



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**SÍNTESIS VERDE DE NANOVECTORES DE ALBÚMINA
LACTOSILADA PARA EL TRANSPORTE DE COMPUESTOS
ANTI-PROLIFERATIVOS DEL ACEITE ESENCIAL DE
ORÉGANO (*Lippia palmeri* S. WATS) PARA SU USO
TERAPÉUTICO CONTRA EL CARCINOMA
HEPATOCELULAR.**

Por:

MARÍA ELENA ANGUIANO LIZÁRRAGA

TESIS APROBADA POR LA

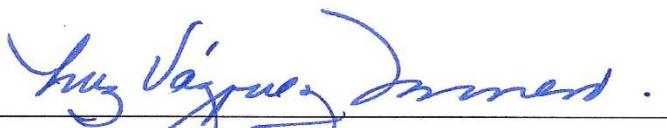
COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

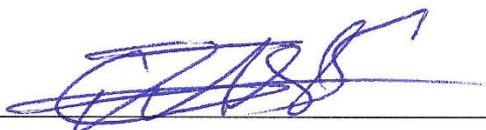
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María Elena Anguiano Lizárraga, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



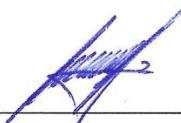
Dra. Luz Vázquez Moreno

Directora de tesis



Dr. Jose Andre-i Sarabia Sainz

Co-director de tesis



Dr. José Ángel Huerta Ocampo

Integrante del comité



M.C María del Refugio Robles Burgueño

Integrante del comité

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Síntesis Verde de Nanovectores de Albúmina Lactosilada para el Transporte de Compuestos Anti-Proliferativos del Aceite Esencial de Orégano (*Lippia palmeri* S. WATS) para su uso Terapéutico Contra el Carcinoma Hepatocelular” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora María Elena Anguiano Lizárraga, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

 **CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico brindado durante mis estudios, y por haberme aceptado en su programa de becarios.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A.C y a su Coordinación de Programas Académicos, por permitirme ser estudiante de esta institución.

A los miembros de mi comité a la Dra. Luz Vázquez Moreno, al Dr. Jose Andre-i Sarabia Sainz, al Dr. José Ángel Huerta Ocampo y a la M.C María del Refugio Robles B. que me han apoyado y aconsejado en cada paso que he dado a lo largo de esta investigación.

Al Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Glicanos, y todos sus miembros

Al laboratorio de Biofísica Médica del Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora, así como al Dr. Martin Pedroza y los investigadores asociados.

A todos mis compañeros y amigos que me acompañaron durante todo mi camino.

Agradezco infinitamente a mi familia por su apoyo y a mi amado esposo por estar conmigo en cada momento.

DEDICATORIA

Mi esfuerzo como mi trabajo es dedicado a mi esposo, quien ha estado conmigo en cada momento apoyándome y amándome incondicionalmente.

A mi familia por siempre estar al pendiente de mí y brindándome su apoyo y sus consejos en paso que he dado en la vida.

A mis amigos por siempre escucharme, comprenderme y ayudarme a salir de los malos momentos, por brindarme siempre una sonrisa y un fuerte abrazo.

Con todo mi amor, le dedico este trabajo a mi padre, abuelo, al mejor hombre que he conocido en mi vida, quien me ha guiado a lo largo de los años y siempre me ha apoyado incondicionalmente, me ha corregido cuando me equivoco y ha limpiado mis lágrimas cuando estoy triste. Porque él me tomo de las manos cuando daba mis primeros pasos, y nunca me ha soltado. Por todo y muchas cosas más este trabajo se lo dedico con tomo mi corazón a Rafael Lizárraga Acosta.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	13
2.1 Nanotecnología	13
2.2 Nanomedicina.....	13
2.3 Nanofarmacéutica	14
2.3.1 Encapsulación y Transporte de Sustancias con Potencial Farmacológico.....	15
2.4 Gliconanotecnología	16
2.4.1 Glicoconjugados y Glicoproteínas	17
2.4.2 Funcionalización de Nanopartículas.....	18
2.5 Sistema de Liberación Controlada del Fármaco	18
2.6 Nanotecnología Verde	20
2.7 Albúmina	20
2.8 Aceite Esencial de Orégano (<i>Lippia palmeri</i> S.Wats).....	23
2.8.1 Carvacrol.....	24
2.9 Carcinoma Hepatocelular: Como Modelo de Estudio.....	25
2.9.1 Características del Carcinoma Hepatocelular	26
2.9.2 Receptor de Ashwell-Morell	26
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVO	29
4.1. Objetivo General.....	29
4.2. Objetivos Específicos	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Síntesis del Glicoconjugado BSA-Gal.	30
5.2 Caracterización de la BSA Glicada.....	31
5.2.1 Electroforesis SDS-PAGE	31
5.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Acoplada a Espectrometría de Masas	32
5.2.3 Espectroscopia Infrarroja FT-IR	32
5.2.4 Ensayos de Biorreconocimiento de la BSA Modificada con RCA	33
5.3 Determinación de Citotoxicidad del Aceite Esencial de Orégano (<i>Lippia palmeri</i> S.Wats).....	33

CONTENIDO (Continuación)

5.3.1 Cultivo de Células y Citotoxicidad.	33
5.4 Síntesis de Nanopartículas y Encapsulación del Aceite Esencial de Orégano/Carvacrol.	34
5.4.1 Síntesis de Nanopartículas Núcleo/Coraza	34
5.4.2 Determinación de Tamaño y Potencial Z de las Nanopartículas	34
5.4.3 Microscopia de Fuerza Atómica.....	35
5.4.4 Extracción de AEO/Carvacrol de las Nanopartículas.....	35
5.4.5 Cinética de Liberación de Compuestos Anticancerígenos.....	36
5.4.6 Ensayos de Biorreconocimiento de la NPs BSA/BSA-Lac con <i>Ricinus Communis Agglutinin I</i> (RCA)	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1 Caracterización de los Glicoconjugados de BSA-Gal	38
6.1.1 Electroforesis SDS-PAGE	38
6.1.2 Análisis por HPLC Acoplado a Espectrometría de Masas.	39
6.1.3 Análisis por FT-IR.....	40
6.1.4 Lectino-Ensayos (ELLA´s)	42
6.2 Determinación de Citotoxicidad del AEO.....	44
6.3 Caracterización de las Nanopartículas	45
6.3.1 DLS y Potencial Z	45
6.3.2 Encapsulación y Cinética de Liberación de AEO.	46
6.3.3 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	48
6.3.4 ELLAs con Nanopartículas	49
7. CONCLUSIÓN	50
8. RECOMENDACIONES	51
9. REFERENCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Nanopartícula núcleo/coraza.	15
2. Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra la liberación libre de fármaco (Sarabia-Sainz et al., 2012).	19
3. Glicación de BSA con lactosa mediante el uso de un agente reductor (NaBH ₃ CN).	21
4. Glicación de BSA con Ácido Lactobiónico mediante el uso de activadores de grupos carboxilos (EDC y NHS).	22
5. Glicación no enzimática mediante la reacción de Maillard.	23
6. Estructura química del carvacrol (Yin et al., 2012).	25
7. Curva estándar de carvacrol para la determinación de la concentración de componentes mayoritarios del AEO en las nanopartículas.	36
8. Electroforesis SDS-PAGE al 10 %, se aplicaron 10 ug de proteína por muestra. Carril A y F son estándares de masa molecular; Carril B BSA sin tratar; Carril C, BSA-Lac Δ; Carril D, BSA-Lac NaBH ₃ CN; Carril E, BSA-Ac.Lacto.	39
9. FT-IR. Comparación del espectro FT-IR de los diferentes productos obtenidos en las reacciones de adición de carbohidratos. BSA-Lac Δ (B), BSA-Lac NaBH ₃ CN (C) y BSA-Ác. Lacto. (D) se observó la huella dactilar para los carbohidratos la cual se encuentra en la región de 900-1199cm ⁻¹ indica la huella dactilar para los carbohidratos. La BSA (A) se usó como control negativo.	42
10. Estructura del ácido lactobiónico.	42
11. Ensayos con lectinas ligadas a enzimas (ELLAs). Las BSA sometidas a modificación con carbohidratos, fueron inmovilizadas en placas de ELISA (20 μg) y expuesta a la lectina RCA.	43
12. Ensayo de citotoxicidad del AEO sobre la línea cancerígena Hep G2, a distintas concentraciones.	45
13. Cinética de liberación de carvacrol con tiempos de medición a las horas 1, 3, 6 y 12. Donde se observa un comportamiento de liberación similar en ambas nanopartículas donde se encontraban encapsulados los compuestos antiproliferativos. Las muestras se compararon contra la nanopartícula control NPs BSA/ BSA-Lac Δ.	47
14. Imagen de nanopartículas observadas con AFM. A) Núcleo de BSA de las NPs, B) NPs de BSA con coraza de BSA-Lac, C) NPs BSA/BSA-Lac con AEO y D) NPs BSA/BSA-Lac con carvacrol. Todas se observan con el mismo tipo de morfología y tamaño excepto la imagen A) que corresponde al núcleo de las nanopartículas.	48
15. Ensayo ELLAs con NPs BSA/BSA-Lac, donde se comprobó la presencia de los residuos de galactosa en la superficie de las NPs.	49

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Doce principios en los que se basa la química verde.....	20
2. Condiciones de glicación de BSA.....	31
3. Determinación de masa molecular de la BSA control y BSA sometida a tratamientos de glicación.....	40
4. Tamaño y potencial Z de las nanopartículas sintetizadas con BSA y BSA Lactosilada, al igual las nanopartículas en las cuales se encapsularon AEO y carvacrol.	46
5. Porcentajes de EE y RR de las nanopartículas BSA/BSA-Lac.	47
6. Valores de R^2 y K_1 obtenidos mediante la aplicación del modelo dependiente (primer orden).....	48

RESUMEN

El uso de la nanotecnología se ha incrementado en las últimas décadas, especialmente en el área clínica, surgiendo la nanomedicina y nanofarmacéutica, sin embargo, se desconocen los alcances de contaminación o problemas de salud que puede acarrear su aplicación. Surge la necesidad de implementar métodos, basados en los principios de la química verde, para producir nanoterapias seguras para el paciente y el medio ambiente. Este trabajo se enfoca en la obtención de nanovectores de albúmina glicada, obtenida por síntesis verde y métodos químicos convencionales, y determinación de la eficiencia de encapsulación y transporte de compuestos anti-proliferativos presentes en el Aceite Esencial del Orégano (*Lippia palmeri*) (AEO). Se desarrollaron 3 métodos de glicación de la albúmina sérica bovina (BSA), en presencia de lactosa o ácido lactobiónico. Posteriormente, se realizó la caracterización mediante electroforesis SDS-PAGE, biorreconocimiento por la lectina *Ricinus comunis* (RCA), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, HPLC acoplado a espectrometría de masas. Se determinó la presencia de carbohidratos y el cambio de la masa molecular de la BSA en cada tratamiento. Solo BSA-Lac Δ y BSA-Lac NaBH₃CN fueron un biorreconocidas por parte de la lectina RCA. En una segunda etapa, se seleccionó la BSA-Lac Δ , que cumple con los principios de la química verde. Se comprobó la capacidad citotóxica de los componentes del AEO contra la línea células Hep G2 donde el IC₅₀ fue de 0.070 mg/mL. La BSA-Lac Δ se utilizó para la síntesis de nanopartículas núcleo/coraza (NPs), donde se encapsuló AEO y/o carvacrol por el método de solvatación. Se obtuvieron NPs con un tamaño de 206 \pm 2.58 nm a 244.4 \pm 5.15 nm con potencial zeta menor a -30 mV y se logró encapsular 7.58 μ g AEO y 11.06 μ g de carvacrol por mg de NPs. Las NPs BSA/BSA-Lac Δ fueron biorreconocidas por la lectina RCA, lo que demostró que las partículas presentan residuos de galactosa en la superficie, lo que conlleva a que las NPs pudieran ser biorreconocidas por el receptor Ashwell-Morell, posibilitando el uso de estos nanovehículos como nanoterapia contra el carcinoma hepatocelular.

Palabras claves: Nanotecnología, Nanomedicina, Nanofarmacéutica Síntesis verde, nanoterapias, Aceite esencial de orégano, Carcinoma hepatocelular

ABSTRACT

The use of nanotechnology has increased in recent decades, especially in clinical fields, emerging, nanomedicine and nanopharmaceutical fields. However, the extent of contamination or health problems that can lead to its application are unknown. There is a need to implement methods that comply with the principles of green chemistry to produce nanotherapies safe for patients and the environment. This work focuses on obtaining glycosylated albumin nanovectors, using green synthesis and chemical methods, encapsulation efficiency determination and transport of anti-proliferative compounds present in Oregano (*Lippia palmeri*) Essential Oil (AEO). Three methods of glycosylation of bovine serum albumin (BSA) were applied using either lactose or lactobionic acid. Subsequently, the characterization was carried out by SDS-PAGE electrophoresis, biorecognition by *Ricinus communis* lectin (RCA), Fourier transform infrared spectroscopy and HPLC coupled to mass spectrometry. The presence of carbohydrates and change in molecular mass of BSA in each treatment was determined. Only BSA-Lac Δ and BSA-Lac NaBH₃CN demonstrated a biorecognition by RCA. In a second phase BSA-Lac Δ was selected as it complied with the principles of green chemistry. Likewise, the cytotoxic capacity of the AEO components was tested against the Hep G2 cell line where the IC₅₀ was 0.070 mg / mL. BSA-Lac Δ was used to perform the synthesis of core / shell nanoparticles (NPs), where AEO and carvacrol was encapsulated by the solvation method. NPs presented sizes of 206 ± 2.58 nm and 244.4 ± 5.15 nm, respectively, and zeta potential under -30 mV. NPs encapsulated 7.58 μ g of AEO and 11.06 μ g of carvacrol (per mg of NP). BSA / BSA-Lac Δ NPs were biorecognized by the RCA, which shows that the particles have galactose residues on the surface and leads the possibility that they could be recognized by the Ashwell-Morell receptor, allowing the use of these nanocarriers as nanotherapies against hepatocellular carcinoma.

Keywords: nanotechnology, nanomedicine, nanopharmaceutical, green chemistry, nanotherapies, Oregano essential oil, hepatocellular carcinoma.

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria encargada del estudio de la materia a escala nanométrica. En una forma muy estricta la nanotecnología solo incluye partículas por debajo de los 100 nm, sin embargo, en la nanotecnología aplicada a sistemas de liberación controlada, donde se emplean matrices poliméricas el término también incluye a partículas por debajo de 1000 nm (Gaumet, et al., 2008). Una de las áreas donde la nanotecnología ha tenido mayor aplicación es en las ciencias de la salud, surgiendo con ella la nanomedicina y la nanofarmacéutica, las cuales son aplicadas en el diagnóstico, transporte y liberación controlada de medicamentos (Pimentel, et al., 2007).

