

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO
COMO TRANSPORTE DE FÁRMACOS PARA
TRATAMIENTO CONTRA CÁNCER DE PIEL**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERÍA**

PRESENTA

Cesar Oswaldo Cota Leyva

DIRECTOR

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Ensenada, Baja California, México, Junio 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO COMO TRANSPORTE DE FÁRMACOS PARA TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER DE PIEL

TESIS

Que para obtener el grado de MAESTRO EN INGENIERÍA presenta:

CESAR OSWALDO COTA LEYVA

Aprobada por:



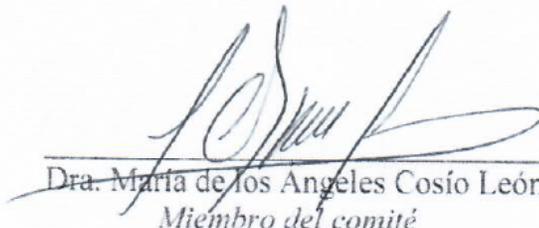
Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Director de tesis



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Codirector de tesis



Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez
Miembro del comité



Dra. María de los Angeles Cosío León
Miembro del comité

Ensenada, Baja California, México, Junio 2018

RESUMEN de la tesis de **CESAR OSWALDO COTA LEYVA** presentada como requisito parcial para la obtención del grado MAESTRO EN INGENIERÍA del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México, Junio del 2018.

**Síntesis y caracterización de quitosano como transporte de fármacos para
tratamiento contra cáncer de piel**

Aprobada por:



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Codirector de tesis



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Director de tesis

Resumen:

En este trabajo se presenta la síntesis de quitosano obtenido a partir de cáscara de camarón para la liberación controlada de un compuesto bioactivo como posible tratamiento contra el cáncer de piel. Los materiales sintetizados se caracterizaron por medio de las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido-Transmisión (*STEM por sus siglas en inglés Scanning Transmission Electron Microscopy*), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (*FT-IR por sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) y Difracción de rayos X (*XRD por sus siglas en inglés X-Ray Diffraction*). El sistema de quitosano cargado con el compuesto bioactivo presentó una estructura circular de arquitectura micelar. La carga del compuesto bioactivo se realizó en una relación de 1:10 (compuesto bioactivo: polímero) a través del método de absorción en solución. La liberación *in vitro* se llevó a cabo mediante el método de diálisis y la concentración del fármaco liberado se determinó mediante espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

Palabras clave: Quitosano; Kaempferitrin; Liberación controlada; Administración de fármacos; STEM; FT-IR; UV-Vis.

**“Investigación es lo que hago cuando
no sé lo que estoy haciendo”**

Wernher von Braun

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios por llenarme de bendiciones, salud y vida, además de darme la oportunidad de llegar a tan valioso momento.

A mis padres, César Cota y Margarita Leyva, por siempre haberme inculcado los valores para ser una buena persona, por su apoyo incondicional, por su paciencia a lo largo de los años y sobre todo su cariño y amor, los amo.

A mis abuelos que siempre han estado apoyándome y dándome sabios consejos, que Dios siempre los cuide y les dé muchos años más.

A mi hermana, Cinthia Fabiola, por ser un gran apoyo y brindarme su cariño en la distancia, por demostrarme lo que es ser un gran profesional entregado a su carrera y motivarme a ser una mejor persona, te quiero mucho.

A toda mi familia, por ser una parte importante en mi vida, por estar siempre pendiente de mí, de mi desarrollo profesional y académico, pero, sobre todo por sus consejos y apoyo en el transcurso de este proyecto y en la vida.

A Alejandra Lazalde por su apoyo, compañía, cariño y paciencia, pero sobre todo su amor y comprensión.

A mis amigos, que siempre estuvieron ahí en los buenos y malos momentos, y darme palabras de aliento y motivarme siempre, infinitas gracias.

A mis profesores, en especial al Dr. Priscy Alfredo Luque Morales, por el tiempo que me dedicaron y por todas las enseñanzas, las cuales me han permitido llegar a este punto de mi vida académica y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme apoyado a lo largo de estos 2 años y poder llevar a cabo la realización de este proyecto, en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI).

A la Facultad de Ingeniería Arquitectura y Diseño de la Universidad Autónoma de Baja California por haberme permitido el uso de sus instalaciones, laboratorios y equipos para poder llevar a cabo mis estudios y experimentos.

A mi asesor el Dr. Priscy Alfredo Luque Morales por sus consejos, paciencia y enseñanzas semestre tras semestre, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, y poder llevar a cabo la realización de este proyecto.

A la Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez por sus enseñanzas, asesoría y consejos tanto en el aula como en los laboratorios.

Al Dr. Alfredo Vilches Néstor por su asistencia técnica en el desarrollo de este trabajo, especialmente en la parte de caracterización.

A la Dra. María Cosío y el Dr. Rubén Villarreal por sus observaciones, instrucciones y comentarios para enriquecer y mejorar este trabajo.

A mis amigos y compañeros por sus consejos, su alegría y sus buenos deseos, así como también a los profesores que fueron parte de mi formación académica a lo largo de los años por sus enseñanzas y consejos tanto en los temas escolares como en la vida diaria.

ÍNDICE TEMÁTICO

RESUMEN.....	III
<i>DEDICATORIA</i>	V
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	VI
ÍNDICE TEMÁTICO.....	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	XI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El Cáncer.....	2
1.2. Cáncer de piel.....	3
1.2.1. Carcinoma basocelular	5
1.3. Fármacos y tratamientos contra cáncer de piel	7
1.4. Extractos de plantas con actividad anticancerígena	8
1.4.1. <i>Justicia spicigera</i> “muicle”	10
1.5. Polímeros utilizados como sistema de administración de fármacos	12
1.5.1. Quitosano.....	14
1.6. Micelas	15
1.7. Objetivo general.....	18
1.8. Objetivos específicos	18
CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS.....	19
2.1. Difracción de rayos X (XRD)	20
2.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	23
2.3. Microscopía Electrónica de Barrido-Transmisión (STEM).....	25
2.4. Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis)	28

2.5. Diálisis en la liberación de fármacos	30
CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
3.1. Síntesis de quitosano a través de cáscara de camarón.....	34
3.2. Obtención de extracto etanólico.....	35
3.3. Difracción de rayos X	35
3.4. Ensayos de toxicidad.....	35
3.5. Preparación de las micelas	36
3.6. Carga de compuesto en el sistema	37
3.7. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier	37
3.8. Microscopía Electrónica de Barrido –Transmisión.....	37
3.9. Liberación de fármaco.....	38
3.10. Curva de calibración	39
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Difracción de rayos X	41
4.2. Ensayos de toxicidad.....	42
4.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier	43
4.4. Microscopía Electrónica de Barrido-Transmisión	46
4.5. Estudios de liberación del fármaco	49
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presentación del cáncer de piel en una persona afectada	4
Figura 2. Esquema del desarrollo del carcinoma basocelular	5
Figura 3. Justicia spicigera.....	11
Figura 4. Estructura de kaempferitrin	12
Figura 5. Estructura química del quitosano	14
Figura 6. Estructura de las micelas poliméricas.....	16
Figura 7. Ley de Bragg	20
Figura 8. Las redes de Bravais en las cuales se clasifican los materiales cristalinos.....	22
Figura 9. Equipo Infrarrojo por Transformada de Fourier con UATR.	24
Figura 10. Señales originadas en la interacción haz-materia	26
Figura 11. Microscopía Electrónica de Barrido- Transmisión	27
Figura 12. Microscopio Electrónico de Barrido-Transmisión JEOL JEM-2100.	27
Figura 13. Absorción de una muestra para espectrofotometría UV-Vis.....	29
Figura 14. Espectrofotómetro UV-Vis HACH DR 5000.....	30
Figura 15. Sistema de liberación por el método de diálisis	31
Figura 16. Esquema general del proceso de obtención de quitosano.....	34
Figura 17. Proceso del fenómeno de difusión en el sistema	38
Figura 18. Espectro de difracción de rayos X de quitosano (línea roja) y cáscara de camarón (línea negra).....	41
Figura 19. Gráficas de las pruebas toxicológicas del polímero de quitosano realizadas por triplicado.	42
Figura 20. Espectro FT-IR del quitosano comercial (línea roja) y el quitosano obtenido (línea negra).	43
Figura 21. Espectros FT-IR de los extractos de las plantas M1) 100% solvente, M2) 60% solvente, M3) 70% solvente con ultrasónico M4) 50% solvente y M5) 70% solvente. ...	44
Figura 22. Espectros FT-IR del sistema de quitosano sin cargar (línea roja) y el polímero cargado (línea negra).....	45
Figura 23. Micrografía de quitosano sin cargar a escala de 0.2 micrómetros.....	46

Figura 24. Micrografía del polímero de quitosano cargado con kaempferitrin a escala de 0.2 micrómetros.....	47
Figura 25. Micrografía del polímero de quitosano cargado con kaempferitrin a escala de 50 nanómetros.	48
Figura 26. Curva de calibración del fármaco kaempferitrin. Se incluye ecuación de regresión lineal y coeficiente de correlación.....	49
Figura 27. Curva de liberación del compuesto bioactivo kaempferitrin.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diferentes tipos de cáncer según el tejido de origen.....	3
Tabla 2. Citotoxicidad de diversas plantas de la región de Baja California.....	10
Tabla 3. Polímeros utilizados para sistemas de administración de fármacos.....	13
Tabla 4. Diferentes tipos y subtipos de células	22
Tabla 5. Reactivos y cantidades para preparar 1 litro de caldo LB.....	36
Tabla 6. Reactivos y cantidades para preparar 1 litro de agar EMB.....	36
Tabla 7. Reactivos utilizados para preparar 250 ml de buffer PBS.	39

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. El Cáncer

El cáncer es una enfermedad prehistórica como se ha encontrado en los restos de huesos fósiles y en las antiguas momias del Egipto. El origen de la palabra cáncer se le acredita a Hipócrates el cual uso las palabras “carcinosis” y “carcinoma”, de origen griego que significa cangrejo, por la forma de las protuberancias que se asemeja a las tenazas. Años más tarde, el romano Celsius (28-50 a.C.) tradujo esta palabra griega a cáncer. Esta enfermedad se ha convertido en la segunda causa de muerte a nivel mundial después de las enfermedades cardiovasculares [1].

De acuerdo con el manual nacional de oncología, el cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier órgano del cuerpo. Dichas enfermedades se caracterizan alteraciones en la regulación del crecimiento y/o muerte celular por adquisición de una capacidad para invadir localmente y diseminarse a distancia; también se denominan tumores malignos o neoplasias malignas. En el cáncer se acumulan células anormales ya sea por multiplicación rápida descontrolada o por fallas en los mecanismos de muerte celular natural. Las células neoplásicas presentan invasividad, esto significa que se extienden más allá de los límites habituales dentro o fuera de sus órganos de origen [2]. En la Tabla 1 se muestra la clasificación de los diferentes tipos de cáncer de acuerdo al tejido de origen.

Algunos autores han definido al cáncer como una entidad letal y definitiva en la actualidad; a nivel mundial se reconoce como una de las principales causas de muerte. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), ocupó para 2008 el segundo lugar (7.7 millones de defunciones) y que, por añadidura, más del 70% de muertes por esta causa se registraron en países de ingresos bajos o medianos. Esta cifra, según cálculos para 2030, llegará a superar los 13.1 millones. Si lo anterior no fuera suficiente, el impacto económico que el cáncer ocasiona anualmente, supera el billón

de dólares, esto sin contar el costo humano a causa del sufrimiento que esta enfermedad ocasiona [3].

Tabla 1. Diferentes tipos de cáncer según el tejido de origen [2].

Tipos de cáncer				
Carcinomas (tumores epiteliales)	Sarcomas (tumores del tejido de sostén, músculos y vasos)	Tumores linforreticulares y hemopoyéticos	Tumores del tejido nervioso	Tumores de melanocitos
-Adenocarcinomas -Carcinoma epidermoide -Carcinoma Basocelular	-Liposarcoma -Fibrosarcoma -Leiomiocarcinoma -Rabdosarcoma -Osteosarcoma	-Linfomas -Leucemias -Mieloma	-Astrocitos -Ependimarios -Embrional -de Nervios Craneales -de Nervios Periféricos -Meninges	-Melanoma

1.2. Cáncer de piel

Uno de los principales tipos de cáncer es el cáncer de piel, ya que es el más común en el mundo y su incidencia sigue aumentando. Este tipo de cáncer se divide principalmente en 2 grupos que representan el 95% de los casos de cáncer de piel, estos son, el que se deriva de los melanocitos (melanoma) y el que se deriva de las células presentes en la epidermis (cánceres de piel no melanoma), otros tumores cutáneos constituyen el 5% restante. La ocurrencia frecuente y su alta prevalencia convierten a estas malignidades en un importante problema de salud [4].

El ser humano tiene que conocer su piel, ya que la aparición de nuevos lunares de formas irregulares puede ser un síntoma de cáncer de piel, así como también una coloración entre marrón y marrón-rojiza, pueden tener bordes irregulares, y no son simétricos (Figura 1) [5]. Uno de los tipos de cáncer de piel no melanoma es el cáncer

basocelular, el cual la incidencia de este es la más frecuente de entre todos los tipos de cáncer existentes.



Figura 1. Presentación del cáncer de piel en una persona afectada [6].

En comparación con otras malignidades, poco se sabe sobre la incidencia del cáncer de piel. La tasa está aumentando en muchos países y aunque la razón aún no está clara, puede ser vinculado a un comportamiento bajo la exposición al sol. Es importante darse cuenta que la incidencia de los tipos de cáncer de piel no melanoma se basa en una vida de exposición a factores de riesgo, como la población de mayor edad que ha utilizado poca protección solar y recibió muy poca educación sobre los efectos de la radiación ultravioleta [7]. Como en otros tipos de cáncer, la posibilidad de padecer cáncer aumenta con la edad; la media de edad de diagnóstico es alrededor de los 63 años, y la media de fallecimiento por este tipo de cáncer es a los 69 años [8].

Gallagher (2010) describe al cáncer de piel como una enfermedad que surge de la división anormal o la mutación de las células de la piel. Casi el 90% de esta enfermedad está asociada a la sobreexposición de los rayos UV, esto puede ser el resultado por la exposición durante mucho tiempo bajo el sol, pero también, las camas bronceadoras están ganando mucha popularidad en estos días y esto ha contribuido en un aumento significativo en la persistencia de este tipo de cáncer [9].

La incidencia del cáncer de piel (incluyendo melanoma y los tipos no melanoma) durante el periodo comprendido entre los años 2002-2011 incrementaron de 3.4 millones a 4.6 millones de personas, pero incluso hasta nuestros días la incidencia sigue en aumento; en este periodo el costo anual por tratamiento aumentó de 3.6 billones de dólares a 8.1 billones, lo cual representa un incremento del 126.2%. Esto no es solo por el aumento de casos a nivel mundial, también es consecuencia del incremento de costos en los métodos de tratamiento. De ahí la importancia de prevenir y detectar a tiempo el cáncer de piel, ya que es más fácil erradicar esta enfermedad en las etapas iniciales, disminuyendo así el costo por tratamiento significativamente [10].

