



Universidad
Autónoma de Baja
California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Campus Tijuana

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS A BASE DE BIOPOLÍMEROS
CARGADAS CON FLAVONOIDES PARA
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
CRONICODEGENERATIVAS**

Presentada por:

Q.F.B Melissa Zulahí Gallegos Granados

Tijuana – México

2021

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS A BASE DE BIOPOLÍMEROS
CARGADAS CON FLAVONOIDES PARA
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
CRONICODEGENERATIVAS”**

Q.F.B Melissa Zulahí Gallegos Granados

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en Ciencias

Directora:

Doctora Rocío Alejandra Chávez Santoscoy

Co-Director:

Doctor Luis Jesús Villareal Gómez

Facultad de ciencias químicas e ingeniería

Universidad Autónoma de Baja California

Tijuana B.C.

2021

*A mis padres por enseñarme
que oración, trabajo y amor, traen la
paz a tu vida*

RESUMEN

RESUMEN de la Tesis de Gallegos Granados Melissa Zulahí, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRA EN CIENCIAS. Tijuana, Baja California, México. Septiembre de 2021.

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE BIOPOLÍMEROS CARGADAS CON FLAVONOIDES PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS.

Resumen aprobado por:



Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy

La quercetina es un componente bioactivo, que ha sido estudiado por sus propiedades capaces de atenuar factores de riesgo para síndrome metabólico. Sin embargo, por su inestabilidad en el tracto gastrointestinal y su baja biodisponibilidad, no es posible aprovechar sus propiedades en un 100%. Por ende, la siguiente tesis tiene como principal estudio la síntesis y comportamiento *in vitro* de nanopartículas a base del biopolímero, inulina, cargadas con el flavonoide más común en la dieta, quercetina. Estas nanopartículas a base de un polisacárido de tipo fructano actúan como un sistema de entrega, para la liberación de quercetina en una célula diana, garantizando la estabilidad de la molécula. En primer lugar, se sintetizaron nanopartículas de inulina cargadas con quercetina (Np

Inu-Quer) por el método de spray dryer. Se utilizó un diseño de experimentos de tipo compuesto central de doble cara con un total de 21 experimentos. Donde se probaron cuatro diferentes variables independientes, concentración de inulina, temperatura de alimentación, temperatura de entrada, temperatura de salida. Las variables de respuesta fueron: tamaño (nm), PDI, y Z-Average. La metodología de superficie de respuesta (MSR) se usó a fin de minimizar las variables dependientes. En las nanopartículas que se sintetizaron bajo las condiciones óptimas obtenidas (Inulina al 10%, 45 °-50 °C, 120 °C, 60 °C) se observó una disminución en el tamaño a 260 nm aproximadamente con un PDI de 0.94 ± 0.08 . La microscopia de fluorescencia indicó un cargado de quercetina en las nanopartículas de inulina, con una eficiencia de aproximadamente de 71.11 % y un porcentaje de cargado de 73.33 ± 7.86 %. El ensayo de DPPH demostró la eficiencia de la pared de inulina frente a estímulos de carácter *in vivo*. La cinética de liberación *in vitro* mostró una liberación específica de colon de tipo inmediata, donde observamos una diferencia significativa en la velocidad de liberación de quercetina con relación a la temperatura del medio, demostrando que contamos con nanopartículas termosensibles y pH dependientes. En cuanto a la viabilidad celular observamos efectos de ligera inhibición sobre células Caco-2 de una manera dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. Esta tesis demuestra el potencial que posee la inulina como nuevo material de transporte de moléculas inestables como un sistema de administración oral para la encapsulación, protección y liberación de quercetina en colon para el tratamiento de enfermedades del síndrome metabólico

Palabras clave: Quercetina; Inulina; Nanopartículas; Síndrome metabólico

ABSTRACT

ABSTRACT of the thesis, presented by Gallegos Granados Melissa Zulahí, in order to obtain the MASTER IN SCIENCE. Tijuana, Baja California, México. September, 2021.

SYNTHESIS AND *IN VITRO* EVALUATION OF NANOPARTICLES BASED ON BIOPOLYMERS LOADED WITH FLAVONOIDS FOR THE TREATMENT OF CHRONIC DEGENERATIVE DISEASES.

Approved by:

Ph.D. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy

Quercetin is a bioactive component, which has been studied for its properties capable of attenuating risk factors for metabolic syndrome. However, due to its instability in the gastrointestinal tract and its low bioavailability, it is not possible to take 100% of its properties. Therefore, the following thesis has as its main study the synthesis and *in vitro* behavior of nanoparticles based on inulin biopolymer loaded with the most common flavonoid in the diet, quercetin. These nanoparticles based on a fructan-type polysaccharide act as a delivery system for the release of quercetin in a target cell, guaranteeing the stability of the molecule. First, inulin nanoparticles loaded with quercetin (Np Inu-Quer) were synthesized by the spray

dryer method. A double-sided core composite type design of experiments was used with a total of 21 experiments. Where four different independent variables were tested, inulin concentration, feed temperature, inlet temperature, outlet temperature. The response variables were: size (nm), PDI, and Z-Average. The response surface methodology (MSR) was used in order to minimize the dependent variables. In the nanoparticles that were synthesized under the optimal conditions obtained (Inulin 10%, 45 ° -50 ° C, 120 ° C, 60 ° C) a decrease in size was observed at approximately 260 nm with a PDI of 0.94 ± 0.08 . Fluorescence microscopy indicated a quercetin loading in the inulin nanoparticles, with an efficiency of approximately 71.11% and a loading percentage of $73.33 \pm 7.86\%$. The DPPH test demonstrated the efficiency of the inulin wall against stimuli of character *in vivo*. *in vitro* release kinetics showed an immediate-type colon-specific release, where we observed a significant difference in the release rate of quercetin in relation to the temperature of the medium, demonstrating that we have thermosensitive nanoparticles and dependent pH. Regarding cell viability, we observed effects of slight inhibition on Caco-2 cells in a manner dependent on the dose and the exposure time. This thesis demonstrates the potential of inulin as a new transport material for unstable molecules as an oral administration system for the encapsulation, protection and release of quercetin in the colon for the treatment of metabolic syndrome diseases.

Keywords: Quercetin; Inulin; Nanoparticles; Metabolic syndrome

AGRADECIMIENTOS.

Primero que nada, quisiera agradecer a los directivos y administrativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) porque sin su apoyo, este proyecto no habría podido ver la luz.

Gracias a mi alma mater, la universidad autónoma de Baja California, por abrirme las puertas desde etapas muy tempranas de mi vida, con el fin de formarme como la persona que soy ahora y hacer cumplir su tan sonado lema “Por la realización plena del hombre”.

Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey campus Monterrey, por abrirme las puertas para poder realizar este proyecto. Al personal administrativo e investigadores del Centro de Biotecnología que siempre me recibieron con los brazos abiertos, y estuvieron para mi en todo momento. A Felipe un especial agradecimiento por tu apoyo incondicional y por pasarme todo su conocimiento sobre el spray dryer. A la doctora Marilena Antunes de igual forma muchísimas gracias por tenerme paciencia para enseñarme el basto campo de cultivo celular. A Javier Villela por ser una gran persona capaz de guiar a otros a través de nuevos horizontes y por tu infinito conocimiento, muchísimas gracias Javi.

Un especial agradecimiento a mi asesora la doctora Alejandra Chávez Santoscoy, por ser una persona única en el mundo, capaz de ver esperanza donde nadie mas la ve. Por su infinito conocimiento, así como su entrega, dedicación y

pasión tan contagiosa, muchísimas gracias. Y especialmente gracias por ese momento de guía que me brindo cuando creía que todo era un abismo. Jamás tendré las suficientes palabras para expresarle mi admiración y mis gracias.

Al doctor Luis Villareal por mostrarme que UABC no solo es un edificio en Otay, Tijuana, si no que UABC puede estar en cualquier parte, incluso a 3 minutos de Tecate, y que esta integrado por excelentes personas, altamente capacitadas y apasionadas en lo que enseñan. Gracias por sus consejos y apoyo en todo momento. Por enseñarme que, si hace falta algún equipo, no es el fin del mundo, solo tenemos que ser más creativos.

A los mejores amigos que la facultad me pudo haber dado: Brisa, Amalia, María, Eliseo, Israel, Rubí, Carlos, Erika, Osiris, Samuel. Por siempre sacarme una sonrisa y darme momentos inolvidables. Gracias por escucharme cuando lo necesitaba, aguantar mis quejas, desahogos y estrés. A Eliseo y María mil gracias por el sinfín de salidas al cine, las incontables horas en el café y los miles de minutos haciéndonos pasar por críticos de cine, los aprecio demasiado chicos.

A mi Best Friend Forever and Ever, Nats, que, aunque no tuvimos un posgrado como lo habíamos soñado, nos hizo darnos cuenta que, aunque haya miles y miles de kilometro de distancia de por medio, siempre estaremos presentes la una para la otra. Gracias amiga por tus llamadas, que, aunque tú me decías que “*De seguro te estoy enfadando*”, me traían una alegría inmensa a mi solitaria vida como

foránea. Te estoy muy agradecida por todo, y quiero que recuerdes que muy pronto estaremos juntas en París.

Al licenciado Emilio Vargas Luna por todo el apoyo que me ha brindado de forma sincera, desde mis inicios en el ámbito laboral. Siempre poniendo interés en el crecimiento personal de sus trabajadores. Gracias por sus historias y consejos de vida.

Y, por último, pero no menos importante, a mis papás, mi hermano y mi familia por siempre ser un apoyo incondicional en todas las nuevas aventuras que me embarco. Gracias por forjar mi camino y dirigir mi sendero, gracias por todos los momentos en los que han estado para ayudarme a aprender de mis errores. Son y siempre serán mi guía en esta vida.

GLOSARIO

%EE: Eficiencia de encapsulación.

ABCA-1: El transportador ATP Binding Cassette A1.

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta.

ANOVA: Análisis de varianza.

ATP: Adenosín trifosfato.

Caco-2: Células de carcinoma de colon humano.

Cel/ mL: Células por mililitro.

CO²: Dióxido de carbono.

COX: Ciclooxygenasa.

COX-2: Ciclooxygenasa–2.

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo.

DAPI: 4,6 Diamidino2-phenylindole.

DLS: Dispersión de luz dinámica.

DMEM: Dulbecco modified Eagles minimal essential medium.

DP: Grado de polimerización.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles.

FBS: Suero bovino fetal al 10%.

FDA: Administración de alimentos y Medicamentos.

GFP: Green fluorescent protein

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico.

HDFa: Línea celular de fibroblastos dermales humanos.

HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad.

HepG2: Células de carcinoma hepatocelular.

IL: Interleucinas.

iNOS: Óxido nítrico sintetasa.

LOX: Lipoxigenasa.

LPS: Lipopolisacárido.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1.

MPa: Megapascuales.

NADPH: Coenzima Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato.

NF- κ b: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

nm: Nanómetros.

NO: Óxido nítrico.

Np I: Nanopartículas no cargadas.

Np I-Q: Nanopartículas de inulina cargadas con quercetina.

Np: Nanopartículas.

PBS: Tampón de fosfato salino.

PDI: Índice de polidispersidad.

PG: Prostaglandinas.

pH: Potencial de hidrógeno.

PI3K- Akt: Vía de señalización de la fosfatidilinositol- 3-kinasa.

PKB: Proteína B quinasa

PLA2: Fosfolipasa A2.

PM: Peso molecular.

r²: Coeficiente de correlación.

RAW 264.7: Células de macrófagos murinos.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

rpm: Revoluciones por minuto.

SCFAs: Short-chain fatty acids.

SGLT-1: Sodium-Glucose Transporter – 1.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α .

v/v: Volumen / Volumen.

α -SMA: α -smooth muscle actin.

μ L: Microlitros.

FIGURAS

Figura 1. Ejemplo nanogel con red tridimensional reticulada (Escalona and Quintanar 2014). Imagen realizada con BioRender.com.

Figura 2. Estrategias de liberación vectorizada de nanopartículas en células diana. Imagen realizada con Biorender.com.

Figura 3. Tipos de liberación en sistemas matriciales. Imagen creada en BioRender.com.

Figura 4. Estructura química de la inulina. Imagen creada por BioRender.com.

Figura 5. Tipos de flavonoides más básicos según su estructura (Cabrera 2009).

Figura 6. Representación de los diferentes efectos de la quercetina en un sistema *in vivo* (Zeng et al., 2021). Imagen realizada en BioRender.com.

Figura 7. Esquema farmacocinético de la quercetina. Tomada de Pérez-Vizcaino et al., (2012).

Figura 8. Vasodilatación producida por NO. Al producirse NO en los vasos sanguíneos, este activa a la molécula guanilato ciclasa, que se encarga de la producción de GMPc, principal dilatador de los vasos sanguíneos (Mata et al. 2010). Imagen creada en Biorender.com.

Figura 9. **A)** Gráfico de superficie para respuesta de tamaño (nm), p-value de 0.023. **B)** Gráfico de superficie para el análisis de la respuesta de PDI, con un total de p-value de 0.683. **C)** Gráfico de superficie para el análisis de la respuesta de Z-Average, con un p-value de 0.217.

Figura 10. Diagrama para la síntesis de nanopartículas cargadas de quercetina por el método de secado por aspersión. Imagen realizada por BioRender.com.

Figura 11. Polvo obtenido por el método de secado por aspersión. **A)** Np I-Q: polvo fino color amarillo, con un rendimiento de casi un 60% **B)** Np I: Polvo blanco con un rendimiento de casi un 65%.

Figura 12. **A)** Caracterización con agua de Np Inu-Quer y Np Inu por medio de dispersión de luz dinámica. **B)** Caracterización en fase orgánica absoluto de Np Inu-Quer y Np Inu.

Figura 13. Imágenes microscopia de fluorescencia **A)** Muestra de Np Inu-Quer sin solución filtro DAPI. **B)** Muestra de Np Inu-Quer sin solución filtro GFP. **C)** Muestra de Np Inu-Quer con solución orgánica filtro DAPI. **D)** Muestra de Np Inu-Quer con solución orgánica filtro GFP. ***Los números en la imagen A y C señalan: 1) Np con déficit de carga. 2) Np con principio activo adherido a la superficie de la matriz polimérica. Barra blanca representa 50 μm .

Figura 14. Potencial zeta de muestras de Np Inu-Quer y muestras Np In, a una temperatura de 37°C en solución acuosa y solución orgánica.

Figura 15. Curva de calibración de quercetina a pH 7.4 con una temperatura de 25 °C. Con un r^2 de 0.9911.

Figura 16. Curva de calibración de quercetina a pH 7.4 con una temperatura de 37 °C. Con un r^2 de 0.9930.

Figura 17. Relación entre temperatura y tamaño de Np Inu-Quer desde 20 °C a 50 °C en una fase orgánica (Np Inu-Quer: etanol: agua 4:4:6 p/v/v).

Figura 18. Relación entre temperatura y tamaño de Np Inu-Quer desde 20 °C a 50 °C en solución acuosa (Np Inu-Quer: agua 4:10 p/v).

Figura 19. Relación temperatura-pH. Temperatura de 30°C a 40 °C a diferentes pH (2, 3, 7.2, 7.4, 8).

Figura 20. Perfil de liberación de quercetina (%) de Np Inu-Quer, a diferentes pH y temperatura de 37 °C. Letras diferentes entre los tratamientos de pH indican ($P < 0.05$) según la prueba de Tukey.

Figura 21. Gráfica de liberación acumulada de Np Inu-Quer a pH 7.4 como simulador de colón, con temperaturas de 25 °C y 37 °C.

Figura 21. A) Gráfica con el porcentaje de captación de radicales libres de Np Inu-Quer a diferentes temperaturas. **B)** Gráfica con porcentaje de captación de radicales libres de Np In-Quer a diferente pH. *Letras diferentes representan ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

Figura 22. Efecto de Np Inu-Quer a diferentes concentraciones (nM) en viabilidad celular de línea Caco-2 a 24 y 72 horas. Valores son presentados en promedio $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA con comparación múltiple de Dunnett, donde **** indica $p < 0.05$.

Figura 23. Efecto de Np Inu-Quer a diferentes concentraciones (nM) en viabilidad celular de línea HepG 2 a 24 y 72 horas. Valores son presentados en promedio $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA con comparación múltiple de Dunnett, donde **** indica $p < 0.05$.

Figura 24. Efecto de Np Inu-Quer a diferentes concentraciones (nM) en viabilidad celular de línea HDFa a 24 y 72 horas. Valores son presentados en promedio $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA con comparación múltiple de Dunnett, donde **** indica $p < 0.05$.

Figura 25. A) Dianas intracelulares de quercetina. Tanto los ROS como los estímulos externos de inflamación, activan una señalización intracelular capaz de causar una inflamación y/o dolor. Las flechas de color azul representan vías estimuladas por quercetina, y flechas rojas representan vías inhibidas por

flavonoides (Ferraz et al. 2020). **B)** Mediadores de inflamación y dolor inhibidos por inulina. Esquema representativo de lo obtenido por Khanna et al. (2020). Imagen creada en BioRender.com.

Figura 26. A) La acción inhibidora de Np Inu-Quer, Np Inu, Quercetina e inulina sobre la producción de NO en células RAW 264.7. Efecto con concentración 30nM, 24nM, 12 nM durante 8 horas. **B)** Viabilidad celular de los extractos a 8 horas en células RAW 264.7 a concentraciones de 30, 24, 12 nM. Estimuladas con 10 μ g/mL de LPS. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se evaluó con ANOVA de dos vías, con comparación múltiple de Dunnett. Donde, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 frente al grupo tratado con LPS.

- **TABLAS**

Tabla 1. Exponente n en la ecuación Peppas & Korsmeyer, mecanismo asignado para la liberación del fármaco de matrices poliméricas (Peppas, 1985).

Tabla 2. Interpretación de la mecánica de liberación con el valor de la potencia de tiempo (b) con la ecuación de Weibull (V. Papadopoulou et al., 2006).

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la quercetina (Nam et al. 2016).

Tabla 4. Diseño experimental. Variables independientes.

Tabla 5. Formulaciones obtenidas por el método de diseño de experimentos compuesto central de doble cara. Con un total de 21 experimentos.

Tabla 6. Formulación final para la síntesis de nanopartículas de inulina. Para minimización de tamaño, PDI, Z-Average.

Tabla 7. Tamaño promedio y tamaños mínimos y máximos de nanopartículas cargadas con quercetina. Microscopia de fluorescencia.

Tabla 8. ANOVA potencial zeta de muestras a 37 °C. Cuando hay presencia de diferentes letras en la misma columna, quiere decir que hay una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Tabla 9. Disposición de tamaños de partículas y PDI a temperaturas de carácter *in vitro*.

Tabla 10. Modelos matemáticos utilizados para la predicción de la mecánica de liberación.

* Para este modelo se utilizaron las primeras 3 horas de liberación a fin de descartar un efecto burst.

Tabla 11. Porcentaje de captación de radicales libres en Np Inu-Quer a diferentes estímulos (temperatura y pH). $\pm$ Medias con letras iguales no son significativas. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$).

Tabla 12. Resultados de viabilidad celular por ensayo MTS en las diferentes líneas celulares. Los resultados se presentan como un porcentaje promedio $\pm$ Desviación estándar. Donde la notación (*) indica (p . value < 0.05), (**) p . value < 0.01 , (***), p . value < 0.001 , y (****) p . value < 0.0001 , que indica diferencia significativa de las muestras control.

Tabla 13. Comparación múltiple de Tukey para resultados de producción de NO (%) por grupos de concentración (%). Los resultados se presentan como un porcentaje promedio $\pm$ Desviación estándar. Letras iguales representa diferencia significativa, donde $p < 0.05$.

ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	III
Agradecimientos.....	V
Glosario.....	IX
Figuras.....	XIII
Tablas.....	XVIII
Índice	XX
1.Introducción.....	1
2.Justificación.....	3

CAPÍTULO 1

3.Antecedentes.....	8
3.1. Nanogel.....	8
3.2. Nanopartículas cargadas.....	9
3.2.1. Liberación controlada de fármacos a través de nanopartículas	9
3.3. Administración peroral.....	11
3.4. Vectorización de nanopartículas.....	11
3.5. Nanopartículas entrecruzadas físicamente	13
3.6. Liberación controlada por hinchamiento	14

3.7. Liberación controlada químicamente	15
3.7.1. Liberación por sistemas erosionables	15
3.7.2. Liberación por sistemas con cadenas laterales.....	16
3.8. Modelos matemáticos de cinéticas de liberación	16
3.8.1. Modelo cinético Korsmeyer & Peppas.....	17
3.8.2. Modelo de Higuchi	18
3.8.3. Modelo de Weibull	20
3.9. Nanoestructuras en alimentos	21
3.10. Inulina.....	24
3.11. Uso de inulina como matriz polimérica	27
3.12. Síndrome metabólico.....	28
3.13. Flavonoides.....	29
3.14. Quercetina	32
3.14.1. Propiedades antiinflamatorias	34
3.14.2. Propiedades antidiabéticas	35
3.15. Metabolismo de la quercetina.....	36
3.16. Secado por aspersión	38
3.17. Modelos <i>in vitro</i>	40
3.17.1. Modelos celulares de hepatoma humano	40
3.17.2. Modelos celular caco-2.....	41

3.17.3. Modelo celular macrófagos murinos	41
4. Hipótesis	43
5. Objetivo general	43
6. Objetivos específicos	43

CAPÍTULO 2

7. Materiales.	47
8. Metodología.....	47
8.1. Diseño de experimentos	47
8.2. Síntesis de nanopartículas	49
8.3. Encapsulación por el método de secado por aspersión	49
8.4. Caracterización por dispersión de luz dinámica	50
8.5. Determinación de la eficiencia de carga de flavonoides.....	51
8.5.1 Flavonoides totales	51
8.5.2 Flavonoides libres.....	51
8.5.3. Eficiencia de encapsulación	52
8.6. Efecto de la temperatura sobre el tamaño de np inu-quer	53
8.7. Liberación <i>in vitro</i> en función del tiempo	53
8.8. Ensayo de viabilidad celular	54
8.8.1. Cultivo del líneas celulares	54
8.8.2. Ensayo de proliferación celular (MTS).....	54

8.9. Ensayo de óxido nítrico	55
8.9.1. Cultivo celular RAW 264.7.....	56
8.9.2. Medición de la concentración de óxido nítrico	57
8.9.3. Medición de la variabilidad celular en RAW 264.7	57
8.10. Evaluación de capacidad antioxidante (% de inhibición de DPPH).....	57
8.11. Microscopia de fluorescencia.....	58
8.12. Análisis estadísticos.....	59

CAPÍTULO 3

9. Resultados y discusiones.....	62
9.1. Diseño de experimentos.....	62
9.2. Síntesis de nanopartículas.....	65
9.3. Secado por aspersión	66
9.4. Caracterización por DLS	68
9.5. Microscopia de fluorescencia.....	71
9.6. Eficiencia de encapsulación y porcentaje de carga	75
9.7. Potencial zeta	77
9.8. Diseño de la curva de calibración.....	80
9.9. Efecto de la temperatura sobre el tamaño de nanopartículas cargadas	82

9.10. Efecto del pH sobre el tamaño de Np Inu-Quer	86
9.11. Efecto del pH en Np Inu-Quer sobre la liberación de quercetina	87
9.12. Cinética de liberación	89
9.13. Evaluación de capacidad antioxidante (% de inhibición de DPPH).....	93
9.14. Ensayo de viabilidad celular	97
9.14.1. Viabilidad en células Caco-2.....	98
9.14.2. Viabilidad celular en células HepG2	101
9.14.3. Viabilidad celular células HDFa.....	104
9.15. Análisis de óxido nítrico	109
10. Conclusiones.....	117
12. Referencias.	121
13. Anexo	135

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 25 años, las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) se han constituido como uno de los más grandes retos para el sector salud, debido a su incremento de mortalidad en México y el mundo (Barba,2018). Durante el 2017 en México fueron contabilizadas 622'647 defunciones por ECNT correspondientes al 88.6% del total de decesos de ese año, de este porcentaje, el 20.1% representa a muertes por enfermedades cardiovasculares, 15.2% diabetes mellitus y 12% a tumores malignos, seguidas por enfermedades de hígado, accidentes cerebrovasculares etc. (Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2018). La pieza clave para convertir a las ECNT en una nueva epidemia global tiene su origen en la mejora del desarrollo social, de infraestructura y la urbanización propio del país, propiciando así, cambios en el estilo de vida de la población, dando paso a "nuevos tipos de riesgo" como lo son estrés, tabaquismo, sedentarismo, y una dieta con alimentos de alta densidad energética (Córdova-Villalobos et al., 2008; Barba, 2018). Se estima que entre los años 2010 y 2030 el costo de las ECNT será de más de 30 billones de dólares a nivel mundial (Robles, 2018).

Se sabe que las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus y el cáncer están íntimamente relacionados con la condición llamada síndrome metabólico, que por lo que se sabe, dichas enfermedades crónicas mantienen una estrecha relación con el desbalance metabólico originado por malos hábitos de vida como ingesta de comidas poco saludables, inactividad física, exceso de alcohol y consumo de tabaco

y/o factores genéticos. Este síndrome se caracteriza por una serie de desórdenes metabólicos considerados como factor de riesgo (obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión y dislipidemia) para el desarrollo de enfermedades como son la diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Lizarzaburu, 2014; Carvajal, 2017)

Debido a este aumento de muertes en México a causa de las enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus y el cáncer; es de suma importancia buscar nuevas y más eficaces alternativas terapéuticas, que cumplan con requerimientos de seguridad y accesibilidad para la población mexicana.

2. JUSTIFICACIÓN

Basándonos en la problemática planteada sobre la falta de un tratamiento 100% eficaz y económico para los padecimientos relacionados con el síndrome metabólico, que aquejan a la población mexicana se ofrece como una alternativa terapéutica el uso de alimentos funcionales. Estos nacen de la demanda del consumidor por alimentos capaces de aportar al organismo nutrientes como proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, y a su vez un compuesto activo que tiene beneficios fisiológicos capaces de reducir enfermedades crónico-degenerativas.

Entre los compuestos bioactivos presentes en los alimentos funcionales, los más estudiados son aquellos que actúan como antioxidantes, antiolesterolémicos, anticancerígenos, etc. (Cruz, 2007). Un ejemplo son los compuestos fenólicos llamados flavonoides que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo-fenólicos, que cuentan con excelentes propiedades de quelación de hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante, desempeñando un papel fundamental en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, además; poseen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis y el cáncer (Martínez et al., 2002).

Uno de los flavonoides propuestos para este estudio es la quercetina, ya que ha demostrado tener propiedades anticancerígenas, anti-mutagénicas, apoptóticas,

anti-ateroescleróticas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antibacterianas y antivirales (Maalik et al., 2014; Ekström et al., 2011; Vicente et al., 2013).

Sin embargo, las características farmacocinéticas de los flavonoides, no presenta buena biodisponibilidad. En los alimentos, la quercetina se puede encontrar en forma de aglicona, de glicósido o incluso en ambas formas. La estructura mayoritaria en la que se presenta es unida a un azúcar, en forma de glicósido (Figura 1). De este modo presenta una absorción de 52% del total ingerido. El azúcar unido a la quercetina hace que la molécula sea más hidrofílica y que tenga mayor peso molecular. Por lo tanto, presenta menos capacidad de absorción por difusión pasiva y requiere transporte activo, a través, por ejemplo, del transportador de glucosa sodio dependiente (SGLT1) localizado en la pared del intestino delgado (Vicente et al., 2013).

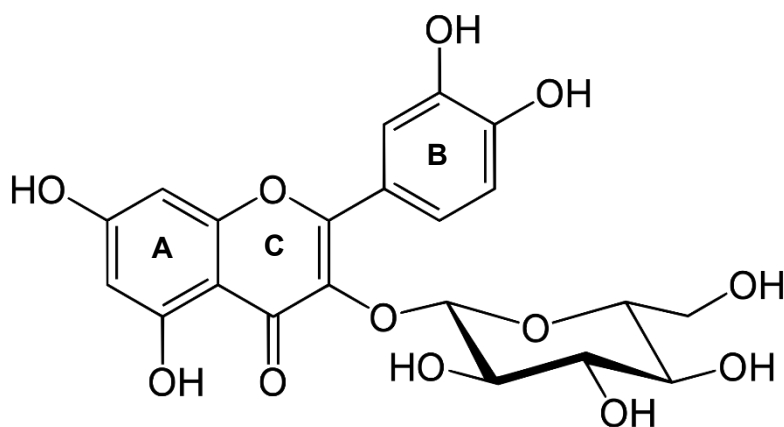


Figura 1. Estructura química del flavonoide: Quercetina. Imagen tomada de Fortunato et al. (2012).

Analizados estos datos de la capacidad de los flavonoides en enfermedades del síndrome metabólico se pretenden realizar estudios del comportamiento de la quercetina en una matriz polimérica a base de inulina para su posible absorción completa y eficaz para su posterior utilización en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico.

CAPITULO 1.

3. ANTECEDENTES

4. HIPOTESIS

5. OBJETIVO GENERAL

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

3. ANTECEDENTES

3.1. NANOGEL

Un nanogel es una red polimérica tridimensional reticulada capaz de absorber una gran cantidad de líquido sin disolverse debido a los enlaces físicos o químicos formados entre sus cadenas (Escalona et al.,2014). Estas redes presentan una serie de propiedades intrínsecas ideales para aplicaciones biomédicas, como un alto contenido acuoso, flexibilidad, compatibilidad celular y excelente dispersidad/solubilidad en agua además de que se hinchan en presencia de ella, aumentando apreciablemente su volumen mientras mantienen la forma hasta alcanzar el equilibrio fisicoquímico (Molina et al.,2015). Representacion grafica en la Figura 1.

Los nanogeles son materiales apropiados para aplicaciones en medicina debido a su buena interacción con los tejidos vivos, dado que por un lado muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, esto principalmente a su consistencia blanda, elástica y contenido de agua (Peñaranda et al.,2009). Por otro lado, son materiales inertes por lo que las células y proteínas no tienden a adherirse a su superficie. La termosensibilidad del nanogel es lograda gracias a la utilización de polímeros que presentan cambios en su estructura cuando el ambiente en donde se encuentra cambia de temperatura. Estos polímeros presentan una temperatura de transición de fase a partir de la cual su solubilidad en agua cambia drásticamente (Shang et al., 2013).

Hasta hace poco, no había consenso mundial sobre la definición de nanogeles; sin embargo, sobre la base de los resultados de varios grupos de investigación, las nanopartículas de gel de <200 nm de tamaño ahora se consideran nanogeles (Yallapu et al., 2011)



Figura 1. Ejemplo nanogel con red tridimensional reticulada (basado en Escalona et al., 2014).

Imagen realizada con BioRender.com.

3.2. NANOPARTÍCULAS CARGADAS

Cuando nos referimos a un sistema de liberación de fármacos por medio de nanopartículas es importante destacar que existen dos métodos utilizados para el cargado de nuestro compuesto activo de interés: uno es el método de adsorción/absorción, donde el principio activo es absorbido después de la formación de las nanopartículas. El segundo método es el de incorporación, nos referimos a cuando el principio activo se incorpora en el mismo medio.

3.2.1. LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE NANOPARTÍCULAS

Actualmente los métodos utilizados para evitar el desarrollo de enfermedades del síndrome metabólico, van desde el cambio del estilo de vida, pérdida de peso y

ejercicio. Esto también incluye el uso de fármacos para la reducción de estos factores de riesgo. (Bahadori et al., 2019)

La administración de nanocompuestos para la liberación de fármacos es una de las nuevas opciones terapéuticas estratégicas para la vectorización de principios activos, así como el aumento de la seguridad y eficacia de los tratamientos (Bahadori et al., 2019). Un ejemplo de los sistemas convencionales es en las terapias del cáncer, algunos fármacos no distinguen entre las células malignas y normales y en estos casos el fármaco puede ocasionar serios daños o incluso hasta la muerte, ya que cuenta con limitaciones, desde las altas dosis no focalizadas y la baja eficiencia (Yavuz et al., 2020; Escalona et al., 2014). Los sistemas conjugados polímero-fármaco pueden diseñarse para conseguir una vectorización del efecto hacia el órgano o células enfermas. Normalmente, la vectorización se logra uniendo al conjugado soluble, receptores específicos como anticuerpos, hormonas o carbohidratos, que idealmente serán reconocidos específicamente por receptores de la superficie de las células de la zona dañada (Reddy et al., 2012)

La liberación del fármaco desde una matriz polimérica puede deberse a tres tipos de mecanismos: liberación desde la superficie de las partículas, difusión a través de la matriz hinchada y liberación debido a la erosión del polímero (Bencherif et al., 2009)

Sin embargo, es importante tener en cuenta el coeficiente de difusión del principio activo a través del polímero, ya que esto garantizaría una velocidad de liberación constante a un tiempo determinado (Escalona et al.,2014)

3.3. ADMINISTRACIÓN PERORAL

Este tipo de administración se centra en la liberación de fármacos a través de la boca o tracto gastrointestinal (estómago, Intestino delgado, colon). Por lo que se ha estudiado a través de la última década la aplicación de los sistemas de nanopartículas para su uso en la liberación controlada de principios activos, ya que estos tienen la capacidad de atravesar barreras biológicas a través de difusión pasiva. También al modular sus propiedades de hinchamiento dependientes de un estímulo externo (temperatura, pH, energía, etc.) para controlar sus características (tamaño, forma, integridad física) podemos garantizar un aumento de tiempo de permanencia en zonas diana, y a su vez la concentración de principio activo deseado liberándose en el lugar. Esto se utiliza comúnmente para un tratamiento local o para garantizar una absorción sistémica (Martínez, 2017).

