

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
MONTERREY

CAMPUS ESTADO DE MÉXICO

Escuela de Ingeniería y Ciencias



Desarrollo y caracterización de nanopartículas de quitosano por diferentes métodos de agitación para la encapsulación del 6-gingerol como posible inhibidor de la 5-ALOX

Disertación presentada por
MCA. Jaqueline Stephanie Ley Martinez

sometida a la
Escuela de Ingeniería y Ciencias
como un requisito parcial para obtener el grado académico de

**Doctor en
Nanotecnología**

Asesora: Dra. Esmeralda Uribe Lam
Co-asesora: Dra. Jacqueline Lizabeth Oliva Ramírez

Miembros del comité: Dra. Dulce Viridiana Melo Máximo
Dra. Maribel Jiménez Fernández
Dra. Dora Ileana Medina Medina

Atizapán de Zaragoza, Estado de México. 02 de diciembre de 2022.

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

Campus Estado de México

Escuela de Ingeniería y Ciencias

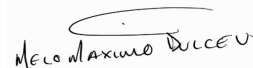
Los miembros del comité aquí citados certificamos que hemos leído la disertación doctoral presentada por Jacqueline Stephanie Ley Martinez y consideramos que es adecuada en alcance y calidad como un requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Nanotecnología.



Dra. Esmeralda Uribe Lam
Tecnológico de Monterrey
Escuela de Ingeniería y Ciencias
Asesor principal



Dra. Jacqueline Lizabeth Oliva Ramírez
MD Anderson
Co-asesor



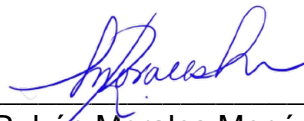
Dra. Dulce Viridiana Melo Máximo
Tecnológico de Monterrey
Escuela de Ingeniería y Ciencias
Miembro del comité



Dra. Maribel Jiménez Fernández
Universidad Veracruzana
Miembro del comité



Dra. Dora Jeana Medina Medina
Tecnológico de Monterrey
Miembro del comité



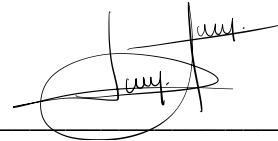
Dr. Rubén Morales Menéndez
Director Nacional de Posgrado
Escuela de Ingeniería y Ciencias

Estado de México a 02 de Diciembre de 2022

Declaración de autoría

Yo, Jaqueline Stephanie Ley Martínez, declaro que esta disertación titulada, “Desarrollo y caracterización de nanopartículas de quitosano por diferentes métodos para la encapsulación del 6-gingerol como posible inhibidor de la 5-ALOX”, y el trabajo que se presenta en ella es de mi autoría. Adicionalmente, confirmo que:

- Realice este trabajo en su totalidad durante mi candidatura al grado de doctor en esta universidad.
- He dado crédito a cualquier parte de esta disertación que haya sido previamente sometida para obtener un grado académico o cualquier otro tipo de titulación en esta o cualquier otra universidad.
- He dado crédito a cualquier trabajo previamente publicado que se haya consultado en esta disertación.
- He citado el trabajo consultado de otros autores, y la fuente de donde los obtuve.
- He dado crédito a todas las fuentes de ayuda utilizadas.
- He dado crédito a las contribuciones de mis coautores, cuando los resultados corresponden a un trabajo colaborativo.
- Esta disertación es enteramente mía, con excepción de las citas indicadas.



MCA. Jaqueline Stephanie Ley Martínez

Atizapán de Zaragoza, Estado de México, 17 de noviembre de 2022

@2022 por Jaqueline Stephanie Ley Martinez

Todos los derechos reservados

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a mi hija Aylín Alesi Ortega Ley y a mi esposo José Erick Ortega Valencia, ya que son mi pilar y mi motivación para seguir progresando, brindándome su apoyo, confianza y amor constante.

A mi madre Gloria Martínez Nájera, por creer en mí, por su ejemplo constante y por motivarme a hacer siempre más de lo que creo que son mis límites.

A mis abuelos Elena Nájera y Margarito Martínez, por ser un ejemplo constante de superación y recordarme lo bonito de la vida.

A mis suegros, cuñadas y sobrinos, Mariana Valencia, José Facundo Ortega, Jazmín Angélica Ortega, Jessica Ortega Valencia, Luis Carlos Castañeda, Renata Hernández y Matías Castañeda, por ser mi segunda familia, por no dejarme caer y más que nada por tener un espacio para mí en su corazón.

A mi familia, por darme su apoyo y consejos a lo largo de mi vida, por demostrarme que siempre estarán ahí para mí.

A mis asesoras de tesis Dra. Esmeralda Uribe Lam, Dra. Jacqueline Lizabeth Oliva Ramírez, Dra. Dulce Viridiana Melo Máximo, Dra. Maribel Jiménez Fernández y Dra. Dora Ileana Medina Medina, por toda la ayuda que me han brindado desde el comienzo de este trabajo de investigación, no solo apoyándome en la elaboración de este proyecto, sino, como apoyo incondicional.

A todos mis amigos y conocidos, quienes nunca han dejado de creer en mí.

y por último a Jaqueline Stephanie Ley Martínez, por todo el esfuerzo empleado.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, doy gracias a Dios por permitirme participar y concluir el programa de Doctorado con salud, con mi familia y con mucha satisfacción.

Agradezco a mi familia, por el amor y la paciencia que recibo de ellos diariamente.

A todas las autoridades y personal del Instituto Tecnológico y de estudios superiores de Monterrey (ITESM), por abrirme las puertas para estudiar este Doctorado.

A el Consejo Nacional de Tecnología y Ciencia (CONACyT), por ser el organismo fondeador para la realización de este proyecto.

A la Universidad Veracruzana, a los laboratorios CIDEA y SARA, particularmente al Dr. Oscar García Barradas y a la Dra. Maribel Jiménez Fernández por abrirme las puertas y brindarme los conocimientos necesarios para realizar muchos de los experimentos de este proyecto.

A la Dra. Esmeralda Uribe Lam, por ser mi asesora y haberme brindado su tiempo y paciencia a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Jacqueline Lizabeth Oliva Ramírez, por brindarme todo el apoyo y conocimiento necesario para culminar de manera exitosa, al igual que su amistad incondicional.

A la Dra. Dulce Viridiana y Lizabeth Melo Máximo, por creer en mí y hacer que el tiempo en laboratorio fuera divertido.

A mis asesoras, por su tiempo y experiencia empleados

Agradezco a mis amigos de Xalapa Dafne, Cinthia, Liesel, Nayda, Anahi, Juan Pablo, Lety, Uriel, Oscar, Ligia, Mariana, Francisco los cuales me fueron un apoyo constante.

A el Dr. Gabriel de la Rosa, DNT Luis Miguel, DCI Abril, MNT Andrés, MNT Bernardo, DCI. Brenda; porque hicieron que mi estancia en el doctorado fuera maravillosa y porque se convirtieron en grandes amigos.

Desarrollo y caracterización de nanopartículas de quitosano por diferentes métodos para la encapsulación del 6-gingerol como posible inhibidor de la 5-ALOX
por
Jaqueline Stephanie Ley Martinez

RESUMEN

Uno de los nanomateriales más utilizados en el área de la salud para la distribución de fármacos son las nanopartículas de quitosano debido a que son biocompatibles y no se les atribuye toxicidad, estas pueden ser funcionalizadas con diversos metabolitos como los son aquellos de origen natural como el 6-gingerol proveniente del Jengibre. El 6-gingerol es un compuesto con actividad antiinflamatoria por lo que puede ser considerado para la inhibición de enzimas que participan dentro del proceso de inflamación como la araquidonato 5-Lipooxigenasa (5-ALOX), involucrada en enfermedades como asma, artritis y algunos tipos de cáncer. Una alternativa para determinar la capacidad inhibitoria es mediante análisis in silico como lo es el docking molecular, el cual brinda un análisis de las interacciones específicas con la enzima 5-ALOX, y así determinar si es viable su encapsulación y distribución mediante nanopartículas. Las nanopartículas de quitosano funcionalizadas con 6-gingerol y sin funcionalizar fueron realizadas mediante gelificación iontrópica, variando los parámetros de método de homogeneización (agitador magnético, agitador magnético, espumador y ultrasonido), pH (4.0, 4.5, 4.75 y 5.0) y proporción tripolifosfato/quitosano (3:1, 4:1, 5:1 y 6:1; TPP/CS), buscando un tamaño de partícula menor a 100 nm, un potencial zeta mayor a ± 10 mV y una polidispersión menor a 0.5; con el objetivo de tener partículas más estables. Se determinó la eficiencia de encapsulación y liberación de proteína (%) mediante un ensayo de Bradford encapsulando Albumina de suero bovino (BSA). El análisis in silico fue realizado a través de diversos softwares, obteniendo estudios farmacocinéticos, toxicológicos, docking molecular y de metabolismo; permitiéndonos conocer la actividad farmacológica y la capacidad inhibitoria del 6-gingerol para la enzima 5-ALOX. Se adquirió jengibre de Tlacuilotepec, Puebla, obteniendo un rendimiento de 13.21% de 6-gingerol. Los menores tamaños de partícula en nanopartículas de quitosano sin funcionalizar se obtuvieron en las proporciones de TPP/CS 5:1 a un pH de 4.75 por los métodos de homogeneizador, espumador y agitador magnético, siendo las obtenidas por homogeneizador las que obtuvieron el mayor valor de potencial zeta y una menor polidispersión. En nanopartículas funcionalizadas ambos métodos empleados (homogeneizador y agitador magnético) presentaron un potencial zeta mayor a -20mV, una polidispersión menor a .5, obteniendo las partículas de menor tamaño a una proporción 5:1 Y un pH de 4.75 por el método de agitador magnético. La mayor eficiencia de encapsulación (82.72%) se observó a un pH de 5.0 a una proporción 5:1; mientras que el mayor porcentaje de liberación de proteína se obtuvo a un pH de 4.75 en una proporción 4:1 de TPP/CS. EL 6-gingerol mostro propiedades farmacológicas y toxicológicas similares a los inhibidores comerciales Zileuton y atreleuton. Además, exhibió interacciones específicas con el sitio catalítico de la enzima araquidonato 5-lipooxigenasa; mostrando interacciones con las tres histidinas involucradas en la inhibición de la 5-ALOX, y por lo tanto un posible candidato inhibidor de la enzima 5-ALOX.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Diagrama de proceso de desarrollo de tesis.....	19
Fig. 2	Aplicaciones de la nanotecnología (Imagen traducida de Khan 2013) ...	22
Fig. 3	Diagrama de aplicaciones de la nanotecnología en la medicina (Imagen traducida de Aceves 2022).....	23
Fig. 4	Esquema que ilustra varios tipos de nanopartículas orgánicas e inorgánicas utilizadas para el desarrollo de sistemas de administración de vacunas y fármacos (Creado por Biorender)	25
Fig. 5	Dimensiones de estructuras cristalinas de nanomateriales a base de carbón (Creado con BioRender.com).....	27
Fig. 6	Estructuras del quitosano y la quitina.....	29
Fig. 7	Nanopartículas de quitosano (A) Imagen por microscopia electrónica de barrido (SEM) y (B) Esquema general (Imagen de Rostami 2013 modificada en BioRender.com)	30
Fig. 8	Esquema general de la preparación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica (creado en BioRender.com)	30
Fig. 9	Esquema general de la preparación de nanopartículas de quitosano por Emulsión por reticulación (creado en BioRender.com)	31
Fig. 10	Imagen de A) nanopulverizador y B) esquema general proceso de secado por aspersión (creado en BioRender.com)	31
Fig. 11	Esquema general de la preparación de nanopartículas de quitosano por coalescencia de gotas por emulsión (creado en BioRender.com).....	32
Fig. 12	Esquema general de la preparación de nanopartículas de quitosano por nanoprecipitación (creado en BioRender.com)	32
Fig. 13	Esquema general de la preparación de nanopartículas por micelización inversa (creado en BioRender.com).....	33
Fig. 14	Esquema general de la preparación de nanopartículas por desolvatación (creado en BioRender.com)	33
Fig. 15	Esquema general de la preparación de nanopartículas por gelificación iónica modificada con polimerización por radicales (creado en BioRender.com)..	34
Fig. 16	Esquema general de la preparación de nanopartículas por difusión de disolventes en mulsión (creado en BioRender.com)	34
Fig. 17	Procedimiento de producción de nanopartículas por gelificación inotrópica (Creado por BioRender.com).....	36
Fig. 18	Microscopio de fuerza atómica (AFM), A) Microscopio Nx-Bio-Biometa, B)Cantilever y C) resultados de superficie de recubrimiento de oro.....	37
Fig. 19	Microscopio electrónico de transmisión (TEM), A) Microscopio JEM-F200 JEOL, B) Rejilla malla 200 para muestras e C) imágenes de nanopartículas de oro analizadas por TEM (C).	38
Fig. 20	Dispersión de luz dinámica (DLS), A) Equipo Zetasizer nano Z590 y B) análisis de partículas de celulosa nano cristalina.	38
Fig. 21	Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), A) Equipo Nanosight Range NS300 y B) Captura de video de nanopartículas con análisis de resultados.....	39

Fig. 22	Microscopio electrónico de barrido (SEM), A) Microscopio JSM-7500F JEOL, B) Stubs para muestras e C) imágenes de un estándar de nanopartículas de oro analizadas por SEM.	40
Fig. 23	Imagen de Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>), 1) estructura anatómica de Zingiber officinale Forma de crecimiento (A); Flor (B); Raiz (C) y 2) presentación comercial.	41
Fig. 24	Estructuras químicas de los compuestos del jengibre. Zingerona (1); gingerol (2); zingiberona (3); β -sesquifelandreno (4); shogaol (5); bisaboleno (forma α ; 6); β -felandreno (7); farneseno (8); 1,2-cineol (9); citral (10); canfeno (11); 6-paradol (12); curcumina (13); terpineol (forma α ; 14); borneol (15); β -elemeno (16); zingiberenol (17); limoneno (18); geraniol (19); linalool (20).(Realizado en chemDraw).....	44
Fig. 25	Estructura química del 6-gingerol.....	45
Fig. 26	Esquema de proceso de inicio y resolución del proceso de inflamación (Creado por Biorender.com).....	48
Fig. 27	Estructura 3D de la Araquidonato 5-Lipooxigenasa (PDB ID: 3O8Y) (Fuente: www.rcsb.org; PROTEIN DATA BANK).....	51
Fig. 28	Resumen de un enfoque clásico de diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD). (Creado en BioRender.com; Fuente: de Ruyck et. al, 2016)..	53
Fig. 29	Metodología experimental	61
Fig. 30	Cámaras climáticas Forma TM de Thermo Scientific (A) y rodajas de jengibre fresco en charolas para su secado.	62
Fig. 31	Extracto Metanólico (A) y Rotavapor [®] BUCHI R-100.....	63
Fig. 32	Columna cromatográfica empacada con Sílica 60 y hexano 100% (A) y colocación del extracto metanólico en la parte superior de la columna y corrimiento para su absorción en sílica.....	64
Fig. 33	Fracciones recuperadas de la columna cromatográfica.	65
Fig. 34	A) Diagrama de funcionamiento de cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en ingles), B) Placa de sílice con un compuesto eluído visto en una cámara ultravioleta y C) Placa de sílice con dos compuestos eluídos.	65
Fig. 35	A) Espectrofotómetro de RMN de 500 MHz Agilent Technologies y B) Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹ H.....	66
Fig. 36	Diagrama de combinaciones de variables para el desarrollo de experimentos posibles.....	68
Fig. 37	Esquema general de creación de nanopartículas de quitosano planteado por Calvo et al en 1997 (creado con BioRender.com).....	69
Fig. 38	Esquema general de creación de nanopartículas de quitosano planteado por iGEM TEC CEM 2018 (creado con BioRender.com).	70
Fig. 39	Esquema general de creación de nanopartículas de quitosano técnica modificada. (creado con BioRender.com)	72
Fig. 40	A) Parrilla con agitación Thermo-Scientific SP131015, B) Espumador comercial marca Zulay Kitchen, C) Homogeneizador modelo D500 de Wiggen Hausser y D) Procesador ultrasónico Cole Parmer de 750 Watt.....	73
Fig. 41	Esquema general de creación de nanopartículas de quitosano funcionalizadas técnica modificada (creado con BioRender.com)	74
Fig. 42	A) Zetasizer Nano-ZS acoplado a computador y B) Cubeta DTS1060 75	

Fig. 43	Medidor Portátil de pH / mV Hanna HI8424.	75
Fig. 44	Informe resultante de un análisis de potencial zeta del equipo Zetasizer nano-ZS.....	76
Fig. 45	Diagrama de proceso de realización de derivación de curva estándar por ensayo de Bradford.....	77
Fig. 46	A)Espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO y B) placa de 96 pocillos de 350 uL cada uno marca CTR Scientific.....	78
Fig. 47	Curva de calibración patrones de BSA usando el método de Bradford.....	78
Fig. 48	Diagrama para encapsulación y recuperación de nanopartículas de quitosano con albumina de suero bovino encapsulado. (Creado en BioRender.com)..	79
Fig. 49	Diagrama de flujo de proceso de cálculo de parámetros farmacocinéticos con programa DataWarrior y Molinspiration. (Creado en BioRender.com)	81
Fig. 50	A) Estructura cristalina de proteína 6N2W y B) Diagrama de flujo de proceso de selección y descarga de proteína. (Creado en BioRender.com)	82
Fig. 51	A) Diagrama de flujo de dibujo de estructura 6-gingerol. y B) Diagrama de flujo de optimización de energía en el software Avogadro. (Creado en BioRender.com)	83
Fig. 52	Diagrama de flujo de proceso de preparación de proteína y receptor en el software Chimera (Creado en BioRender.com).....	84
Fig. 53	A) Jengibre (Zingiber Officinale) en metanol, B) Extracción metanólica con múltiples fases visibles y C) Extracción metanólica de Jengibre.....	88
Fig. 54	A) Fracciones recolectadas y B) Placa de sílica para cromatografía en capa fina con corrimiento de dos puntos de fracciones recolectadas.	88
Fig. 55	A) Compuesto 1 y 2; B) Compuesto 3,4 y 5; C) Compuesto 5 y 6; y compuesto 7 y 8 en placas de sílica para cromatografía en capa fina (TLC).....	89
Fig. 56	A) Compuesto recolectado 3, B) Compuesto recolectado 4 y C) Compuesto recolectado 5	90
Fig. 57	A) Espectro de RMN de compuesto 6-gingerol realizado por Gan et. al, B) Espectro de RMN de compuesto 3, C) Espectro de RMN de compuesto 4 y D) Espectro de RMN de compuesto 5.....	91
Fig. 58	Estructura del compuesto 6-gingerol y las respectivas posiciones de sus átomos.....	92
Fig. 59	A) Experimento de RMN homonuclear 2D (¹ H- ¹ H COSY) de 6-gingerol y B) Experimento RMN heteronuclear 2D (HSQC) de 6-gingerol.....	94
Fig. 60	Efecto de la relación de masa TPP:CS en tamaño de partícula a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Homogeneizador, B) Agitador Magnético, C) Espumador y D) Ultrasonido	100
Fig. 61	Efecto de la relación de masa TPP:CS en potencial zeta a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A)Homogeneizador, B) Agitador Magnético, C) Espumador y D) Ultrasonido	102
Fig. 62	Efecto de la relación de masa TPP:CS en la polidispersión a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de	

homogenización con A) Homogenizador, B) Agitador Magnético, C) Espumador y D) Ultrasonido	103
Fig. 63 Liberación de proteína (%) a concentraciones 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1 con diferentes pH A) 4.0 (●), B) 4.5 (■), C) 4.75 (▲) y D) 5 (▼).....	105
Fig. 64 Efecto de la relación de masa TPP:CS en tamaño de partícula a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Agitador Magnético y B) Espumador.	109
Fig. 65 Efecto de la relación de masa TPP:CS en potencial zeta a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Agitador Magnético y B) Espumador.....	110
Fig. 66 Efecto de la relación de masa TPP:CS en la polidispersión a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Agitador Magnético y B) Espumador.	111
Fig. 67 Acoplamiento molecular de 6-gingerol con 5-LOX (PDB:6N2W). Los principales residuos implicados en la interacción proteína-ligando (izquierda) y las principales interacciones implicadas en la unión proteína-ligando (derecha) del 6-gingerol; las distancias se muestran como Å sobre las líneas.	117
Fig. 68 Acoplamiento molecular de 6-shogaol con 5-LOX (PDB:6N2W). Los principales residuos involucrados en las interacciones proteína-ligando (izquierda) y las principales interacciones involucradas en la unión proteína-ligando (derecha) de 6-shogaol, las distancias se muestran como Å sobre las líneas.	118
Fig. 69 Interacciones entre la superficie de 6-shogaol y 5-LOX (PDB:6N2W). Complejo fisicoquímico de 6-shogaol y 5-LOX evaluando la hidrofobicidad, puentes de hidrógeno, carga interpolada, ionización y superficie accesible al solvente (SAS).....	119
Fig. 70 Interacciones entre la superficie de 6-shogaol y 5-LOX (PDB:6N2W). Complejo fisicoquímico de 6-shogaol y 5-LOX evaluando la hidrofobicidad, puentes de hidrógeno, carga interpolada, ionización y superficie accesible al solvente (SAS).....	119
Fig. 71 Evaluación in silico del metabolismo del 6-gingerol. Sitios metabólicos (SOM) del 6-gingerol mediados por isoenzimas CYP450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 y HLM).....	121
Fig. 72 Evaluación in silico del metabolismo del 6-shogaol. Sitios metabólicos (SOM) del 6-shogaol mediados por isoenzimas CYP450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 y HLM).....	122

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda	49
Tabla 2. Programas de acoplamiento molecular más representativos.....	53
Tabla 3. Proteínas utilizadas, ligandos, aplicación y software empleados en análisis in silico.....	58
Tabla 4. Variables y valores seleccionados en el diseño experimental.	67
Tabla 5. Diluciones para derivación de curva estándar usando Buffer tampón fosfato salino (PBS). Adaptación a pequeña escala de técnica adjunta de Sigma Aldrich para ensayo de Bradford en las diluciones preparadas realizada por el equipo iGEM 2018 TecCem.....	77
Tabla 6. Compuestos purificados obtenidos por el método de cromatografía en columna y su rendimiento del aceite esencial (%).....	90
Tabla 7. RMN ¹ H (500 MHz) y ¹³ C (125 MHz, r.t.) desplazamientos químicos de 6-gingerol, δ en ppm en cloroformo-d (CDCl ₃).....	93
Tabla 8. Tamaño de partícula, carga superficial y polidispersión de nanopartículas de quitosano con diferente método de homogenización, pH y concentración TPP: Quitosano.....	96
Tabla 9. Porcentaje de Eficiencia de encapsulación (EE%) de BSA en nanopartículas de quitosano a pH 4.0, 4.5, 4.75 y 5.0 a proporciones 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1 de TPP:CS.	104
Tabla 10. Tamaño de partícula, carga superficial y polidispersión de nanopartículas de quitosano con diferente método de homogenización, pH y concentración TPP: Quitosano.....	106
Tabla 11. Propiedades farmacocinéticas de 6-shogaol y 6-gingerol en comparación con los inhibidores redox de 5-LOX obtenidos del software Osiris Data Warrior y Molinspiration.....	112
Tabla 12. Evaluación de la semejanza con el fármaco, la puntuación del fármaco y los riesgos de toxicidad del 6-shogaol y el 6-gingerol en comparación con los inhibidores redox de 5-LOX utilizando el software Osiris Data warrior.....	115