1.2.1. Carcinoma basocelular

El cáncer basocelular (*BCC*, por su sigla en inglés) es una neoplasia que se desarrolla en las células germinales basales (Figura 2), no tiene una fase pre-maligna visible y se caracteriza por un crecimiento lento y nodular, generalmente se desarrolla en la cara y un tercio se desarrolla en parte protegidas del sol como la esquina interior del ojo o la región retroauricular. Este tipo de cáncer tiene una tasa de metástasis menor de 0.1%; sin embargo, es altamente invasivo y localmente destructivo que compromete áreas extensas de tejido, cartílago e incluso en algunas ocasiones el hueso. A veces es difícil definir clínicamente cual tipo de cáncer de piel es y varios diagnósticos deben de ser considerados [11].

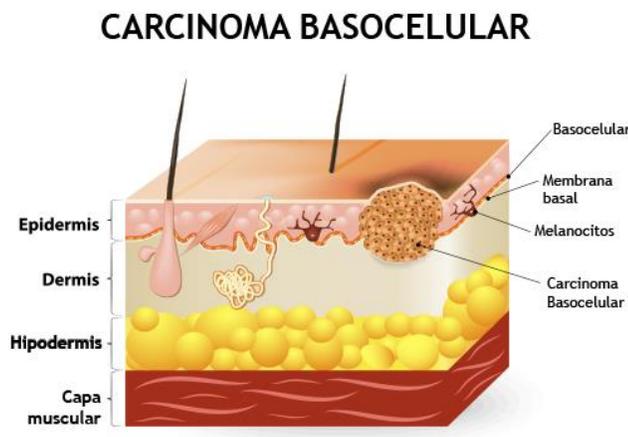


Figura 2. Esquema del desarrollo del carcinoma basocelular [12].

El cáncer de piel tipo basocelular es de especial interés ya que es el tipo de cáncer más común de entre todos los tipos de cáncer, uno de los principales factores de riesgo es la exposición a los rayos ultra-violeta y a pesar de la creciente conciencia de los efectos perjudiciales que tiene la exposición al sol, la incidencia sigue aumentando. El aumento de incidencia de cáncer de piel tipo no melanoma es de 2 al 8% anual desde los primeros reportes en 1960 [13].

El carcinoma basocelular no tiene una lesión precursora y generalmente proviene de las células madres dentro de los folículos capilares y la epidermis interfolicular. Una activación anormal en señalización de “puercoespín” (*Hedgehog*, por su sigla en inglés) es la llave en la fisiopatología de este tipo de cáncer [14].

El crecimiento del carcinoma basocelular conlleva a la destrucción local de las células sanas que se encuentran enseguida y en la capa inferior de las células cancerosas, lo cual puede resultar en un mal funcionamiento de las células y una morbilidad cosmética. Existen diferentes histopatologías de este tipo de cáncer, el carcinoma basocelular nodular (*nBCC*, por su sigla en inglés) es la variante que aparece con mayor frecuencia en la cara de las personas, tiene una apariencia nodular o papular, con un aspecto translucido y un color blanquizco, que en ciertas ocasiones presenta telangiectasia y ulceración en la superficie. La segunda variante más frecuente es el carcinoma basocelular superficial (*sBCC*, por su sigla en inglés), se presenta como un parche o una macula escamosa rojiza, aparece principalmente en el torso; tanto como el carcinoma basocelular superficial como el nodular son subtipos no agresivos [15].

Aunque la mayoría de los carcinomas de células basales se tratan fácilmente mediante diversos métodos quirúrgicos, estas lesiones progresan ocasionalmente a un estado avanzado que ya no es susceptible de cirugía o radioterapia (carcinoma de células basales localmente avanzado) o, más raramente, las lesiones se propagan a sitios distantes [16].

1.3. Fármacos y tratamientos contra cáncer de piel

Los tratamientos actuales contra el cáncer de piel no son tan eficientes, ya que la mayoría de éstos son cirugías para extirpar o desaparecer el tumor; para el caso de los tratamientos con fármacos terapéuticos contra el cáncer de piel, existe una amplia variedad de tratamientos para el cáncer cutáneo no melanoma, como son 5-fluorouracilo, mebutato de ingenol, imiquimod, diclofenaco, metotrexato, cetuximab, vismodegib, radioterapia, todos ellos con altas tasas de respuesta clínica e histológica [17].

Los tratamientos convencionales contra el cáncer que se usan hoy en día, quimioterapia y radioterapia, son costosos y causan muchos efectos secundarios, incluidos vómito, alopecia, diarrea, estreñimiento y otros más graves como mielosupresión, toxicidad neurológica, cardíaca, pulmonar y renal. Todos estos efectos secundarios reducen la calidad de vida y desalientan a los pacientes a observar protocolos de medicación que luego conducen a la progresión del cáncer y las complicaciones asociadas. Además, muchos de estos tratamientos presentan una actividad anticancerígena limitada. Los procedimientos de cirugía de resección, por otro lado, causan deficiencias funcionales o incomodidad estética. Por lo tanto, existe la necesidad de descubrir fármacos anticancerígenos alternativos, más potentes, selectivos y menos tóxicos que los actualmente se utilizan [18].

A pesar de existir tratamientos, algunos tumores no responden a éstos debido a la aparición de resistencia, tanto primaria como adquirida. Es por ello que se han desarrollado nuevas alternativas una de ellas son los sistemas de administración de fármacos (*DDS*, por su sigla en inglés). Diversos investigadores han trabajado con estos sistemas basados en diferentes materiales, generalmente de origen polimérico. Por ejemplo, se tienen varios estudios relacionados con el quitosano como medio de transporte de fármacos, Vivek y colaboradores (2013) elaboraron un sistema utilizando el fármaco tamoxifen, el cual fue cargado en nanopartículas de quitosano para formar complejos y el tamoxifen fue liberado más rápido a pH 4.0 y pH 6.0 que a un pH de

7.0, para tratamiento en células de cáncer de mama, lo cual es una característica deseable para un transportador de fármacos anti-tumoral [19]. Sabitha y colaboradores (2012) evaluaron el desarrollo y liberación del compuesto 5-fluorouracilo cargado en nanogeles a base de quitina para tratamiento de cáncer mostró pérdidas en el área afectada de la epidermis por interacción catiónica de la quitina cargada con fármaco, sin observarse signos de inflamación [20].

1.4. Extractos de plantas con actividad anticancerígena

Los materiales vegetales se han utilizado para el tratamiento de enfermedades malignas durante siglos. Diversos autores han utilizado los extractos de distintas plantas como un tratamiento alternativo contra el cáncer. Los exámenes fitoquímicos recientes de las plantas que tienen un historial adecuado en su uso en el folclore para el tratamiento de cáncer, ha resultado en el aislamiento de principios activos con actividad antitumoral. El estudio intensivo de plantas, microorganismos y animales marinos para la actividad antitumoral comenzó en la década de 1950, principalmente porque el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (*NCI*, por su sigla en inglés) fue instigado a financiar un importante programa de investigación [21].

Las plantas nos ofrecen una alta capacidad biosintética, además de un bajo costo de producción, una fácil obtención, mayor seguridad (porque no sirven como huéspedes de patógenos humanos) y una gran capacidad de servir como transporte de fármacos de administración oral. Diferentes estudios se han centrado en atacar diversas enfermedades y en el análisis del costo de las operaciones del proceso, obteniendo un ahorro de costos en general sobre los sistemas convencionales. De hecho, la aplicación de estos sistemas basados en plantas por parte de la industria se está convirtiendo en una realidad, varios productos como las vacunas contra la gripe, han estado a punto de ser comercializados [22]. En la búsqueda de compuestos bioactivos del reino vegetal, el valor de la etnomedicina y la farmacología es reconocida para incrementar la probabilidad de encontrar nuevas moléculas con propiedades biológicas importantes

en el tratamiento contra diferentes enfermedades, como el cáncer, los cuales tienen un impacto social y económico muy grande [23].

Casi el 65% de todos los medicamentos utilizados contra los diferentes tipos de cáncer son derivados de compuestos aislados de fuentes naturales tales como plantas y diversos organismos marinos. Los derivados de las plantas se conocen como metabolitos secundarios y ayudan a la planta a crecer. Los metabolitos secundarios se clasifican en tres grupos principales, los flavonoides, los terpenoides y los alcaloides, que son compuestos que contienen nitrógeno y azufre. Miles de plantas y sus derivados han sido evaluadas para el tratamiento de cáncer alrededor del mundo y se ha informado que son muy activas como agentes anticancerígenos [24].

México es considerado un país con una alta diversidad biológica, gracias a la cantidad de plantas y animales que se encuentran en toda su extensión. A nivel mundial se encuentra en el quinto lugar en especies conocidas de plantas, y se cree que más de 700 mil especies tienen propiedades médicas y comerciales; 4000 especies con actividad farmacológica han sido identificadas y registradas en México, y de estas se usan alrededor de 3700 especies, de las cuales 3600 se encuentran de forma silvestre y 370 se cultivan [25].

En la región de Baja California se cuenta con una gran cantidad de plantas con compuestos bioactivos para tratamiento de diversos tipos de cáncer que actualmente no se aprovechan, estos compuestos pueden ser de gran utilidad ya que se ha demostrado que el uso de compuestos de origen natural reduce los efectos secundarios. Murillo-Álvarez y colaboradores (2001) reportaron la citotoxicidad mostrada por diversos extractos etanólicos de las plantas que crecen en esa región, de las cuales las más destacadas fueron las mostradas en la Tabla 2 [26].

La planta *Justicia spicigera* se puede encontrar en abundancia en la región y en el estudio se demostró que el extracto etanólico de esta planta presenta toxicidad en contra de las células cancerígenas, además del bajo costo que implica adquirirla.

Tabla 2. Citotoxicidad de diversas plantas de la región de Baja California [26].

Familia	Planta (nombre común)	Citotoxicidad reportada IC₅₀ (µg/ml)
Acanthaceae	<i>Jacobina spicigera</i> (Schlecht) Baily (<i>Justicia spicigera</i>)	84.3
Asteraceae	<i>Ambrosia psilostachya</i> DC. (Cotafiata)	81
Asteraceae	<i>Xanthium strumarium</i> L. (Bardana)	84.6
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i> var. <i>Radiata</i> (amor seco)	71

1.4.1. *Justicia spicigera* “muicle”

Las plantas de la familia *Justicia* ha sido ampliamente utilizada gracias a los componentes que contiene, algunas han sido utilizadas para tratar diferentes enfermedades estomacales y respiratorias, así como también para tratar diversos tumores cancerígenos. Las plantas también han sido utilizadas para tratar enfermedades del sistema nervioso central como alucinógenos, agentes somníferos, sedantes, antidepresivos y como tratamiento contra la epilepsia y otros desórdenes mentales. Otras especies son popularmente utilizadas para tratar los dolores de cabeza y para controlar la fiebre, para tratar la diabetes y el VIH. Las partes de la planta se utilizan completamente (hojas, ramas, tallo, raíces) en la medicina popular. Los extractos que se preparan de las hojas son los más utilizados, seguidos de los extractos de las raíces, y algunas especies se utilizan de forma conjunta (tallo y raíces, raíces y hojas, etc.) [27].

La planta denominada *Justicia spicigera* (Figura 3) conocida comúnmente como muicle es de especial interés. Las hojas se utilizan para hacer una infusión para el tratamiento de diversas enfermedades, como lo son: dolores de cabeza crónicos, hipertensión y epilepsia, incluso también se utiliza para calmar los dolores estomacales, la diarrea y la disentería [28]. Esta planta también se ha utilizado como tratamiento para el cáncer. Jacobo-Salcedo y colaboradores (2012) utilizaron las hojas y extrajeron un compuesto denominado “kaempferitrin” (Figura 4) el cual es un antitumoral, realizaron las pruebas citotóxicas en células HeLa y demostraron que tiene una gran actividad citotóxica en esta línea celular [29].



Figura 3. *Justicia spicigera* [30].

Justicia spicigera es un tipo de arbusto de aproximadamente 1-1.5 metros de altura, con flores tubulares de color naranja. Su crecimiento se da en climas cálidos, como por ejemplo en algunos estados de México, extendiéndose hasta América del sur. Las propiedades medicinales de esta planta se han atribuido a la presencia de metabolitos de tipo fenólico, compuestos que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, principalmente a los de tipo flavonoides que poseen tres anillos aromáticos en su estructura. Las propiedades biológicas que poseen los flavonoides son de tipo antimicrobial, antiinflamatoria, antitumoral, antirradicalar, antidiabética, entre otros. Recientemente, se ha encontrado que los extractos de *Justicia spicigera* ejercen

efectos inmunoestimulantes *in vitro*, en donde el componente principal del extracto fue un glucósido del Kaempferol llamado kaempferitrin (Figura 4) [31].

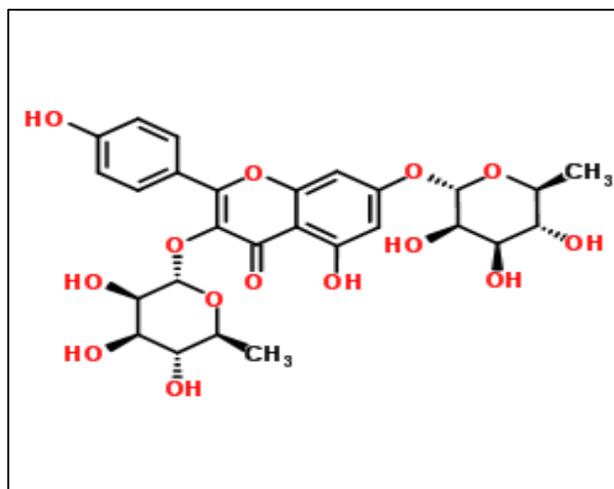


Figura 4. Estructura de kaempferitrin [32].

1.5. Polímeros utilizados como sistema de administración de fármacos

El desarrollo de varios fármacos avanzados durante la última década ha necesitado de nuevos métodos de administración controlada para estos compuestos, que incluyen péptidos, proteínas, ADN plásmidico, oligodeoxinucleótidos anti sentido e inmuno toxinas. La actividad de tales moléculas depende de su capacidad para llegar a los sitios seleccionados; sin embargo, son fácilmente degradables por las proteasas o DNAsas ADN *in vivo* una vez que ingresan al sistema corporal. Además, muchas de estas proteínas terapéuticas son extremadamente activas y pueden reaccionar en diversos tejidos dentro del cuerpo aparte del tejido diana. Un sistema de administración de fármacos ideal para estas moléculas debe colocarse lo más cercano posible del sitio enfermo o lesionado y liberar el fármaco en respuestas a los cambios en el tejido circundante. Este sistema controlado de administración de medicamentos también proporciona una barrera adicional para limitar el acceso de los agentes desnaturizantes a los medicamentos [33].