3.4. VECTORIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Cuando nos referimos a vectorización, hablamos de una liberación de principio activo sobre un sitio específico. Las estrategias para esta focalización son 3: Difusión pasiva, difusión activa y la liberación por estímulo (De la Torre,2019).

La difusión pasiva u orientación pasiva, Figura 2.1, se da mediante la adición de un principio activo en un sistema de tamaño nano molecular o incluso macromolecular, para que sea capaz de llegar a órgano o células dianas pasivamente (Oropesa et al.,2012). La difusión activa u orientación activa, Figura 2.2, se conoce que posee agente de direccionamiento, ya que va dirigida solo para ciertos tipos de células, esto gracias a la conjunción de ligandos selectivos en la superficie de las nanopartículas (Landín, 2016). Las interacciones entre estos ligandos y los receptores que encontramos expresados en células, nos permiten facilitar la internalización de las nanopartículas. Este sistema garantiza un aumento en la captación de principio activo (David, 2017).

Mientras que la liberación por estímulo, Figura 2.3, es caracterizada por transportadores de fármacos que, al producirse un cambio, ya sea físico o químico en el ambiente, suelen liberar su contenido. Este estímulo pueden ser cambios en el pH, temperatura, cambios magnéticos, exposición a luz o por biomoléculas propias del ambiente. Para que este tipo de liberación se lleve a cabo, los materiales que conforman al transportador deben presentar sensibilidad física por medio de protonación específica, escisión hidrolítica, cambios moleculares o supra moleculares (Mura S. et al. 2013).

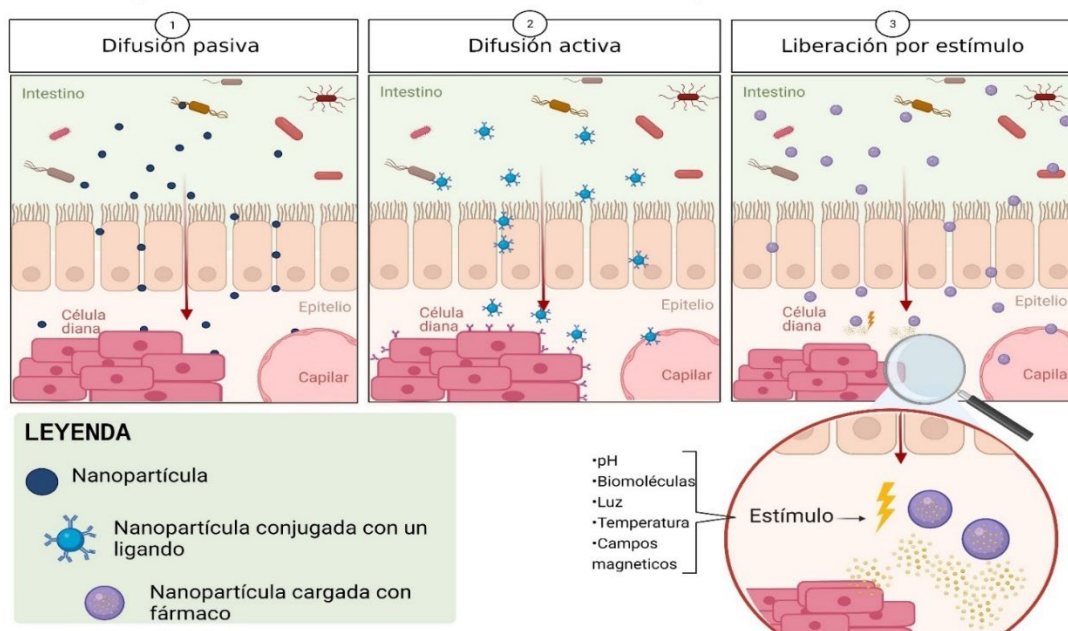


Figura 2. Estrategias de liberación vectorizada de nanopartículas en células diana. Imagen realizada con Biorender.com.

3.5. NANOPARTÍCULAS ENTRECruzADAS FÍSICAMENTE

Cuando hablamos de métodos físicos de entrecruzamiento nos referimos a la reticulación del fármaco en la matriz sin la necesidad de utilizar agentes químicos, ni foto-irradiación que podrían ser tóxicos para la salud y dañar la integridad de células y proteínas. Estos agentes suelen ser un inconveniente a la hora de su aplicación *in vivo*, ya que es necesario extraer antes de su aplicación, ocasionando un gasto económico a nivel industrial (Hernández, 2014). A través del tiempo estas técnicas se han popularizado debido a que presentan una alternativa eficaz de bio-producción (Gómez, 2018). No obstante, debido a que el entrecruzamiento físico

depende de la interacción de enlaces de hidrógeno o iónicas, incluso por cristalización, estos suelen ser sistemas inestables e impredecibles, ya que pueden ser reversibles por factores externos como el cambio de pH, el nivel de fuerza iónica del sistema de dispersión y la temperatura (Martínez, 2017)

3.6. LIBERACIÓN CONTROLADA POR HINCHAMIENTO

Este sistema se caracteriza por la relajación de las cadenas poliméricas que permite el paso del principio activo al medio de disolución, por lo tanto, la liberación del fármaco será proporcional a la velocidad del hinchamiento del polímero (Lizarzaburu, 2014; Martínez, 2017).

Una vez que se presenta el hinchamiento en el sistema polimérico, hay presencia de dos características: (1) La fase de hinchamiento: donde el estado vítreo se separa del estado elastomérico a determinada velocidad, (2) Interfase polimérica: Donde se presenta una separación entre el polímero hinchado y el medio de disolución. Representación gráfica en Figura 3.

La estructura química del material de matriz juega un papel importante en la capacidad de hinchamiento del nanogel, ya que puede llegar a presentar cambios conformacionales en presencia de estímulos como pH y/o temperatura. También la presencia de grupos funcionales que llegan a presentar ionización en el medio. Se sabe gracias a Ramírez et al. (2016) que la presencia de grupos funcionales aniónicos en los nanomateriales, determinan el grado de hinchamiento de las

nanopartículas, ya que se observa un aumento en el hinchamiento en presencia de cambios de pH, mientras que con grupos catiónicos hay una disminución del hinchamiento.

3.7. LIBERACIÓN CONTROLADA QUÍMICAMENTE

Este tipo de liberación se caracteriza por la intervención de algún disolvente o estímulo en la matriz polimérica. Esta reacción de liberación puede deberse por un ataque hidrolítico o enzimático a un enlace con características débiles, ionización o protonación (Sáez et al., 2004)

Actualmente se conocen dos subtipos de liberación controlada químicamente para sistemas matriciales. La liberación llevada a cabo por la erosión de la pared matricial y liberación por la relajación de las cadenas laterales del polímero (Zahin et al., 2020):

3.7.1. LIBERACIÓN POR SISTEMAS EROSIONABLES

La liberación por erosión sigue otras leyes a diferencia de las demás, ya que la fracción libre es igual a la cantidad de matriz hidrolizada. La erosión tiende a no ser una variable controlada, ya que tiende a ocurrir de forma gradual y la difusión de nuestro principio activo no es despreciable (Costa, 2004). Una de las grandes ventajas que posee la liberación por erosión del polímero, es la biocompatibilidad con el medio (Sevim et al., 2018).

3.7.2. LIBERACIÓN POR SISTEMAS CON CADENAS LATERALES

Este sistema se basa en la unión química del fármaco o principio activo a las cadenas poliméricas de la pared matricial. Esta unión llega a desprenderse por una ruptura hidrolítica o de tipo enzimático por parte de los enlaces (Martínez, 2017).

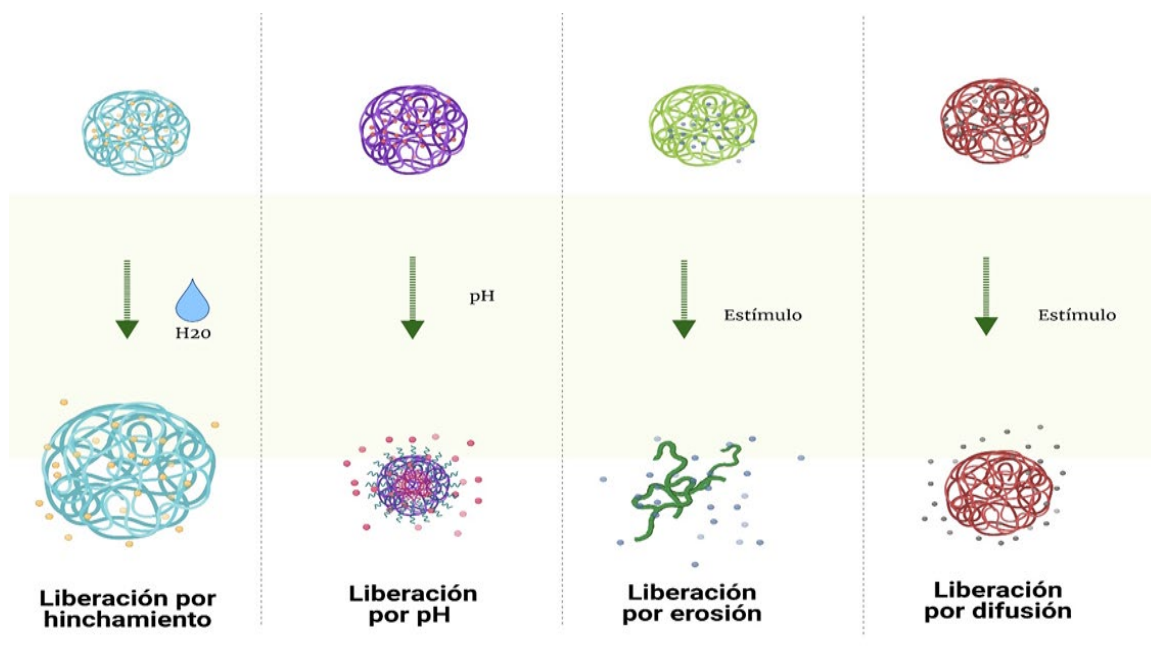


Figura 3. Tipos de liberación en sistemas matriciales. Imagen creada en BioRender.com.

3.8. MODELOS MATEMÁTICOS DE CINÉTICAS DE LIBERACIÓN

Actualmente se cuenta con una serie de modelos matemáticos con los cuales es posible predecir la cinética y mecanismos de liberación que llegan a presentar los sistemas matriciales. Esto debido a que es normal encontrar más de un sistema de

liberación (difusión, hinchamiento, erosión, etc.), Se debe considerar que la liberación del principio activo está estrechamente relacionada con la naturaleza del principio activo, el agente encapsulante y el medio de disolución (Caucoto, 2014).

Entre los modelos matemáticos para predicción de cinética de liberación encontramos a: Korsmeyer & Peppas, Higuchi, y Hixson-Crowell y se describen a continuación:

3.8.1. MODELO CINÉTICO KORSMEYER & PEPPAS

Este modelo se desarrolló a fin de relacionar la liberación del principio activo en contraste con el tiempo, gracias a una ecuación exponencial. Se emplea para explicar el mecanismo en donde se presenta una erosión y/o disolución de matriz. Este modelo es principalmente, para un ajuste del 60%-70% de la cantidad de principio activo liberado

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1)$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco liberado en t (tiempo), M_∞ es la cantidad total de fármaco liberado o que se liberará en un tiempo infinito, k es la constante cinética, y n es el exponente difusional (Martínez, 2017). Un valor de n igual a 0.5, nos dice que el mecanismo de liberación es de tipo Fickiano; cuando n va de 0.5-1 nos indica un mecanismo de liberación no Fickiano, y si n es igual a 1, es un mecanismo de orden cero. Para valores que sobrepasan 1, la liberación es debido

a la relajación de las cadenas poliméricas de la pared matricial (Jiménez, 2017). Esta ecuación no es más que una forma generalizada de la ecuación de Higuchi.

El uso de esta fórmula conlleva a un determinado perfil de condiciones que se deben cumplir para su aplicación:

- El vehículo debe ser de geometría plana y no degradable.
- La liberación debe ser unidimensional. Ya que solo presenta buenos resultados cuando hay una relación de diámetro/ espesor o ancho/ espesor de 10/1
- La difusión del principio activo debe ser independiente de la concentración del soluto.
- Como se menciona anteriormente $M_t/M_\infty \leq 0.60$.

Tabla 1. Exponente n en la ecuación Peppas & Korsmeyer, mecanismo asignado para la liberación del fármaco de matrices poliméricas (Peppas, 1985).

Capa delgada	Cilindro	Esfera	Mecanismo de Liberación
0.5	0.45	0.43	Difusión "Fickiana"
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Transporte anómalo
1	0.89	0.85	Transporte tipo II

3.8.2. MODELO DE HIGUCHI

Con este modelo se predice el proceso de liberación a partir de la superficie o cara de la matriz polimérica a favor del gradiente de concentración. Es aplicable cuando el hinchamiento y erosión tienden a un comportamiento depreciable.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (2)$$

En donde M_t representa la cantidad del principio activo en el tiempo (t), M_∞ es la cantidad de principio activo que se liberó a tiempo infinito y k es la constante de velocidad de liberación (Siepmann y Peppas, 2011). Esto dará lugar a una línea recta si el sistema se ajusta al modelo.

El valor de n nos ayuda a la predicción del mecanismo de liberación, en general:

- Si n es 0.43-0.5: Indica liberación por difusión de Fick (Se puede aplicar Higuchi después).
- Si n es 0.85-1: Indica relajación de las cadenas laterales del polímero (Caso II). Aquí la liberación es independiente de la cantidad de fármaco libre, ya que es constante con el tiempo.
- Si n se encuentra entre los dos casos anteriores; La liberación se está llevando a cabo por más de dos mecanismos (difusión, relajación de cadenas laterales), a esto se le conoce como transporte anómalo. Se puede utilizar el modelo de orden uno o modelo de Peppas-Sahlin.
- Si n es mayor a 1: Se le conoce como transporte super caso II, ya que este presenta tiempos de liberación muy elevados (Martínez, 2017).

- Si n es <0.50 : se confirma la existencia de otro método de liberación diferente al de difusión

3.8.3. MODELO DE WEIBULL

Este modelo se utiliza principalmente en la comparación de disolución de fármacos de matrices poliméricas

$$M = M_0 \left[1 - e^{-(t-T)b/a} \right] \quad (3)$$

Donde M representa la cantidad de fármaco disuelto a t , tiempo, M_0 es el total del fármaco liberado, y T es el intervalo de tiempo analizado en el proceso. “ a ” y “ b ” son escalas de tiempo diferentes del tiempo y la forma de la curva de disolución, respectivamente.

Se utiliza “ b ” para la interpretación de la mecánica de liberación sobre tiempo.

Donde:

Tabla 2. Interpretación de la mecánica de liberación con el valor de la potencia de tiempo (b) con la ecuación de Weibull (V. Papadopoulou et al., 2006).

b	Interpretación de la mecanica de liberación
<0.35	Espacios altamente en desorden.
$0.35-0.69$	Difusión en un sustrato fractal.
$0.69-0.75$	Difusión en un espacio euclidiano normal.
$0.75-1$	Difusión en un espacio euclidiano normal, con otros mecanismos implicados en la liberacion.

3.9. NANOESTRUCTURAS EN ALIMENTOS

La encapsulación de componentes activos se presenta hoy día como una tecnología en expansión con un alto potencial de aplicaciones tanto como en el área farmacéutica e industria alimenticia (Huang et al., 2010). Con un enfoque nanotecnológico se pretende generar una innovación en las características organolépticas de los alimentos, como textura, sabor, atributos sensoriales, fuerza de coloración, procesabilidad y estabilidad durante la vida útil, lo que lleva a una amplia gama de posibilidades para la creación de productos nuevos (Ezhilarasi et al., 2013).

La efectividad de los productos nutraceuticos en la prevención de enfermedades depende de la preservación de la biodisponibilidad de los ingredientes activos (Singh, 2016). Esto representa un desafío formidable, dado que solo queda una pequeña proporción de moléculas disponibles después de la administración oral, debido a un tiempo de residencia gástrico insuficiente, baja permeabilidad y / o solubilidad dentro del intestino, así como inestabilidad en condiciones encontradas en el procesamiento de alimentos (temperatura, oxígeno, luz) o en el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, presencia de otros nutrientes), todo lo cual limita la actividad y los posibles beneficios para la salud de las moléculas con función nutraceutica (Tapal et al., 2012).

Se sabe que la adición o fortificación con estos nanoencapsulados en los alimentos que hacen parte de la canasta básica familiar, es una de las estrategias

más empleadas para prevenir y eliminar las deficiencias nutricionales y también para la prevención de enfermedades, gracias a que estos alimentos logran llegar a gran parte de una determinada población (Guerra et al., 2016).

Un ejemplo muy conocido de la aplicación de nanopartículas en alimentos son las de óxido de hierro, usado como colorante alimenticio. Las nanoestructuras de hierro son útiles para enriquecer ciertos alimentos y compuestos con este metal, ya que la deficiencia de este micronutriente en la salud humana es una de las más comunes (Ávalos, 2016).

En lo que respecta a la nanotecnología en alimentos procesados. El uso de nanopartículas en diversos campos de la ciencia de los alimentos y la microbiología de los alimentos, incluido el procesamiento de alimentos, el envasado, el desarrollo funcional de alimentos, la seguridad alimenticia, la detección de patógenos transmitidos por alimentos y la extensión de la vida útil de los alimentos y / o productos alimenticios (Singh et al., 2017). El tamaño de partícula puede afectar directamente el suministro de cualquier compuesto bioactivo a varios sitios dentro del cuerpo, ya que se observó que, en algunas líneas celulares, solo las nanopartículas submicrométricas se pueden absorber de manera eficiente, pero no las micropartículas de mayor tamaño (Ezhilarasi et al., 2013).

Un sistema de administración ideal debe tener las siguientes propiedades: (i) capaz de administrar el compuesto activo con precisión en el lugar objetivo (ii) garantizar la disponibilidad a un tiempo objetivo y una velocidad específica, y (iii)

eficiente para mantener los compuestos activos en niveles adecuados por largos períodos de tiempo (en condiciones de almacenamiento) (Singh et al. 2017).

Los ingredientes alimenticios nano-estructurados se están desarrollando con la afirmación de que ofrecen un sabor, textura y consistencia mejorados (Singh et al., 2017). La nanotecnología aumenta la vida útil de diferentes tipos de materiales alimenticios y también ayuda a reducir el desperdicio de alimentos debido a la infestación microbiana (Pradhan et al., 2015).

La nanotecnología aplicada en la formación de encapsulados, emulsiones, matrices de biopolímeros, soluciones simples y coloides de asociación ofrece sistemas de entrega eficientes. Los nano-polímeros están tratando de reemplazar los materiales convencionales en el envasado de alimentos (Singh, 2016), esto debido a la demanda mundial en material de productividad segura y sostenible para evitar un impacto ambiental. Esta implementación tiene como ventajas: Innovación tecnológica, tamaños compactos sin afectar el rendimiento, mayor conservación de alimentos y aumento de la vida útil (Elizondo et al., 2011).

Las nanopartículas tienen mejores propiedades de encapsulación y eficiencia de liberación que los sistemas de encapsulación tradicionales. Las nano-encapsulaciones enmascaran olores, sabores, controlan las interacciones de los ingredientes activos con la matriz alimentaria, controlan la liberación de los agentes activos, aseguran la disponibilidad a un tiempo objetivo y una tasa específica, y los protegen de la humedad, el calor (Ubbink et al., 2006), químicos, o degradación

biológica durante el procesamiento, almacenamiento y utilización, y también exhiben compatibilidad con otros compuestos en el sistema (Weiss et al., 2006). Además, estos sistemas de suministro poseen la capacidad de penetrar profundamente en los tejidos debido a su tamaño más pequeño y, por lo tanto, permiten el suministro eficiente de compuestos activos a los sitios objetivo del cuerpo (Lamprecht et al., 2004).

3.10. INULINA

Los enlaces β - (2-1) D-frutósil fructosa están presentes entre las unidades de fructosa de inulina y la configuración β del carbono anomérico, lo que hace que no sea digerible en el intestino delgado humano, sin embargo, puede ser fermentado en el intestino grueso por la microbiota intestinal (Figura 4) (Shoaib et al., 2016).

El fructano de tipo inulina consiste en unidades de β -D-fructosilo unidas linealmente ($2 \rightarrow 1$), enlazadas al resto fructosilo de sacarosa. En la inulina de achicoria, el número de unidades de fructosa varía de 2 a 60 lo que indica una combinación de oligómeros y polímeros (A.C Apolinário et al., 2014; Paixão et al., 2013).

La inulina actúa como fibra dietética, ya que es un ingrediente alimenticio no digerible, siendo degradada solo por la microbiota del colon, lo que significa que tiene acción prebiótica (Beirão-da-Costa et al., 2013). Llevada a cabo la fermentación por bacterias sacarolíticas, se liberan metabolitos que llegan a

promover funciones fisiológicas como la proliferación de mucosa, inflamación, carcinogénesis y eliminación de compuestos nitrogenados (Marti del Moral et al., 2003).

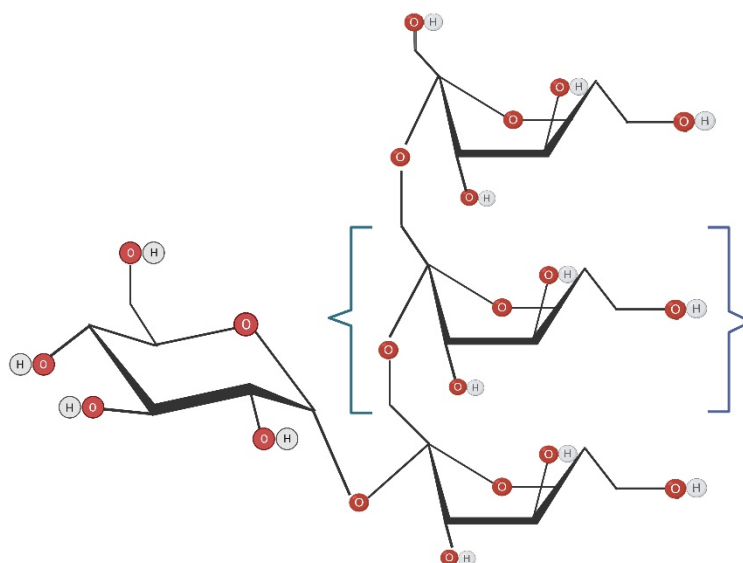


Figura 4. Estructura química de la inulina. Imagen creada por BioRender.com.

En el intestino, la inulina se convierte en ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, del inglés short-chain fatty acids), que luego se convierten en cetonas saludables que alimentan a los tejidos. Los SCFAs también pueden nutrir a las células del intestino grueso y producir más hormonas que controlan el apetito en el cuerpo (Shoaib et al., 2016). También tienen influencia en el aporte de energía de los colonocitos, esto origina un efecto protector contra enfermedades metabólicas como la diabetes, y contra la obesidad (Den Besten et al., 2013).

El DP (Grado de polimerización) y las ramificaciones están asociados a la funcionalidad y propiedades físico-químicas de una macromolécula, siendo en inulina vegetal relativamente baja (máximo < 200). Por otro lado, la inulina presente en las bacterias tiene un DP muy alto, que oscila entre 10.000 y más de 100.000; además, una inulina bacteriana es un 5% más ramificada que la inulina vegetal (Apolinário et al., 2014).

Como se mencionaba anteriormente, las propiedades fisicoquímicas de la inulina están estrechamente relacionadas con su DP (Mudannayake et al., 2015). La fracción de cadena corta, oligofructosa, tiende a presentar una solubilidad más alta y con un característico sabor más dulce, que la inulina nativa, mientras que la fracción de cadena larga es menos soluble, más viscosa y más termoestable que la inulina nativa (Apolinario et al., 2014).

En apariencia, se trata de un polvo blanco inoloro y de sabor neutro, con partículas finas que tienen mayor claridad (Saavedra et al., 2014). La mayoría de sus propiedades físicas se establecen a partir de un sistema en estado sólido, donde las moléculas tienen una movilidad restringida

La solubilidad de la inulina en agua aumenta notablemente con la temperatura, observándose solubilidades casi nulas a 25 °C y alcanzando aproximadamente el 35% (p/v) a 90 °C. La solubilidad puede disminuir al aumentar el DP (Mudannayake et al., 2015). Partes de la estructura molecular, específicamente los grupos hidroxilo, son más capaces de interactuar con el agua que otras partes. Esto proporciona a la

inulina cierto carácter tensioactivo y es capaz de formar geles estables con agua en concentraciones de 13-50%. Las propiedades gelificantes para inulina de achicoria estándar e inulina de cadena larga pueden ser mayores del 25% y 15%, respectivamente.

Sin embargo, la estabilidad química de la inulina disminuye en entornos ácidos a $\text{pH} \leq 4$ debido al tiempo de calentamiento y al aumento de temperatura, limitando así las aplicaciones de inulina en alimentos ácidos, especialmente calentados a temperaturas superiores a 60 °C (Öztürk et.al., 2017).

3.11. USO DE INULINA COMO MATRIZ POLIMÉRICA

A través de los últimos años se ha estudiado la posibilidad de utilizar ingredientes y/o materiales con la capacidad de poseer propiedades físicas que proporcionen una pared o matriz protectora en lo que respecta a la encapsulación de alimentos y fármacos. Este tipo de protección ofrece una estabilidad química, y protección ante agentes externos.

Uno de los materiales que han presentado una excelente opción para la formación de una matriz protectora es la inulina, que aparte de tener un costo bajo, tiene propiedades benéficas para su consumo humano (Castel et al., 2018).

Las propiedades fisicoquímicas de la inulina como su capacidad de formar gel y temperatura de transición vítrea, entre otras, han sido estudiadas con el objetivo de

tener información sobre el comportamiento reológico de esta, cuando es adicionada a un sistema alimenticio. El gel de inulina es una red tridimensional de partículas sub micrómicas insolubles con gran cantidad de agua inmovilizada la cual asegura la estabilidad física. Cuando las concentraciones exceden el 15%, la inulina tiene la capacidad de formar gel o crema (Muñoz et al., 2012).

La longitud, composición y polidispersidad de las cadenas que incorporan unidades de fructosa en la inulina dependen de la especie vegetal, la fase de su ciclo de vida, la fecha de recolección y los procedimientos de extracción y post extracción (Abed et al., 2016).

3.12. SÍNDROME METABÓLICO

Se le conoce como inflamación a la respuesta patológica a diversos estímulos externos. Esta reacción ha sido estudiada a través de los años por su relación intrínseca en el desarrollo de muchas enfermedades crónicas (Inflamación del intestino, enfermedades cardiovasculares, diversos tipos de cánceres, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y artritis reumatoide) (T. Li et al., 2019).

Es diagnosticada clínicamente cuando un individuo presenta tres o más de las siguientes condiciones: Aumento de la circunferencia de la cintura, hipertensión, resistencia a la insulina, triglicéridos altos y niveles bajos de colesterol HDL.

(Alqahtani et al., 2020). Su desarrollo se manifiesta por factores genéticos, ambientales e ingesta de alimentos sin valor nutricional (Prieto-Gómez et al., 2017)

3.13. FLAVONOIDES

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etcétera (Martínez-Flórez et al., 2002). En la Figura 5, se presentan las estructuras básicas de los flavonoides más comunes.

Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis y cáncer.

Algunos flavonoides, como la catequina y la quercetina pueden captar directamente especies reactivas de oxígeno (ROS), como superóxido (O_2^-), agua oxigenada (H_2O_2) o ácido hipocloroso ($HOCl$), que pueden ser muy dañinos para lípidos, proteínas y ADN. Los flavonoides actúan capturando radicales libres con formación del radical flavínico, mucho menos reactivo, ya que los electrones desapareados están más deslocalizados. Los flavonoides también pueden quelar

iones metálicos de transición (hierro y cobre), lo que evitaría la formación de ROS obtenidos por la reacción de Fenton (De Luis et al., 2008). La capacidad para modular la actividad de muchas enzimas y, consecuentemente, interferir en los mecanismos de señalización y otros procesos celulares puede deberse, en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos. La presencia de grupos hidroxilos aromáticos, que son relativamente reactivos, permite el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes y la posibilidad de formar complejos con iones metálicos como el cobre (Cu^{2+}) y el hierro (Fe^{2+}). Esto último limita la actividad de estos iones para interactuar con proteínas, para hacerlo con moléculas más simples, tales como radicales o intervenir en reacciones de oxidación y reducción (Álvarez et al., 2003)

Se ha propuesto que los flavonoides ejercen efectos beneficiosos en la prevención de una gran cantidad de enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y de carácter antiinflamatorio. Recientemente hemos revisado la evidencia en constante crecimiento que respalda el papel beneficioso de los flavonoles en enfermedades crónico degenerativas y los posibles objetivos moleculares involucrados (Chávez et al., 2016; De Luis et al., 2008; Maalik et al., 2014). Sin embargo, algunas preguntas fundamentales con respecto a la eficacia, el mecanismo de acción y la biodisponibilidad de los flavonoides siguen sin respuestas.

Pese a la amplia diversidad de efectos que han mostrado los flavonoides *in vitro* y *ex-vivo*, estos han mostrado ser muy poco solubles, poco biodisponibles, y

altamente bio-transformados en el organismo. A esto se le conoce como la paradoja de los flavonoides (Pérez et al., 2012). Uno de los factores que afecta en la solubilidad de este compuesto es que se encuentran presentes en formas glicosiladas, con azúcares asociados como glucosa o ramanosa comúnmente, sin embargo, también se encuentran azúcares como galactosa, xilosa y ácido glucurónico.

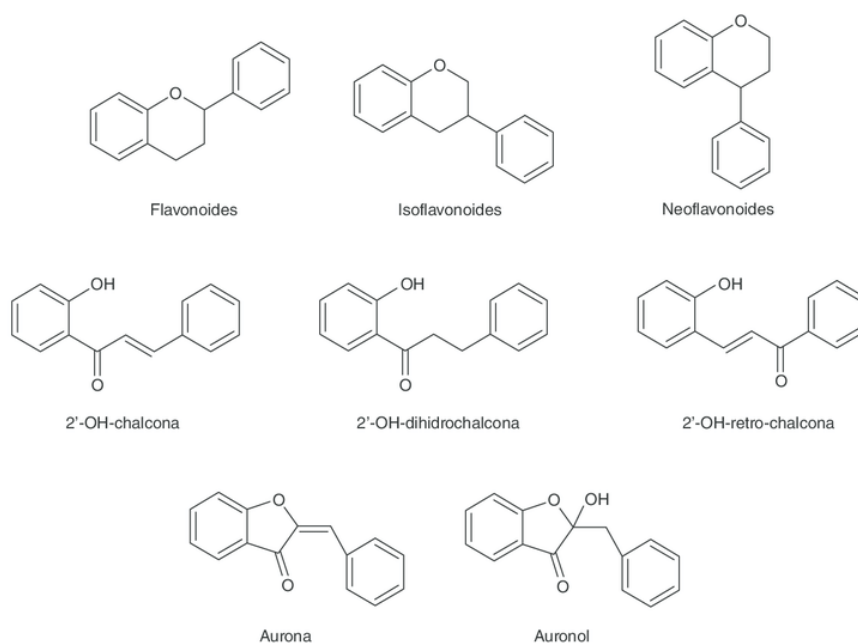


Figura 5. Tipos de flavonoides más básicos según su estructura (Cabrera 2009).

Tras varios estudios, se llega a la conclusión que lo que podría alcanzar sus objetivos biológicos son los metabolitos conjugados. Sin embargo, los niveles de los metabolitos circulantes son bajos (menos de 1 micro Molar) y su vida media en plasma es muy corta de 1 a 2 horas. La información disponible sobre los efectos *in*

vitro de estos metabolitos indica que son menos activos que los compuestos originales y, a menudo, totalmente inactivos (Barat et al., 2020).