Contenido

RESUMEN	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS.....	11
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	14
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	17
1.3 OBJETIVOS.....	18
1.4 METODOLOGÍA	19
CAPITULO 2. MARCO TEORICO.....	22
2.1 Nanotecnología.....	22
2.2 Nanomedicina.....	23
2.2.1 Sistemas dirigidos de liberación de fármacos	24
2.2.1.1 Clasificación de nanomateriales	26
2.3 Nanopartículas de quitosano	27
2.3.1 Síntesis de nanopartículas poliméricas	30
2.3.1.1 Gelificación iontrópica.....	35
2.3.1.2 Métodos de caracterización de nanopartículas	36
2.4 Jengibre	41
2.4.1 6-gingerol	44
2.5 Inflamación	47
2.5.1 5-ALOX	50
2.6 Análisis in silico.....	51
CAPITULO 3. ESTADO DEL ARTE	55
3.1 Extracción y purificación de compuesto 6-gingerol.....	55
3.2 Nanopartículas de quitosano	56
3.3 Docking Molecular	58
3.4. Conclusiones del estado del arte.....	59
CAPITULO 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	61
4.1 Preparación de extracto de 6-gingerol.....	62
4.1.2 Purificación del compuesto 6-gingerol.....	64
4.1.3 Elucidación y caracterización de 6-gingerol	65
4.2 Diseño de experimentos para la elaboración de nanopartículas	66
4.2.1 Preparación de nanopartículas	69
4.2.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de quitosano.....	74
4.2.3 Preparación de nanopartículas cargadas con albúmina de suero bovino (BSA).....	76
4.2.3.1 Derivación de curva estándar	76
4.2.3.2 Evaluación de la eficiencia de encapsulación de proteína BSA en nanopartículas de quitosano.....	78
4.3 Modelado computacional: parámetros farmacocinéticos.	80
4.3.1 Docking Molecular.....	82
CAPITULO 5. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	86
5.1 Extracción y purificación del compuesto 6-gingerol	86
5.1.1 Elucidación del compuesto 6 gingerol.....	90

5.2 Elaboración de nanopartículas: caracterización fisicoquímica de nanopartículas de quitosano.....	95
5.2.1 liberación de proteína.....	104
5.2.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de quitosano con 6-gingerol	105
5.3 Evaluación in silico de propiedades farmacológicas y toxicológicas del 6-gingerol: predicción de propiedades farmacocinéticas	111
5.3.1 Puntuación de fármacos y análisis de toxicidad.....	114
5.4 Docking entre 5-alox con el compuesto 6-gingerol y 6-shogaol.....	116
5.5 Evaluación in silico del metabolismo de 6-gingerol y 6-shogaol	120
CAPITULO 6. CONCLUSIONES.....	123
6.1 TRABAJO FUTURO	126
REFERENCIAS.....	129

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La nanotecnología es el estudio que combina la ciencia, medicina, ingeniería y tecnología a nivel nanométrico, generando el desarrollo de nanomateriales, nanocomponentes y nanosistemas [1]. La nanotecnología es la ciencia que tiene la capacidad de sintetizar, caracterizar y transformar la materia en una escala de longitud inferior a 100 nm [2]. Dentro de su enfoque en nanomateriales, la nanotecnología comprende principalmente el uso de nanopartículas y nanoestructuras que van desde 1 nm hasta 100 nm de tamaño [3]. La aplicación de la nanotecnología se presenta en cinco áreas principales [1, 4, 5]:

- minerales y agroindustria,
- dispositivos médicos y salud,
- energía y medioambiente,
- materiales y fabricación,
- electrónica,
- información y comunicaciones.

Los nanomateriales se desarrollan en diversas formas, como nanovarillas, nanopartículas, nanoláminas y películas nanoestructuradas que se pueden caracterizar en función de su dimensionalidad [6], los nanomateriales presentan características y propiedades especiales y únicas debido a su mayor relación superficie-volumen [5]. Las nanopartículas son partículas diminutas (menores de 100 nanómetros), estas partículas se pueden sintetizar química o biológicamente. [3, 7, 8]. En la actualidad, existen nanopartículas de diversos materiales con propiedades fisicoquímicas únicas, un tamaño reducido, superficie específica y propiedades ópticas; utilizadas ampliamente en diversas áreas como medicina, electrónica, electricidad, información, ciencia e ingeniería, con la finalidad de mejorar la eficiencia de un sistema o proceso [9]. Las nanopartículas, también son denominadas como “nanomateriales de ingeniería” [2].

En las aplicaciones de la medicina se destacan los sistemas de administración de fármacos basados en nanopartículas (NP). Este tipo de sistemas han sido utilizados ampliamente para el tratamiento de enfermedades como diabetes, trombosis, enfermedades cardíacas, trastornos neurodegenerativos y cáncer. Como respuesta a las limitaciones de las alternativas terapéuticas, cuyos sistemas de dosificación de fármacos son invasivos [9–11]. La prioridad ha recaído en la búsqueda y desarrollo de nanopartículas que puedan dirigirse a sitios de acción específicos y que presenten un uso menos invasivo, esto al tener un tamaño reducido y cargas superficiales específicas. Permitiendo su penetración a través de la mucosa y modular la liberación del fármaco; mejorando así la eficiencia y reduciendo la toxicidad del fármaco [12].

Una gran variedad de materiales como polímeros, lípidos y tensioactivos naturales y sintéticos (modificadores de la tensión superficial dos fases) han sido empleados

como nano portadores de fármacos; para mejorar su distribución y eficacia al reducir su tamaño y aumentar su especificidad [12]. Los polisacáridos o carbohidratos complejos formados por múltiples azúcares simples, son de los materiales más utilizados. Este tipo de materiales presentan excelentes propiedades físicas y biológicas, mayor biodegradabilidad y biocompatibilidad; un ejemplo es el quitosano. El quitosano es un biopolímero natural aislado del exoesqueleto de crustáceos, como cangrejos y camarones [13]. El uso de polisacáridos ofrece varias ventajas para el suministro de fármacos a las mucosas, como baja toxicidad y buena biodegradabilidad, así como propiedades inmunoestimulantes y altas propiedades autoadhesivas. [12]

Las nanopartículas de quitosano representan una alternativa viable para la aplicación de fármacos, además de ser ampliamente estudiadas en la industria farmacéutica como vectores de proteínas, agentes anticancerígenos, genes o antígenos [14, 15]. Las nanopartículas de quitosano presentan un tamaño reducido lo que facilita su penetración a través de diferentes tejidos, posible protección contra la degradación enzimática y modulación de la farmacocinética del fármaco, mejorando así la eficacia y reduciendo la toxicidad del fármaco [12, 16, 17].

Existen diversos métodos de síntesis de nanopartículas de quitosano, siendo las más utilizadas la gelificación iónica, reticulación por emulsión, secado por aspersión y coalescencia de gotas de emulsión. La técnica más simple y sostenible es la gelificación iónica, ya que no requiere uso de solventes o aplicación de temperatura [10, 18–20]. Este método ha sido examinado minuciosamente para obtener nanopartículas reproducibles con una distribución pequeña del tamaño [12]. En consecuencia, la influencia de parámetros como las variaciones en el peso molecular del quitosano, la concentración de quitosano, la relación en peso de quitosano a tripolifosfato (TPP) y el pH de la solución, se han analizado para determinar su efecto sobre características como el tamaño de las nanopartículas, la intensidad de la carga superficial y la tendencia a la formación de partículas [14, 21]. La interacción entre las cargas de tripolifosfato y quitosano, a determinados valores de pH, se comporta como un sistema termodinámico metaestable que es sensible a variaciones en la fuerza iónica, lo que indica que la velocidad de agitación es determinante para obtener nanopartículas con un tamaño específico menor a los 100 nm [22].

La administración de fármacos basada en nanopartículas (NP) permite la obtención de beneficios como la baja toxicidad, biocompatibilidad cuando se combina con productos naturales. Los extractos de plantas son una fuente natural de fármacos que poseen un bajo costo de producción y alta biocompatibilidad [7, 23]. La funcionalización de partículas con derivados de compuestos naturales como los derivados del jengibre, que han mostrado potencial para curar infecciones y enfermedades, lo hacen al mejorar la inmunidad de los pacientes [24]. Estos compuestos naturales se componen de bioproteínas, carbohidratos y también en componentes químicos biológicamente activos que actúan como fármacos contra las células infectadas [25]. Una especie altamente usada desde la antigüedad, como condimento y medicina es el jengibre (*Zingiber officinale*), cuya importancia a

aumentado debido a su baja toxicidad y su amplio espectro de aplicaciones biológicas y farmacológicas, que incluyen resfriado común, fiebre, dolor, antipirético, trastornos gastrointestinales, náuseas y vómitos asociados con el mareo por movimiento y el embarazo [26–28]

El jengibre (*Zingiber officinale*) es un nutracéutico que ha atraído mucha atención en investigaciones recientes para la resolución de procesos inflamatorios debido a los diversos fitoquímicos potencialmente bioactivos, como el 6-gingerol [24]. Este compuesto presenta propiedades farmacológicas para su uso como medicamento, tales como propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, quimiopreventivas y antipiréticas [29, 30]. Se ha demostrado que el 6-gingerol inhibe la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos peritoneales murinos [24, 27, 31]. La presente investigación se centra en la obtención de 6-gingerol por extracción química de la especie *Zingiber officinale* para evaluar las propiedades toxicológicas y farmacológicas como posibles inhibidores de la araquidonato 5-lipoxigenasa (5-ALOX) [32].

La araquidonato 5-lipoxigenasa o 5-lipoxigenasa (5-ALOX o 5-LOX), es la enzima clave para la biosíntesis de los leucotrienos a partir del ácido araquidónico, los cuales son mediadores inflamatorios y alérgicos, además de provocar molestias físicas como inflamación, estrechez y secreción de mucosidad en las vías respiratorias [32–34]. La inflamación es la causa de una serie de implicaciones fisiopatológicas como alergia, asma, trastornos cardiovasculares y autoinmunes [35]. Al inhibir a la enzima 5-ALOX, se elimina o reduce su acción, eliminando así las molestias físicas [33].

Con la finalidad de encapsular en nanopartículas un producto natural para la solución o disminución de la inflamación causado por enfermedades que involucran la enzima 5-ALOX, se seleccionó el método de gelificación ionotrópica para la encapsulación en nanopartículas de quitosano al 6-gingerol compuesto presente en el jengibre. La hipótesis central es que el compuesto 6-gingerol, puede ser encapsulado en nanopartículas de quitosano mediante gelificación ionotrópica considerando parámetros como la concentración, pH y método de agitación, con la finalidad de inhibir a la enzima 5-ALOX.

A pesar de las contribuciones realizadas por los diversos autores citados en la presente investigación, aún quedan aspectos como el análisis de pH del medio y potencial de carga superficial de las nanopartículas de quitosano y la encapsulación de extractos naturales, que podrían ser investigados y empleados para el tratamiento o resolución de enfermedades. La presente investigación tiene como objetivo el desarrollar un candidato inhibidor de la enzima 5-ALOX mediante evaluación *in silico*, para ser utilizado como posible antiinflamatorio en enfermedades como asma, artritis y alergias; utilizando compuestos biocompatibles y no tóxicos como el 6-gingerol y el quitosano, mediante el desarrollo y estandarización de nanopartículas de tamaño reducido, potencial de carga alto y poca variación de tamaño.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El proceso inflamatorio en el cuerpo cumple una función importante en el control y reparación de lesiones, sin embargo, este proceso puede ser doloroso, debilitante, afectar la calidad de vida de las personas e incrementar cargas económicas considerables al tratarse de una inflamación crónica [36]. El proceso inflamatorio habitual inicia con la protección contra la propagación de la infección, seguida de la restauración de los tejidos afectados a su estado estructural y funcional normal; una inflamación que no desaparece puede afectar a todas y cada una de las partes del cuerpo requiriendo así un tratamiento específico para reducir su sintomatología [37–39].

La araquidonato 5-lipooxigenasa (5-ALOX) es una enzima producida por el cuerpo humano encontrada en pacientes con enfermedades crónicas como asma, arteriosclerosis y algunos tipos de cáncer [33]. Esta enzima forma parte de las señales relacionadas con la inflamación y produce sintomatología no deseada como vasopermeabilidad, secreción de moco y contracción del músculo liso [32, 33]. El único inhibidor de la 5-ALOX producido comercialmente para el tratamiento del asma es un fármaco llamado Zileutón, de la marca Zyflo CR® que inhibe la acción de la enzima 5-ALOX; sin embargo, presenta efectos secundarios como daño hepático y alta toxicidad [33, 40]. Por estas razones, existe la necesidad de obtener y desarrollar nuevas moléculas orgánicas que tengan un efecto inhibitorio sobre los efectos secundarios de 5-ALOX para prevenir, mejorar y solucionar enfermedades inflamatorias crónicas [33, 34, 40]

La síntesis de fármacos que sean eficaces requiere en promedio 8.3 años y costos entre US\$ 314 millones y US\$ 2.8 mil millones; esto debido a la gran cantidad de reactivos y operaciones que deben de realizarse para obtener un compuesto adecuado [41]. Por esta razón, estudios como los realizados por los equipos de autores como Da Silva, Markam y Shing [25, 42, 43], se han centrado en el uso de compuestos naturales como 6-gingerol extraído del jengibre; y el quitosano para el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos. El uso de estos sistemas derivados de compuestos naturales ha demostrado su funcionamiento similar al de los fármacos [25].

Considerando que el compuesto 6-gingerol posee potencial antiinflamatorio y el quitosano es altamente biocompatible y no posee toxicidad atribuida, una alternativa es la encapsulación del 6-gingerol dentro de una nanopartícula compuesta por quitosano y una sal iónica como el tripolifosfato, a través de la técnica de gelificación ionotrópica [12, 29, 30, 44]. Las nanopartículas de quitosano deben ser de tamaño menor a 100 nm, un potencial zeta alejado de 0 y una polidispersión cercana a 0; al cumplir estos parámetros las nanopartículas presentarán una baja agregación y serán nanopartículas poco reactivas, características ideales para la distribución de fármacos [45]. Para ello se propone variar los parámetros de pH, concentración de quitosano/tripolifosfato y métodos de agitación, los valores serán evaluados por medio de un equipo de luz dinámica. Se evaluará la capacidad de liberación del compuesto 6-gingerol, mediante la técnica Biuret, la cual mide la liberación de

proteína. Finalmente, se propone realizar un docking molecular entre el 6-gingerol y la 5-ALOX para determinar las interacciones y los sitios de inhibición de la 5-ALOX, y con ello una solución alterna a la inhibición de la enzima 5-ALOX presente en procesos inflamatorios crónicos como el asma y cáncer. Esta solución tiene el potencial de tener una mayor afinidad biológica, esto debido al uso de compuestos naturales como el 6-gingerol que posee características antiinflamatorias, y el quitosano que ha sido ampliamente estudiado por su baja toxicidad y alta biocompatibilidad.

1.3 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y producir nanopartículas de quitosano mediante la técnica de gelificación ionotrópica por la encapsulación del compuesto 6-gingerol extraído del jengibre (*Zingiber officinale*) como alternativa para inhibir la enzima 5-ALOX.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer y evaluar la eficiencia del sistema de elución para la extracción y posterior elucidación del 6-gingerol de jengibre de la especie *Zingiber officinale* mediante resonancia magnética nuclear.
- Producir nanopartículas mediante la técnica de gelificación ionotrópica por agitación magnética, espumador, homogeneizador y ultrasonido, evaluando parámetros de tamaño de partícula, potencial zeta y polidispersión.
- Desarrollar el estudio de liberación de proteína de las nanopartículas de quitosano a través de la técnica de Bradford con albúmina de suero bovino (BSA) y reactivo de Bradford.
- Producir nanopartículas con 6-gingerol encapsulado mediante la técnica de gelificación ionotrópica por agitación magnética, espumador, homogeneizador y ultrasonido, evaluando parámetros de tamaño de partícula, potencial zeta y polidispersión.
- Evaluar las propiedades farmacológicas y toxicológicas del 6-gingerol para su posible uso como inhibidor de la 5-ALOX mediante Avogadro, Mol inspiration, DataWarrior, Isis DataWarrior, Xenosite, UCFS-Chimera, Mestrenova, ChemDraw y BIOVIA Discovery
- Determinar las interacciones del 6-gingerol con 5-ALOX mediante modelado molecular (Docking) para evaluar los sitios catalíticos para su inhibición.
- Evaluar las propiedades metabólicas del 6-gingerol para su posible uso como inhibidor de la 5-ALOX mediante Xenosite

1.4 METODOLOGÍA

La metodología para el desarrollo de la investigación presentada se divide en 11 fases que engloban la extracción, elucidación, identificación de compuesto 6-gingerol; la elaboración de nanopartículas de quitosano-tripolifosfato con y sin el compuesto 6-gingerol encapsulado; y la evaluación de objetivos, determinación de propiedades de 6-gingerol, docking y evaluaciones *in silico* del metabolismo de 6-gingerol. El diagrama de proceso se presenta en la Figura 1.

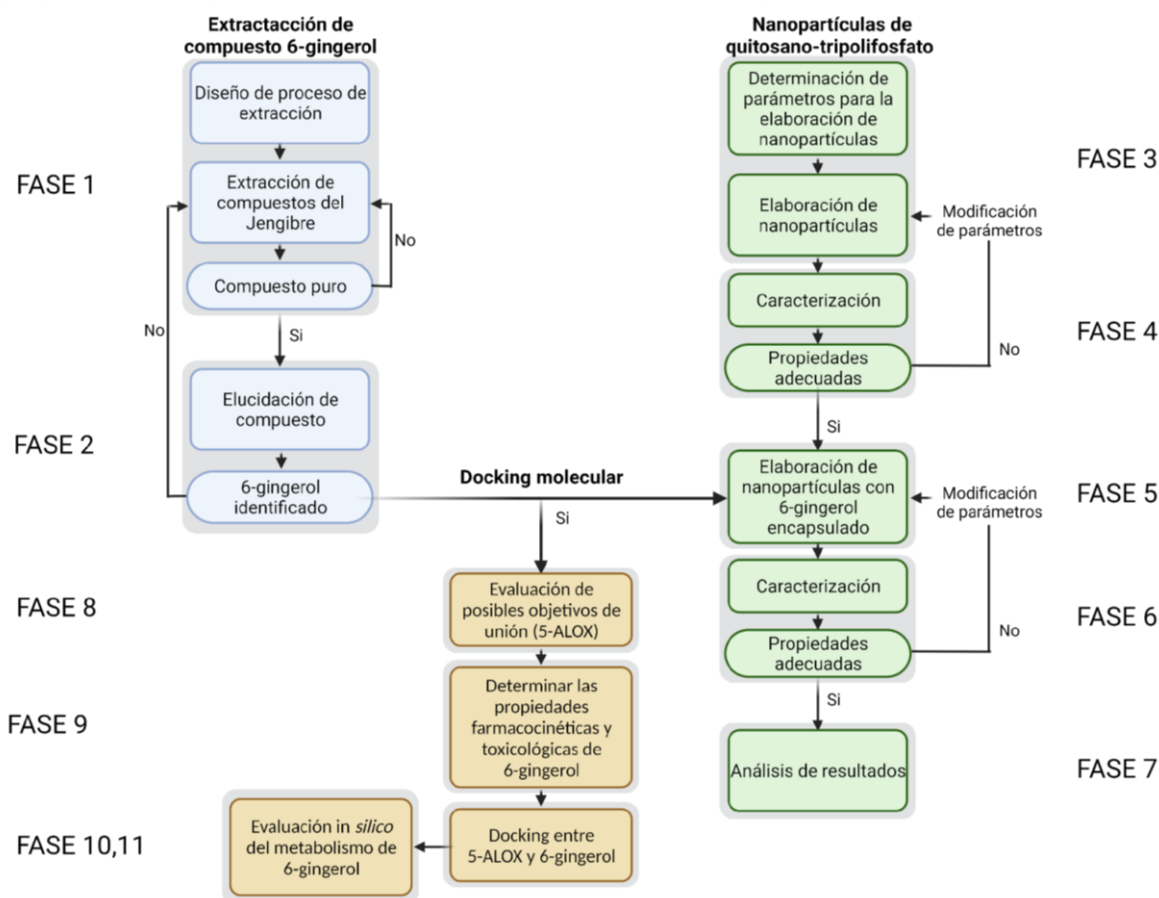


Fig. 1 Diagrama de proceso de desarrollo de tesis

Extracción de compuesto 6-gingerol:

Fase 1: Extracción de compuestos por cromatografía en columna puros del rizoma de jengibre, determinando mediante cromatografía la pureza, lo que facilitara la elucidación de una molécula.

Fase 2: Elucidación de los compuestos puros extraídos e identificación del compuesto 6-gingerol, mediante la obtención de espectros por resonancia magnética nuclear que faciliten la identificación de los compuestos presentes y la forma de la molécula final obtenida.

Nanopartículas de quitosano-tripolifosfato

Fase 3: Elaboración de nanopartículas mediante la técnica de gelificación ionotrópica de quitosano-tripolifosfato, determinando las proporciones adecuadas de quitosano/tripolifosfato, el pH del medio, tiempo y métodos de agitación.

Fase 4: Caracterización de nanopartículas por análisis de luz polarizada para determinar características de menor tamaño, mayor carga superficial y menor polidispersión.

Fase 5: Elaboración de nanopartículas por gelificación ionotrópica de tripolifosfato-quitosano con el compuesto 6-gingerol previamente identificado, determinando si existen variaciones en cuanto a las proporciones iniciales propuestas.

Fase 6: Caracterización de nanopartículas con compuesto 6-gingerol encapsulado, para determinar características de menor tamaño, mayor carga superficial y menor polidispersión por análisis de luz polarizada.

Fase 7: Análisis de resultados, para determinar las diferencias de tamaño, potencial de carga y dispersión de tamaño de nanopartículas con el compuesto 6-gingerol encapsulado y sin encapsular. Determinación de los parámetros adecuados para producir nanopartículas con el menor tamaño, mayor potencial de carga y menor polidispersión.

Docking molecular

Fase 8: Evaluación por software de la enzima 5-ALOX como posibles objetivos de unión para el compuesto 6-gingerol. Determinado por el análisis de la acción farmacológica del compuesto 6-gingerol con la enzima 5-ALOX.