Pese a que los nanomateriales suponen grandes ventajas, también presentan riesgos, siendo difícil prever su impacto en el medio ambiente, debido a que poseen propiedades físicas y químicas distintas al material original. El desconocimiento sobre las interacciones de estos materiales con el ambiente y los sistemas biológicos, aunado a la falta de estandarización de protocolos y normatividad de las instancias gubernamentales para su uso, dificultan evaluar su impacto real (Vazquez y Huerta, 2018). Una estrategia alternativa para producir los nanomateriales es la síntesis verde, que busca ser amigable con el ambiente y biocompatible con el organismo (Boroumand et al., 2015).

Para el diseño de nanopartículas en el área de la medicina, la síntesis verde debe tomar en cuenta todo el proceso para el desarrollo de la nanoestructura. Se ha demostrado que, entre muchos ejemplos de sistemas de administración de medicamentos impulsados por la nanotecnología verde, los que reciben la mayor atención incluyen nanopartículas desarrolladas con biopolímeros compatibles con el organismo (Jahangirian et al., 2017).

Para el carcinoma hepatocelular (CHC), se han propuesto terapias dirigidas usando nanovectores glicoconjugados (Lee et al., 2017). Que puedan interactuar con el receptor de Ashwell-Morell de los hepatocitos y permitan transportar sustancias con propiedades farmacológicas. En este sentido los compuestos de origen natural con propiedades citotóxicas, como el carvacrol presente en el aceite esencial del orégano (AEO), pueden tener gran potencial como agentes terapéuticos. Así que, una síntesis verde de estos nanovectores debe incluir: la obtención del material glicoconjugado y la nanoencapsulación del agente terapéutico de origen natural.

2. ANTECEDENTES

2.1 Nanotecnología

La nanotecnología (deriva del griego *nanno*, que significa enano o pequeño), surgió a finales de la década de los 70's, representando un nuevo campo de investigación el cual se enfoca en estudiar el comportamiento de la materia a una escala nanométrica (10^{-9}). Se sabe que dicha materia adopta distintas propiedades a las convencionales del material macroscópico, para poder explicar dichos comportamientos se debieron aplicar las leyes de la mecánica cuántica haciendo de lado la física clásica (Mendoza y Rodríguez 2007). Lo cual ha permitido manipular la materia a escala molecular, atómica y sub-atómica. Esto conlleva a beneficios importantes dentro la ciencia (Mejías et al., 2009).

La fabricación de diversos nano-materiales como: nanosensores, sistemas fotovoltaicos, embalajes inteligentes de alimentos, revestimientos de piezas metálicas, cosméticos, prótesis, nanocápsulas de fármacos, uso en diagnóstico por imagenología, entre otros, representan un gran avance en el aprovechamiento de las propiedades de los materiales a escala nanométrica (Roco, 2006). Con base en los últimos ejemplos, el área de la medicina y la farmacéutica son los sectores con mayor potencial de crecimiento (Moncada, 2007), surgiendo nuevas ramas de estudio de la nanotecnología.

2.2 Nanomedicina

La nanomedicina es conocida como la aplicación de nanocompuestos en el área médica, la cual es reconocida como una de las principales promesas para el combate de diversas patologías (Pimentel et al., 2007). El principal objetivo es vigilar, controlar, construir, reparar y proteger los sistemas biológicos; mediante una intervención a escala molecular para beneficio de la salud de las personas (Boisseau and Loubaton 2011).

Se han publicado diversas investigaciones donde se utiliza la nanotecnología, en la generación de distintos materiales como nanopartículas, nanocápsulas, biopelículas nanoestructuradas, nanotubos, entre otros. Los cuales, se han potencializado para su uso en el diagnóstico,

tratamiento, monitoreo y control de distintas enfermedades que afectan el organismo (Pimentel et al., 2007).

De manera más específica, la nanomedicina se ha enfocado en desarrollar posibles curas de enfermedades con alta tasa de mortalidad, como el cáncer que ha sido un objetivo primordial para esta nanociencia. Se han desarrollado distintos tipos de nanomateriales que ayudan al combate de este padecimiento, las nanopartículas metálicas con propiedades magnéticas utilizadas para el transporte de sustancias activas a un sitio de interés. Asimismo, la bioacumulación de dichas nanopartículas en los vasos sanguíneos que rodean un tumor interrumpiendo el flujo sanguíneo y aislandolo, restringiendo el ingreso de nutrientes y causando la muerte celular (Prijic y Sersa, 2011). De igual manera, se encuentran los nanoliposomas transportadores de fármaco, que fueron los primeros en ser aprobados para su uso en humanos (Lollo et al., 2011).

2.3 Nanofarmacéutica

La nanofarmacéutica se define como la aplicación de nanomateriales en el área de la farmacéutica, interviniendo en el desarrollo de transporte y entrega de fármacos en sitios de interés. Asimismo, abre la posibilidad de nuevos nanomateriales con la capacidad de interactuar con el sistema a una escala molecular, (Villafuerte et al., 2009). La nanomedicina en conjunto con nanofarmacéutica tienen como objetivo desarrollar nuevos dispositivos y nanomateriales con la finalidad de lograr un beneficio para la salud (Quirino-Barreda, 2014).

El objetivo principal de la nanofarmacéutica es el desarrollo de sistemas biomoleculares con funciones únicas, como reconocimiento de células cancerígenas, administración de fármaco en un tejido específico, que brinde información acerca del avance de la terapia y que logre integrarse a un sistema o tejido vivo. Además, se busca que estos nanosistemas sean eficientes, económicos para una producción en masa, que se puedan controlar y trabajar con el mínimo riesgo para el paciente (Villafuerte, 2009). La nanotecnología representa un gran potencial de aplicación en el área clínica, debido a su comportamiento en la escala molecular y a la naturaleza en la que interactúan los sistemas biológicos.

2.3.1 Encapsulación y Transporte de Sustancias con Potencial Farmacológico

Las sustancias activas son aquellas sustancias de origen natural (vegetal, animal o mineral), semi-sintéticas o sintéticas que tienen la capacidad de interactuar con sistemas vivos, modificando un proceso o respuesta biológica y produciendo un efecto farmacológico (Chéry et al., 2013). La actividad de éstas, depende de diversos factores como el medio fisiológico en el que se encuentran, la vía de administración, las barreras fisiológicas a traspasar, las propiedades fisicoquímicas propias del compuesto y su especificidad (Santa y López, 2013).

Específicamente en la encapsulación y transporte de sustancias activas como fármacos, hormonas, vitaminas, probióticos, entre otros. El uso de sistemas de transporte que permitan acarrear a dichas sustancias, y sean entregadas de forma pasiva (biodistribución sistémica inespecífica) o de forma activa (biodistribución orientada a un sitio diana), pueden representar grandes ventajas comparado con la vía de administración libre (Bertrand, 2014). En este sentido, un vector con capacidad de concentrar dichos compuestos en el lugar requerido y en la forma adecuada será de gran relevancia en el tratamiento de patologías.

Se han desarrollado nanosistemas complejos para el transporte de distintos principios activos. Entre ellos se encuentran, las nanopartículas poliméricas núcleo-coraza que constan de tres componentes (figura 1): en el centro se tiene encapsulado un fármaco o sustancia de interés en un núcleo polimérico y/o metálico, afín a dichos compuestos, seguido de una coraza exterior, la cual puede cumplir dos funciones. La primera es brindar estabilidad a la partícula y la otra es otorgarle un direccionamiento mediante diversos ligandos que pueden ser reconocidos por los receptores de las células tumorales (Henriques, 2015).

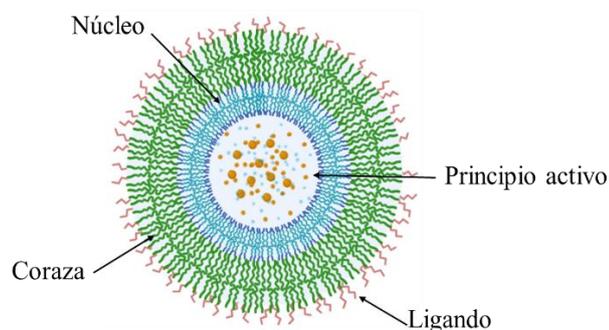


Figura 1. Nanopartícula núcleo/coraza.

Las ventajas que se obtienen al utilizar nanovectores, es que facilitan el transporte de sustancias activas; su tamaño les permite atravesar las barreras fisiológicas y tener mejor biodistribución, evitando la degradación de la sustancia activa y el reconocimiento por el sistema inmune. Además la absorción en las células resulta fácil y permite entregar dichos compuestos en la zona de interés (Garnett y Kallinteri, 2006; Limbach et al., 2007).

Es importante señalar que la distribución de los vectores en un organismo es en gran medida influenciada por su tamaño. Sin embargo, son muy importantes las propiedades químicas y físicas del material que forma al vector, por ejemplo, la adhesividad, carga superficial, capacidad de deformación, entre otros (Irache, 2008).

El uso de compuestos que brinden un direccionamiento facilita la entrega y disminuye los efectos secundarios ocasionados a otros órganos o tejidos sanos del cuerpo, por lo que se ha trabajado arduamente en la utilización de ligandos. En la actualidad diversas investigaciones se basan en el diseño de nuevas nanoestructuras conjugadas con carbohidratos, proporcionando habilidades para interactuar con receptores específicos surgiendo una nueva rama de la nanociencia llamada gliconanotecnología (Castañas et al., 2013).

2.4 Gliconanotecnología

La gliconanotecnología interviene en la síntesis de nanoestructuras modificadas superficialmente con carbohidratos. El uso de estas moléculas, les proporciona la capacidad a las nanopartículas de interactuar con un sistema biológico (Sangabathuni et al. 2016). Esta área de la nanotecnología, presenta diversas aplicaciones como biosensores de glicoproteínas, agentes moleculares, entrega selectiva de fármacos, entre otras (Kaur et al., 2016).

Las nanopartículas glicadas son otra importante herramienta que ha contribuido al conocimiento de las interacciones lectina-carbohidrato. Por un lado, permiten compensar la baja afinidad de estos tipos de interacciones con una presentación multivalente de los ligandos (De la fuente y penadés, 2006). A su vez, al tener un tamaño nanométrico, la interacción con las lectinas es más eficaz debido a que permite tener una mejor interacción entre el ligando y receptor. Por otro lado, es posible poder controlar y analizar la síntesis de glicoconjugados, lo cual permitiría diseñar una plataforma de interacción multivalente con una composición homogénea de carbohidratos (Barrientos, et al. 2003).

Las primeras investigaciones, en el área de la gliconanotecnología, se realizaron con

nanopartículas recubiertas con glicanos empleadas por primera vez como bases para el estudio de interacciones de carbohidratos (Eissa et al., 2016). Durante la última década, se ha reportado que las nanopartículas funcionalizadas con carbohidratos en sus superficies presentan propiedades antibacterianas contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y micobacterias (Xue et al., 2011). Además, una razón importante para el interés especial en estos materiales son sus potenciales aplicaciones como agentes o vectores terapéuticos.

2.4.1 Glicoconjugados y Glicoproteínas

Los glicoconjugados se definen como carbohidratos enlazados covalentemente a una proteína, lípidos o péptidos. La unión de estas moléculas le confiere a la proteína o lípido un direccionamiento específico, que permite que sean biorreconocidas por receptores celulares, para su interacción e internalización en la célula (Sangabathuni et al., 2016).

Las glicoproteínas se generan durante el proceso de síntesis glicosilación enzimática de proteínas dentro de las células (Berg et al., 2007). En el laboratorio, es posible generar neoglicoproteínas por medio del proceso de glicación, que consiste en la unión de un carbihidrato a otra molécula (proteína, lípidos, biopolímeros) mediante síntesis química no enzimática.

El proceso de glicación depende del tipo de carbohidrato, la temperatura de reacción, el pH y las características propias de las proteínas (Zhang et al., 2008). La reacción de glicación o reacción de Maillard, resulta interesante en el área de la glicobiología, debido a que es un proceso de bajo costo, pero es poco controlado (Fenaille et al., 2004). A consecuencia de que los gliconjugados se demandan como poderosas herramientas en la bioquímica, biotecnología o la misma nanotecnología, se han estudiado diversos procesos para generar neoglicanos.

Existen otros métodos de glicación no enzimáticos, donde se utilizan compuestos químicos como agentes reductores o activadores de grupos carboxilos. El cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN) es un agente reductor suave, utilizado para glicar proteínas, en una reacción de una sola etapa (Hermanson, 2013). Sin embargo, los subproductos indirectamente obtenidos, pueden llegar a ser sumamente tóxicos y peligrosos para los seres vivos, debido al ion cianuro que posee el compuesto (Guerrero, 2005). Otro caso de glicación química, el uso de agentes activadores de grupos carboxilo, como el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), los cuales son utilizados frecuentemente en conjunto para

incrementar la eficiencia en el acoplamiento entre una amina primaria y un grupo carboxilo. Las glicaciones químicas son sumamente costosas y peligrosas, debido al proceso de obtención de estos reactivos y la alta tasa de generación de subproductos tóxicos que se desprenden de las reacciones para obtener los reactivos y las glicoproteínas (Hermanson, 2013).

2.4.2 Funcionalización de Nanopartículas

La funcionalización de nanopartículas es necesaria en varios casos, entre ellos, se encuentra cumplir la función principal de la partícula, su biorreconocimiento, atravesar diferentes barreras fisiológicas o para la degradación de las partículas después de su vida media. Existen diferentes formas de funcionalización, entre ellas, la agregación de moléculas de baja masa molecular, y el recubrimiento con biopolímeros o lípidos (Paradinas, 2013).

La vectorización de una partícula, hacia un sitio localizado en el organismo puede conseguirse emulando la naturaleza y aprovechando moléculas biológicas que sean reconocidas o que reconozcan a la célula diana. Es decir, cualquier molécula implicada en fenómenos de biorreconocimiento, puede ser usada, incorporándola a la superficie de una nanocápsula, para producir un transportador con orientación o especificidad (Kumar, 2012). En este sentido, un nanovector puede ser modificado con la adición de moléculas como anticuerpos, monosacáridos, vitaminas o péptidos, que le permita dirigir una sustancia deseada hacia un blanco específico. Por ejemplo, ciertos nanovectores funcionalizados con carbohidratos, pueden ser reconocidos por receptores tipo lectina presentes en las células cancerígenas (Kumar, 2012). De esta manera, la función principal del transportador, será distinguir entre las células de un tejido y otro para hacer más eficiente la entrega del compuesto terapéutico y evitar los daños colaterales asociados a los medicamentos.