3.14. QUERCETINA

El grupo más representativo de flavonoides presente en los alimentos es la quercetina, presente en cebolla (con 1.2 g/Kg de peso fresco), el vino tinto y el té que contienen hasta 45 mg/L, manzana y frijol negro (Rodríguez, 2017). La quercetina es un ácido débil que presentan baja solubilidad en agua y posee un pKa cercano a 6. También se informa que tiene efecto sobre el aumento de la apoptosis celular mutada mediante la modulación de las vías de señalización celular, lo que deriva en la inhibición del crecimiento del cáncer (Nam et al., 2016). Esta actividad se llega a presentar contra diferentes líneas celulares de cáncer como la leucemia HL-60, cáncer de colon SW-480, el cáncer de mama murino 4T1 y las células tumorales epidermoides A431 (Yuan et al., 2012; Shan et al., 2009; Kim et al., 2013; Huang et al., 1999)

Sin embargo, la aplicación de quercetina en productos farmacéuticos todavía es limitada debido a su escasa biodisponibilidad, naturaleza hidrófoba y baja estabilidad. Después de la ingestión oral, los flavonoides están sujetos a modificaciones químicas dentro del tracto gastrointestinal por las enzimas del huésped y la microbiota y luego se metabolizan después de la absorción en la pared intestinal, el hígado y los tejidos periféricos (Zeng et al., 2021). La matriz alimentaria también puede influir en el metabolismo y la absorción gastrointestinal. Por lo tanto,

dentro de nuestra dieta diaria habitual, una multitud de compuestos están presentes en la luz, la sangre y los tejidos gastrointestinales. Las concentraciones alcanzadas para la mayoría de estas sustancias están por debajo del rango micromolar (Wandersleben et al., 2018)

La mayoría de la quercetina se metaboliza en el intestino y el hígado después de la administración oral, y solo el 5,3% de la quercetina no modificada está biodisponible. Además, la quercetina se destaca por tener baja solubilidad y es propensa a cambiar bajo condiciones encontradas durante el procesamiento de alimentos y productos farmacéuticos e inestabilidad en medio fisiológico (Li et al., 2018; Kumari et al., 2010).

Makris y Rossiter (2000) comentan que la descomposición oxidativa de la quercetina se presenta en un medio de tampón de fosfato de pH 8. Las concentraciones de quercetina llegan a disminuir después de 240 min a 97 °C hasta un 16% con una velocidad de degradación de 4.3×10^{-5} mM/s. A continuación, en la Tabla 3, se presentan las características fisicoquímicas de la quercetina:

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la quercetina (Nam et al., 2016).

Característica		Quercetina
Masa molar (g/mol)		302.238
pKa		6.38
Log P		2.16
Solubilidad	Agua	0.00215
	Metanol	27.8

3.14.1. PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS

Poco se sabe sobre los mecanismos de acción que llega a presentar la quercetina para ejercer sus propiedades antiinflamatorias. Una de las teorías más acertada es que inhibe la actividad del ácido araquidónico por medio de la fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX). Como también la inhibición de la enzima encargada de la producción de óxido nítrico (enzima óxido nítrico sintasa). El resultado de estas inhibiciones es la disminución de mediadores de la inflamación como lo son ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y óxido nítrico (Pourcel et al. 2005).

Sin embargo, a diferencia de los demás flavonoides, quercetina y epicatequin-3-galato, activan ATP-Binding cassette-A1, mejor conocido con el transportador

ABCA1. También reduce proteínas quimio atrayente de macrófagos tipo 1 (MCP-1) e inhiben la producción de PCR (Maravillas, 2017).

En la Figura 6, podemos observar las diferentes rutas que la quercetina es capaz de tomar *in vitro*, atacando diferentes blancos terapéuticos a fin de causar un beneficio protector en la salud del consumidor.

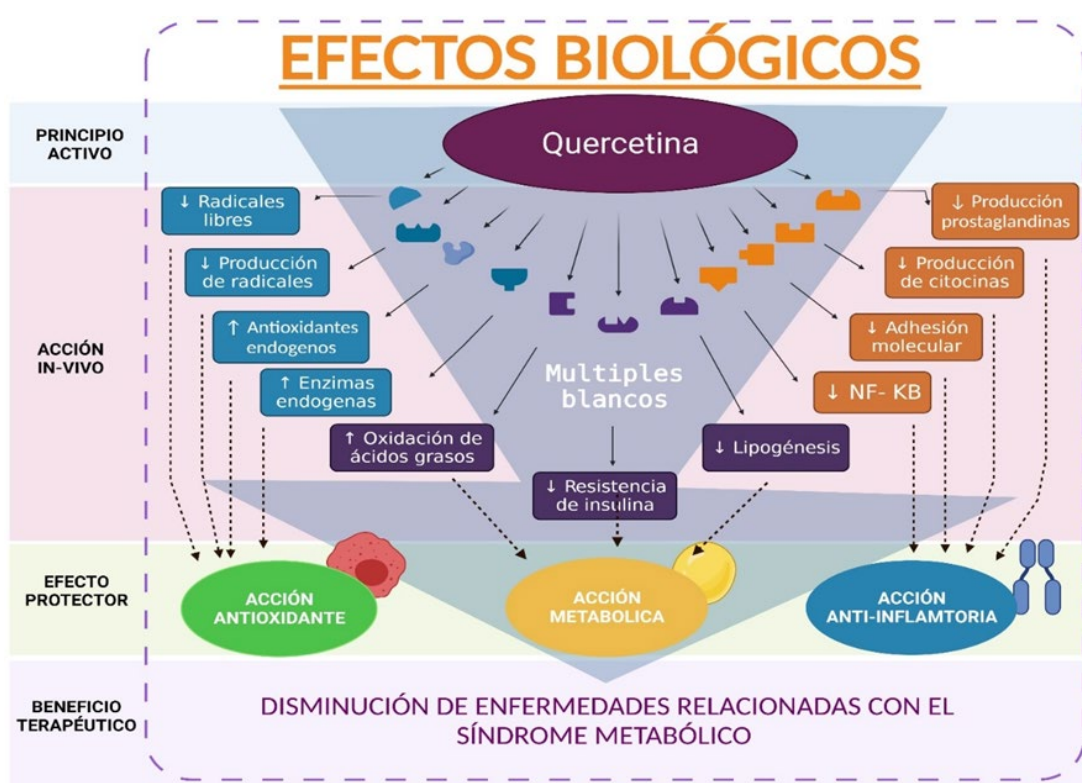


Figura 6. Representación de los diferentes efectos de la quercetina en un sistema *in vivo* (Zeng et al., 2021). Imagen realizada en BioRender.com.

3.14.2. PROPIEDADES ANTIDIABÉTICAS

Varios han sido los trabajos publicados que destacan las propiedades de la quercetina como promotor de la adipogénesis. Perdicaro et al. (2020) mostraron resultados donde quercetina redujo significativamente los tamaños de adipocitos en ratas, específicamente en el tejido adiposo blanco del epidídimo; mejoro la angiogénesis y la adipogénesis y atenuó la resistencia a la insulina y la inflamación. Ellos confirman que el uso de quercetina en una dieta promueve una expansión positiva en los adipocitos, logrando que mejore la angiogénesis y la adipogénesis. Estos factores contribuyen en reducir la hipertrofia adiposa, la inflamación y la resistencia a la insulina.

3.15. METABOLISMO DE LA QUERCETINA

La quercetina es altamente sensible a la temperatura, encontrándose productos de degradación desde los 35 ° C. La degradación térmica de quercetina disminuye en medio ácido, mientras que, en medio básico, la aglicona está sujeta a procesos de autooxidación, independientemente de la temperatura. Se sabe gracias a Jing Wang & Zhao que la velocidad de degradación de quercetina a 37 ° C llega a aumentar hasta 12 veces cuando se modifica el pH de 6.0 a 7.5 (Wang, 2016)

Se ha aclarado durante la última década que, a pesar de que la quercetina no está presente en el plasma como aglicona, sí está presente conjugada con ácido glucurónico y sulfato.

Los glucósidos son hidrolizados por la boca y las bacterias intestinales por la lactasa floridizina hidrolasa en las células epiteliales, pero algunos también pueden absorberse intactos a través del transportador de glucosa SGLT1 para hidrolizarse intracelularmente. Estos glucósidos también son hidrolizados por la actividad bacteriana en el colon donde se forman las aglicona (Kumari et al., 2010). La quercetina se conjuga rápidamente con ácido glucurónico y / o sulfato durante el metabolismo de primer paso en la pared intestinal o en el hígado, donde puede ser que una parte de los metabolitos también se metilan. Las enzimas responsables de estos procesos metabólicos son UDP glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas y metiltransferasas y los principales metabolitos de la quercetina en el plasma humano son la quercetina-3-glucurónido, la quercetina-3 -Sulfato e isorhamnetina-3 glucurónico (3-Metil-quercetina-3-glucurónido) (Boelens et al., 2018). Estas moléculas suelen retenerse en el intestino grueso por 6 horas en una administración oral (Figura 7).

Sin embargo, debido a la naturaleza de la molécula de quercetina, esta suele presentar problemas de estabilidad química en medio alcalino, posiblemente por el ataque de iones hidroxilos en el anillo C, que es donde se localiza el grupo hidroxilo, anteriormente visto en la Figura 1.

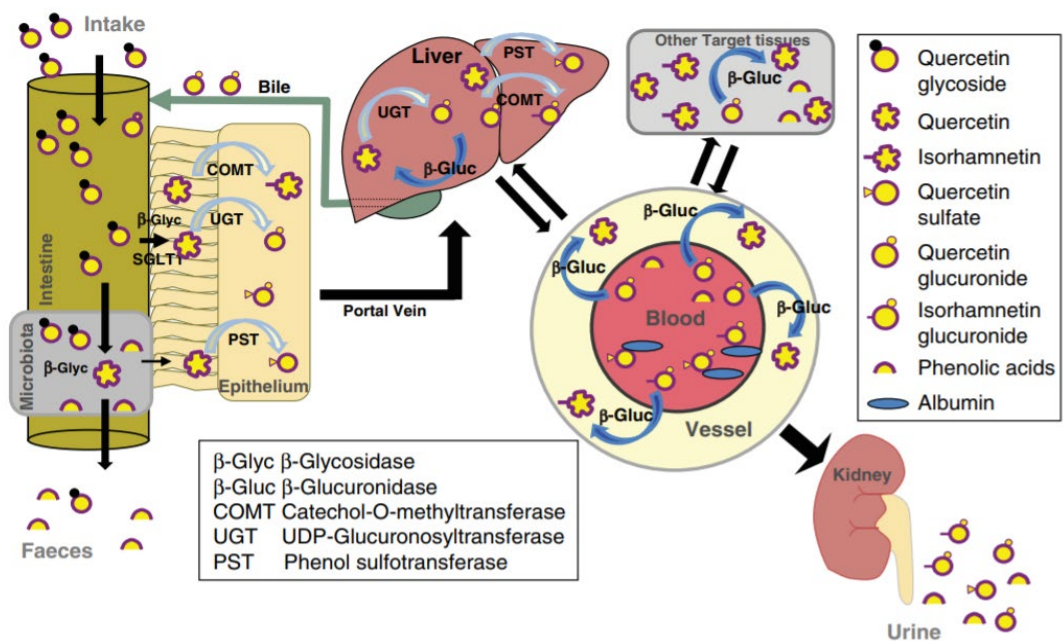


Figura 7. Esquema farmacocinético de la quercetina. Tomada de Pérez et al. (2012).

3.16. SECADO POR ASPERSIÓN

El secado por aspersión se aplica ampliamente en la industria farmacéutica para producir medicamentos, excipientes en bruto o hacer el proceso de microencapsulación. Esta técnica transforma las soluciones líquidas en polvo seco en un solo paso y es factible para la ampliación de la microencapsulación en una operación de procesamiento continuo de partículas que se puede usar en una amplia variedad de materiales (Karine et al., 2009).

Diferentes autores han confirmado que la utilización de esta técnica, garantiza la estabilidad de las moléculas, así como las propiedades; Un ejemplo de estudio es el elaborado por F. Sansone et al. (2011) donde por medio de microscopio

electrónico de barrido (MEB) y dispersión de luz dinámica (DLS), llegan a la conclusión que la técnica de secado por aspersion es idónea para microencapsular y estabilizar flavonoides (Sansone et al., 2011).

Las nanopartículas tienen mejores propiedades de encapsulación y eficiencia de liberación que los sistemas de encapsulación tradicionales. Las nano-encapsulaciones enmascaran olores, sabores, controlan las interacciones de los ingredientes activos con la matriz alimentaria, controlan la liberación de los agentes activos, aseguran la disponibilidad a un tiempo objetivo y una tasa específica, y los protegen de la humedad, el calor (Ubbink et al., 2006), químicos, o degradación biológica durante el procesamiento, almacenamiento y utilización, y también exhiben compatibilidad con otros compuestos en el sistema (Weiss et al., 2006). Además, estos sistemas de suministro poseen la capacidad de penetrar profundamente en los tejidos debido a su tamaño más pequeño y, por lo tanto, permiten el suministro eficiente de compuestos activos a los sitios objetivo del cuerpo (Lamprecht et al., 2004).

Con esta técnica de encapsulación, la morfología de partículas obtenidas es generalmente esférica, con un tamaño que va de 10-50 μm . Sin embargo, este tamaño está estrechamente relacionado con el fluido de alimentación, así como las condiciones de operación. Muchas veces esta técnica es considerada como ‘técnica de inmovilización’ más que de encapsulación, ya que parte de los activos tienden a quedarse expuestos en la superficie de la partícula (Caucoto, 2014).

3.17. MODELOS *IN VITRO*

Uno de los recursos más importantes para poner a prueba hipótesis en el desarrollo de nuevos modelos experimentales es la utilización de modelos *in vitro*. Estos simulan condiciones naturales que se aproximan a resultados que se podrían presentar en experimentos *in-vivo* (Fina, 2013).

Estos modelos nos sirven como referencia de la capacidad de fungir como herramientas para el análisis de su comportamiento *in-vivo* (Escobedo et al., 2015). A continuación, se mencionan algunos de los modelos celulares más utilizados que se aproximan a resultados que se podrían presentar en experimentos *in-vivo* (Fina, 2013).

3.17.1. MODELOS CELULARES DE HEPATOMA HUMANO

El hecho de que el hígado sea el órgano más activo en el metabolismo de los fármacos lo convierte en una diana muy vulnerable. De hecho, la hepatitis tóxica constituye el 14% de los casos de lesión hepática que ingresan en un hospital y son una de las causas principales de fallo hepático agudo requiriendo con frecuencia un trasplante hepático (Escalona et al., 2014; Yallapu et al., 2011). Además, la hepatotoxicidad supone la causa principal de la interrupción del desarrollo pre clínico y clínico de nuevos medicamentos, así como de la retirada del mercado o de restricción de las indicaciones de fármacos ya aprobados.

La línea de hepatoma humano HepG2 es la más utilizada y quizá por ello la mejor caracterizada funcionalmente (Yuan et al., 2012). Se dispone de información muy exhaustiva sobre los efectos de un elevado número de compuestos (hepatotóxicas modelo, fármacos, compuestos químicos) sobre muchos parámetros indicativos de toxicidad celular (viabilidad, integridad de la membrana, proliferación celular, niveles de ATP, estrés oxidativo, potencial de membrana mitocondrial, etc.) utilizando diferentes tecnologías (ensayos convencionales de toxicidad, metabolómica, transcriptómica y análisis de imagen de alto contenido) (Huang et al., 2010).

3.17.2. MODELOS CELULAR CACO-2

De las células más utilizadas para la simulación de mucosa intestinal se encuentran las células aisladas de carcinoma de colon humano (Caco-2) la cual puede llegar a presentar una alta diferenciación. (Calderón., 2013). Esta línea celular, pertenece a la lista de métodos aceptados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos, para implementación en análisis referentes a permeabilidad y absorción de fármacos (Martirosyan et al., 2016).

3.17.3. MODELO CELULAR MACRÓFAGOS MURINOS

La línea celular RAW 264.7 se utiliza para el análisis de la respuesta inmunomoduladoras, ya que en presencia de LPS tiende a liberar citocinas. (Karnjanapratum et al., 2011). Deriva de la línea celular de monocito/macrófago RAW264.7. Gracias a su necesidad de LPS para la producción de óxido nítrico (NO),

hace que su tendencia sea más parecida a la de un macrófago normal (Reales., 2014).

4. HIPÓTESIS

Es posible elaborar un sistema de entrega de compuestos bioactivos, basándonos en técnicas de vanguardia, para la utilización de biopolímeros en el desarrollo de alimentos funcionales para su potencial uso como adyuvante en el tratamiento y/o prevención de enfermedades del síndrome metabólico

5. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de esta tesis es sintetizar y evaluar nanopartículas a base de la fibra soluble inulina cargadas con un compuesto fenólico por medio del método de secado por aspersión para su posterior evaluación como posible tratamiento para la disminución de la inflamación en enfermedades del síndrome metabólico. Con esto propósito se desarrollaron nanopartículas con una matriz polimérica de inulina cargadas con quercetina. En los capítulos 2 y 3 se estarán presentando y evaluando los análisis elaborados en este proyecto.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimización a base de un diseño de experimentos para la elaboración de nanopartículas de inulina por el método secado por aspersión.
2. Encapsulación de quercetina por el método de secado por aspersión a una matriz polimérica de inulina.

3. Caracterización de nanopartículas cargas y no cargadas por medio de dispersión de luz dinámica y evaluación del potencial zeta.
4. Caracterización de nanopartículas cargas y no cargadas por medio de microscopia de fluorescencia.
5. Caracterización por su actividad antioxidante por medio de DPPH.
6. Evaluar la liberación de los flavonoides previamente cargados en las nanopartículas.
7. Evaluar el porcentaje de cargado de los flavonoides en nanopartículas.
8. Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de nanopartículas cargadas con flavonoides en líneas celulares.
9. Evaluación de la producción de óxido nítrico de nanopartículas cargadas con flavonoides en líneas celulares.

CAPITULO 2

7. MATERIALES

8. METODOLOGIA

7. MATERIALES

Los materiales utilizados para la síntesis de nanopartículas fueron los siguientes: Quercetina $\geq 95\%$ pureza (Sigma Aldrich), Inulina Microingredients® (DP >23). Los solventes utilizados, grado p.a. fueron adquiridos por Sigma Aldrich.

8. METODOLOGÍA

8.1. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Se realizó un diseño de experimentos a partir de diferentes formulaciones de acuerdo con un diseño compuesto central de doble cara, utilizado normalmente para la optimización de procesos, con 5 puntos axiales para disminuir la varianza en la predicción de las respuestas y 4 factores que incluyen parámetros de control como temperatura de entrada a la cámara de secado, temperatura de la muestra de entrada o temperatura de alimentación, temperatura de salida, y la concentración de inulina en nuestra solución inicial (Tabla 4). Cada uno de estos factores juega un papel de gran importancia a la hora del secado. Un ejemplo es la temperatura de entrada de la muestra, esta temperatura debe ser acorde a las propiedades fisicoquímicas de la inulina a fin de elevar el rendimiento en la producción y calidad de nuestro producto final. El trabajar con temperaturas diferentes a las acordes con las propiedades del material en cuestión, puede interferir con el flujo de la masa en el equipo de secado por atomización y bajar el rendimiento del proceso (Toneli et

al., 2010). Dentro de este orden de ideas se espera obtener 3 respuestas Tamaño de nanopartículas, PDI y Z-Average (Beirão-da-Costa et al. 2013). Este diseño se llevó a cabo gracias al programa Design Expert 11.

Se prepararon las soluciones de nanopartículas no cargadas (Np Inu), basándonos en las diferentes formulaciones que el diseño arrojó, esto para posteriormente secarlo por medio del secador por aspersión. Como se muestra en la Tabla 5, se realizaron en total 21 experimentos.

Tabla 4. Diseño experimental. Variables independientes.

Nanopartículas de inulina			
	-1	0	1
Concentración Inulina (%)	5	10	15
Tem. Alimentación (°C)	40	50	60
Tem. Entrada (°C)	100	150	200
Tem. Salida (°C)	60	80	100

Tabla 5. Formulaciones obtenidas por el método de diseño de experimentos compuesto central de doble cara. Con un total de 21 experimentos.

ESTANDAR	CONC. INULINA (%)	TEM. ALIMEN. (°C)	TEM. ENTRADA (°C)	TEM. SALIDA (°C)
1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1
3	1	-1	1	1
4	-1	1	-1	-1
5	1	-1	-1	-1
6	-1	-1	1	-1
7	-1	1	1	1
8	-1	-1	-1	-1
9	-1	0	0	0
10	1	0	0	0
11	0	-1	0	0
12	0	1	0	0
13	0	0	-1	0
14	0	0	1	0
15	0	0	0	-1
16	0	0	0	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0

8.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Dentro de este marco se consideraron los valores que se utilizarían para la síntesis de nuestras nanopartículas por método indirecto, basándonos en la metodología propuesta por Sansone et al. (2011), con ligeras modificaciones.

Para las nanopartículas de inulina cargadas con quercetina (Np Inu-Quer) se preparó una solución madre de quercetina 450 mg en 5 ml y luego se aforó para

obtener una solución etanol en agua (10:90 v/v), que fue sometida al sonicador de frecuencia de 40 KHz a no más de 25 °C por 30 min. Esta solución fue añadida gota a gota a la solución de inulina. Fue dejada en agitación magnética y a una temperatura de 45-50 °C.

8.3.ENCAPSULACIÓN POR EL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN

Basándonos en los resultados obtenidos gracias al diseño de experimentos propuesto, se utilizaron los siguientes parámetros para el secado por aspersión con el equipo a escala de laboratorio SprayDryer ADL311 Yamato. Para la temperatura de entrada se usó a 120 °C, temperatura de salida 60 °C $\pm$ 2 °C y una presión de 0.15-0.2 MPa. La velocidad de alimentación fue de 3 mL/min. El polvo obtenido se mantuvo en bolsas herméticas oscuras a temperatura ambiente para sus posteriores análisis.

8.4.CARACTERIZACIÓN POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA

El tamaño de las nanopartículas se determinó por dispersión de luz dinámica (DLS) por medio del equipo Zetasizer DTS 1060 (Malvern instruments). Se realizaron dos tipos de reconstitución para las muestras. Una solución acuosa a una concentración de 0.4 mg/mL que se analizó con un índice de refracción de 1.469, absorción 2.303 con óptica de dispersión de 173 °C a 633 nm (Charoenwongpaiboon et al., 2019). La segunda muestra de nanopartículas cargadas y no cargadas fue reconstituida a 0.4 mg/0.3 mL etanol/0.7 mL H₂O que fue leída a con un índice de

refracción de 1.450 y con una óptica de dispersión de 173°C a 633nm. Cada muestra fue sonicada por 10 minutos antes de su lectura. Se leyó por triplicado.

Se determinó el aumento de tamaño de las nanopartículas una vez cargadas con la siguiente fórmula:

$$\text{Tamaño hyd (\%)} = \frac{W_D - W_S}{W_S} \times 100 \quad (4)$$

Donde WD es el volumen de nanopartícula final y WS es el tamaño antes de cargar quercetina. (Llopis, 2020).

8.5. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE CARGA DE FLAVONOIDES

1. FLAVONOIDES TOTALES

A fin de determinar la cantidad total de flavonoides que estaban presentes se hizo uso de la metodología propuesta por Palma et al. (2014) con ligeras modificaciones. Se dispersaron 100 mg de nanopartículas cargadas en 4 mL de agua: etanol: acetona (50:25:25 v/v/v) se agitaron por 1 min, se pasaron al ultrasonificador por 20 min a temperatura ambiente y se centrifugo por 30 a 3500 rpm. Se tomó una alícuota del sobrenadante para su lectura por medio del equipo de UV-vis a 320 nm.

2. FLAVONOIDES LIBRES

Para determinar la cantidad de flavonoides no encapsulados por la matriz de inulina, se utilizó la metodología propuesta por Palma et al (2014), con ligeras modificaciones. Se colocaron 100 mg de Np Inu-Quer en 4 mL de metanol. Se agitó muy suavemente de forma manual con un agitador. El metanol ayudó a extraer los flavonoides de la pared sin romper la matriz polimérica. El sobrenadante fue sometido a una solución agua: metanol: acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) mas 1% de ácido acético glacial. El sobrenadante fue leído por medio del UV-vis a 320 nm.

3. EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

La metodología utilizada para la determinación de flavonoides libre o no encapsulados se llevó a cabo mediante el uso de la técnica de Palma et al (2014), con ligeras modificaciones. Donde se pesaron 100 mg de nanopartículas cargadas y se dispersaron en 2 mL de metanol, posteriormente fueron agitadas por vortex 1 min.

Para la eficiencia de encapsulación se leyó por medio de un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Fisher scientific) una concentración de 2 mg/mL de nanopartículas cargadas con quercetina. Se comparó con una curva de calibración predeterminada ($r^2=0.96$). Y se utilizó la siguiente fórmula (Sun et al. 2018):

$$\%EE = \frac{Q_a}{Q_0} \times 100 \quad (5)$$

Donde Q_a representa los mg/mL de quercetina final y Q_0 representa la quercetina inicial.

8.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL TAMAÑO DE NP INU-QUER

Las nanopartículas cargadas fueron reconstituidas tanto en una fase orgánica como en una fase acuosa (volver al apartado de caracterización para las concentraciones) fueron sonicadas por 20 min a temperatura de no más de 30 °C. El tamaño de las nanopartículas se obtuvo por medio de DLS.

8.7. LIBERACIÓN *IN VITRO* EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Para la cuantificación de fármaco libre en función al tiempo se realizó en una solución con buffer PBS a pH 7.4 a temperatura de 25°C y 37°C. La solución se mantuvo en agitación magnética todo el tiempo.

El estudio de liberación del fármaco “*in vitro*” fue seguido por espectroscopia ultravioleta-visible utilizando un espectrofotómetro DU 730 UV- Vis a 320 nm.

Durante 72 horas se determinó la concentración del fármaco liberado en la solución a diferentes intervalos de tiempo, para lo cual se extrajeron alícuotas del volumen de la siguiente manera; 0,5,10,15,30 min, posteriormente se midió cada 30 min hasta completar 3 horas, y para finalizar se leyeron a 24, 48 y 72 horas, se

extrajo 1 mL de la solución para su análisis y se reemplazó con un volumen igual de medio fresco para garantizar las condiciones de inmersión.

La liberación acumulada de quercetina se calculó a partir de una curva estándar, y todos los experimentos se realizaron por triplicado.

8.8. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.

1. CULTIVO DEL LINEAS CELULARES.

Las células de cáncer colorrectal humano (Caco-2), de carcinoma hepatocelular (HepG2) y la línea celular de fibroblastos dermales humanos (HDFa) se cultivaron en placas Petri con medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) y 1% de la mezcla comercial de estreptomicina y penicilina (Pen Strep Gibco ©).

Las células se incubaron a 37 ° C y con una humedad del 5% de CO². A fin de evaluar el efecto de las Np Inu, Np Inu-Quer, quercetina e inulina sobre la viabilidad, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (concentración de 5 x10⁵ cel./mL) Las placas se dejaron reposar durante 24 h. Se agregaron diferentes concentraciones de las muestras, Np Inu 4.2mg/mL, Np Inu-Quer 4.2mg/mL, quercetina 4.3x10⁻³ mg/ml, e inulina con una concentración de 3.3 mg/mL, posteriormente las placas se incubaron por 48 horas.

2. ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR (MTS).

Para este ensayo se hace uso de la sal de tetrazolio (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio) o mejor conocido como MTS y etosulfato de fenazina (PES) como estabilizante. El MTS se caracteriza por presentar bio-reducción en presencia a NADPH o NADH liberadas por enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas (Promega Corporation 2012). Aquí el MTS+PES penetran a citoplasma de células viables donde es reducido a formazán. Este formazán presenta una coloración azul. Por eso es conocido como un ensayo colorimétrico. A diferencia del ensayo MTT, el producto es soluble en agua, por lo tanto, no es necesario agregar DMSO para eliminar los cristales de formazán (Sancho, 2018).

La viabilidad celular se determinó usando el kit de proliferación celular Cell Titer 96 Aqueous One Solution. La absorbancia se midió a 490 nm con un lector de microplacas de 96 pocillos (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT). La viabilidad celular se calculó dividiendo la absorbancia de las células tratadas por la absorbancia de las células de control (sin tratar), y esta relación se expresó como porcentaje.

8.9. ENSAYO DE ÓXIDO NÍTRICO

El papel que llega a presentar el NO en procesos biológicos es importante para la regulación de redes fisiológicas, ya que un aumento en la presencia de esta molécula, puede llegar a asociarse con enfermedades de hipertensión, angiogénesis, artritis, disfunción cardíaca, entre otras (Mata et al., 2010). Representación gráfica de vasodilatación producida por óxido nítrico en Figura 8.

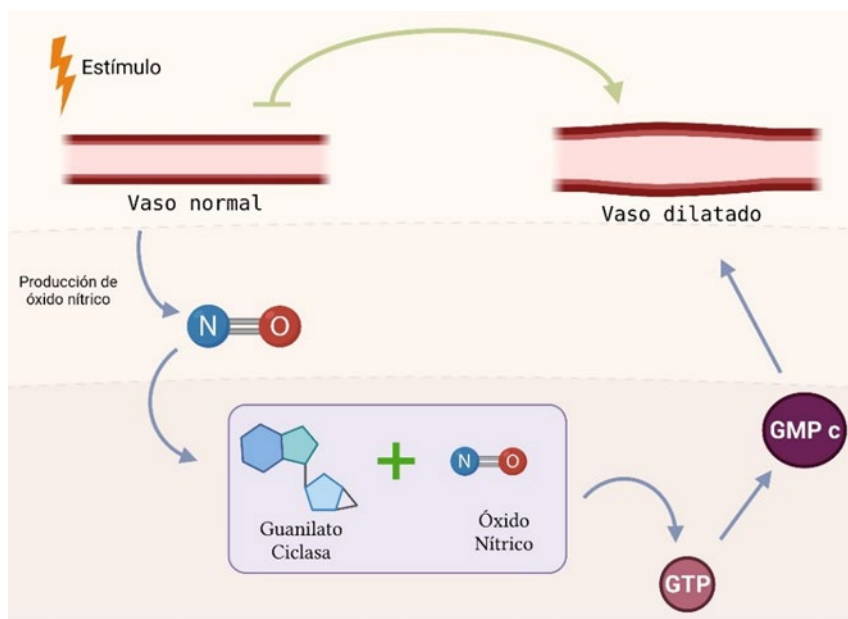


Figura 8. Vasodilatación producida por NO. Al producirse NO en los vasos sanguíneos, este activa a la molécula guanilato ciclasa, que se encarga de la producción de GMPc, principal dilatación de los vasos sanguíneos (Mata et al., 2010). Imagen creada en Biorender.com.

8.9.1. CULTIVO CELULAR RAW 264.7

Para este ensayo se utilizó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Las células se cultivaron en placas de Petri con DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de la mezcla comercial de estreptomicina-penicilina (Pen Strep Gibco ©) y se incubaron a 37 ° C en presencia de 5% de CO₂ (NuAire, Plymouth, MINNESOTA). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (5 x 10⁵ células/mL) y se dejaron adherir durante 24 h. Se agregaron 50 µL de las muestras de Np Inu, Np Inu-Quer, Inulina y quercetina en concentraciones de 4.2 mg/mL, 4.2mg/mL, 3.3mg/mL, 4.3x10⁻³ mg/mL respectivamente. A continuación, la mitad de los pocillos se estimularon con LPS a 10 µg/mL (concentración final), mientras que la otra mitad se utilizó como control para cada muestra.

8.9.2. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

La producción de NO se midió indirectamente mediante la determinación de nitritos, utilizando el sistema de reactivos Griess a 490 nm. Los datos se expresaron como porcentaje de inhibición de la producción de NO en relación con las células de control (no estimuladas con LPS) (Camarena-Rangel et al., 2020). La absorbancia se midió con el lector de microplacas de 96 pocillos (Synergy HT KC4, Bio-Tek).

8.9.3. MEDICIÓN DE LA VARIABILIDAD CELULAR EN RAW 264.7

Para evaluar la viabilidad celular se hizo uso del kit CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega) para el ensayo de proliferación celular. Se midió a una absorbancia con ayuda de un lector de microplacas Synergy HT KC4, Bio-Tek. Para obtener el porcentaje de viabilidad celular se dividió la absorbancia de las células con los extractos por la absorbancia de las células control.

8.10. EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (% DE INHIBICIÓN DE DPPH)

Para este ensayo se utilizó el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) descrita anteriormente por Kumari et al (2010), con ligeras modificaciones. Donde primero se pesaron 2 mg/mL de nanopartículas cargadas de quercetina y se colocaron en diferentes soluciones con variables como temperatura y pH. Se prepararon soluciones con temperaturas de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y

80°C. Mientras que las otras soluciones, constaban de pH de 2, 4, 7.2 y 7.4. Se utilizó una solución metanoica de DPPH a una concentración 0.10 mM.