Fase 9: Determinación de las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas del compuesto 6-gingerol mediante análisis *in silico* con ayuda de diversos softwares. Como pruebas farmacocinéticas las cuales son solubilidad, peso molecular, logaritmo del coeficiente de partición (cLogP), Enlaces donadores de hidrógeno, enlaces aceptores de hidrógeno, enlaces rotables y “la regla de los 5” de Lipinski; mientras que para las pruebas toxicológicas se realizaron evaluaciones *in silico*, considerando riesgos toxicológicos como mutagenicidad, tumorigenicidad, irritabilidad y efecto reproductivo.

Fase 10: Docking entre el compuesto 6-gingerol y la enzima 5-ALOX, para determinar la posible interacción del compuesto en el sitio catalítico de la enzima, y llevar a cabo su posible acción farmacológica mediante el software UCSF CHIMERA.

Fase 11: Evaluación *in silico* del metabolismo del 6-gingerol, para determinar los sitios atómicos del compuesto y como podría ser metabolizado mediante la enzima citocromo P450 (CYP450) y sus isoenzimas.

La organización general de este proyecto de tesis se conforma de 6 capítulos:

Capítulo 1. Introducción, en esta se presenta el contexto actual de esta investigación, el planteamiento del problema, justificación, objetivos y la metodología utilizada para solucionar el problema planteado en esta tesis.

Capítulo 2. Marco teórico, en este se realiza una revisión completa de la literatura y fundamentos teóricos que buscan sustentar el desarrollo de la investigación.

Capítulo 3. El estado del arte incluye un compilado de la información más relevante y actual sobre las investigaciones realizadas que involucran el desarrollo de nanopartículas realizadas por el método de gelificación ionotrópica de quitosano y tripolifosfato; al igual que su aplicación en procesos inflamatorios regidos por la enzima 5-ALOX. En este capítulo se determina la viabilidad de este proyecto.

Capítulo 4. Desarrollo experimental, menciona los parámetros de pH, concentración y método de agitación, utilizados para la creación de nanopartículas de quitosano/tripolifosfato y evaluar su capacidad de liberación de proteína. También, se presenta el proceso seleccionado para modelado y análisis computacional para la evaluación del compuesto 6-gingerol como inhibidor de la enzima 5-ALOX.

Capítulo 5. En esta sección se evaluará si se lograron desarrollar y producir nanopartículas de quitosano mediante la técnica de gelificación ionotrópica con el compuesto 6-gingerol extraído del jengibre (*zingiber officinale*). También se determinará mediante modelado computacional si es una alternativa para inhibir la enzima 5-ALOX.

Capítulo 6. Conclusiones del proyecto, recomendaciones y algunas observaciones para trabajo a futuro.

Adicional a los capítulos previamente descritos, se presentan las referencias utilizadas a lo largo de la investigación

CAPITULO 2. MARCO TEORICO

2.1 Nanotecnología

La nanotecnología es el estudio de la combinación emergente de ciencia, medicina, ingeniería y tecnología a nivel de nano escala, de manera fundamental se refiere a un campo de la ciencia incluye la síntesis y el desarrollo de varios nanomateriales que varían en tamaño de 1 a 100 nm [1, 2]. La idea de la nanotecnología fue introducida por primera vez por Richard Feynman en su conferencia titulada "There's Plenty of Room at the Bottom" en una reunión de la Sociedad Estadounidense de Física en Caltech el 29 de diciembre de 1959[2]. La nanotecnología es una tecnología emergente que encierra grandes promesas para el futuro, permitiendo su aplicación en diversas áreas como lo es medicina, nanotecnología, nanobiología, bioingeniería, entre otras más que se muestran en la figura 2; el manejo de sistemas en nano escala da a los materiales nuevas características como resultado de la superficie y los efectos de tamaño pequeño / cuántico [11, 15, 46].

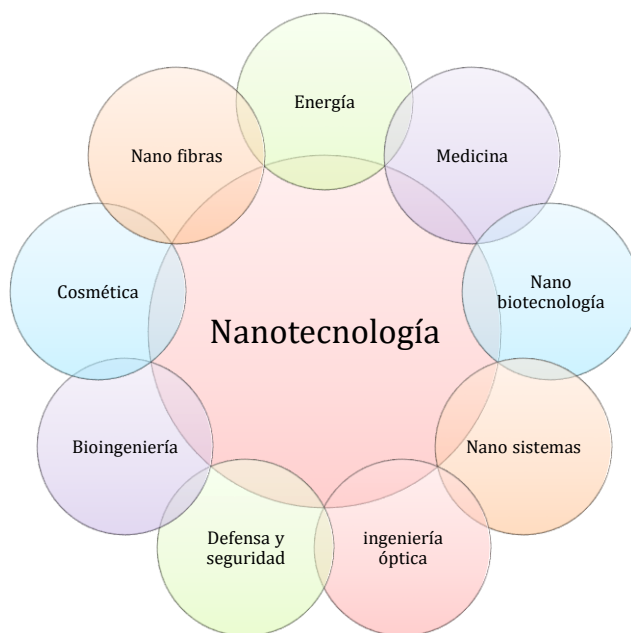


Fig. 2 Aplicaciones de la nanotecnología (Imagen traducida de Khan 2013)

Los nanomateriales se definen como materiales con cualquier dimensión externa en la nano escala, o que tienen una estructura interna o estructura superficial en la nano escala, aproximadamente de 1 a 100 nm [6, 47]. Debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, que incluyen un tamaño pequeño, una gran superficie específica y propiedades ópticas únicas, los nanomateriales se han utilizado en diferentes áreas: científicas, medicina, electrónica, producción de energías limpias, exploración espacial, biotecnología, medio ambiente, etc (Figura 2) [9, 40]. La producción de nanomateriales de origen polimérico se clasifica en dos grandes estrategias: construcción y deconstrucción, conocidas por los términos en inglés

“bottom-up” y “top-down”, respectivamente [48]. La estrategia de construcción se basa en agregar o acumular moléculas, hasta obtener estructuras en el intervalo de tamaño deseado (orden de los nanómetros). Por su parte, la estrategia de deconstrucción se basa en el fraccionamiento controlado de materiales más grandes con el objetivo de producir los nanomateriales [13].

2.2 Nanomedicina

La medicina es la ciencia, la ingeniería y la práctica de diagnosticar, tratar, curar, monitorear, predecir y prevenir enfermedades; siendo así que la nanomedicina es un campo interdisciplinario, donde la nanociencia, la nano ingeniería y la nanotecnología interactúan con esta ciencia [9, 49]. La nanomedicina tiene una amplia gama de aplicación al implicar el desarrollo y la aplicación de materiales y tecnologías con escalas de longitud nanométrica para funcionar, lo cual permite tener una amplia posibilidad de aplicación como se muestra en la figura 3, abarcando desde la toma de muestra hasta métodos de terapia dirigida [49, 50].

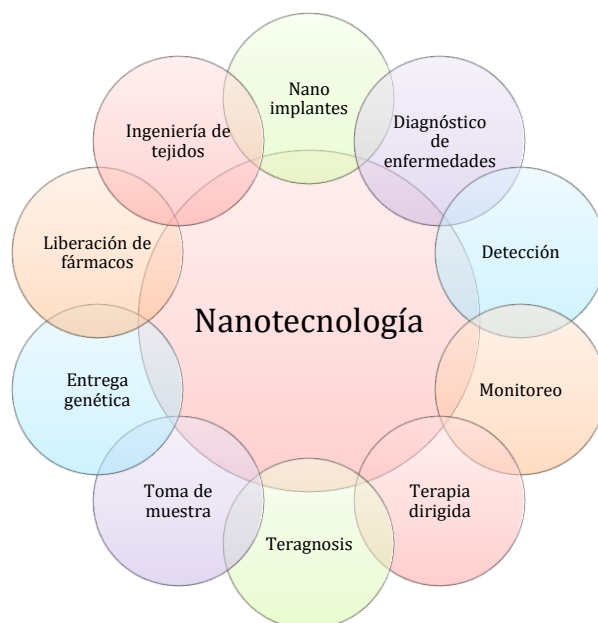


Fig. 3 Diagrama de aplicaciones de la nanotecnología en la medicina (Imagen traducida de Aceves 2022)

La aplicación de la nanomedicina tiene enormes perspectivas de mejorar el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades humanas [3, 8, 51]. Entre otras estrategias de nanotecnología, las nanopartículas son el componente clave que permite el desarrollo de la nanomedicina [50]. Los sistemas de administración basados en nanopartículas a pesar de ofrecer una administración selectiva de fármacos, mejorar la capacidad de focalización de los fármacos de transición y de lograr una alta eficacia del fármaco a través de una liberación lenta y sostenida; presenta la posibilidad de contar con propiedades toxicológicas, por lo que requieren la realización de más estudios para comprender y dilucidar las interacciones biológicas y los posibles mecanismos [9].

Las combinaciones sinérgicas de diferentes materiales nanoestructurados dan la posibilidad de desarrollar plataformas nanomédicas multifuncionales para el diagnóstico y la terapia simultáneos [51, 52]; además de abrir la puerta a la creación de nanomedicinas con nuevas entidades moleculares y agentes terapéuticos, logrando así un diagnóstico temprano o tratamiento de enfermedades de alta especificidad [49, 53–55]. La nanomedicina cubre tres áreas principales: nano diagnóstico, liberación de fármacos y medicina regenerativa [50, 56]. En general, el nano diagnóstico se considera como el diseño y desarrollo de sistemas analíticos y de imagen que permitan detectar enfermedades o funciones celulares anormales en etapas tempranas, tanto in vivo como in vitro [56, 57]; la administración de fármacos es la administración de los agentes quimioterapéuticos en la concentración más eficaz para mejorar el índice terapéutico y el perfil farmacocinético [25, 58]; mientras que la medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados utilizando herramientas de [50, 56, 59].

2.2.1 Sistemas dirigidos de liberación de fármacos

El estudio de nuevas formulaciones farmacéuticas ha buscado abandonar el uso de vías parenterales, buscando el uso de vías alternas como la vía de las mucosas, como las vías nasal, pulmonar, oral y vaginal, permitiendo así una interacción local con los tejidos objetivo o garantizado la aplicación del ingrediente farmacéutico activo [12, 25]. Las micropartículas y nanopartículas son los sistemas más prometedores para la administración de fármacos y antígenos [21, 50].

El uso de nanopartículas como portadores de fármacos, se ha implementado para el tratamiento de múltiples enfermedades y tiene varias ventajas que apoyan el uso de nanopartículas para la administración de fármacos, las cuales se citan a continuación:

1. Los materiales sintéticos a nano escala, que son componentes no humanos, suelen ser avirulentos y se pueden formar fácilmente en cápsulas y películas [8, 49, 60, 61].
2. Las nanopartículas pueden atravesar barreras fisiológicas debido a su pequeño diámetro y diseño suficiente que permiten su estabilidad en la circulación, esto para proteger macromoléculas, como péptidos, proteínas, oligonucleótidos y genes de la degradación en medios biológicos, y para administrar fármacos o macromoléculas a un sitio objetivo con la siguiente liberación controlada [8, 22].
3. Las nanopartículas y sus cargas de fármaco pueden co-encapsularse de forma estable con alta consistencia [16, 22].
4. Las nanopartículas pueden transportar anticuerpos o aptámeros diseñados basados en el objetivo, lo que les permite reconocer células específicas [9, 49, 62].

Las nanopartículas para el transporte de fármacos consisten en una variedad de materiales [63]. Se han utilizado ampliamente polímeros naturales y sintéticos (nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros), materiales inorgánicos como óxidos de oro, hierro y silicio (nanopartículas inorgánicas), lípidos (liposomas),

compuestos organometálicos (nanotubos) e incluso virus los cuales se muestran en la figura 4 [64, 65]. El material que compone las nanopartículas puede ser polímeros sintéticos o naturales, los cuales deben degradarse en moléculas sin toxicidad para los entornos biológicos para poder ser utilizados en humanos o animales [51, 66, 67]. Por esta razón de biocompatibilidad, se puede utilizar un número muy limitado de polímeros para preparar materiales biodegradables [7, 22]. Entre los materiales más utilizados son los polisacáridos, los cuales han recibido una atención cada vez mayor debido a sus excelentes propiedades físicas y biológicas, uno de los principales es el quitosano y sus derivados [12, 68, 69].

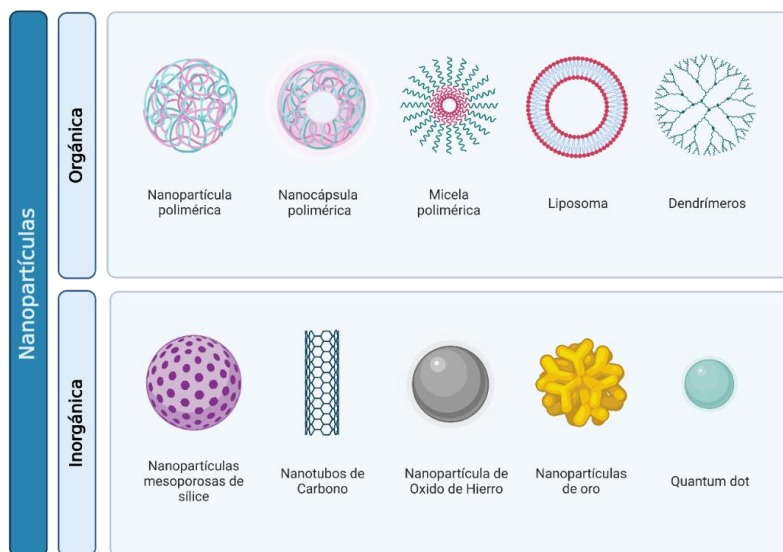


Fig. 4 Esquema que ilustra varios tipos de nanopartículas orgánicas e inorgánicas utilizadas para el desarrollo de sistemas de administración de vacunas y fármacos (Creado por Biorender)

Las propiedades fisicoquímicas no solo afectan los procesos de absorción y liberación, sino que también gobiernan la interacción de las partículas con diferentes compuestos biológicos (proteínas o membranas) del tejido donde se introducen [22, 47]. En consecuencia, el éxito en el desarrollo de las partículas poliméricas que actúan como vehículos de suministro está determinado por un conocimiento detallado de su naturaleza química y propiedades físicas que explicaría cómo interactúan con su entorno biológico [22, 62]. Se ha observado en tratamientos que el uso de nanopartículas en conjunto con productos naturales, ofrecen un índice terapéutico más alto debido a la liberación mejorada a los tejidos diana, lo que promueve la permeabilidad, la retención, los perfiles farmacocinéticos y la reducción de los efectos secundarios [23, 70, 71].

El diseño de portadores para la administración de fármacos controlados y dirigidos es de suma importancia para lograr así la liberación de fármacos de manera eficaz en los sitios que lo requieren, estos en conjunto con compuestos naturales han mostrado potencial para curar las infecciones al mejorar la inmunidad de los pacientes [71, 72]. Estos compuestos naturales debido a su origen son bastante ricos en bioproteínas, carbohidratos y también en componentes químicos

biológicamente activos que actúan ellos mismos como fármaco [25, 73, 74]. En general, para la liberación controlada de fármacos, las NP deben estar diseñadas para escapar de la eliminación inmunitaria, pero también deben poder adherirse a los tejidos diana y ser absorbidas o interactuar con el receptor deseado células in vivo [50]. Pueden acumularse en los tejidos de forma activa o pasiva, ya sea a través del transporte por presión intraorgánica o mediante la adhesión a estructuras biológicas específicas en el tejido diana mediante el reconocimiento de ligandos unidos a la superficie por moléculas [75].

2.2.1.1 Clasificación de nanomateriales

La clasificación de los nanomateriales puede presentarse de acuerdo al tipo de síntesis, la morfología o forma de los nanomateriales [46, 76]. Las principales características de la morfología incluyen planitud, esfericidad y relación de aspecto. Las morfologías de baja relación de aspecto generalmente tienen forma esférica, ovalada, cúbica, prisma, helicoidal o pilar; mientras que las morfologías de alta relación de aspecto alcanzan la forma de zigzag, hélices y cinturones [68, 77]. Según la dimensión, los nanomateriales se clasifican en 0 dimensiones (0D), unidimensionales (1D), bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D) [77–79]. Además, se clasifican según el tamaño: en términos de diámetro, las nanopartículas tienen un tamaño de entre 1 y 100 nm [77].

Según la composición, los nanomateriales se organizan en cuatro tipos principales:

- **Nanomateriales a base de carbono.** Estos nanomateriales están compuestos principalmente de carbono e incluyen estructuras como las mostradas en la figura 5, fullerenos (nanomateriales de carbono esféricos y elipsoidales), CNT (nanomateriales cilíndricos), nano diamante, grafito y grafeno [46, 68, 78]. El fullereno, posee una alta simetría, lo que le permite ser una molécula fuerte y capaz de recuperar su forma después de ser sometidas a alta presión (3000 presiones atmosféricas). Los CNT son versiones alargadas de las moléculas de fullereno, se pueden organizar en zigzag, sillón y quiral; además de contar con gran rigidez, resistencia, elasticidad, conductividad eléctrica y emisión de campo. Los nanodiamantes en forma de nanopartícula (4-10 nm) poseen una alta tasa de absorción, por lo que en productos para la piel permite una alta penetración en los tejidos. El grafeno, debido a el movimiento de sus electrones a una velocidad efectiva de la luz 300 veces menor que la velocidad de la luz en el vacío, permite observar efectos relativistas sin utilizar aceleradores de partículas [47, 79].

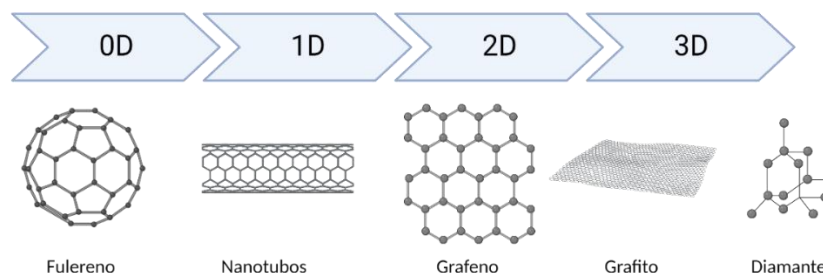


Fig. 5 Dimensiones de estructuras cristalinas de nanomateriales a base de carbón (Creado con BioRender.com)

- **Nanomateriales de base orgánica.** Los nanomateriales de base orgánica se componen principalmente de compuestos orgánicos, como lípidos, carbohidratos o sustancias poliméricas en rangos de 10 nm a 1 μm . El uso de estructuras poliméricas ha sido altamente utilizado, debido a su alta integridad estructural, estabilidad y liberación controlada; estos en forma de nanopartículas, dendrímeros, liposomas y micelas [47, 76, 78]. Se han fabricado utilizando polímeros sintéticos biodegradables, como copolímeros de polilactida-poliglicólido, poliácridatos, policaprolactonas, o polímeros naturales, como albúmina, gelatina, alginato, colágeno y quitosano [11].
- **Nanomateriales de base inorgánica.** Los nanomateriales de base inorgánica como los de metal, óxido metálico y cerámica exhiben propiedades ópticas y electrónicas diversas a medida que su tamaño se acerca a la nano escala. Presentan alto brillo, fotos estabilidad y capacidad multicolor, debido a esto son utilizados como agentes de contraste[5, 47].
- **Nanomateriales compuestos.** Un compuesto es una combinación de dos o más materiales diferentes que se mezclan en un esfuerzo por combinar las mejores propiedades de ambos. La idea es utilizar nanopartículas o nanoestructuras como bloques de construcción dentro de una matriz de alojamiento para crear nuevos materiales con gran flexibilidad y mejorar sus propiedades mecánicas, físicas, químicas o biológicas[47].

2.3 Nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas son partículas diminutas (menores de 100 nanómetros) con diversas estructuras utilizando una amplia gama de materiales, incluidos liposomas, quitosano, poli (ácido láctico-coglicólico) (PLGA), dextrano, sílice y metales como el óxido de hierro o el oro [80, 81]. Las nanopartículas se utilizan cada vez más en aplicaciones médicas debido a sus propiedades fisicoquímicas, incluida su composición química, tamaño, forma, estructura, morfología y propiedades superficiales [82]. Sus superficies son hidrófilas o hidrófobas y exhiben carga

superficial y ligandos específicos, que son factores de referencia para la selección de nanomateriales utilizados para el tratamiento de enfermedades clínicas[8].

Las nanopartículas se pueden sintetizar química o biológicamente, estas se han asociado muchos efectos adversos con los métodos de síntesis química debido a la presencia de algún químico tóxico absorbido en la superficie. Las alternativas ecológicas a los métodos químicos y físicos son las formas biológicas de síntesis de nanopartículas utilizando microorganismos, enzimas, hongos y plantas o extractos de plantas [3, 7, 82]. Los estudios han demostrado que las nanopartículas tienen un área de superficie activada más grande que otras formas físicas de materiales, lo que promueve la capacidad de carga del fármaco, una vida útil prolongada, una buena capacidad de penetración de los epitelios y la conveniencia de ser transportadas al cuerpo en comparación con las micropartículas. En los sistemas de liberación de fármacos, el tamaño y la distribución del tamaño de las partículas son los parámetros importantes que deben tenerse en cuenta, ya que de esto depende su velocidad de liberación y la cantidad de fármaco absorbida [10, 17]. Las nanopartículas se han explorado ampliamente para aplicaciones farmacéuticas, como portadores para la administración de fármacos, genes y vacunas. Además, se ha demostrado que nanopartículas de materiales como el quitosano tienen una actividad antitumoral eficaz y una actividad hipoquelosterolémica [10, 15, 82].

Las nanopartículas se agrupan en nanopartículas orgánicas e inorgánicas, en donde las nanopartículas de materiales orgánicos como nanotubos de carbono, lípidos y polímeros tienen aplicaciones versátiles [65, 77]. Las nanopartículas biopoliméricas tienen ventajas adicionales, como la disponibilidad de recursos marinos (quitina y quitosano) o agrícolas (celulosa, almidón, pectina), biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad [83, 84].

El quitosano cuya estructura se muestra en la figura 6, es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, es un polisacárido catiónico natural que consta de $-1 \rightarrow 4$ residuos de 2-amino-2-desoxi-glucopiranososa (GlcN) y 2-acetamido-2-desoxi-d-glucopiranososa (GlcNAc) enlazados, fabricados comercialmente a gran escala por desacetilación parcial alcalina de la quitina como se muestra en la figura 6; se origina en las conchas de los crustáceos. Debido a la naturaleza policatiónica única, el quitosano se ha propuesto para diversas aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y química [12, 14–17, 21, 22, 25, 44]. A diferencia de otros polímeros, el quitosano es un polímero hidrofílico con carga positiva que proviene de grupos básicos débiles, que le confieren características especiales desde el punto de vista tecnológico [17, 22, 85].