El uso de sistemas de administración de fármacos de origen polimérico ha despertado gran interés por parte de los científicos debido a los beneficios que ofrecen al mantenimiento de la integridad del fármaco, su especificidad y tiempo para la liberación. La aplicación de estos sistemas cuyo mecanismo se basa en un estímulo-respuesta para el tratamiento de tumores se ha reportado por varios autores. Por ejemplo, se han desarrollado micelas poliméricas de poli ((*N*-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico)-Policaprolactona) cuya liberación del fármaco se presenta en presencia de un pH extracelular bajo, característico de las células tumorales [34].

En lo que respecta al cáncer se han desarrollado nuevos materiales conocidos como polímeros de coordinación, en los que se combinan las propiedades orgánicas de los polímeros con las de algunos iones metálicos, para la formación de sistemas de liberación de fármacos como terapia contra el cáncer. La ventaja de estos materiales híbridos es que poseen gran flexibilidad en su composición y estructura, lo que les brinda diversas formas, tamaños y propiedades químicas que les permiten ser cargados con diferentes tipos de moléculas terapéuticas, y al mismo tiempo ser liberadas de manera específica sobre la zona tumoral, disminuyendo los efectos secundarios durante la terapia [35].

Tabla 3. Polímeros utilizados para sistemas de administración de fármacos.

Polímero de transporte	Agente terapéutico	Cáncer a tratar
Ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)	Paclitaxel	Cáncer de pecho [36]
Ácido poliláctico (PLA)	Doxorrubicina	Cáncer pulmonar [37]
Celulosa	5-Fluororacilo	Cáncer de piel [38]
Quitina	Paclitaxel	Cáncer de colon [39]
Quitosano	Myricetina	Tumor cerebral [40]

Los polímeros biodegradables se han utilizado para la administración controlada de fármacos por muchos años debido a la acción de liberación prolongada del agente terapéutico que estos ejercen en el cuerpo, sin la necesidad de retirar el

sistema después del tratamiento; además estos polímeros no son tóxicos para las personas [41], en la Tabla 3 se muestran diversos polímeros utilizados para estos sistemas.

1.5.1. Quitosano

Gracias a su abundancia, biocompatibilidad y biodegradabilidad la popularidad en las áreas biomédicas y ambientales del polímero quitosano ha ido en aumento; esto lo hace un excelente material para la formación de sistemas de administración de fármacos [42].

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó “quitosano” [43]. La estructura química de este polímero se muestra en la Figura 5, donde el grupo funcional característico que lo diferencian de la quitina es el grupo amino (NH_2).

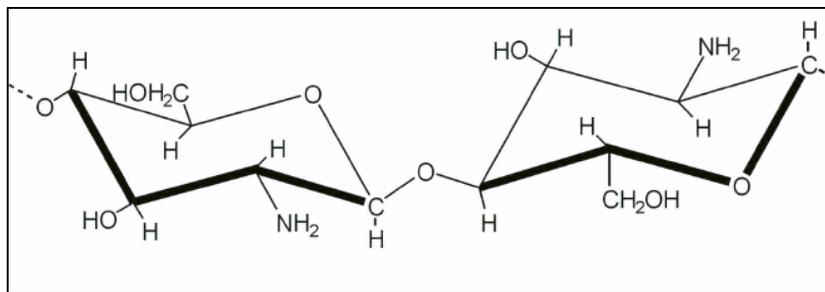


Figura 5. Estructura química del quitosano [43].

En el ámbito biomédico el quitosano ha despertado un sin número de aplicaciones debido a que se prefiere un producto natural porque estos materiales son más biocompatibles que los materiales sintéticos. En el caso del quitosano es metabolizado por ciertas enzimas humanas, como la lisozima, por lo tanto, es biodegradable. Se considera un material versátil ya que ofrece la ventaja de ser

procesados fácilmente en geles, membranas, nanofibras, perlas, micropartículas, nanopartículas, andamios y formas similares a esponjas. Debido a estas propiedades y su biocompatibilidad, tiene aplicaciones en ingeniería de tejidos, cicatrización de heridas, como excipientes para el suministro de fármacos y la administración de genes [44].

Se tienen muchos estudios con quitosano como sistema de administración de fármacos. Shao y colaboradores (2018) utilizaron quitosano y péptidos RPM para hacer un sistema de administración de fármacos cargado con doxorrubicina para inhibir el crecimiento tumoral de células en el cáncer de riñón, hicieron pruebas *in vivo* en ratones e *in vitro* en líneas celulares HT29 y encontraron que reduce significativamente la metástasis de este tipo de células cancerígenas al aumentar la expresión de la proteinasa $\alpha_5\beta_1$ [45] y para el caso de la caracterización, todos los nanotransportadores son polímeros que contienen quitosano, algunos autores se basan principalmente en el porcentaje de liberación del fármaco de sus respectivos experimentos.

Los investigadores han trabajado con diversas estructuras para los sistemas de administración de fármacos, como lo son, los hidrogeles, liposomas, macropartículas y nanopartículas poliméricas, pero dentro de estas sobresale una estructura con grandes propiedades para la realización de estos sistemas denominados micelas.

1.6. Micelas

Principalmente las micelas poliméricas (Figura 6) están diseñadas para mejorar 3 parámetros del fármaco: 1) la solubilización de los fármacos hidrófobos o insolubles, 2) la liberación controlada del fármaco y 3) dirigirse a cierto tipo de células. El desarrollo rápido de las micelas poliméricas como transportadores hacia los objetivos definidos ha intensificado la necesidad de tener una mejor comprensión de los principios relacionados con la selección de materiales de entrega adecuados para diseñar, caracterizar, cargar medicamentos, mejorar la estabilidad, la capacidad de

direccionamiento, la bioseguridad para el organismo y la eficacia de formación de las micelas [46].

En los últimos años, los copolímeros de bloques anfifílicos han recibido mucha importancia en la aplicación de administración de fármacos, ya que forman estructuras micelares autoensambladas. Las micelas se conforman de una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. El segmento hidrofóbico del polímero forma el núcleo de las micelas que solubilizan las moléculas del fármaco de naturaleza hidrofóbico, la parte hidrofílica forma la corona la cual proporciona la compatibilidad de las micelas en el entorno acuoso [47].

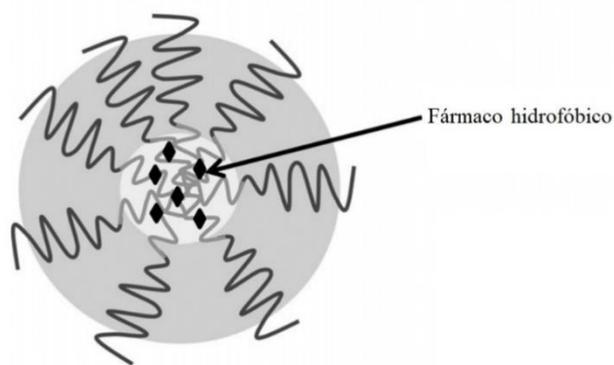


Figura 6. Estructura de las micelas poliméricas [46].

El término micela fue utilizado para describir las estructuras de autoensamblaje de pequeñas moléculas surfactantes. El tamaño de estas estructuras micélicas son determinados por su composición y asociado su geometría de empaquetamiento, y varían de 5 a 100 nanómetros de diámetro. La clasificación de las micelas se basa en el tipo de fuerzas intermoleculares involucradas durante su formación. Existen 3 tipos de micelas: las micelas anfifílicas las cuales tienen interacciones hidrofóbicas dominantes, los complejos de micelas poli-iónicas los cuales principalmente se forman por interacciones electrostáticas y las micelas con complejos metálicos. Las micelas poliméricas pertenecen a la primera categoría mencionada, por qué consisten en bloques poliméricos anfifílicos auto ensamblados en una estructura de núcleo-caparazón [48].

Los copolímeros permiten la formación de una amplia variedad de nanoestructuras, y tienen demasiadas aplicaciones dentro de la ciencia farmacéutica, pero estas aplicaciones pueden utilizarse en otras ramas, como lo es, en formulaciones para realizar pinturas y tintes, además de productos para cuidado personal. Los copolímeros con bloques anfifílicos consisten al menos de dos regiones con propiedades químicas diferentes, lo cual permite que estos polímeros se autoensamblen en las micelas que pueden servir como nanotransportadores para los compuestos de muy baja solubilidad en agua [49].

1.7. Objetivo general

Sintetizar y caracterizar quitosano a partir de cáscara de camarón como medio de transporte de fármaco para la liberación controlada contra el cáncer de piel.

1.8. Objetivos específicos

- Sintetizar quitosano a partir de cáscaras de camarón por medio de soluciones químicas.
- Caracterizar fisicoquímicamente los materiales por medio de Difracción de rayos X (*XRD*, por sus siglas en inglés), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (*FTIR*, por sus siglas en inglés), Microscopía Electrónica de Barrido-Transmisión (*STEM*, por sus siglas en inglés) y Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).
- Evaluar la carga de fármaco natural por medio absorción de solución.
- Evaluar toxicológicamente las muestras por medio de bacteria *E. coli*.
- Determinar el tiempo de liberación de fármaco de origen natural.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTOS Y
TÉCNICAS

CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS

2.1. Difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X se produce cuando se bombardea un material con electrones de alta energía. Cuando los electrones penetran en el material se desaceleran y emiten radiación en un intervalo de longitudes de onda, denominándose esta radiación continua *bremsstrahlung* (*Bremse* significa freno en alemán, y *Strahlung* rayo). Sobre esta aparecen superpuestos picos agudos de alta intensidad. Estos picos tienen su origen en la interacción de electrones que inciden con los electrones de las capas internas de los átomos del material; las colisiones expulsan los electrones y un electrón de mayor energía desciende al espacio vacante, emitiendo la diferencia de energía como un fotón de rayos X [50].

Los rayos difractados que no se encuentran en fase (cuando las crestas de una radiación coinciden con los valles de otra) se anulan parcial o totalmente entre sí. En cambio, aquellos que se encuentran en fase se refuerzan y emergen. Para que ello ocurra, el ángulo que forma el rayo emergente con el plano del cristal debe cumplir la ley de Bragg (Ecuación 1), la cual dice que la diferencia o atraso de los rayos reflejados en los distintos planos cristalográficos debe ser un número entero de la longitud de onda de la radiación (Figura 7) [51].

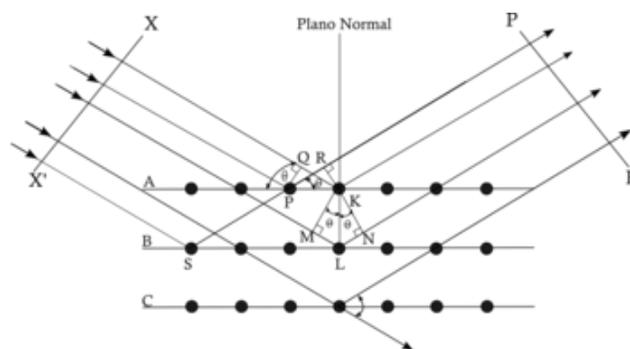


Figura 7. Ley de Bragg [51].

$$n\lambda = 2d\sin\theta \dots\dots\dots(1)$$

Los índices de Miller se utilizan para identificar, ya sea, la posición de los átomos con los puntos en la red, las direcciones dentro y fuera de la celda y, para definir los planos formados por los átomos de una estructura dada. La cristalinidad de los materiales se puede asociar a la existencia de arreglos de los átomos que forman pequeñas celdas, esto es, formas geométricas regulares y donde se asocia un átomo para cada uno de sus vértices. Existen 7 tipos de celdas llamadas primitivas, las cuales cumplen las condiciones para definir que un material es cristalino. Algunas de estas celdas tienen subtipos: como son las centradas en el cuerpo, en las caras o en las bases (Tabla 4). En estos casos se agregan uno o varios átomos a la celda simple o primitiva en ciertas posiciones especiales, como su nombre lo indica. Todos estos subtipos de celdas forman lo que se conoce como Redes de Bravais. La Figura 8 muestra 14 subtipos de celdas posibles y todos los materiales cristalinos se pueden clasificar según el tipo de estos [52].

Tabla 4. Diferentes tipos y subtipos de celdas [52].

Estructura	Subtipos	Abreviatura
Cúbica	Simple	Cs
	Centrada en el cuerpo	Cccu
	Centrada en las caras	Ccca
Tetraogonal	Simple	Ts
	Centrada en el cuerpo	Tccu
Hexagonal	-----	H
Trigonal	-----	Tri
Ortorrónica	Simple	Os
	Centrada en el cuerpo	Occu
	Centrada en las bases	Occb
	Centrada en las caras	Occa
Monoclínica	Simple	Ms
	Centrada en las bases	Mcb
Triclínica	-----	Tricli

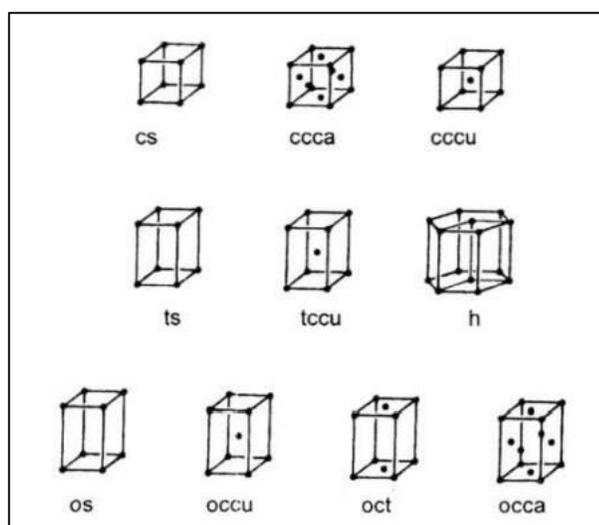


Figura 8. Las redes de Bravais en las cuales se clasifican los materiales cristalinos [52].

Para determinar los tamaños de los cristales generalmente se utiliza la ecuación de Scherrer (Ecuación 2), en la cual se debe tener en cuenta que el ensanchamiento del pico de difracción es originado por el tamaño de cristal de la muestra. El tamaño de cristal se puede definir como el tamaño del dominio coherente donde se lleva a cabo la difracción de rayos X, es decir, el volumen del material donde es posible aplicar la operación de simetría de traslación en el sólido cristalino, cada dominio tiene su orientación [53].

$$D = \frac{K}{\beta \cos \theta} \dots\dots\dots(2)$$

Donde k es una función de forma la cual tiene el valor de 0.94, λ es la longitud de onda de la radiación ($\text{CuK}\alpha = 0.1541 \text{ nm}$), β es el ancho a la altura media del pico seleccionado, y θ es el ángulo de incidencia [54].

