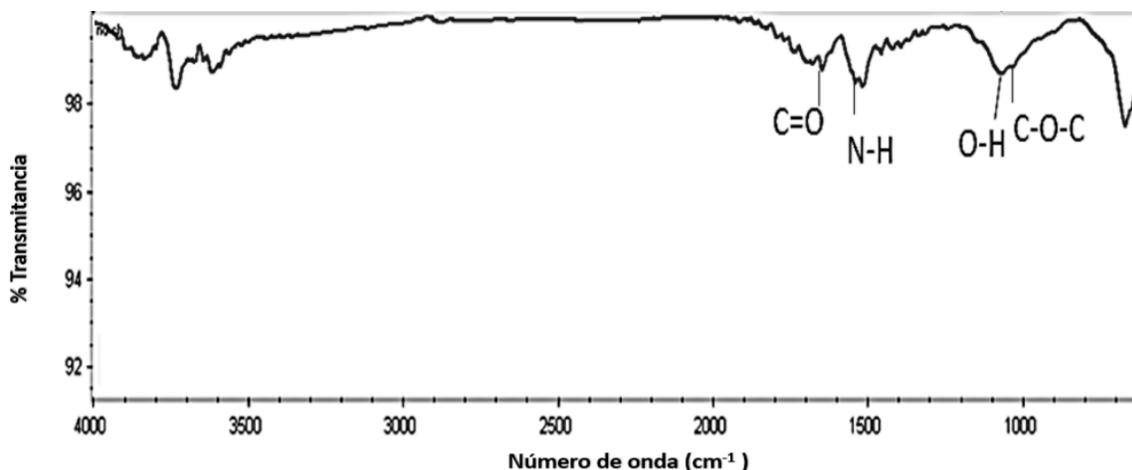
## 10.2 Síntesis de nanopartículas

La identificación del adecuado acoplamiento entre los nanodiamantes y el quitosano, en las nanopartículas sintetizadas, se realizó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. Donde los grupos funcionales característicos del quitosano son las amidas, hidroxilos y éteres; las amidas III, II y I presentan un máximo de intensidad a los 1394.2  $\text{cm}^{-1}$ , 1542.3  $\text{cm}^{-1}$  y 1649.5  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente; el grupo éter a los 1034.8  $\text{cm}^{-1}$ , y a 1070.1  $\text{cm}^{-1}$  y 1421.8  $\text{cm}^{-1}$  del hidroxilo primario; tal como se aprecia en la Figura 3a (Möller *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010; Martel *et al.*, 2014 y 2015). En los NDs los grupos característicos son los carboxilos, con señal a los 1540.6  $\text{cm}^{-1}$  y 1698  $\text{cm}^{-1}$ ; así como a los 1649  $\text{cm}^{-1}$  debido al grupo cetónico (Figura 3b) (Chung *et al.*, 2006).



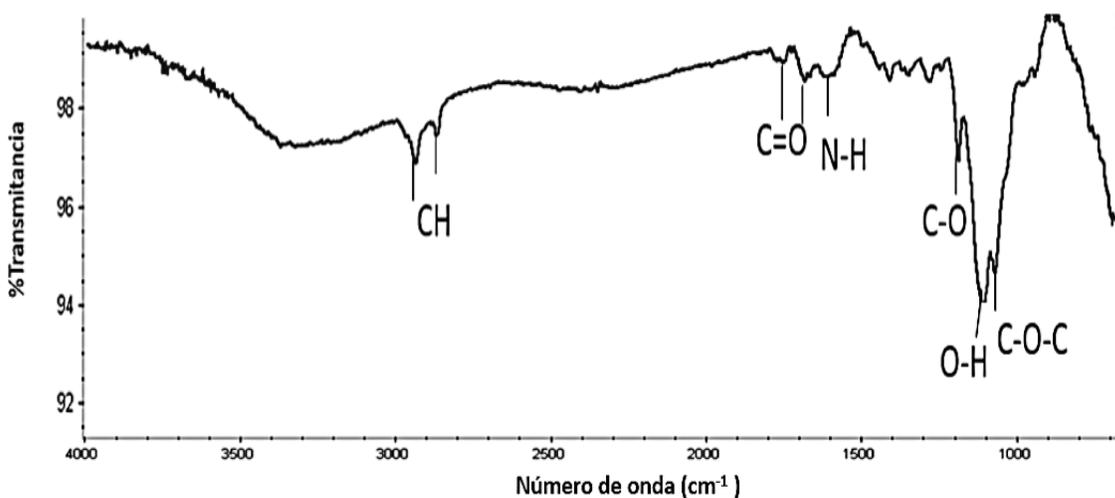
**Figura 3.** Análisis de los grupos funcionales de las nanopartículas por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. a.- Quitosano (Ch), b.- Nanodiamante (ND).

Al analizar las nanopartículas de ND/Ch se encontraron señales a 1518.4 y 1795.2  $\text{cm}^{-1}$  características para los carboxilos de los NDs, los cuales disminuyeron su transmitancia en un 2% como máximo. Así mismo, las señales a 1034.8  $\text{cm}^{-1}$  y 1070.1  $\text{cm}^{-1}$  del grupo éter y el hidroxilo primario respectivamente, del quitosano disminuyeron su transmitancia en un 3% en comparación con el Ch (Figura 3a), mientras que la señal a 1542.3  $\text{cm}^{-1}$ , de la amina II del quitosano, se mantuvo sin cambios (Figura 4) (Martel *et al.*, 2014 y 2015).



**Figura 4.** Análisis de los grupos funcionales de las nanopartículas de NDs/Ch por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

En el espectro infrarrojo de unión del extracto etanólico de *Mimosa tenuiflora* a NDs/Ch, Figura 5, desaparecen las señales emitidas por los NDs. Por otro lado, se intensifican las señales a los 1034.8 cm<sup>-1</sup> y 1070.1 cm<sup>-1</sup> característica de los grupos éter y grupos hidroxilo del quitosano; hasta en un 5% de transmitancia, a la vez que la señal de su amino secundario disminuye aproximadamente en un 2% con respecto a la señal mostrada por el ND/Ch. Lo cual permite inferir que se está dando una unión entre los grupos carboxilo del ND con los amino terminal de las glicoproteínas; a la vez de la interacción entre los carboxilos terminales de las glicoproteínas con los aminos de quitosano.



---

**Figura 5.** Análisis de los grupos funcionales de las nanocápsulas de NDs/Ch/ Extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora* por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

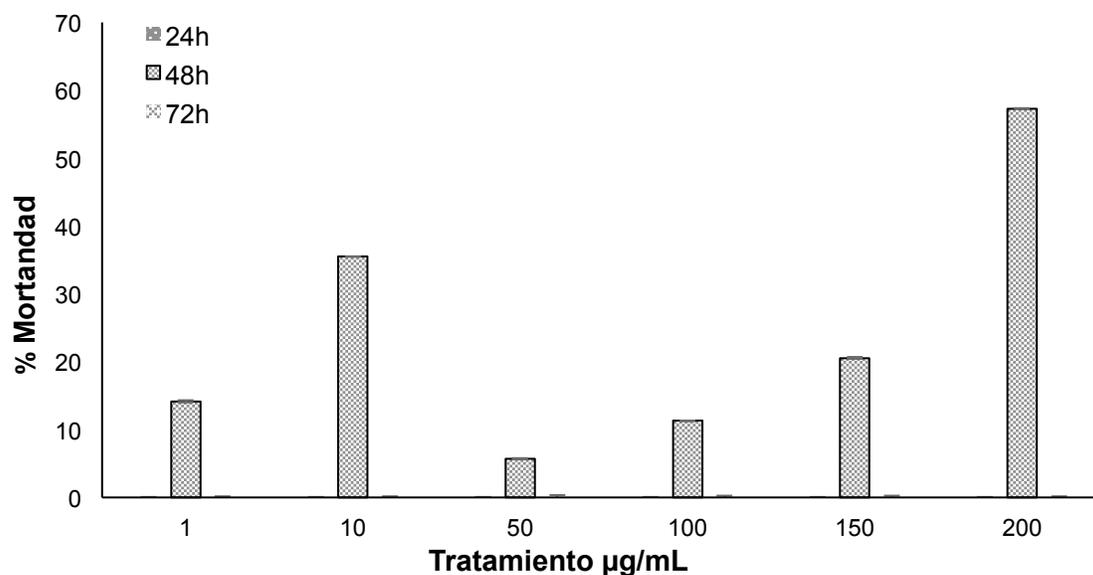
La comprobación de la unión entre ND/Ch se comprueba por espectroscopía de FT-IR, en donde al disminuir las señales de los grupos carboxilo del ND, así como los amino del quitosano; se infiere que la unión entre estas dos moléculas debe darse entre dichos grupos; similar a lo reportado por Ansari y colaboradores (2015), en donde comprueban que la unión de los NDs con  $\beta$ -galactosidasa se da mediante los carboxilos de los NDs y los aminos terminales de la  $\beta$ -galactosidasa. Tras incorporar en la mezcla al extracto etanólico de *Mimosa tenuiflora* a NDs/Ch, desaparecen las señales emitidas por los NDs; comprobándose de esta forma que están recubiertos por Ch/EPC. Por otro lado, se intensifican las señales a los  $1034.8\text{ cm}^{-1}$  y  $1070.1\text{ cm}^{-1}$  característica de los grupos éter y grupos hidroxilo del quitosano; hasta en un 5% de transmitancia, a la vez que la señal de su amino secundario disminuye aproximadamente en un 2% con respecto a la señal mostrada por el ND/Ch. Lo cual permite inferir que se está dando una unión entre los grupos carboxilo del ND con los amino terminal de las glicoproteínas; a la vez de la interacción entre los carboxilos terminales de las glicoproteínas con los aminos de quitosano. Estos resultados se sustentan con lo reportado por Cui y colaboradores (2016), quienes funcionalizaron la superficie del nanodiamante con alginato de sodio mediante interacciones electrostáticas entre la unión de los grupos carboxilo del ND y el sodio del alginato, y después el fármaco quimioterapéutico cisplatino diaminodicloro II lo unieron a las cargas negativas del nanodiamante funcionalizado por las cargas positivas del grupo amino, de manera que quedó expuesto, por lo tanto las señales de los grupos carboxilo del ND desaparecieron, como lo sucedido en este trabajo. Sin embargo, la preparación de las nanopartículas no fue seriada como en el trabajo mencionado, sólo se realizó una mezcla de los tres componentes (ND-Ch-EPC), por lo tanto, no se puede saber si el que queda expuesto es el quitosano o el extracto, así como las señales encontradas en el infrarrojo se pueden atribuir al quitosano o al extracto, debido a que en ambas moléculas se encuentran presentes estos mismos grupos funcionales.