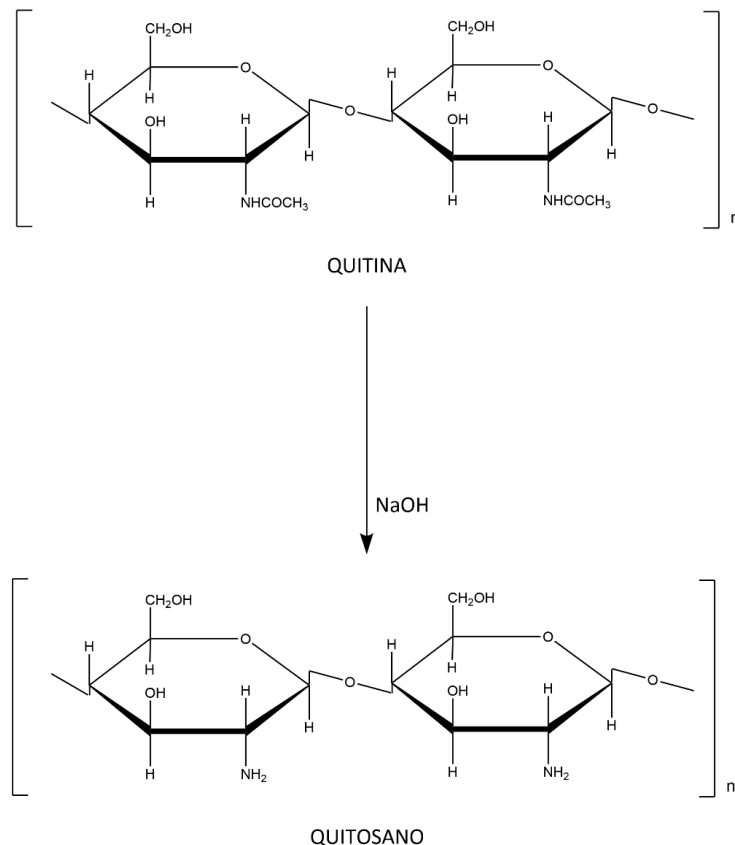


Fig. 6 Estructuras del quitosano y la quitina

El quitosano es un material útil debido a los grupos amino en su estructura que le confieren un carácter policationico, sin embargo, durante la protonación en soluciones ácidas tiene carga positiva y puede interactuar con moléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos amino en la estructura mejora la capacidad de adsorción del quitosano. Las propiedades de sorción y mucoadhesivas del quitosano lo convierten en un polímero preferible en un sistema de administración de fármacos [7, 14, 17, 85]. El quitosano tiene una alta capacidad de carga de fármaco y presenta como características principales baja toxicidad, buena biodegradabilidad, propiedades inmunoestimulantes y altas propiedades mucoadhesivas; debido a esto es considerado como uno de los mejores sistemas de administración de fármacos utilizado como excipiente en diferentes formulaciones, como tabletas, matriz, micro y nanopartículas [14, 16, 17, 22, 23, 44].

Las nanopartículas de quitosano, las cuales se muestran en la figura 7A, generalmente se preparan mediante métodos de gelificación iontrópica, autoensamblaje o microemulsión. El método de microemulsión se utiliza para la producción de nanopartículas con un tamaño estrecho empleando grandes cantidades de disolvente orgánico, el autoensamblaje es un método simple de modificación mediante la introducción de nuevos grupos químicos mientras que la gelificación iontrópica ofrece un método sin la introducción de grupos químicos en las moléculas de quitosano ni uso de solventes orgánicos, dando como resultado una nanopartícula estructurada como la mostrada en la figura 7B [12, 15].

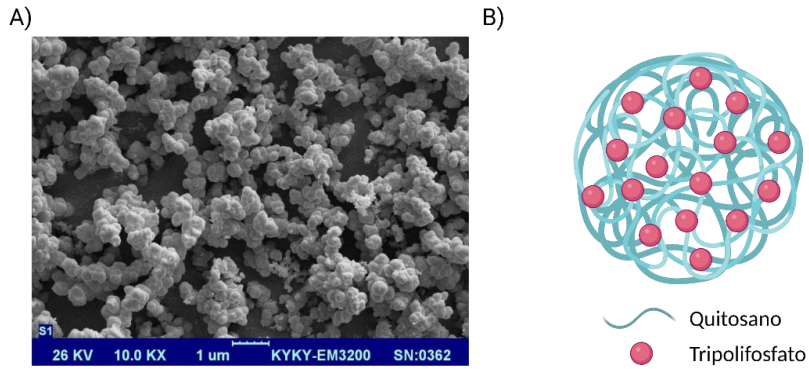


Fig. 7 Nanopartículas de quitosano (A) Imagen por microscopia electrónica de barrido (SEM) y (B) Esquema general (Imagen de Rostami 2013 modificada en BioRender.com)

2.3.1 Síntesis de nanopartículas poliméricas

Se han empleado muchos métodos para la síntesis de nanopartículas, los cuales son:

- **GELIFICACIÓN IONOTRÓPICA.** En este método se realizan dos soluciones, una solución ácida acuosa para obtener el catión de quitosano y una de tripolifosfato aniónica, como se observa en la figura 8, la solución de TPP es agregada gota a gota en agitación constante. Como resultado el quitosano sufre una gelificación iónica debido al complejo entre el polianión tripolifosfato y el quitosano por fuerzas electrostáticas, formando partículas esféricas [10, 19, 84, 86, 87].

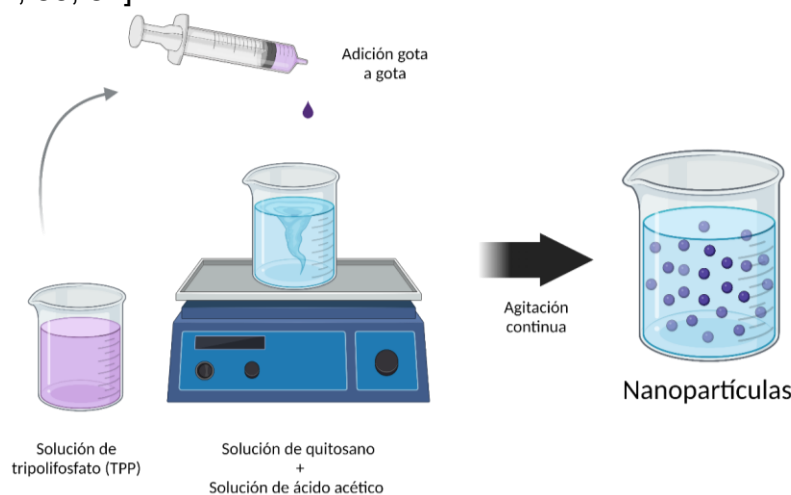


Fig. 8 Esquema general de la preparación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica (creado en BioRender.com)

- **EMULSIÓN POR RETICULACIÓN.** En este método como se muestra en la figura 9, se emulsiona una solución acuosa de quitosano en la fase oleosa para preparar una emulsión de agua en aceite (W/O), estabilizando las gotas acuosas con un tensioactivo a alta velocidad. La emulsión estable se retícula

con glutaraldehído, enzimas o temperatura, para posteriormente precipitar las partículas [19, 20, 84, 86].

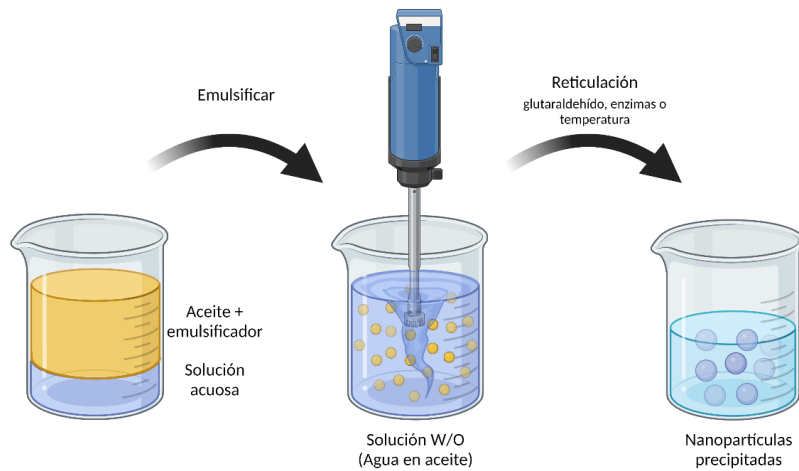


Fig. 9 Esquema general de la preparación de nanopartículas de quitosano por Emulsión por reticulación (creado en BioRender.com)

- SECADO POR ASPERSIÓN. Este método es realizado con un secador de nanopulverización el cual se muestra en la imagen 10A. El método depende del secado de gotitas atomizadas en una corriente de aire caliente como se muestra en la figura 10B. Se prepara una solución de quitosano en una solución de ácido acético, almacenando por al menos 12 h [19].

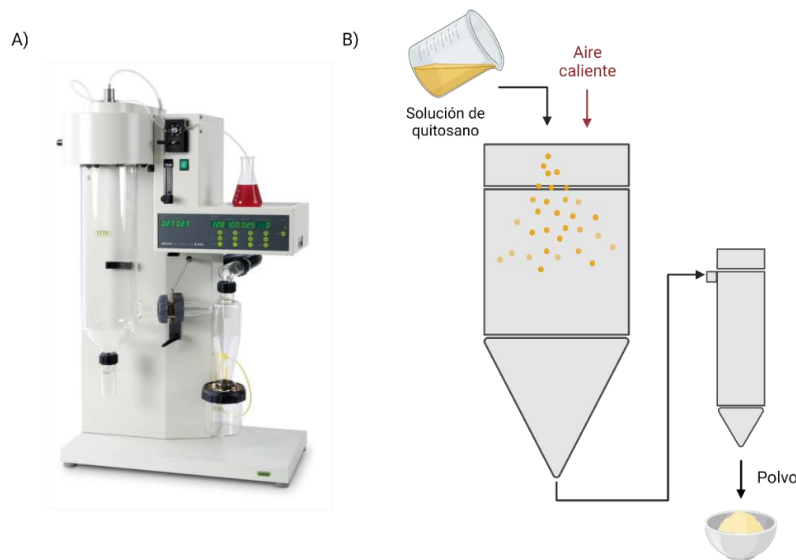


Fig. 10 Imagen de A) nanopulverizador y B) esquema general proceso de secado por aspersión (creado en BioRender.com)

- COALESCENCIA DE GOTAS DE EMULSIÓN. Para este método se utilizan dos emulsiones estables como se muestra en la figura 11, una solución acuosa de quitosano junto con el fármaco en aceite de parafina líquido; y otra con quitosano en solución acuosa de NaOH en aceite de parafina líquido.

Como se puede ver en la imagen, se mezclan las dos soluciones bajo agitación a alta velocidad, dando como resultado la fusión de ambas soluciones y precipitando para formar partículas de tamaño pequeño [10, 19, 20, 86].

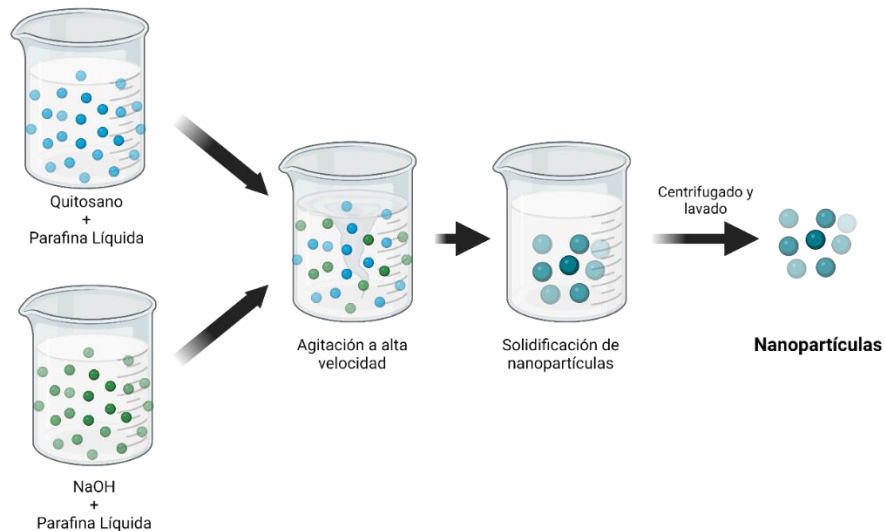


Fig. 11 Esquema general de la preparación de nanopartículas de quitosano por coalescencia de gotas por emulsión (creado en BioRender.com)

- **NANOPRECIPITACIÓN.** En este método, se disuelve quitosano para formar la fase de difusión, posteriormente agregar a la fase de dispersión (metanol) en condiciones de agitación magnética, el cual será posteriormente evaporado. La solución inicial se agrega con una aguja colocada dos centímetros por encima de la superficie a 0.86 mL min^{-1} usando una bomba de jeringa como se muestra en la figura 12 [19, 79].

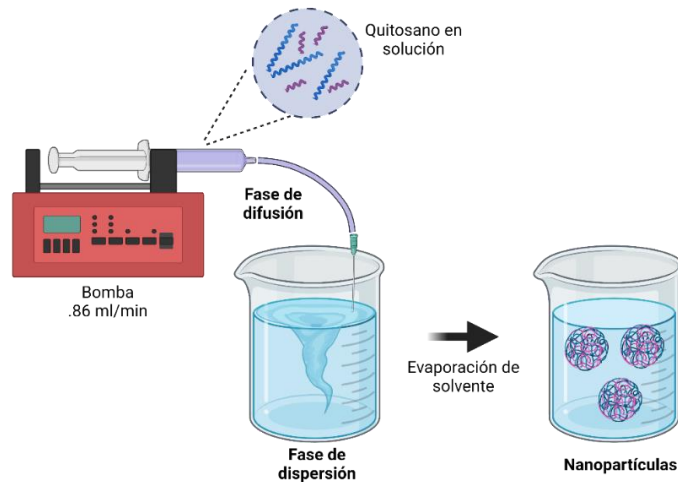


Fig. 12 Esquema general de la preparación de nanopartículas de quitosano por nanoprecipitación (creado en BioRender.com)

- **MICELIZACIÓN INVERSA.** En este método, como se puede ver en la figura 13, se prepara una emulsión agua en aceite (W / O) utilizando un tensioactivo lipófilo que se disuelve en un disolvente orgánico (e.j. n-hexano). Después de eso, se añaden una solución acuosa de quitosano, fármaco y glutaraldehído a la fase orgánica con agitación continua [10, 19, 84].

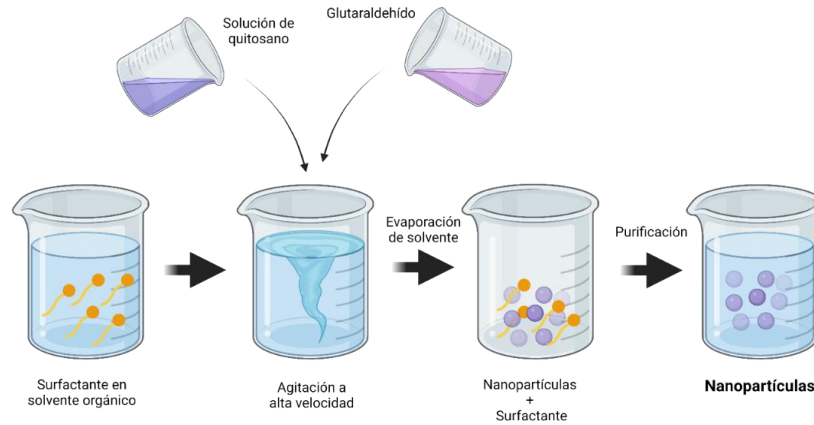


Fig. 13 Esquema general de la preparación de nanopartículas por micelización inversa (creado en BioRender.com)

- **DESOLVATACIÓN / COACERVACIÓN SIMPLE / SEPARACIÓN DE FASES.** En este método que se representa en la figura 14, se prepara una solución de quitosano utilizando un disolvente a fin, para posteriormente añadir un agente competidor del solvente de mayor hidrofiliicidad (ej. sulfato de sodio). Cuando la sal entra en contacto con el ambiente acuoso de la solución, se produce una eliminación progresiva del agua, llevando a la insolubilización del polímero y, como se puede apreciar en la imagen, como resultado se lleva a cabo la precipitación de las partículas [10, 19].

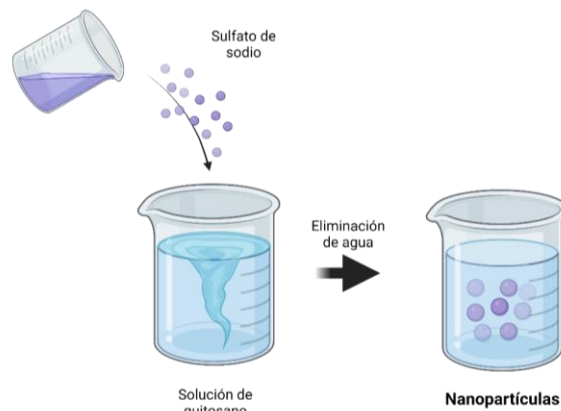


Fig. 14 Esquema general de la preparación de nanopartículas por desolvatación (creado en BioRender.com)

- **GELIFICACIÓN IÓNICA MODIFICADA CON POLIMERIZACIÓN POR RADICALES.** En este método representado en el esquema de la figura 15, en agitación constante se añade una solución acuosa de monómero de ácido

acrílico a una solución acuosa de quitosano. La gelificación iónica se produce debido a la interacción iónica entre el catión del quitosano y el anión del monómero de ácido acrílico, la polimerización radical de este último se inicia con persulfato de potasio. Posteriormente se realiza un proceso de diálisis para eliminar monómeros sin reaccionar[19]

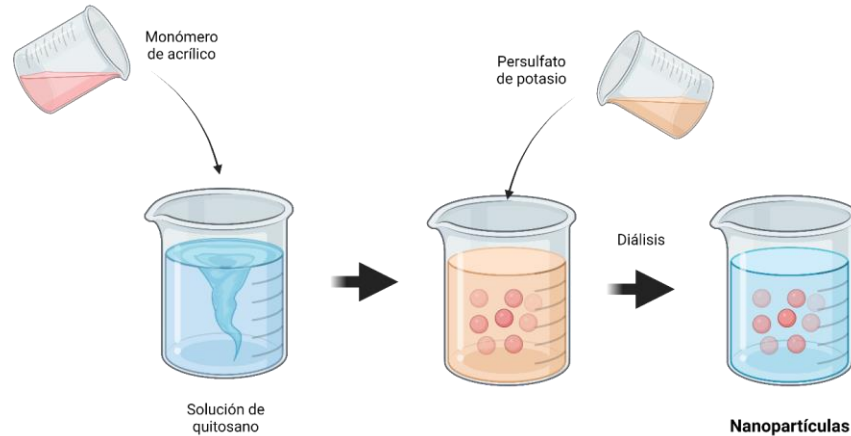


Fig. 15 Esquema general de la preparación de nanopartículas por gelificación iónica modificada con polimerización por radicales (creado en BioRender.com)

- **DIFUSIÓN DE DISOLVENTES EN EMULSIÓN.** En este método, una fase orgánica (ej. acetona) con el fármaco hidrófobo, se añade a una solución acuosa con quitosano y un estabilizador (ej. lecitina) para preparar una emulsión aceite en agua (O / W). Como se puede ver en la imagen 16, la emulsión resultante se somete a homogeneización a alta presión. Las nanopartículas se forman por precipitación del polímero[19, 20].

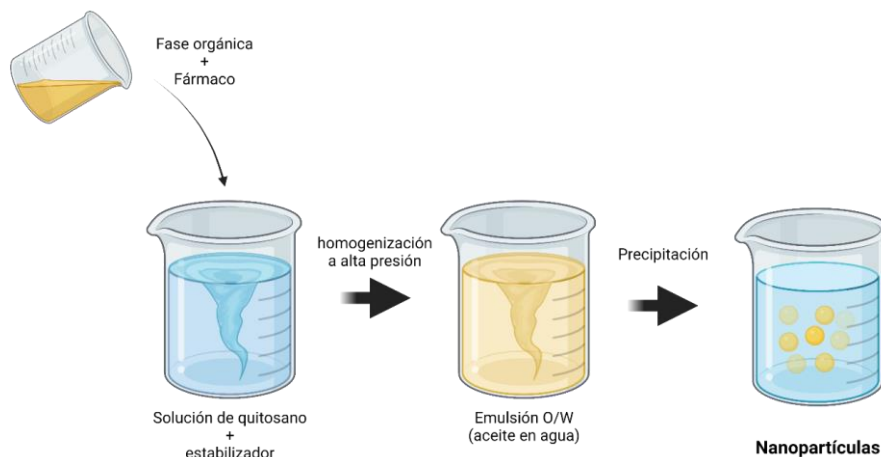


Fig. 16 Esquema general de la preparación de nanopartículas por difusión de disolventes en emulsión (creado en BioRender.com)

Muchos de los métodos mencionados anteriormente a menudo conducen a la degradación de fármacos macromoleculares o son difíciles de escalar, resultando

en mayores costos de producción [20]. Debido a esto, uno de los métodos más utilizados es el de gelificación ionotrópica, por lo simple de su ejecución, el uso de equipos de bajo costo y la poca necesidad de uso de solventes orgánicos [84].

2.3.1.1 Gelificación ionotrópica

La formación de partículas mediante gelificación iónica es un proceso considerado como simple y suave, ya que evita el uso de disolventes orgánicos y altas temperaturas, lo que permite la encapsulación exitosa de moléculas frágiles, como proteínas [12, 20, 87]. El proceso de gelificación iónica es una técnica simple y fue informado por primera vez por Calvo et al. [18] y se encuentra representada en la figura 16, este proceso de basa en la formación de micro o nanopartículas mediante interacciones electrostáticas entre las cadenas de quitosano cargadas positivamente y los polianiones empleados como reticulantes. Bodmeier, Oh y Prammar[88], informaron que se pueden obtener partículas pequeñas goteando una solución de quitosano por goteo con ayuda de una jeringa sobre una solución de tripolifosfato (TPP), siendo este el polianión más utilizado debido a su baja toxicidad y costo; esta técnica posteriormente fue replanteada por Calvo et al. (1997) añadiendo la solución de TPP gota a gota a la solución de quitosano bajo agitación magnética vigorosa como se puede observar en la imagen 17 [12, 14, 16, 17, 22, 44]. Después de agregar la solución TPP, las nanopartículas se forman inmediatamente a través de enlaces inter e intramoleculares creados entre los fosfatos TPP y los grupos amino CTS. Generalmente, en este método, las nanopartículas se preparan mediante la adición de una solución de TPP (pH 7-9) en una solución ácida (pH 4-6) de quitosano. El tamaño de partícula y el potencial zeta de la superficie pueden manipularse mediante la variación del desarrollo condiciones tales como relación CTS: TPP, concentración de CTS y solución de pH [16, 89].