2.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

La región infrarroja (IR) del espectro electromagnético se encuentra entre $12800 - 10 \text{ cm}^{-1}$. Esta región se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, IR medio (MIR): $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ e IR lejano $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$, dependiendo de las aplicaciones y de los diferentes equipos que trabajan con esta región del espectro electromagnético [55].

Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo, de especies moleculares, se pueden explicar asumiendo que todos son el resultado de distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energías vibracionales y rotacionales a otros [56].

Una gran variedad de técnicas espectroscópicas ha sido utilizada para estudiar las muestras, pero la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una de las más completas ya que ofrece velocidad, precisión y sensibilidad que antes no era

posible de alcanzar con los espectrómetros de longitud de onda dispersiva. Esta técnica ofrece un rápido análisis de micro muestras, haciendo al FT-IR una herramienta invaluable para resolver dudas en muchos estudios. La principal ventaja de la técnica FT-IR sobre otros métodos espectroscópicos es que prácticamente todos los compuestos muestran absorción/emisión característica en la región espectral IR y en función de esta propiedad, pueden analizarse tanto cualitativamente como cuantitativamente [57].

El análisis del espectro infrarrojo puede mostrarnos cuales moléculas están presentes en una muestra y en que concentración; es por esto que el espectro infrarrojo es muy útil. Hay diferentes tipos de espectrómetros infrarrojos en el mundo, pero los más utilizados son los espectrómetros infrarrojos por transformada de Fourier. Un espectrómetro por transformada de Fourier consta de 3 elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson y un detector [58].

El equipo utilizado en el laboratorio para obtener los espectros infrarrojos por transformada de Fourier de los diversos materiales se presenta en la Figura 9 y cuenta con los elementos mencionados anteriormente, trabaja en el espectro infrarrojo medio y abarca una parte del lejano, desde el número de onda de 4500 a 450 cm^{-1} proporciona información valiosa de los enlaces químicos presentes en nuestra muestra.



Figura 9. Equipo Infrarrojo por Transformada de Fourier con UATR.

Se puede utilizar diferentes accesorios en el espectro infrarrojo para obtener mejores resultados, como lo es la reflectancia total atenuada (*ATR*, por sus siglas en inglés). La espectroscopía *ATR* utiliza el fenómeno de la reflexión interna total. Un haz de radiación pasa a través de un cristal y se somete a una reflexión interna total a través del cristal. Se crea una onda evanescente que va solo unas pocas micras más allá de la superficie de cristal, la distancia de esta onda que se extiende desde la superficie depende del material que se utilice. Además, la onda evanescente decae rápidamente, es por eso que se debe de tener un buen contacto entre el material y el cristal cuando se realizan este tipo de mediciones. Por lo tanto, es conveniente emplear un brazo de presión para realizar las mediciones *ATR*. La radiación que penetra una fracción de una longitud de onda más allá de la superficie del cristal entra en la muestra colocada en la superficie del cristal. La profundidad de penetración para *ATR* es una función de la longitud de onda, índice de reflexión del cristal utilizado y el ángulo de incidencia del haz [59].

2.3. Microscopía Electrónica de Barrido-Transmisión (STEM)

En el caso de los microscopios electrónicos, estos utilizan un haz de electrones para formar imágenes en vez de un haz de luz como lo hacen los microscopios tradicionales. Los microscopios electrónicos pueden observar campos mucho más pequeños como son las micro y nanoescalas. Se originan diversas señales cuando un haz de electrones interacciona con la muestra esto es por la excitación de los electrones del átomo, estos procesos físicos se denominan eventos de dispersión. Hay una transferencia de energía hacia los átomos de la muestra a través del rayo de electrones. Las interacciones que se producen en la interacción haz- muestra son los electrones retro dispersados, electrones secundarios, rayos X, electrones Auger, y electrones transmitidos (Figura 10); dependiendo la información que necesitamos conocer de la muestra se elige la señal electrónica correspondiente a través de diversos detectores [60].



Figura 10. Señales originadas en la interacción haz-materia [60].

El Microscopio Electrónico de Barrido-Transmisión (*STEM*, por su sigla en inglés) es una herramienta muy utilizada en muchas áreas de la ciencia de materiales es especial en aquellas que se enfocan en escalas atómicas y nanocaracterizaciones. El STEM tiene la capacidad de generar mapas locales de las composiciones químicas y estructuras electrónicas a resoluciones atómicas, incluso cuando se cuenta con complejos y muestras desconocidas. El STEM es utilizado para ver estructuras a nanoescalas, además de la que la interpretación de la imagen es muy sencilla, lo cual puede ser difícil en las imágenes arrojadas por el microscopio electrónico de transmisión (*TEM*, por su sigla en inglés) convencional [61].

Al igual que el TEM, el STEM utiliza los electrones transmitidos para generar las imágenes. Sin embargo, del mismo modo que el Microscopio electrónico de barridos (*SEM* por su sigla en inglés) el STEM escanea una parte pequeña sobre la muestra. El STEM consiste en una fuente de electrones, una gran cantidad de lente para enfocar los electrones en una pequeña sonda, una unidad de escaneo para que escanear esta sonda

a través de la muestra y un detector que colecta las diferentes señales después de que los electrones hallan interactuado con la muestra. La imagen se forma por la recolección de la señal de interés como una función de la posición de la sonda [62]. En la Figura 11 podemos observar las partes de un microscopio electrónico de barrido-transmisión.

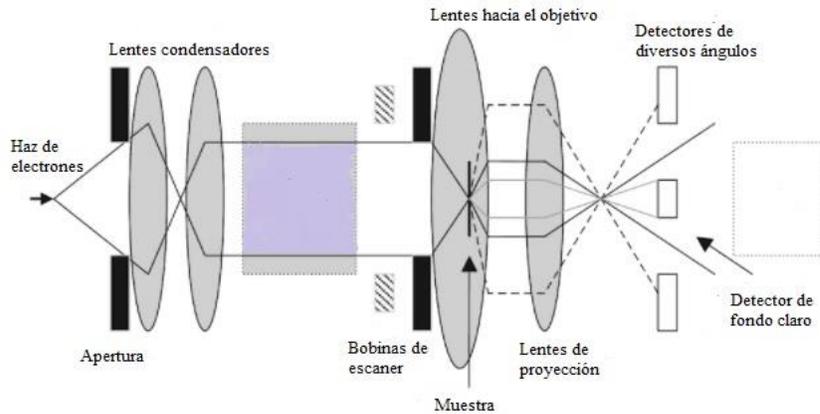


Figura 11. Microscopía Electrónica de Barrido- Transmisión [62].

El equipo utilizado para los análisis de microscopía electrónica de barrido-transmisión es de la marca JEOL modelo JEM- 2100 (Figura 12), funciona con una energía de 200 kV y fue utilizado para observar la morfología con la que cuentan nuestros materiales.



Figura 12. Microscopio Electrónico de Barrido-Transmisión JEOL JEM-2100.

2.4. Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis)

En los estudios químicos, ambientales e incluso biológicos la espectrofotometría UV-Vis es ampliamente utilizada ya que permite conocer diversa información de las moléculas que están presentes en la vida diaria, tanto cualitativa como cuantitativamente, la información que se puede conocer con esta técnica es la siguiente [63]:

- La molécula de interés en caso de ser desconocida.
- La concentración en la cual se encuentra la disolución.
- La banda prohibida de las transiciones entre la capa superior de la banda de valencia y el fondo de la banda de conductividad.
- Defectos como los hoyos de pares electrónicos.
- Transiciones electrónicas entre los orbitales d de los iones de metales de transición.

Toda molécula, tanto en fase gaseosa como en solución, posee una energía cuántica interna y está compuesta por las energías electrónica, vibracional y rotacional, y la ecuación se representa como:

$$E_{\text{int}} = E_e + E_{\text{vib}} + E_{\text{rot}} \dots \dots \dots (3)$$

Según la teoría cuántica, en una molécula estas energías son independientes entre sí y están cuantizadas, es decir que pueden tomar sólo ciertos y determinados valores permitidos por los perfiles energéticos de las mismas que a su vez dictan las posibilidades cuánticas de absorción. La radiación electromagnética que proviene de la región ultravioleta y visible del espectro interactúa con los electrones de valencia de las moléculas modificando la energía electrónica [64].

La ley de Lambert-Beer (Ecuación 4) es una ecuación de gran importancia para el análisis en los métodos de espectrofotometría, ya que permite calcular la

concentración de una sustancia a partir de la absorción de la radiación en una disolución de la misma.

$$A = a b C \dots\dots\dots(4)$$

Donde a es la absorptividad, b es la trayectoria del haz que incide en la muestra (camino o paso óptico, generalmente equivale a 1 cm) y C es la concentración de la solución. La absorptividad es la constante que relaciona la absorbancia con la concentración de la especie muestreada y sus unidades depende de las unidades empleadas en la concentración. Es decir, si C se expresa en g/l, la absorptividad tendrá unidades de l/g cm. Sin embargo, cuando C se expresa en mol/l, la absorptividad se denomina absorptividad molar, representada por el símbolo ϵ , y tendrá unidades de l/mol cm. La absorptividad es característica de cada sustancia y depende de la temperatura y del disolvente utilizado [65].

En la Figura 13 se muestra un paralelepípedo de sección transversal S y de longitud b el cual contiene una solución con n especies absorbentes. Un haz de luz monocromática, de potencial inicial P_0 , cae perpendicularmente sobre la cara anterior y se reparte uniformemente y cuando el haz atraviesa el medio químico absorbente, los fotones interaccionan con las moléculas y son absorbidos, causando una disminución de la potencia del haz inicial [66].

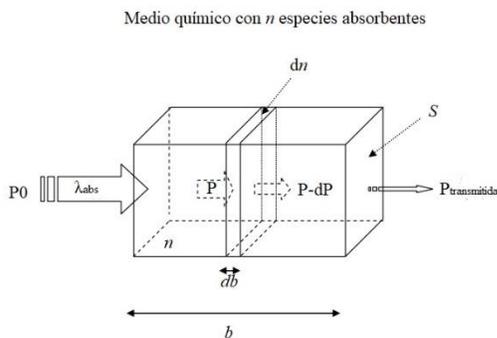


Figura 13. Absorción de una muestra para espectrofotometría UV-Vis [66].

Los componentes principales de un equipo de espectrofotometría son: una fuente de luz, un monocromador o filtro, un compartimiento para las celdas de medición, un amplificador y un detector. En los espectrofotómetros, también conocidos como espectrómetros, la luz utilizada para medición es dividida (dispersada) en sus constituyentes por un prisma o monocromador. Generalmente las lámparas utilizadas para la región ultravioleta son de deuterio y las utilizadas para la región visible son tungsteno (o tungsteno halógeno), estos instrumentos permiten las constantes variaciones de la longitud de onda en las mediciones a lo largo del espectro. La mayoría de los equipos cubren la región que comprende de 190 nanómetros a los 900 nanómetros [67].

El equipo con el que se cuenta en el laboratorio es un espectrofotómetro UV-Vis de la marca *HACH* modelo DR 5000, que realiza lecturas desde los 1100 a las 190 longitudes de onda y funciona con 115 V y 230 V de energía (Figura 14).



Figura 14. Espectrofotómetro UV-Vis HACH DR 5000.

2.5. Diálisis en la liberación de fármacos

La diálisis dinámica es uno de los métodos más utilizados para la determinación de los sistemas de liberación de fármacos (Figura 15). El comportamiento del fármaco en la solución receptora es una consecuencia de la liberación de las partículas en la

cámara de diálisis seguido de la difusión a través de la membrana de diálisis. Esta doble barrera necesaria en el método complica la interpretación de los datos y pueden llevar a conclusiones no tan precisas con respecto a las vidas medias de la liberación de las partículas. La unión reversible del nanotransportador del fármaco liberado reduce la fuerza motriz del transporte de fármacos a través de la membrana de diálisis [68].

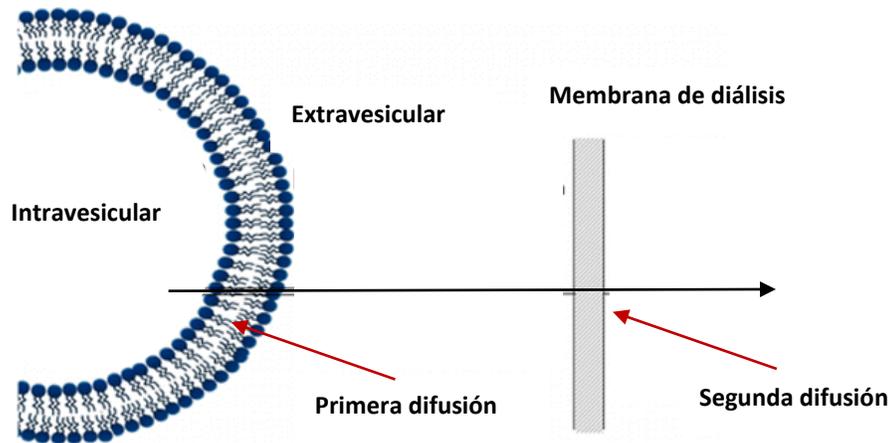


Figura 15. Sistema de liberación por el método de diálisis [68].

Las pruebas de los métodos de liberación *in vitro* generalmente son realizadas para alcanzar uno o más de los siguientes objetivos [69]:

- Como una medición indirecta de la disponibilidad de los fármacos, especialmente en etapas preliminares del desarrollo de los productos.
- El control de calidad para apoyar la liberación de los lotes y satisfacer las especificaciones de los lotes para ser corroborar que son efectivos clínica y biológicamente.
- Evaluar los factores para la formulación y los métodos de fabricación que puedan influir en la biodisponibilidad.
- Como un requerimiento complementario.

El perfil de liberación *in vitro* revela información importante en la estructura y el comportamiento de la formulación a nivel molecular, las posibles interacciones entre

el fármaco y el polímero, y su influencia en el mecanismo y la relación de la liberación del fármaco, así como datos para el modelado de la liberación. En el caso de la liberación parenteral, una gran cantidad de investigaciones están enfocadas en las micropartículas biodegradables como un eficaz sistema de liberación, pero se le ha dado poca importancia al desarrollo de la técnica *in vitro* [70].

CAPÍTULO III
PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Síntesis de quitosano a través de cáscara de camarón

Se lavaron las cáscaras de camarón y se retiraron las patas, cola y cabeza, después se secaron en estufa por 4 horas a 90 °C. Posteriormente se molió la cáscara seca para obtener el menor tamaño posible de ésta.

Se pesaron 10 g de cáscara de camarón molida, y se puso en agitación en 400 ml de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 molar a temperatura ambiente durante 2 horas hasta la desaparición de burbujas, esto con el fin de retirar los minerales de nulo interés presentes en la cáscara, posteriormente se hicieron lavados con agua desionizada hasta obtener un pH neutro.

Para el proceso de desproteización, las cáscaras se agregaron a una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 10% en relación peso/volumen de 1:20 con agitación constante durante 20 horas a 25 °C, después se filtró y el producto de esta etapa se lavó con agua desionizada hasta obtener un pH neutro.