---

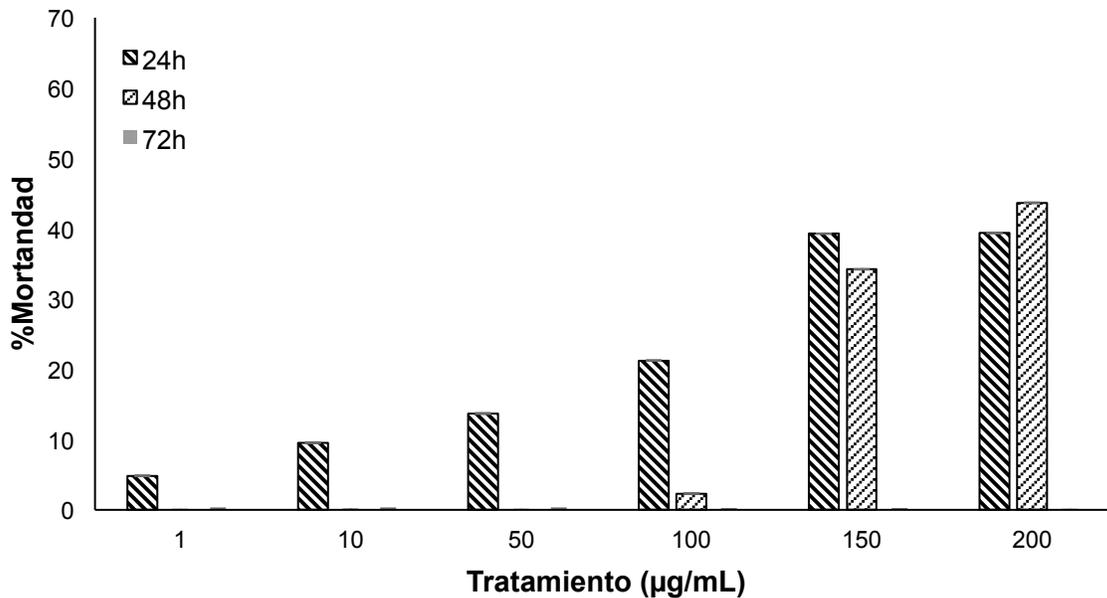
### 10.3. Evaluación de la citotoxicidad

#### 10.3.1. Extracto etanólico de *M. tenuiflora*

Tras identificarse las AGPs en el extracto etanólico del polvo de la corteza de *Mimosa tenuiflora*, mediante la metodología previamente descrita, se procedió a evaluar su efecto citotóxico sobre la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama, por el método del MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio). Lográndose apreciar que el extracto tuvo mayor efecto citotóxico a una concentración de 200 µg/mL, siendo a las 48 h de incubación donde se presentó cerca del 58% de mortandad en dicha línea (Figura 6). Sin embargo, dicho efecto no es selectivo para células malignas; debido a que, en los fibroblastos humanos, utilizados como referencia de células sanas, provocaron a esta concentración cerca del 40% de mortandad a las 24 h de incubación (Figura 7).



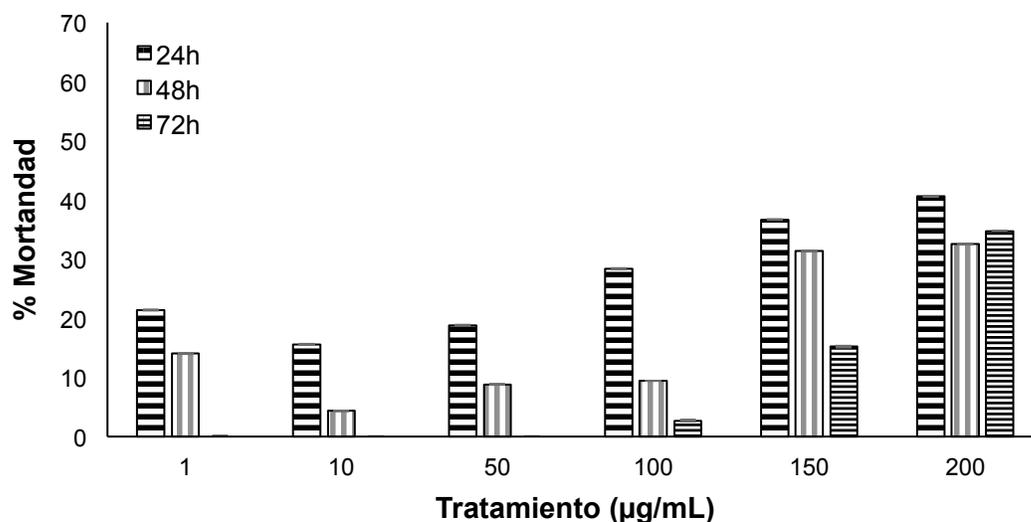
**Figura 6.** Efecto citotóxico del extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora* sobre MDA-MB-231.



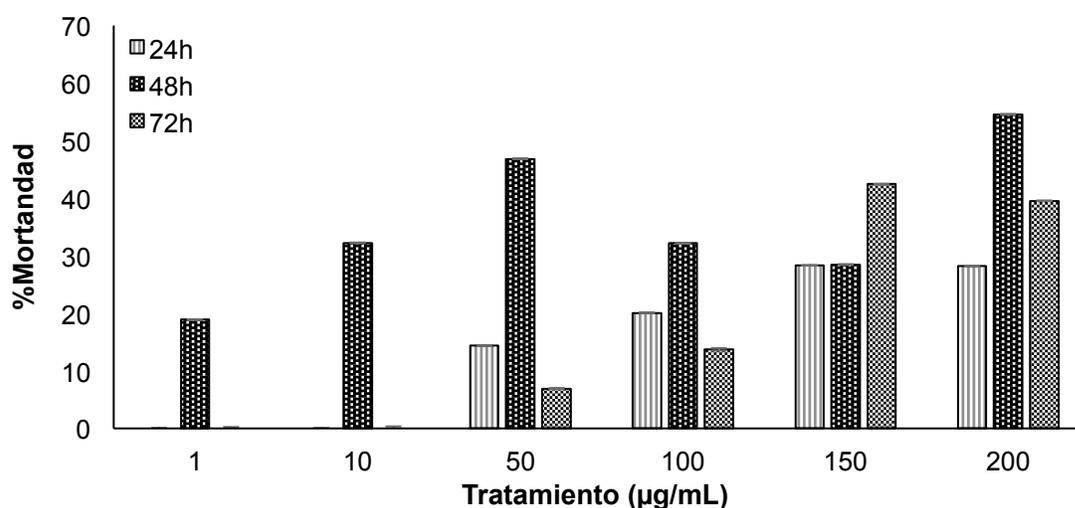
**Figura 7.** Efecto citotóxico del extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora* sobre fibroblasto humano.