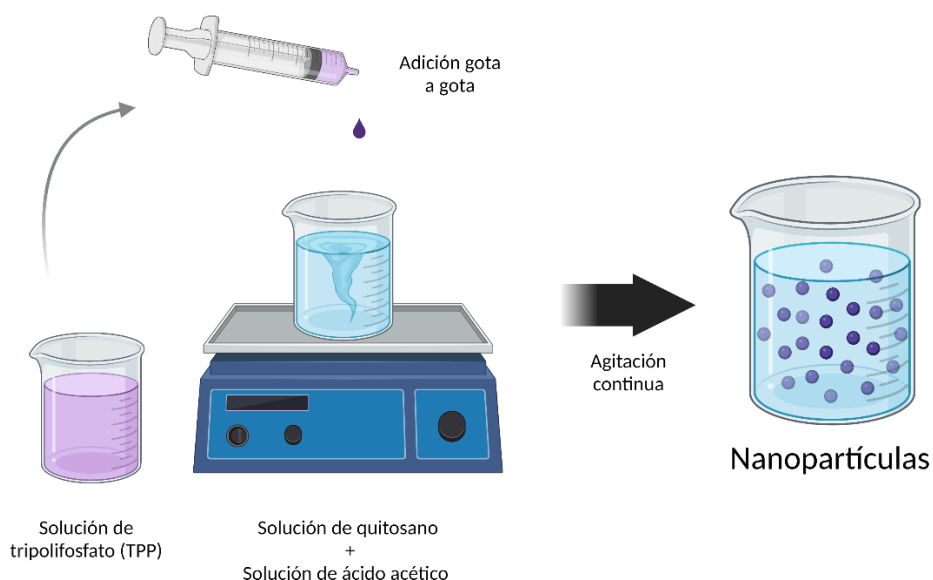


Fig. 17 Procedimiento de producción de nanopartículas por gelificación inotrópica (Creado por BioRender.com)

El método de gelificación iónica se ha examinado a fondo con el fin de obtener partículas reproducibles y de tamaño nanométrico con una distribución de tamaño estrecha, así como una carga superficial altamente positiva [10, 83]. Para este método, el tamaño de las nanopartículas se ve afectado por la concentración y el peso molecular del quitosano, en este tipo de sistemas se procura que la concentración de nanopartículas sea en un nivel bajo para evitar la agregación / fusión de partículas inmediatamente después de la preparación o por una estabilidad física / química limitada cuando las suspensiones de nanopartículas se almacenan durante un período de tiempo prolongado [12, 14, 15, 72, 90].

La producción de nanopartículas de tamaño estrecho no es sencilla y puede producirse una aglomeración de partículas incluso en el proceso de liofilización, sin embargo, es posible preparar partículas de distribución de tamaño estrecho y estables utilizando sales monovalentes durante la preparación como lo es el cloruro de sodio (NaCl)[17]. Además, se han investigado los efectos de la concentración de ácido acético, la temperatura de gelificación, pH, concentraciones, proporciones de componentes y diferentes métodos de mezcla, esto debido a sus posibles aplicaciones[21]. Las nanopartículas de quitosano se han utilizado como un sistema de administración de compuestos bioactivos como medicamentos, proteínas, flavonoides, aceites esenciales y genes; esto debido a su biodegradabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad bioactivos[44].

2.3.1.2 Métodos de caracterización de nanopartículas

Para mejorar la comprensión de cada mecanismo de formación de nanopartículas y los cambios en las propiedades biológicas que genera, es muy importante la caracterización de las nanopartículas [47, 77, 82]. Los estudios que se realizan para llevar a cabo una caracterización se dividen para la evaluación de tamaño, de superficie o de carga, sin embargo; implican el manejo de múltiples técnicas como lo es la microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), Dispersión de luz dinámica (DLS), Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y microscopio electrónico de barrido (SEM)[47, 82, 83].

Varios estudios han determinado que las partículas de menor tamaño son mejores para transfectar células al poseer una mejor penetración que las contrapartes más grandes e incluso son capaces de cruzar capilares y sinusoides tisulares [47, 82]. Los experimentos relacionados con la determinación del tamaño de las nanopartículas a menudo son complicados debido a la polidispersión de las muestras, por lo que el uso de técnicas múltiples es necesario, utilizando AFM o TEM, combinada con DLS [68]. La utilización de dos métodos diferentes puede dar como resultado discrepancias en la determinación del tamaño de las nanopartículas [47, 82]. Las técnicas de caracterización de nanopartículas se muestran a continuación:

- **MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM):** La preparación de muestras para su análisis por microscopio de fuerza atómica (figura 18A) se lleva a

cabo mediante secado de muestras en un portaobjetos o rejilla. Su funcionamiento es a través de una punta atómicamente afilada como la mostrada en la figura 18B, la cual escanea una superficie con un mecanismo que permite mantener la punta con una fuerza constante (Cantilever) o altura sobre la superficie de la muestra. Se utiliza para determinar características de la superficie obteniendo imágenes como la mostrada en la figura 18C; sin embargo, solo permite el análisis de un número limitado de partículas y brinda información cualitativa [2, 48, 49, 68, 81–83, 87].

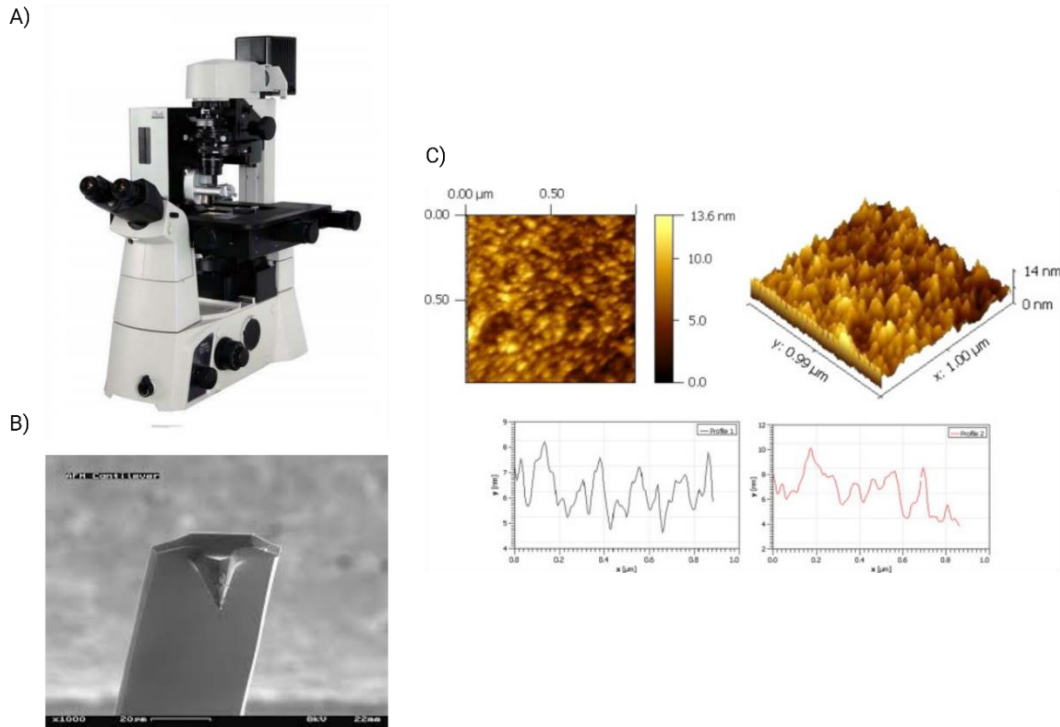


Fig. 18 Microscopio de fuerza atómica (AFM), A) Microscopio Nx-Bio-Biometa, B) Cantilever y C) resultados de superficie de recubrimiento de oro.

- **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).** La preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (Fig 19A) se lleva a cabo mediante secado de muestras en una rejilla como la mostrada en la figura 19B. Su función es a través de un haz de electrones de alta energía irradia una muestra y la imagen resultante se puede ver en una pantalla de manera fluorescente como la imagen de la figura 19C. Su principal uso es para la determinación de tamaño y morfología de superficie permitiendo la vista de número limitado de partículas y brindando información cualitativa[2, 17, 23, 48, 81, 82, 86, 87].

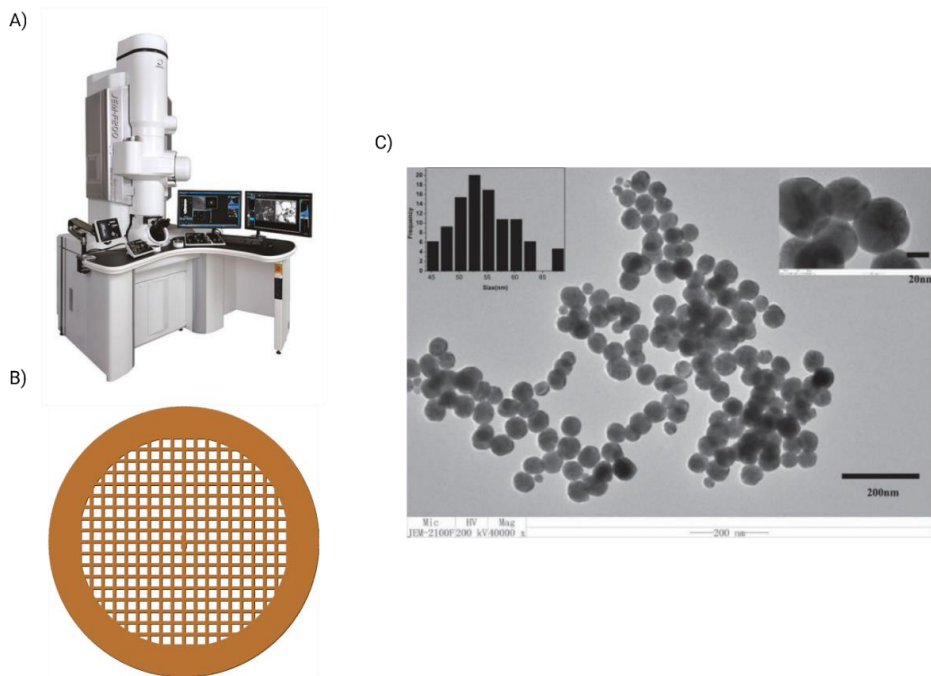


Fig. 19 Microscopio electrónico de transmisión (TEM), A) Microscopio JEM-F200 JEOL, B) Rejilla malla 200 para muestras e C) imágenes de nanopartículas de oro analizadas por TEM (C).

- **DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS).** Analiza una suspensión de nanopartículas en agua o tampón. Este proceso se realiza al colocar una solución de muestra que contiene las partículas en el camino de un haz de luz monocromático en un equipo especializado como el mostrado en la figura 20A, el cual determina las fluctuaciones temporales de la luz dispersa debido al movimiento browniano de las partículas. Este método permite el análisis de miles de partículas brindando información cuantitativa que es expresada en un reporte final como el mostrado en la figura 20B [17, 20, 21, 25, 44, 67, 82, 83, 87].

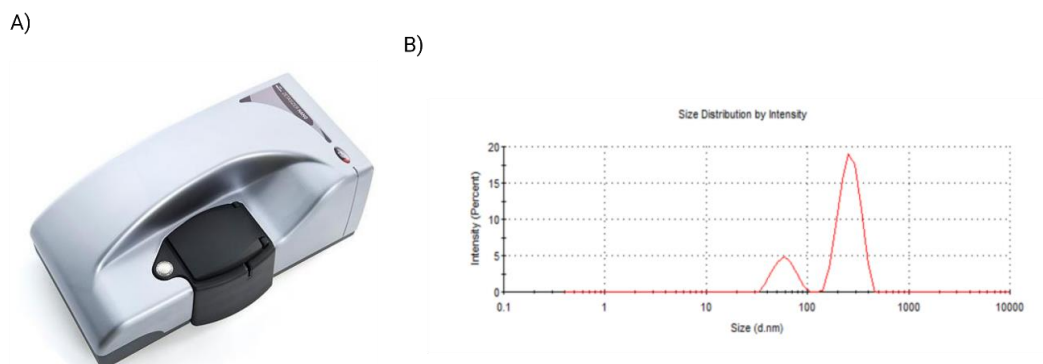


Fig. 20 Dispersión de luz dinámica (DLS), A) Equipo Zetasizer nano Z590 y B) análisis de partículas de celulosa nano cristalina.

- ANÁLISIS DE SEGUIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA). Se utiliza un equipo especializado como el Nanosight mostrado en la figura 21A, este equipo analiza una suspensión de nanopartículas en agua o tampón, permitiendo la captura videos de nanopartículas que se mueven bajo el movimiento browniano cuando se iluminan con luz láser en un medio líquido (figura 21B). Este método permite rastrear partículas individuales y obtener una mayor percepción de número y distancia de partículas mediante el análisis de un informe final con gráficos como el mostrado en la figura 21B [14, 21, 40, 82, 83].

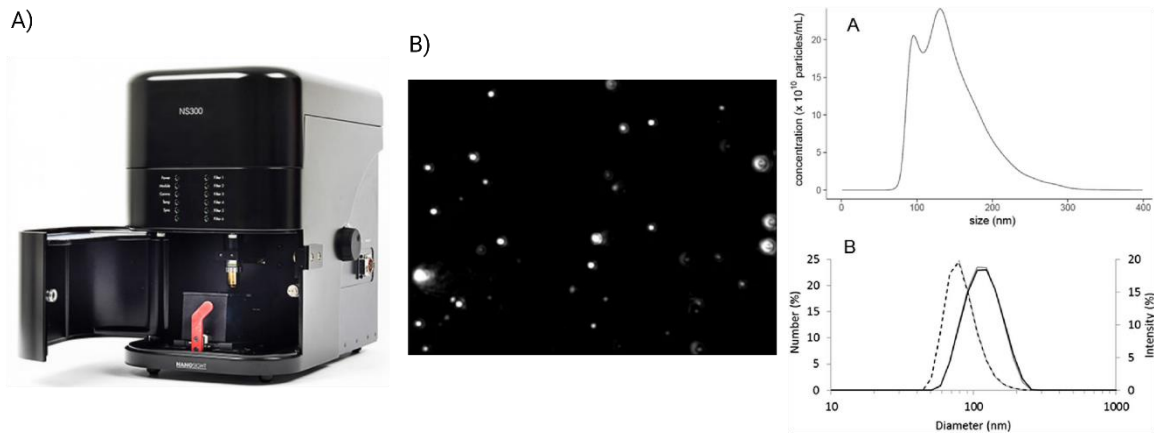


Fig. 21 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), A) Equipo Nanosight Range NS300 y B) Captura de video de nanopartículas con análisis de resultados.

- MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM). Para el análisis, se utiliza un equipo especializado con el mismo nombre mostrado en la figura 22A, las muestras deben pasar por un secado y recubrimiento fino de oro o platino en stups, los cuales tienen diferentes formas de acuerdo a su aplicación (figura 22B). Para el análisis se hace incidir un haz de electrones de alta energía, el cual permite escanear la superficie de la muestra brindando una Imagen directa de la superficie de la nanopartícula e información de tamaño como la mostrada en la figura 22C [48, 81, 82] .

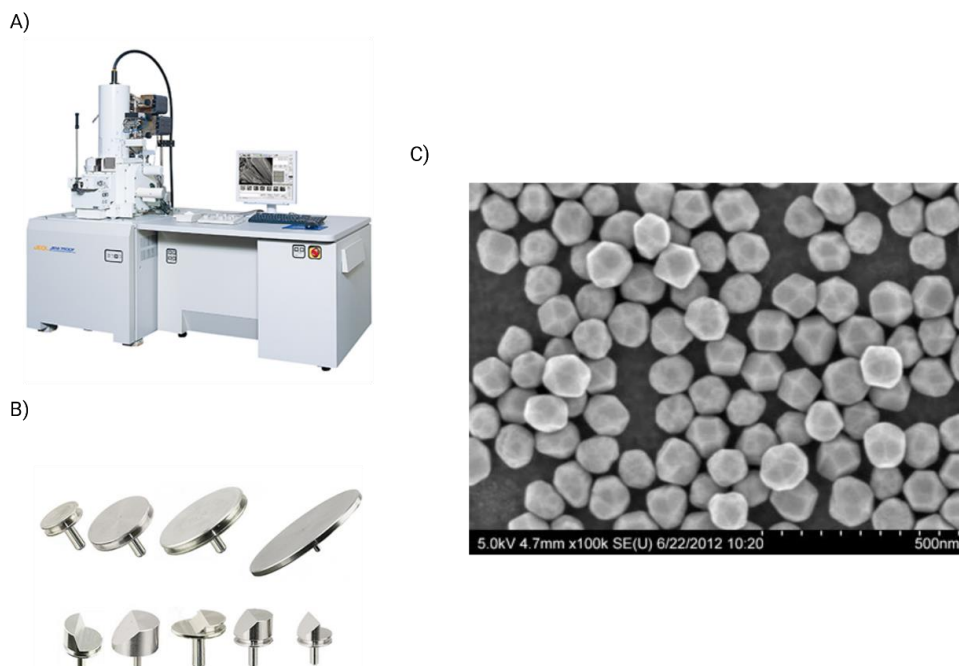


Fig. 22 Microscopio electrónico de barrido (SEM), A) Microscopio JSM-7500F JEOL, B) Stubs para muestras e C) imágenes de un estándar de nanopartículas de oro analizadas por SEM.

La interacción de las nanopartículas depende de la forma y morfología de la superficie de las nanopartículas. La morfología de la superficie puede ser analizada utilizando TEM, AFM y SEM; las principales estructuras resultantes son de forma esférica, globular, toroide y en forma de varillas [68, 82, 83]. La carga superficial de las nanopartículas se informa como potencial zeta y se refiere al potencial que existe en el límite hidrodinámico de una solución que contiene iones y está rodeada por una doble capa eléctrica de iones y contraiones. Si las partículas en suspensión tienen altos valores de potencial zeta negativos o positivos, entonces tienden a repelerse entre sí y no hay tendencia a la agregación [82].

La técnica DLS es una técnica considerada como sencilla, por la facilidad de preparación de muestras, no ser invasiva y por no requerir ninguna calibración inicial; esta técnica es utilizada para la determinación de tamaño y carga superficial de las nanopartículas [67]. El DLS, también es conocido como dispersión de luz cuasi elástica (QELS) o espectroscopia de correlación de fotones (PCS), y en este método una solución de muestra que contiene las partículas se coloca en el camino de un haz de luz monocromático y se determinan las fluctuaciones temporales de la luz dispersa debido al movimiento browniano de las partículas [45, 82].

Las propiedades de las nanopartículas están muy influenciadas por el entorno circundante, por lo que existen problemas comunes que influyen en los resultados, como lo son: el uso de solventes que dispersan la luz o aumentan la viscosidad de la muestra, uso de muestras no homogéneas o que precipiten rápidamente, uso de muestras muy concentradas o diluidas, muestras fluorescentes, uso de cubetas de

plástico para disolventes orgánicos y utilizar el equipo si esperar la estabilización del láser [67].

2.4 Jengibre

Z. officinale es una planta herbácea perenne que crece hasta una altura de aproximadamente 1 m, como se muestra en la figura 23(1A). Las hojas se desarrollan a partir del rizoma ramificado y las flores, que se asemejan a las orquídeas, pasan desapercibidas y se presentan en una espiga densa, que consta de varias escamas superpuestas en un tallo alargado. Cada flor tiene tres pétalos de color naranja amarillento con una estructura adicional de color púrpura, similar a un labio, dicha estructura se muestra en la figura 23(1B) [26]. El jengibre posee un característico aroma perfumado, refrescante con un toque de limón y un color amarillo característico como el observado en la figura 23(2). Su sabor es especiado, picante y penetrante, con un toque ligeramente dulzón [7, 91]. Desde el punto de vista de composición, se sabe que el contenido de carbohidratos en el jengibre es tan alto como el 68% de su composición total y contiene 22,2% de amilosa, que es un polisacárido [25].

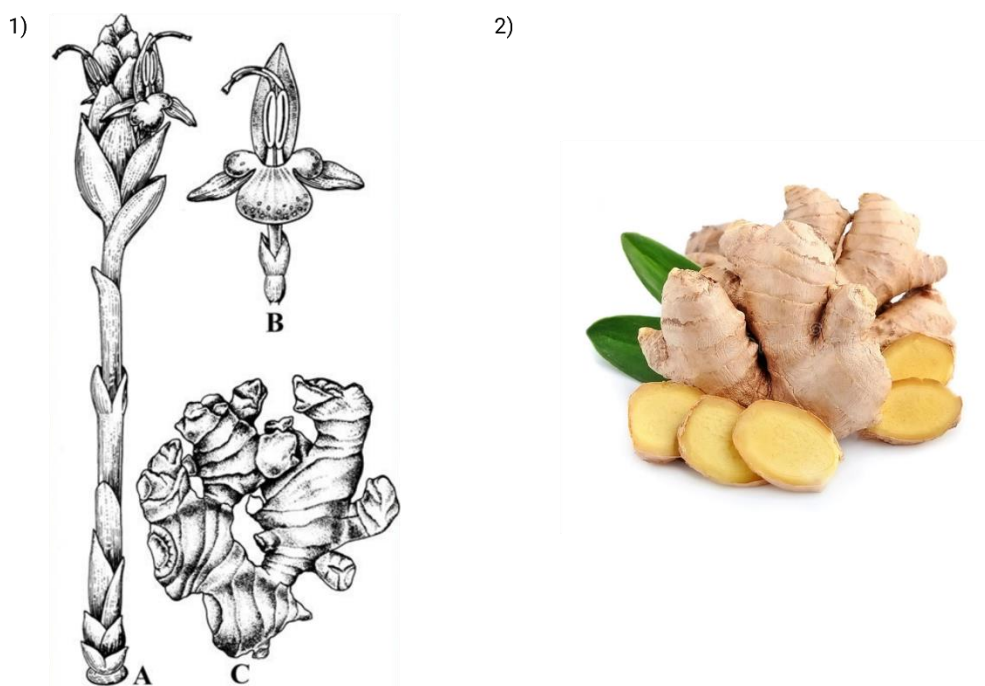


Fig. 23 Imagen de Jengibre (*Zingiber officinale*), 1) estructura anatómica de *Zingiber officinale* Forma de crecimiento (A); Flor (B); Raiz (C) y 2) presentación comercial.

El jengibre posee propiedades especiadas y medicinales, este ha sido utilizado como medicina desde el período védico, conocido como "maha aushadh", que significa la gran medicina [7, 92]. Pertenece a la familia Zingiberaceae, cuyo nombre

científico es *Zingiber Officinale Roscoe*. Los nombres, Zingiber y Jengibre, provienen del hindú zingibil [29]. La importancia del jengibre se ha incrementado recientemente debido a su baja toxicidad y su amplio espectro de aplicaciones biológicas y farmacológicas, a saber. actividades antitumorales, antioxidantes, antiinflamatorias, antiapoptóticas, citotóxicas, antiproliferativas y antiplaquetarias [7, 23, 27, 92].