El proceso de desacetilación para obtener quitosano se llevó a cabo usando NaOH al 50% en una relación peso volumen de 1:20 durante 22 horas a 85 °C, después, se realizaron lavados hasta obtener un pH neutro, el producto se secó en estufa durante 15 horas a 50 °C. En la Figura 16 observamos el esquema general del proceso de obtención del quitosano, así como también que sucede en cada etapa del proceso.

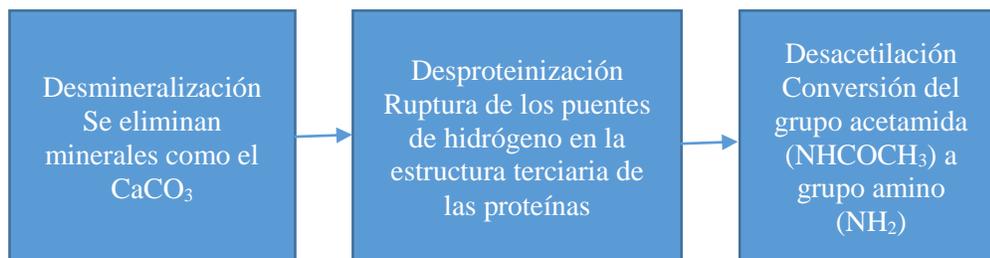


Figura 16. Esquema general del proceso de obtención de quitosano.

3.2. Obtención de extracto etanólico

Se pesaron 5 g de hojas seca de la planta *Justicia spicigera*, se trituraron en un mortero de ágata y se colocaron en un papel filtro cónico para posteriormente introducirlo en el equipo Soxhlet, se utilizaron 100 ml de etanol al 100%, 70%, 60% y 50% como solvente para extraer el compuesto. Además, se preparó una muestra de 100 ml de etanol al 70% pero se utilizó ultrasonido en lugar del equipo Soxhlet para realizar la extracción. Después se utilizó el rotavapor para separar el solvente en exceso del extracto para retirar el exceso de agua de la muestra, el extracto libre de solvente se congeló y liofilizó en un equipo LABCONCO-FreeZone 2.5 durante 24 horas a 1.030 mBar y -50 °C.

3.3. Difracción de rayos X

Los estudios de difracción de rayos X (*XRD*, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo utilizando un difractómetro de rayos X (D2-Phaser, Bruker). Las muestras seleccionadas fueron cargadas en un soporte y se colocaron en una placa de cuarzo para la exposición a la radiación Cu K- α de longitud de onda de 1.5406 Å. El difractómetro se hizo funcionar a 30 kV, 10 mA en un rango de 2θ de 10-50 °, con un tamaño de paso de 0.02 °, y un tiempo de recuento de 1 s/paso.

3.4. Ensayos de toxicidad

Se prepararon los medios de cultivo caldo LB y medio de cultivo de agar de eosina y azul de metileno (agar E.M.B. o agar E.A.M.), en la Tabla 5 y 6 se incluyen los reactivos y cantidades utilizadas para preparar cada medio de cultivo.

La cepa de *E. coli* se incubó en 10 ml de caldo LB durante 24 horas a 37 °C, posteriormente, se inocularon en cajas Petri con agar de eosina y azul de metileno para que se formaran colonias de bacterias, el agar se esterilizó previamente en autoclave a 115 °C durante 21 minutos.

Se utilizaron 5 tubos de ensaye, en los primeros 3 se colocó el quitosano utilizado para realizar el sistema de administración de fármacos y se le añadió 5 ml de caldo LB, el cuarto y quinto tubo contenían 5 ml de caldo LB; finalmente se le agregó al primer, segundo, tercer y cuarto tubo una colonia de *E. coli* de alrededor de 1 mm de diámetro, el cuarto tubo representa el control positivo, respectivamente, el quinto tubo solo contenía caldo LB y quitosano y se utilizó como control negativo.

Una muestra de 400 microlitros de cada tubo se leyó en el espectrofotómetro Uv-Visible a 618 nm cada 2 horas.

Tabla 5. Reactivos y cantidades para preparar 1 litro de caldo LB.

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
NaCl	10 g

Tabla 6. Reactivos y cantidades para preparar 1 litro de agar EMB.

Reactivo	Cantidad
Peptona de gelatina	10 g
Lactosa	5 g
Sacarosa	5 g
Fosfato diposádico	2 g
Eosina Y	0.4 g
Azul de metileno	65 mg
Agar	13.5 g

3.5. Preparación de las micelas

Para la preparación de las micelas de quitosano se pesaron 50 mg de quitosano obtenido previamente y se disolvieron en 5 ml de ácido acético al 10% obteniendo una concentración de 10 mg/ml, se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente.

3.6. Carga de compuesto en el sistema

Se añadieron 5 mg del compuesto extraído en 5 ml de agua hasta su completa disolución, para después agregar esta solución al sistema polimérico gota a gota, se dejó en agitación constante durante 3 horas para que el polímero y el fármaco estuvieran en contacto durante largos periodos de tiempo con el objetivo de lograr una mayor encapsulación. Posteriormente el sistema se llevó a congelación para después ser liofilizado en el equipo LABCONCO-FreeZone 2.5 durante 48 horas con parámetros de presión de vacío y temperatura 1.030 mBar y -49 °C, respectivamente.

3.7. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

El equipo utilizado para obtener los espectros infrarrojos es el espectrofotómetro infrarrojo Spectrum Two (Perkin Elmer) en modo de transmitancia con detector directo y resolución de 0.5 cm^{-1} . Todas las muestras se pusieron en contacto directo con reflectancia total atenuada horizontal (*ATR*, por sus siglas en inglés) a temperatura ambiente y el software utilizado para obtener los espectros fue Spectrum versión 6.0.

Para hacer las lecturas se realizó un barrido de fondo de aire. Las mediciones se realizaron en el espectro fueron quitosano, el compuesto extraído kaempferitrin, el polímero transporte (quitosano disuelto en ácido acético) y el polímero cargado (quitosano con kaempferitrin), las muestras fueron liofilizadas previamente.

3.8. Microscopía Electrónica de Barrido –Transmisión

La microscopía electrónica de barrido-transmisión (*STEM*, por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada para estudiar la forma, la estructura y el tamaño de los polímeros, ya que es capaz de concentrar el haz de electrones en un punto estrecho y escanear la muestra, evitando o reduciendo el daño a los materiales poliméricos utilizados para encapsular ambos fármacos hidrofóbicos. Para su análisis, el sistema

sin cargar y el sistema cargado son dispersadas en alcohol isopropílico mediante ultrasonidos; inmediatamente se coloca un poco de la suspensión en una rejilla de cobre revestida con una película de carbono, para secar en condiciones ambientales y luego examinar bajo el microscopio electrónico de transmisión.

Las micrografías se obtienen utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2100, el cual funciona a 200 kV de voltaje de aceleración con un filamento LaB₆ en modo STEM con detector de campo claro.

3.9. Liberación de fármaco

El sistema de administración de fármacos se colocó en una membrana Spectra/por con tamaño de poro de 12-14 KiloDaltones previamente hidratada durante 30 minutos en una solución amortiguadora de buffer de fosfatos (*PBS*, por sus siglas en inglés), la membrana se cerró utilizando unas pinzas para membranas, posteriormente la membrana se sumergió en 100 ml de la solución de buffer de fosfatos con pH de 7.2, la membrana en la solución se colocó en una incubadora a 37 °C y 100 rpm, simulando las condiciones de la piel humana. El proceso de difusión de este sistema se puede observar en la Figura 17.

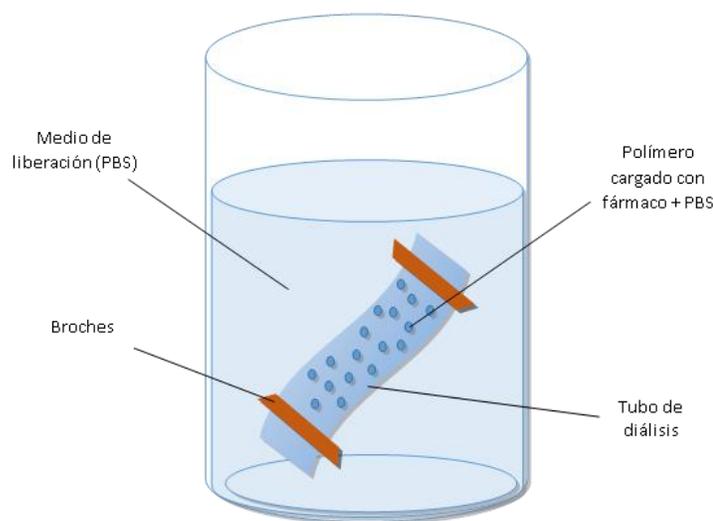


Figura 17. Proceso del fenómeno de difusión en el sistema [71].

La Tabla 7 muestra los reactivos utilizados para hacer 250 mililitros del buffer de fosfatos 1X, una vez preparado el buffer se diluyo en relación 1:10 en agua desionizada para hacerlo 10X.

Tabla 7. Reactivos utilizados para preparar 250 m de buffer PBS.

Reactivo	Sustancia
Cloruro de sodio (NaCl)	20.150 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.550 g
Fosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄)	2.875 g
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.500 g

Posteriormente, el muestreo se llevó a cabo tomando 3 ml de la solución adyacente a la membrana de diálisis, a diferentes periodos de tiempo, la liberación se le dio seguimiento mediante espectrofotometría UV-Visible a 242 nanómetros correspondiente al espectro de la kaempferitrin.

3.10. Curva de calibración

Para realizar la curva de calibración de kaempferitrin se prepararon diferentes concentraciones diluidas en un buffer de fosfatos 10X y pH de 7.2 y se tomaron lecturas en el espectrofotómetro UV-Visible a 242 nanómetros el cual corresponde al pico característico de este compuesto, se tomaron concentraciones que estén dentro del rango valido de concentración, para que la curva no pase a perder linealidad.

CAPÍTULO IV
**RESULTADOS Y
DISCUSIÓN**

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Difracción de rayos X

La Figura 18 nos muestra el difractograma de rayos X tanto para la cáscara de camarón, como para el polímero quitosano donde podemos observar el pico principal entre 20° y 21° , este material es amorfo y no tiene un tamaño de cristal definido como lo reporta Chen y colaboradores [72].

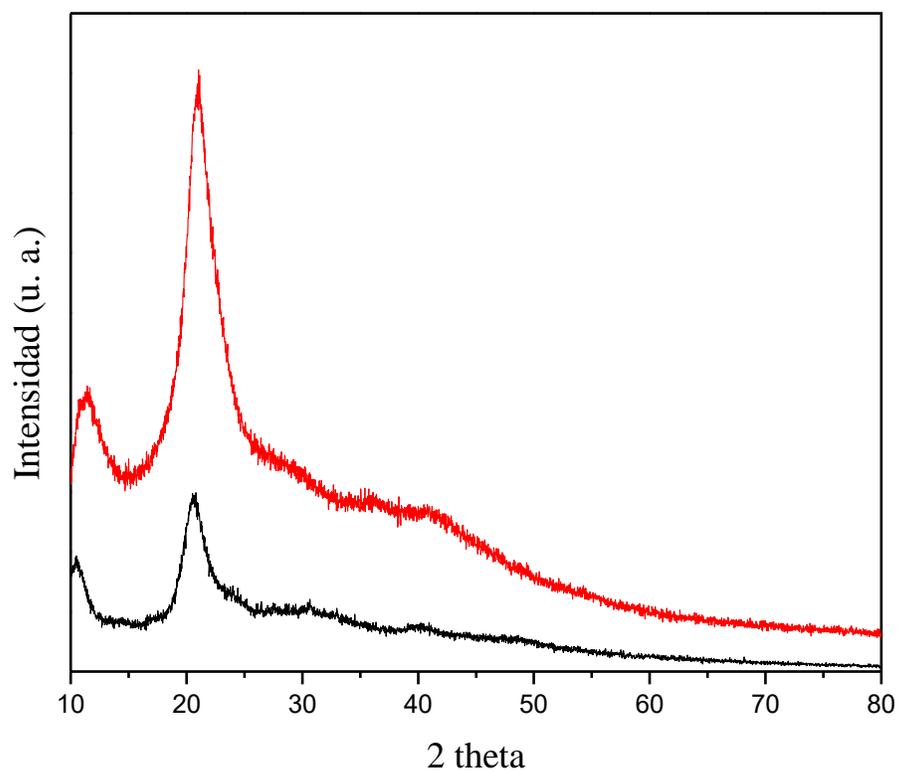


Figura 18. Espectro de difracción de rayos X de quitosano (línea roja) y cáscara de camarón (línea negra).

4.2. Ensayos de toxicidad

Como se puede observar en la Figura 19, el quitosano (Ch1, Ch2 y Ch3) utilizado para elaborar el sistema de administración de fármacos no resultó tóxico en las muestras de la bacteria *E. coli*, ya que las tres muestras utilizadas no impidieron que la bacteria creciera adecuadamente, se puede observar en la gráfica de crecimiento que las muestras con polímero quitosano fueron aumentando la lectura de absorbancia similar al control positivo utilizado, este control solo tiene bacterias de *E. coli* en la solución, cabe resaltar que el polímero no se disolvió en el caldo de Luria-Bertani utilizado, ya que la naturaleza del quitosano nos indica que es insoluble en agua. Además de que en el control negativo representado con la línea rosa no se observó algún crecimiento, ya que solo contenía quitosano, por lo tanto, nuestro material es seguro para utilizarlo en contacto con el cuerpo humano.

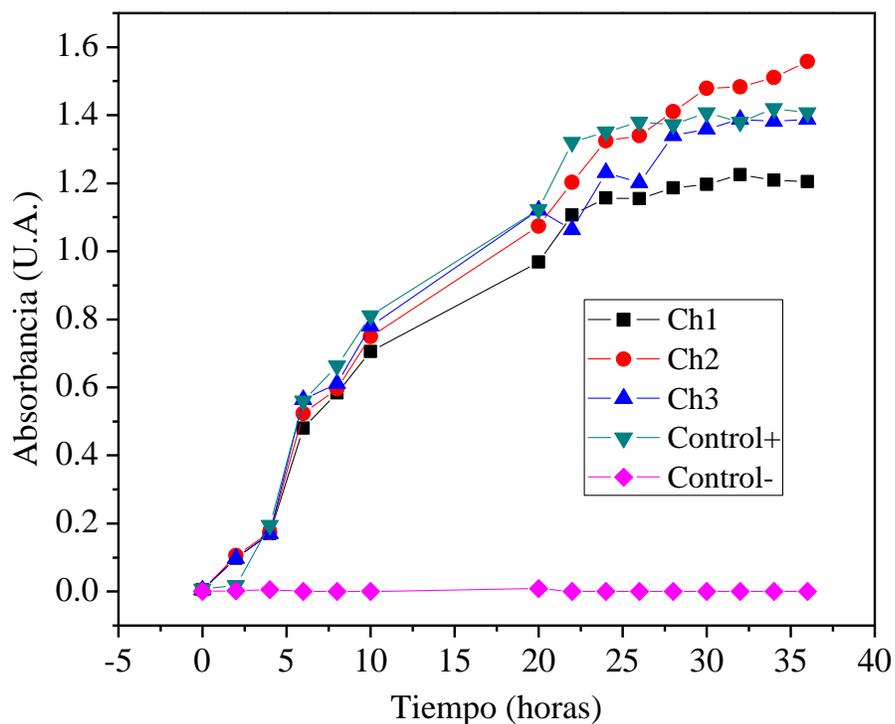


Figura 19. Gráficas de las pruebas toxicológicas del polímero de quitosano realizadas por triplicado.