En la placa se colocaron 100µL de muestra y controles. A cada pocillo se le adicionó 200µL de la solución de DPPH. Las mezclas se dejaron a temperatura ambiente en total oscuridad por 30 min. La lectura se llevó a cabo gracias al lector de microplacas Synergy HT KC4 de BIO TEK, con una absorbancia de 517nm.

El porcentaje de captación de radicales se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%DPPH = \left(1 - \frac{A_{muestra}}{A_{control}}\right) * 100 \quad (6)$$

Donde A control representa la absorbancia de la muestra de control y A muestra es la absorbancia obtenida de cada una de las muestras después de 30min con la solución DPPH.

Los resultados se realizaron por triplicado y son expresados por promedio con su desviación estándar correspondiente.

8.11. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para este ensayo se utilizó el equipo de microscopia de fluorescencia AMF4300 con sistema de imagen EVOS® FL, marca Thermo Scientific. Es un sistema de

imagen digital invertido donde se utilizaron 2 filtros de fluorescencia como el DAPI (352 - 477 nm) y GFP (457 - 538 nm). Con una amplitud de imagen de 12.5 μm .

8.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los experimentos se replicaron un mínimo de tres veces ($n \geq 3$). Los valores se expresaron como la media $\pm$ de, y se analizaron mediante un análisis factorial de varianza (ANOVA). $P < 0,05$ se consideró significativamente diferente.

CAPITULO 3

9.RESULTADOS Y DISCUSIONES

10. CONCLUSIONES

11. REFERENCIAS

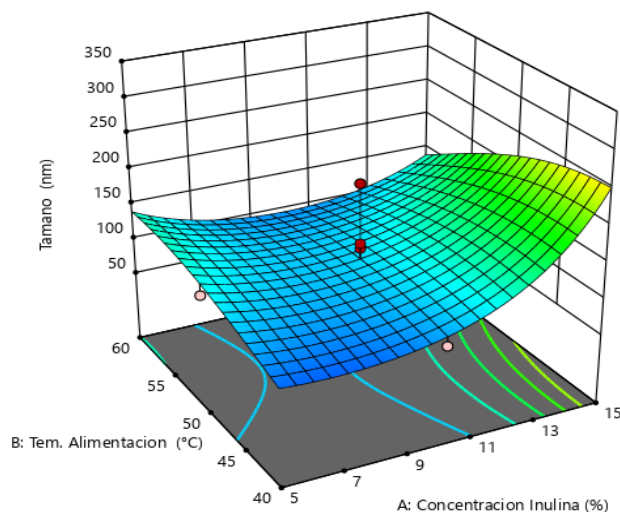
9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.9. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

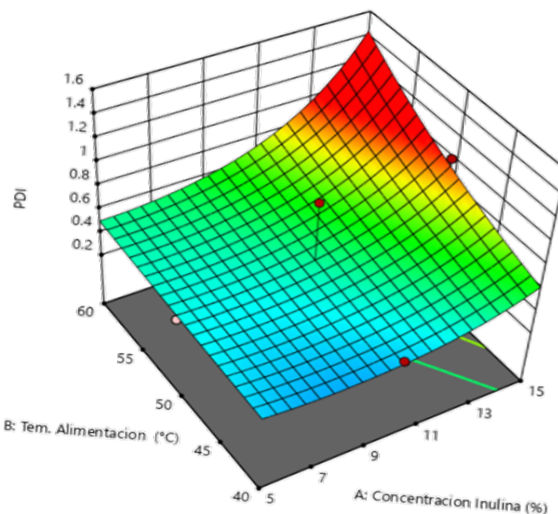
El secado por atomización es uno de los métodos más importantes para obtener polvos. Sin embargo, el proceso de secado por aspersión frecuentemente da como resultados materiales amorfos en lugar de cristalinos. El grado de cristalinidad es un factor fundamental que puede influir en muchas propiedades físicas de los polvos secados por aspersión, como la pegajosidad, la porosidad, la solubilidad y la fluidez. La cristalinidad de los polvos secados por aspersión está fuertemente relacionada con las condiciones de secado, como la temperatura del aire de entrada.

Debido a estas características de los productos ricos en azúcar, es importante definir las condiciones de secado por atomización para obtener un producto final de alta calidad. El proceso de secado por aspersión se basa en la producción rápida de un producto seco a un estado amorfo. Los materiales que tienen como característica ser azucarados cuando se encuentran en su punto vitreo, presenta propiedades termoplásticas y se eleva su higroscopicidad, lo que dificulta su paso por la boquilla de atomización causando adherencia a las paredes y obstrucción, bajando de esta manera la calidad y rendimiento del polvo (Toneli et al., 2010).

A)



B)



C)

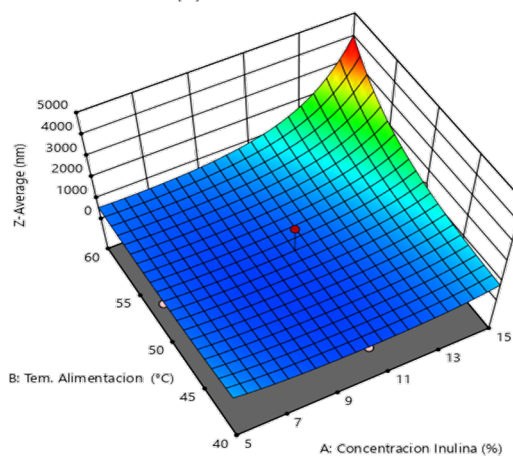


Figura 9. A) Gráfico de superficie para respuesta de tamaño (nm), p-value de 0.023. **B)** Gráfico de superficie para el análisis de la respuesta de PDI, con un total de p-value de 0.683. **C)** Gráfico de superficie para el análisis de la respuesta de Z-Average, con un p-value de 0.217.

En cuanto a los resultados obtenidos, gracias al programa Design expert 11, los gráficos de superficie con ANOVA para modelo cuadrático se lograron constatar que la concentración inicial de inulina en nuestra solución juega un papel importante en

el tamaño de las nanopartículas, ya que presentan una proporcionalidad directa, al igual que con la temperatura de alimentación (Figura 9). Ambos factores muestran una significancia de $P\text{-value} < 0.05$. Por consiguiente, mayor entrada de aire las temperaturas dan como resultado muestras más cristalinas. Un ejemplo es cuando se trabajaban con temperaturas de entrada más altas de 150°C , se obtenían tamaños mayores a 250 nm con PDI por encima de 400. Esto fue reportado anteriormente por Beirão-da-Costa et al (2013), donde obtienen un tamaño de partículas más pequeñas cuando la temperatura del secador era de $130\text{-}160^{\circ}\text{C}$.

En el análisis de varianza del modelo se obtuvo un valor F de 3.81, lo que implica que el modelo es significativo. Mientras que en el análisis de varianza residual obtuvimos un valor F de falta de ajuste de 1.02, lo que implica que la falta de ajuste no es significativa en relación con el error puro. Existe un 54.47% de probabilidad de que se produzca un valor F de falta de ajuste tan grande debido al ruido. Esta falta de ajuste no significativa garantiza que nuestro modelo matemático propuesto si muestre una tendencia real.

Es necesario puntualizar la importancia de la concentración inicial de inulina. Ya ha sido mencionado anteriormente que, a mayor material para secar, hay un aumento en la viscosidad de la solución, lo que deriva en un mayor tiempo en la cámara de atomizado del equipo de secado, esto dificulta la formación de la gota y es posible que la boquilla se tape (Walton, 2000). Es posible observar en la Figura 9.A que al variar la concentración de inulina (%) en la muestra, hay un aumento de tamaño en la N_p ; Mientras que en las Figuras 9.B y 9.C a mayor concentración de

inulina y mayor temperatura de alimentación, la inulina tiende a tener un efecto de aumento de polidispersidad y Z-Average, debido a la formación de aglomerados por las propiedades anteriormente mencionadas (Palma et al. 2014).

Para el presente trabajo se trató optimizar los diámetros de nanopartículas para que estos fueran mínimos, a fin de obtener un producto capaz de presentar una difusión homogenizada en un sistema *in vitro*. Los datos experimentales de tamaños fueron descritos con éxito por modelo cuadrático y con un nivel de confianza de 95%. A continuación, en la Tabla 6, se presentan los valores obtenidos para la formulación de Np Inu e Np Inu-Quer:

Tabla 6. Formulación final para la síntesis de nanopartículas de inulina. Para minimización de tamaño, PDI, Z-Average.

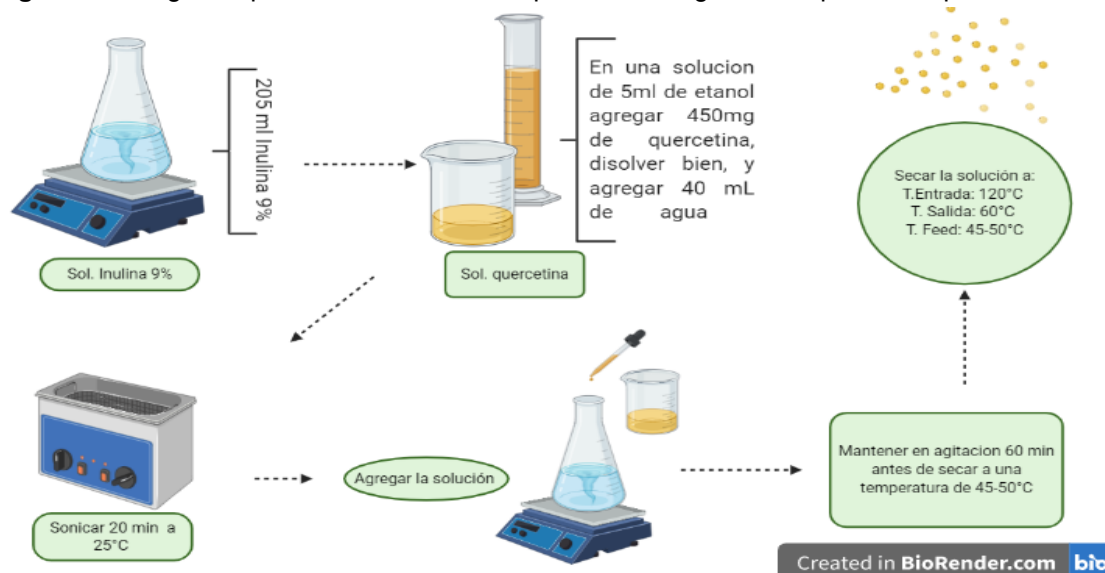
Formulación Final			
Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	Temperatura de alimentación (°C)	Concentración de inulina (%)
120	60	45-50	9

9.10. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Para la obtención de nanopartículas optimizadas en cada respuesta estudiada, se consideró la minimización del tamaño, PDI y Z-Average. Así que gracias al programa Desing Expert 11 se obtuvo una función de deseabilidad considerando las variables de respuesta que nos proporcionaran los valores más bajos.

En la Figura 10, es posible observar el diagrama de flujo utilizado para la síntesis de Np Inu y Np Inu-Quer:

Figura 10. Diagrama para la síntesis de nanopartículas cargadas de quercetina por el método



de secado por aspersión. Imagen realizada por BioRender.com.

9.11. SECADO POR ASPERSIÓN

El secado por aspersión se caracteriza por la rápida evaporación del agua en una solución densa de material de pared, lo que resulta en la formación de una coraza que es capaz de atrapar el material del núcleo. Esta propiedad tiene la capacidad de aumentar la eficiencia de encapsulación y la estabilidad del producto (Castel 2018). Considerando los datos proporcionados para la minimización de la respuesta de tamaño y PDI, se concluyó que las mejores condiciones para el secado

por aspersión para inulina eran: Temperatura de entrada: 120°C, temperatura de salida de 60°C y una temperatura de alimentación de 45 a 50°C.

De esta optimización se obtuvieron dos polvos finos de nanopartículas cargadas y no cargadas (Figura 11). El rendimiento de recuperación del secado por aspersión se calculó considerando el peso de la masa total de sólidos inicial y el peso de la masa recuperada del vaso recolector del equipo por 100. El rendimiento en la recuperación de nanopartículas fue de $56.8 \pm 4.9\%$ y $64.9 \pm 3.3\%$ para nanopartículas blanco y nanopartículas cargadas respectivamente. Aunque se sabe que la degradación de flavonoides ocurre más rápido en presencia de calor debido a reacciones de oxidación, se podría decir que la recuperación de quercetina por el método de secado por aspersión fue alta. Esto comparado con la recuperación obtenida por Bustos-Garza, et al. (2013) donde en sus formulaciones con inulina por secado por aspersión obtienen hasta un 35%. También encontramos artículos como J. Toneli et al. (2010) donde su máximo rendimiento es de 72%.

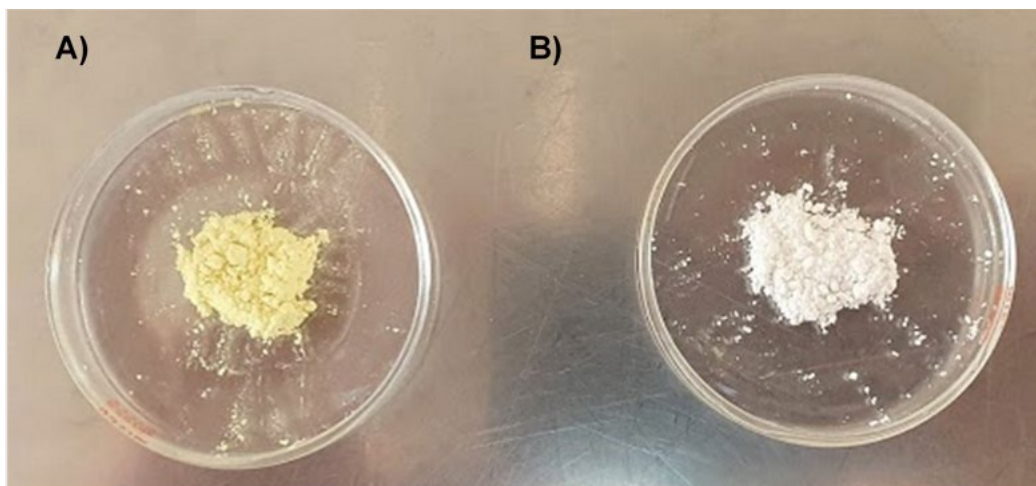


Figura 11. Polvo obtenido por el método de secado por aspersión. **A)** Np Inu-Quer: polvo fino color amarillo, con un rendimiento de casi un 60% **B)** Np Inu: Polvo blanco con un rendimiento de casi un 65%.

9.12. CARACTERIZACIÓN POR DLS

En lo que respecta a la determinación de tamaño de nanopartículas por DLS, se observa una distribución unimodal donde es posible observar un rango de tamaños para nanopartículas cargadas de 289.75 ± 16.3 y 231.4 ± 10.32 nm disueltas en fase acuosa y fase orgánica respectivamente, y un rango entre 102.68 ± 12.8 y 118.15 ± 6.57 para las nanopartículas no cargadas en fase acuosa y fase orgánica respectivamente (Figura 12). Por ende, se observa un aumento de tamaño alto en las nanopartículas, 182.1% y 95% respectivamente.

Se decidieron hacer estas dos dispersiones en diferentes solventes para observar si había un cambio en el comportamiento de tamaño de las nanopartículas,

y se logró observar una disminución tanto en diámetro como en el índice de polidispersidad cuando estas eran disueltas en medio orgánico. El PDI para nanopartículas cargadas disueltas en agua fue de 0.94 ± 0.08 , mientras que dispersas en medio orgánico nos arrojaba un PDI más bajo de 0.464 ± 0.12 . Pese a que se aplicó una minimización del factor PDI, no hubo una disminución del mismo. Esto es común en sistemas que se encapsularon por secado por aspersión (Castel et al., 2018). Otro factor que menciona López et al. (2020) es el aumento en la concentración de inulina, ya que en sus estudios, observó, que un aumento en la concentración, aumentaba también las propiedades reológicas, dando lugar a geles con un tamaño de partícula mayor, así como un aumento en la polidispersidad.

Se sabe, que el tamaño de partícula juega un papel importante en la internalización celular. Garrido et al. (2021) comentan sobre su hallazgo en el campo de internalización de nanopartículas de sílice con ácido hialurónico, que sus Nps de 179 nm lograron una internalización eficiente en células MDA-MB-231 de cáncer mamario y MCF10A derivada de epitelio mamario no tumoral, en comparación como Nps por encima de 250 nm.

Se han determinado que las nanopartículas que poseen tamaños de diámetro menores a 200 nm también suelen presentar absorción por parte de las células, sin embargo con una menor eficiencia (Yin et al., 2005)

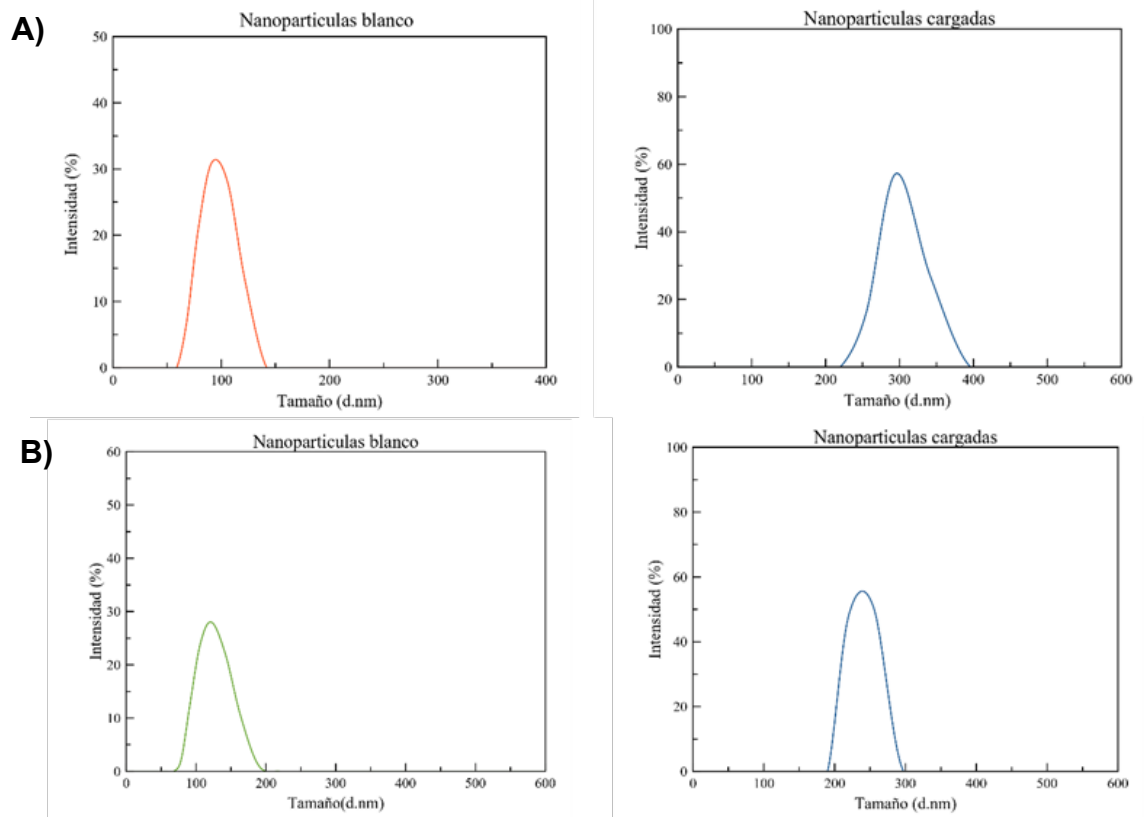


Figura 12. A) Caracterización con agua de Np Inu-Quer y Np Inu por medio de dispersión de luz dinámica. **B)** Caracterización en fase orgánica absoluto de Np Inu-Quer y Np Inu.

Durante la última década, los nanomateriales han venido a ejercer un gran impacto en la mejora de las terapias, al mejorar la eficacia terapéutica, así como la reducción de la toxicidad en células no diana. Una de sus principales ventajas, es el tamaño, ya que, con este, es capaz de tener efectos más rápidos y eficaces al lograr pasar por barreras biológicas o celulares que otros fármacos no pueden (Lakshmi et al., 2019).

9.13. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Con ayuda del equipo de microscopia de fluorescencia se confirma la presencia de partículas de tipo esféricas, esto gracias a las propiedades fluorescentes que presenta la quercetina (Alva et al., 2018). En general se observan nanopartículas esféricas con apariencia lisa y presencia de aglomeraciones en las nanopartículas sin medio. Mientras que las nanopartículas en fase orgánica muestran una menor polidispersidad y reducción en el tamaño. El tamaño de las partículas polvo fue medido a partir de estas imágenes gracias al programa ImageJ, donde se presentaron diámetros de 78.83 ± 20.87 nm para Np secas y 42.62 ± 19.33 nm para Np en medio orgánico (Tabla 7), con una gran variación de diámetro (Coeficiente de variación= 26.47% y 45.4, respectivamente). No se midieron Np Inu-Quer en fase acuosa ya que no se lograron observar en el microscopio, esto debido a que el enlace de hidrogeno intermolecular entre los grupos polares del soluto y el agua excede varios enlaces de hidrogeno intramoleculares, esto forma un ángulo de diedro lo que imposibilita la transferencia de carga intramolecular en estado excitado (Alva et al., 2018). Esto también puede estar relacionado a lo mencionado anteriormente por Charoenwongpaiboon et al. (2019), donde comentan que la adición de inulina puede llegar a promover la disolución de quercetina, ellos observan un aumento de su solubilidad de hasta 4.3 veces en comparación a la quercetina pura.

Tabla 7. Tamaño promedio y tamaños mínimos y máximos de nanopartículas cargadas con quercetina. Microscopia de fluorescencia. Cuando hay presencia de diferentes letras en la misma columna, quiere decir que hay una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

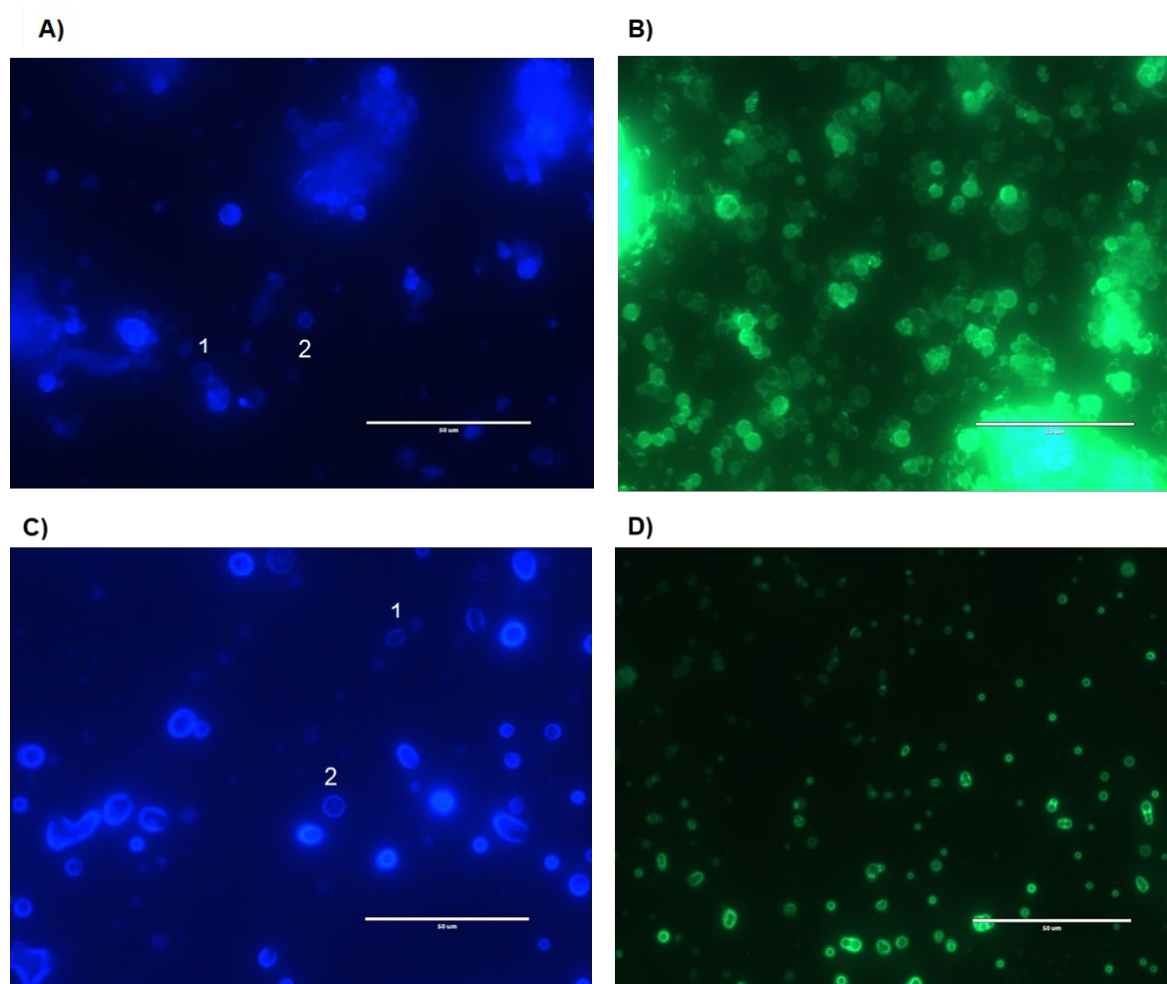
Muestra	Tamaño (nm)	CV (%)	Tamaño Max. (nm)	Tamaño Min (nm)
Np Inu-Quer Sin Solución	78.83 $\pm$ 20.87 a	26.4	89.41	61.31
Np Inu-Quer Sol. Orgánica	42.62 $\pm$ 19.33 b	45.4	54.17	29.04

Las imágenes A y B de la Figura 13 muestran las fotografías de las muestras tomadas por el equipo de microscopia de fluorescencia AMF4300. Es evidente, al ver la Figura 13 notar que no se cuenta con un cargado del 100% en algunas nanopartículas, incluso es posible decir que hubo un cargado poco eficiente en algunas de ellas; Asimismo la presencia de Np que cuentan con quercetina adherida a la superficie de la matriz polimérica. A su vez, las muestras secas presentan zonas con un alto grado de aglomeración (Ojo: Para el análisis de la Tabla 7, solo se midieron partículas no aglomeradas) a diferencia de las partículas sometidas a una reconstrucción en una fase orgánica. Esta presencia de aglomeraciones y variación en el cargado del principio activo se ve influenciado por: (1) El choque entre partículas en el equipo secado por aspersión, ya sea en la zona de secado o en la zona del ciclón, o el efecto de altas temperaturas en la inulina, que deriva de una adhesión entre partículas de diversos tamaños (Morelo et al., 2019; Sansone et al.,

2011). (2) Por la velocidad de secado, al no presentar la velocidad requerida puede llegar a evaporar el agua de forma muy rápida, como consecuente se presenta una contracción de las Np al momento del secado. Este fenómeno es reportado en otros tratamientos de inulina como material de pared por medio del secado por aspersión (Bustos et al., 2013). Donde utilizan una velocidad de aspiración de $32.9 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, presión 4.0 MPa y una temperatura de alimentación de 25°C , temperatura de entrada 120°C y de temperatura de salida 70°C .

Ya que este es un análisis cualitativo, no se podría definir la superficie de las nanopartículas, sin embargo, autores que han trabajado el secado por aspersión con inulina como material polimérico, muestran resultados en su mayoría de superficie lisa. Tal es el caso de Leite et al. (2008) que obtuvieron micropartículas esféricas, lisa y algunas con superficies rugosas; Ellos utilizan temperaturas de entrada de $186\text{-}193^\circ\text{C}$. Leite et al mencionan que la presencia de una superficie lisa y la alta unión entre partículas chicas y de gran diámetro, es característico de productos amorfos. La presencia de rugosidad es planteada por Ré I (1998), cuando se presenta un proceso lento de formación de película o pared en el secado por atomización; un aumento de temperatura de entrada elevara la velocidad de formación de la película en la gota. Beirão-da-Costa et al. (2013) observaron que con una concentración menor al 10% de inulina y a temperaturas de $130\text{-}160^\circ\text{C}$ obtenían micropartículas de 3 a 4.5mm , con superficie lisa y sin rugosidades. Otro ejemplo de obtención de partículas con superficie lisa por medio de secado por aspersión es J. Toneli et al. (2010) con temperaturas de entrada de 210°C y temperatura de alimentación de 25°C obtuvo un polvo con características esféricas

de superficie lisa, con un tamaño de 2.20 mm Por lo tanto, es posible concluir que la inulina como matriz polimérica ofrece una electricidad en el proceso de secado que



mejora la superficie de la pared, haciéndola lisa y sin rugosidad si es tratada con las condiciones de secado y de concentración correctas.

Figura 13. Imágenes microscopia de fluorescencia **A)** Muestra de Np Inu Quer sin solución filtro DAPI. **B)** Muestra de Np Inu Quer sin solución filtro GFP. **C)** Muestra de Np Inu Quer con solución orgánica filtro DAPI. **D)** Muestra de Np Inu Quer con solución orgánica filtro GFP. ***Los

números en la imagen A y C señalan: **1)** Np con déficit de carga. **2)** Np con principio activo adherido a la superficie de la matriz polimérica. Barra blanca representa 50 μm .

9.14. EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN Y PORCENTAJE DE CARGA

A fin de evaluar la capacidad de encapsulación de las Np Inu-Quer, se determinó la quercetina total y libre en las muestras. Estos valores nos ayudan a observar tanto la quercetina que no pudo ser encapsulada ni de forma física ni química, así como el grado de encapsulación que puede llegar a tener a poseer la inulina.

Se obtuvo una eficiencia de carga del 71.11% y un porcentaje de cargado de $73.33 \pm 7.86 \%$ en las nanopartículas. Esto garantiza una aplicación terapéutica *in vivo* ya que presenta una excelente eficiencia de encapsulación junto con un tamaño de partículas menor, capaz de atravesar barreras fisiológicas, logrando que llegue a tener una acción dual.

Sansone et al. (2011) proponen la utilización de polímeros de recubrimiento como celulosa acetato-ftalato (CAP), agentes de hinchamiento o tensoactivos como potenciadores de la velocidad de disolución de flavonoides como quercetina para la elaboración de micropartículas por secado por aspersión, donde la combinación que presentaba mayor %EE fue CAP/Quercetina/ Croscarmelosa de sodio, con un rendimiento de 82.4% y un tamaño de partícula de 31.45 μm .

Otro ejemplo es Morelo et al. (2019) donde encapsularon flavonoides (Quercetina y epicatequina) en una matriz de inulina por secado por aspersión donde

obtuvieron un rendimiento de $78.1 \pm 1.0\%$ con una temperatura de alimentación de $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ y de entrada de $160\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, este tratamiento presento irregularidades en la superficie y aglomeración.

P. Robert et al. (2012) presentan eficiencias de encapsulación que varían desde 42.6% hasta 96.4%, utilizando diferentes tipos de inulina como material de pared (Nativa y acetilada) siendo la inulina nativa la que presento mayor eficiencia de encapsulación para ácido gálico (83%).

En contraste a que se obtuvo niveles aceptables de eficiencia de carga en comparación con otros autores, se podría deber a diversos factores:

- (1) El porcentaje de cargado es mayor a la eficiencia de cargado, esto debido a que se obtuvo $0.520 \pm 0.09\text{ mg/mL}$ de flavonoides libres o adheridos a la capa externa de nuestro material de encapsulación. Que en SEM podríamos distinguirlos como cristales incrustados en la superficie de la matriz polimérica. Esto nos habla que casi un 30% de quercetina no pudo ser encapsulada
- (2) Al colocar las muestras en medio acuoso puede haber una ligera liberación por poros del material, debido a la relajación de las cadenas poliméricas. Esto ocurre normalmente en materiales hidrofílicos

9.15. POTENCIAL ZETA

El potencial zeta es un valor que representa el comportamiento electrostático de partículas coloidales en el medio; está relacionado con la tendencia de agregación de las partículas en solución, por lo que se considera que refleja la estabilidad del sistema coloidal. Esta propiedad está ligada al grado de adhesión que pueden llegar a presentar. Esto es importante ya que puede aumentar el tiempo de liberación de un fármaco aumentando así la eficiencia terapéutica (Zahin et al., 2020).