2.5 Sistema de Liberación Controlada del Fármaco

La forma tradicional de administrar un fármaco es a través de tabletas, comprimidos, soluciones intravenosas o intramusculares. Los medicamentos presentan limitantes en cuanto al control que se tiene sobre la manera y la cantidad de fármaco que llega al lugar necesario. Para asegurar

una concentración adecuada del medicamento, se requiere repetir las dosis, lo que ocasionalmente lleva a variaciones en la concentración del fármaco fuera de la ventana terapéutica, en la figura 2 se observa una comparación entre la administración de fármacos en vía libre y la liberación controlada (Rojas et al., 2016). Asimismo, el fármaco está expuesto a los mecanismos de depuración del propio sistema, a formar complejos con proteínas residentes, a la modificación química o enzimática, acumulación en tejidos sin interés para la terapia, etc. (Santa y López, 2013).

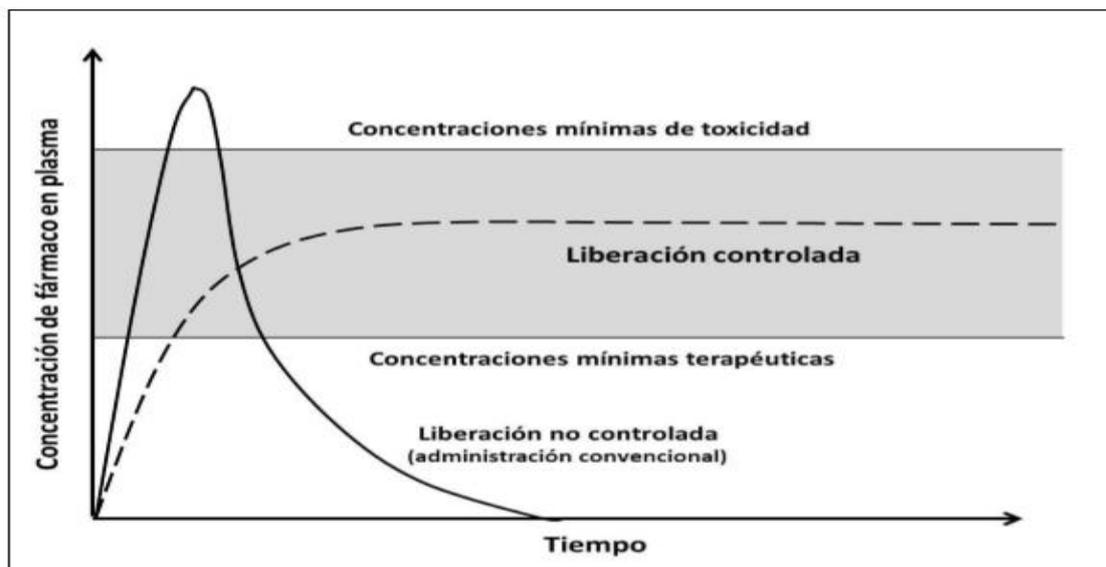


Figura 2. Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra la liberación libre de fármaco (Sarabia-Sainz et al., 2012).

Para lograr un control sobre el transporte y liberación controlada del fármaco, es necesario contar con un vector capaz de encapsular, transportar y entregar el medicamento en el lugar de interés, evitando así daños colaterales en el organismo.

Existe una gran variedad de materiales que pueden ser utilizados como matrices poliméricas para el transporte de fármacos. Los materiales poliméricos se pueden clasificar en sintéticos y naturales. Por ejemplo, polímeros sintéticos como: ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA por sus siglas en inglés), poli- ϵ -caprolactosa (PCL por sus siglas en inglés), celulosas modificadas, poliácridamidas, entre otros. Así como polímeros naturales como: albúmina, gelatina, quitosano, ácido hialurónico y alginatos (Neira-Carrillo et al., 2013).

2.6 Nanotecnología Verde

La química verde fue implementada en los 90's, durante el desarrollo ambientalista moderno, para reducir la contaminación generada por los procesos químicos de las industrias (Afanador y Pimiento, 2007). La química verde propone doce principios, los cuales son fundamentales para la obtención de productos químicos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Doce principios en los que se basa la química verde.

1. Prevenir la generación de residuos	7. Utilizar materia prima renovable
2. Maximizar la economía atómica	8. Evitar la formación de derivados químicos
3. Síntesis menos peligrosa	9. Utilizar catalizadores
4. Diseñar productos menos peligrosos	10. Generar productos biodegradables
5. Uso de disolventes seguros	11. Monitoreo de reacción en tiempo real
6. Realizar síntesis con menor gasto de energía	12. Medidas de seguridad para prevención de accidentes.

Debido a los altos niveles de contaminación generados por el desarrollo de nanomateriales y a la necesidad de regular la síntesis de nanopartículas surgió una nueva área llamada "Nanotecnología Verde". La cual se define como el uso de productos de origen natural para la producción de nanopartículas y se basa en los 12 principios propuestos en la química verde (Castro y Verbel, 2011). La intervención de la síntesis verde en el área de la nanotecnología, brinda la posibilidad de desarrollar nanopartículas a base de biopolímeros, como proteínas, polisacáridos, entre otros.

2.7 Albúmina

La albúmina es una proteína con una masa molecular aproximada de 66 kDa, se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo. Este biopolímero presenta varias ventajas para el

transporte de agentes terapéuticos, ya que es un material fisiológico, biodegradable y de baja alergenicidad. La síntesis de las partículas resulta fácil y reproducible; asimismo, tiene diversos grupos funcionales que permiten la adición de ciertas moléculas de orientación específica. (Fernández 2015).

Las aplicaciones que ha tenido la albúmina son diversas, entre ellas generar nanopartículas transportadoras de fármaco con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Michaelis et al., 2006). De esta manera, se han utilizado en nanopartículas para transporte de fármaco antiviral contra el citomegalovirus para combatir la rinitis (Merodio et al., 2001).

La conjugación de una proteína como la Albúmina Sérica Bovina (BSA) con distintas moléculas como Lactosa o Ácido Lactobiónico, mediante distintos métodos químicos de glicación ha sido ampliamente descrita. El uso de compuestos como el cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN) como agente reductor suave usado comúnmente en aminación reductiva, permite llevar a cabo la glicación de la proteína en una sola etapa, donde estabilizará la interacción de algún grupo amino de la cadena lateral de los aminoácidos lisina o arginina de la BSA y el grupo carbonilo de la glucosa perteneciente a la Lactosa (Hermanson, 2013). Como resultado, una glicoproteína acompaña de subproductos como moléculas de agua, cianuro de hidrógeno y/o borohidruro de sodio (figura 3).

El cianuro de hidrógeno y borohidruro de sodio son tóxicos, y existe una amplia contaminación por su uso en la industria química. Específicamente el cianuro de hidrógeno o ácido cianhídrico se conoce como un líquido incoloro, altamente venenoso y volátil, con un punto de ebullición a los 26°C , se conoce que su ion cianuro afecta a la respiración celular, lo que conlleva a una intoxicación y muy posiblemente a la muerte (Guerrero, 2005).

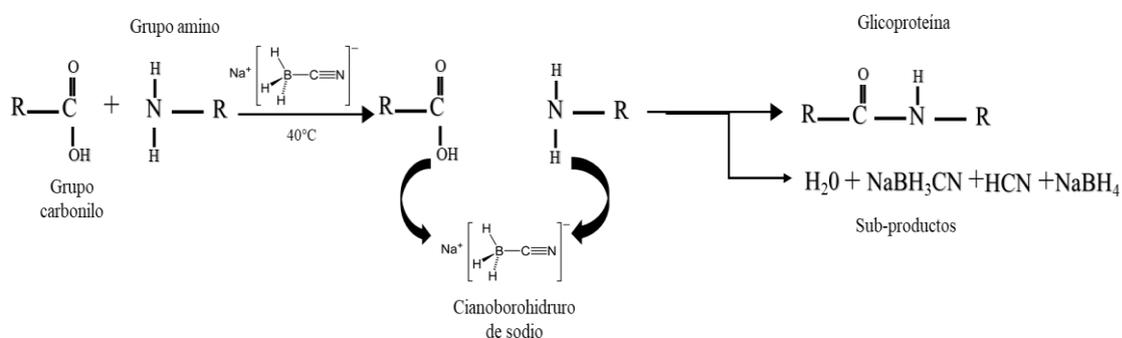


Figura 3. Glicación de BSA con lactosa mediante el uso de un agente reductor (NaBH_3CN).

Otro método de glicación utiliza 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (figura 3). Estos agentes activantes de grupos carboxilos para la unión con aminas primarias. Que son usados frecuentemente en combinación para incrementar la eficiencia en el acoplamiento o para crear productos estables reactivos a aminas (Hermanson, 2013) (figura 4).

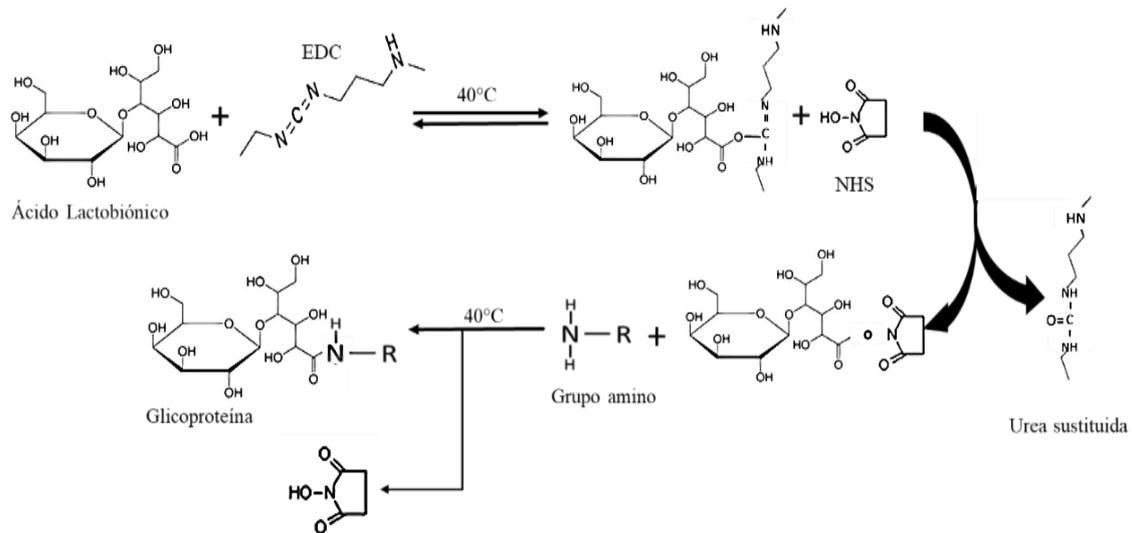


Figura 4. Glicación de BSA con Ácido Lactobiónico mediante el uso de activadores de grupos carboxilos (EDC y NHS).

Los subproductos generados por esta reacción, aunque no son tóxicos, pueden llegar a generar efectos adversos como irritación, daño en las mucosas o alergias. Además de la generación de residuos contaminantes en el medio ambiente.

La reacción de Maillard o glicación no enzimática (figura 5), se da en tres etapas, en la primera etapa se produce la unión covalente entre un grupo amino libre de la proteína y un grupo carbonilo, que procede normalmente de un azúcar reductor. Durante una segunda etapa, se pierde una molécula de agua para generar una “base de Schiff”, que se transforma en la correspondiente glicosilamina N-sustituida, la cual es muy inestable y experimenta un reordenamiento irreversible, denominado reordenamiento de Amadori. Las etapas finales de la reacción de Maillard, engloban una serie de reacciones de ciclación, deshidratación, retroaldolización, reordenamiento, isomerización y condensación de los productos iniciales de

la reacción, que dan lugar a oligómeros y polímeros nitrogenados de alto peso molecular (Friedman, 1996).

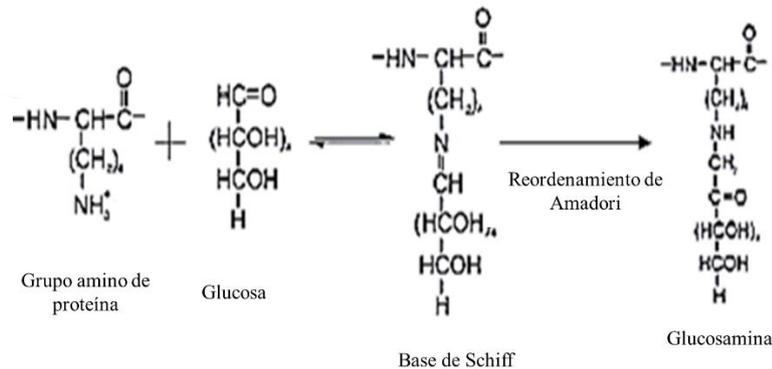


Figura 5. Glicación no enzimática mediante la reacción de Maillard.

Lo beneficioso del uso de esta glicación es su baja o nula toxicidad, bajo costo de producción y es amigable con el medio ambiente. Cumple satisfactoriamente con los principios de la química verde.

La nanotecnología verde comprende no solo el uso de matrices biocompatibles y biodegradables, también el uso de compuestos con acción farmacológica de origen natural, que posean características que permitan su encapsulación, entre ellos, se encuentra el aceite esencial de orégano, el cual cuenta con propiedades anti-cancerígenas.

2.8 Aceite Esencial de Orégano (*Lippia palmeri* S.Wats)

Los componentes naturales encontrados en diversas plantas, han comprobado ser una gran fuente de compuestos con actividad biológica, los cuales son ampliamente utilizados en la medicina popular y en la industria farmacéutica. Más de la mitad de medicamentos antineoplásicos se han desarrollado con dichos componentes, ya que han demostrado tener la capacidad de modular las vías moleculares involucradas con el desarrollo y progresión tumoral, además de activar el proceso de apoptosis en las células cancerígenas. Ejemplo de ello, se encuentra, el taxol también conocido como paclitaxel, que proviene de la planta *Taxus brevifolia*, el cual se utiliza para el tratamiento contra el cáncer de mama, cérvico-uterino, de pulmón, entre otros. Otro caso de ello, es la camptotecina, la cual es usada en el tratamiento de

tumores sólidos, proviene de la corteza y hojas del árbol *Camptotheca acuminata*, cuya actividad biológica radica en la inhibición de la enzima topoisomerasa I, ocasionando la ruptura de la cadena del ADN e iniciando la muerte celular (Cragg y Newman., 2005).

Recientes investigaciones han reportado que algunos aceites esenciales herbales y sus componentes mayoritarios poseen actividad citotóxica en células tumorales. Entre ellos se encuentra el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), conocido por poseer actividad antibacterial, antifúngica, antioxidante y antiinflamatoria, además de ser ampliamente utilizado como condimento para los alimentos (Custodio et al 2011; Teixeira et al 2013).