El nombre del jengibre procede del sánscrito shringavera, que quiere decir “con forma de cornamenta”. De allí se derivaron el griego ziggiberis, el latín zingiber y el inglés ginger. Se ha cultivado durante miles de años con fines medicinales y como especia, es procedente de Asia Central y el Sudeste Asiático, posteriormente se extendió a las islas de las especias y Africa occidental. *Z. officinale* se ha naturalizado en muchos países y ahora tiene una amplia distribución en las partes tropicales y subtropicales del mundo. En México se le conoce como castilanchile (náhuatl), caxta lam'pin, tonahuiz camu (totonaco) y ixthi, nixtí (otomí) [26, 31, 91].

Según las estadísticas de 2019 de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la producción mundial de jengibre fue de 4,686,497 toneladas, teniendo India el 33% (703.000 toneladas) de la producción mundial, seguida de Nigeria (14.74%; 691,239 toneladas) y China (12.91%; 605,123 toneladas) siendo México quien posee el número 22 (.08%; 3,860 toneladas).

El rizoma se utiliza con frecuencia como condimento para diversos alimentos y bebidas, este se utiliza fresco, seco o como extracto, de acuerdo con la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos clasificó al jengibre como un aditivo alimentario. El uso de rizomas del jengibre es muy común en cocinas china, coreana, japonesa, vietnamita y de muchas cocinas del sur de Asia y África para condimentar platos, como mariscos, carne, y platos vegetarianos. El olor y sabor característicos del jengibre es causado por una mezcla de zingerona, shogaoles y gingeroles, aceites volátiles que componen del 1 al 3% del peso del jengibre fresco [24, 26].

El rizoma de *Zingiber officinale* se ha utilizado desde la antigüedad en la medicina ayurvédica y tradicional china para tratar una amplia gama de dolencias que incluyen resfriado común, fiebre, dolor de garganta, dolor, reumatismo, bronquitis, como carminativo y estimulante del apetito, antipirético, para problemas digestivos, trastornos gastrointestinales, náuseas y vómitos asociados con el mareo por movimiento y el embarazo, y espasmo abdominal. La planta también se ha utilizado para tratar dolores de estómago, diarrea, dolor de muelas, gingivitis, bronquitis, hipertensión, demencia, helmintiasis, estreñimiento y trastornos respiratorios asmáticos [26, 31]. Según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (Food and Drug Administration: FDA), su uso es seguro durante el embarazo, sin embargo, no hay datos suficientes que avalen su

seguridad en el periodo de lactancia. Por otro lado, no está recomendado su consumo en niños menores de 6 años y pacientes con hipersensibilidad a cualquiera de los principios activos [31].

El jengibre contiene varios compuestos y cuyas estructuras se muestran en la figura 24, entre los cuales una mezcla de zingerona, shogaoles, gingeroles y aceites volátiles son los responsables de su olor y sabor característicos, de los cuales los gingeroles y shogaoles forman los principales grupos bioactivos que constituyen el 23-25% y el 18-25%, respectivamente [24, 93]. Otros constituyentes incluyen capsaicina, gingediol, galanolactona, ácido gingesulfónico, galactosilgliceroles, glicolípidos de jengibre, diarilheptanoides, neral, monoacildi-vitaminas y fitoesteroles. El jengibre contiene hasta un 3% de un aceite esencial fragante cuyos componentes principales son sesquiterpenoides, con zingibereno (3) como componente principal. Otros constituyentes importantes presentes en el aceite volátil son los mono y sesquiterpenos, canfeno, β -sesquifellandreno (4), β -bisaboleno (6), α -farneseno (8), curcumeno, cineol (9), citral (10), terpineol. (14), terpenos, borneol (15), β -elemeno (16), zingiberenol (17), limoneno (18), geraniol (19), zingiberol, linalol (20). Los compuestos derivados de fenilpropanoides no volátiles, en particular gingeroles, shogaoles (5), paradol (12) y zingerona (1) son responsables del sabor picante del jengibre. El compuesto 5 se produce a partir de gingeroles (2) durante los procesos de secado o cocción. Estos compuestos son responsables de la sensación cálida y picante en la boca y también se informa que explican muchos de los efectos farmacológicos de la planta. El felandreno monoterpeneo (7) así como el curcumeno (13) también se han reportado en el jengibre [26, 29, 93, 94].

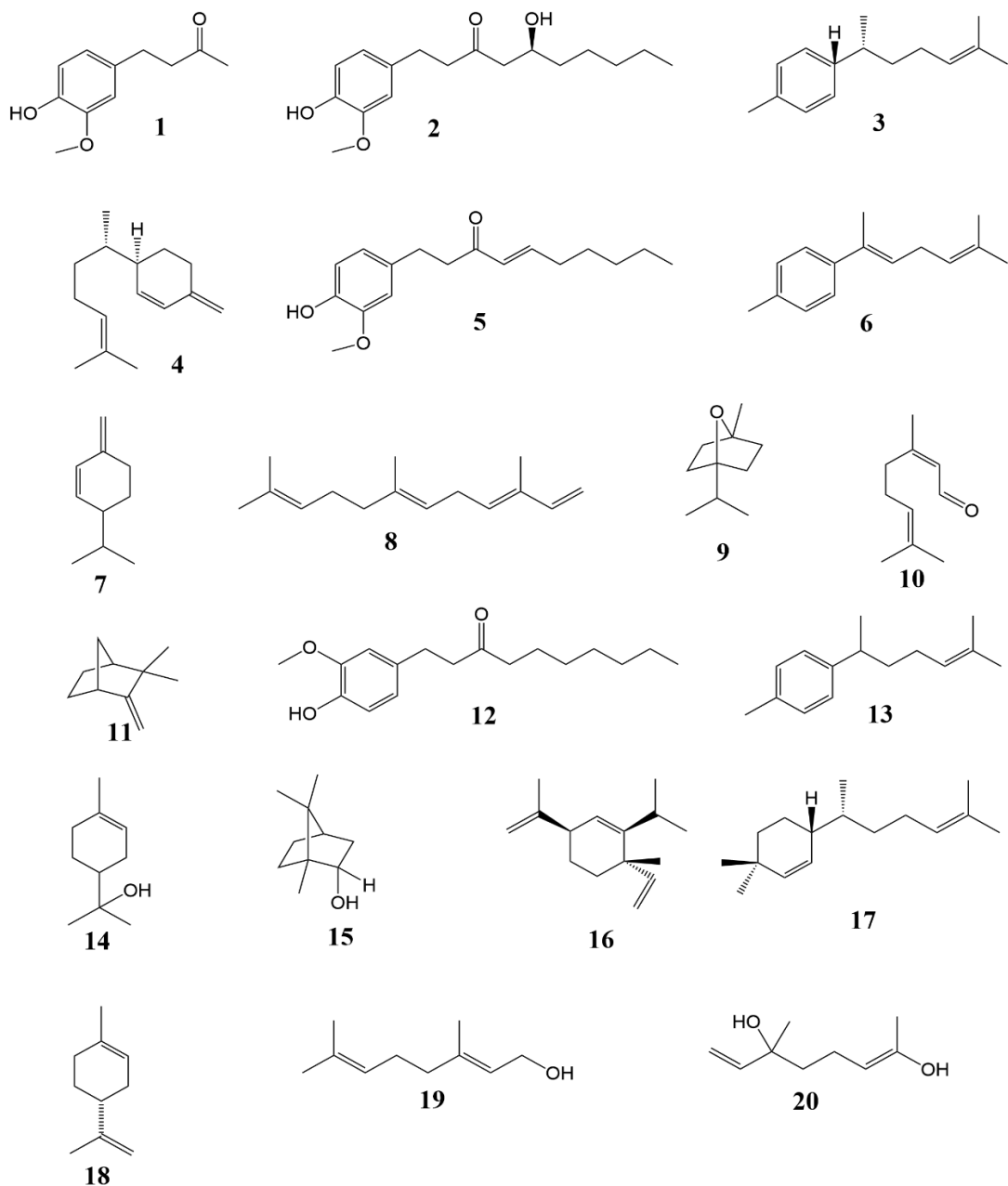


Fig. 24 Estructuras químicas de los compuestos del jengibre. Zingerona (1); gingerol (2); zingiberona (3); β -sesquifelandreno (4); shogaol (5); bisaboleno (forma α ; 6); β -felandreno (7); farneseno (8); 1,2-cineol (9); citral (10); canfeno (11); 6-paradol (12); curcumina (13); terpineol (forma α ; 14); borneol (15); β -elemeno (16); zingiberenol (17); limoneno (18); geraniol (19); linalool (20) (Realizado en chemDraw).

2.4.1 6-gingerol

Las sustancias fenólicas picantes en conjunto presentes en el jengibre son conocidas como gingeroles, estos son los compuestos más potentes y farmacológicamente activos y poseen actividades antiinflamatorias, analgésicas,

antipiréticas, gastroprotectoras, cardiotónicas y antihepatotóxicas[29, 92]. El jengibre fresco también contiene gingeroles, como 6-gingerol, 8-gingerol y 10-gingerol, que son componentes biológicamente activos importantes[27]. Los gingeroles son térmicamente lábiles debido a la presencia de un grupo β -hidroxi ceto en la estructura y se deshidratan fácilmente para formar los correspondientes shogaoles, que imparten una fragancia picante dulce[31, 93]. Las investigaciones farmacológicas han revelado que el jengibre y sus principales ingredientes picantes tienen efectos quimiopreventivos y quimioterapéuticos en una variedad de líneas de células cancerosas y en modelos animales [92, 94].

De los gingeroles, el compuesto más potente y farmacológicamente activo es el 6-gingerol, y ahora es un objetivo para el desarrollo de fármacos[29, 30, 92, 94]. El compuesto 6-Gingerol con nombre IUPAC (S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil) decan-3-ona y como se observa en la figura 25, posee un grupo fenol, por lo que se considera un compuesto fenólico; es el principal componente farmacológicamente activo del jengibre y la parte activa de la molécula es el resto de la cadena alifática que contiene un grupo hidroxilo, es un aceite amarillo volátil a temperatura ambiente, aislado por primera vez en 1879 de los rizomas del jengibre por Tresh [29, 31]. Se ha demostrado que el componente químico fenilpropanoide del rizoma del jengibre es quien atribuye numerosas propiedades biológicas y farmacéuticas, entre las que se incluyen antiinflamatorias, antioxidantes, antiobesidad y antidiabéticas y anticancerígenas[29, 30, 94].

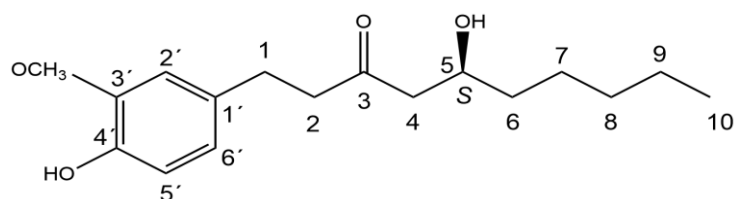


Fig. 25 Estructura química del 6-gingerol

En experimentos *in vivo* con sujetos humanos sanos, se ha demostrado que los metabolitos del jengibre, 6-, 8- y 10-gingerol y 6-shogaol son seguros hasta 2000 mg. Sin embargo, se informó que algunas personas experimentaron síntomas gastrointestinales menores, incluidos eructos, acidez e indigestión en las dosis más altas [30]. Dentro de los efectos atribuidos al jengibre se encuentran los siguientes:

EFFECTO CONTRA EL CÁNCER: Evidencias de estudios *in vitro*, animales y epidemiológicos sugieren que el jengibre y sus componentes activos suprimen el crecimiento e induce la apoptosis de una variedad de tipos de cáncer incluyendo piel, ovario, colon, mama, cuello uterino, oral, renal, cáncer de próstata, gástrico, pancreático, hepático y cerebral[29, 30, 93, 95]. El 6-gingerol induce la detención del ciclo celular y ejerce efectos antiinvasivos y promotores de la apoptosis al actuar

en múltiples vías de señalización en diferentes tipos de líneas celulares cancerosas [96].

EFEECTO ANTIINFLAMATORIO: El jengibre es bien conocido por su uso terapéutico en los trastornos inflamatorios, y el 6-gingerol es uno de los ingredientes activos responsables de estas propiedades [29, 97]. El 6-gingerol inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como la óxido nítrico sintasa (NOS), la ciclooxigenasa (COX) -2, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleucina (IL) -1b y la IL-12 a partir del lipopolisacárido (Macrófagos estimulados con LPS), pero no tiene ningún efecto sobre la expresión inducida por lipopolisacáridos de B7.1, B7.2 y el complejo principal de histocompatibilidad II. Por tanto, el 6-gingerol puede inhibir selectivamente la producción de citocinas proinflamatorias de los macrófagos[29, 30]. De igual forma el 6-gingerol inhibe el desarrollo de sepsis al interferir con la secreción de citocinas proinflamatorias y atenuar la piroptosis en los macrófagos, es decir, una muerte celular programada de tipo inflamatorio. [98]

EFEECTO ANTIOXIDANTE: Las propiedades antioxidantes del compuesto fenólico pueden estar relacionadas con su capacidad para donar electrones y actuar como eliminador de radicales libres mediante la formación de un radical fenoxilo estable. El 6-gingerol reduce el nivel elevado de glucosa en sangre y el estrés oxidativo al aumentar el nivel de superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y GSH. Por lo tanto, el 6-gingerol puede convertirse en un importante aditivo alimentario antioxidante natural [29, 99]. Su actividad antioxidante depende significativamente de las estructuras de la cadena lateral, incluidos los grupos funcionales y la longitud de la cadena [100].

ARTRITIS: El 6-gingerol tiene un efecto terapéutico sobre la osteoartritis al proteger contra el estrés oxidativo y la regulación negativa de mediadores proinflamatorios *in vitro* e *in vivo*, este también estimula la diferenciación de osteoblastos y alivia la supresión de la diferenciación de osteoblastos inducida por TNF α e en células similares a osteoblastos, lo que sugiere su beneficio potencial en la formación de hueso[99, 101, 102]. Los osteoclastos, las únicas células que reabsorben el hueso, tienen un papel importante en la patogenia de los trastornos inflamatorios óseos como la artritis reumatoide, las enfermedades periodontales y la osteólisis periprotésica[30].

ALZHEIMER: El 6-gingerol reduce los niveles de secretasas a y b, APH1a y COX-2, lo que resultó en una mejora en los comportamientos cognitivos y conductual [30, 103]. Esto es debido a que el compuesto atenúa la neuroinflamación y el deterioro cognitivo inducidos por LPS, en parte al suprimir la sobreactivación de los astrocitos, siendo que la neuroinflamación tiene un papel importante en enfermedades neurodegenerativas como el alzheimer [30, 104].

LESION RENAL: El compuesto fenólico 6-gingerol atenúa el daño causado por ROS y RNS en los tejidos renales neutralizando los efectos agresivos de las especies reactivas, como lo demuestra la disminución de malondialdehído y un aumento en la actividad del glutatión. También se ha reportado beneficios como el alivio de la necrosis tubular aguda y la captación de ROS en las células renales[30, 105].

OBESIDAD: El 6-Gingerol tiene un papel importante en la regulación de la obesidad al inducir el oscurecimiento en el tejido adiposo blanco a través de la vía de señalización de β 3-AR actuando como agonista, por ello es considerado como un potente agente nutracéutico terapéutico en el manejo de la obesidad [24, 106, 107].

En cuanto a la eliminación de este compuesto, se ha determinado que el 6-gingerol es eliminado parcialmente por tres posibles vías: el hígado, responsable del metabolismo del 6-gingerol a (S)-6-gingerol-40-O-b-glucurónido, que se identificó como el principal metabolito en el hígado de rata; por plasma, la molécula diana en varios experimentos se absorbió en el plasma, tejido y orina oscilando la recuperación de este entre el 72,5% y el 90,4%; y por orina, el 6-gingerol-glucurónido, un metabolito principal del 6-gingerol, se encuentra principalmente en esta vía[30, 108, 109].

2.5 Inflamación

La inflamación es un componente complejo y necesario de la respuesta a estímulos biológicos, químicos o físicos [110–112]. La palabra inflamación viene del latín “*inflammatio*” y es un calco del griego “*empyresis*”. En latín propiamente significaba incendio, entrada en llamas, debe su nombre a la presencia de calor y enrojecimiento, dos de los signos cardinales observados por Aulo Cornelio Celso (ca. 25 a. C. a ca. 50 d. C.): enrojecimiento, hinchazón, calor. (calor) y dolor (dolor)— en personas con inflamación aguda [36, 113].

La inflamación está definida como el proceso de reclutamiento y activación de las células del Sistema Inmune en respuesta a traumatismo o lesión [114, 115]. Este proceso comprende un complejo conjunto de respuestas adaptativas ante un daño causado sobre un tejido vascularizado, dicha respuesta puede ser de carácter sistémico o local [114, 116]. La inflamación se desarrolla a diferentes niveles de organización: tisular, vascular y celular, aunado a esto, la inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: la aguda y la crónica, que se caracterizan por la duración y el tipo de mediadores celulares y químicos presentes en cada una de ellas; todo se encuentra mediado por factores químicos procedentes del plasma o de las células y que son activadas por el propio estímulo inflamatorio [113–115, 117].

El proceso de la inflamación aguda local se observa en la figura 26 y se describe a continuación: el proceso inflamatorio comienza con la lesión, liberando de manera espontánea bradicinina, la cual causa la vasodilatación al aumentar el flujo de sangre hacia el área inflamada, lo que genera elevación de la temperatura y

enrojecimiento local (calor y rubor), de igual forma por acción de quimioatrayentes serán atraídos mastocitos en reposo **(1)**; los mastocitos liberan mediadores a través de varios estímulos, produciendo histamina, la cual produce alteraciones vasculares que permiten que el vaso sanguíneo se inflame y salgan las células de sangre periférica a causa de la concentración de moléculas atrayentes (quimiotaxis), los neutrófilos son atraídos para fagocitar el tejido dañado **(2)**; los neutrófilos liberan IL-8, y MCP1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1), las cuales son proteínas quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos respectivamente, los monocitos al salir de circulación se convierte en macrófagos los cuales son proinflamatorios y tienen receptores TOLL produciendo citocinas inflamatorias, principalmente TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) y IL-1 β (Interleucina 1 beta) y algún interferón tipo 1 o IL-6 (Interleucina 6), los cuales inflaman más el sitio **(3)**; para poder llevar a cabo el proceso de resolución y apagar la cascada de señalizaciones, macrófagos no inflamatorios que viven en el tejido se comen las células apoptóticas de todo lo que fue ya procesado o muerto, para evitar más inflamación y empezar a desinflamar **(4)**, los macrófagos no inflamatorios producen principalmente citocinas TGF- β (Factor de crecimiento transformante beta) o IL-10 (Interleucina 10, factor de inhibición de la síntesis de citocinas) **(5)** encendiendo el proceso de resolución llamando así a los fibroblastos (células indiferenciadas) los cuales son productores de fibrina, llevando a un estado procoagulante, lo que impide la diseminación de gérmenes a través de la circulación sanguínea **(6)** [110, 111, 115, 118–121].

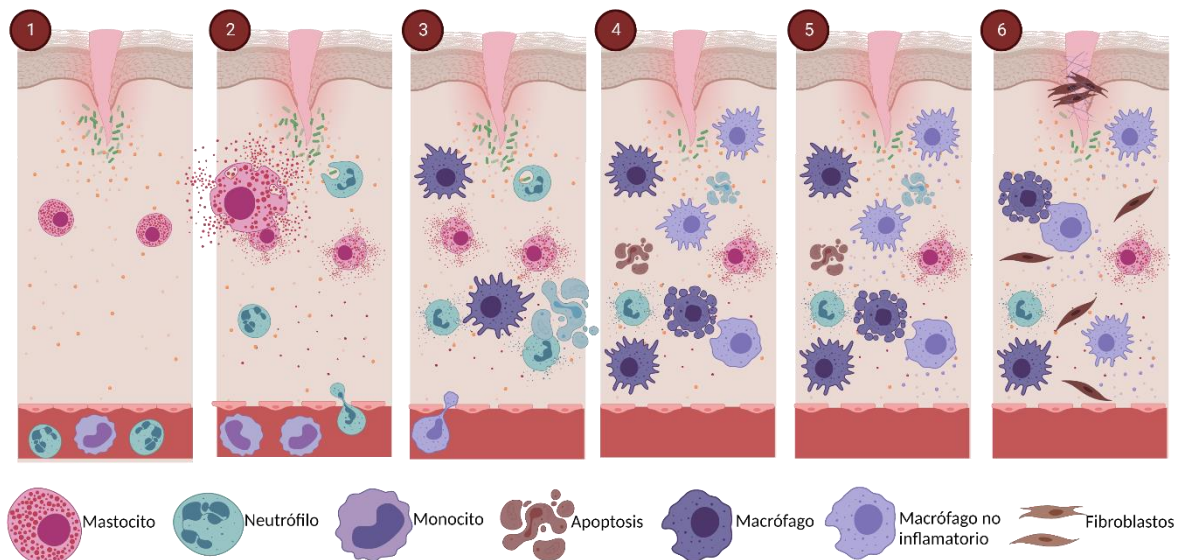


Fig. 26 Esquema de proceso de inicio y resolución del proceso de inflamación (Creado por Biorender.com)

Una variedad de mediadores químicos del sistema circulatorio, las células inflamatorias y el tejido lesionado contribuyen activamente y ajustan la respuesta inflamatoria. Los mediadores químicos liberados se mencionan en la tabla 1 e incluyen (1) aminas vasoactivas como la histamina y serotonina, (2) péptido (p. ej., bradicinina) y (3) eicosanoides (p. ej., tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas) [115, 120]. Los mediadores químicos de la inflamación son pequeñas moléculas que entrelazan todos los acontecimientos propios del proceso inflamatorio y

proceden de diferentes orígenes como el plasma o células partícipes del proceso inflamatorio; la mayoría realiza su actividad biológica uniéndose inicialmente a receptores específicos situados en las células, actuando sobre uno o algunos tipos de células diana [122]. Los mediadores pueden tener diferente efecto según sea el tipo de célula; además son capaces de estimular la liberación de otros mediadores por parte de las propias células diana; una vez activados y liberados de la célula, la mayoría los mediadores dura muy poco tiempo y la mayor parte de los mediadores puede producir efectos perjudiciales[111, 120, 121].