### 10.3.2. Nanopartículas de NDs/Ch

Se evaluó el efecto citotóxico de las nanopartículas NDs/Ch en células MDA-MB-231 y fibroblasto humano. Observándose en la Figura 8, que su mayor porcentaje de mortandad en células cancerosas fue del 41% a las 24 h de incubación, a una concentración de 200 µg/mL. Mientras que, en células sanas a la misma concentración, ocasionaron cerca del 55% de muerte celular a las 48 h de incubación (Figura 9).



**Figura 8.** Efecto citotóxico de nanopartículas de NDs/Ch sobre MDA-MB-231.



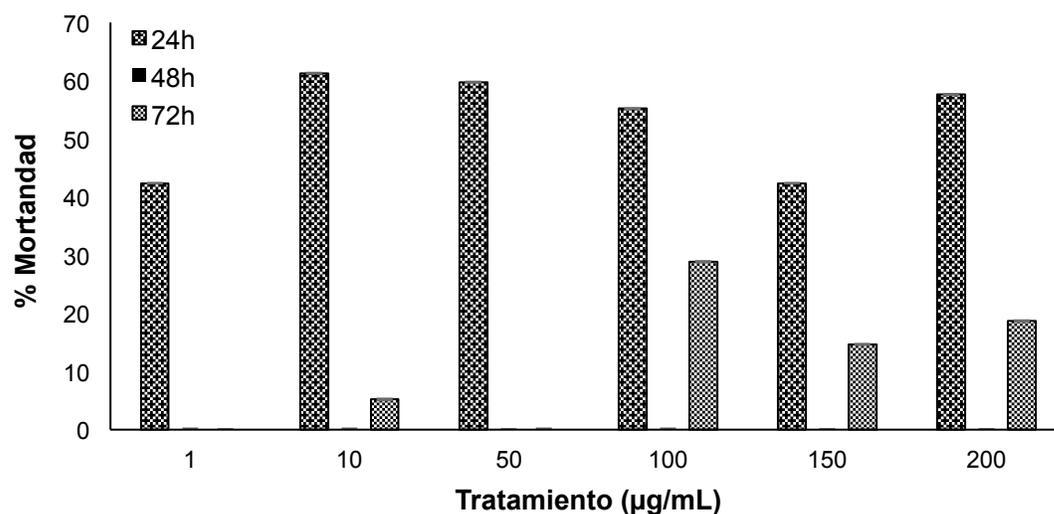
**Figura 9.** Efecto citotóxico de nanopartículas de NDs/Ch sobre fibroblasto humano.

### 10.3.3. Nanocápsulas de NDs/Ch-Extracto

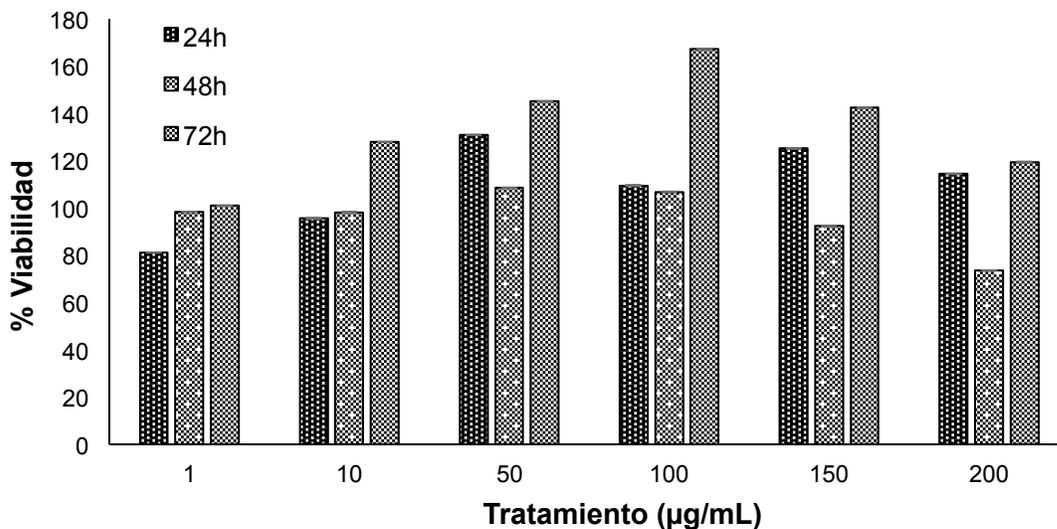
El efecto citotóxico de las nanocápsulas de NDs/Ch-Extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora*, se evaluó en MDA-MB-231. Encontrando que al cabo de las 24 h de incubación, las concentraciones de 50, 100 y 200 µg/mL ocasionaron más del 50% de mortandad. Observando un porcentaje más alto a la concentración de 10 µg/mL, el cual es del 62% (Figura 10). Sin embargo, es a los 50 µg/mL la concentración ideal con un 59% de

---

mortandad la que se recomienda utilizar para futuros experimentos, debido que a dicha concentración no ocasionó ningún efecto en fibroblasto humano, como se muestra en la Figura 11. Donde se observa que la unión entre el extracto y las nanopartículas favoreció el crecimiento de las células a las 72 h de incubación en las 6 concentraciones utilizadas. Sin embargo a 24 h de incubación aún se presenta un efecto tóxico del 19 y 5% de mortandad en 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Por otro lado, el mayor porcentaje de muerte que se presentó fue del 26%, siendo en el tiempo de incubación de 48 h a una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ .



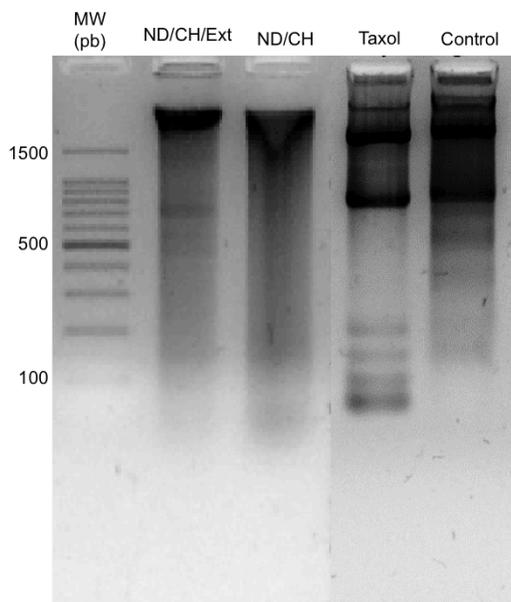
**Figura 10.** Efecto citotóxico de nanocápsulas de NDs/Ch-Extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora* sobre MDA-MB-231.



**Figura 11.** Efecto citotóxico de las nanocápsulas de NDs/Ch-Extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora* sobre fibroblasto humano.

#### 10.3.4. Fragmentación del DNA

Uno de los métodos utilizados para conocer la vía de muerte celular provocada por apoptosis o necrosis es la fragmentación del DNA, analizada mediante gel de electroforesis. Observando la aparición de un patrón característico de DNA en escalera, para la muerte por apoptosis y un barrido para necrosis (Alfaro *et al.*, 2000). Logrando observar en ND/Ch-extracto que la muerte de células de cáncer de mama es por activación tanto de apoptosis como necrosis; esto debido a que se aprecian tanto los fragmentos de DNA en escalera típicos de apoptosis; pero también un ligero barrido indicativo de necrosis. En comparación a la muestra con Taxol, en la cual se aprecia el bandeo de escalera. Mientras que en el carril de ND/Ch se observó un completo barrido, siendo indicativo de necrosis (Figura 12).



**Figura 12.** Gel de electroforesis de la fragmentación del DNA de la línea celular MDA-MB-231 con ND/Ch-Extracto, ND/Ch y Taxol como control positivo. Y como control negativo (control), células sin tratamiento.