Lippia palmeri S.Wats (orégano) pertenece a la familia de las verbenáceas, planta de orégano que se encuentra en el desierto de Sonora, Baja California y Sinaloa, en México (Shreve y Wiggin, 1964). Comparte diversos compuestos con el orégano europeo llamado *Origanum vulgare*. El Aceite Esencial de Orégano (AEO) utilizado en esta investigación, fue previamente obtenido y caracterizado por Ortega-Nieblas y colaboradores (2011). Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, lograron identificar y cuantificar 50 componentes. De los cuales los siguientes 10 componentes constituían el 90.4%, p-cimeno (22.3%), timol (21.3%), iso-aromandreno (16.7%), carvacrol (8.8%), γ -terpinene (6.7%), p-timol (5.9%), epóxido de longipino (2.6%), α -eudesmol (2.5%), α -epóxido de bisaboleno (1.3%) y limoneno-6-ol (1.2%). La mayoría de sus componentes son monoterpenos fenólicos a los que se les atribuye propiedades benéficas para el organismo humano, como actividad antioxidante, anticancerígeno, antimicrobiano (Tomás-Barberan, 2003). Los atributos protectores de los compuestos fenólicos se deben a que activan y modulan distintas vías de señalización involucradas en la oncogénesis como el ciclo celular, apoptosis o angiogénesis. Debido a su efecto antimutagénico y anticancerígeno del AEO representa una alternativa para la prevención y/o tratamiento contra el cáncer.

2.8.1 Carvacrol

El carvacrol o 2-metil-5-(1-metiletil) fenol, es un fenol monoterpeno, que cuenta con una estructura química compuesta por un grupo fenólico (figura 6), el cual es altamente hidrofóbico. El carvacrol es conocido como un agente antimicrobiano, con la capacidad de desintegrar la membrana celular de las bacterias Gram negativas (García-García et al., 2008).

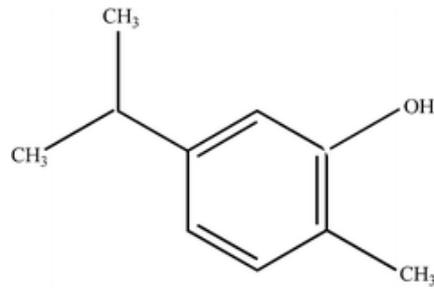


Figura 6. Estructura química del carvacrol (Yin et al., 2012).

Otra propiedad de interés sobre el carvacrol, es su actividad anticancerígenas, se ha reportado el efecto citotóxico que posee sobre distintas líneas celulares, como, células de leucemia mieloide crónica K562, células de melanoma B16 murino, células Hep-G2 de carcinoma hepatocelular, entre otras. Sin embargo, aún no se ha descrito específicamente el mecanismo de acción que posee para llevar a cabo este efecto citotóxico (Yin et al., 2012).

2.9 Carcinoma Hepatocelular: Como Modelo de Estudio

El hígado es el órgano más grande del cuerpo. Algunas de sus funciones más importantes son la síntesis de proteínas sanguíneas, producción de bilis que interviene en la metabolización de las grasas, en la conversión de glucosa a glucógeno, transformación de amoníaco a urea para su excreción, depuración de fármacos y otras sustancias tóxicas en la sangre. Es por esto que se le considera un órgano vital (Finn, 2001).

Desafortunadamente este órgano también es víctima de diversos padecimientos, que van desde infecciones virales como son la hepatitis A, B y C; cirrosis hepática, hígado graso, padecimientos congénitos como enfermedad de Wilson o cáncer hepático, siendo el último uno de los más agresivos (Segovia, 1968).

El cáncer de hígado o carcinoma hepatocelular (CHC) es la neoplasia maligna primaria más frecuente del hígado, y en algunos países su incidencia ha incrementado rápidamente en las últimas décadas (Bustíos et al., 2009). El CHC cuenta con un pronóstico de sobrevivencia muy bajo, de aproximadamente de 6 a 9 meses en tumores tempranos y en casos avanzados de solo 1 a 2 meses (Jemal et al., 2011).

2.9.1 Características del Carcinoma Hepatocelular

La distribución mundial de este padecimiento es heterogénea, y se encuentra estrechamente relacionada con factores de riesgo como infecciones hepáticas, obesidad y alcoholismo. El desarrollo de este cáncer está asociado con enfermedades crónicas del hígado, la más común es la cirrosis hepática, aunque también se relaciona con hepatitis C, hígado graso y predisposición genética (Fattovich et al., 2004).

Los síntomas que se presentan en CHC suelen ser inflamación constante del hígado, pérdida de peso, dolor abdominal, además de manifestaciones extra-hepáticas como hipoglucemia, hipercalcemia, hipercolesterinemia e hipertensión arterial (Trevisani et al., 1996).

Los tratamientos que se utilizan comúnmente se caracterizan por causar una disminución en la proliferación del tumor y en algunos casos atacan los síntomas. Por ejemplo, la terapia ablativa, radioterapia y la quimioterapia (Mokdad et al., 2016). Desafortunadamente suelen ser agresivos para el paciente, ocasionando efectos secundarios severos, como es el caso de la quimioterapia, que frecuentemente daña el tejido sano y puede llegar a afectar gravemente al tejido cardíaco.

2.9.2 Receptor de Ashwell-Morell

El receptor de Ashwell-Morell (AMR) se encuentra en las células hepáticas, y fue uno de los primeros en ser aislado e identificado, además de ser la primera lectina detectada en mamíferos. Pertenece a la familia de lectinas tipo C y reconoce específicamente a la galactosa. Es también conocido como receptor de asialoglicoproteínas (ASGPR) debido a que ésta implicado en el reconocimiento y eliminación de glicoproteínas con residuos de galactosa expuestos (Grewal 2010).

La exposición de galactosas en glicoproteínas es indicativa del fin de su vida media, por esto el receptor las retira del torrente sanguíneo. Así, el complejo formado (AMR-glicoproteína) es endocitado por la célula hepática para degradar a la proteína por acción de los lisosomas. Se estima que el AMR se encuentra con una densidad de 500 000 moléculas por hepatocito y además su expresión persiste en el CHC (Han, 1999).

Por lo tanto, este trabajo propone, el estudio de la síntesis verde aplicada al desarrollo de nanovectores con base proteica, funcionalizados con ligandos dirigidos al receptor de Ashwell-

Morell, con la finalidad de desarrollar una terapia con direccionamiento específico para la entrega selectiva de los compuestos antiproliferativos del AEO hacia las células cancerígenas del hígado, presentando menor daño colateral al paciente y que su síntesis sea amigable con el medio ambiente.

3. HIPÓTESIS

Los compuestos antiproliferativos del aceite esencial de orégano (*Lippia palmeri* S.Wats) pueden ser encapsulados y transportados por nanovectores de albúmina lactosilada obtenida por síntesis verde, para una posible aplicación como nanoterapia contra el carcinoma hepatocelular.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo General

Obtener albúmina glicada por diversos métodos, incluida la síntesis verde, para usarla en el desarrollo de nanovehículos que encapsulen y transporten los compuestos antiproliferativos presentes en el aceite esencial de Orégano (*Lippia palmeri* S.Wats).

4.2. Objetivos Específicos

- 1) Producir albúmina glicada (BSA-Lac) por medio de síntesis verde y glicación química y determinar la vía de reacción con mayor grado de glicación y bioreconocimiento, mediante caracterización fisicoquímica y por lectino ensayos.
- 2) Sintetizar y caracterizar nanovectores con núcleo de BSA para promover la encapsulación del AEO y recubrirlos con una coraza de BSA-Lac para otorgarles un direccionamiento.
- 3) Determinar citotoxicidad del AEO en la línea celular Hep G2 perteneciente al carcinoma hepatocelular.
- 4) Encapsular los compuestos antiproliferativos del AEO, realizar la caracterización físico-química de las nanopartículas y la cinética de liberación de los componentes.
- 5) Determinar la exposición de las galactosas en las nanopartículas mediante el uso de la lectina de *Ricinus communis*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos	Peso molecular	% Pureza		Seguridad
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	66 kDa	96	Sigma	Sin riesgos
Lactosa	342.30 g/mol	98	Sigma	Sin riesgos
Ácido Lactobiónico	358.30 g/mol	97	Sigma	Sin riesgo
Cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN)	62.84 g/mol	95	Sigma	
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimina clorhidrato (EDC)	191.70 g/mol	97	Sigma	
N- hidroxisuccinimida (NHS)	115.09 g/mol	97	Sigma	Sin riesgos

5.1 Síntesis del Glicoconjugado BSA-Gal.

Se usó albúmina sérica bovina (BSA) la cual fue modificada mediante los métodos de glicación descritos por (Anguiano-Lizárraga, 2017). En la Cuadro 2 se describen las condiciones de glicación, todas las muestras se aislaron de posibles contaminantes mediante una columna PD10 (14.5 × 50 mm) (GE Healthcare, UK). Posteriormente se congelaron y liofilizaron para realizar su caracterización.

Cuadro 2. Condiciones de glicación de BSA.

Identificación de la Muestra	BSA (mg)	Lactosa (mg)	Ác. Lactobiónico (mg)	EDC*/NHS** (mg)	NaBH ₃ C N (mg)	Temperatura (°C)	Incubación (horas)	Buffer
Bsa-Lac NaBH ₃ CN	20	400	--	--	162	40	120	PBS
BSA-Ác. Lacto.	20	--	400	155/115	--	40	120	MES
BSA- Lac Δ	100	100	--	--	--	100	0.5	Agua

EDC: 1-etil-3-(3- dimetilaminopropil) carbodimina clorhidrato. NHS: N- hidroxisuccinimida
NaBH₃CN: Cianoborohidruro de sodio.

5.2 Caracterización de la BSA Glicada.

5.2.1 Electroforesis SDS-PAGE

La masa molecular de la albúmina modificada con lactosa BSA-Lac y BSA- Ác. Lacto, se analizó mediante electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras usando geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) de acuerdo a (Laemmli, 1970). Los pozos del gel fueron cargados con 10 µg de proteína y fue teñido con azul de Coomassie después de la separación. La masa molecular relativa de la proteína se calculó por la comparación con los marcadores de peso molecular. En este experimento la albúmina sin modificar se utilizó como control.

5.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Acoplada a Espectrometría de Masas

Otra técnica utilizada para la determinación de la masa molecular de una proteína es la espectrometría de masas, la cual es una potente técnica instrumental de análisis, de alta sensibilidad, que se basa en una ionización de las moléculas y la separación de los iones que se producen según su relación masa/carga (m/z), lo cual, permite determinar la masa molecular de una proteína y las moléculas añadidas a ésta, como es el caso de la unión entre una proteína y un carbohidrato. El análisis de la albúmina glicada intacta se realizó mediante, cromatografía líquida de ultra alta resolución utilizando el sistema LC infinity 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con una columna analítica ZORBAX. 300SB-C8 ($5\ \mu\text{m} \times 2.1\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), acoplado a un espectro de masas Agilent 6530 conformado por una fuente de ionización Dual AJS ESI (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), y un analizador de masas en tándem cuadrupolo-tiempo vuelo Q-TOF (por sus siglas en inglés) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

Para el análisis de BSA y BSA glicada intacta, las fases móviles fueron 0.1% de ácido fórmico acuoso (FA) (fase A) y 0.1% de ácido fórmico en acetronitrilo (fase B), La columna fue equilibrada con la fase inicial del gradiente (20% de la fase B) a un flujo de $400\ \mu\text{l}/\text{min}$. El gradiente utilizado fue de 0 a 4 min, de 20 a 60%B; de 4 a 7 min, de 60 a 90% de B; de 7 a 9 min, 90%B, de 9 a 10 min, de 90 a 20%B. El tiempo total de corrida fue de 10 min, con tiempos de equilibrio de columna, post-corrída de 3 min. Se inyectaron $1\ \mu\text{l}$ de las muestras de BSA control y BSA glicadas con una concentración $1\ \text{mg}/\text{ml}$, previamente filtradas y solubilizadas en ácido fórmico al 0.1%. Los parámetros utilizados en el espectrómetro de masas fueron los siguientes: Modo de adquisición MS en polaridad del ión positiva en un rango de masa/carga de 300-3,200 m/z a una velocidad de escaneo de 1espectro/segundo y el voltaje del capilar de 4500 V. Los espectros obtenidos de las proteínas intactas fueron analizados por el software Agilent Mass Hunter BioConfirm B.08.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.)

5.2.3 Espectroscopia Infrarroja FT-IR

Los grupos funcionales presentes en la albúmina glicada se determinaron mediante el método de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) (Güler et al., 2016). Los

espectros fueron obtenidos con un módulo UATR (Spectrum Two, Perkin Elmer, USA) a una resolución de 4 cm⁻¹ en intervalos de 500-4000 cm⁻¹.

5.2.4 Ensayos de Biorreconocimiento de la BSA Modificada con RCA

La lectina de *Ricinus Communis Agglutinin I* (RCA) es una lectina usada para determinar la presencia de galactosas en diferentes tipos de muestras. En este trabajo, la BSA sometida a glicación fue analizada con RCA mediante ensayos tipo ELISA o también conocidos como ensayos con lectinas ligadas a enzimas (ELLAs, por sus siglas en inglés). Los ELLAs se efectuaron siguiendo el procedimiento descrito por Sarabia-Sainz et al., (2011), con ligeras modificaciones. La BSA sometida a glicación (20 µg/100 µL) fue inmovilizada en placas de ELISA en una solución amortiguadora de carbonato (50 mM) con pH 9.5. Se incubó la placa a 4°C durante la noche. Las interacciones inespecíficas se bloquearon durante 1 h con PBS conteniendo BSA al 1.5%. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% (TPBS). Posteriormente se incubó durante 2 h con 100 µL de solución de RCA biotilizada (5 µg/ml). Nuevamente se realizaron 3 lavados, seguidos de la incubación con avidina-peroxidasa (1:1000) (ExtrAvidin[®]-Peroxidase, Sigma) durante 40 min. Finalmente se evidenció la interacción biológica usando como sustrato diclorhidrato de *o*- fenilendiamina (OPD, SigmaFast) leyendo las placas en un lector de ELISA a 450 nm. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA de una vía con una P (<0.05) mediante un análisis de comparación de medias de Tukey- Kramer, en el paquete estadístico NCSS 2019.