Tabla 1. Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda

Mediador químico	Acción
Histamina y serotonina (aminas vasoactivas)	Incremento de la permeabilidad
Bradicinina	Incremento de la permeabilidad y dolor
C3a (Producto complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad opsonina
C5a (Producto complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Prostaglandinas (metabolitos del ácido araquidónico)	Vasodilatación, dolor, fiebre, activa a otros mediadores
Leucotrieno B₄ (metabolitos del ácido araquidónico)	Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Leucotrieno C₄, D₄, E₄ (metabolitos del ácido araquidónico)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, vasoconstricción.
Metabolitos del oxígeno (radicales libres)	Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular
Factor activador de plaquetas (PAF)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, cebado de leucocitos
Interleucina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF) (citocinas)	Reacciones de fase aguda, activación endotelial, quimiotaxis
Oxido nítrico	Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad

La inflamación debe regularse con precisión, ya que las respuestas insuficientes o excesivas pueden conducir a complicaciones patológicas. La inmunodeficiencia, la falta de respuestas inflamatorias adecuadas, da como resultado un aumento de las tasas de infecciones o cáncer [117, 120]. Por otro lado, la liberación excesiva de TNF, el grupo de alta movilidad recuadro 1 (HMGB1) y otros mediadores proinflamatorios conducen a una inflamación sistémica, asociada con el desarrollo de complicaciones patológicas graves que incluyen sepsis y enfermedades autoinmunes [115, 119].

2.5.1 5-ALOX

La inflamación es la causa de una serie de implicaciones fisiopatológicas como alergia, asma, trastornos cardiovasculares y autoinmunes, por lo que actualmente, también se ha convertido en una carga mundial para la población humana [123]. La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) como el ácido araquidónico (AA), el ácido linoleico, el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) conduce a una inflamación que se controla mediante la señalización de ácidos grasos. La oxidación del AA es metabolizada por Vías de lipoxigenasa (LOX), ciclooxigenasa (COX) y epoxigenasa (EPOX) [33, 124]

Las lipoxigenasas son el hierro no hemo que contiene dioxigenasa que oxida 1,4-cis-cis-pentadienos que contienen ácidos grasos poliinsaturados. La clasificación de las LOX de mamíferos se basa en la oxidación regio y estereo-selectiva de sus sustratos naturales, por ejemplo, el ácido araquidónico (AA) [123, 125]. La enzima araquidonato 5-lipoxigenasa (ALOX5) es la enzima clave para la biosíntesis de leucotrienos (LT) a partir del ácido araquidónico (AA), esta vía que desempeña un papel importante en la causa del asma, artritis, alergia e inflamación [33, 34]. Los leucotrienos (LT) son una familia de mediadores inflamatorios importantes como mediadores de la inflamación y las respuestas alérgicas; y se clasifican en diferentes tipos, incluidos LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄ que producen los signos de inflamación. El LTA₄ es un intermedio inestable y se convierte en LTB₄, que media la migración de leucocitos desde la sangre a los tejidos inflamados y también produce agregación, generación de superóxido, desgranulación y movilización del Ca²⁺ + asociado a la membrana de los neutrófilos [123–126]. Los LT que contienen cisteinilo (C₄, D₄ y E₄) provocan vasopermeabilidad, secreción de moco y contracción del músculo liso. ALOX5 se expresa principalmente en leucocitos, como monocitos / macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas y linfocitos B [32–34].

ALOX-5 tiene dos funciones catalíticas principales, una de las cuales es la incorporación de oxígeno molecular en AA, convirtiéndolo en ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) por su actividad dioxigenasa, y convirtiéndolo en ácido 5-hidroxicicosatetraenoico (5-HETE) o LTA₄. LTA₄ se forma a partir de la actividad de la LTA₄ sintasa a través de la formación de epóxido [124, 125]. Además de la biosíntesis de LT, ALOX5 participa en la formación de lipoxinas antiinflamatorias a partir de 5-HPETE, junto con las enzimas 12-LOX y 15-LOX. Además de AA, algunos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácidos eicosatrienoicos y ácidos grasos con dobles enlaces 5,8 -cis sirven como buenos sustratos para ALOX5 [32, 124, 125].

La proteína ALOX5 se muestra en la figura 27, se puede observar que posee una estructura monomérica con un peso molecular de 72 a 82 kDa; pero también se

puede formar un homodímero. La estructura de la proteína de ALOX5 consta de dos dominios principales, que son hojas β , que contienen un dominio tipo C2 regulador N-terminal (120 aminoácidos) con bucles de unión de ligandos, y varias hélices α , que contienen un catalizador C-terminal dominio [32].

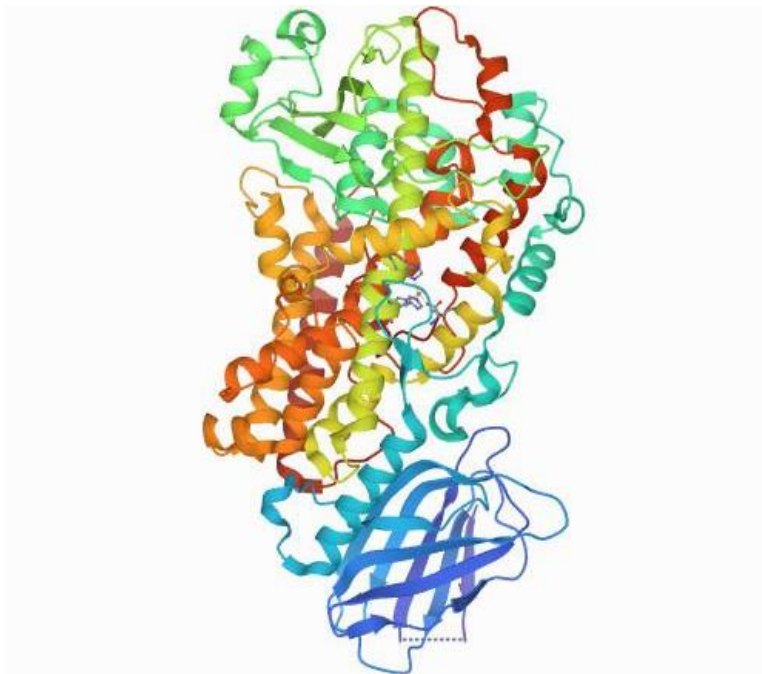


Fig. 27 Estructura 3D de la Araquidonato 5-Lipooxigenasa (PDB ID: 3O8Y)
(Fuente: www.rcsb.org; PROTEIN DATA BANK)

Hasta ahora, sobre la base del mecanismo de acción, se han identificado cuatro tipos diferentes de inhibidores de la 5-LOX. Entre ellos, tres son inhibidores directos de 5-LOX (una forma quelato con hierro, el segundo tipo reduce el sitio de unión al hierro y el tercero son de tipo no redox), según nuestro conocimiento, todos los inhibidores directos se unieron en el mismo sitio de unión [124, 125]. El restante es un inhibidor indirecto que bloquea la interacción funcional entre la proteína activadora de 5-LOX y 5-lipoxigenasa (FLAP). A pesar de todos estos esfuerzos, Zileuton es el único inhibidor directo de la 5-LOX como fármaco disponible en el mercado para el tratamiento del asma con algunos inconvenientes terapéuticos como un perfil farmacocinético deficiente de vida media corta y hepatotoxicidad debido a la formación de metabolitos químicamente reactivos en el hígado [33, 40].

2.6 Análisis in silico

Desde la invención de la computadora en la década de los cuarenta, se ha intentado reproducir fenómenos naturales de alta complejidad o bien que contienen un elevado número de variables, que tomaría mucho tiempo correlacionar y así poder entenderlos en su totalidad [127, 128]. Para referirse a lo anterior nació la expresión

“in silico”, que se aplica a todo lo “hecho por computadora o vía simulación computacional”, en otras palabras un análisis in silico hace uso de cualquier aplicación de tecnologías informáticas, como algoritmos y bases de datos para intentar reproducir o predecir (por ejemplo) un proceso biológico, como el que describe el comportamiento de un fármaco dentro del cuerpo humano y la manera en la cual se relaciona con la estructura de una proteína determinada, para así obtener y entender el efecto deseado [128–131]. Los enfoques in silico ahora permiten la detección virtual de millones de compuestos en un tiempo asequible, lo que reduce los costos iniciales de identificación de aciertos y mejora las posibilidades de encontrar los candidatos a fármacos deseados. En la actualidad, varias técnicas de modelado molecular están disponibles para facilitar las tareas de descubrimiento de fármacos, la mayoría de ellas clasificadas en enfoques basados en estructuras y basados en ligandos [132, 133].

El modelado computacional consiste en un uso sistemático de una amplia gama de diferentes herramientas computacionales con múltiples objetivos, para recopilar, validar, almacenar, compartir, analizar, modelar y aplicar esa información para mejorar el conocimiento sobre las interacciones diana-ligando (acoplamiento molecular), aumentando el rendimiento de la selección de moléculas al centrar la búsqueda en compuestos con mayor probabilidad de unir el objetivo o incluso sugerir nuevos compuestos principales potenciales [128, 131, 134–137]. El proceso de modelado implica dos pasos principales: construir el modelo y luego mapear el proceso químico enzimático [137, 138]. Una técnica de uso frecuente para diseñar moléculas inhibitoras es el diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD). El método más popular en SBDD es el Docking o acoplamiento molecular [136, 139].

El Docking o acoplamiento molecular se encuentra representado en la figura 28, este intenta predecir la posición, la orientación y la conformación nativas de un complejo intermolecular formado entre dos o más moléculas constituyentes: un receptor y un ligando [128, 134–137, 140]. El receptor es la mayoría de las veces una proteína, mientras que el ligando puede ser otra proteína, un ácido nucleico o una pequeña molécula (un posible fármaco, sustrato, inhibidor, etc.) [133, 135, 140]. Al proporcionar la comprensión básica de las interacciones que tienen lugar entre el ligando y su receptor, el acoplamiento abre la puerta a la estimación de la afinidad antes de la síntesis, así como a las técnicas de optimización del ligando [134, 141]. Inicialmente, el acoplamiento, un término acuñado a fines de la década de 1970, sigue siendo un área de investigación vigorosa y ahora es una de las herramientas más útiles para el diseño de fármacos in silico y un componente principal en muchos programas de descubrimiento de fármacos [134–136, 138, 141].

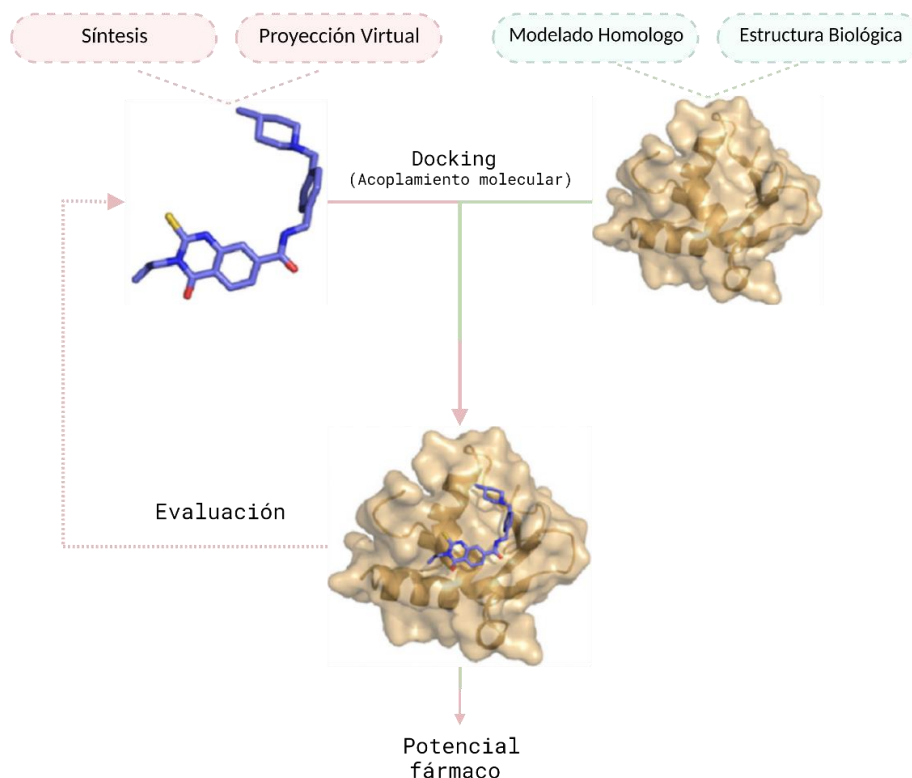


Fig. 28 Resumen de un enfoque clásico de diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD). (Creado en BioRender.com; Fuente: Ruyck et. al, 2016)

El primer programa de acoplamiento fue desarrollado por el grupo Kuntz y se denominó DOCK. Funcionó de manera muy similar al modelo de 'cerradura y llave': encontrar complejos con un alto grado de complementariedad de forma entre el ligando y el receptor [133]. En este enfoque, tanto el ligando como el receptor tienen estructuras muy rígidas, de ahí el nombre de acoplamiento de cuerpo rígido [134, 139, 140]. Actualmente hay disponibles más de 30 programas de acoplamiento diferentes, algunos de los cuales se describen brevemente en la Tabla 2, el software de acoplamiento difiere en la forma en que maneja la flexibilidad de proteínas y ligandos, su algoritmo de muestreo y su función de puntuación.

Tabla 2. Programas de acoplamiento molecular más representativos

PROGRAMA	ALGORITMO DE BÚSQUEDA	FUNCIÓN DE PUNTUACIÓN NATIVA	LICENCIA
AutoDock	Estocástico	Basado en campos de fuerza	Gratuito para academia
DOCK	Sistemático	Basado en campos de fuerza	Gratuito para academia
FlexX	Sistemático	Empírico	Paga
Glide	Sistemático	Empírico	Paga

GOLD	Estocástico	Basado en campos de fuerza	Paga
ICM	Estocástico	Basado en campos de fuerza	Paga
MOE	Estocástico	Basado en campos de fuerza	Paga

Fuente: Gioia et. al, 2017

Se utilizan varios enfoques para muestrear los modos de unión del ligando y, en algunos casos, para tratar la flexibilidad de la proteína. Estos algoritmos de muestreo se pueden dividir en tres categorías principales:

- Algoritmos de búsqueda sistemática: Varios métodos que entran en la categoría de "algoritmos de búsqueda sistemática" utilizan la técnica de la reconstrucción incremental del ligando para compensar esta dependencia exponencial del tamaño molecular[133, 136, 139, 141].
- Métodos estocásticos: En este método el ligando se considera como un todo y los cambios paso a paso se aplican a una pose inicial o a una población de poses. Posteriormente, dichos métodos califican las nuevas poses en cada paso tratando de mejorar las interacciones con la proteína, lo que con suerte conduce al modo de unión nativo[136, 139, 141].
- Enfoques de simulación: Los métodos de simulación agrupan la dinámica molecular y los métodos de minimización. Estos enfoques a menudo no pueden cruzar barreras de alta energía dentro de períodos de tiempo de simulación factibles y, por lo tanto, solo pueden acomodar ligandos en mínimos locales de la superficie de energía [136, 141].

Aunque el acoplamiento se ha utilizado principalmente como un método independiente para el diseño de fármacos, ahora a menudo se integra en flujos de trabajo que incluyen otros métodos computacionales, como enfoques basados en ligandos, basados en estructuras e inteligencia artificial [128, 135]. Se pueden combinar diferentes enfoques in silico con acoplamiento para generar flujos de trabajo integrados con rendimientos de predicción mejorados, también se pueden combinar diferentes enfoques para integrar el acoplamiento (p. ej., la dinámica molecular y las estimaciones de energía libre vinculante se pueden combinar con el acoplamiento para mejorar los resultados de la detección virtual) [128, 133, 134, 141].

CAPITULO 3. ESTADO DEL ARTE

La información presentada en esta sección es la recopilación de las investigaciones de mayor relevancia para desarrollar y producir nanopartículas de quitosano mediante la técnica de gelificación ionotrópica, para la encapsulación del compuesto 6-gingerol extraído del jengibre (*zingiber officinale*) como alternativa para inhibir la enzima 5-ALOX. Se presenta el análisis de los solventes utilizados para la extracción y purificación del compuesto 6-gingerol proveniente de rizomas frescos de jengibre, las variables empleadas para la elaboración de nanopartículas de quitosano mediante la técnica de gelificación ionotrópica y los estudios basados en el modelado molecular del compuesto 6-gingerol con la enzima 5-ALOX.

3.1 Extracción y purificación de compuesto 6-gingerol

En esta sección presenta el análisis de la investigación desarrollada por diversos autores sobre de los diversos solventes empleados para la extracción y purificación del compuesto 6-gingerol, con la finalidad de determinar el solvente que brinde mayor rendimiento de extracción y la mejor mezcla de solventes para llevar a cabo la purificación del compuesto. Existen múltiples métodos para la extracción, siendo el método de extracción con solventes la técnica más utilizada para el aislamiento de compuestos polifenólicos vegetales (6-gingerol); sin embargo, depende en gran medida de la naturaleza del disolvente de extracción y origen de la materia, debido a la variación de sus compuestos polifenólicos [142, 143]. Said et al. [144] presenta el uso solventes para recuperar el compuesto 6-gingerol de rizomas frescos adquiridos en un mercado en India, reportando un rendimiento de hasta 6% con Etanol, 4.3% con Acetona, 3.1% con Hexano y 7. 5% con Metanol, siendo este último valor el mayor rendimiento obtenido; en contraste el grupo de Usman et al. [142] demuestra el mayor rendimiento del compuesto 6-gingerol utilizando como solvente la acetona con 7.39%, 5.69% con Metanol y 4.58% con agua, proveniente de rizomas adquiridos en India; no obstante, en la investigación de Gautam et al. [145] el mayor rendimiento fue obtenido al utilizar metanol en rizomas de mercados de Nepal con un porcentaje de 10.81% de extracto de 6-gingerol. Acorde a los resultados analizados, al realizar extracciones con solventes de materia vegetal el solvente empleado determina el rendimiento de la oleorresina, al igual que el origen de la materia empleada, ya que la diferencia observada en el rendimiento entre métodos similares puede atribuirse a factores como cosecha y maduración del rizoma[143, 146].

Una vez obtenida la oleorresina, es de gran importancia determinar la mezcla adecuada de solventes, ya que la purificación por cromatografía en columna depende de la polaridad de la polaridad de los solventes y de la gravedad [147–151]. Entre las mezclas de solventes más utilizadas en investigaciones se destacan el Acetato de Etilo: Éter de petróleo en una proporción 20:80, en el estudio realizado por Kumar et al. [92]un rendimiento de 10.5 mg/g de extracto de jengibre fue producido; a su vez Wang et al. [152] reporta la obtención de 11.04 mg/g de rendimiento bajo las mismas condiciones. Otro solvente ampliamente utilizado es el

Hexano en combinación con otros solventes, como lo es el acetato de etilo, Unmesh et al. [151] al emplear una proporción de de 4:6 obtuvo un rendimiento de 1.23 mg/g del compuesto 6-gingerol, mientras que El-Naggar et al. [153] obtuvo 3.8 mg/g de rendimiento; Taha et al. [154] al utilizar una proporción de 6:4 de estos solventes obtuvo un rendimiento de 14 mg/g, no obstante, empleando esta misma proporción Đúrc et al. [155] logro obtener un rendimiento de 37.7 mg/g del compuesto 6-gingerol. Aly et al. [150] emplearon como mezcla de solventes Metanol: Agua en una proporción 7:3 obtuvieron un rendimiento de recuperación del compuesto 6-gingerol de 7.89 mg/g, a su vez en la investigación de Vedashree et al. [156] fue utilizada una mezcla Hexano: Éter Etilico en una proporción 4:6, obteniendo un rendimiento de 13.8 mg/g; mientras que Nile et al. al [157] desarrollo la aplicación de una mezcla de solventes Acetato de etilo: Acido fórmico: Agua en una proporción 85:5:10 recuperando un total de 10.85 mg/g de compuesto. La comparación de los resultados de los estudios mencionados permite determinar que la mezcla de solventes en diferentes proporciones influye en el rendimiento del compuesto 6-gingerol recuperado, siendo el Hexano uno de los solventes con mayor frecuencia de utilización.

3.2 Nanopartículas de quitosano

En esta sección se presenta el estudio de las variables de proceso que pueden ser modificadas con la finalidad de generar partículas de quitosano/tripolifosfato mediante la técnica de gelificación iontrópica con los siguientes requerimientos: tamaño de partícula menor a 100 nm, potencial zeta mayor a ± 10 mV y polidispersión menor a 0.5, características necesarias para su desempeño en la distribución y liberación de fármacos. [12, 18, 88]

El pH es un factor de gran relevancia para la elaboración de nanopartículas de quitosano con tripolifosfato, debido a que durante el proceso de gelificación iontrópica se llevan a cabo interacciones iónicas entre quitosano y tripolifosfato en donde el medio afecta o beneficia el entrecruzamiento de los componentes [22, 44, 158, 159]. Los autores Lopez-Leon et al [22] presentan en su estudio la producción de nanopartículas empleando un pH entre 4- 7 observando una reducción de tamaño de partícula de 300 nm a 200 nm de diámetro, concluyendo que las cadenas de quitosano al poseer grupos de glucosamina pueden desprotonarse si aumenta el pH y así provocar un deshinchamiento al modificar el pH de valores ácidos a básicos; a su vez, en el grupo de investigación de Antoniou et al [44] fue determinado que no solo el pH afecta el tamaño final de la partícula, sino también el potencial de carga el cual disminuye casi linealmente con el aumento del pH pasando de un valor de 19 mV a valores de 14.5 mV, además de observar que existe un incremento en el tamaño de partícula pasando de 100 a 150 nm cuando el pH es superior a 5.5 a una concentración de quitosano de 0.5 mg/mL, mientras que a una concentración de 1.5 mg/mL se forman partículas más grandes con un tamaño de 160 nm a un pH inicial bajo, reduciéndose al incrementar entre 4.5 y 5, alcanzando un tamaño de 100 nm de diámetro, indicando que los valores óptimos para la reticulación del quitosano con el tripolifosfato sucede en pH cercanos a 4.5 y 5. Los autores Markam & Bajpai [25] observaron en sus análisis que el pH afecta

también a la liberación del compuesto encapsulado, encontrando que en medios ácidos cercanos a 1.2 la liberación es mayor alcanzando un radio de liberación de 4.5, mientras que el mínimo de liberación lo obtienen a pH alcalino de 7.4 con un radio de liberación de 3, esto debido a que a menor pH se observa un hinchamiento, el cual permite la entrada de moléculas de agua que acarrean moléculas del compuesto hacia el exterior de la partícula. De acuerdo con los resultados obtenidos por los autores previamente analizados, es posible determinar que el pH es un parámetro que tiene un efecto en propiedades como el tamaño de partícula, potencial zeta y velocidad de liberación de fármaco, obteniendo los mejores resultados en pH menores a 7.