Al evaluar el efecto citotóxico del extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora*, se observó que a concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ , se presentó la mayor mortandad celular con cerca del 58%. Sin embargo, en fibroblastos humanos, utilizados como referencia de células sanas, provocaron a esta concentración, cerca del 40% de mortandad. Esto pudiese deberse a que en el extracto no solo se encuentran arabinogalactanos, sino otras moléculas, como saponinas, taninos y compuestos polifenólicos; en un estudio realizado por Zippel y colaboradores (2009) con el extracto etanólico de *Mimosa tenuiflora*, observaron que a concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , se provocaba la muerte total de fibroblastos (pNHDF) y queratinocitos humanos al cabo de las 48 h de incubación; lo cual se lo atribuyen a la presencia de polifenoles en dicho extracto. Sin embargo, en un estudio realizado por Moghtaderi y colaboradores (2017), con AGPs obtenidos de la corteza de *Larix decidua*, quedó demostrado que estos compuestos también provocan la muerte tanto de células sanas como cancerosas; dicho efecto resultó ser dependiente del tiempo y concentración matando el 40% de las células MDA-MB-231 de cáncer de mama y el 15% de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (utilizadas como células

---

sanas) a una concentración de 10 mg/mL a las 24 h de incubación. Dicha muerte se dio por activación de la apoptosis en un 30% y necrosis en 15% aproximadamente.

Este efecto es similar a lo observado al evaluar las nanopartículas NDs/Ch; las cuales provocaron una mortandad del 41% de las células MDA-MB-231 y un 55% de fibroblastos humanos a la concentración de 200 µg/mL y 24 h de incubación. Esto era de esperarse debido a que el quitosano, quien recubre al nanodiamante, expone sus grupos amino capaces de interactuar con las cargas negativas de los residuos de macromoléculas (lipopolisacáridos y proteínas), presentes en las membranas de las células provocando la formación de poros en la membrana, lo cual provoca la lisis celular (Verle *et al.*, 2017). Estas cargas también pueden competir con el calcio para los sitios electronegativos en la membrana, lo que compromete su integridad, causando la liberación de material intracelular resultando en la muerte celular inducida por necrosis (Martínez-Camacho *et al.*, 2010; Möller *et al.*, 2004). En el presente estudio la presencia de necrosis generada por las nanopartículas de NDs/Ch fue demostrada al apreciar que las células expuestas a estas partículas presentan un barrido en la prueba de fragmentación del DNA, lo cual es típico de necrosis.

Por otro lado, la incorporación del extracto etanólico de *M. tenuiflora* a NDs/Ch, fue selectivo para células cancerosas a una concentración de 50 µg/mL; ocasionando un porcentaje de mortandad de cerca del 60% en dichas células y del 0% en células sanas, a las 24 h de incubación. Esta muerte se logra apreciar que es por activación tanto de apoptosis como necrosis; esto debido a que se aprecian tanto los fragmentos de DNA en escalera típicos de apoptosis; pero también un ligero barrido indicativo de necrosis. Esto concuerda con lo reportado por Moghtaderi y colaboradores (2017), en donde al evaluar la combinación de 75 µM curcumina (colorante vegetal) y 10mg/mL de AGPs sobre células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), utilizadas como células sanas. Identificaron que al cabo de 24 h de incubación se provocaba una mortandad del 66% de células cancerosas y cerca del 15% de células sanas; y que dicha muerte se daba por activación de la apoptosis en un 90% y necrosis en 20% aproximadamente. Estudios realizados por Wang y colaboradores (2014), muestran que un complejo de nanodiamante con epirubicina en relación 5:1 provocan mortandad tanto en células sanas como tumorales hepáticas en modelos *in vitro* e *in vivo* en

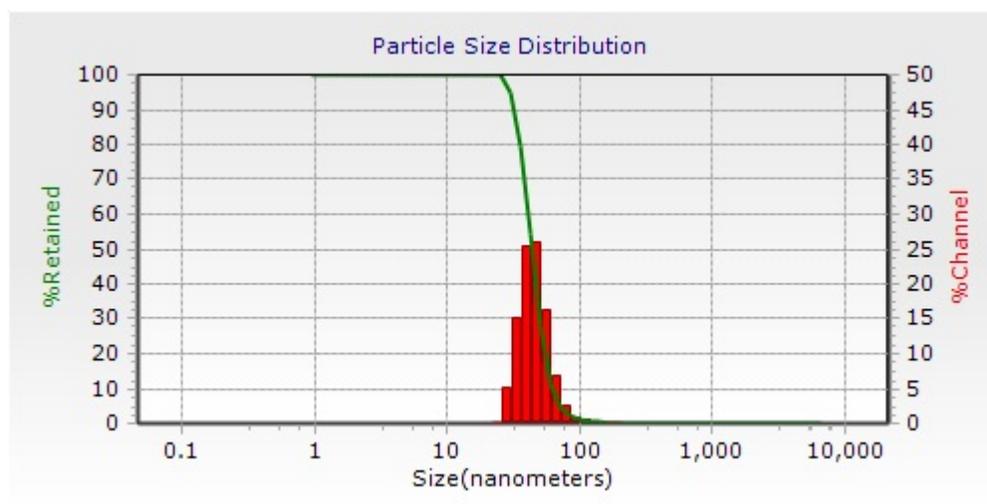
---

comparación con tratamientos estándares como el paclitaxel. Esto contrasta con aportaciones previas, que señalan que el nanodiamante es inerte y menos tóxico que otras alternativas, como los nanotubos de carbono (Lim, 2016).

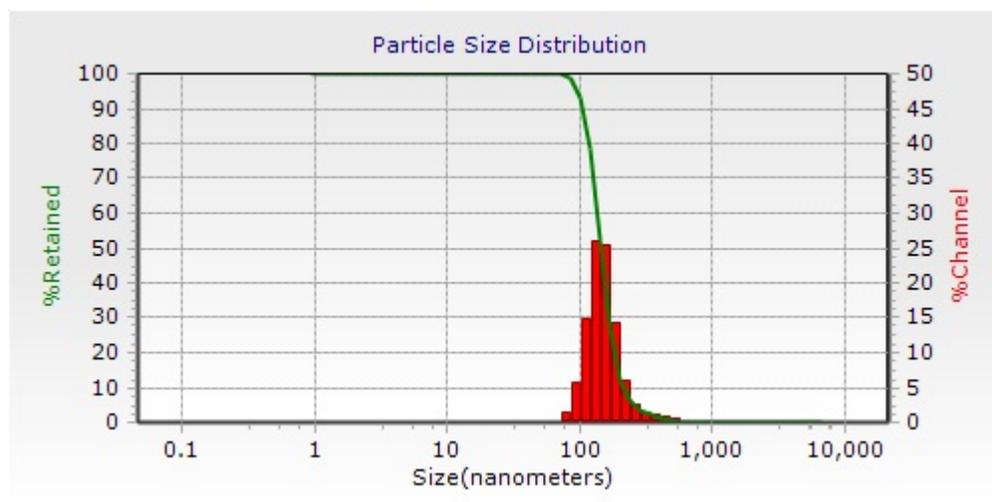
Sin embargo, la especificidad del material probablemente se deba a un bloqueo de la actividad antimicrobiana del quitosano por la incorporación del extracto, o viceversa, pero no se sabe quién de los dos queda expuesto, por lo que se desconoce quién fue el causante de la muerte celular.

#### 10.4. Tamaño de partícula y potencial zeta

Se realizó un análisis de tamaño de partículas por medio del equipo Microtrac, el cual tiene como principal función la determinación del tamaño de las partículas disueltas en alguna solución, donde se analizaron las nanocápsulas de Ch y ND, y se encontró, que al tener únicamente las partículas de ND (Figura 13) el tamaño de partícula se encuentra entre una distribución de 50 a 90nm, con un valor medio (VM) de 46.90 nm, en cambio en la Figura 14, al estar las partículas de ND/Ch debería de haber un incremento de tamaño, encontrándose un tamaño de entre una distribución de entre 100 y 500 nm, con un VM de 158.6nm, lo que nos indica en que hay una unión entre estas dos partículas.

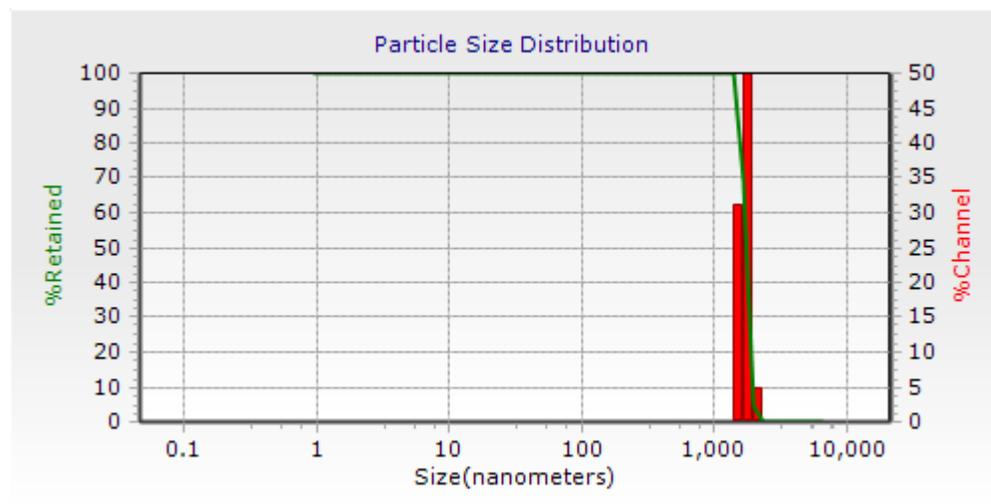


**Figura 13.** Distribución del tamaño de partículas de nanodiamantes (ND).



**Figura 14.** Distribución del tamaño de partículas de nanodiamantes y quitosano (ND/Ch).

Por otro lado, se analizaron las nanocápsulas de Ch/ND/Extracto (Figura 15), y, un mayor tamaño de las partículas con un VM 1,710nm, lo que es un indicio de que se encuentran unidos los 3 compuestos: ND/Ch/Ext.