5.3 Determinación de Citotoxicidad del Aceite Esencial de Orégano (*Lippia palmeri* S.Wats)

5.3.1 Cultivo de Células y Citotoxicidad.

La línea celular Hep G2 (proveniente de carcinoma hepatocelular) fue cultivada en suero DMEM suplementado al 10 % con suero fetal bovino a 37° C con una concentración de 5% de CO₂, posteriormente se colocó una concentración de 5x10⁴ en placa ELISA (96 pozos). Para ser expuestas al AEO a diferentes dosis (0.03, 0.06, 0.125, 0.25 y 0.5 mg. Las células fueron incubadas durante 24 h, pasado el tiempo de exposición, /mL) se retiró el tratamiento y se

añadió 200 μ l de bromuro de 3- (4-5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a una concentración de 5 mg/mL durante 2 h, para finalmente disolver los cristales formados con 200 μ L DMSO. La viabilidad celular fue determinada por la intensidad del color púrpura de MTT el cual fue analizado en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570nm (Mosmann, 1983).

5.4 Síntesis de Nanopartículas y Encapsulación del Aceite Esencial de Orégano/carvacrol.

5.4.1 Síntesis de Nanopartículas Núcleo/Coraza

Las nanopartículas de albúmina fueron preparadas por el método descrito por Maryam y colaboradores en 2015, con ligeras modificaciones. Se colocaron 10 mg de BSA proveniente de los tratamientos de glicación, la cual fue disuelta en 1 ml de agua desionizada, se añadió 5% v/v de tween 80, y se agitó durante 30 minutos. La desolvatación de la BSA y por lo tanto, la formación de las nanopartículas fue promovida por la adición de etanol gota a gota, añadiendo un total de 3 ml, al cual se le agregó previamente 1 μ L de AEO/carvacrol, la reacción se mantuvo en agitación constante. Posteriormente se añadieron 5 μ L de glutaraldehído (entrecruzante) al 8% para dar estabilidad a las nanopartículas formadas. La mezcla se dejó en agitación constante durante 5 horas. Posteriormente, para la formación de la coraza se agregó 1mg de BSA-Lac dejándose en agitación durante 30 minutos; pasado el tiempo se agregó 1 μ L de glutaraldehído al 25%. Se recuperaron las nanopartículas mediante centrifugación y se lavaron con agua desionizada. Después de su recuperación se realizó la caracterización.

5.4.2 Determinación de Tamaño y Potencial Z de las Nanopartículas

Después de haber obtenido las nanopartículas, éstas fueron suspendidas en agua Milli-Q para su caracterización física. El tamaño de nanopartícula se determinó mediante dispersión dinámica de la luz (por sus siglas en inglés: DLS) dicho método, es una técnica físico-química empleada para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensión (Foord et al., 1970). Esta técnica se basa en hacer pasar la luz del láser a través de la muestra, la cual será

dispersada en todas las direcciones, la intensidad y el ángulo de la dispersión de la luz depende del tamaño de partícula. Después de determinar el tamaño de la partícula, se realizó la determinación del Potencial Z, técnica basada en la medición del diferencial del potencial electrostático que se encuentra entre la capa iónica stern layer y la capa iónica difusa de una partícula. Según la escala del potencial electrostático, una partícula con potencial Z mayor a ± 30 se considera estable en un sistema coloidal. Dichas técnicas fueron analizadas mediante el equipo Zetasizer nano ZS90 (Marvern, Reino Unido).

5.4.3 Microscopia de Fuerza Atómica

Las distintas nanopartículas recuperadas fueron fijadas en un portaobjeto a distinta concentración para su análisis mediante microscopias de fuerza atómica (AFM) técnica utilizada para conseguir una imagen tridimensional, dicha imagen se obtiene mediante interacciones de fuerzas de Van de Waals que se dan entre la punta del instrumento y la superficie de la muestra (Poole y Owens, 2007).

5.4.4 Extracción de AEO/Carvacrol de las Nanopartículas

Para la extracción de los compuestos encapsulados en las nanopartículas, se les añadió 1 ml de etanol en 5 mg de nanopartículas y se incubaron 24 horas en agitación constante. Las muestras fueron centrifugadas y se recuperó el sobrenadante. Dicho sobrenadante se colocó en una placa de 96 pocillos, por triplicado, se leyó absorbancia a 275 nm. Se realizó una curva estándar de carvacrol desde 10 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (figura 7), y se determinó la concentración de carvacrol presente en las nanopartículas (Maryam et al., 2015).

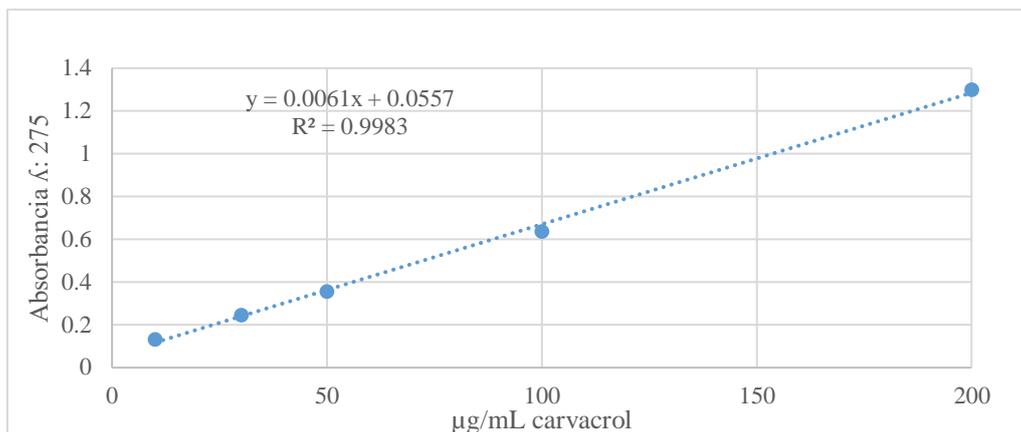


Figura 7. Curva estándar de carvacrol para la determinación de la concentración de componentes mayoritarios del AEO en las nanopartículas.

5.4.5 Cinética de Liberación de Compuestos Anticancerígenos

Se realizó una cinética de liberación de los compuestos encapsulados en las nanopartículas, para determinar el tiempo en que los compuestos serían liberados. Se preparó una concentración de 5 mg de NPs BSA/BSA-Lac/AEO y NPs BSA/BSA-Lac/carvacrol, a las cuales se les añadió 2 ml de PBS a pH 7.2, incubaron a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas para su medición a 275 nm en espectrofotómetro, las lecturas se realizaron a 1, 3, 6 y 12 horas de incubación.

Mediante la ecuación del modelo dependiente o de primer orden se utiliza para describir la absorción y la liberación de algunos fármacos desde matrices porosas. La liberación de los fármacos que siguen esta cinética se establece que:

$$\text{Log } C_t = \text{Log } C_0 - \frac{K_1}{2.303} t \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde C_t es la cantidad de fármaco remanente al tiempo t , C_0 es la cantidad inicial de fármaco en la solución y k_1 es la constante de liberación de primer orden. A medida que el fármaco es liberado del material poroso, la concentración del medio de disolución se va enriqueciendo con

el soluto, por lo que el proceso de liberación es condicionado por el punto de saturación del soluto (Guzmán et al., 2013).

5.4.6 Ensayos de Biorreconocimiento de la NPs BSA/BSA-Lac con *Ricinus Communis* Agglutinin I (RCA)

Basándonos en los ensayos de biorreconocimiento realizados a la BSA glicada, para determinar la presencia de galactosas, se realizó una metodología similar con las nanopartículas. Se inmovilizó 5 µg/mL de nanopartículas en placas de ELISA en una solución amortiguadora de carbonato (50 mM) con pH 9.5. Se dejó incubando la placa a 4°C durante la noche. Las interacciones inespecíficas se bloquearon durante 1 h con PBS conteniendo BSA al 1.5%. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% (TPBS). Posteriormente se incubó durante 2 h con 100 µl de solución de RCA biotilada (5 µg/ml). Nuevamente se realizaron 3 lavados, seguidos de la incubación con avidina-peroxidasa (1:1000) (ExtrAvidin®-Peroxidase, Sigma) durante 40 min. Finalmente se evidenció la interacción biológica usando como sustrato diclorhidrato de *o*-fenilendiamina (OPD, SigmaFast), leyendo las placas en un lector de ELISA a 450 nm. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA de una vía con una P (<0.05) mediante un análisis de comparación de medias de Tukey- Kramer, en el paquete estadístico NCSS 2019.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las glicoproteínas obtenidas por los distintos métodos glicación, fueron purificadas en columnas de PD10 y posteriormente liofilizadas, descrito previamente en la sección de Materiales y Métodos. Dichos procesos se llevaron a cabo para poder realizar una caracterización físico-química de las glicoproteínas.

6.1 Caracterización de los Glicoconjugados de BSA-Gal

6.1.1 Electroforesis SDS-PAGE

La conjugación de la albúmina con otras moléculas, como disacáridos o moléculas más complejas como el ácido lactobiónico, tendrá como consecuencia un incremento en la masa molecular de la proteína. Una de las técnicas mayormente utilizada para estimar este cambio es la electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras SDS-PAGE, así mismo determinar de manera indirecta el grado de glicación de la BSA. En la figura 8 se pueden observar los productos de las glicaciones de la BSA. Al comparar los patrones de migración de las proteínas sometidas a los distintos tratamientos y la BSA sin modificar, se presentó un incremento de la masa molecular de la BSA, en los tratamientos donde se adiciona lactosa, ya sea en presencia del Cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN) o mediante síntesis verde. Se estimó un incremento de 13 kDa para glicación de BSA-Lac con NaBH_3CN y de 9 kDa para la BSA-Lac Δ . Las cuales se observan en la figura 8 en los carriles D y C respectivamente. Al contrario, con el método de glicación con ácido lactobiónico se observó una banda tenue sin cambio significativo en la masa molecular de la proteína, esto se puede deber a una baja conjugación de moléculas de ácido lactobiónico con la BSA, o bien la formación inespecífica de aglomerados de la BSA, que se formaron durante la glicación, debido a que el EDC y la NHS pueden actuar sobre los grupos carboxilos de la BSA, causando una unión con los grupos aminos de la proteína, impidiendo la entrada al gel de electroforesis y quedando en la parte superior de este. En trabajos previos se ha reportado que, en condiciones anhidras, la reacción con EDC/NHS y ácido lactobiónico tienen un mayor rendimiento de conjugación con la

proteína (Hermanson, 2013).

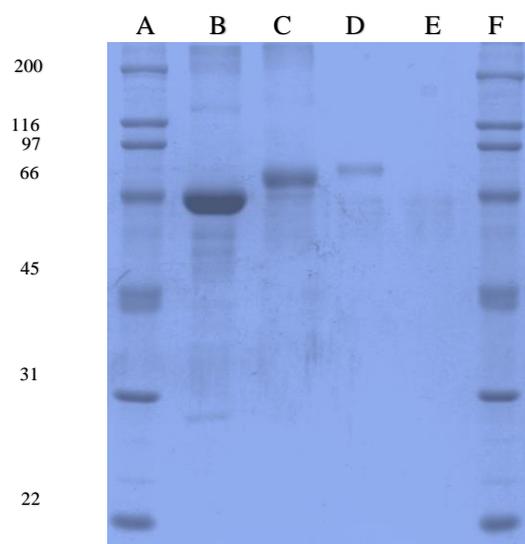


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE al 10 %, se aplicaron 10 ug de proteína por muestra. Carril A y F son estándares de masa molecular; Carril B BSA sin tratar; Carril C, BSA-Lac Δ; Carril D, BSA-Lac NaBH₃CN; Carril E, BSA-Ac.Lacto.

La migración electroforética de los productos obtenidos en la modificación de la BSA, fueron comparadas con la BSA sin tratar. Los resultados obtenidos de la BSA-Lac Δ concuerdan con lo reportado previamente por Sarabia-Sainz en 2011 y con lo obtenido mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas.

6.1.2 Análisis por HPLC Acoplado a Espectrometría de Masas.

Una de las técnicas mayormente utilizada para determinar la masa molecular de las proteínas, es la espectrometría de masas, por su alta exactitud y sensibilidad, la cual, permite realizar una ionización de las moléculas y separa estos iones mediante su relación masa-carga (m/z) (Abián et al., 2008). Se observó un incremento en la masa molecular de la proteína, en todas las glicaciones respecto a la BSA control. En la Cuadro 3, se muestra que el peso molecular de las glicoproteínas obtenidas. Los neoglicanos obtenidos por la unión química entre BSA y la lactosa, mediante síntesis verde y en presencia del cianoborohidruro de sodio (BSA-Lac Δ y BSA-Lac NaBH₃CN) presentaron una masa molecular similar, dentro del intervalo de los 67-

85 kDa. Donde en ambas unidades de lactosas unidas a la BSA se encontraron entre 3-59 y de 2-59. Sin embargo, la población más abundante en cada caso fue de 85 kDa, con solo una diferencia de rendimiento de dos unidades de lactosa unidas a la BSA. En el caso de la BSA-Ác. Lacto la masa molecular fue de masa molecular de 67-86 kDa y las unidades de ácido lactobiónico de 2-59, teniendo una población más abundante con un peso de 80 kDa con un máximo de 41 unidades de ácido lactobiónico. Todas las muestras glicadas por las diferentes vías, mostraron un incremento en el peso molecular con respecto a la BSA sin glicar (66 kDa). Los datos obtenidos con el tratamiento de BSA-Lac Δ , indicaron un rendimiento mayor (una mayor glicación) al previamente reportado por Sarabia-Sanz en 2012, que mediante el método MALDI-TOF presentó la adición de 47 moléculas de lactosa conjugadas a BSA.