Se realizaron dos lecturas para cada nanopartícula, una en un medio acuoso y otra en un medio orgánico, como se muestra en la siguiente Tabla 8. En lo que respecta a las nanopartículas cargadas obtuvimos un potencial de -0.178 ± 0.06 en medio acuoso y un potencial de -13.28 ± 4.3 reconstituidas en etanol. Para las nanopartículas blanco se obtienen -11.09 ± 1.5 y 1.4 ± 1.9 en agua y etanol respectivamente. A continuación, se muestran los valores en la Tabla 8:

Tabla 8. ANOVA potencial zeta de muestras a 37°C. Cuando hay presencia de diferentes letras en la misma columna, quiere decir que hay una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

	Fase orgánica	Fase acuosa
Np In-Quer	$-13.28 \pm 4.3_a$	$-0.178 \pm 0.06_a$
Np In	$1.4 \pm 1.9_b$	$-11.09 \pm 1.5_b$

Con este orden de ideas, es posible notar que las nanopartículas muestran una tendencia a ser negativas esto debido a que la inulina posee una carga negativa débil. Sin embargo, se encontraron cambios importantes cuando se dispersaron las muestras en una fase orgánica, haciendo que se aumentara la negatividad de las Np Inu-Quer. Esto se le atribuye a la presencia de grupos hidroxilo en nuestro material de pared que es la inulina (Xu et al., 2020), o al enlace de hidrógenos con agua y la desprotonación de los grupos carboximetilicos que posee (Afinjuomo et al., 2019). Pero vemos una variación entre los tratamientos, donde se observa un potencial zeta de -13.28 ± 4.3 en fase orgánica y un potencial zeta -0.178 ± 0.06 en fase acuosa. El valor negativo sugiere una tendencia a agregación entre partículas. Sin embargo, otros autores han reportado la misma tendencia negativa para partículas con inulina. Jiménez et al. (2019) obtienen un valor de $-10 \pm 1,8$ mV para Np de inulina que después de 15 días presentan estabilidad. Ante esto, es posible destacar que disueltas en una fase orgánica presentan una mejor estabilidad, así como una excelente dispersión.

Pese a la presencia negativa en la pared polimérica, es posible ver en la Figura 14 que no se observa gran agregación en Np Inu-Quer con medio orgánico, aunque en la Tabla 8 se nos muestra un potencial zeta de -13.28 . Peng et al. (2019) mencionan que la presencia de otro compuesto en Np a base de inulina, puede llegar a afectar la carga neutra de la inulina. Ya que observaron, que Np con pared de inulina, formaba cadenas fuertes, lo que ocasionaba una repulsión estérica entre partículas. Por lo que se garantizaba la estabilidad y la baja agregación en almacenamiento prolongado.

El potencial zeta también nos es útil para la determinación de la compatibilidad entre proteínas. Esta compatibilidad esta mediada por el pH, fuerza iónica y la biocompatibilidad del polímero. Estos factores determinaran la interacción con el material de pared o su segregación (López et al., 2019).

Jiménez-Rodríguez et al (2021) concluyen que “la estabilidad de una nanoemulsión no solo se encuentra influenciada por las características eléctricas de la capa superficial, sino por las fuerzas estéricas promovidas por los cambios fisicoquímicos y conformacionales del polisacárido” esto después de analizar el polisacárido de Agave salmiana para la estabilización de nanoemulsiones.

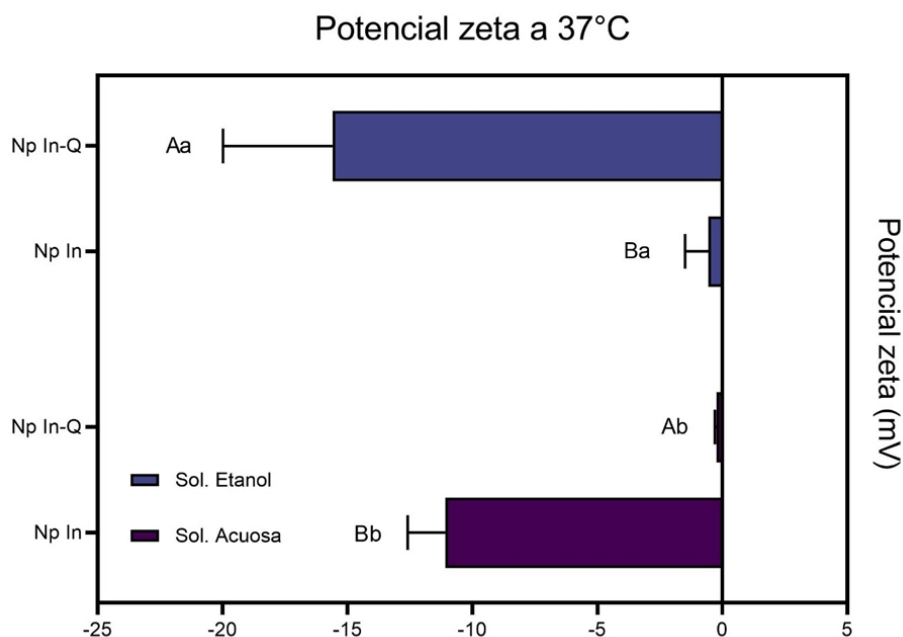


Figura 14. Potencial zeta de muestras de Np Inu-Quer y muestras Np Inu, a una temperatura de 37°C en solución acuosa y solución orgánica. Donde letras diferentes representan diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

9.16. DISEÑO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se llevo a cabo un barrido de absorción con ayuda del espectrofotómetro a fin de encontrar las longitudes de onda máxima y mínima de nuestro principio activo quercetina. Esto nos dio como resultado picos de 318nm y un máximo de 574nm.

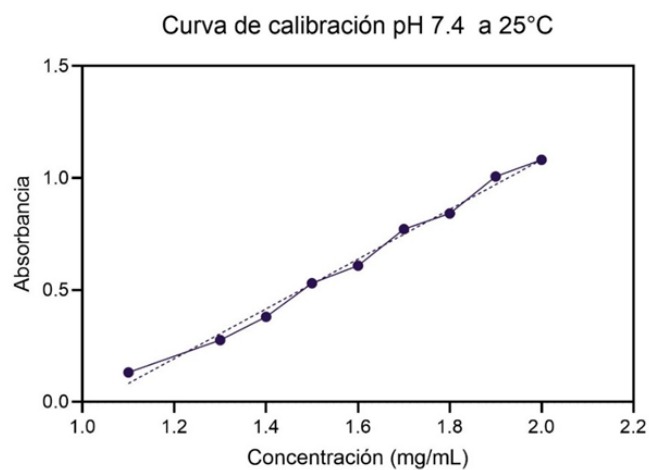
Una vez obtenidos los picos característicos se realizaron dos curvas de calibración a fin de tener un cálculo sobre una concentración conocida de quercetina pura a 25°C y otra a 37°C, donde fue necesario establecer la linealidad de ambos modelos. Se realizaron por triplicado. Los modelos se muestran en las Figuras 15 y 16.

A partir de una solución madre, se realizaron 9 diluciones seriadas de quercetina. Las lecturas obtenidas debían brindar una absorbancia alrededor de 1. Al realizar la regresión lineal de los datos obtenidos, donde el eje de la variable independiente (x) representa concentración en mg/mL, y el eje de la variable dependiente (y) representa la absorbancia (nm). Se obtiene la siguiente ecuación.

$$y = 1.110x - 1.139$$

Donde 1.110 representa a m (pendiente), y, -1.139, como b (Ordenada al origen) con un coeficiente de determinación de 0.9911.

Figura 15. Curva de calibración de quercetina a pH 7.4 con una temperatura de 25°C. Con un r^2 de 0.9911.



Con respecto a la curva de calibración para quercetina con una temperatura de 37°C a un pH de 7.4 se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 2.229x - 2.847$$

Donde 2.229 representa a m (pendiente), y -2.847, b (Ordenada al origen) y un coeficiente de determinación de 0.9930.

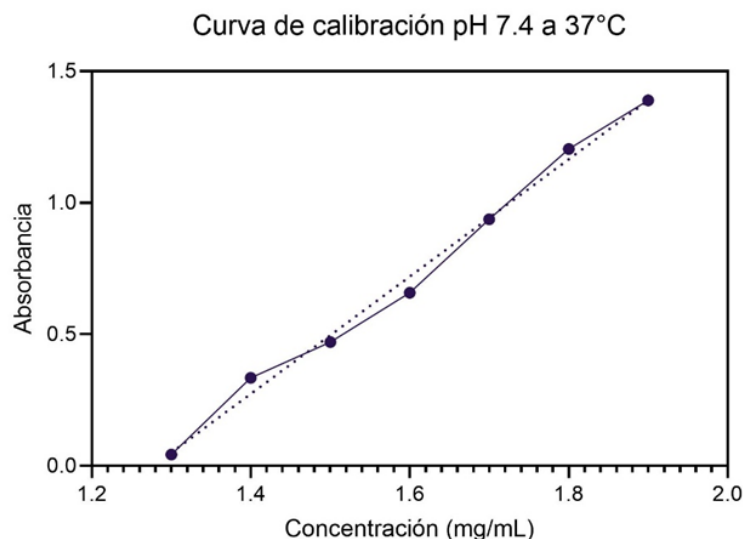


Figura 16. Curva de calibración de quercetina a pH 7.4 con una temperatura de 37°C. Con un r^2 de 0.9930.

De esta forma es posible concluir que el análisis matemático es selectivo y sensible para la determinación de quercetina.

9.17. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS

Como es bien sabido la inulina posee en su estructura (2→1) de residuos β -D-fructosilo unidos con un grupo terminal de (1↔2) α -D-glucosa. Gracias a esta configuración, la inulina tiende a tener características de carbohidrato no reductor (No forma aldehídos o cetonas). Comúnmente los carbonos anoméricos (Glucosa y fructosa) son aldehídos y cetonas, respectivamente, donde las cetonas presentan

un mayor grado de reactividad en solución. Los fructanos pueden llegar a ser degradados por medio de enzimas (Ríos et al., 2019).

Generalmente la degradación de inulina se lleva a cabo por enzimas de tipo fructano-exo-hidrolasas (exoinulasas y exolevanasas como la 2,1- β -D-fructanohidrolasa y la β -D-fructofuranosilfructohidrolasa) que tienen la capacidad de romper enlaces β (2 $\rightarrow$ 1), esto conlleva a la liberación de fructosa y polisacáridos de cadena corta. Estas estructuras presentan un rango de temperatura de 45 °C hasta 55 °C y un pH óptimo de 5 a neutro (Chacón, 2006).

La inulina presenta insolubilidad a temperaturas menores a 25 °C, por eso es posibles ver en la Figura 17 que a temperaturas menores a 28 °C nuestras nanopartículas tienden a presentar tamaños de partícula mayores a 450 nm diluido en una fase orgánica y entre 400 nm cuando es disuelta en medio acuoso.

Tabla 9. Disposición de tamaños de partículas y PDI a temperaturas de carácter *in vitro*.

Temperatura. (°C)	Fase Orgánica		Fase Acuosa	
	Tamaño (nm)	PDI	Tamaño (nm)	PDI
34	104.98 $\pm$ 21.23	0.585 $\pm$ 0.03	278.30 $\pm$ 21.33	1.00 $\pm$ 0
36	110.05 $\pm$ 13.6	0.573 $\pm$ 0.10	218.4 $\pm$ 51.6	1.00 $\pm$ 0
38	111.99 $\pm$ 17.97	0.58 $\pm$ 0.14	164.9 $\pm$ 0.99	1.00 $\pm$ 0
40	173.13 $\pm$ 65.4	0.64 $\pm$ 0.05	222.7 $\pm$ 23.1	1.00 $\pm$ 0

De las principales características que posee la inulina es la alta movilidad conformaciones de sus cadenas. Estudios anteriores han constatado que al agregar un tratamiento térmico a inulina de temperaturas entre 135 a 190 °C, disminuye la cantidad del fructano (Böhm et al., 2005). Se observó que el contenido de inulina disminuía con el aumento de temperatura y la duración del calentamiento.

Gracias al estudio realizado podemos constatar que, a temperaturas mayores a 28 °C, la inulina presente como matriz de pared llega a presentar solubilidad tanto en medio acuoso como en una fase orgánica. Ante este orden de ideas es preciso notar que el etanol suele afectar la conformación de la inulina, ya que observamos que a los 32 °C se aumenta la solubilidad de manera lineal con la temperatura y se mantiene de esta forma hasta los 44 °C.

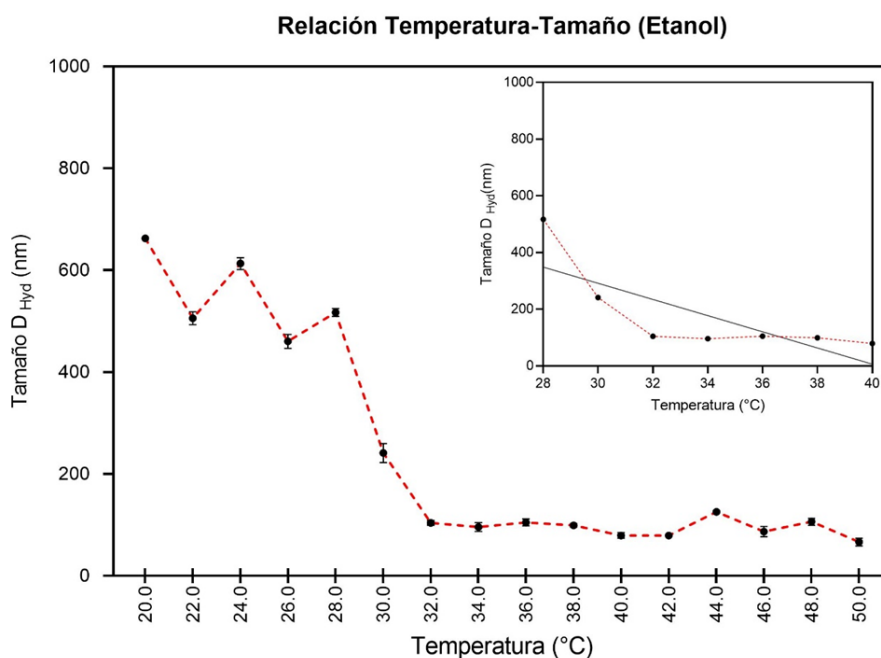


Figura 17. Relación entre temperatura y tamaño de Np Inu-Quer desde 20°C a 50°C en una fase orgánica (Np Inu-Quer: etanol:agua 4:4:6 p/v/v).

Mientras que, en la muestra disuelta en agua, notamos mayor estabilidad en la solubilidad, sin embargo, después de los 28°C, al igual que en la Figura 17 (etanol) tiende a disminuir en menor medida el tamaño de partícula, manteniendo su tamaño de forma lineal a temperaturas de 30°C a 36°C.

Estos resultados demuestran que el tamaño de las nanopartículas a base de Inulina depende en gran medida de la temperatura del medio. Ya que en base a nuestro análisis es posible visualizar que a menor temperatura mayor será el tamaño de partícula. Este resultado concuerda con los obtenidos por Charoenwongpaiboon et al. (2019) donde obtienen tamaños de partícula de inulina sin cargar de 95.9, 115.7, 150.5, 207.3 y 238.5 nm con temperaturas de 50, 40, 30, 20 y 4°C respectivamente.

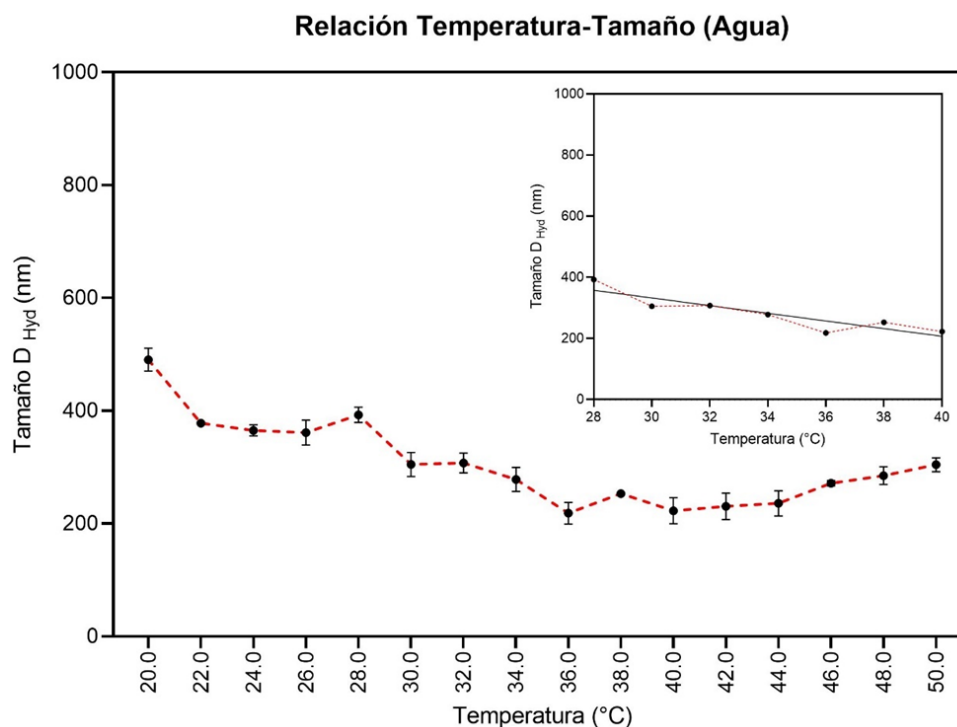


Figura 18. Relación entre temperatura y tamaño de Np Inu-Quer desde 20°C a 50°C en solución acuosa (Np Inu-Quer: Agua 4:10 p/v).

9.18. EFECTO DEL PH SOBRE EL TAMAÑO DE NP INU-QUER

La estabilidad de las nanopartículas a diferentes pH se evaluó mediante el equipo DLS. Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados son mostrados en la Figura 19.

Como se había analizado en la sección pasada, la inulina es un material capaz de formar redes tridimensionales, esta estructura se caracteriza por la absorción de agua en el medio en el que se encuentre, lo que desencadena un hinchamiento que da un aumento de volumen. Sin embargo, tanto el pH como la temperatura podrían afectar la capacidad de absorción del gel (Lopez et al., 2020)

Estos resultados sugieren que la capacidad de la inulina para la formación de redes poliméricas se rige por uniones débiles no covalentes. Ya que el cambio de pH en el medio de disolución, modifico de forma significativa los tamaños de partícula. En general, a pH 2 se registran formas inestable de tamaño de partícula, que va desde los 1400-800 nm. Mientras que a pH 8, 7.4, 7.2 haya más estabilidad y menor tamaño. Interesantemente, se observó que el diámetro de la mayoría de los tratamientos se intentaba estabilizar a un tamaño aproximado de 700-600 nm a una temperatura de 40°C.

Si se comparan estos resultados con los del punto “9.9. *Relación temperatura-tamaño*” es preciso observar, que, en efecto, el pH puede llegar a presentar cambios en las propiedades de nuestros materiales. En este caso en particular, es preciso

decir que nuestras nanopartículas al interactuar con pH ácido en el medio, son más propensas al hinchamiento.

A partir de estos datos, decidimos realizar una cinética de liberación a los diferentes pH, a fin de descartar la degradación del polímero a temperatura de 37 °C.

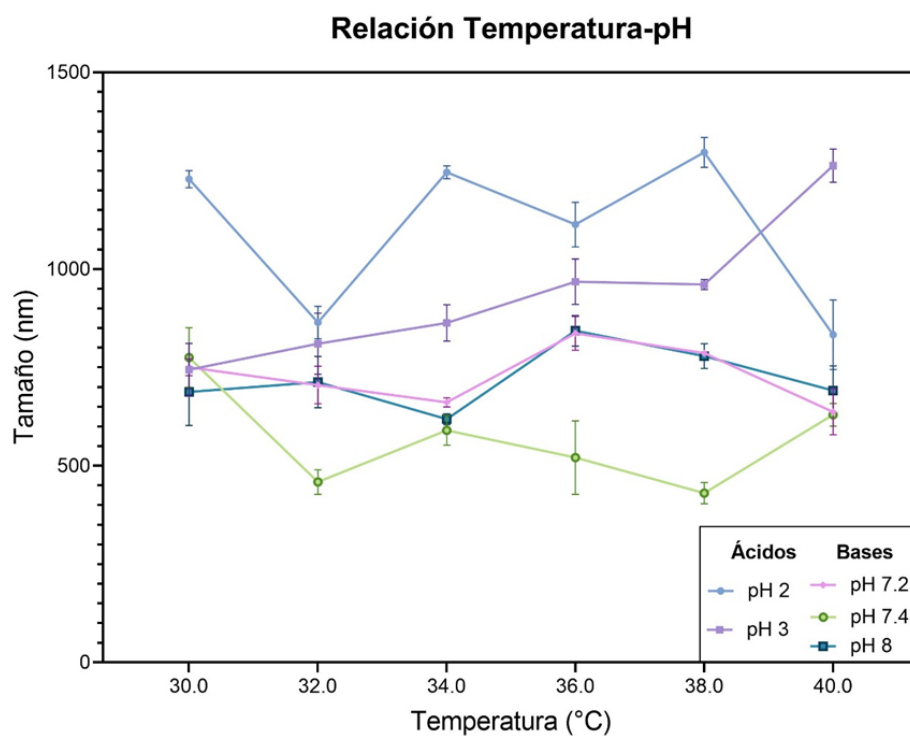


Figura 19. Relación temperatura-pH. Temperatura de 30°C a 40°C a diferentes pH (2, 3, 7.2, 7.4, 8).

9.19. EFECTO DEL PH EN NP INU-QUER SOBRE LA LIBERACIÓN DE QUERCETINA

Debido a que nuestras nanopartículas se pretenden administrar por vía oral, se evalúa su estabilidad en las diferentes condiciones de pH que pueden presentarse

en un sistema *in vitro*. Fueron agregados 1.5 mg/mL a diferentes pH por 15 minutos. Los resultados en las Figura 20 muestran una degradación de la matriz polimérica a pH ácidos, esto puede ser debido a la presencia de enlaces fácilmente hidrolizados de la inulina (Pitarresi et al., 2009). Los resultados muestran diferencias significativas en cada tratamiento. Donde su mayor liberación se da a pH básicos, iguales a las condiciones presentes en el colon.

Hay estudios que mencionan la descomposición de la inulina en ambientes de pH <4, ya que propicia el aflojamiento de las cadenas poliméricas. Esto está estrechamente relacionado con el porcentaje de concentración de inulina, siendo la de concentración de 25% la que presentaba una estructura más compacta (Glibowski et al., 2011).

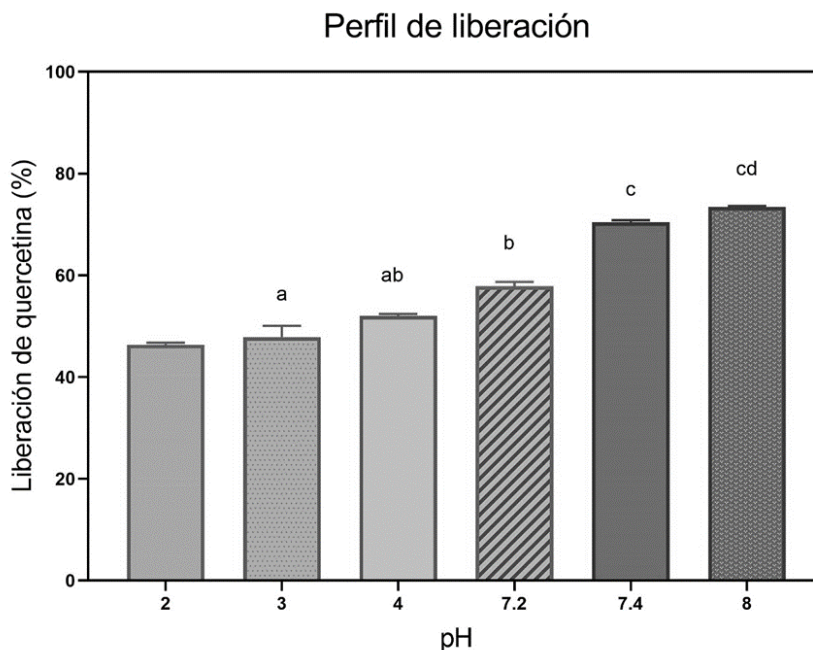


Figura 20. Perfil de liberación de quercetina (%) de Np Inu-Quer, a diferentes pH y temperatura de 37°C. Letras diferentes entre los tratamientos de pH indican ($P < 0.05$) según la prueba de Tukey.

De esta forma se confirma su paso por el estómago sin una degradación total de las nanopartículas. Sin embargo, no podemos olvidar que en el fluido intestinal es capaz de sufrir degradación por enzimas conocidas como Inulinasas. Autores han documentado que estas enzimas son capaces de degradar la matriz polimérica, aumentando la concentración de principio activo en el medio (Pitarresi et al., 2009).

9.20. CINÉTICA DE LIBERACIÓN

Se observa en la gráfica de perfil de liberación (% Liberado vs Tiempo) que en ambas temperaturas se presenta un comportamiento bifásico donde en la primera fase (0 a 15 min) se le conoce como fase de explosión, donde se le atribuye al flavonoide presente en la parte superficial de la matriz. Y en la segunda fase poseemos un perfil de liberación constante o paulatino después de 60 min. Lo que nos indica una liberación de tipo sostenida. Aquí se presenta el porcentaje de la liberación de la quercetina encapsulada.

En lo que se refiere a la primera fase de explosión, se ha reportado con en otros estudios con inulina como material de pared. Un ejemplo es Beirão-da-Costa et al. (2013) donde se encapsula aceite esencial de orégano en inulina para su liberación. Ellos reportan una fase explosiva de liberación de aceite de orégano en los primeros 75 min, En donde observan que es debido a la expansión o hinchamiento del polímero cuando entra en contacto con medios acuosos. Esta relajación de las cadenas puede ser la principal causa de la liberación precipitada de nuestra quercetina, al tratarse de un polímero con propiedades hidrófilas.

Otro estudio referente a liberación controlada por microencapsulado de flavonoides en polímero insoluble (Inulina) llegó a presentar el mismo comportamiento bifásico, donde se observó que micropartículas sin un agente canalizador, aumentaba el tiempo de liberación, obteniendo liberación del 60% en el primer día, mientras que las que poseían algún tipo de agente canalizador presentaban tiempos más prolongados, alcanzando el 30% al 4to día (Palma et al., 2014). Hasan et al. (2007) hablan de que la liberación inmediata también se puede deber al pequeño diámetro de sus nanopartículas, lo que da lugar a una gran superficie de intercambio con el medio, y también debido a la porosidad de su material de pared.

La cantidad de quercetina liberada a 37 y 25°C a pH 7.4 se midió a 320 nm. Como podemos observar en la Figura 21, obtenemos una liberación en un tiempo muy corto. Esto nos hace pensar que no hubo una buena encapsulación de nuestro compuesto.

Sabemos que para que se lleve a cabo una liberación de fármaco son necesarios factores como el tiempo y el medio de liberación (Pourtalebi et al., 2020). Para tener un análisis matemático del comportamiento que llega a presentar la matriz polimérica en la liberación de quercetina, se utilizaron primero el modelo de Weibull para obtener una interpretación sobre la cinética de liberación.

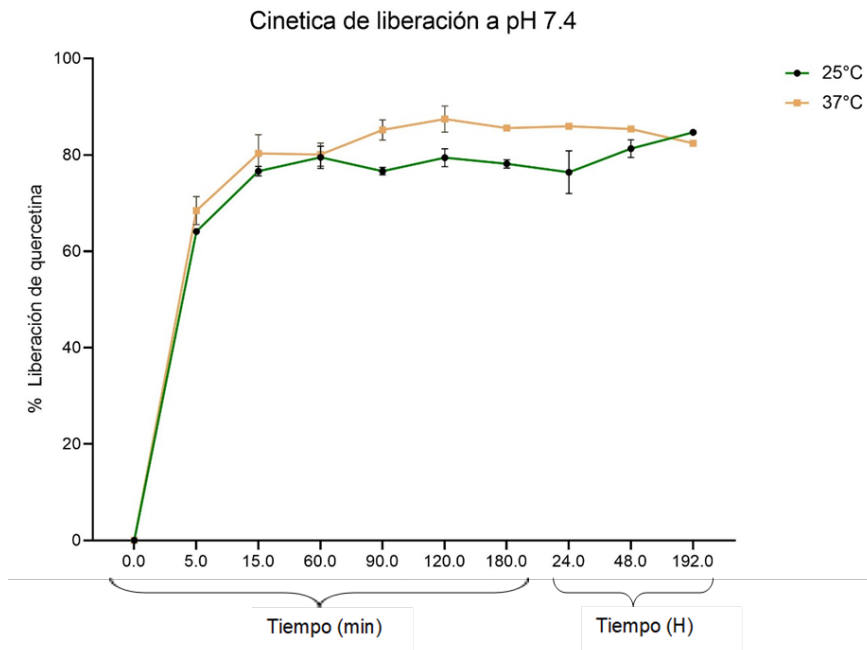


Figura 21. Gráfica de liberación acumulada de Np Inu-Quer a pH 7.4 en condiciones similares de colón, con temperaturas de 25°C y 37°C.

Las Nps presentaron un mejor ajuste utilizando la función de Weibull. A partir de aquí se utilizó esta ecuación como una función de ajuste, donde los valores de “b” nos permiten obtener una interpretación sobre la mecánica que poseen las nanopartículas (Tabla 10). Al realizar el análisis por medio del programa Origin 2018, obtuvimos una “b” de 0.93 para las dos liberaciones como se muestra en la Tabla 10. Gracias a la Tabla 2 podemos visualizar que contamos con una difusión normal, pero que presenta más de 1 mecanismo de liberación.

Tabla 10. Modelos matemáticos utilizados para la predicción de la mecánica de liberación. *

Para este modelo se utilizaron las primeras 3 horas de liberación a fin de descartar un efecto *burst*. Donde, en el modelo Weibull “b” es el valor de la potencia del tiempo. Para el modelo de Krosmeier

& Peppas, " k " es constante cinética, y " n " exponente difusional. Y en el modelo de Lindner Lippold, " b " es la representación del efecto burst.

Muestras y medios de difusión	Modelo Weibull		Modelo Krosmeier & Peppas			Modelo Lindner Lippold *			
	b	r^2	k	n	r^2	k	b	n	r^2
25°C	0.93	0.9414	71.09	0.48	0.9362	76.6	-0.019	0.46	0.9832
37°C	0.93	0.9402	87.01	0.57	0.9374	82.27	-0.016	0.57	0.9897

Este resultado con la ecuación de Weibull, coincide con los valores de n en la ecuación de Korsmeyer & Peppas, donde en las dos condiciones de temperatura, obtenemos una esfera con un tipo de difusión No Fickiano de tipo anómala. Este tipo de mecanismo se rige por la difusión e hinchazón de la matriz polimérica. Este reordenamiento de las cadenas y el proceso de difusión crean efectos anómalos en la difusión dependientes del tiempo (Peppas, 1985). Este tipo de difusión es normal en polímeros vítreos, cuando la temperatura del ambiente es menor que su T_g (Temperatura de transición vítrea). En el transporte que nosotros presentamos, la velocidad de liberación del disolvente y la relajación polimérica posee magnitudes similares (Klech y Simonelli, 1989).

También se hizo uso de la ecuación de Lindner y Lippold que se utiliza para describir más de un tipo de liberación en una matriz polimérica, donde se observa un coeficiente b (Efecto *burst*) muy bajo negativo, lo que nos indica que este efecto no está presente en las nanopartículas, por lo que podemos suponer que la quercetina se encuentra encapsulada dentro de la matriz polimérica y no en su

superficie. Y sus valores de n concuerdan con los de Korsmeyer & Peppas (Aragón et al., 2012)

Los resultados de liberación son útiles para evaluar la aplicabilidad que podrían llegar a tener las nanopartículas sintetizadas en alimentos. Cuando la liberación tiende a ser lenta, normalmente estas son aplicadas a formulaciones de alimentos funcionales. Por el contrario, cuando el principio activo presenta una liberación rápida, este queda expuesto fuera de la matriz polimérica perdiendo su protección. En este análisis se comprobó que la tasa de liberación de quercetina presenta una cinética alta, lo que sugiere que su aplicación presentaría mejores resultados en mezclas secas o alimentos instantáneos a fin de mantener el valor nutricional de la quercetina. Esto concuerda con la aplicación que le otorga Robert et al. (2012) a sus micropartículas de inulina cargadas con ácido gálico ante una liberación rápida.

9.21. EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE DPPH)

Uno de los principales intereses que tiene la industria alimentaria es la preservación de las propiedades químicas de las moléculas para su posterior consumo (Shahidi et al., 2020). Una de las principales desventajas que posee la quercetina es su oxidación a altas temperaturas y su fotosensibilidad. Por ende, investigaremos si la inulina como material de encapsulación juega un papel importante en la optimización de la estabilidad de las propiedades de la quercetina.

La quercetina contiene en su estructura dos grupos OH en el anillo B en posición orto, esto da como resultado un aumento en el tiempo de inducción. Por lo tanto, mientras más grupos hidroxilo presentes, mayor será su capacidad antioxidante, esto fue mencionado previamente por Hill et al. (2015).

Este estudio se utilizó para demostrar que el uso del polímero inulina mejora la biodisponibilidad de la quercetina y mantiene sus propiedades sin alterar. Las Nps fueron sometidas a diferentes estímulos que se encuentran en un sistema *in vitro*.