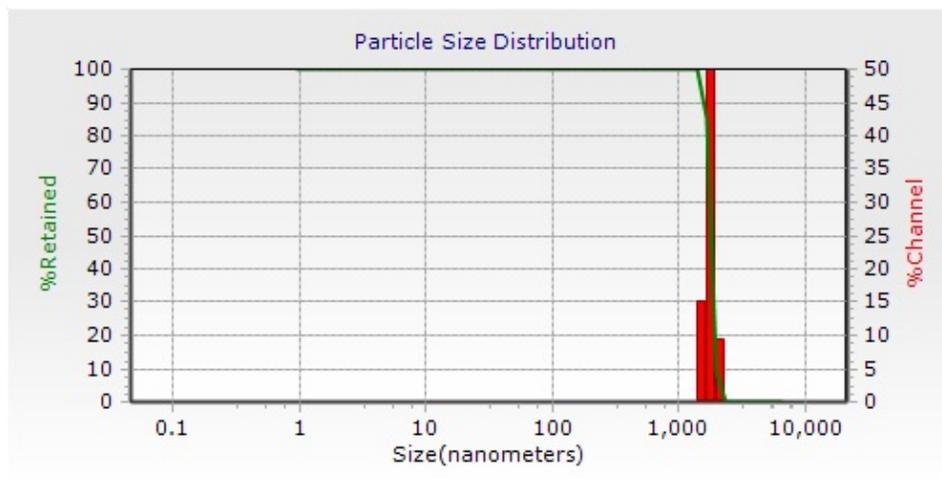


**Figura 15.** Distribución del tamaño de partículas de quitosano, nanodiamantes y extracto (Ch/ND/Ext).

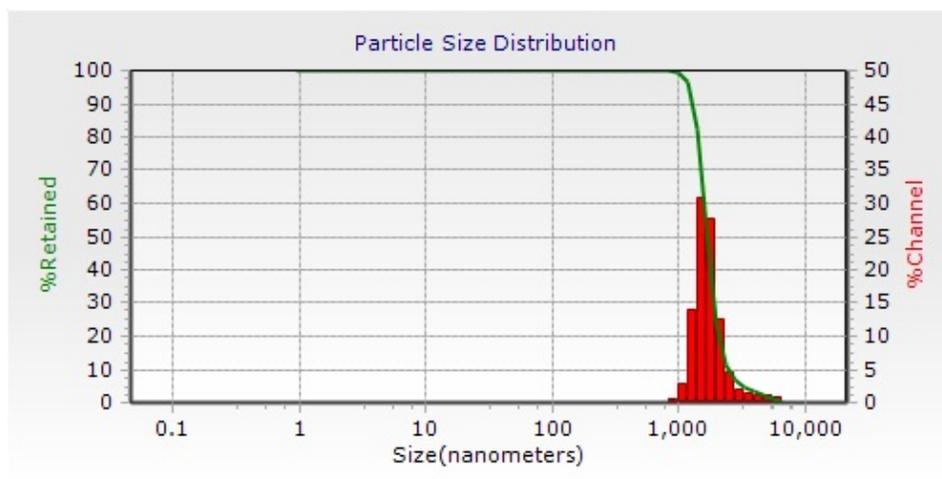
En este sentido, se realizó la medición de las nanocápsulas de Ch/ND/Ext a tiempo cero en los tres diferentes pH: 6.4, 7.4 y 7.6, esto se logró por medio del equipo Microtrac, encontrando que el valor medio (VM) del tamaño de partícula para la muestra de pH 6.4 (Figura 16) fue de 1,771nm y un potencial Z de 247.8mv, en cambio las partículas medidas

---

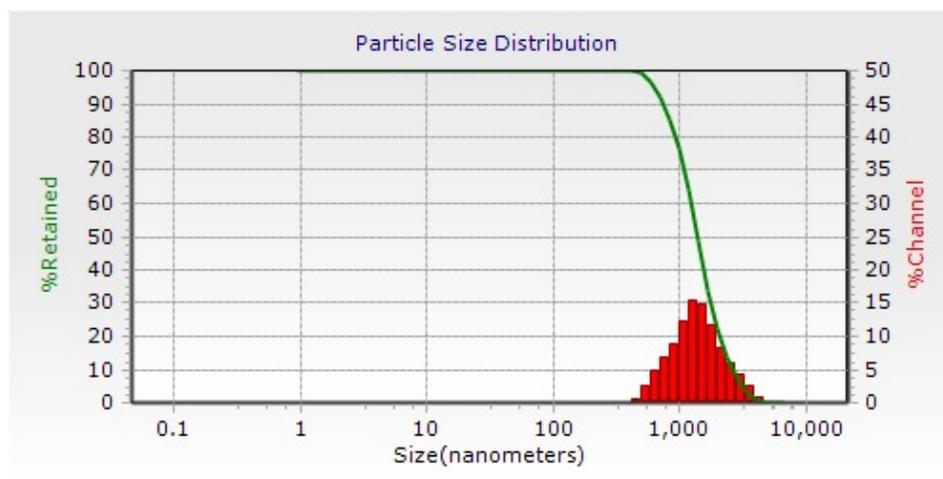
en pH 7.4 (Figura 17), presentó un VM 1,829 y un potencial Z de -306.9mv y en la muestra de pH 7.6 (Figura 18), presentó un VM 1,519 de un potencial Z de 4,301,5mv.