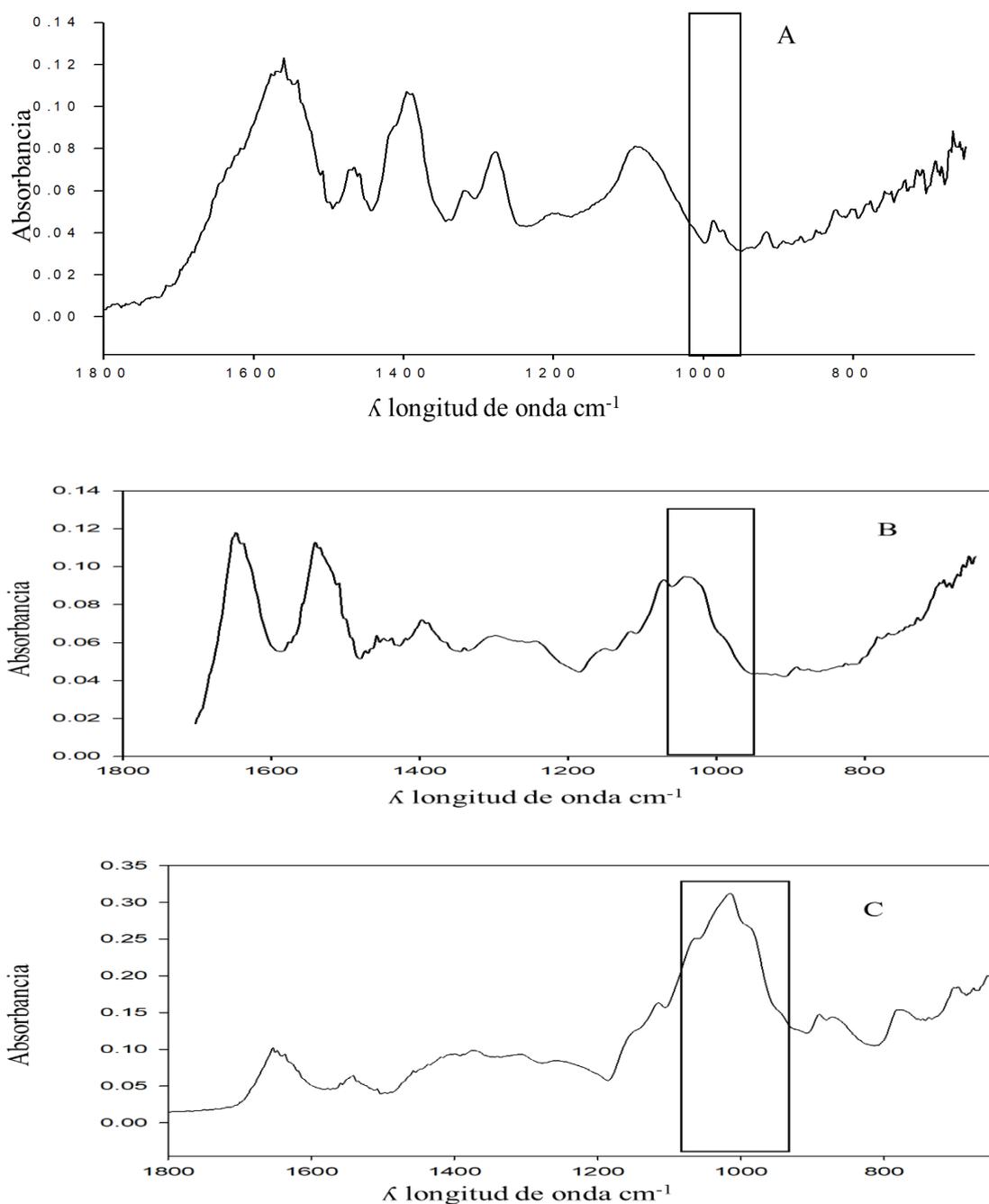
Cuadro 3. Determinación de masa molecular de la BSA control y BSA sometida a tratamientos de glicación.

<i>Muestra</i>	<i>BSA Control</i>	<i>BSA-Lac Δ</i>	<i>BSA-Lac NaBH₃CN</i>	<i>BSA- Ác. Lactobiónico</i>
Masa molecular (intervalo)	66,502.74	67,518.30 – 85,778.27	67,082.20 – 85,566.53	67,101.74 – 86,633.74
Lactosas unidas	--	3 - 59	2 - 59	--
Ácido lactobiónico unido	--	--	--	2 - 59
Masa molecular más abundante	66,502.74	85572.3533	84970.5843	80444.4847
Unidades de lactosa	--	59	57	--
Unidades de ácido lactobiónico	--	--	--	41

6.1.3 Análisis por FT-IR

Otra herramienta útil para determinar la presencia de carbohidratos en la molécula de BSA es la espectroscopia de infrarrojo. El análisis por FT-IR es ampliamente usado para determinar

enlaces moleculares representativos de un compuesto. En la figura 10 se muestran los espectros FT-IR de la BSA control (A) y la BSA sometida a la modificación con carbohidratos (B, C y D). Se ha reportado que los carbohidratos presentan una banda característica a 900-1199 cm^{-1} (Leopold et al., 2011). Como se puede observar en la figura 10, todos los tratamientos presentaron en su espectro FT-IR, un cambio evidente, respecto a la proteína sin modificar, la región conocida como huella molecular de los carbohidratos y que es atribuido a los enlaces C-O (Cortez, 2017).



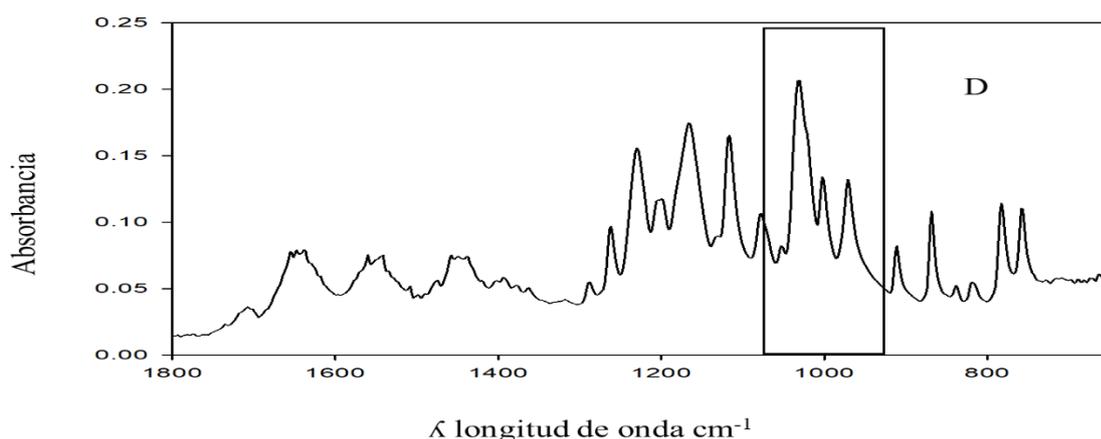


Figura 9. FT-IR. Comparación del espectro FT-IR de los diferentes productos obtenidos en las reacciones de adición de carbohidratos. BSA-Lac Δ (B), BSA-Lac NaBH₃CN (C) y BSA-Ác. Lacto. (D) se observó la huella dactilar para los carbohidratos la cual se encuentra en la región de 900-1199cm⁻¹ indica la huella dactilar para los carbohidratos. La BSA (A) se usó como control negativo.

En el caso de la BSA-Ác.Lacto (D) se observa un número mayor de bandas que van desde la región de los 600 - 1300 cm⁻¹, en esta región se encuentran los enlaces C-C, C-O, C=C, C=O (Cortez, 2017). Estos tipos de grupos funcionales pertenecen a la parte del ácido glucónico (figura 11), que debido a su estructura no rígida cuentan con mayor vibración.

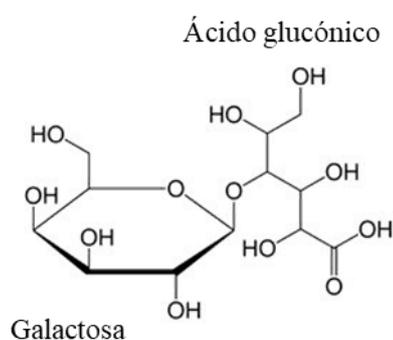


Figura 10. Estructura del ácido lactobiónico

6.1.4 Lectino-Ensayos (ELLA's)

Los bioensayos con lectinas son utilizados para evaluar la biodisponibilidad de carbohidratos simples o complejos (Kalograiaki, 2017). Las lectinas, como la RCA, obtenidas de plantas son

una herramienta útil para determinar la presencia de carbohidratos en la superficie de células o glicoconjugados en general. En este trabajo se usó la lectina RCA debido a que presenta especificidad por galactosa. En la figura 12, se muestra la interacción de la lectina de RCA con los diferentes tratamientos de glicación. De los cuales, solo dos de ellos (BSA-Lac Δ y BSA-Lac NaBH₃CN) mostraron ser reconocidos por la lectina RCA, con valores por encima de la BSA (control negativo), lo cual confirma la modificación de la proteína con lactosa y que el carbohidrato se encuentra con la estructura correcta para el biorreconocimiento. El tratamiento BSA-Ac.Lacto no fue reconocido por la lectina, lo que indica que los carbohidratos no se encuentran disponibles para su biorreconocimiento.

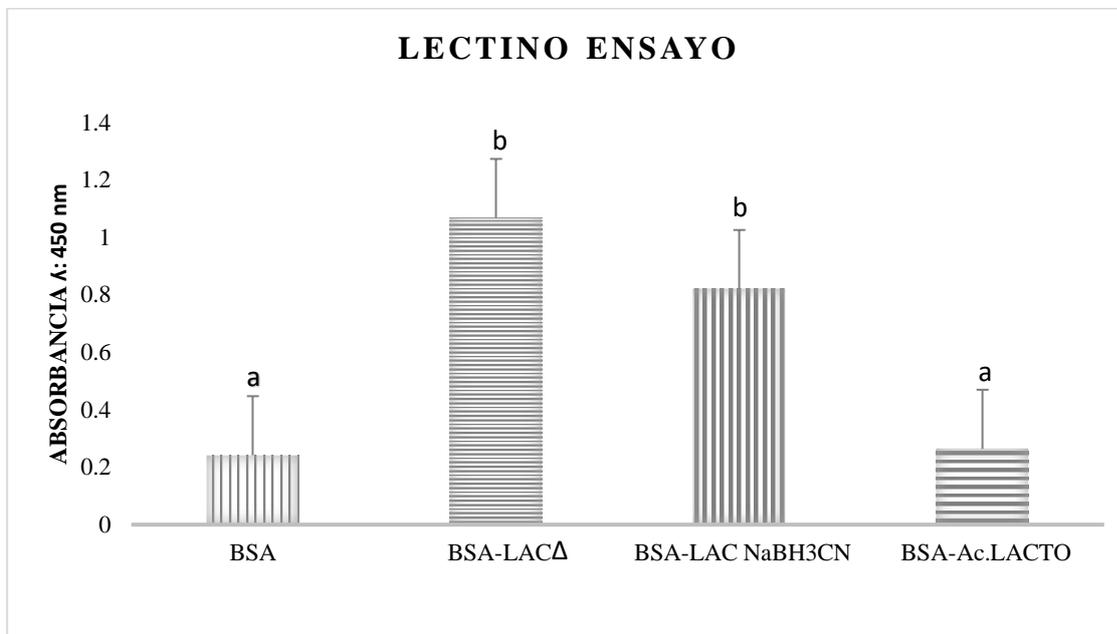


Figura 11. Ensayos con lectinas ligadas a enzimas (ELLAs). Las BSA sometidas a modificación con carbohidratos, fueron inmovilizadas en placas de ELISA (20 μ g) y expuesta a la lectina RCA.

De los tratamientos de modificación de BSA que demostraron biorreconocimiento por la RCA, se seleccionó la BSA-Lac Δ para desarrollar las nanopartículas, ya que fue el único método donde no se utilizaron reactivos tóxicos para el medio ambiente coincidiendo con los principios de la química verde.

6.2 Determinación de Citotoxicidad del AEO

Dentro de los componentes que constituyen al AEO, al p-cimeno, timol y carvacrol monoterpenos a los cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y anticancerígena. Esta última propiedad ha despertado el interés de varios autores, donde se han descrito los distintos mecanismos por los cuales los fenoles monoterpenos como el timol y carvacrol pueden atacar a las células cancerígenas (Yin et al 2012) (Kubatka, et al 2017). Se ha descrito que el carvacrol activa la vía de la caspasa-3 y disminuye la expresión del gen Bcl-2, induciendo la apoptosis en la línea celular Hep G2 (Günes-Bayir, et al. 2017). En el caso del p-cimeno, se ha descrito un efecto adverso en el proceso de generación de ATP, ya que afecta los estadios respiratorios 2 y 4 de la mitocondria, teniendo como consecuencia la muerte celular (Custódio et al., 2011)

En la figura 13, se muestra que el AEO proveniente de planta *Lippia palmeri*, endémica de Álamos, Sonora, cuenta con actividad citotóxica sobre la línea celular Hep G2, perteneciente al carcinoma hepatocelular. El IC₅₀ que presentó el AEO fue de 0.070 mg/ml obtenido mediante el ensayo de citotoxicidad con las células Hep G2, el cual fue 2.8 veces más bajo de lo reportado por Zapata y colaboradores (2009), donde evaluaron aceites esenciales extraídos de *Lippia Origanoides* con un IC₅₀ 0.200 mg/ml. La diferencia entre los valores del IC₅₀ entre el AEO y el aceite de *Lippia origanoides*, se debe a que el primero cuenta con dos compuestos mayoritarios altamente anticancerígenos, como el carvacrol y el p-cimeno. Mientras el segundo cuenta con 1,8-cineolo, α -terpineno, γ -terpineno, p-cimeno como componentes mayoritarios

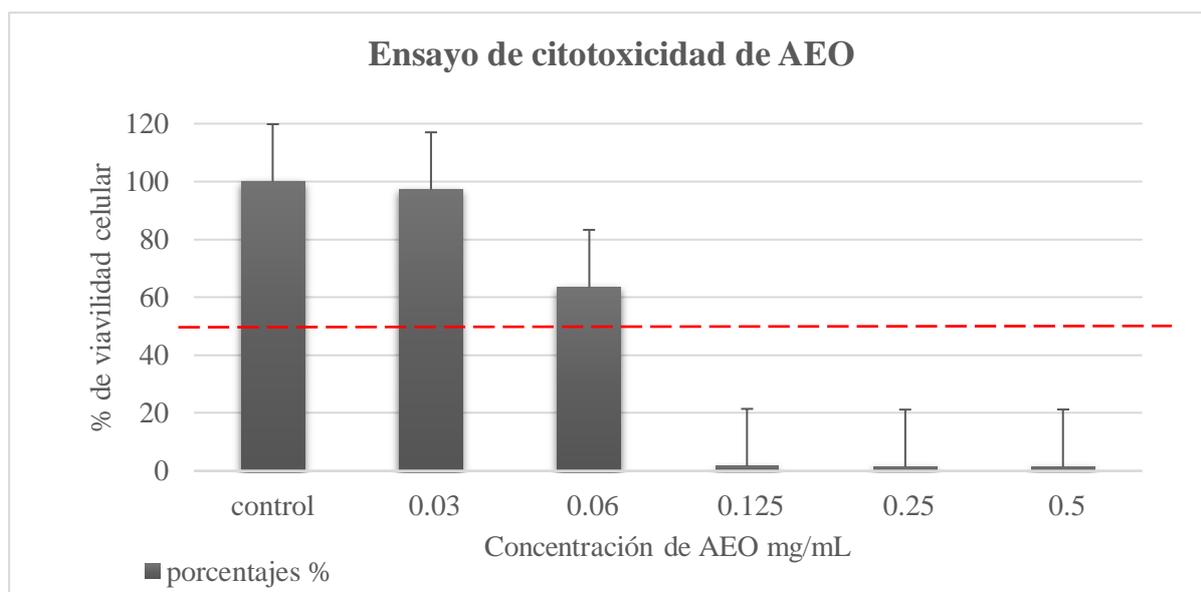


Figura 12. Ensayo de citotoxicidad del AEO sobre la línea cancerígena Hep G2, a distintas concentraciones.