4.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

En la Figura 20 se muestra el espectro FT-IR del quitosano obtenido a través de la cáscara de camarón donde se puede apreciar las bandas características en 1571.6 cm^{-1} para el enlace de N-H característico del grupo amida y para el enlace N-H₂ característico del grupo amino del segundo carbono en la estructura del quitosano, también se puede apreciar la banda del enlace O-H a 3336.9 cm^{-1} y para el grupo glucósido el enlace C-O-C se encuentra en 1073.79 cm^{-1} y a 1021.5 cm^{-1} encontramos las vibraciones del enlace C-N, el espectro del quitosano obtenido a través de la cáscara de camarón se corrobora con el espectro de quitosano comercial Sigma-Aldrich [73].

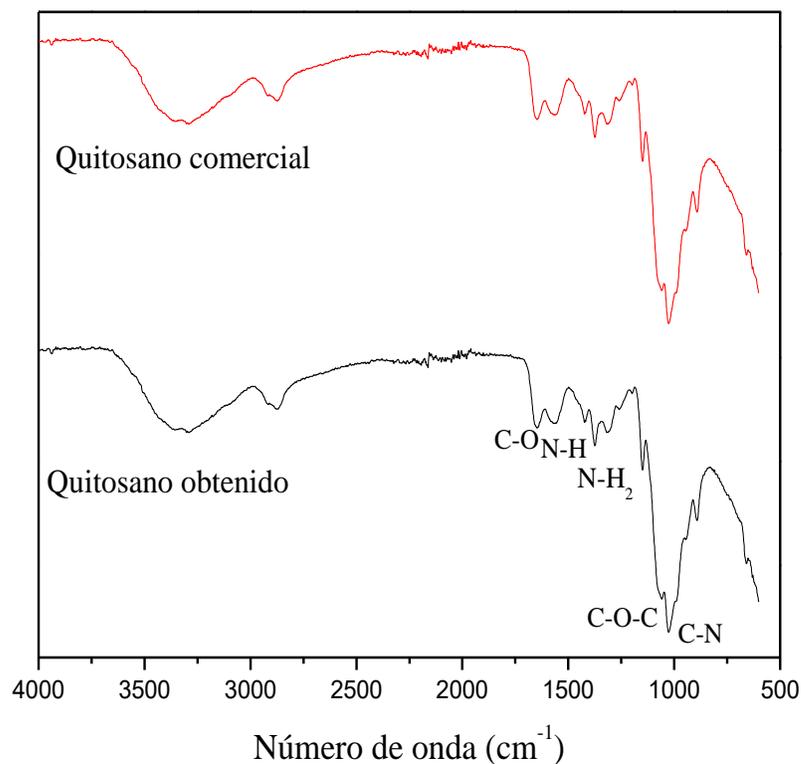


Figura 20. Espectro FT-IR del quitosano comercial (línea roja) y el quitosano obtenido (línea negra).

En la Figura 21 se muestran los diferentes espectros FT-IR de los extractos obtenidos con diferentes concentraciones de solvente en todos los espectros aparecen bandas características como lo es la unión O-H presente en 3354.65 cm^{-1} que se encuentra en abundancia en la estructura de nuestro compuesto de interés, el cual es la kaempferitrin, además de la unión C=C que se presentan a 1616.15 cm^{-1} y el enlace C-O-C el cual se presenta 1070.30 cm^{-1} .

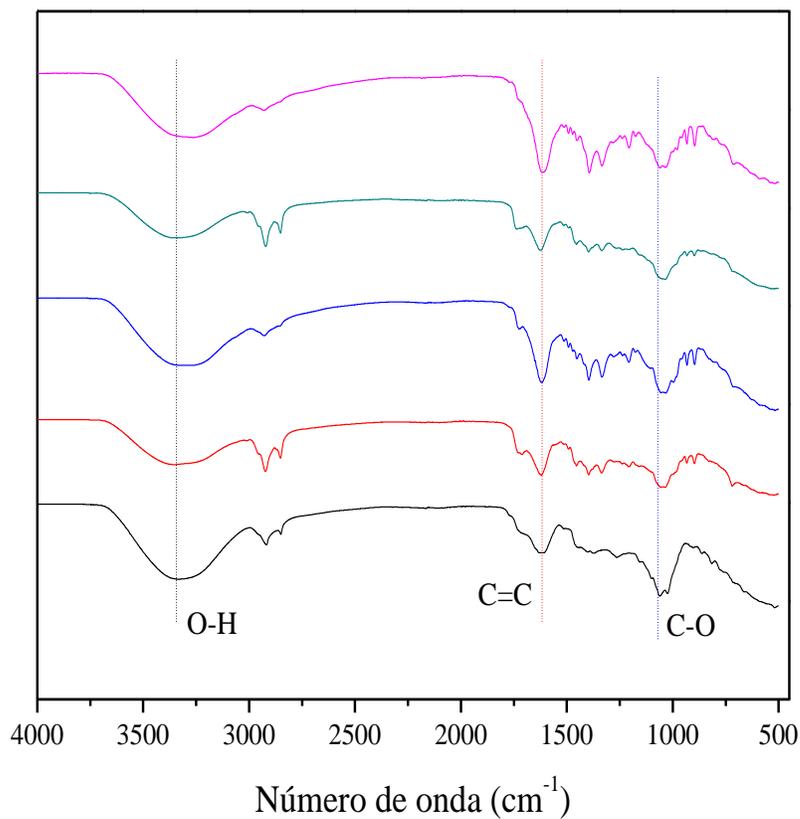


Figura 21. Espectros FT-IR de los extractos de las plantas M1) 100% solvente, M2) 60% solvente, M3) 70% solvente con ultrasónico M4) 50% solvente y M5) 70% solvente.

En la Figura 22 se muestran los espectros FT-IR del sistema de quitosano antes de la presencia del fármaco y después de haber cargado el compuesto bioactivo en las micelas, se puede observar que son similares los espectros, esto puede ser ya que exista un solapamiento de las bandas [74], ya que encontramos enlaces O-H tanto en la kaempferitrin como en el quitosano y en los espectros aparece la banda característica de este enlace en 2925.89 cm^{-1} , el enlace N-H aparece en 1620.18 cm^{-1} y se le atribuye al grupo amida II presente en la estructura del quitosano, también observamos la presencia de los enlaces C-O-C de los alquiles de quitosano en 1035.5 cm^{-1} .

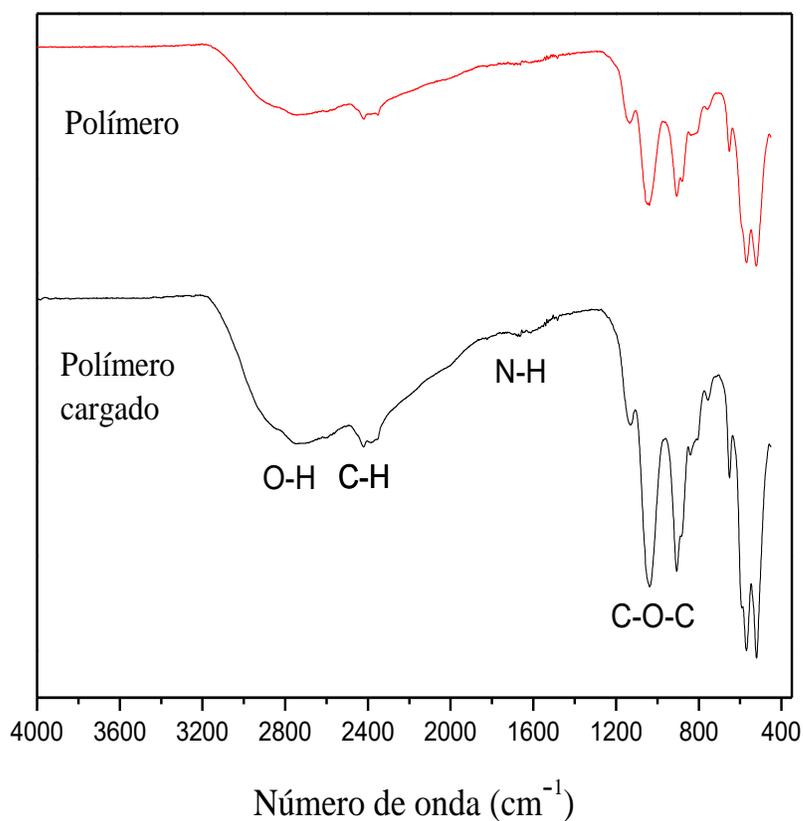


Figura 22. Espectros FT-IR del sistema de quitosano sin cargar (línea roja) y el polímero cargado (línea negra).

4.4. Microscopía Electrónica de Barrido-Transmisión

En la micrografía siguiente (Figura 23) se puede apreciar que la partícula en el polímero transporte antes de estar cargado no tienen una forma definida, es decir, tienen una morfología amorfa, se logra apreciar que la superficie esta abultada, y la partícula más grande presente en la micrografía tiene un tamaño alrededor de 0.3 micrómetros.

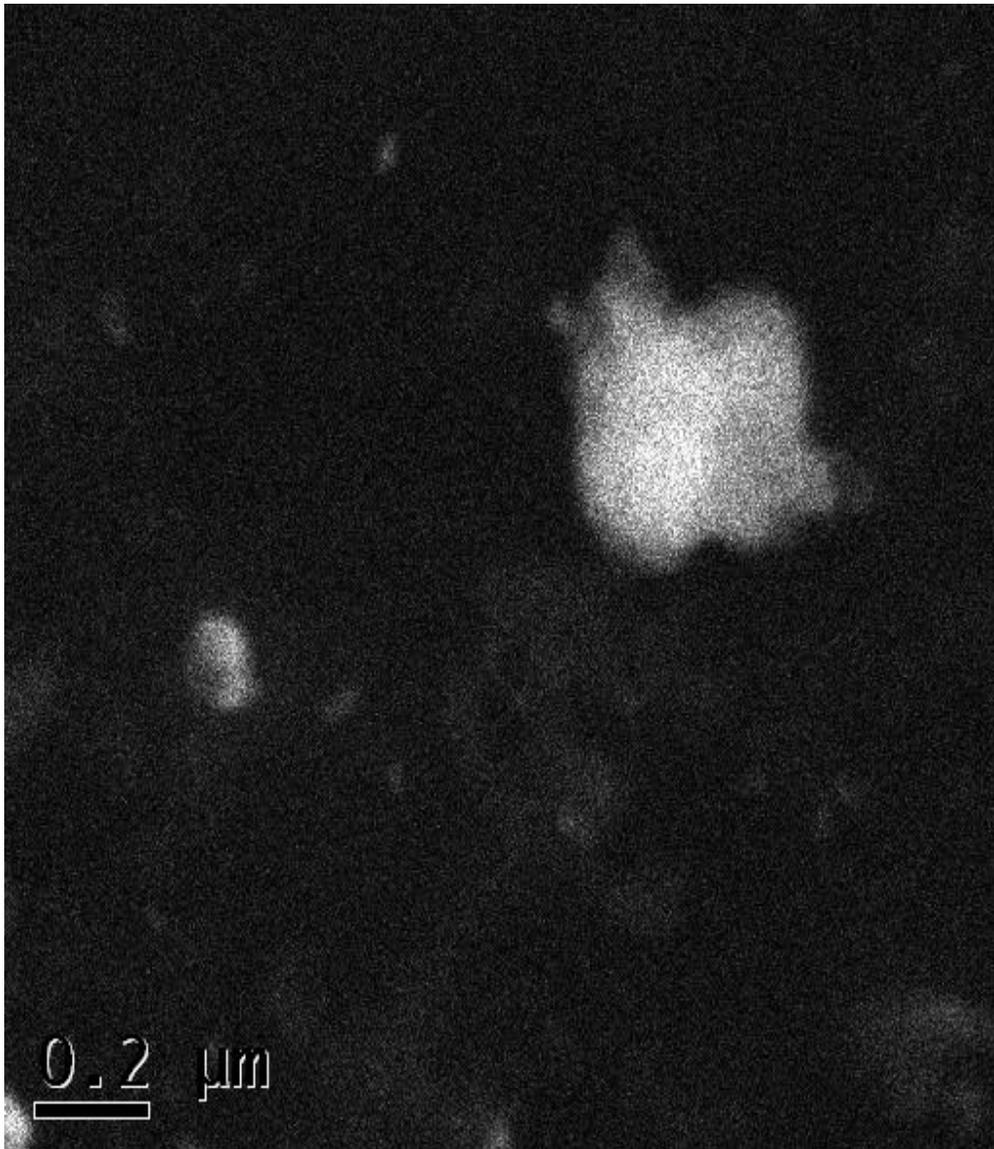


Figura 23. Micrografía de quitosano sin cargar a escala de 0.2 micrómetros.

En la micrografía siguiente (Figura 24) nos muestra el sistema de administración ya cargado, se puede apreciar que las partículas tienen una forma circular bien definida, además se puede observar que el centro de la partícula tiene una coloración muy intensa la cual le corresponde a la parte hidrofóbica del sistema, se alcanza a apreciar que la corona alrededor (parte hidrofílica) de la partícula tiene una coloración de menor tonalidad, esto nos indica que el componente bioactivo kaempferitrin está cargado correctamente en nuestro sistema; además de que esta partícula es de mayor tamaño a las observadas en la micrografía de la Figura 23.