**Figura 16.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo cero a pH 6.4.

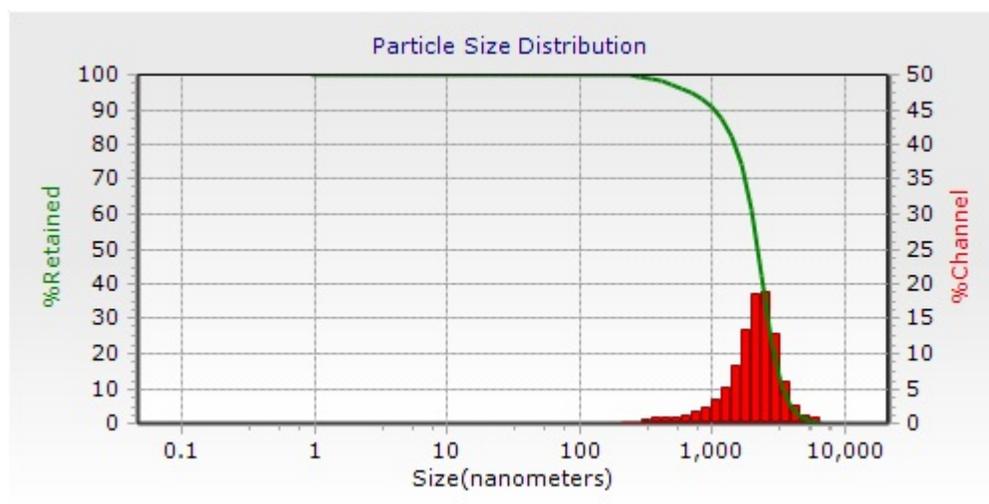


**Figura 17.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo cero a pH 7.4.

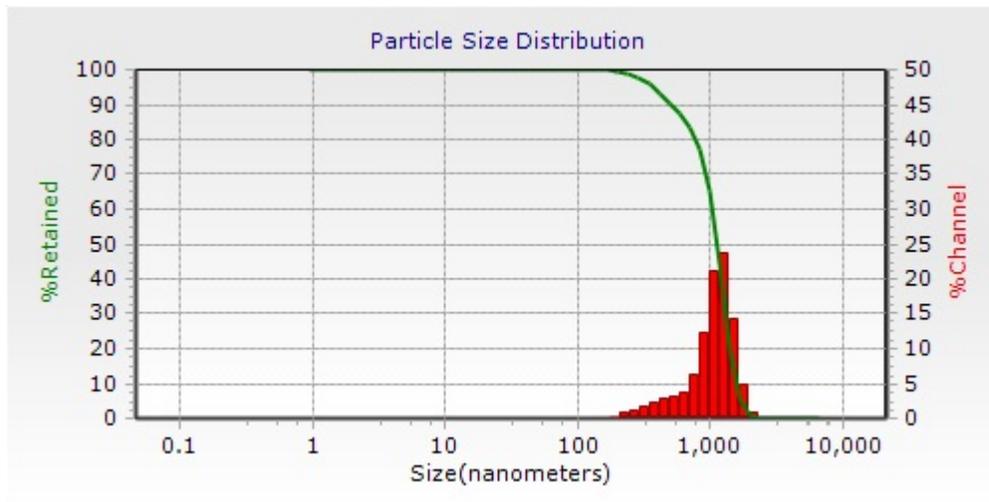


**Figura 18.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo cero a pH 7.6.

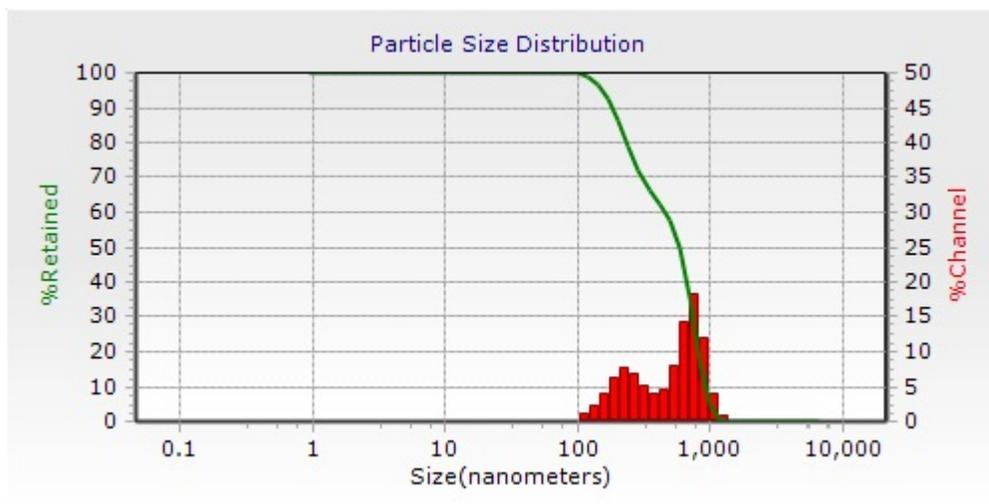
Se realizó la medición de las nanocápsulas de Ch/ND/Ext a tiempo de 24h en los tres diferentes pH: 6.4, 7.4 y 7.6, esto se logró por medio del equipo Microtrac, encontrando que el valor medio (VM) del tamaño de partícula para la muestra de pH 6.4, (Figura 19), fue de 2,201nm y un potencial Z de 336.1mv, en cambio las partículas medidas en pH 7.4 (Figura 20), presentó un VM de 1,075nm y un potencial Z de 7,740mv y en la muestra de pH 7.6 (Figura 21), presentó una distribución bimodal con un VM 542.0nm de y un potencial Z de 20.7mv.



**Figura 19.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 24h a pH 6.4.

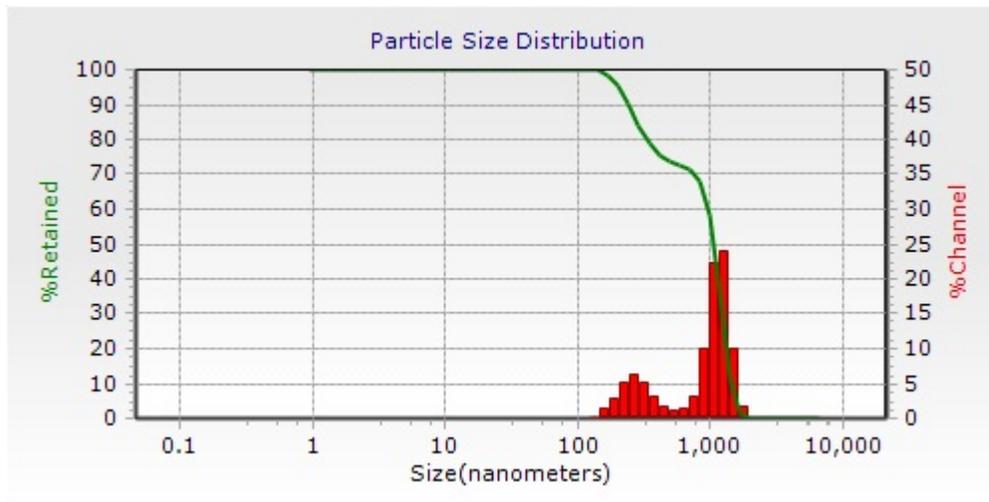


**Figura 20.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 24h a pH 7.4.

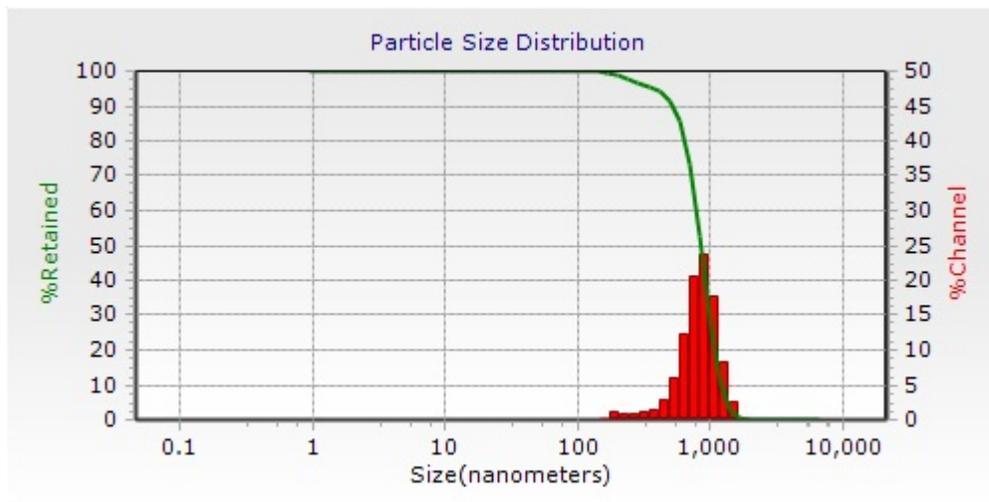


**Figura 21.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 24h a pH 7.6.

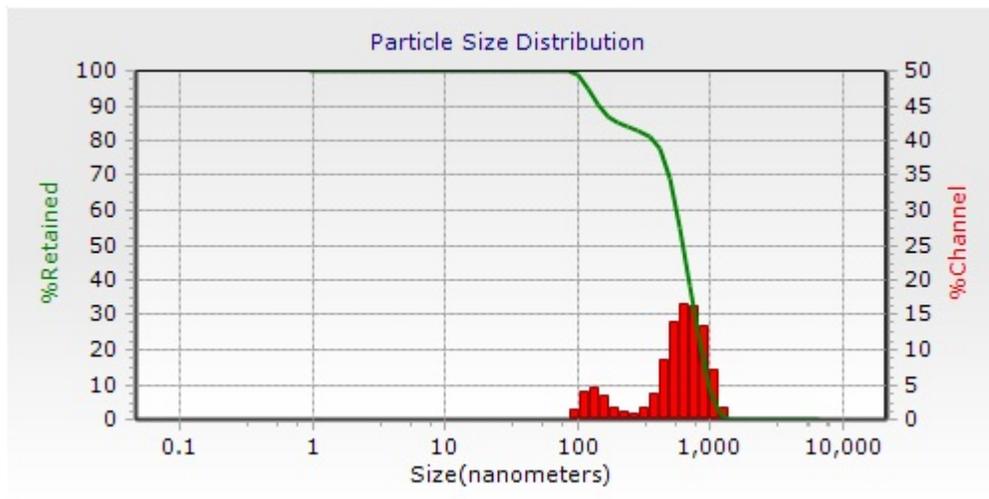
Se realizó la medición de las nanocápsulas de Ch/ND/Ext a tiempo de 48 h en los tres diferentes pH: 6.4, 7.4 y 7.6, esto se logró por medio del equipo Microtrac, encontrando que el valor medio (VM) del tamaño de partícula para la muestra de pH 6.4, (Figura 22), fue de 920.0nm con una distribución bimodal y un potencial Z de 4,492.8mv, en cambio las partículas medidas en pH 7.4 (Figura 23), presentó un VM de 839.0nm y un potencial Z de 15.2mv y en la muestra de pH 7.6 (Figura 24), presentó una distribución bimodal con un VM 598.0 nm de y un potencial Z de 54.7mv.