6.3 Caracterización de las Nanopartículas

Después de realizar la caracterización de las glicoproteínas, se seleccionó la BSA que contara con los requerimientos necesarios para la elaboración de los nanovectores. El primero de ellos, fue contar con residuos de galactosa disponibles para su biorreconocimiento, y el segundo fue cumplir con los principios de la química verde. Basándonos en eso, la BSA-Lac Δ obtenida mediante la reacción de Maillard (síntesis verde) resultó ser la mejor candidata.

6.3.1 DLS y Potencial Z

Utilizando la BSA modificada por el método de síntesis verde se elaboraron nanopartículas núcleo-coraza. En el cual el núcleo fue de BSA (sin tratamiento) y posteriormente fue recubierto por una coraza de BSA-Lac Δ . Se realizó el análisis del tamaño de las partículas mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Asimismo, se obtuvo la carga superficial de las partículas obtenidas. En la Cuadro 4 se muestran los tamaños de las nanopartículas sintetizadas. En la cual se puede observar la distribución de tamaño que poseen las nanopartículas de BSA/BSA-

Lac Δ , BSA/BSA-Lac Δ /AEO y BSA/BSA-Lac Δ /carvacrol, la distribución de tamaños fue de 200-250 nm. Adicionalmente, se reportan las cargas superficiales de las nanopartículas, para las NPs BSA, NPs BSA-Lac Δ , NPs BSA-Lac Δ /AEO y NPs BSA-Lac Δ /carvacrol, el potencial Z se encuentra por encima de los -30 mV. Estos resultados son favorables debido a que indica que las partículas se pueden mantener en suspensión acuosa (Schaffazick et al., 2003). Mantener partículas estables en un sistema coloidal, con tamaños uniformes, es de gran importancia pensando en futuras aplicaciones terapéuticas.

Cuadro 4. Tamaño y potencial Z de las nanopartículas sintetizadas con BSA y BSA Lactosilada, y las nanopartículas en las que se encapsularon AEO y carvacrol.

Muestra	Tamaño (DLS) nm	Potencial Electrostático (potencial Z) mV
NP's BSA control	133.8 \pm 0.76	-42 \pm 0.89
NPs BSA/BSA-Lac Δ control	214 \pm 3.51	-34.1 \pm 0.361
NPs BSA/ BSA-Lac/AEO	206.9 \pm 2.58	-31.5 \pm 0.656
NPs BSA BSA-Lac/carvacrol	244.4 \pm 5.15	-31.3 \pm 0.0874

6.3.2 Encapsulación y Cinética de Liberación de AEO.

Se determinó la concentración de carvacrol del AEO encapsulado en las NPs BSA/BSA-Lac, mediante el uso de una curva estándar, la cual fue de 37.91 μ g/ml de carvacrol en 5 mg de NPs BSA/BSA-Lac/AEO y 55.13 μ g/ml de carvacrol en 5 mg de NPs BSA/BSA-Lac/carvacrol.

Mediante la información obtenida de la extracción de carvacrol se estimó el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) de las nanopartículas, demostrando una ineficiencia en la encapsulación por parte de las NPs de BSA/BSA-Lac Δ /AEO y BSA/BSA-Lac Δ /carvacrol donde se obtuvo el 3.67 %EE y 5.62 %EE, respectivamente. Además, se determinó el porcentaje de rendimiento de recuperación (%RR) de las nanopartículas, donde se obtuvo alrededor del 50% RR para ambas NPs, los resultados se muestran en la Cuadro 5.

Cuadro 5. Porcentajes de EE y RR de las nanopartículas BSA/BSA-Lac.

Muestra	%RR	%EE
NPs BSA/BSA-Lac/ AEO	42.5	3.67
NPs BSA/BSA-LAC / carvacrol	53.5	5.62

La cinética de liberación de compuestos (figura 13) encapsulados mediante la aplicación de la ecuación del modelo dependiente, demostró ser de primer orden (Cuadro 6.) (Con un K_1 cercano a 0), en la cual la relación de remoción del compuesto depende de la concentración y de un tiempo determinado para su completa liberación (Palma-Aguirre 1991). Se liberó 42.5% del AEO de las NPs BSA/BSA-Lac Δ /AEO y 53.5% y de carvacrol de las NPs BSA/BSA-Lac/carvacrol. El tiempo de liberación fue de 6 horas, en ambas nanopartículas, el cual se encuentra dentro del intervalo que se reporta para la mayoría de los fármacos, que van de intervalo de 4 a 12 horas para su liberación (Sáez et al.,2002).

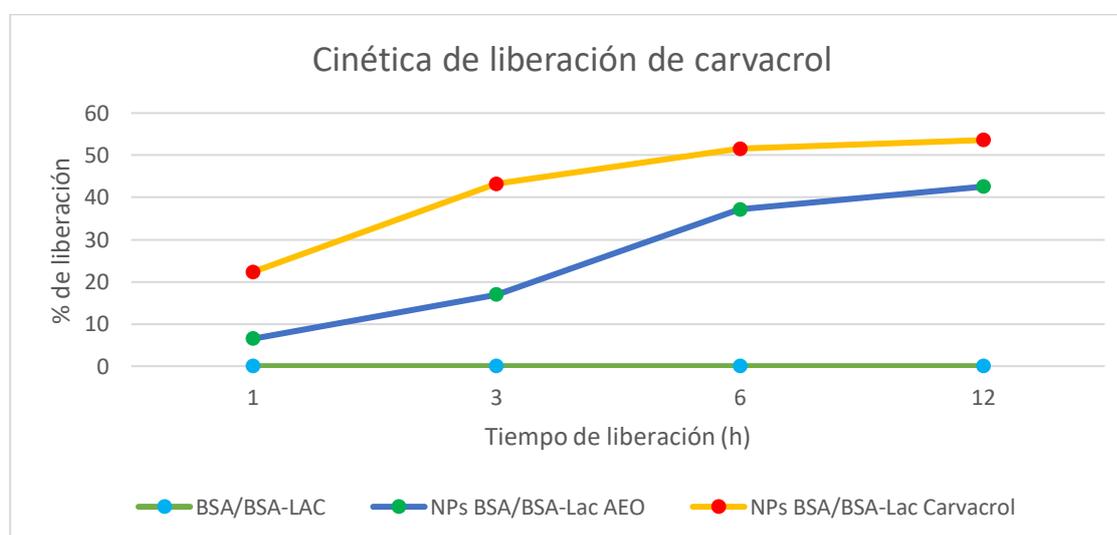


Figura 13. Cinética de liberación de carvacrol con tiempos de medición a las horas 1, 3, 6 y 12. Donde se observa un comportamiento de liberación similar en ambas nanopartículas donde se encontraban encapsulados los compuestos antiproliferativos. Las muestras se compararon contra la nanopartícula control NPs BSA/ BSA-Lac Δ .

Cuadro 6 Valores de R^2 y K_1 obtenidos mediante la aplicación del modelo dependiente (primer orden).

Muestra	R^2	K_1
NPs BSA	-	-
NPs BSA/BSA-Lac Δ /AEO	0.9577	-0.046
NPs BSA/BSA-Lac Δ /carvacrol	0.8519	-0.063

6.3.3 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

La morfología de las nanopartículas se analizó por AFM. La figura 15 (A, B, C y D), muestra la morfología aparentemente esférica para todos los tipos de partículas, al igual se observan con una superficie aparentemente lisa. Además, la imagen AFM permitió estimar un tamaño de partícula alrededor de los 200 nm, lo cual coincide con el estudio realizado mediante DLS. Esto concuerda con lo reportado por Maryam y colaboradores 2015, donde obtuvieron nanopartículas de albúmina con carvacrol con tamaño de 223 nm y de apariencia similar. Sin embargo, en todas las NPs se observan la presencia de agregados, posiblemente ocasionada por el proceso de preparación y secado de las muestras.

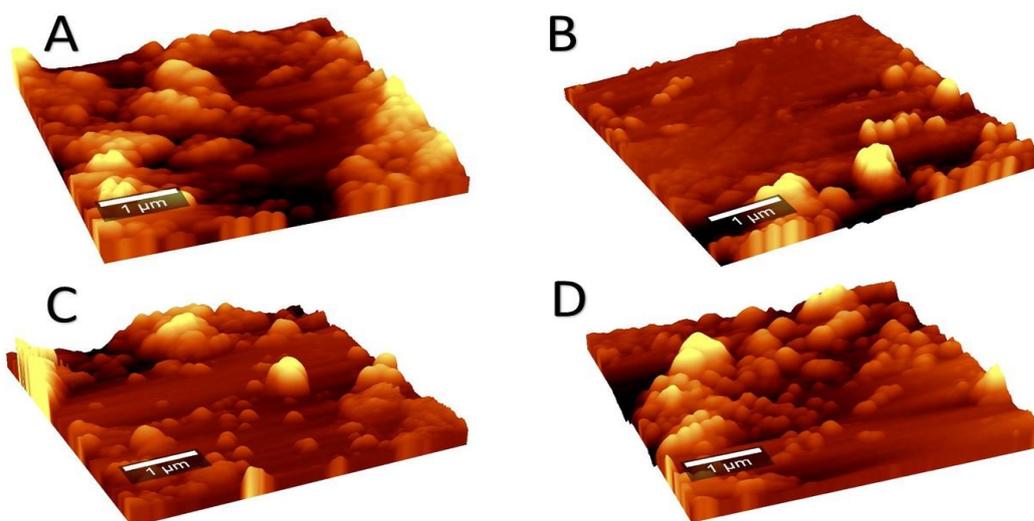


Figura 14. Imagen de nanopartículas observadas con AFM. A) Núcleo de BSA de las NPs, B) NPs de BSA con coraza de BSA-Lac, C) NPs BSA/BSA-Lac Δ con AEO y D) NPs BSA/BSA-Lac Δ con carvacrol. Todas se observan con el mismo tipo de morfología y tamaño excepto la imagen A) que corresponde al núcleo de las nanopartículas.

6.3.4 ELLAs con Nanopartículas

Para la evaluar de la exposición de los residuos de galactosa en la superficie de las nanopartículas se realizaron lectino ensayos, en los cuales se utilizó la lectina RCA. En la figura 16 se puede observar que hay diferencia significativa entre el biorreconocimiento que mostró la lectina RCA hacia la NPs BSA/BSA-Lac Δ , con respecto al núcleo de BSA de las nanopartículas. Estas últimas no presentaron diferencia con respecto al OPD el cual se utilizó como blanco reactivo.

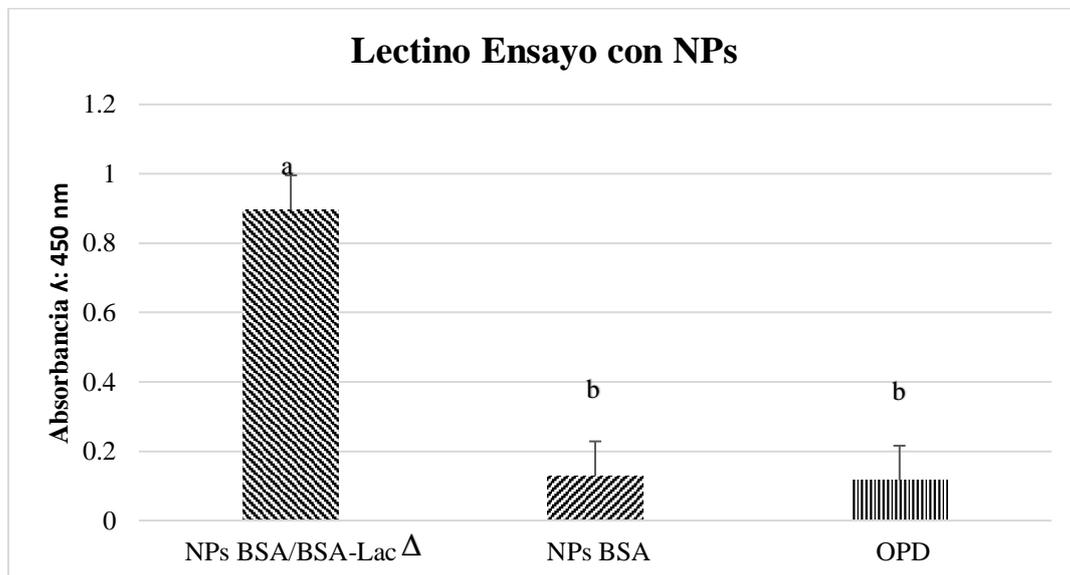


Figura 15. Ensayo ELLAs con NPs BSA/BSA-Lac Δ , donde se comprobó la presencia de los residuos de galactosa en la superficie de las NPs de albúmina lactosilada por síntesis verde.

Con base a los resultados de la gráfica se pudo determinar que las NPs BSA/BSA-Lac presentan en la superficie residuos de galactosa y estos se encuentran disponibles para su biorreconocimiento por parte de la RCA, lo cual abre la posibilidad de ser reconocidas por el receptor Ashwell-Morell.

7. CONCLUSIÓN

La glicación de la albúmina basada en un tratamiento térmico cumple con los principios de la química verde y demostró ser un excelente candidato para la elaboración de nanovehículos. Las glicaciones por métodos químicos convencionales generan una mayor cantidad de residuos perjudiciales al medio ambiente e incrementan los costos en su proceso. El uso de sustancias bio-activas, con la capacidad de producir un efecto citotóxico en la línea celular Hep G2 y derivadas de plantas comestibles endémicas de la región de Sonora, como el Aceite Esencial de Orégano (*Lippia palmeri*), representarían una gran ventaja, ya que se disminuirían los efectos adversos en el paciente y al medio ambiente.

Con base en lo anterior, el uso de nanoterapias utilizando nanovehículos de albúmina lactosilada transportadoras de compuestos antiproliferativos del Aceite Esencial de Orégano (*Lippia palmeri*), que poseen en su superficie residuos de galactosa pudieran representar una terapia alternativa para padecimientos con una alta tasa de mortalidad, como lo es el carcinoma hepatocelular, además de constituir un menor riesgo de efectos adversos en los pacientes y menor contaminación.

8. RECOMENDACIONES

Para la continuación de este trabajo se recomienda, mejorar la encapsulación de los compuestos antiproliferativos del AEO en las NPs, mediante distintos métodos de síntesis de nanopartículas. Además de realizar la evaluación de biorreconocimiento y la citotoxicidad de las NPs por parte de la línea celular Hep G2.