Los resultados arrojaron diferencias significativas no muy altas entre los tratamientos de temperatura, mostrando actividades antioxidantes altas en 30°C y 80°C. esto es equiparable con los resultados obtenidos en el capítulo 7.9 *Relación temperatura-tamaño*. Donde comentamos que a temperaturas de 28°C en adelante se llega a presentar un aumento de la solubilidad de la inulina, esto conlleva a una liberación de quercetina al medio, que a su vez aumenta el porcentaje de radicales libres.

Como observamos en los datos de pH, vemos un mayor porcentaje de radicales libres a pH básico, siendo el más alto a 7.4 (Tabla 11). Esto está relacionado con los resultados del capítulo 7.10 *Relación pH- tamaño*. Donde vemos una disminución del tamaño de partícula a pH básico.

Este hallazgo sugiere que la estructura del complejo dependerá en gran medida del pH del medio.

También podemos decir que se logró una alta eficiencia de encapsulación del flavonoide, ya que los valores de porcentaje de captación de radicales libre para quercetina libre arrojaron un total de 72.41%. con esto podemos decir que el uso de inulina como material de encapsulación desempeña un papel importante en la protección y estabilidad de la quercetina, ya que no se observan alteraciones de su capacidad antioxidante a temperaturas altas o en ambientes de pH extremos. Estos resultados son equiparables a los obtenidos por Beirão-da-Costa et al. (2013), Charoenwongpaiboon et al. (2019), Bustos et al. (2013) donde mostraron que la inulina proporciona una estabilidad térmica en varios compuestos. Como conclusión mencionan que la inulina representa hoy en día, el material de encapsulación del futuro para diversos campos, industria alimentaria y en medicina.

En el caso del aumento del porcentaje de captación de radicales libre a pH 7.4 en comparación con el total original de la quercetina libre (72.41%), observamos diferencia significativa. Esto es explicado por la acción sinérgica que proporciona la inulina a la quercetina. Otros autores atribuyen el aumento de la actividad antioxidante a un efecto de tipo sinérgico positivo entre la matriz polimérica y el principio activo (Mu et al., 2021).

El menor efecto de antioxidante lo vemos a pH 2, esto es comparable con los resultados obtenidos anteriormente por Sedaghat et al (2019) donde lo atribuyen a una cristalización de la quercetina a $\text{pH} < 2$, lo que deriva en una disminución en la solubilidad a este pH.

Tabla 11. Porcentaje de captación de radicales libres en Np Inu-Quer a diferentes estímulos (temperatura y pH). * Medias con letras iguales no son significativas. ANOVA y prueba de Tukey (p >0.05).

Captación de radicales libres (%)					
Temperatura (°C)	$(\bar{X} \pm D.E)$		pH	$(\bar{X} \pm D.E)$	
20	67.67±0.005	a *	2	67.70±0.056	a
30	68.02±0.006	b	4	70.68±0.02	ab
40	67.04±0.008	c	7.2	71.38±0.004	c
50	63.17±0.026	d	7.4	77.50±0.015	d
60	65.54±0.003	e			
70	64.34±0.004	f			
80	68.61±0.003	g			

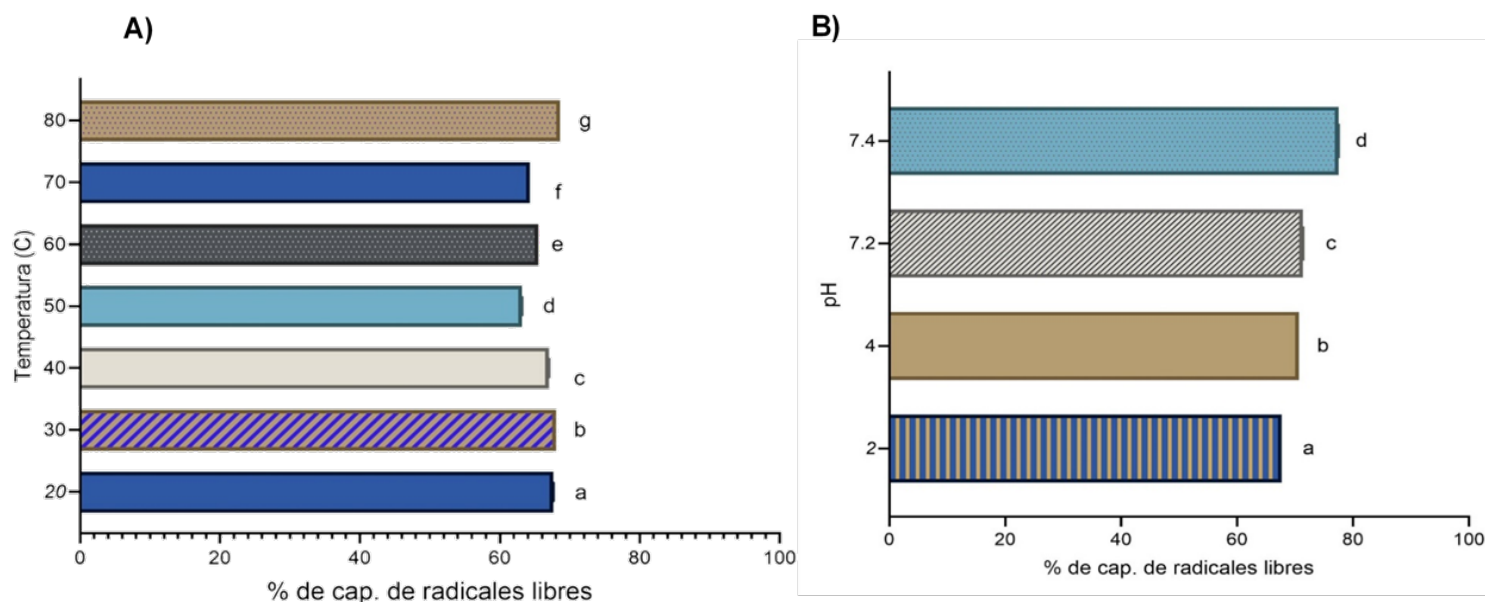


Figura 22. A) Gráfica con el porcentaje de captación de radicales libres de Np In-Quer a diferentes temperaturas. **B)** Gráfica con porcentaje de captación de radicales libres de Np In-Quer a diferente pH. *Letras diferentes representan (P <0.05) según prueba de Tukey.

9.22. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La adición de sistemas de nanopartículas cargados con componentes activos puede llegar a causar complicaciones en la salud si no se modela el potencial de los ingredientes en sistemas *in vitro*. Esto debido a las interacciones que puedan llegar a presentar los componentes alterando sus propiedades fisicoquímicas, influyendo en su paso a través del tracto gastrointestinal y en su biodisponibilidad (Martirosyan et al., 2016).

En la última década han surgido las investigaciones referentes a las propiedades terapéuticas que presentan los flavonoides, como su acción antioxidante y anticancerígeno. Estos han llegado a presentar acción protectora de daño del ADN en células Caco-2 y HepG-2 (Wang y Zhao, 2016).

En esta sección evaluaremos la viabilidad de las Np Inu-Quer en células del tracto gastrointestinal mediante sistemas de cultivo *in vitro* que consta de Caco-2, células de carcinoma hepatocelular (HepG-2) y células de tipo fibroblastos dermales humanos (HDFa).

Cabe destacar que se presentan los datos de viabilidad celular obtenidos de los ingredientes puros: inulina y quercetina. A las mismas concentraciones de las Np, tanto cargadas como no cargadas. A fin de poder comparar datos. Las viabilidades se presentan en la Tabla 12.

9.22.1. VIABILIDAD EN CÉLULAS Caco-2

Como hace mención Vila Vecilla (2016), las células Caco-2 llegan a mostrar una diferenciación enterocítica, de mejor morfología y funcionalidad, en comparación a otras líneas celulares de adenocarcinoma de colon. Es capaz de expresar actividad hidrolítica de enzimas del intestino delgado, ejemplo la sacarasa-isomaltasa, lactasa, aminopeptidasa N, y dipeptidil-peptidasa IV. Mas el uso de ensayos colorimétricos, como lo es el MTS, nos ayuda a evaluar la actividad mitocondrial de la célula (Yuan et al., 2012). Este estudio nos ayuda a comprender la dinámica en la absorción de un compuesto bioactivo. Si esta llega a presentar un daño por la exposición a estos principios activos veremos un deterioro en la absorción del compuesto.

En lo referente a los nanomateriales utilizados como posibles transportadores para su aplicación en modelos celulares, es importante connotar que citotoxicidad tendrá una respuesta en relación con la concentración aplicada y al tiempo de exposición al compuesto a la hora del conteo celular.

Los resultados del ensayo MTS, para la evaluación de la viabilidad celular en contacto con diferentes concentraciones de Np Inu-Quer se muestran en la Figura 23.

En base a la recopilación de datos sobre los efectos anticancerígenos de la quercetina, se esperaba que, una vez expuestas las Np en línea celular de adenocarcinoma humano, disminuiría el porcentaje de proliferación celular. Sin

embargo, a primera vista podemos observar que a concentraciones arriba de 60 nM, se presentan dos tipos de efectos, un efecto citotóxico con diferencia significativa entre las células control, y un segundo, efecto prooxidante que aparece cuando el tiempo de exposición a las nanopartículas aumenta a 72 horas. Este efecto de comportamiento bifásico o “growth hormesis” se ha presentado anteriormente en células Caco-2. Dihal et al. (2006) atribuyen este fenómeno de proliferación celular a 96 h, al grado de diferenciación de las células Caco-2 y la presencia de metabolitos de quercetina. También fue observado en otras líneas celulares como HCT-116, HT29 y MCF-7 por Van Der Woude et al. (2003). Ambos autores formulan la teoría de una interacción con el receptor de estrógeno (ER) y el agonista quercetina. En nuestro caso, un aumento de la concentración de Np por arriba de 60 nM, pudo haber actuado como un fitoestrógeno, capaz de activar proteínas tirosina quinasa intracelulares, que esto desencadena un estímulo para la proliferación celular (Dihal et al., 2006; Van Der Woude et al., 2003).

En lo correspondiente a la comparación con quercetina e inulina libres, conseguimos ver que ambos tienen la misma tendencia a aumentar el porcentaje viabilidad celular después de 72 horas. En la Tabla 9 obtenemos el potencial de la quercetina pura como inhibidor de crecimiento celular dependiente de tiempo (72 h) y dependiente de dosis (3.7-15 nM). Estos mismos resultados ya habían sido presentados por Huang et al., (1999), donde observan el mismo comportamiento de la quercetina a concentraciones de entre $10 \pm 50 \mu\text{M}$ en células A431. Este efecto es observable en un tiempo de 12 a 72 horas. Ellos afirman que tanto la quercetina

como la luteolina son dos inhibidores de la actividad de la tirosina quinasa y mediadores de EGFR.

Las nanopartículas cargadas no muestran actividad anticancerígena hacia las células de Caco-2 en concentraciones por debajo de 30 nM. Esta inhibición es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición en las células. La dosis estimada de inhibición de crecimiento (IC50) para Np Inu-Quer fue de 65 nM. Mientras que para Np-Inu, inulina y quercetina fue de 7.5 nM.

Aun no se cuenta con información concreta sobre el papel que juega la quercetina en el efecto antitumoral. Sin embargo, los mecanismos más aceptados son su participación en la inhibición de la tirosina quinasa (PI3K)- Akt/PKB (proteína B quinasa), inhibición de vías de señalización miogénicas, modificación de vías de tumorigénesis, y con interacción con receptores y proteínas específicos. (Darband et al., 2018).

Nuestros resultados demuestran que las Np Inu-Quer modulan la proliferación celular de Caco-2 de forma bifásica. Por lo tanto, su efecto depende de la concentración administrada. En conclusión, podemos decir que las Np Inu-Quer no muestran efectos anticancerígenos a las concentraciones propuestas en células de carcinoma humano (Caco-2).

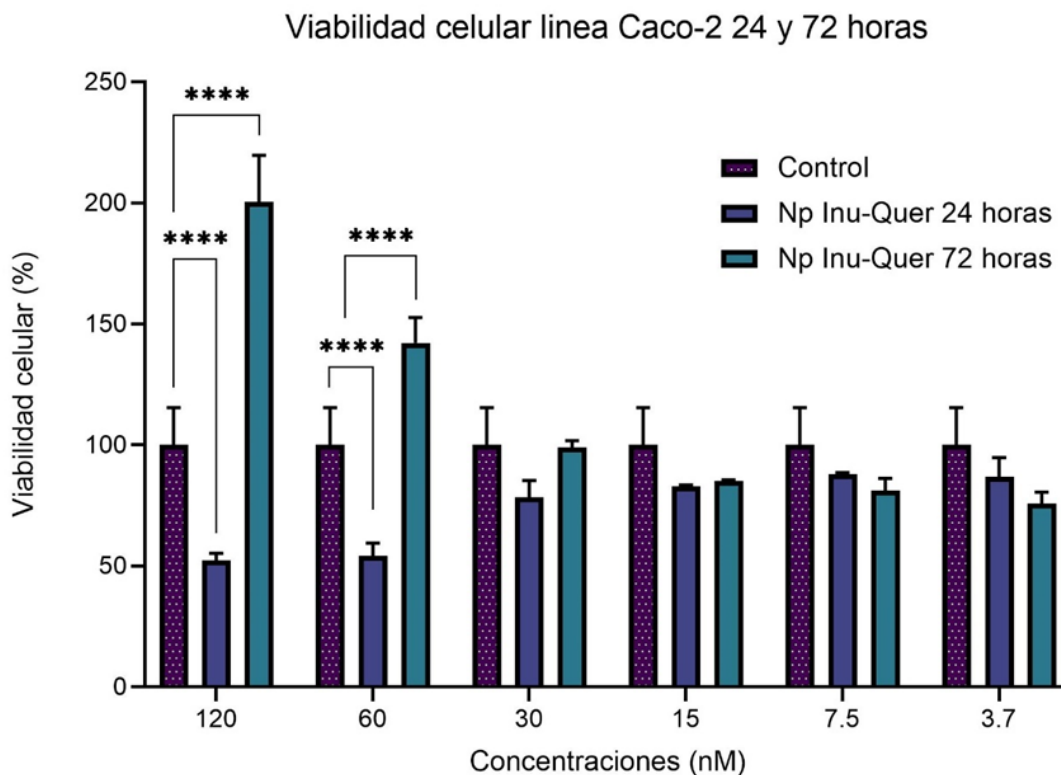


Figura 23. Efecto de Np Inu-Quer a diferentes concentraciones (nM) en viabilidad celular de línea Caco-2 a 24 y 72 horas. Valores son presentados en promedio $\pm$ desviación estándar. Se utilizo ANOVA con comparación múltiple de Dunnett, donde **** indica $p < 0.05$.

9.22.2. VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS HepG2

Para la determinación de los efectos citotóxicos de las Np Inu-Quer, se probó su viabilidad celular en la línea HepG2. Se comparo la viabilidad con muestras de inulina y quercetina a las mismas concentraciones (Tabla 12). Gracias a eso se observó que quercetina e inulina presentan un efecto de antiproliferativo en todos los tratamientos. Llegándose a presentar una disminución de la viabilidad en relación al

tiempo. Para estas muestras se obtuvo un IC50 de 7.5 nM para quercetina, y un IC50 de 3 nM aproximadamente para inulina.

Las Np Inu-Quer influyeron en la disminución de la viabilidad celular. Al igual que en el apartado 7.14.1 Viabilidad de células Caco-2, obtenemos un efecto bifásico producido por la presencia de quercetina, donde hay un aumento en la proliferación celular a las 72 horas a concentraciones 60-120 nM. Y un efecto antiproliferativo a concentraciones por debajo de 15 nM, con un IC50 de 55 nM. Aquí se mostró diferencia significativa en las 72h de la exposición. Lo que indica que se redujo la toxicidad de los compuestos individuales. Esta diferencia entre compuestos puede ser explicada por el potencial sinérgico que ofrece la conjugación de inulina-quercetina. Zhang et al. (2018) muestran los mismos resultados de sinergia entre quitosano e inulina en células HepG2. Sin embargo, no se sabe aún el mecanismo detrás de esta actividad. Se informó también que un aumento de los productos de oxidación de quercetina, pueden llegar a causar citotoxicidad. Estos radicales libres podrían participar en el aumento de ROS lo que induciría un efecto apoptótico (Nishimura et al., 2017). Se ha encontrado que la actividad antioxidante o prooxidante dependerá del modelo celular utilizado. El efecto prooxidante de la quercetina se ve presente en células de cáncer agresivas con proliferación activa (Kim et al., 2017).

Como podemos observar, las Np Inu-Quer inducen la muerte celular en células HepG2 inhibiendo el crecimiento de células cancerígenas. Por lo tanto, podemos

decir que la encapsulación de quercetina con inulina mejora su eficacia como inhibidor de la proliferación de cáncer de hígado de forma *in vitro*.

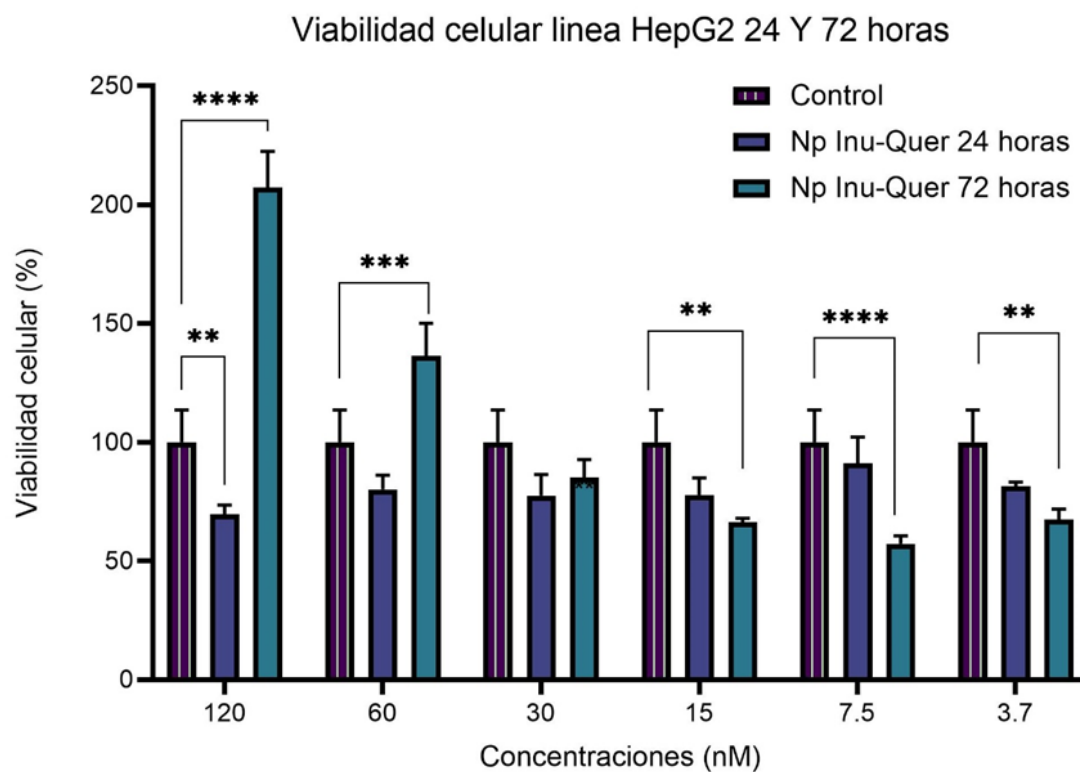


Figura 24. Efecto de Np Inu-Quer a diferentes concentraciones (nM) en viabilidad celular de línea HepG 2 a 24 y 72 horas. Valores son presentados en promedio $\pm$ desviación estándar. Se utilizo ANOVA con comparación múltiple de Dunnett, donde **** indica $p < 0.05$, *** $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.0001$.

9.22.3. VIABILIDAD CELULAR CÉLULAS HDFa

Se trataron células HDFa con Np Inu-Quer a diferentes concentraciones para la evaluación de posibles efectos citotóxicos aplicando el método del ensayo MTS. El ensayo dio como resultado un valor de IC₅₀ de 45 nM para células HDFa. En la Figura 25 podemos observar una inhibición del 50% de la proliferación celular a las 24 horas a una concentración de 120 nM, con un efecto de citotoxicidad significativo. A su vez, vemos un efecto proliferante a las 72 horas del tratamiento. Lo que nos dice que las Np Inu-Quer es capaz de disminuir la población de fibroblastos de HDFa de una forma dosis-tiempo dependiente. En las concentraciones más bajas de 15 nM- 3.7 nM desaparece por completo el efecto proliferante, aquí encontramos una disminución de la población tanto en las 24 como en las 72 horas. A la concentración más baja (3.7 nM) no hay variabilidad en la viabilidad celular en comparación con las células no tratadas. Por lo tanto, a 3.7 nM las células de HDFa no mostraron signos de toxicidad a esta concentración.

En la Tabla 12 se puede corroborar que quizá el ingrediente que este causando la proliferación en células HDFa, es la inulina, ya que a concentración de 120 nM a 24 horas presenta una viabilidad sin diferencia significativa contra control, sin embargo, a las 72 horas su viabilidad aumenta hasta un 175% siendo $p < 0.001$. Es preciso remarcar que hay una diferencia en los fenómenos de la viabilidad de Np Inu-Quer en comparación con sus materiales (Inulina, quercetina). Se propone la teoría que estas diferencias notorias se deben a los tamaños de partícula, que son internalizadas con mayor velocidad.

Otra interpretación para el efecto prooxidante de la quercetina, puede ser debido a su participación en la activación de vías. Dinda et al. (2016) mostraron que una fracción de *Caléndula Officinalis* mostraba efectos activantes de la vía PI3K para la proliferación de fibroblastos HDFa y por la expresión de α -SMA y CTGF. Los flavonoides son conocidos por su potencial de inhibición de quinasas e inhibidores de la activación de vías de señalización de y Akt,, encargados de la viabilidad celular por medio de la regulación de la apoptosis (Moskot et al., 2015).

También se ha encontrado que la topografía presente en la pared matricial, juega un papel importante en la adhesión y la proliferación celular (Krivorotova et al., 2016).

Con este análisis se comprobó la viabilidad celular que desempeñan las Np Inu-Quer sobre fibroblastos humanos como células normales de la línea HDFa a diferentes concentraciones, donde se encontró que a dosis altas y exposición prolongada se presenta una actividad de tipo citotóxica. De las concentraciones analizadas en este ensayo, la concentración que demostró no tener efecto citotóxico en las células HDFa es a 3.7 nM.

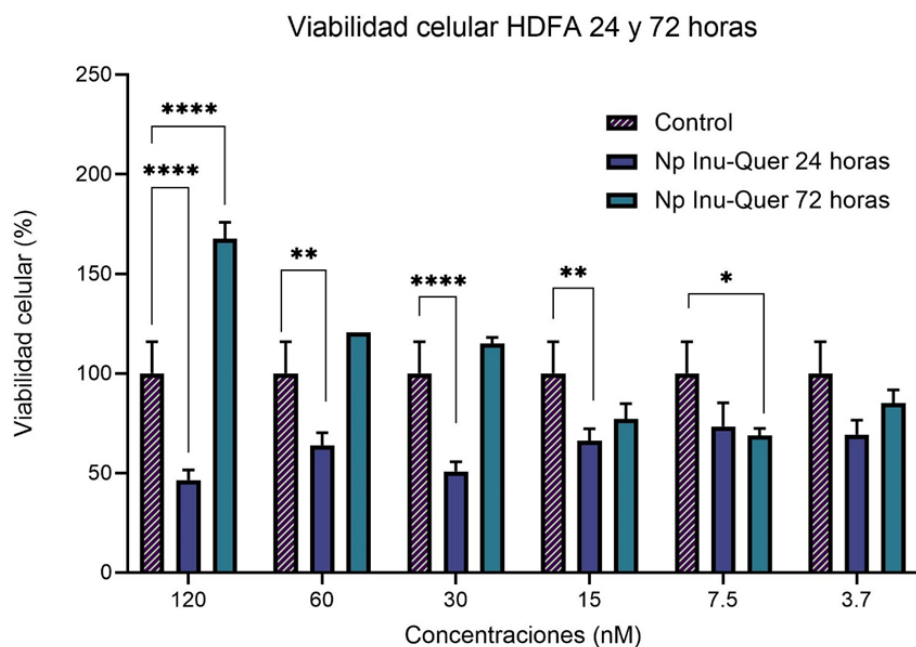


Figura 25. Efecto de Np Inu-Quer a diferentes concentraciones (nM) en viabilidad celular de línea HDFA a 24 y 72 horas. Valores son presentados en promedio $\pm$ desviación estándar. Se utilizo ANOVA con comparación múltiple de Dunnett, donde **** indica $p < 0.05$, *** $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.001$,

* $p \leq 0.0001$

Tabla 12. Resultados de viabilidad celular por ensayo MTS en las diferentes líneas celulares. Los resultados se presentan como un porcentaje promedio $\pm$ Desviación estándar. Donde la notación (*) indica (p. value < 0.05), (**) p. value < 0.01, (***) p. value < 0.001, y (****) p. value < 0.0001, que indica diferencia significativa de las muestras control.

% DE VIABILIDAD CELULAR										
Línea celular	Concentración (nM)	120		60		30				
	Tiempo (h)	24	72	24	72	24	72	24	72	
Caco-2	Np Inu-Quer	52.2 $\pm$ 3.0 ***	200.4 $\pm$ 19.3 ****	54.2 $\pm$ 5.2 ***	142.2 $\pm$ 10.5 ****	78.4 $\pm$ 6.9	98.9 $\pm$ 2.8			
	Np Inu	120.6 $\pm$ 5.5	143.1 $\pm$ 19.3 ****	97.4 $\pm$ 12.7	86.3 $\pm$ 0.4	93.8 $\pm$ 9.1	77.1 $\pm$ 4.0			
	Quercetina	108.5 $\pm$ 2.7	137.0 $\pm$ 4.8 **	99.1 $\pm$ 7.4	106.1 $\pm$ 10.2	91.7 $\pm$ 6.8	84.7 $\pm$ 0.8			
	Inulina	105.6 $\pm$ 1.5	176.9 $\pm$ 7.2 ****	90.2 $\pm$ 10.4	111.2 $\pm$ 1.5	89.8 $\pm$ 7.1	79.1 $\pm$ 4.9			
HepG2	Np Inu-Quer	69.7 $\pm$ 3.9 **	207.2 $\pm$ 15.1 ****	80.1 $\pm$ 6.0	136.3 $\pm$ 13.7 ***	77.5 $\pm$ 8.9	85.1 $\pm$ 7.6			
	Np Inu	124.7 $\pm$ 2.9 *	129.3 $\pm$ 17.1 **	120.5 $\pm$ 4.9	71.6 $\pm$ 12.1	99.0 $\pm$ 0.9	67.0 $\pm$ 10.4			
	Quercetina	111.4 $\pm$ 3.4	102.5 $\pm$ 10.2	100.4 $\pm$ 5.1	73.6 $\pm$ 0.3	98.0 $\pm$ 1.8	64.2 $\pm$ 2.0 ***			
	Inulina	170.9 $\pm$ 3.4 ****	117.1 $\pm$ 11.1	139.2 $\pm$ 11.6 **	60.4 $\pm$ 1.0 **	132.1 $\pm$ 15.5 **	59.4 $\pm$ 1.0 ***			
HDFa	Np Inu-Quer	46.5$\pm$5.1 ****	167.6$\pm$8.2 ****	63.9 $\pm$ 6.2 **	120.6 $\pm$ 0.4	50.8$\pm$4.8 ****	114.1 $\pm$ 3.1			
	Np Inu	91.0 $\pm$ 4.2	172.4$\pm$15.0 ****	96.7 $\pm$ 8.7	63.6 $\pm$ 9.8 *	75.2 $\pm$ 10.7	91.3 $\pm$ 4.4			
	Quercetina	82.8 $\pm$ 2.6	93.5 $\pm$ 6.4	76.8 $\pm$ 6.7	91.7 $\pm$ 9.8	58.6$\pm$4.9 **	74.2 $\pm$ 5.7			
	Inulina	91.0 $\pm$ 11.7	124.3 $\pm$ 10.1	81.2 $\pm$ 6.2	73.8 $\pm$ 9.5	71.5 $\pm$ 1.8	48.5$\pm$13.1 ****			

Tabla 12. Resultados de viabilidad celular por ensayo MTS en las diferentes líneas celulares. Los resultados se presentan como un porcentaje promedio $\pm$ Desviación estándar. Donde la notación (*) indica (p. value < 0.05), (**) p. value < 0.01, (***) p. value < 0.001, y (****) p. value < 0.0001, que indica diferencia significativa de las muestras control.

Linea celular	% DE VIABILIDAD CELULAR										
	Concetración (nM)	15			7.5			3.7			
	Tiempo (h)	24	72		24	72		24	72		
Caco-2	Np Inu-Quer	82.8 ± 0.7	85.2 ± 0.2		87.9 ± 0.7	81.2 ± 4.8		86.7 ± 8.1	75.8 ± 4.7	*	
	Np Inu	82.3 ± 7.2	81.8 ± 5.7		107.8 ± 38.5	51.9 ± 2.3	****	89.5 ± 4.3	89.5 ± 2.8		
	Quercetina	91.5 ± 1.4	76.0 ± 4.0	*	72.2 ± 4.5	55.3 ± 6.9	****	85.8 ± 7.9	69.4 ± 3.5	**	
	Inulina	74.2 ± 5.7	68.1 ± 7.2	*	87.8 ± 11.2	76.9 ± 16.1		53.0 ± 12.0	**	84.6 ± 1.7	
HepG2	Np Inu-Quer	77.7 ± 7.2	66.3 ± 1.7	*	91.1 ± 11.0	57.2 ± 3.4	****	81.5 ± 1.6	67.5 ± 4.4	**	
	Np Inu	93.6 ± 0.9	66.2 ± 10	*	116.2 ± 0.3	80.2 ± 2.8		112.2 ± 9.9	90.7 ± 4.5		
	Quercetina	109.8 ± 7.7	56.2 ± 6.2	****	72.1 ± 11.3	51.3 ± 5.5	****	81.1 ± 9.3	74.3 ± 1.3	*	
	Inulina	110.3 ± 1.5	69.4 ± 1.0	**	105.3 ± 2.1	62.4 ± 1.9	***	113.3 ± 16.3	59.2 ± 3.4	****	
HDFa	Np Inu-Quer	66.2±5.8	*	77.0±7.6	73.3±11.9	68.8±3.5	*	69.2±7.2	85.1±6.5		
	Np Inu	84.4±9.4		113.1±7.4	102.2±2.9	103.4±17.2		68.0±4.7	82.4±2.7		
	Quercetina	95.8±4		71.5±0.8	*	47.4±0.5	***	64.2±6.9	**	68.1±7	72.9±6.1
	Inulina	52.3±3.6	**	51.2±2.2	***	72.1±2.1		65.2±5.3	**	72.9±0.9	73.8±5.7

9.23. ANÁLISIS DE ÓXIDO NÍTRICO

Los liposacáridos (LPS) son estimuladores de la respuesta inflamatoria, que activan, en los macrófagos, mediadores como el óxido nítrico (NO) que se consideran de carácter proinflamatorio, las prostaglandinas (PG) y citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), e interleucinas IL-1, IL-6, e IL-8 (T. Li et al. 2019). En este análisis, se observaron los efectos inmunomoduladores de Np Inu-Quer, Np Inu, quercetina e inulina utilizando células RAW 264.7 estudiando la cantidad liberada de óxido nítrico (NO). En la Figura 27.A se presenta la actividad de NO inducida por las muestras a concentraciones de 30, 24 y 12 nM, es expresada como el % de producción de nitritos liberadas en las células RAW 264.7.

Podemos observar que los niveles de producción de NO, comparables con la cantidad de NO producida por el control positivo LPS, tiene poca actividad estimulante en las concentraciones de 30, 24 y 12 nM, para todas las muestras. Se realizó un ensayo de viabilidad para descartar cualquier potencial de citotoxicidad para las 4 muestras, en las mismas células. Se observó que la disminución en la producción del óxido nítrico, no mostró efecto tóxico en las células RAW 264.7 en el rango de concentraciones de 30 a 12 nM en comparación con las células de control sin tratamiento inducidas por LPS (Figura 27.B). Sin embargo, logramos notar una disminución de la viabilidad con una diferencia significativa de $p < 0,001$ con Np Inu a 30 nM.

En cuanto a la producción de NO inducida por LPS, se observó una notable disminución para todos los tratamientos en una relación dependiente de la concentración. Se pueden observar disminuciones del porcentaje de NO de hasta el 96% (Quercetina 30nM-12nM). Las 4 muestras redujeron la producción de NO a menos del 10% en las células tratadas con LPS, en comparación con el control.