**Figura 22.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 48h a pH 6.4.

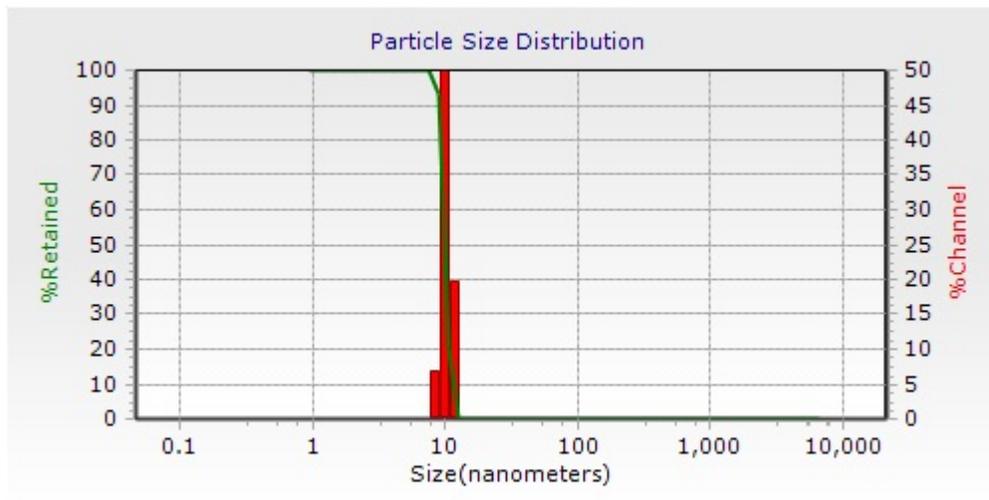


**Figura 23.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 48h a pH 7.4.

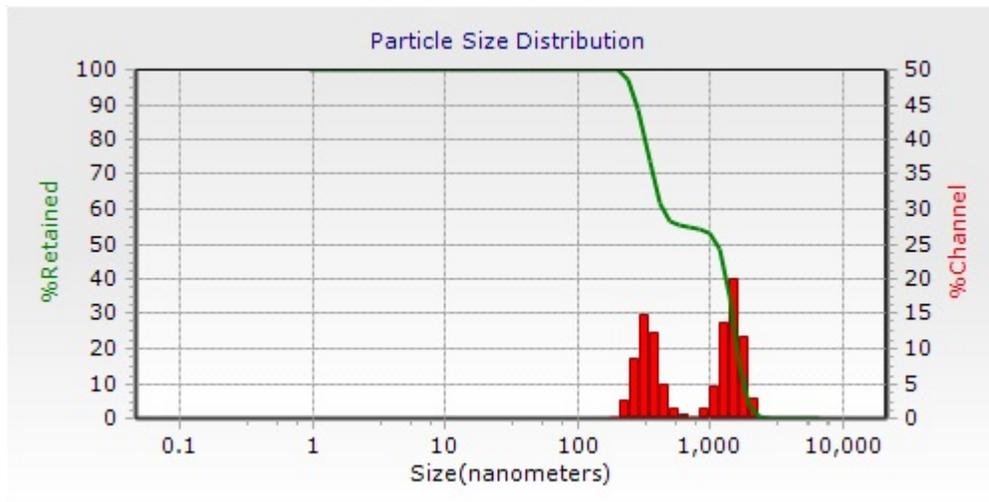


**Figura 24.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 48h a pH 7.6.

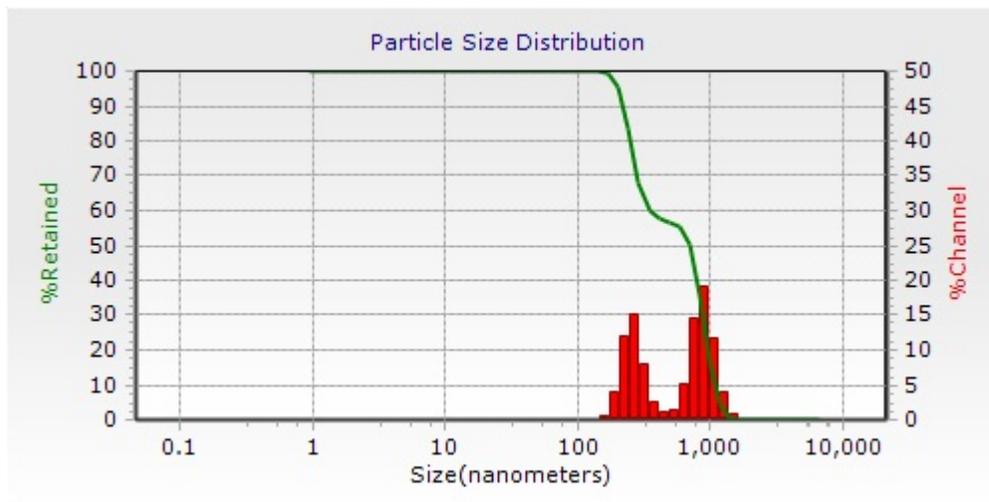
También se realizó la medición de las nanocápsulas de Ch/ND/Ext a tiempo de 72h en los tres diferentes pH: 6.4, 7.4 y 7.6, esto se logró por medio del equipo Microtrac, encontrando que el valor medio (VM) del tamaño de partícula para la muestra de pH 6.4 (Figura 25), fue de 10.10nm con una distribución bimodal y un potencial Z de 21,238.4mv, en cambio las partículas medidas en pH 7.4 (Figura 26), presentó un VM de 966.0 nm con una distribución bimodal y un potencial Z de 338.3mv y en la muestra de pH 7.6 (Figura 27), presentó una distribución bimodal con un VM 619.0nm de y un potencial Z de 899.7mv



**Figura 25.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 72h a pH 6.4.



**Figura 26.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 72h a pH 7.4.

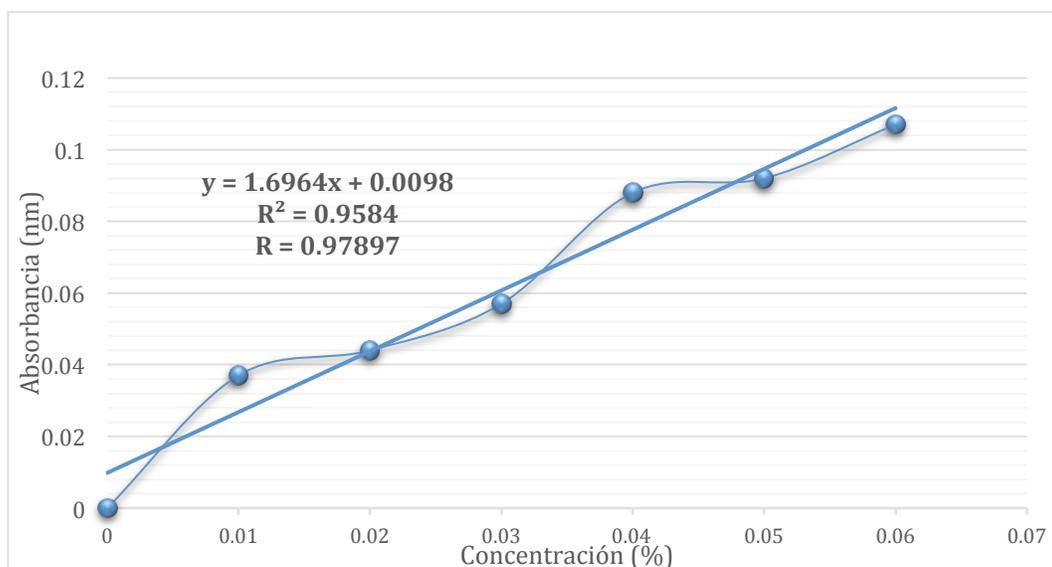


**Figura 27.** Distribución del tamaño de partículas de Ch/ND/Ext, tiempo 72h a pH 7.6.

### 10.5 Medición de partículas con espectrofotometría UV-vis

Se llevó a cabo la medición de las partículas de Ch/ND/Ext donde se midieron las absorbancias a los tiempos: 0, 24, 48 y 72h a pH de: 6.4, 7.4 y 7.6. Sin embargo, solamente se realizó la curva de calibración para el pH de 7.4 a concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, y 0.06 % (Figura 28), donde se obtuvo una fórmula de  $y=1.6964x + 0.0098$ , con la cual al sustituir 'y' por los valores obtenidos de las absorbancias de las diferentes muestras en distintos tiempos y pH al despejar 'x' se lograron obtener los valores de concentración de muestras, los cuales se describen en la Tabla 1.