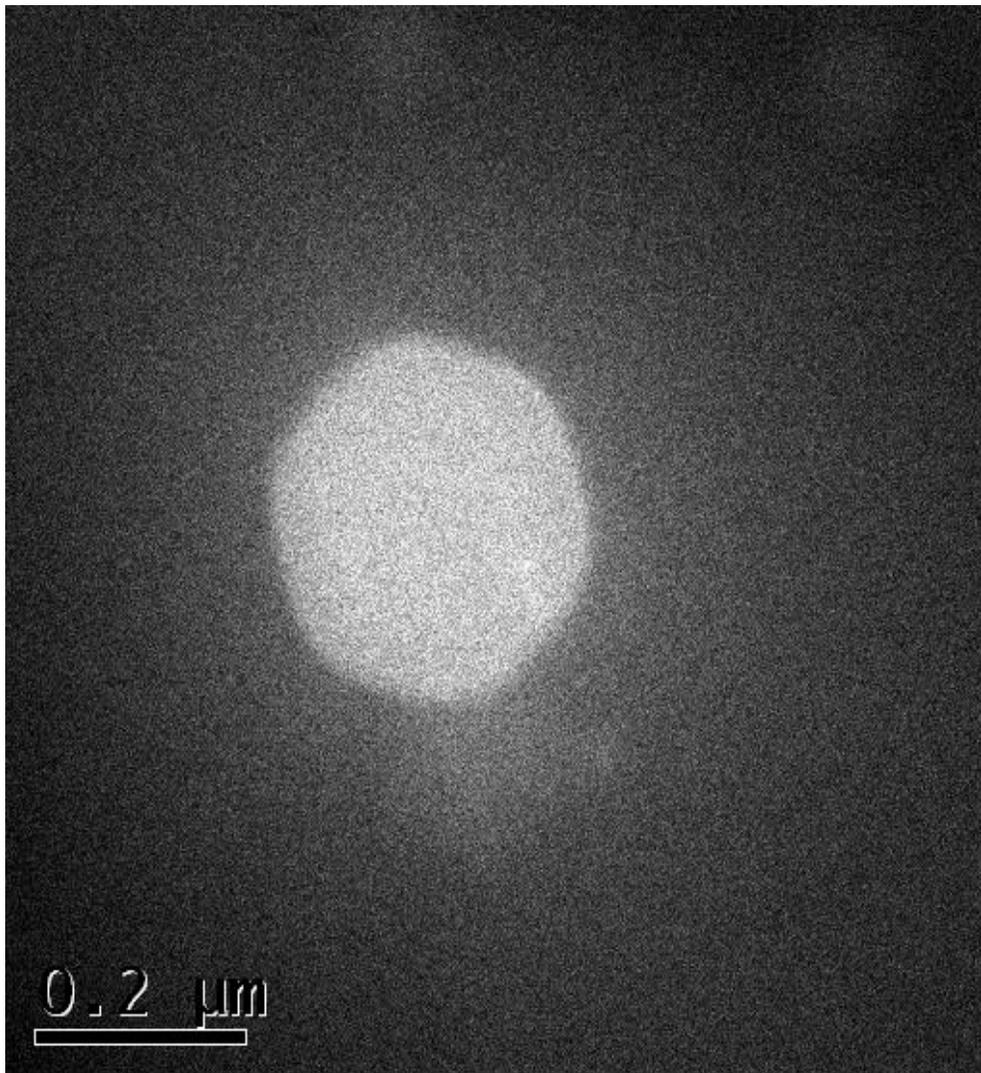


Figura 24. Micrografía del polímero de quitosano cargado con kaempferitrin a escala de 0.2 micrómetros.

La Figura 25 corresponde a una micrografía a menor escala donde se pueden apreciar varias partículas de tamaño muy pequeño y cargadas, con el centro de la partícula con una tonalidad más fuerte, de una morfología circular muy bien definida.

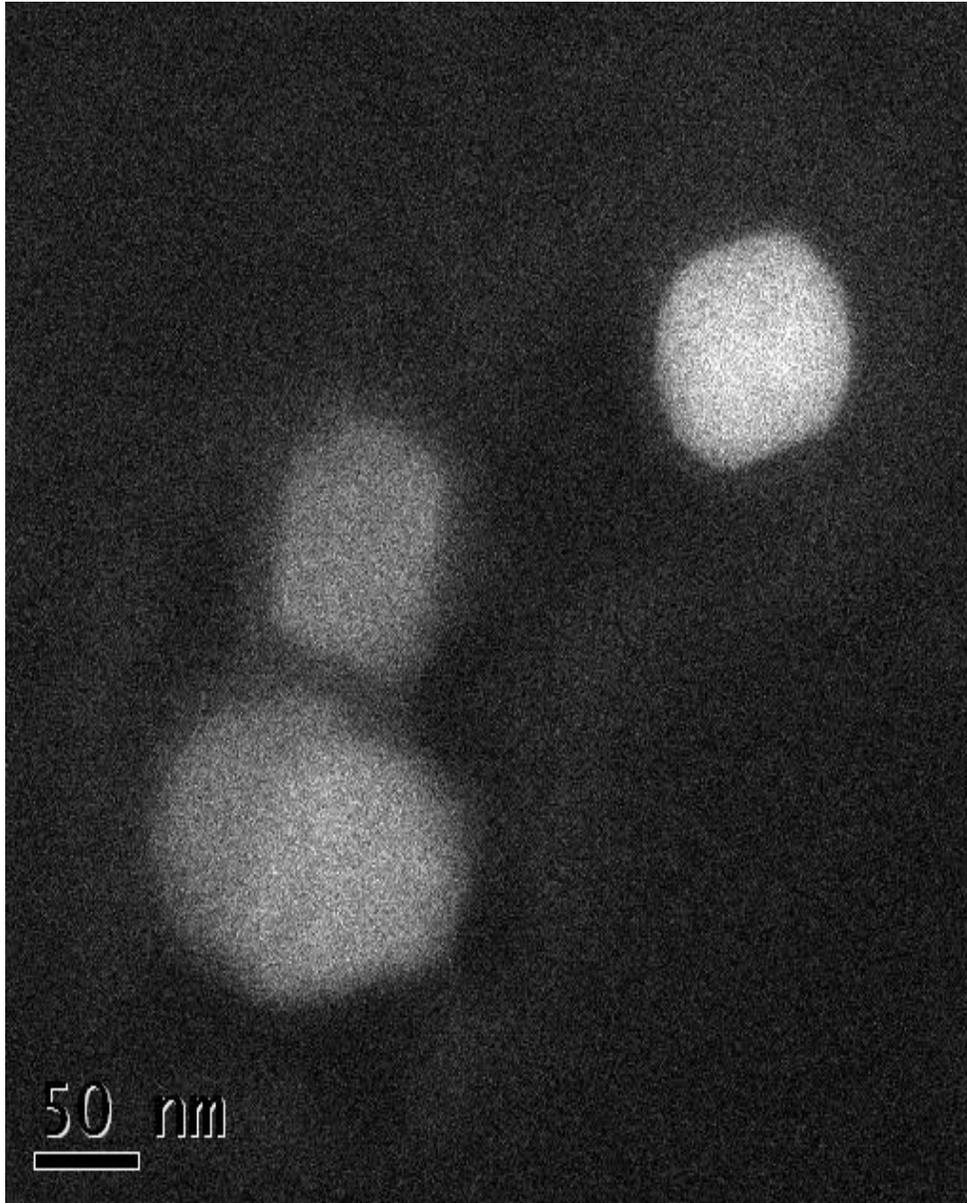


Figura 25. Micrografía del polímero de quitosano cargado con kaempferitrin a escala de 50 nanómetros.

4.5. Estudios de liberación del fármaco

Se obtuvo la curva de calibración de nuestro fármaco (Figura 26), la cual se elaboró a partir de disolver diferentes concentraciones del compuesto kaempferitrin en agua desionizada y hacer mediciones en el equipo UV-Vis.

Esta curva de calibración es útil para conocer a que concentración se encuentra el compuesto bioactivo kaempferitrin liberado en la solución PBS a través de la absorbancia, cuando se toman las muestras el equipo arroja una absorbancia y esta absorbancia arrojada se interpola en la línea de la gráfica siguiente, cabe señalar que esta curva es de confianza ya que tiene un factor de correlación de 0.9813

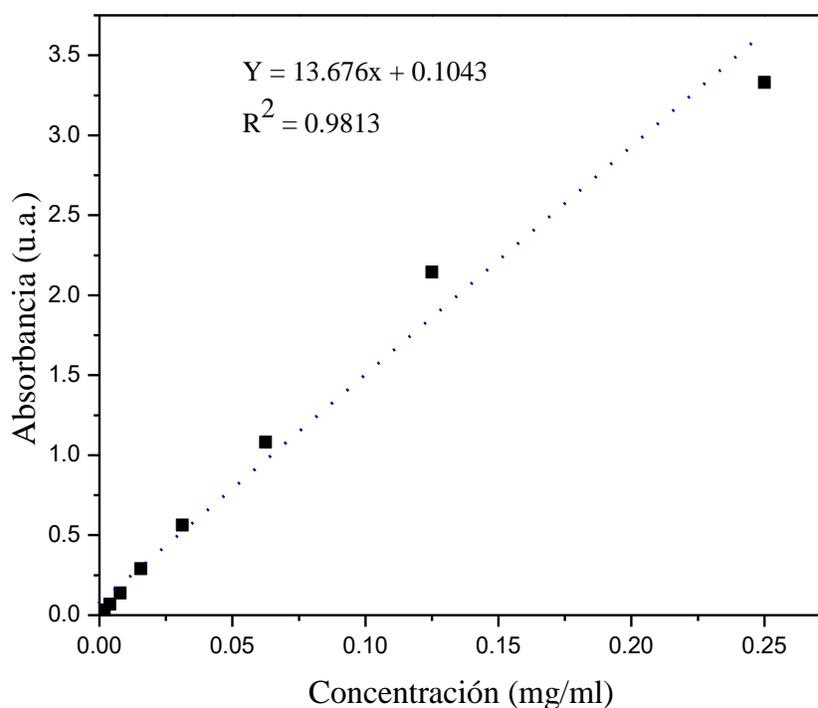


Figura 26. Curva de calibración del fármaco kaempferitrin. Se incluye ecuación de regresión lineal y coeficiente de correlación.

En la Figura 27 se muestra la curva de liberación de fármaco a diferentes periodos de tiempo simulando las condiciones de la piel humana, se puede observar que primeramente tuvo una liberación de más de 50% de la concentración del fármaco en 5 horas; en la gráfica se puede observar que a las 10 horas transcurridas se obtuvo una liberación del 71.05% de la concentración del fármaco esto quiere decir 3.5 mg/ml, el tiempo total de liberación fue de 24 horas y se liberó una concentración de 80.2% de 4.01 mg/ml.

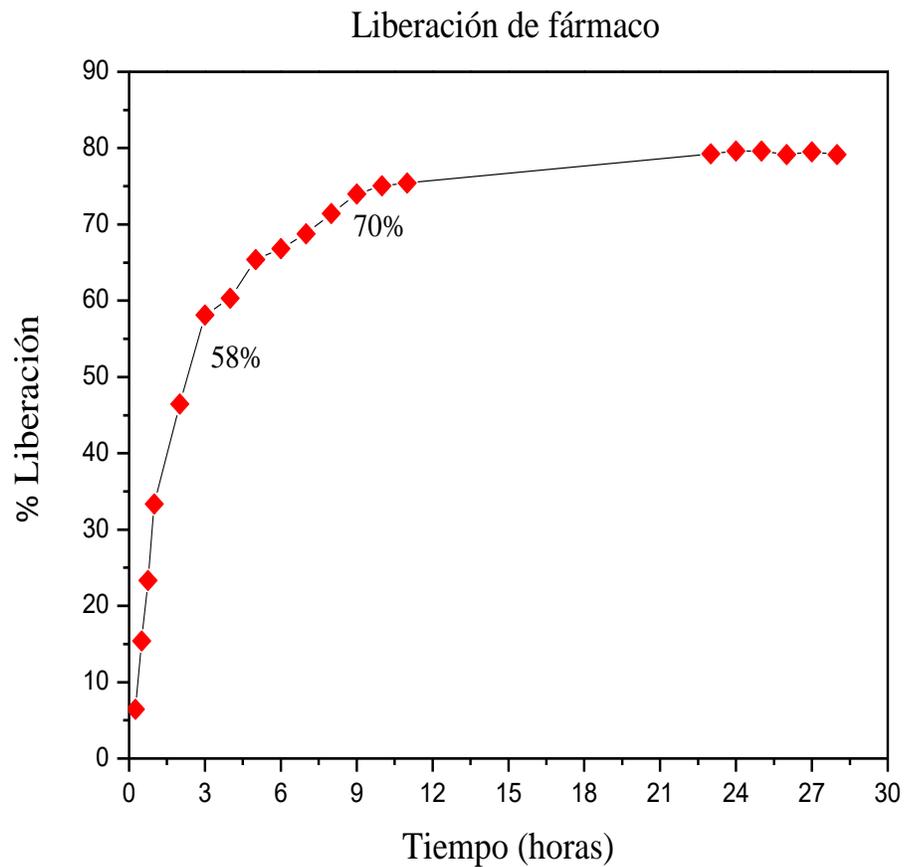


Figura 27. Curva de liberación del compuesto bioactivo kaempferitrin.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Un sistema de administración de fármacos que contiene el compuesto bioactivo kaempferitrin en micelas de quitosano promete ser una alternativa muy buena para el tratamiento contra el cáncer de piel, ya que se ha comprobado que este tipo de tratamientos de origen natural reducen significativamente los efectos secundarios comparados con los agentes terapéuticos convencionales, además las características de este sistema fueron benéficas para la liberación prolongada del fármaco.

El compuesto extraído de la planta muicle se corroboró por la técnica de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), cabe destacar que en los espectros fueron similares entre sí, pero se notó una diferencia entre las bandas obtenidas en los diversos espectros ya que las bandas fueron más prolongadas y anchas en algunos espectros, esto es debido a la variación del porcentaje de concentración de etanol utilizado como solvente al momento de su extracción.

La síntesis de quitosano fue correcta, ya que el espectro FT-IR del polímero sintetizado en el laboratorio fue similar al que se encuentra en el mercado actualmente, las bandas presentes son correspondientes a los enlaces de la estructura de este material, además de que se comparó con diferentes espectros de quitosano obtenido por diversos investigadores.

El quitosano presentó una estructura cristalina amorfa, esto quiere decir que no tiene una estructura de cristal definida. Respecto a las pruebas de toxicidad este material sintetizado en el laboratorio no fue tóxico para las bacterias de *E. coli*. Esto indica que se puede usar para diversas aplicaciones hacia el cuerpo humano, además de que por su naturaleza es biocompatible.

Respecto a la comprobación de la carga del fármaco por la técnica de infrarrojo, se puede observar que las bandas características del compuesto bioactivo no se pueden observar con claridad, esto nos indica que ocurre un solapamiento por las bandas

características del polímero quitosano utilizado como transportador, ya que las bandas de los enlaces característicos del compuesto bioactivo kaempferitrin son similares a las del quitosano.

En el caso de la morfología las micelas de quitosano se muestran con formas irregulares de tamaño muy pequeño y sin una simetría definida antes de agregar el fármaco. Una vez cargado el fármaco podemos corroborar la presencia de este en las micrografías STEM ya que las micelas presentan una forma definida con la presencia de una corona y un núcleo con coloración más oscura que la corona, además de que se observa que las partículas tienen un tamaño mayor a su contraparte sin cargar, esta arquitectura es benéfica para un buen sistema de administración de fármacos.