La quercetina ha demostrado en investigaciones pasadas inhibir la producción de ARN m y NO de iNOS en macrófagos activas con LPS/ IFN- γ , sin presentar efecto sobre la activación de NF- κ B (Figura 26.A). Los macrófagos activados suelen liberar factores celulares como NO, TNF- α y PGE2, esto inhibe el crecimiento de células de tipo cancerígenas. El NO juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmunitaria contra tumores (Karnjanapratum et al., 2011). Por lo tanto, la considerable disminución en la producción de NO de macrófagos murinos por las Np Inu-Quer, Np Inu, Quercetina e inulina sugieren que podrían actuar como modificadores de la respuesta biológica y, por consiguiente, son capaces de estimular el sistema inmunológico. T. Li et al. (2019) lograron observar que la quercetina inhibía el aumento de NO con células estimuladas por LPS. Ellos comentan que es debido a la supresión del ARNm del óxido nítrico sintasa (iNOS) Quercetina también ha demostrado disminuye la quinasa C-Jun N-terminal (JNK) / p38/ activador de la proteína 1 (Byun et al., 2013).

El potencial antiinflamatorio de la quercetina se le atribuye a la inhibición de citocinas proinflamatorias, esto debido a la capacidad reductora de la actividad mieloperoxidasa (MPO), estrés oxidativo, reducción de COX-2, activación de

NLRP3, p65, NF-Kb y la señalización de MAP quinasa, aumenta la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Figura 26.A). No obstante, también ha sido estudiada por su potencial efecto analgésico, por activación de la vía Nrf2 / HO-1 (Ferraz et al., 2020).

Le et al. (2014) demostraron por primera vez el potencial de la quercetina como potencial tratamiento de la atrofia muscular inducida por obesidad. Estos efectos se asociaron con la supresión de la respuesta inflamatoria, ya que se observó una disminución de los receptores inflamatorios TLR4 y 4-1BB, así como la inhibición de sus vías de señalización.

Otras vías que puede llegar a tomar la quercetina es el aumento de en la producción de NO por la activación de la vía PI3K/Akt y AMPK. Taguchi et al. (2020) presentan en su investigación el potencial uso de la quercetina como promotor en la producción de óxido nítrico para el tratamiento de la disfunción endotelial por las complicaciones vasculares comúnmente vistas en personas con diabetes mellitus. Aquí la quercetina activa la producción de e NOS y la producción de NO, que conlleva a la vasodilatación en la aorta de ratones con diabetes mellitus por la activación de la vía de señalización PI3K/Akt y AMPK. Sin embargo, es importante resaltar que para este ensayo se utilizó una concentración de quercetina de entre 9000 nM a 5000 nM.

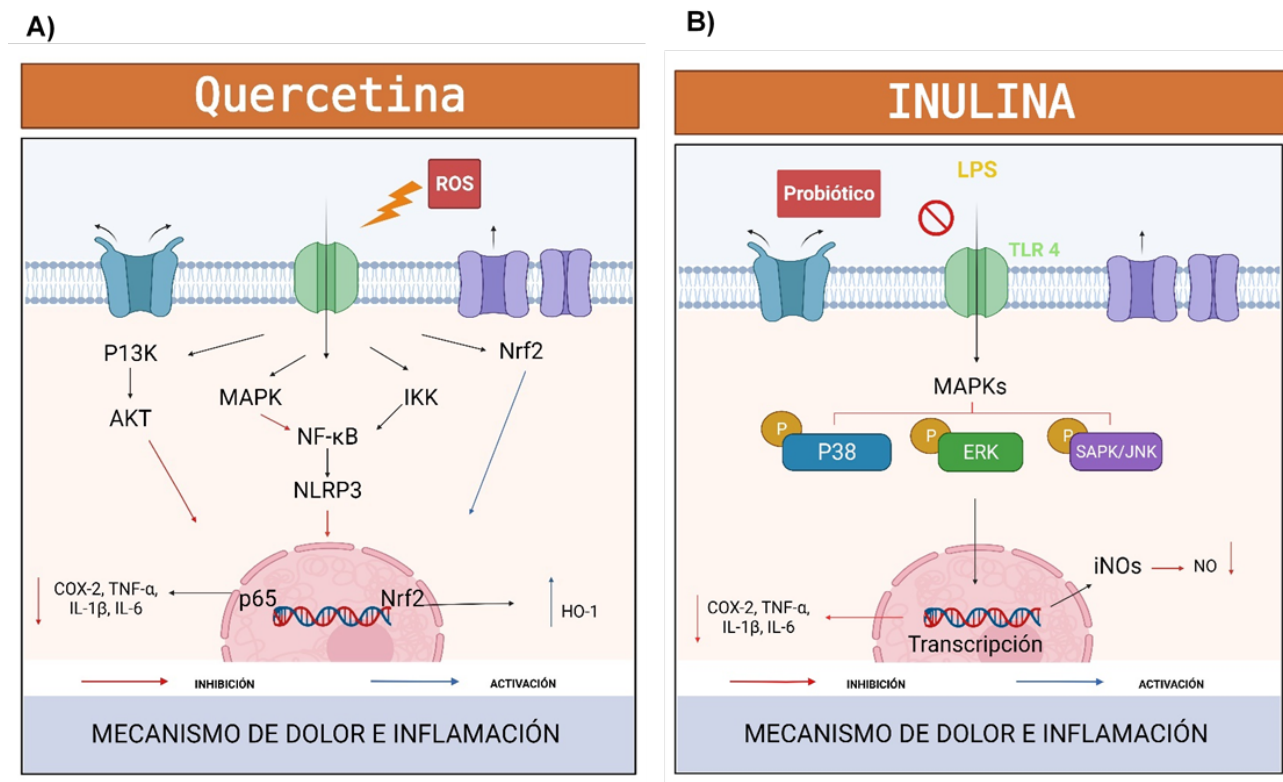


Figura 26. A) Dianas intracelulares de quercetina. Tanto los ROS como los estímulos externos de inflamación, activan una señalización intracelular capaz de causar una inflamación y/o dolor. Las flechas de color azul representan vías estimuladas por quercetina, y flechas rojas representan vías inhibidas por flavonoides (Ferraz et al. 2020). **B)** Mediadores de inflamación y dolor inhibidos por inulina. Esquema representativo de lo obtenido por Khanna et al. (2020). Imagen creada en BioRender.com.

No obstante, es importante enfatizar que la inulina también llega a presentar propiedades antiinflamatorias presentes en concentraciones menores a 24 nm (Figura 26.B). Como es posible observar en la Tabla 12. Las Np Inu y la inulina comercial no presentan ninguna diferencia significativa en cuanto a la disminución en la producción de NO. Con esto podemos constatar que no hubo alteración de las

propiedades antiinflamatorias de la inulina cuando esta paso por el proceso de secado por aspersión a una temperatura de 120°C.

En la Figura 26.B vemos el mecanismo de acción de inulina sobre vías inflamatorias. Lee et al. (2018) hablan de la capacidad de los probióticos de inhibir COX-2 por la supresión de la vía de señalización NFκB en células RAW. Por otra parte, Li et al. (2019) observaron que en células HT-29 había una reducción en la expresión de p38 por la inhibición de MAPK. Estos resultados se obtuvieron de la combinación de dos prebióticos de tipo *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*. Khanna et al. (2020) postula que la actividad antiinflamatoria de los probiótico se da por diversos factores, como la inhibición de NO, citocinas proinflamatorias y la disminución en la regulación de COX-2 por la inhibición de la vía MAPK, así como supresión de NFκB.

Otro efecto importante que se observa es el efecto sinérgico de inulina y quercetina en las Np Inu-Quer desde su administración en una concentración de 30nM. Nosotros proponemos que esta diferencia en el porcentaje de producción de NO puede llegar a ser por dos factores:

1. Tamaño de partícula: Las nanopartículas obtenidas por el método de secado por aspersión presentan un tamaño promedio de 110.05 ± 13.6 nm a una temperatura de 37°C con una liberación de quercetina de casi el 90% a las 2 horas. Mientras que la inulina comercial muestra tamaños $< 500 \mu\text{m}$. Esto da como resultado una rápida internalización de los

compuestos activos a través de receptores de membrana TLR4 o IFN- γ por difusión pasiva.

2. Inhibición y activación de vías de señalización: Con base al estudio realizado sobre los mecanismos de acción de ambas moléculas, podemos decir que ambos actúan como inhibidores de las mismas vías de señalización de la inflamación, así como reguladores de agentes proinflamatorios. Por ende, obtenemos una mejor y más rápida respuesta en cuanto a la disminución de NO.

Hasta el día de hoy, los mecanismos de acción por los cuales la quercetina e inulina demuestran su potencial antiinflamatorio no han sido aclarados, esto debido, en el caso de la quercetina a la capacidad que tienen la molécula de ser multi-diana. Mientras que en el caso de la inulina puede ser debido a su reciente descubrimiento como nano encapsulador para alimentos. Sin embargo, con los resultados obtenidos podemos notar ambos ofrecen una respuesta biológica de tipo terapéutica para la regulación en la disminución de NO, inhibiendo o activando proteínas reguladoras, esto en relación a la concentración añadida.

Los resultados de la actividad antioxidante de las Np Inu-Quer, comprobaron reducir la actividad antiinflamatoria producida por la liberación de óxido nítrico en células RAW 264.7. De esta forma podemos decir que el uso de la nanotecnología en el área de liberación de compuestos activos ofrece una ventaja en la regulación

de actividades biológicas. También que el uso estratégico de los ingredientes puede llegar a potenciar efectos terapéuticos.

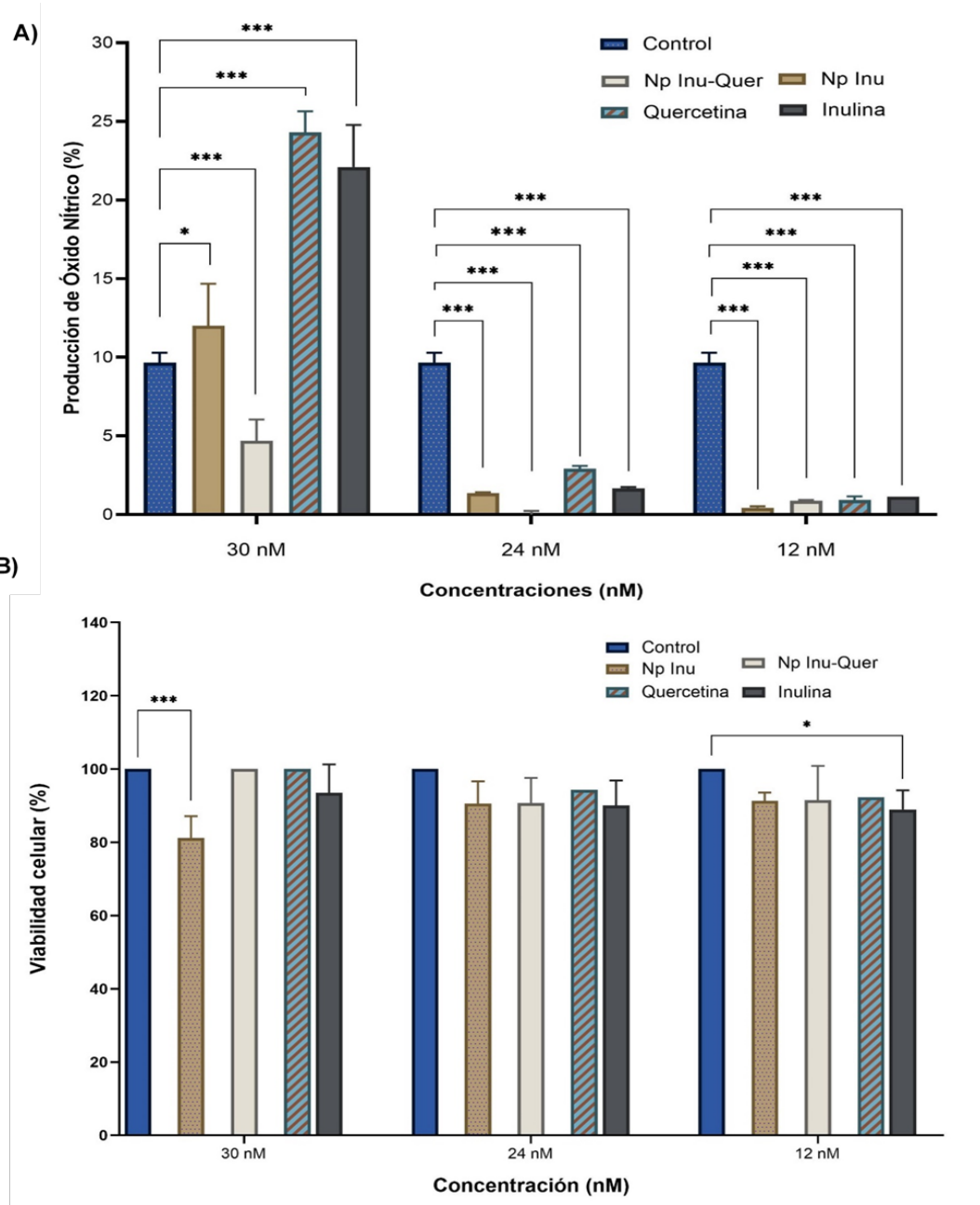


Figura 27. A) La acción inhibidora de Np Inu-Quer, Np Inu, Quercetina e inulina sobre la producción de NO en células RAW 264.7. Efecto con concentración 30nM, 24nM, 12 nM durante 8 horas. **B)** Viabilidad celular de los extractos a 8 horas en células RAW 264.7 a concentraciones de 30, 24, 12 nM. Estimuladas con 10 µg/mL de LPS. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se evaluó con ANOVA de dos vías, con comparación múltiple de Dunnett. Donde, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 frente al grupo tratado con LPS.

Tabla 13. Comparación múltiple de Tukey para resultados de producción de NO (%) por grupos de concentración (%). Los resultados se presentan como un porcentaje promedio $\pm$ Desviación estándar. Letras iguales representa diferencia significativa, donde p < 0.05.

		Producción de NO (%)							
Muestras		<i>Np Inu-Quer</i>		<i>Np Inu</i>		<i>Quercetina</i>		<i>Inulina</i>	
Concentración (nM)	30	4.7 $\pm$ 1.34	<i>abcd</i>	12 $\pm$ 2.68	<i>abcd</i>	24.3 $\pm$ 1.34	<i>abc</i>	22.1 $\pm$ 2.68	<i>abd</i>
	24	0 $\pm$ 0.23	<i>ac</i>	1.37 $\pm$ 0.05	<i>b</i>	2.92 $\pm$ 0.18	<i>ac</i>	1.66 $\pm$ 0.09	<i>d</i>
	12	0.88 $\pm$ 0.05	<i>a</i>	0.44 $\pm$ 0.09	<i>b</i>	0.94 $\pm$ 0.22	<i>c</i>	1.14 $\pm$ 0.03	<i>d</i>

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos gracias a este trabajo de investigación permiten concluir que:

1. La velocidad de rotación de la bomba peristáltica está relacionada con la tasa de atomización del producto, la tasa de producción en masa del proceso y la calidad del producto final. La temperatura de entrada juega un papel importante en las propiedades físicas de la inulina atomizada en la alimentación del secado por atomización, lo que interfiere con el flujo de la masa y rendimiento del proceso de secado. Por consiguiente, en relación con este tema, la solubilidad de las nanopartículas dependerá de la temperatura del medio.
2. La optimización para la síntesis de Nps cargadas de quercetina por el método de spray dryer nos permitió obtener una técnica de fabricación eficaz y eficiente para su posterior aplicación en la fabricación a nivel industrial.
3. La determinación de tamaño de nanopartículas dio como resultado una respuesta dependiente a la temperatura del medio, con un diámetro de 289.75 ± 16.3 nm para Np Inu-Quer. Donde la eficiencia de cargado fue de 71.11% y un rendimiento de recuperación de $64.9 \pm 3.3\%$. Gracias a esto se confirma un encapsulado exitoso.
4. La incorporación de dos tipos de ingredientes con efecto terapéutico en un mismo vehículo de transporte, representa hoy en día un reto en los sistemas de liberación controlados, ya que los resultados muestran que a través de la

ingesta por vía oral, se optimizan los efectos terapéuticos de cada principio activo.

5. La encapsulación de principios activos de tipo flavonoides por el método de secado por aspersión es una herramienta que nos ayuda a potenciar los beneficios terapéuticos del principio activo, ya que protege la molécula de condiciones que pueden afectar su estabilidad, así como enmascarar su característico sabor y controlar su liberación a nivel *in vitro*. Como conclusión obtenemos una liberación controlada que tiene efectos importantes en la prolongación de la vida media de quercetina al ser transportada por una matriz polimérica de inulina, ya que se demostró que al ser sometida a condiciones de pH y temperatura *in vitro*, esta presenta actividad de liberación en condiciones de pH 7.4. Obteniendo de esta forma Np dependientes de pH.
6. Los datos obtenidos en el análisis de inhibición de DPPH arrojaron que la quercetina liberada por las nanopartículas en distintas condiciones, aún mantiene sus propiedades antioxidantes, aunque se sometió a altas temperatura en el secador por aspersión. Por lo que el encapsulado por medio de inulina resulto efectivo para la protección de la quercetina.
7. La liberación *in vitro* de la quercetina mejora cuando se encuentra en un medio básico a temperatura de 37 °C; esto debido a las propiedades prebióticas propias de la inulina, ya que observamos que es capaz de pasar a través del pH del estómago sin transformarse por un proceso de hidrólisis, donde se constata que es capaz de alcanzar sitios con pH básicos como el colon. Sobre este orden de ideas, podemos decir que gracias a esto es capaz de estimular selectivamente la microbiota intestinal. En conclusión, se cuenta con Np

termosensibles y sensibles a pH, capaces de liberar más del 90% del principio activo a las 3 horas de administración en condiciones similares a colon. Aplicando los modelos matemáticos anteriormente planteados, la liberación de la quercetina se rige por más de dos procesos, difusión y relajación de las cadenas poliméricas de Nps esféricas, y por un mecanismo de liberación no Fickiano.

8. En tema de viabilidad celular, las Np Inu-Quer tienen una tendencia a presentar citotoxicidad en relación concentración-tiempo dependientes. Las nanopartículas tienden a mostrar efectos sinérgicos en línea celular Caco-2 a concentraciones arriba de 60nM, dado que a 24 horas muestra una disminución en la viabilidad de estas, mientras que ha a 72 horas, presenta un efecto proliferativo. Sin embargo, a partir de 30nM no se presenta disminución significativa de la viabilidad. Por lo tanto, podemos decir que las Np no muestran efecto anticancerígeno en células de cáncer de colón. Mientras que en células HepG2 si es posible visualizar un campo terapéutico anticancerígeno a concentraciones por debajo de 15nM, también concentración-Tiempo dependientes.
9. Las Np Inu no muestran citotoxicidad en HDFa, por debajo de una concentración de 30nM, por lo que podemos decir que son óptimas para ser utilizadas como vehículo para fármacos.
10. Las Nps, después de una larga exposición en las líneas celulares (72h) mostraron un efecto prooxidante a concentraciones arriba de 60nM; Este aumento, al ser más alto que los ingredientes en su forma comercial, es debido

a la adhesión a la membrana celular, su rápida internalización y el efecto sinérgico de ambos compuestos.

11. Se encontró que las Np Inu-Quer no presentan efectos citotóxicos sobre la proliferación celular de células RAW 264.7 en un rango de concentración de 30-12 nM. El NO actúa como regulador de la inflamación, se llega a presentar tanto en procesos fisiológicos como patológicos. El NO es producido en macrófagos maduros (Shim, Lee, 2018). En base a los resultados obtenidos en el apartado “9.15 Análisis de óxido nítrico” podemos decir que las Np Inu-Quer, a concentraciones entre 24 y 12 nM son capaces de suprimir la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos. De esta forma se comprueba que las Np Inu-Quer muestran propiedades antiinflamatorias.

12. REFERENCIAS

1. A. Sheikh Hasan, M. Socha, A. Lamprecht, F. El Ghazouani, A. Sapin, M. Hoffman, P. Maincent, N. Ubrich, (2007). "Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release". International Journal of Pharmaceutics. Volume 344, Issues 1–2, Pages 53-61, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.066>.
2. Abed, Sherif M et al. (2016). "Inulin as Prebiotics and Its Applications in Food Industry and Human Health; A Review." International Journal of Agriculture Innovations and Research 5(1): 88-97. http://ijair.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJAIR_2037_FINAL.pdf.
3. Afinjuomo, F., Barclay, T., Parikh, A., Chung, R., Song, Y., & Nagalingam, G. et al. (2019). "Synthesis and Characterization of pH-Sensitive Inulin Conjugate of Isoniazid for Monocyte-Targeted Delivery". Pharmaceutics, 11(11), 555. doi: [10.3390/pharmaceutics11110555](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110555)
4. Albert Cabrera, Núria Mach. (2012). "Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón". Revista Española de Nutrición Humana y Dietética. Volume 16, Issue 4, Páginas 143-153, [https://doi.org/10.1016/S2173-1292\(12\)70089-3](https://doi.org/10.1016/S2173-1292(12)70089-3).
5. Alqahtani, S., Kobos, L., Xia, L., Ferreira, C., Franco, J., Du, X., & Shannahan, J. (2020). Exacerbation of Nanoparticle-Induced Acute Pulmonary Inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. Frontiers In Immunology, 11. doi: [10.3389/fimmu.2020.00818](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00818)
6. Alva-Ensastegui, J., Palomar-Pardavé, M., Romero-Romo, M., & Ramírez-Silva, M. (2018). Quercetin spectrofluorometric quantification in aqueous media using different surfactants as fluorescence promoters. RSC Advances, 8(20), 10980-10986. doi: [10.1039/c8ra01213j](https://doi.org/10.1039/c8ra01213j)
7. Alvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2021). Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-actividad-biologica-los-flavonoides-ii--13055925>.
8. Apolinario, Alexsandra Conceição et al. 2014. "Inulin-Type Fructans: A Review on Different Aspects of Biochemical and Pharmaceutical Technology." Carbohydrate Polymers 101(1): 368-78. [Doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.081](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.081)

9. Aragón, J., González, R., Fuentes, G., Palin, L., Croce, G., & Viterbo, D. (2011). In vitro release kinetics and physical, chemical and mechanical characterization of a POVIAC ® /CaCO 3 /HAP-200 composite. *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, 23(2), 259-270. [doi: 10.1007/s10856-011-4514-1](https://doi.org/10.1007/s10856-011-4514-1)

10. Arredondo Peñaranda, Alejandro, & Londoño López, Marta Elena. (2009). "Hidrogeles: potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos". *Revista Ingeniería Biomédica*, 3(5), 83-94. Retrieved August 17, 2021, http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-97622009000100013&lng=en&tlng=es

11. Ashwin A. Dihal, Ruud A. Woutersen, Ben van Ommen, Ivonne M.C.M. Rietjens, Rob H. Stierum. (2006). "Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2". *Cancer Letters*. Volume 238, Issue 2, Paginas 248-259, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.007>.

12. Ávalos Fúnez, A., Haza Duaso, A., & Morales Gómez, P. (2016). "Nanotecnología en la industria alimentaria I: aplicaciones. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*", 10(2). [Doi: 10.5209/rev_rccv.2016.v10.n2.53544](https://doi.org/10.5209/rev_rccv.2016.v10.n2.53544)

13. Ayelet David. (2017). Peptide ligand-modified nanomedicines for targeting cells at the tumor microenvironment, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 119, 120-142, ISSN 0169-409X, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.006>

14. Barba Evia, José Roberto. (2018). "México y El Reto de Las Enfermedades Crónicas No Transmisibles. El Laboratorio También Juega Un Papel Importante." *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* 65(1): 4-17. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=79689>.

15. Beirao-da-Costa, Sara et al. (2013). "Inulin Potential for Encapsulation and Controlled Delivery of Oregano Essential Oil." *Food Hydrocolloids* 33(2): 199-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.009>.

16. Bencherif, Sidi A. et al. (2009). "Nanostructured Hybrid Hydrogels Prepared by a Combination of Atom Transfer Radical Polymerization and Free Radical Polymerization." *Biomaterials* 30(29): 5270-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.011>.

17. Böhm, A., Kaiser, I., Trebstein, A. et al. Heat-induced degradation of inulin. *Eur Food Res Technol* 220, 466–471 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1098-8>

18. Bustos-Garza, Cecilia, Jorge Yáñez-Fernández, and Blanca E. Barragán-Huerta. (2013). "Thermal and PH Stability of Spray-Dried Encapsulated Astaxanthin Oleoresin from Haematococcus Pluvialis Using Several Encapsulation Wall Materials." *Food Research International* 54(1): 641-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.061>.
19. Calderón, Sebastián. 2013. "Estandarización de La Metodología IN VITRO Para Evaluar La Absorción Intestinal de Ampicilina Liberada Por El Polímero PAM 18NA." *Universidad ICCESI*. https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76826/1/calderon_estandarizacion_metodologia_2013.pdf.
20. Camacho Elizondo, Melissa, Vega Baudrit, José, & Campos Gallo, Allan. (2011). Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(4), 292-306. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000400007&lng=es&tling=es.
21. Camarena-Rangel, N.G., Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J. et al. (2020). "Identification of metabolites present in *Opuntia callus* and study of their antioxidant, anti-inflammatory and anti-adipogenic properties". *Plant Cell Tiss Organ Cult*. Volumen 143, Paginas 31–43. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01893-4>
22. Carvajal Carvajal, Carlos. (2017). "Síndrome metabólico: definiciones, epidemiología, etiología, componentes y tratamiento". *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(1), 175-193. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152017000100175&lng=en&tling=es.
23. Castel, Virginia, Amelia C. Rubiolo, and Carlos R. Carrara. (2018). "Brea Gum as Wall Material in the Microencapsulation of Corn Oil by Spray Drying: Effect of Inulin Addition." *Food Research International* 103: 76-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.036>.
24. Caucoto, Valentina. 2014. "Liberación de Epicatequina En Sistemas Hidrofóbicos Desde Micropartículas Con Inulina." <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130100/Liberacion-de-epicatequina-en-sistemas-hidrofobicos-desde-microparticulas-con-inulina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

25. Chacón-Villalobos, Alejandro (2006). Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacáridos (FOS). *Agronomía Mesoamericana*, 17(2),265-286. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43717212>
26. Charoenwongpaiboon, Thanapon et al. (2019). "Temperature-Dependent Inulin Nanoparticles Synthesized by *Lactobacillus Reuteri* 121 Inulosucrase and Complex Formation with Flavonoids." *Carbohydrate Polymers* 223: 115044. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115044>.
27. Chávez-Santoscoy RA, Lazo-Vélez MA, Serna-Sáldivar SO, Gutiérrez-Urbe JA. (2016). "Delivery of Flavonoids and Saponins from Black Bean (*Phaseolus vulgaris*) Seed Coats Incorporated into Whole Wheat Bread". *Int J Mol Sci*. 17;17(2):222. doi: [10.3390/ijms17020222](https://doi.org/10.3390/ijms17020222).
28. Córdova-Villalobos, José Ángel, Barriguete-Meléndez, Jorge Armando, Lara-Esqueda, Agustín, Barquera, Simón, Rosas-Peralta, Martín, Hernández-Ávila, Mauricio, León-May, María Eugenia de, Admon, Lic, & Aguilar-Salinas, Carlos A. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México*, 50(5), 419-427. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342008000500015&lng=es&tlng=es.
29. Costa, Edda, Aquiles Arancibia, and Jean Marc Aïache. (2004). "Sistemas Matriciales." *Acta Farmaceutica Bonaerense* 23(2): 259-65. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-actividad-biologica-los-flavonoides-ii--13055925>.
30. Cruz Neyra, L. (2017). Alimentos funcionales. *Biotempo*, 7, 46-54. doi: [10.31381/biotempo.v7i0.872](https://doi.org/10.31381/biotempo.v7i0.872)
31. Cuéllar Mata, Patricia, & Solís Martínez, Martha Olivia, & Sánchez Leyva, Ma. del Carmen, & García Nieto, Rosa María, & Arias Negrete, Sergio (2010). El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes. *Acta Universitaria*, 20 (3),24-33. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41618860003>.
32. Darband SG, Kaviani M, Yousefi B, Sadighparvar S, Pakdel FG, Attari JA, Mohebbi I, Naderi S, Majidinia M. (2018). "Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer". *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6544-6560. doi: [10.1002/jcp.26595](https://doi.org/10.1002/jcp.26595).
33. De la Torre, Paloma. 2019. "Desarrollo de sistemas micro y nano particulares de autora: Ana Iamas pillo." *Universidad complutense*. Pag 20

<https://eprints.ucm.es/id/eprint/49177/2/ANA%20LAMAS%20PILLO%20%282%29.pdf>

34. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. (2013) "The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism". J Lipid Res. Sep;54(9):2325-40. [doi: 10.1194/jlr.R036012](https://doi.org/10.1194/jlr.R036012).
35. Dinda, Manikarna et al. (2016). "The Water Fraction of Calendula Officinalis Hydroethanol Extract Stimulates In vitro and In Vivo Proliferation of Dermal Fibroblasts in Wound Healing." Phytotherapy Research 1707(May): 1696-1707. [Doi: 10.1002/ptr.5678](https://doi.org/10.1002/ptr.5678)
36. Effat Bahadori, Zahra Farjami, Majid Rezayi, Hadis Lngari, Majid Darroudi, Amir Avan, Majid Ghayour-Mobarhan, (2019). "Recent advances in nanotechnology for the treatment of metabolic syndrome, Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, Volume 13, Issue 2, Paginas 1561-1568, <https://doi.org/10.1016/j.dsrx.2019.03.002>.
37. Ekström AM, Serafini M, Nyrén O, Wolk A, Bosetti C, Bellocco R. (2011). "Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden". Ann Oncol. 22(2):438-43. [doi: 10.1093/annonc/mdq390](https://doi.org/10.1093/annonc/mdq390).
38. Escalona Rayo, Oscar, & Quintanar Guerrero, David. (2014). "Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos". Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, 45(3), 17-38. Recuperado en 18 de agosto de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000300003&lng=es&tlng=es.
39. Escobedo-Moratilla A, Barba RAP, Pérez-Urizar JT. (2015). "Modelos preclínicos in vitro e in vivo para la evaluación de la actividad biológica en estudios de biocomparabilidad". Gac Med Mex. 2015;151(3):377-386. https://www.anmm.org.mx/GMM/2015/n3/GMM_151_2015_3_377-386.pdf
40. Eui-Baek Byun, Mi-So Yang, Han-Gyu Choi, Nak-Yun Sung, Du-Sup Song, Sung-Jae Sin, Eui-Hong Byun. (2013) "Quercetin negatively regulates TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide through Tollip expression. Biochemical and Biophysical Research Communications. Volume 431, Issue 4, Paginas 698-705, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.056>.
41. Ezhilarasi, P.N., Karthik, P., Chhanwal, N. et al. (2013). "Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review". Food Bioprocess Technol 6, 628–647 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>

42. Ferraz CR, Carvalho TT, Manchope MF, Artero NA, Rasquel-Oliveira FS, Fattori V, Casagrande R, Verri WA Jr.(2020). "Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development". *Molecules.*; 25(3):762. <https://doi.org/10.3390/molecules25030762>.
43. Fina, Brenda Lorena; Lombarte, Mercedes; Rigalli, Alfredo; Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios *in vivo*, *in vitro* o *in silico*?; Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral; Actualizaciones en Osteología; 9; 3; 12-2013; 239-240. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/21655>.
44. Fortunato, L., Alves, C., Teixeira, M., & Rogerio, A. (2012). Quercetin: a flavonoid with the potential to treat asthma. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 48(4), 589-599. [doi: 10.1590/s1984-82502012000400002](https://doi.org/10.1590/s1984-82502012000400002)
45. Glibowski P., Bukowska A. (2011). "The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stability". *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 10(2), 189-196. https://www.researchgate.net/publication/50934047_The_effect_of_pH_temperature_and_heating_time_on_inulin_chemical_stability.
46. Gómez-Garzón, M. (2018). "Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis verde". *Revista Repertorio De Medicina Y Cirugía*, 27(2). <https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v27.n2.2018.191>.
47. Hernández-Olmos, Saira Lizette. (2014). "Nanopartículas Copoliméricas Inteligentes (pH - y T - Sensibles) y Sus Aplicaciones En Biomedicina." Tesis: 1-4. http://www.mufr.fr/sites/mufr.univ-toulouse.fr/files/evenement/symposium/ponencias/saira_l_hernandez.pdf.
48. Hoek-van den Hil, Elise F. et al. (2015). "Quercetin Tests Negative for Genotoxicity in Transcriptome Analyses of Liver and Small Intestine of Mice." *Food and Chemical Toxicology* 81: 34-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.005>.
49. Huang, Q., Yu, H., & Ru, Q. (2010). Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal Of Food Science*, 75(1), R50-R57. [doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x)
50. Huang, Y. T. et al. 1999. "Effects of Luteolin and Quercetin, Inhibitors of Tyrosine Kinase, on Cell Growth and Metastasis-Associated Properties in A431 Cells

Overexpressing Epidermal Growth Factor Receptor." *British Journal of Pharmacology* 128(5): 999-1010.

51. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2018. "Principales Causas de Muerte En México." *Estadísticas de Mortalidad*: 60. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est>.
52. Iris Garrido-Cano, Vicente Candela-Noguera, Guadalupe Herrera, Juan Miguel Cejalvo, Ana Lluch, M.Dolores Marcos, Felix Sancenon, Pilar Eroles, Ramón Martínez-Máñez. (2021). "Biocompatibility and internalization assessment of bare and functionalised mesoporous silica nanoparticles". *Microporous and Mesoporous Materials*. Volume 310, 110593. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110593>.
53. Jiménez Minotta, J. 2017. "Evaluación de La Cinética de Liberación de Un Fármaco Modelo Con Clasificación Biofarmacéutica Clase II, Desde Matrices Comprimidas Compuestas Por Materiales Poliméricos Aniónicos.": 1-61.
54. Jiménez-Sánchez, Maira et al. 2019. "Self-Assembled High Molecular Weight Inulin Nanoparticles: Enzymatic Synthesis, Physicochemical and Biological Properties." *Carbohydrate Polymers* 215(March): 160-69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.060>.
55. Karine, Hellen et al. 2009. "Evaluation of Cross-Linked Chitosan Microparticles Containing Acyclovir Obtained by Spray-Drying." *Materials Science & Engineering C* 29(2): 387-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.07.030>.
56. Karnjanapratum, Supatra, and Sang Guan You. 2011. "Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from *Monostroma Nitidum* and Their in vitro Anticancer and Immunomodulatory Activities." *International Journal of Biological Macromolecules* 48(2): 311-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.002>.
57. Khanna, Sakshi, Mahendra Bishnoi, Kanthi Kiran Kondepudi, and Geeta Shukla. 2020. "Isolation, Characterization and Anti-Inflammatory Mechanism of Probiotics in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(5): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02852-z>.
58. Kim, H., Seo, E., Sharma, A., Ganbold, B., Park, J., & Sharma, G. et al. (2013). "Regulation of Wnt signaling activity for growth suppression induced by quercetin in 4T1 murine mammary cancer cells". *International Journal of Oncology*, 43(4), 1319-1325. doi: [10.3892/ijo.2013.2036](https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2036)
59. Klech, C., & Simonelli, A. (1989). Examination of the moving boundaries associated with non-fickian water swelling of glassy gelatin beads: Effect of

solution pH. Journal Of Membrane Science, 43(1), 87-101. [doi: 10.1016/s0376-7388\(00\)82355-8](https://doi.org/10.1016/s0376-7388(00)82355-8)

60. Krivorotova, T., Staneviciene, R., Luksa, J., Serviene, E., & Sereikaite, J. (2016). Preparation and characterization of nisin-loaded pectin-inulin particles as antimicrobials. LWT - Food Science And Technology, 72, 518-524. [doi: 10.1016/j.lwt.2016.05.022](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.022)
61. Kumari, Avnesh et al. (2010). "Development of Biodegradable Nanoparticles for Delivery of Quercetin." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 80(2): 184-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.002>.
62. Lakshmi, Buddolla Anantha, and Sanghyo Kim. (2019). "Quercetin Mediated Gold Nanoclusters Explored as a Dual Functional Nanomaterial in Anticancer and Bio-Imaging Disciplines." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 178: 230-37. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.054>.
63. Lamprecht, A., Saumet, J., Roux, J., & Benoit, J. (2004). Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. International Journal Of Pharmaceutics, 278(2), 407-414. [doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.03.018](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.03.018)
64. Le, N., Kim, C., Park, T., Park, J., Sung, M., & Lee, D. et al. (2014). Quercetin Protects against Obesity-Induced Skeletal Muscle Inflammation and Atrophy. Mediators Of Inflammation, 2014, 1-10. [doi: 10.1155/2014/834294](https://doi.org/10.1155/2014/834294)
65. Li, F., Jin, H., Xiao, J., Yin, X., Liu, X., Li, D., & Huang, Q. (2018). The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent. Food Research International, 111, 351-360. [doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.038](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.038)
66. Li, S., Hsu, W., Chang, J., & Shih, C. (2019). Combination of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis subsp. lactis Shows a Stronger Anti-Inflammatory Effect than Individual Strains in HT-29 Cells. Nutrients, 11(5), 969. [doi: 10.3390/nu11050969](https://doi.org/10.3390/nu11050969).
67. Li, T., Li, F., Liu, X., Liu, J., & Li, D. (2019). Synergistic anti-inflammatory effects of quercetin and catechin via inhibiting activation of TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways. Phytotherapy Research, 33(3), 756-767. [doi: 10.1002/ptr.6268](https://doi.org/10.1002/ptr.6268)
68. Lizarzaburu Robles, J. (2014). Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. Anales De La Facultad De Medicina, 74(4), 315. [doi: 10.15381/anales.v74i4.2705](https://doi.org/10.15381/anales.v74i4.2705)

69. Llopis, Marta. (2020). "Estudio Bibliográfico de La Liberación Controlada de Neurotransmisores y Antibióticos En Un Hidrogel de Base Celulósica Con Incorporación de Un Polímero Conductor." http://repositori.uji.es/xmlui/bitstream/handle/10234/189524/TFG_2020_LlopisP_rats_Marta.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
70. López-Castejón, María Luisa, Carlos Bengoechea, Sixto Espinosa, and Cecilio Carrera. (2019). "Characterization of Prebiotic Emulsions Stabilized by Inulin and -Lactoglobulin." *Food Hydrocolloids* 87(August 2018): 382-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.024>.
71. Luis, D., & Aller, R. (2008). "Role of tea flavonoids in cardiovascular protection". *Anales de medicina interna*, 25(3). [doi: 10.4321/s0212-71992008000300001](https://doi.org/10.4321/s0212-71992008000300001)
72. M. Re. I. (1995). Instructions for Preparation of Manuscripts for Direct Reproduction. *Drying Technology*, 13(1-2), v-v. [doi: 10.1080/07373939508902366](https://doi.org/10.1080/07373939508902366).
73. Maalik, A., Khan, F., Mumtaz, A., Mehmood, A., Azhar, S., & Atif, M. et al. (2014). Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1561. [doi: 10.4314/tjpr.v13i9.26](https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.26)
74. Mahajan, H., & Deshmukh, S. (2015). Development and evaluation of gel-forming ocular films based on xyloglucan. *Carbohydrate Polymers*, 122, 243-247. [doi: 10.1016/j.carbpol.2015.01.018](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.018).
75. Mahfoozur, Rahman. Sarwar, Beg. Vikas, Kumar. (2020). *Nanomedicine for Bioactives*. 1st ed. ed. Farhan. Ahmad, Jalees. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1664-1>.
76. Makris, D., & Rossiter, J. (2000). Heat-Induced, Metal-Catalyzed Oxidative Degradation of Quercetin and Rutin (Quercetin 3-O-Rhamnosylglucoside) in Aqueous Model Systems. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3830-3838. [doi: 10.1021/jf0001280](https://doi.org/10.1021/jf0001280)
77. Maravillas Perez, abril. (2017). Programa de Doctorado Nutrición y Seguridad Alimentaria "Estudio de La Complejación de Flavonoides En Ciclodextrinas." Universidad católica de Murcia. <http://repositorio.ucam.edu/bitstream/handle/10952/2836/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

78. María Luisa López Castejón, Carlos Bengoechea, S. López Collado, José Manuel Aguilar García. (2020). "Propiedades reológicas y microestructurales de geles prebióticos de inulina". *Revista de química teórica y aplicada*, Vol. 77, N°. 591, págs. 175-181. ISSN 0001-9704. <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/download/377163/470447/>.
79. Marti del Moral, A., M.J Moreno-Aliaga, and Alfredo Martinez Hernandez. (2003). "Efecto de Los Prebioticos Sobre El Metabolismo Lipidico." *Nutricion Hospitalaria* 18: 181-88. <http://www.unav.es/fyn>.
80. Martínez, M. (2017). "Desarrollo y Aplicaciones de Hidrogeles Para La Administración y Liberación Modificada de Fármacos." <http://hdl.handle.net/10550/57123>.
81. Martínez-Flórez, S., J. González-Gallego, J. M. Culebras, and María Jesús Tuñón. 2002. "Los Flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes." *Nutricion Hospitalaria* 17(6): 271-78. <https://www.academia.edu/download/35504097/flavonoides.pdf>.
82. Martirosyan, Alina et al. (2016). "Tuning the Inflammatory Response to Silver Nanoparticles via Quercetin in Caco-2 (Co-)Cultures as Model of the Human Intestinal Mucosa." *Toxicology Letters* 253: 36-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.018>.
83. Molina, Maria and Bergueiro, Julian and Sousa-Herves, Ana and Calderon, Marcelo. (2015). "Aplicaciones Biomedicas de Nanogeles Dendriticos Termosensibles." *revista iberoamericana de polimeros* 16(3): 164-72. [Chrome extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Freviberpol.files.wordpress.com%2F2019%2F07%2F2015-molina.pdf](chrome-extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Freviberpol.files.wordpress.com%2F2019%2F07%2F2015-molina.pdf).
84. Morelo, G., Giménez, B., Márquez-Ruiz, G., Holgado, F., Romero-Hasler, P., Soto-Bustamante, E., & Robert, P. (2019). Influence of the Physical State of Spray-Dried Flavonoid-Inulin Microparticles on Oxidative Stability of Lipid Matrices. *Antioxidants*, 8(11), 520. [doi: 10.3390/antiox8110520](https://doi.org/10.3390/antiox8110520).
85. Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Smolińska, E., Piotrowska, E., Węgrzyn, G., & Gabig-Cimińska, M. (2015). Effects of flavonoids on expression of genes involved in cell cycle regulation and DNA replication in human fibroblasts. *Molecular And Cellular Biochemistry*, 407(1-2), 97-109. [doi: 10.1007/s11010-015-2458-3](https://doi.org/10.1007/s11010-015-2458-3).

86. Mu, Yuwen et al. (2021). "The Antioxidant Capacity and Antioxidant System of Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) Tubers in Relation to Inulin during Storage at Different Low Temperatures." *Industrial Crops and Products* 161(June 2020): 113229. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113229>.
87. Mudannayake, D., Wimalasiri, K., Silva, K., & Ajlouni, S. (2015). Comparison of Properties of New Sources of Partially Purified Inulin to Those of Commercially Pure Chicory Inulin. *Journal Of Food Science*, 80(5), C950-C960. [doi: 10.1111/1750-3841.12857](https://doi.org/10.1111/1750-3841.12857).
88. Muñoz Ohmen, Segundo Álvaro, & Restrepo Molina, Diego Alonso, & Sepúlveda Valencia, José Uriel (2012). Revisión: Inulina en Algunos Derivados Cárnicos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 65(2),6795-6804. ISSN: 0304-2847. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179925831022>
89. Mura, S., Nicolas, J. & Couvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Mater* 12, 991–1003 (2013). <https://doi.org/10.1038/nmat3776>
90. Nam, J., Sharma, A., Nguyen, L., Chakraborty, C., Sharma, G., & Lee, S. (2016). Application of Bioactive Quercetin in Oncotherapy: From Nutrition to Nanomedicine. *Molecules*, 21(1), 108. [doi: 10.3390/molecules21010108](https://doi.org/10.3390/molecules21010108).
91. Narro Robles, José Ramón. (2018). "Enfermedades No Transmisibles Situación y Propuestas de Acción: Una Perspectiva desde la Experiencia de México". Secretaría de Salud, 232 páginas.ISBN electrónico: 978-607-460-578-5. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/416454/Enfermedades_No_Transmisibles_ebook.pdf.
92. Nishimura, Kazuhiko, Risa Matsumoto, Yuuki Yonezawa, and Hiroshi Nakagawa. 2017. "Effect of Quercetin on Cell Protection via Erythropoietin and Cell Injury of HepG2 Cells." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 636(September): 11-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2017.10.013>.
93. Oropesa, Reiner, and Uises Jáuregui. 2012. "Las Nanopartículas Como Portadores de Fármacos?: Características y Perspectivas Nanoparticles as Drug Carriers?: Characteristics and Perspectives." *CENIC Ciencias Biológicas* 43(3): 1-20.
94. Paixão, S., Teixeira, P., Silva, T., Teixeira, A., & Alves, L. (2013). Screening of novel yeast inulinases and further application to bioprocesses. *New Biotechnology*, 30(6), 598-606. [doi: 10.1016/j.nbt.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.02.002).
95. Palma, Manuel et al. 2014. "Release Kinetics of Flavonoids in Methyl Linoleate from Microparticles Designed with Inulin and Channelizing Agent." *Food*

96. Peng, Tao Xing et al. 2019. "Enhanced Storage Stability of Solid Lipid Nanoparticles by Surface Modification of Comb-Shaped Amphiphilic Inulin Derivatives." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 181(May): 369-78. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.061>.
97. Perdicaro, Diahann J. et al. 2020. "Quercetin Attenuates Adipose Hypertrophy, in Part through Activation of Adipogenesis in Rats Fed a High-Fat Diet." *Journal of Nutritional Biochemistry* 79: 108352. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108352>.
98. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., & Santos-Buelga, C. (2012). The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 92(9), 1822-1825. [doi: 10.1002/jsfa.5697](https://doi.org/10.1002/jsfa.5697).
99. Pitarresi, G. et al. (2009). "Inulin Vinyl Sulfone Derivative Cross-Linked with Bis-Amino PEG: New Materials for Biomedical Applications." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 19(6): 419-23. [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247\(09\)50086-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247(09)50086-X).
100. Pourcel, L., Routaboul, J., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2005). TRANSPARENT TESTA10 Encodes a Laccase-Like Enzyme Involved in Oxidative Polymerization of Flavonoids in Arabidopsis Seed Coat. *The Plant Cell*, 17(11), 2966-2980. [doi: 10.1105/tpc.105.035154](https://doi.org/10.1105/tpc.105.035154)
101. Pourtalebi Jahromi, L., Ghazali, M., Ashrafi, H., & Azadi, A. (2020). A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles. *Heliyon*, 6(2), e03451. [doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03451](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03451).
102. Pradhan, N., Singh, S., Ojha, N., Shrivastava, A., Barla, A., Rai, V., & Bose, S. (2015). Facets of Nanotechnology as Seen in Food Processing, Packaging, and Preservation Industry. *Biomed Research International*, 2015, 1-17. [doi: 10.1155/2015/365672](https://doi.org/10.1155/2015/365672).
103. Prieto-Gómez, Bertha, Aguirre-Castañeda, Angélica, Saldaña-Lorenzo, Jessica Alejandra, León del Ángel, Juan Francisco, & Moya-Simarro, Andrés. (2017). Síndrome metabólico y sus complicaciones: el pie diabético. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(4), 7-18. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422017000400007&lng=es&tlng=es.

104. Promega Corporation. 2012. "CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay." Wwww.Promega. Com/Protocols/: 2014-12-15. www.promega.com/protocols/.
105. Ramirez, Arnaldo, Benítez, José Luis, Rojas de Astudillo, Luisa, & Rojas de Gáscue, Blanca. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 36(2), 108-130. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522016000200002&lng=es&tlng=es.
106. Reales, José. 2014. "Estudio de La Respues de Macrófagos Murino y Humano Frente a Candida Albicns Utilizando Diversas Técnicas Proteómicas." Universidad complutense de Madrod. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/24585/1/T35164.pdf>.
107. Reales, José. 2014. "Estudio de La Respues de Macrófagos Murino y Humano Frente a Candida Albicns Utilizando Diversas Técnicas Proteómicas." Universidad complutense de Madrod. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/24585/1/T35164.pdf>.
108. Reddy, L. Harivardhan, José L. Arias, Julien Nicolas, and Patrick Couvreur. 2012. "Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications." Chemical Reviews 112(11): 5818-78.
109. Rios-Mera, Juan D. et al. 2019. "Encapsulation Optimization and PH- and Temperature-Stability of the Complex Coacervation between Soy Protein Isolate and Inulin Entrapping Fish Oil." Lwt 116(July): 108555. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108555>.
110. Robert J Nijveldt, Els van Nood, Danny EC van Hoorn, Petra G Boelens, Klaske van Norren, Paul AM van Leeuwen, (2001). "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications". The American Journal of Clinical Nutrition, Volume 74, Issue 4, Pages 418–425, <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>
111. Robert, Paz et al. 2012. "Acetylated Starch and Inulin as Encapsulating Agents of Gallic Acid and Their Release Behaviour in a Hydrophilic System." Food Chemistry 134(1): 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.019>.

112. Rodríguez, Amairani Ramírez. 2017. "Efecto de Los Frutos de Acacia Farnesiana En La Dieta Caprina: Presencia de Compuestos Bioactivos y Actividad Antioxidante de La Leche." 142 páginas.
113. Saavedra-Leos, M., Leyva-Porras, C., Martínez-Guerra, E., Pérez-García, S., Aguilar-Martínez, J., & Álvarez-Salas, C. (2021). Physical properties of inulin and inulin–orange juice: Physical characterization and technological application. *Carbohydrate Polymers* 105(1): 10-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.079>.
114. Sáez, Virginia. Hernáez, Estibaliz. Lucio, Sanz. (2004). "Mecanismos de Liberación de Fármacos Desde Materiles Poliméricos." revista iberoamericana de polimeros 5(1): 55-70. <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/08/2004-virginia.pdf>.
115. Sancho Sanmartín, Raquel. (2018). "Estudio de La Formación de Redes Polimericas de Poliglicerol Sebacato y Del Efecto de Los Productos de Su Biodegradación En El Metabolismo Celular." Universidad politécnica de Valencia. https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/106846/20237368J_TFG_153073_19197035607718956184960121.pdf?sequence=2&isAllowed=y.
116. Sansone, F. et al. 2011. "Flavonoid Microparticles by Spray-Drying: Influence of Enhancers of the Dissolution Rate on Properties and Stability." *Journal of Food Engineering* 103(2): 188-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.015>.
117. Sedaghat Doost, Ali et al. 2019. "Self-Assembly, Functionality, and In vitro Properties of Quercetin Loaded Nanoparticles Based on Shellac-Almond Gum Biological Macromolecules." *International Journal of Biological Macromolecules* 129: 1024-33. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.071>.
118. Serpa Guerra, Angélica Maria, Vélez Acosta, Lina Maria, Barajas Gamboa, Jaime Alejandro, Castro Herazo, Cristina Isabel, & Gallego, Robin Zuluaga. (2016). "Compuestos de hierro para la fortificación de alimentos: El desarrollo de una estrategia nutricional indispensable para países en vía de desarrollo:Una revisión". *Acta Agronómica*, 65(4), 340-353. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50327>.
119. Sevim, K., & Pan, J. (2018). A model for hydrolytic degradation and erosion of biodegradable polymers. *Acta Biomaterialia*, 66, 192-199. doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.023.
120. Shahidi Noghabi, M., & Molaveisi, M. (2019). Microencapsulation optimization of cinnamon essential oil in the matrices of gum Arabic, maltodextrin, and inulin

- by spray-drying using mixture design. Journal Of Food Process Engineering, 43(2). [doi: 10.1111/jfpe.13341](https://doi.org/10.1111/jfpe.13341)
121. Shan, B., Wang, M., & Li, R. (2009). Quercetin Inhibit Human SW480 Colon Cancer Growth in Association with Inhibition of Cyclin D1 and Survivin Expression through Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. Cancer Investigation, 27(6), 604-612. [doi: 10.1080/07357900802337191](https://doi.org/10.1080/07357900802337191).
 122. Shang, T., Wang, C., Ren, L., Tian, X., Li, D., & Ke, X. et al. (2013). Synthesis and characterization of NIR-responsive Aurod@pNIPAAm-PEGMA nanogels as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. Nanoscale Research Letters, 8(1), 4. [doi: 10.1186/1556-276x-8-4](https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-4)
 123. Shim, S., Lee, S., & Lee, M. (2018). Biflavonoids Isolated from Selaginella tamariscina and Their Anti-Inflammatory Activities via ERK 1/2 Signaling. Molecules, 23(4), 926. [doi: 10.3390/molecules23040926](https://doi.org/10.3390/molecules23040926)
 124. Shoaib, Muhammad et al. 2016. "Inulin: Properties, Health Benefits and Food Applications." Carbohydrate Polymers 147(April): 444-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020>.
 125. Siepmann, Juergen, and Nicholas A. Peppas. 2011. "Higuchi Equation: Derivation, Applications, Use and Misuse." International Journal of Pharmaceutics 418(1): 6-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>.
 126. Singh, H. (2016). Nanotechnology Applications in Functional Foods; Opportunities and Challenges. Preventive Nutrition And Food Science, 21(1), 1-8. [doi: 10.3746/pnf.2016.21.1.1](https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.1.1)
 127. Singh, T., Shukla, S., Kumar, P., Wahla, V., Bajpai, V., & Rather, I. (2017). Application of Nanotechnology in Food Science: Perception and Overview. Frontiers In Microbiology, 8. [doi: 10.3389/fmicb.2017.01501](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01501).
 128. Sun, Qijuan et al. 2018. "Redox-Sensitive Nanoparticles Based on 4-Aminothiophenol-Carboxymethyl Inulin Conjugate for Budesonide Delivery in Inflammatory Bowel Diseases." Carbohydrate Polymers 189: 352-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.021>.
 129. Taguchi, Kumiko et al. 2020. "Plant Polyphenols Morin and Quercetin Rescue Nitric Oxide Production in Diabetic Mouse Aorta through Distinct Pathways." Biomedicine and Pharmacotherapy 129(April): 110463. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110463>.

130. Tapal, Arun, and Purnima Kaul Tikku. 2012. "Complexation of Curcumin with Soy Protein Isolate and Its Implications on Solubility and Stability of Curcumin." *Food Chemistry* 130(4): 960-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.025>.
131. Toneli, J., Park, K., Murr, F., & Negreiros, A. (2008). Efeito da umidade sobre a microestrutura da inulina em pó. *Ciência E Tecnologia De Alimentos*, 28(1), 122-131. [doi: 10.1590/s0101-20612008000100018](https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000100018).
132. Toneli, J., Park, K., Negreiros, A., & Murr, F. (2010). Spray-Drying Process Optimization of Chicory Root Inulin. *Drying Technology*, 28(3), 369-379. [doi: 10.1080/07373931003645017](https://doi.org/10.1080/07373931003645017)
133. Ubbink, J., & Krüger, J. (2006). Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends In Food Science & Technology*, 17(5), 244-254. [doi: 10.1016/j.tifs.2006.01.007](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.01.007)
134. Van der Woude, H., Gliszczyńska-Świgło, A., Struijs, K., Smeets, A., Alink, G., & Rietjens, I. (2003). Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Letters*, 200(1), 41-47. [doi: 10.1016/s0304-3835\(03\)00412-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(03)00412-9)
135. Vicente-Vicente, L, M. Prieto, and A. I. Morales. 2013. "Efficacy and Safety of Quercetin as Dietary Supplement." *Toxicología* 30(2): 171-81. <http://www.redalyc.org/pdf/919/91931189008.pdf>.
136. Vila Vecilla, Laura. (2016). "Desarrollo de Un Modelo in vitro de Barrera Intestinal Para La Evaluación Del Riesgo de Los Nanomateriales.". Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Genètica i de Microbiologia. 185 pàgines. ISBN: 9788449066498. <http://hdl.handle.net/10803/398242>.
137. Walton, D. (2000). The morphology of spray-dried particles a qualitative view. *drying technology*, 18(9), 1943-1986. [doi: 10.1080/07373930008917822](https://doi.org/10.1080/07373930008917822).
138. Wang, J., & Zhao, X. (2016). Degradation kinetics of fisetin and quercetin in solutions affected by medium pH, temperature and co-existed proteins. *Journal Of The Serbian Chemical Society*, 81(3), 243-253. [doi: 10.2298/jsc150706092w](https://doi.org/10.2298/jsc150706092w).
139. Wandersleben, Traudy et al. 2018. "Enhancement of Functional and Nutritional Properties of Bread Using a Mix of Natural Ingredients from Novel Varieties of Flaxseed and Lupine." *LWT - Food Science and Technology* 91: 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.029>.

140. Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. (2006). Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal Of Food Science*, 71(9), R107-R116. [doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x)
141. Xu, Wei et al. 2020. "Stability, Microstructural and Rheological Properties of Complex Prebiotic Emulsion Stabilized by Sodium Caseinate with Inulin and Konjac Glucomannan." *Food Hydrocolloids* 105(February): 105772. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105772>.
142. Yallapu, Murali Mohan, Meena Jaggi, and Subhash C. Chauhan. 2011. "Design and Engineering of Nanogels for Cancer Treatment." *Drug Discovery Today* 16(9-10): 457-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2011.03.004>.
143. Yavuz, Murat et al. 2020. "Nanophytomedicines for the Prevention of Metabolic Syndrome: A Pharmacological and Biopharmaceutical Review." *Front. Bioeng. Biotechnol* 8: 425. www.frontiersin.org.
144. Yin Win, K., & Feng, S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), 2713-2722. [doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.050](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.050)
145. Zahin, N., Anwar, R., Tewari, D., Kabir, M., Sajid, A., & Mathew, B. et al. (2019). Nanoparticles and its biomedical applications in health and diseases: special focus on drug delivery. *Environmental Science And Pollution Research*, 27(16), 19151-19168. [doi: 10.1007/s11356-019-05211-0](https://doi.org/10.1007/s11356-019-05211-0).
146. Zeng, Xiangquan, Zhenjiao Du, Xiaomeng Ding, and Weibo Jiang. 2021. "Protective Effects of Dietary Flavonoids against Pesticide-Induced Toxicity: A Review." *Trends in Food Science and Technology* 109(March): 271-79. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.046>.
147. Zhang, Guiqiang et al. 2018. "Conjugation of Inulin Improves Anti-Biofilm Activity of Chitosan." *Marine Drugs* 15(16): 13. www.mdpi.com/journal/marinedrugs.

13. ANEXO

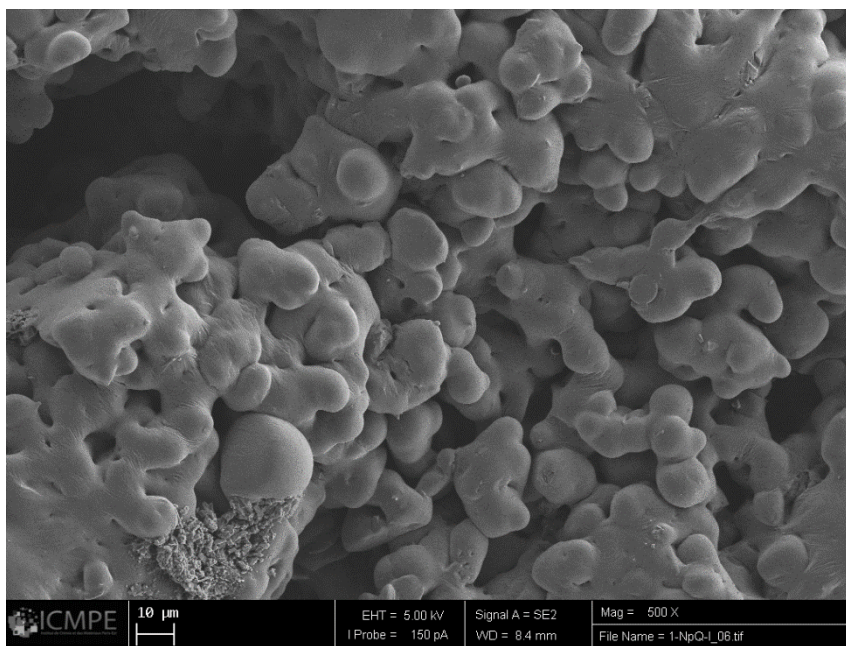
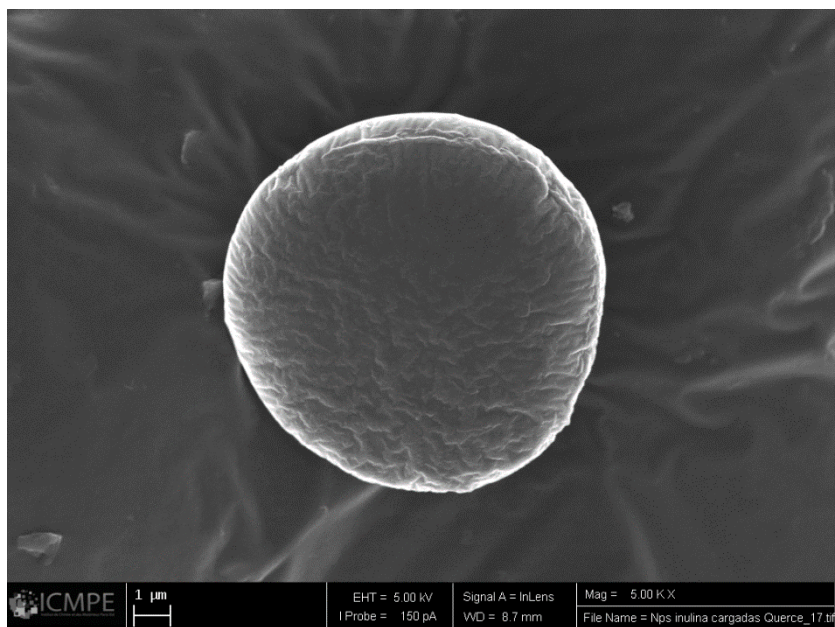


Figura A.12.1. Fotografías por Microscopia electrónica de barrido de Np Inu-Quer.

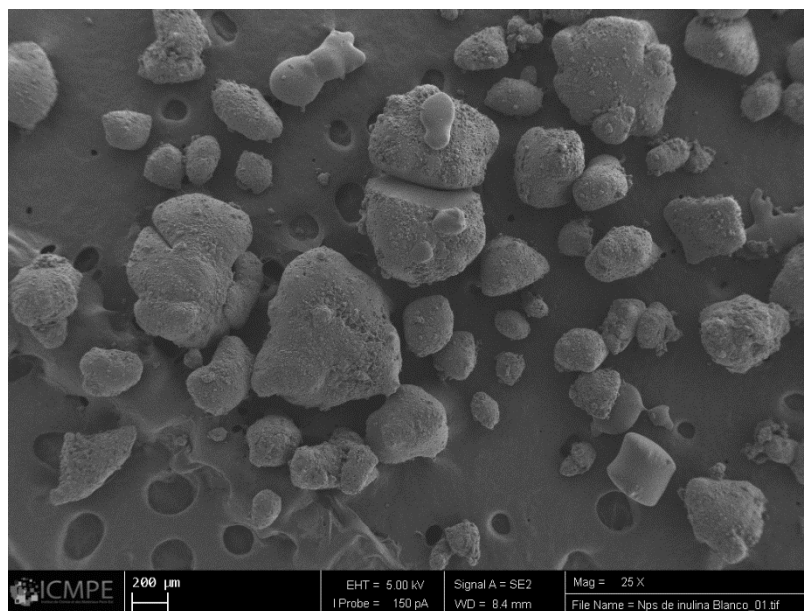
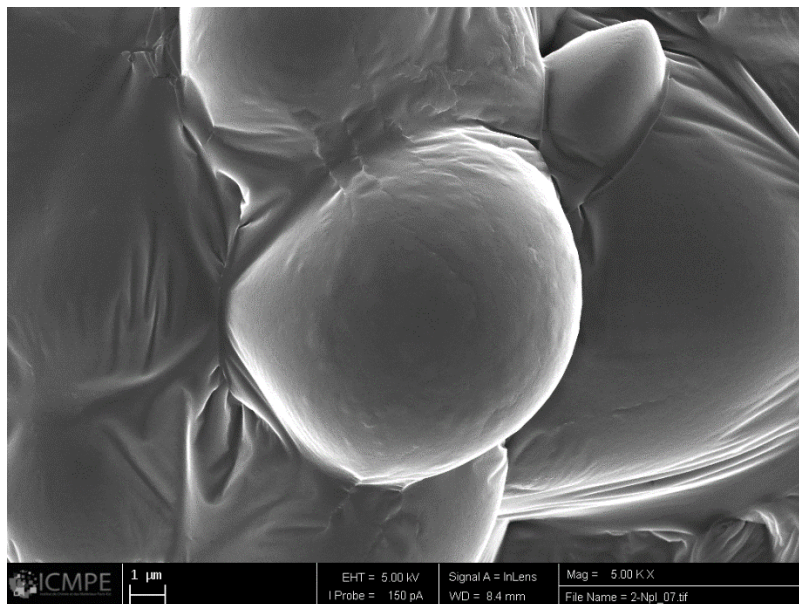


Figura A.12.2. Fotografía por Microscopia Electrónica de barrido de Np Inu.