Cabe destacar que las concentraciones teóricas de las partículas iniciales fueron del 0.02%, sin embargo, según las absorbancias obtenidas en cada caso, no se observa una disminución de la concentración, sino un aumento de ella en la mayoría de las muestras.



**Figura 28.** Curva de calibración de concentraciones 0.01 a 0.06 % de Ch/ND/Ext en PBS a pH 7.4, a 280nm.

**Tabla 1.** Absorbancias registradas y concentraciones calculadas de Ch/ND/Ext en pH 6.4, 7.4 y 7.6 a tiempo 0, 24, 48 y 72h.

Tiempo	pH	Concentración (%)	Absorbancia (Abs)
0 h	6.4	<b>0.021339</b>	0.046
	7.4	<b>0.016033</b>	0.037
	7.6	<b>0.029592</b>	0.06
24 h	6.4	<b>0.016623</b>	0.038
	7.4	<b>0.034897</b>	0.069
	7.6	<b>0.036076</b>	0.071
48 h	6.4	<b>0.025465</b>	0.053
	7.4	<b>0.035486</b>	0.07
	7.6	<b>0.067319</b>	0.124
72 h	6.4	<b>0.089719</b>	0.162
	7.4	<b>0.025465</b>	0.053

## 11. Conclusiones

El aislamiento e identificación de los arabinogalactanos en el extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora*, se llevó a cabo mediante la técnica de difusión de agarosa radial utilizando el reactivo de Yariv.

El acoplamiento entre los NDs/Ch-extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora* se logró analizar mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, sin embargo, se desconoce si los grupos hidroxilo, éteres y amida pertenecen al quitosano o al extracto, debido a que ambas moléculas presentan estos grupos funcionales.

Las nanocápsulas de NDs/Ch-extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora*, ocasionaron la muerte de casi 60% de células tumorales, siendo específico para éstas, a una concentración de 50 µg/mL al cabo de 24 h de incubación.

La muerte celular ocasionada por las nanocápsulas fue por activación tanto de apoptosis como necrosis; esto debido a que se aprecian tanto los fragmentos de DNA en escalera típicos de apoptosis; pero también un ligero barrido indicativo de necrosis.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Amidi, M., Hennink, W. (2010). Chitosan-based formulations of drugs, imaging agents and biotherapeutics. Preface. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(1), 1-2.
- Anbinder, P., Macchi, C., Amalvy, J., & Somoza, A. (2016). Chitosan-graft-poly(n-butyl acrylate) copolymer: Synthesis and characterization of a natural/synthetic hybrid material. *Carbohydr Polym*, 145, 86-94. doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.072
- Banu, H., Sethi, D. K., Edgar, A., Sheriff, A., Rayees, N., Renuka, N., . . .
- Vasanthakumar, G. (2015). Doxorubicin loaded polymeric gold nanoparticles targeted to human folate receptor upon laser photothermal therapy potentiates chemotherapy in breast cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B*, 149, 116-128. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.05.008

- 
- Choi, C., Nam, J.-P., & Nah, J.-W. (2016). Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *33*, 1-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2015.10.028>
- Cui, Z., Zhang, Y., Zhang, J., Kong, H., Tang, X., Pan, L., . . . Zhu, Y. (2016). Sodium alginate-functionalized nanodiamonds as sustained chemotherapeutic drug-release vectors. *Carbon*, *97*, 78-86. doi:10.1016/j.carbon.2015.07.066
- Fernández Ortega, J., De Paz Fernández, J. (2012). Cáncer de mama y ejercicio físico: revisión. *Revista hacia la promoción de la salud*, *17*(1), 135-153.
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*, *62*(1), 3-11.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>
- Krueger, A., Stegk, J., Liang, Y., Lu, L., & Jarre, G. (2008). Biotinylated Nanodiamond: Simple and Efficient Functionalization of Detonation Diamond. *Langmuir*, *24*(8), 4200-4204. doi:10.1021/la703482v
- Lam, R., Chen, M., Pierstorff, E., Huang, H., Osawa, E., & Ho, D. (2008). Nanodiamond-Embedded Microfilm Devices for Localized Chemotherapeutic Elution. *ACS Nano*, *2*(10), 2095-2102. doi:10.1021/nn800465x
- Li, J., Zhu, Y., Li, W., Zhang, X., Peng, Y., & Huang, Q. (2010). Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug. *Biomaterials*, *31*(32), 8410-8418. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.058
- Liu, R., Zhao, F., Yu, X., Naito, K., Ding, H., Qu, X., & Zhang, Q. (2014). Synthesis of biopolymer-grafted nanodiamond by ring-opening polymerization. *Diamond and Related Materials*, *50*, 26-32.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.diamond.2014.08.011>
- Martel-Estrada, S. A., Olivas-Armendáriz, I., Santos-Rodríguez, E., Martínez-Pérez, C. A., García-Casillas, P. E., Hernández-Paz, J., . . . Chapa-González, C. (2014). Evaluation of in vitro bioactivity of Chitosan/Mimosa tenuiflora composites. *Materials Letters*, *119*, 146-149. doi:10.1016/j.matlet.2014.01.004
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerro-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., . . . Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and
-

- 
- antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315.  
doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.069
- Martinez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodriguez-Felix, F., Castillo-Ortega, M. M., Burgos-Hernandez, A., . . . Plascencia-Jatomea, M. (2013). Extruded films of blended chitosan, low density polyethylene and ethylene acrylic acid. *Carbohydr Polym*, 91(2), 666-674.  
doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.076
- Mochalin, V. N., Shenderova, O., Ho, D., & Gogotsi, Y. (2012). The properties and applications of nanodiamonds. *Nat Nano*, 7(1), 11-23.
- Ostadossein, F., Mahmoudi, N., Morales-Cid, G., Tamjid, E., Navas-Martos, F., Soriano-Cuadrado, B., . . . Simchi, A. (2015). Development of Chitosan/Bacterial Cellulose Composite Films Containing Nanodiamonds as a Potential Flexible Platform for Wound Dressing. *Materials*, 8(9), 5309.
- Perchyonok, V., Souza, T., Felliti, R., Zhang, S. and Grobler, S. . (2015). Bio-Functional Nanodiamond Restorative Materials Containing Bio-Additives: In Vitro Approach. *Open Journal of Stomatology*, 5, 117-126.
- Quiroz, M. M., U., Martínez, C. (2006). Nanodiamantes. *Ingenierías*, 33, 37-43.
- Rivera-Arce, E., Gattuso, M., Alvarado, R., Zarate, E., Aguero, J., Fera, I., & Lozoya, X. (2007). Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. *J Ethnopharmacol*, 113(3), 400-408.  
doi:10.1016/j.jep.2007.06.023
- Shimkunas, R. A., Robinson, E., Lam, R., Lu, S., Xu, X., Zhang, X. Q., . . . Ho, D. (2009). Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles. *Biomaterials*, 30(29), 5720-5728. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.004
- van der Lubben, I. M., Verhoef, J. C., Borchard, G., & Junginger, H. E. (2001). Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 201-207.  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00172-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00172-5)
- Wang, H.-D., Yang, Q., & Niu, C. H. (2010). Functionalization of nanodiamond particles with N,O-carboxymethyl chitosan. *Diamond and Related Materials*, 19(5-6), 441-444. doi:10.1016/j.diamond.2010.01.032
-

---

Wang, P., Zhang, L., Yao, J., Shi, Y., Li, P., & Ding, K. (2015). An arabinogalactan from flowers of *Panax notoginseng* inhibits angiogenesis by BMP2/Smad/Id1 signaling. *Carbohydrate Polymers*, *121*, 328-335.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.073>

Zhang, H. H., Liu, Y. T., Wang, R., Yu, X. Y., Qu, X. W., & Zhang, Q. X. (2011). Functionalization of nanodiamond with epoxy monomer. *Chinese Chemical Letters*, *22*(4), 485-488. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccllet.2010.10.047>

Zhang, X.-Q., Lam, R., Xu, X., Chow, E. K., Kim, H.-J., & Ho, D. (2011). Multimodal Nanodiamond Drug Delivery Carriers for Selective Targeting, Imaging, and Enhanced Chemotherapeutic Efficacy. *Advanced Materials*, *23*(41), 4770-4775. doi:10.1002/adma.201102263

Zippel, J., Deters, A., & Hensel, A. (2009). Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. *J Ethnopharmacol*, *124*(3), 391-396. doi:10.1016/j.jep.2009.05.034