9. REFERENCIAS

- Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de masas para la caracterización de Péptidos y proteínas en Proteómica.
- Afanador, E. O. V., & Pimiento, L. P. R. (2007). Química verde en el siglo XXI; química verde, una química limpia. *Revista cubana de química*, 19(1), 29-32.
- Anguiano-Lizárraga M. E. (2017). "Diseño de nanovectores a base de glicoconjugados para el transporte y entrega selectiva de fármacos antitumoral hacia línea celular Hep G2" (Licenciatura), Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
- Barrientos, Á. G., de la Fuente, J. M., Rojas, T. C., Fernández, A., y Penadés, S. (2003). Gold glyconanoparticles: synthetic polyvalent ligands mimicking glycocalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies. *Chemistry A European Journal*, 9(9), 1909-1921.
- Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. (2007). *Bioquímica*. Reverté. Sexta edición. Barcelona. 1026 pp.
- Bertrand, N. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2-25. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>
- Boisseau, P. and B. Loubaton (2011). "Nanomedicine, nanotechnology in medicine." *Comptes Rendus Physique* 12(7): 620-636.
- Boroumand Moghaddam, A., Namvar, F., Moniri, M., Azizi, S. y Mohamad, R. (2015). Nanopartículas biosintetizadas por hongos y levaduras: una revisión de su preparación, propiedades y aplicaciones médicas. *Moléculas*, 20 (9), 16540-16565.
- Bustíos Sánchez, C., Díaz Ferrer, J., Román Vargas, R., Dávalos Moscol, M., & Zumaeta Villena, E. (2009). Características clínico-epidemiológicas del carcinoma hepatocelular y su tratamiento en el departamento del aparato digestivo del HNERM ES-SALUD. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 29(1), 17-23.
- Casañas Pimentel, R., Da Silva Pinto, M., Monroy Garcia, A., Hinestroza, J., Gomez Garcia, C., & San Martin Martinez, E. (2013). Vectorización de Nanotransportadores Poliméricos de Nanopartículas de Plata para Tratamiento de Cáncer.
- Castro, N. P. P., & Verbel, J. T. O. (2011). Química verde: un nuevo reto. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 21(2), 169-182.
- Chéry, P. M. A., Goldfien, A., & Jawetz, E. (2013). *Manual de farmacología básica y clínica*. McGraw-Hill Interamericana. Quinta edición. México, D.F. 361 pp.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005, August 22). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 100, pp. 72–79.
- Cortez, P. M. (2017). Espectroscopia de infrarrojo para todos. *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, AC*.
- Cuadros-Moreno, A., et al. (2014). "Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas." *Latin-American Journal of Physics Education* 8(4): 14.
- Custodio, J., Ribeiro, M. V., Silva, F., Rodrigues Machado, S. M., & Sousa, M. (2011). The essential oils component p-cymene induces proton leak through Fo-ATP synthase and

- uncoupling of mitochondrial respiration. *Journal of Experimental Pharmacology*, 69. <https://doi.org/10.2147/jep.s16387>
- Eissa, AM, Abdulkarim, A., Sharples, GJ y Cameron, NR (2016). Nanopartículas glicosiladas como agentes de administración antimicrobianos eficientes. *Biomacromolecules*, 17 (8), 2672-2679. Fattovich, G., et al. (2004). "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors." *Gastroenterology* 127(5): S35-S50.
- Fenaille, F., Morgan, F., Parisod, V., Tabet, J. C., & Guy, P. A. (2004). Solid-state glycation of β -lactoglobulin by lactose and galactose: localization of the modified amino acids using mass spectrometric techniques. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 16-28. Fernández, P. L. (2015). Velázquez. Farmacología Básica y Clínica (eBook online), Ed. Médica Panamericana.
- Finn, G. (2001). Histología, Panamericana.
- Foord, R., Jakeman, E., Oliver, C. J., Pike, E. R., Blagrove, R. J., Wood, E., & Peacocke, A. R. (1970). Determination of diffusion coefficients of haemocyanin at low concentration by intensity fluctuation spectroscopy of scattered laser light. *Nature*, 227(5255), 242.
- Garnett, M. C. and P. Kallinteri (2006). "Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles." *Occupational Medicine* 56(5): 307-311.
- Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.
- García-García, R. M., & Palou-García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2(2), 41-51.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 69(1), 1-9.
- Grewal, PK (2010). El receptor Ashwell-Morell. En *Methods in enzymology* (Vol. 479, págs. 223-241). Prensa académica.
- Guerrero, J. (2005). Cianuro: Toxicidad y destrucción biológica. *El Ingeniero de minas*, 10, 22-25.
- Güler, G., et al. (2016). "Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 161: 8-18.
- Günes-Bayir, A., Kiziltan, HS, Kocyigit, A., Güler, EM, Karataş, E. y Toprak, A. (2017). Efectos del compuesto fenólico natural carvacrol sobre las células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) in vitro. *Medicamentos contra el cáncer*, 28 (5), 522-530.
- Guzmán, M. P., Lerma, Y. O., & Aristizábal, Y. B. (2013). Estudio comparativo de la liberación in vitro de metformina, a partir de dos productos multifuente de liberación inmediata, comercializados en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 42(2), 169-189.
- Han, J.-H. (1999). *International journal of pharmaceuticals* 188, 39.
- Henriques, S. (2015). Cuando lo diminuto tiene enormes efectos: La radiación ionizante como instrumento para la ingeniería a escala nanométrica. *Organismo Internacional de Energía*

Atómica Boletín, 56(3), 26-27.

- Hermanson, GT (2013). *Técnicas de bioconjugado*. Prensa académica. Tercera edición. San diego. 1146 pp.
- Irache, J. M. (2008). Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 31, No. 1, pp. 7-10). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Jahangirian, H., Lemraski, E. G., Webster, T. J., Rafiee-Moghaddam, R., & Abdollahi, Y. (2017). A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. *International journal of nanomedicine*, 12, 2957.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.
- Jesús, M., y Penadés, S. (2006). Gliconanopartículas: tipos, síntesis y aplicaciones en glucociencia, biomedicina y ciencia de materiales. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Sujetos generales*, 1760 (4), 636-651.
- Kaur, J., Kaur, J., Jaiswal, S. y Gupta, GD (2016). Avances recientes en el sistema tópico de administración de medicamentos. *Investigación Farmacéutica*, 6 (07).
- Kalograiki, I. (2017). *Patrones de glicosilación y reconocimiento por lectinas-glycosylation patterns and recognition by lectins* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Kubatka, P., Kello, M., Kajo, K., Kruzliak, P., Výbohová, D., Mojžiš, J., ... & Pěč, M. (2017). Oregano demonstrates distinct tumour-suppressive effects in the breast carcinoma model. *European journal of nutrition*, 56(3), 1303-1316.
- Kumar Khanna, V. (2012). "Targeted delivery of nanomedicines." *ISRN pharmacology* **2012**.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *nature* **227**(5259): 680-685.
- Leary, S. P., et al. (2005). "Toward the emergence of nanoneurosurgery: Part I—Progress in nanoscience, nanotechnology, and the comprehension of events in the mesoscale realm." *Neurosurgery* **57**(4): 606-634.
- Lee, C., Kim, B., Lee, S., Kim, T. H., Kim, J. O., Lee, E. S., ... & Youn, Y. S. (2017). Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 183-191.
- Leopold, L. F., Leopold, N., Diehl, H. A. y Socaciu, C. (2011). Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Spectroscopy* 26, 93-104
- Limbach, LK, Wick, P., Manser, P., Grass, RN, Bruinink, A. y Stark, WJ (2007). Exposición de nanopartículas de ingeniería a células epiteliales de pulmón humano: influencia de la composición química y la actividad catalítica en el estrés oxidativo. *Ciencia y tecnología ambiental*, 41 (11), 4158-4163. *Environmental science & technology* **41**(11): 4158-4163.
- Lollo, G., Rodríguez, GR, Torres, D., y Alonso, MJ (2011, diciembre). Nanoterapias oncológicas: aplicaciones actuales y perspectivas futuras. En *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 77, No. 4).
- Mariotto, A. B., et al. (2011). "Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010–

2020." Journal of the National Cancer Institute.

- Maryam, K., Shakeri, S., & Kiani, K. (2015). Preparation and in vitro investigation of antigastric cancer activities of carvacrol-loaded human serum albumin nanoparticles. *IET nanobiotechnology*, 9(5), 294-299.
- Mejias Sánchez, Y., Cabrera Cruz, N., Toledo Fernández, A. M., Machado, D., & José, O. (2009). La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. *Revista Cubana de Salud Pública*, 35.
- Mendoza Uribe, G., & Rodríguez-López, J. L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles latinoamericanos*, 14(29), 161-186.
- Merodio, M., Arnedo, A., Renedo, M. J., & Irache, J. M. (2001). Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 251-259.
- Michaelis, K., Hoffmann, MM, Dreis, S., Herbert, E., Alyautdin, RN, Michaelis, M. y Langer, K. (2006). El enlace covalente de la apolipoproteína e con las nanopartículas de albúmina aumenta en gran medida el transporte de fármacos al cerebro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 317 (3), 1246-1253.
- Moncada A, E. (2007). "Nanotecnología, aplicaciones en embalajes para alimentos y productos farmacéuticos." *Vitae* 14(2): 114-120.
- Mokdad, A. A., Singal, A. G., & Yopp, A. C. (2016). Treatment of liver cancer. *Jama*, 315(1), 100-100.
- Mosmann, T. (1983). Ensayo colorimétrico rápido para el crecimiento y la supervivencia celular: aplicación a ensayos de proliferación y citotoxicidad. *Revista de métodos inmunológicos* , 65 (1-2), 55-63.
- Neira-Carrillo, A., Muñoz, D. Y., Zazzali, P. A., Marini, Y. A., Vilches, S. V., & Palma, R. E. (2013). Encapsulación de biomoléculas usando polímeros naturales: "un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en medicina". *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2), ág-31.
- Ortega-Nieblas, M. M., Robles-Burgueño, M. R., Acedo-Félix, E., González-León, A., Morales-Trejo, A., & Vázquez-Moreno, L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 34(1).
- Palma-Aguirre, J. A. (1991). Importancia clínica de la farmacocinética. *GACETA MEDICA DE MEXICO*, 127(4), 341.
- Paradinas, S. S. (2013). Nanopartículas como herramientas en procesos bio-químicos. Síntesis, caracterización, funcionalización y aplicaciones, Universidad de Salamanca.
- Pimentel, L. F., et al. (2007). "Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária."
- Pimentel, Carlos. (2017). Synthesis and reactivity of minerals of dolomite group and analogue phases (Síntesis y reactividad de minerales del grupo de la dolomita y fases análogas). 10.13140/RG.2.2.11393.92008.
- Poole, C. P., & Owens, F. J. (2007). *Introducción a la nanotecnología*. Reverté. primera edición. Barcelona. 419 pp
- Prijic, S., y Sersa, G. (2011). Las nanopartículas magnéticas como sistemas de distribución dirigida en oncología. *Radiología y oncología* , 45 (1), 1-16.
- Quirino-Barreda, C. T. 2014 Los retos de la nanotecnología farmacéutica. *Mundo Nano. Revista*

Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología, 7(12).

- Roco, M. C. (2006). "Nanotechnology'S future." *Scientific American* **295**(2): 39-39.
- Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., & González-Méndez, I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos:¿ la (r) evolución de la terapia contra el cáncer?. *Educación química*, 27(4), 286-291.
- Sáez, V., Hernáez, E., & Angulo, L. S. (2002). Sistemas de liberación controlada de medicamentos. *Revista iberoamericana de polímeros*, 3(3), 1-17.
- Sarabia-Sainz, A. I., et al. (2011). "Bacterial recognition of thermal glycation products derived from porcine serum albumin with lactose." *Acta Biochim. Pol* **58**: 95-100
- Sarabia-Sainz, A. I., Ramos-Clamont, G., Winzerling, J., & Vázquez-Moreno, L. (2011). Bacterial recognition of thermal glycation products derived from porcine serum albumin with lactose. *Acta Biochimica Polonica*, 58(1).
- Sarabia-Sainz, A., Montfort, G. R. C., Lizardi-Mendoza, J., Sánchez-Saavedra, M. D. P., Candia-Plata, M. D. C., Guzman, R. Z., ... & Vazquez-Moreno, L. (2012). Formulation and characterization of gentamicin-loaded albumin microspheres as a potential drug carrier for the treatment of E. coli K88 infections. *International Journal of Drug Delivery*, 4(2), 209.
- Sangabathuni, S., Murthy, R. V., Chaudhary, P. M., Surve, M., Banerjee, A., & Kikkeri, R. (2016). Glyco-gold nanoparticle shapes enhance carbohydrate–protein interactions in mammalian cells. *Nanoscale*, 8(25), 12729-12735.
- Santa, C. F. and B. L. López Osorio (2013). "Materiales poliméricos en nanomedicina: transporte y liberación controlada de fármacos." *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **37**(142): 115-124.
- Schaffazick, Scheila Rezende, Guterres, Sílvia Stanisçuaski, Freitas, Liane de Lucca, & Pohlmann, Adriana Raffin. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26(5), 726-737. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>
- Segovia, D. A. (1968). Hígado y vías biliares, Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Nacional de la Nutrición.
- Shreve, F., y Wiggins, IL (1964). *Vegetación y flora del desierto de Sonora* (Vol. 591). Stanford University Press.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, NR, ... & Nunes, ML (2013). Composición química y bioactividad de diferentes extractos de orégano (*Origanum vulgare*) y aceite esencial. *Revista de la Ciencia de la Alimentación y la Agricultura* , 93 (11), 2707-2714.
- Tomás Barberán, F. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutricion y Salud*. vol10 N° 2 pp-41-53.
- Trevisani, F., et al. (1996). "Clinical and pathologic features of hepatocellular carcinoma in young and older Italian patients." *Cancer* **77**(11): 2223-2232.
- Vazquez Muñoz, R., & Huerta Saquero, A. (2018). Toxicidad de los nanomateriales de interés biomédico en los sistemas biológicos. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 11(20), 65-75.
- Villafuerte-Robles, L. (2009). Nanotecnología farmacéutica. *Razón y palabra*, 14(68).

- Xue, X., Pasparakis, G., Halliday, N., Winzer, K., Howdle, SM, Cramphorn, CJ, y Alexander, C. (2011). "Synthetic polymers for simultaneous bacterial sequestration and quorum sense interferenc). *Angewandte Chemie Edición internacional* , 50 (42), 9852-9856.
- Yin, Q. H., Yan, F. X., Zu, X. Y., Wu, Y. H., Wu, X. P., Liao, M. C., ... & Zhuang, Y. Z. (2012). Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64(1), 43-51.
- Zhang, Q., Ames, J. M., Smith, R. D., Baynes, J. W., & Metz, T. O. (2008). A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *Journal of proteome research*, 8(2), 754-769.