Al momento de realizar los estudios de liberación de fármaco se puede observar como en las primeras horas se lleva a cabo una liberación rápida y después ocurre una liberación más lenta, hasta llegar a su punto máximo de liberación que fue en un tiempo de 24 horas, esto quiere decir que nuestro sistema libera todo un día completo. Las pruebas de farmacoliberación presentaron una concentración liberada del sistema del 80%, es decir, la concentración total de fármaco en nuestro sistema es de 0.04 mg/ml. La cantidad liberada del sistema puede estar en función del peso molecular del compuesto kaempferitrin el cual tiene un peso molecular igual a 578.72 g/mol.

Este sistema presentó una buena liberación comparado con los elaborados por diferentes autores, y en general, obtuvimos resultados similares, pero con la ventaja de que el material utilizado para realizar el sistema fue sintetizado completamente en el laboratorio, de materia prima presente en la naturaleza, el cual uno de nuestros principales materiales es un desecho muy abundante en la región por ser una zona turística y pesquera como lo es la cáscara de camarón. Para obtener el compuesto kaempferitrin se utilizó la planta comúnmente conocida como “muicle”, esta planta se encuentra fácilmente en esta región e incluso se puede conseguir en las botánicas de la ciudad a un muy bajo costo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Tariq, A., Mussarat, S., & Adnan, M. (2015). Review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological evidence of Himalayan anticancer plants. *Journal of ethnopharmacology*, 164, 96-119.
- [2] Goldman, A. 2014. Manual de enfermería oncológica. Instituto Nacional del Cáncer Argentina, 1, 5-7.
- [3] De la Garza Salazar J.G., & Juárez Sánchez P. 2014. El Cáncer. Universidad Autónoma de Nuevo León, 8, 1-205.
- [4] Craythorne, E., & Al-Niami, F. (2017). Skin Cancer. *Medicine*, 14, 431-434.
- [5] Godic, A., Poljšak, B., Adamic, M., & Dahmane, R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6(1), 1-6.
- [6] Dourmishev, L. A., Rusinova, D., & Botev, I. (2013). Clinical variants, stages, and management of basal cell carcinoma. *Indian Dermatology Online Journal*, 4(1), 12.
- [7] Lomas, A., Leonardi-Bee, J., & Bath-Hextall, F. (2012). A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology*, 166(5), 1069-1080.
- [8] Bibbins-Domingo, K., Grossman, D. C., Curry, S. J., Davidson, K. W., Ebell, M., Epling, J. W., & Kurth, A. E. (2016). Screening for skin cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Journal of American Medical Association*, 316(4), 429-435.
- [9] Gallagher, R. P., Lee, T. K., Bajdik, C. D., & Borugian, M. (2010). Ultraviolet radiation. *Chronic Diseases and Injuries in Canada*, 29.
- [10] Guy, G. P., Machlin, S. R., Ekwueme, D. U., & Yabroff, K. R. (2015). Prevalence and costs of skin cancer treatment in the US, 2002–2006 and 2007–2011. *American Journal of Preventive Medicine*, 48(2), 183-187.

- [11] Ahmed, A. H., Soyer, H.P., Saunders, N., Boukamp P., & Roberts, M. S. (2008). Non-melanoma skin cancers, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 5(1), 55-62.
- [12] Solorsano, C. (2015). Carcinoma Basocelular Esquema. Asociación Colombiana de Dermatología. Consultado en febrero de 2018, recuperado de: http://www.cancerdepielcolombia.org/dt_portfolios/carcinoma-basocelular-esquema/
- [13] Madan, V., Lear, J. T., & Szeimies, R. M. (2010). Non-melanoma skin cancer. *The Lancet*, 375, 673-685.
- [14] Basset-Seguín, N., Sharpe, H. J., & de Sauvage, F. J. (2015). Efficacy of Hedgehog pathway inhibitors in basal cell carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(3), 633-641.
- [15] Zloty, D., Guenther, L. C., Sapijaszko, M., Barber, K., Claveau, J., Adamek, T., & Guidelines Committee. (2015). Non-melanoma skin cancer in Canada chapter 4: management of basal cell carcinoma. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 19(3), 239-248.
- [16] Sekulic A., Migden M. R., Oro A. E., Dirix L., Lewis K. D., Hainsworth J. D. & Marmor, E., (2012). Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 366(23), 2171-2179.
- [17] Gracia-Cazaña T., Salazar N., Zamarrón A., Mascaraque M., Lucena S. R. & Juarranz A. (2016). Resistance of nonmelanoma skin cancer to nonsurgical treatments. Part II: photodynamic therapy, vismodegib, cetuximab, intralesional methotrexate, and radiotherapy. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 107(9), 740-750.
- [18] Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972.
- [19] Vivek, R., Nipun Babu, V., Thangam, R., Subramanian, K.S., & Kannan, S. (2013). pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as tamoxifen carriers for

effective anti-tumor activity in breast cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 111, 117–23.

[20] Sabitha, M., Sanoj Rejinold, N., Nair A., Lakshmanan, V. K., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2012). Development and evaluation of 5-fluorouracil loaded chitin nanogels for treatment of skin cancer. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 48–57.

[21] Dhanamani, M. D. S. L., Devi, S. L., & Kannan, S. (2011). Ethnomedicinal plants for cancer therapy—a review. *Hygeia Journal for Drugs and Medicines*, 3(1), 1-10.

[22] Wong-Arce A., González-Ortega O., & Rosales-Mendoza S. (2017). Plant-made vaccines in the fight against cancer. *Trends in Biotechnology*, 35(3), 241-256.

[23] Lira-De León, K. I., Herrera-Martínez, M., Ramírez-Mares, M. V., & Hernández-Carlos, B. (2017). Evaluation of anticancer potential of eight vegetal species from the state of Oaxaca. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(3), 61-73.

[24] Mbele, M., Hull, R., & Dlamini, Z. (2017). African medicinal plants and their derivatives: Current efforts towards potential anti-cancer drugs. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(2), 121-134.

[25] Mendoza, A. B., Peña, I., Aarland, C., Peralta, S., Sierra, E., & García, B. (2016). Pharmacological and phytochemical potential study of plants collected in Amecameca, State of Mexico, Mexico. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 15(1), 62-67.

[26] Murillo-Alvarez, J. I., Encarnación, D. R., & Franzblau, S. G. (2001). Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Pharmaceutical Biology*, 39(6), 445-449.

[27] Corrêa, G. M., & Alcântara, A. F. (2012). Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(1), 220-238.

[28] Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., & García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic

effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 455-462.

[29] Jacobo-Salcedo, R. M., Alonso-Castro, A. J., Salazar-Olivo, L. A., Carranza-Alvarez, C., González-Espíndola, L. A., Dominguez, F., & Estrada-Castillon, E. (2011). Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications*, 6(12), 1925-1928.

[30] Villavicencio Nieto, M. A., & Pérez Escandón, B. E. (2005). Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua, Hidalgo I. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Biológicas. Hidalgo, México. 21-22.

[31] Alonso-Castro, A. J., Ortiz-Sánchez, E., García-Regalado, A., Ruiz, G., Núñez-Martínez, J. M., González-Sánchez, I., & Cerbón, M. A. (2013). Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2), 476-489.

[32] Sigma-Aldrich (2016). Catálogo de productos, consultado en febrero del 2018.

[33] Ramanan, R. M. K., Chellamuthu, P., Tang, L., & Nguyen, K. T. (2006). Development of a temperature-sensitive composite hydrogel for drug delivery applications. *Biotechnology progress*, 22, 118-125.

[34] Dai, Y., Zhang L., Xiang R., Wan Y., Pan X., Zheng L., & Yi, Y. (2017). Polymeric micelles with photo-activated proton release behavior for enhanced tumor extracellular pH targeting and drug release. *European Polymer Journal*, 96, 69-78.

[35] Liu J., Yang G., Zhu W., Dong Z., Yang Y., Chao Y. & Liu Z. (2017). Light-controlled drug release from singlet-oxygen sensitive nanoscale coordination polymers enabling cancer combination therapy. *Biomaterials*, 146, 40-48.

[36] Liu, J., Meisner, D., Kwong, E., Wu, X. Y., & Johnston, M. R. (2007). A novel trans-lymphatic drug delivery system: implantable gelatin sponge impregnated with PLGA-paclitaxel microspheres. *Biomaterials*, 28(21), 3236-3244.

- [37] Ayen, W. Y., & Kumar, N. (2012). A systematic study on lyophilization process of polymersomes for long-term storage using doxorubicin-loaded (PEG) 3–PLA nanopolymersomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(5), 405-414.
- [38] Zhu, K., Ye, T., Liu, J., Peng, Z., Xu, S., Lei, J., & Li, B. (2013). Nanogels fabricated by lysozyme and sodium carboxymethyl cellulose for 5-fluorouracil controlled release. *International Journal of Pharmaceutics*, 441(2), 721-727.
- [39] Smitha, K. T., Anitha, A., Furuike, T., Tamura, H., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2013). In vitro evaluation of paclitaxel loaded amorphous chitin nanoparticles for colon cancer drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 245-253.
- [40] Tang, X. J., Huang, K. M., Gui, H., Wang, J. J., Lu, J. T., Dai, L. J., & Wang, G. (2016). Pluronic-based micelle encapsulation potentiates myricetin-induced cytotoxicity in human glioblastoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4991-5002.
- [41] Engineer, C., Parikh, J., & Raval, A. (2011). Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 25(2), 79-85.
- [42] Tan, M. L., Choong, P. F., & Dass, C. R. (2009). Doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(2), 131-142.
- [43] Velásquez, C. L. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(2), 91-109.
- [44] Ahmed, S., & Ikram, S. (2016). Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 27-37.
- [45] Shao, S., Zhu, Y., Meng, T., Liu, Y., Hong, Y., Yuan, M., & Hu, F. (2018). Targeting high expressed $\alpha 5\beta 1$ integrin in liver metastatic lesions to resist metastasis of colorectal cancer by RPM peptide modified chitosan-stearic micelles. *Molecular Pharmaceutics*, 15(4), 1653-1663.

- [46] Deshmukh, A. S., Chauhan, P. N., Noolvi, M. N., Chaturvedi, K., Ganguly, K., Shukla, S. S., & Aminabhavi, T. M. (2017). Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(1), 249-268.
- [47] Talelli, M., Barz, M., Rijcken, C. J., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Lammers, T. (2015). Core-crosslinked polymeric micelles: Principles, preparation, biomedical applications and clinical translation. *Nano Today*, 10(1), 93-117.
- [48] Tanbour, R., M Martins, A., G Pitt, W., & A Hussein, G. (2016). Drug delivery systems based on polymeric micelles and ultrasound: a review. *Current pharmaceutical Design*, 22(19), 2796-2807.
- [49] Adams, M. L., Lavasanifar, A., & Kwon, G. S. (2003). Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(7), 1343-1355.
- [50] Cortes, H., Martínez, P., & Valencia, H. (2006). *Fundamentos de cristalografía*. Editorial Elizcom, Armenia, Colombia.
- [51] Lindenvald, N. (1980). *La estructura de los metales*. Prensa Universitaria Argentina, 3, 15-16.
- [52] Vázquez Briseño, L., & de la Torre, I. (2002). Índices de Miller. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Departamento de Materiales, 4, 12-14.
- [53] García, M. (2007). Determinación del tamaño de cristal utilizando el software Jade 6.5. *Centro de Investigación en Energía-UNAM*, 6-51.
- [54] Vargas, R., Landáez, H., & Vélez, M. (1983). Determinación de la morfología de cristallitos por difracción de rayos X: El Método de las Superficies Proyectadas. *Latinamerican Journal of Metallurgy and Materials*, 3(2), 76-80.
- [55] Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamental and Applications*. John Wiley and sons.
- [56] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Timothy, A. D. (2001). *Principios de análisis instrumental*. Ed. 5. McGraw-Hill Interamericana de España.

- [57] Jaggi, N., & Vij, D. R. (2006). Fourier transform infrared spectroscopy. Handbook of Applied Solid State Spectroscopy. Springer US.
- [58] Bacsik, Z., Mink, J., & Keresztury, G. (2004). FTIR spectroscopy of the atmosphere. I. Principles and methods. Applied Spectroscopy Reviews, 39(3), 295-363.
- [59] Perkin Elmer (2004) Technical note, FT-IR spectroscopy, consultado 1 de febrero del 2018.
- [60] Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2017). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Springer. 1-550.
- [61] Lupini, A. R., Rashkeev, S. N., Varela, M., Borisevich, A. Y., Oxley, M. P., Van Benthem, K., & Chisholm, M. F. (2007). Scanning transmission electron microscopy. Nanocharacterization. Kirkland & Hutchinson.
- [62] Bogner, A., Jouneau, P. H., Thollet, G., Basset, D., & Gauthier, C. (2007). A history of scanning electron microscopy developments: towards “wet-STEM” imaging. Micron, 38(4), 390-401.
- [63] Förster, H. (2004). UV/Vis spectroscopy, Characterization I. Molecular Sieves- Science and Technology, 4, 337-426.
- [64] Perkampus, H. H. (2013). UV-VIS Spectroscopy and its Applications. Springer Science & Business Media.
- [65] Sierra, I., Gómez-Ruiz, S., Pérez-Quintanilla, D., & Morante, S. (2010). Análisis instrumental. Algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al Espacio Europeo de Educación Superior. Barcelona, España. Netbiblo.
- [66] Millán, F. (2011). Métodos espectroscópicos UV-Visible para análisis molecular y elemental. Libro de espectroscopía UV Visible. Mérida, Yucatán. Instituto Politecnico Universitario “Santiago Mariño”.

- [67] Faraldos, M., & Goberna, C. (2011). Técnicas de análisis y caracterización de materiales. Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- [68] Modi, S., & Anderson, B. D. (2013). Determination of drug release kinetics from nanoparticles: overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. *Molecular Pharmaceutics*, 10(8), 3076-3089.
- [69] Burgess, D. J., Hussain, A. S., Ingallinera, T. S., & Chen, M. L. (2002). Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: AAPS workshop report, co-sponsored by FDA and USP. *Pharmaceutical Research*, 19(11), 1761-1768.
- [70] D'souza, S. S., & DeLuca, P. P. (2006). Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharmaceutical Research*, 23(3), 460
- [71] Soto-Robles, C. A. (2017). Desarrollo de un sistema polimérico (PEG-PVP) para el transporte y liberación controlada de fármacos contra el cáncer de piel (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California.
- [72] Chen X., Yang H., Zhong Z., & Yan, N., (2017). Base-catalysed, one-step mechanochemical conversion of chitin and shrimp shells into low molecular weight chitosan. *Green Chemistry* 19 (2017) 2783-2792.
- [73] Soares P., Sousa A., Silva J., Ferreira I., Novo C., & Borges J.P. (2016). Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling. *Carbohydrate Polymers*, 147, 304-312.
- [74] Okolo, P. O., Akakuru, O. U., Osuji, O. U., & Jideonwo, A. (2013). Studies on the properties of chitosan-starch beads and their application as drug release materials. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 6(1), 118-126.