Otra variación de importancia es la proporción de componentes (quitosano/tripolifosfato), debido a que la presencia de aniones disponibles permite aumentar el entrecruzamiento entre las cadenas de quitosano dentro de la nanopartícula permitiendo la creación de partículas de menor tamaño [12, 13, 22, 160]. Calvo et al [18] afirma en su estudio que otro factor determinante para el tamaño de partícula es la variación de componentes, al producir nanopartículas de quitosano y tripolifosfato, se obtuvieron tamaños de partícula entre 200–1000 nm y un potencial zeta entre 20 mV y 60 mV y fue observado que al repetir las proporciones de los componentes podían ajustar el tamaño de las nanopartículas. De igual forma Rampino et al [12] realizaron el análisis de una mezcla en proporciones de 5:1 y 6:1 de tripolifosfato y quitosano reportan partículas de entre los 200 y 273 nm respectivamente, atribuyendo esta diferencia al incremento de proporción de tripolifosfato; a diferencia de lo reportado por Antoniou et al [44] sobre el control del tamaño de la partícula por diferentes proporciones de masa CS: TPP dependiendo de la concentración de CS, logrando producir partículas con tamaño menor a los 120 nm con una proporción 12:1. La concentración de quitosano es el parámetro de mayor influencia en el tamaño de partícula al evaluar múltiples proporciones de masa CS: TPP entre 3:1 a 15:1 con una concentración constante de quitosano de 0,5 mg/mL, determinando que a relación más baja (3:1) el tamaño es mayor (800 nm) y disminuye mientras más cercano es a una relación 12:1, en donde se obtuvieron los menores tamaños de partícula, los cuales fueron entre 40 a 130 nm. Acorde con las investigaciones, es posible determinar que los menores tamaños de partícula se obtienen a concentraciones mayores de componentes como lo es 5:1 de tripolifosfato /quitosano o valores superiores de 3:1 de quitosano/tripolifosfato.

Un factor adicional para considerar durante la producción de nanopartículas es el método de homogenización, ya que los parámetros de tamaño de partícula, potencial zeta y PDI varían de acuerdo al método empleado. Al acelerar la disolución del TPP en la solución de CS formando así un enlace más rápido con las cadenas de CS [12, 161] . Rampino et al [12] quienes al emplear un agitador magnético para realizar las nanopartículas obtuvieron partículas pequeñas y homogéneas de hasta 40 nm, reduciendo también su agregación en la suspensión final; De igual manera, en la investigación presentada por Antoniou et al [44] se emplearon técnicas que involucran procesos como la centrifugación y la ultra sonicación, logrando controlar los tamaños de partícula al reducirlas hasta los 90 nm. Debido a los resultados obtenidos por estos autores presentados, es importante considerar que existen

métodos de homogenización que pueden ser empleados en la técnica de gelificación iontrópica.

La eliminación del compuesto quitosano, ocurre al degradarse a oligosacáridos del quitosano (COS) por acción de enzimas como las cuales hidrolizan a los enlaces glucosídicos β -1,4, en el tracto gastrointestinal[162–164]. El COS se absorbe a través del epitelio intestinal hacia la sangre principalmente distribuyéndose principalmente al hígado, los riñones y el bazo; el COS absorbido se degrada a un peso molecular más bajo por la lisozima en la sangre, el hígado, los riñones y la orina, mientras que el COS no absorbido puede llegar al intestino distal para ser fermentado y utilizado por la microbiota intestinal. Las principales formas de eliminación de las nanopartículas de quitosano son vía renal (urinaria), la excreción hepatobiliar (fecal) [162, 163].

3.3 Docking Molecular

En esta sección se mostrará la aplicación del análisis in silico por docking molecular en diferentes proteínas mostradas en la tabla 3, las cuales serán empleadas para predecir la acción de un ligando, su acción farmacológica y softwares empleados.

Tabla 3. Proteínas utilizadas, ligandos, aplicación y software empleados en análisis in silico.

Proteína (PDB ID)	Función de proteína	Ligando	Aplicación	Software empleado	Referencia
ACE2 PDB ID: 1R42	Enzima usada como puerta de entrada por SARS-CoV-2	Terpinoleno, Timol, Bicycloterpeno	Capacidad inhibitoria en SARS-CoV-2	Winmostar, ORCA, BIOVIA	[165]
AChE PDB ID: 1EVE	Colinesterasa (enzima de transmisión nerviosa) primaria en el cuerpo	Donepezil	Tratamiento para el Alzheimer	AutoDock, AdmetSAR, PyMOL	[166]
MAO-B PDB ID: 2V5Z	Enzima de la membrana mitocondrial externa. Esta proteína degrada la bencilamina y la fenetilamina.	Análogos de cafeinilo	Tratamiento para el Parkinson	AutoDock, Molinspiration, ChemBioDraw; Discovery Studio Visualizer	[167]
AA2AR PDB ID: 3EML	Regula la secreción de neurotransmisores		Tratamiento para el Parkinson		
HSA	proteína de transporte en sangre	nanopartículas de	-	ACD/Chem Sketch,	[168]

PDB ID: 1E7I	humana, puede unirse a cualquier ligando que se inyecte en el torrente sanguíneo.	CuO y TiO ₂		Gaussian, AutoDock, SPDBV, PyMOL, Chimera	
COX1 PDB ID: 2AYL	Enzima que permite al organismo producir unas sustancias llamadas prostaglandinas a partir del ácido araquidónico.	Núcleos de quinona y resorcinol	Actividad antiinflamatoria	GOLD	[169]
COX2 PDB ID: 5IKV					
SaHPPK PDB ID: 3QBC	Enzima producida por Staphylococcus aureus	Derivados del Jengibre	Actividad antibacteriana	GOLD, CDOCKER	[170]

Los resultados analizados previamente, muestran que el análisis in silico por docking molecular es una herramienta ampliamente utilizada para predecir el comportamiento de moléculas y ligandos, facilitando así el estudio de procesos biológicos como lo es el comportamiento de un fármaco dentro del cuerpo humano y la manera en la cual se relaciona con la estructura de una proteína determinada, para así obtener y entender el efecto deseado [130, 131, 135]. Estudios como el del grupo de Azam et al. [167] en donde adicional al docking molecular un análisis in silico farmacocinético fue realizado, determinando que el ligando empleado era adecuado para ser empleado vía oral; permiten considerar que existen métodos de análisis in silico complementarios que pueden ser de utilidad para determinar la óptima interacción de un ligando con una proteína.

3.4. Conclusiones del estado del arte

La información analizada permite la determinación de los parámetros principales a utilizar para lograr una óptima extracción del compuesto 6-gingerol, logrando así determinar que:

- El mejor solvente para llevar a cabo la extracción de la oleorresina de jengibre (*Zingiber officinale*) es Metanol al 95%, al ser este solvente con el que se obtuvo un mayor rendimiento de oleorresina.
- La mezcla de solventes con mayor rendimiento del compuesto 6-gingerol a través del método de cromatografía en columna es Hexano: Acetato de Etilo en una proporción 6:4, debido a que al usar esta mezcla de solventes se obtuvo el mayor rendimiento del compuesto 6-gingerol.
- El uso de rizoma de origen mexicano puede dar diferentes rendimientos de oleorresina de jengibre y del compuesto 6-gingerol, debido a que estos parámetros varían dependiendo el origen y maduración de la materia prima.

En la elaboración de nanopartículas existen múltiples parámetros que pueden dar como resultado variaciones en el tamaño de partícula, potencial zeta, polidispersión o porcentaje de liberación de proteína variable [12, 16, 44], por lo que la información analizada es la base general para establecer distintos parámetros a utilizar con la finalidad de obtener nanopartículas de quitosano con un tamaño menor a 100 nm, con un potencial zeta mayor a 10mV y un PDI menor a 0.5, lo que nos indicaría la producción de partículas con menor agregación, concluyendo que:

- Los menores tamaños de partícula se obtuvieron a un pH entre 4 y 5, ya que al ser valores cercanos al pKa del quitosano (6.5) permite se observen procesos de hinchamiento/encogimiento.
- Los menores tamaños de partícula se obtuvieron a una concentración de quitosano/tripolifosfato mayor a 3:1 y una proporción tripolifosfato/quitosano mayor de 5:1, ya que a estas proporciones se observo un tamaño de partícula menor a 130 nm.
- El uso de agitador magnético y ultrasonido permite la reducción del tamaño de partícula, por lo que se contempla el empleo de métodos adicionales de agitación como el homogeneizador y el espumador.

En conclusión, existen múltiples softwares para la realización de pruebas *in silico*, empleados principalmente para la determinación de la actividad inhibitoria de los ligandos frente a proteínas de interés, permitiendo que exista una amplia posibilidad de aplicación debido a la gran cantidad de bases de datos con las que se cuentan en la actualidad. De igual forma, se determina que existen pruebas *in silico* que pueden ser aplicadas para enriquecer los resultados y definir con mayor precisión la aplicación de proteínas y ligandos.

CAPITULO 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta la metodología experimental utilizada para el desarrollo de este estudio, que tiene como objetivo producir nanopartículas de quitosano de un tamaño menor a 100 nm, baja polidispersión y valores más alejados de 0 de potencial zeta a través de la técnica de gelificación iónica. Se analizaron parámetros realizando variaciones en concentración de tripolifosfato y quitosano, pH y método de agitación en la elaboración de nanopartículas para la encapsulación del compuesto 6-gingerol extraído del jengibre (*Zingiber officinale*) como posible inhibidor de la enzima 5-ALOX mediante un modelado *in silico*. El proceso experimental se muestra en la figura 29 y se divide las siguientes etapas:

1. Extracción y purificación de 6-gingerol,
2. Elucidación del compuesto 6-gingerol,
3. Elaboración de nanopartículas,
4. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de quitosano,
5. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de quitosano con 6-gingerol,
6. Evaluación *in silico* de propiedades farmacológicas y toxicológicas del 6-gingerol,
7. Docking entre 5-ALOX y 6-gingerol,
8. Evaluación *in silico* del metabolismo de 6-gingerol

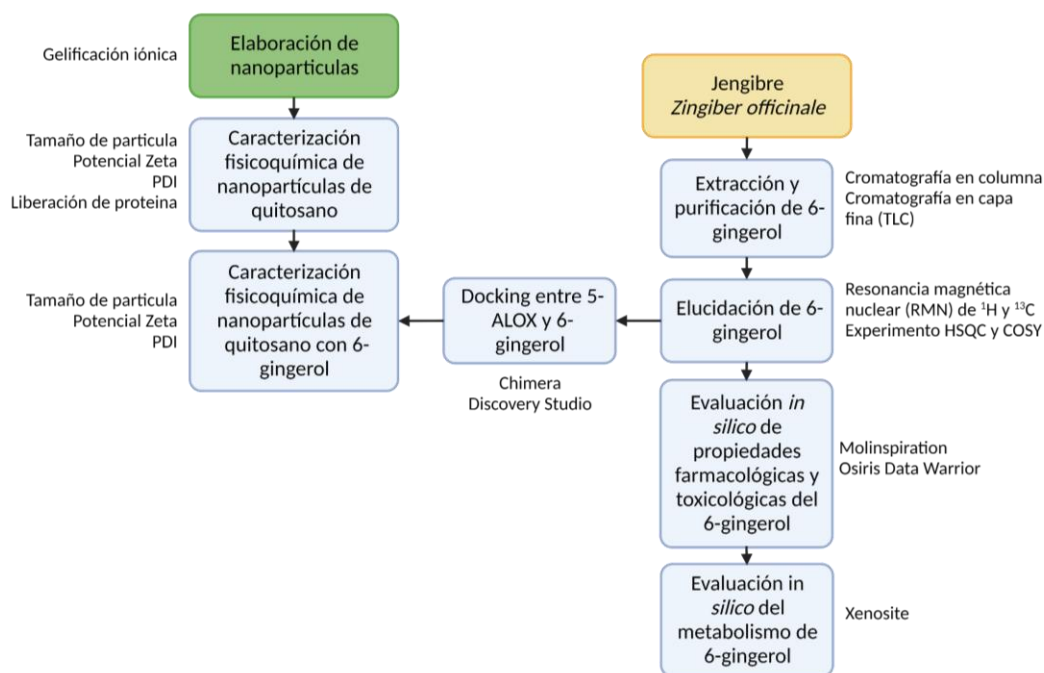


Fig. 29 Metodología experimental

Esta metodología permite determinar los procedimientos necesarios para obtener nanopartículas de tamaño menor a 100nm con el compuesto 6-gingerol

encapsulado; al igual que determinar mediante un modelado *in silico* su actividad inhibitoria sobre la proteína 5-ALOX.

4.1 Preparación de extracto de 6-gingerol

Para el desarrollo y experimentación de este proyecto se requirieron 52.6 kg de jengibre (*Zingiber officinale*) adquiridos en presentación de rizoma (raíz) como se muestra en la figura 30A, proveniente de la ciudad de Tlacuilotepec, en el estado de Puebla, México. El rizoma de jengibre fue lavado y cortado en un grosor promedio aproximado de 0.5 cm con la finalidad facilitar su etapa de secado en cámaras climáticas Forma™ (Thermo Scientific) (figura 30B), distribuidos en bandejas (figura 30C) a una temperatura de 55°C por 72 h, posteriormente la extracción del compuesto 6-gingerol fue realizada.



Fig. 30 Cámaras climáticas Forma™ de Thermo Scientific (A) y rodajas de jengibre fresco en charolas para su secado.

La pérdida de humedad de los rizomas de jengibre fue calculada a partir de la pérdida de peso y la medición del contenido de humedad inicial. El contenido de humedad (base húmeda) se obtuvo a partir del peso del rizoma de jengibre antes y después del proceso de secado, por medio de la utilización de una balanza (OHAUS Pioneer, PX224, New Jersey, USA). El análisis matemático del peso de las muestras húmedas se presenta en la ecuación 2, mientras que la ecuación 3 permite el cálculo del contenido de humedad en las muestras a analizar.

Ecuación [1]

$$\text{Peso de humedad} = \text{Peso de muestra fresca} - \text{Peso muestra seca}$$

Ecuación [2]

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{\text{Peso de la humedad}}{\text{Peso de la muestra fresca}} \times 100$$

La recuperación en seco para el secado de rizomas de jengibre se calculó a partir del peso de los rizomas de jengibre sin pelar y el peso del jengibre seco. La recuperación seca se expresó en porcentaje como se muestra en la ecuación 4.

Ecuación [3]

$$\text{Muestra seca recuperada (\%)} = \frac{\text{Peso de muestra seca (g)}}{\text{Peso de muestra fresca (g)}} \times 100$$

Los rizomas secos fueron colocados en contenedores de 4.546 L y recubiertos de alcohol metílico, a temperatura ambiente (24°C) por 24 h. El extracto metanólico fue recuperado por filtración rápida con ayuda de un embudo de vidrio y papel filtro de tamaño de poro medio de celulosa de 5 µm. El Metanol fue recuperado al evaporarlo en un Rotovapor® (BUCHI, R-100) a 40°C por 4h (figura 31).

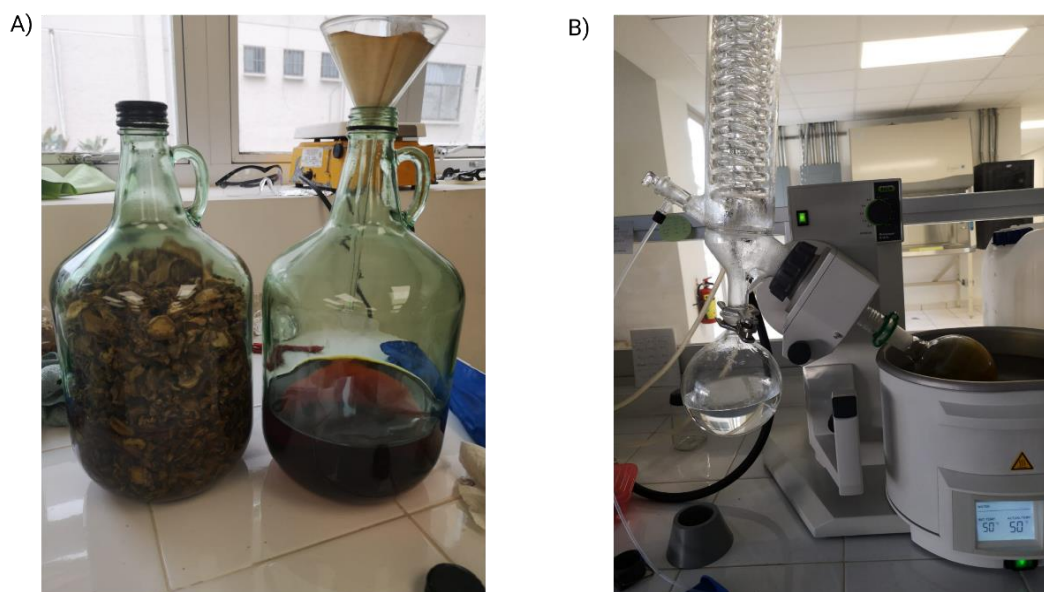


Fig. 31 Extracto Metanólico (A) y Rotavapor® BUCHI R-100.

El extracto recuperado fue almacenado a temperatura ambiente (24°C) al vacío en un matraz balón fondo plano con un tapón de silicón sellado con Parafilm®, hasta su purificación. El rendimiento fue determinado con la siguiente ecuación (ecuación 5):

Ecuación [4]

$$\text{Rendimiento de aceite esencial}(\%) = \frac{\text{Cantidad de aceite esencial obtenido (g)}}{\text{Materia Prima utilizada (g)}} \times 100$$

Este valor, se refiere a la cantidad de producto o extracto obtenido al finalizar el proceso de extracción expresado en porcentaje. Los resultados nos ayudaron a determinar la proporción de extracto metanólico y del compuesto 6-gingerol presente en los rizomas de jengibre.

4.1.2 Purificación del compuesto 6-gingerol

Para la purificación del compuesto 6-gingerol, se tomaron 2 gr del extracto metanólico concentrado, los cuales se colocaron en una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria Sílica 60 con ancho de malla entre 0.04-0.063 mm (Macherey Nagel, Alemania) con Hexano al 100% para llevar a cabo el empaquetado (fig 32A), que consiste en la absorción total del solvente por parte de la sílica evitando burbujas de aire. La adición del extracto metanólico se realiza añadiendo en la parte superior de la sílica ya empaquetada, abriendo la llave inferior de la columna para que la muestra comience a correr a través de la misma para llevar a cabo el proceso de elución (fig 32B)

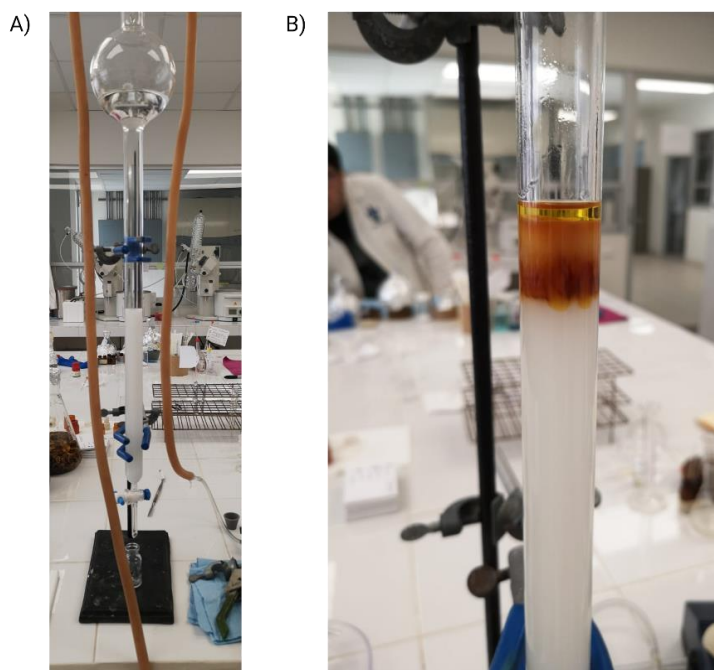


Fig. 32 Columna cromatográfica empacada con Sílica 60 y hexano 100% (A) y colocación del extracto metanólico en la parte superior de la columna y corrimiento para su absorción en sílica.

Se añadió una mezcla de solventes de Hexano:Acetato de etilo en proporción 60:40 (v/v), recuperando fracciones por goteo durante 5 días como las mostradas en la figura 33. Las fracciones con la misma elución se concentraron a 40°C hasta

eliminar el solvente presente, estos fueron almacenados al vacío a temperatura ambiente (24°C).



Fig. 33 Fracciones recuperadas de la columna cromatográfica.

4.1.3 Elucidación y caracterización de 6-gingerol

La pureza del 6-gingerol fue verificada mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de gel de sílice con indicador fluorescente F254 (TLC gel de sílice 55 60 F254) usando un sistema de disolvente de n-hexano: acetato de etilo (60:40 v/v) como el representado en la figura 34A; se observaron manchas oscuras como las mostradas en la figura 34B en la placa de gel sílice al exponerlas en una cámara ultravioleta (UV) con una longitud de onda corta (254 nm). Como resultado al comparar el corrimiento de las muestras en la placa de sílice, de determino de manera visual si era el mismo compuesto o si eran distintos, como las que se pueden apreciar en la figura 34C, en donde podemos determinar que es el mismo compuesto ya que presentan el mismo corrimiento.

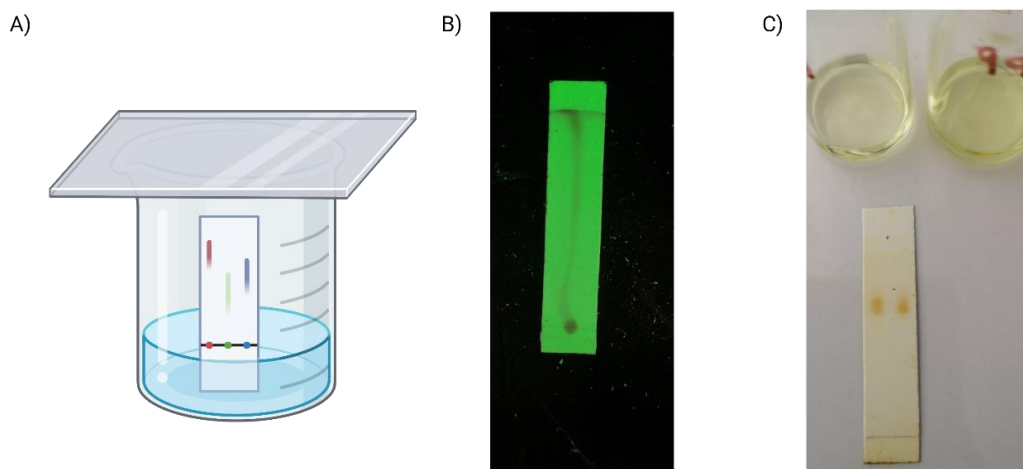


Fig. 34 A) Diagrama de funcionamiento de cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en ingles), B) Placa de sílice con un compuesto eluído visto en una cámara ultravioleta y C) Placa de sílice con dos compuestos eluídos.

Para corroborar la síntesis del compuesto 6-gingerol la técnica espectroscópica no destructiva Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fue implementada, utilizando un equipo de RMN de 500 MHz de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE. UU.)

como el que se muestra en la figura 35A; utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como estándar. Se obtuvieron los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , los cuales lucen como el mostrado en la figura 35 B, este posteriormente fue analizado e interpretado con ayuda del Software MestReNova 9.1.0, para poder percibir con mayor claridad las señales obtenidas.

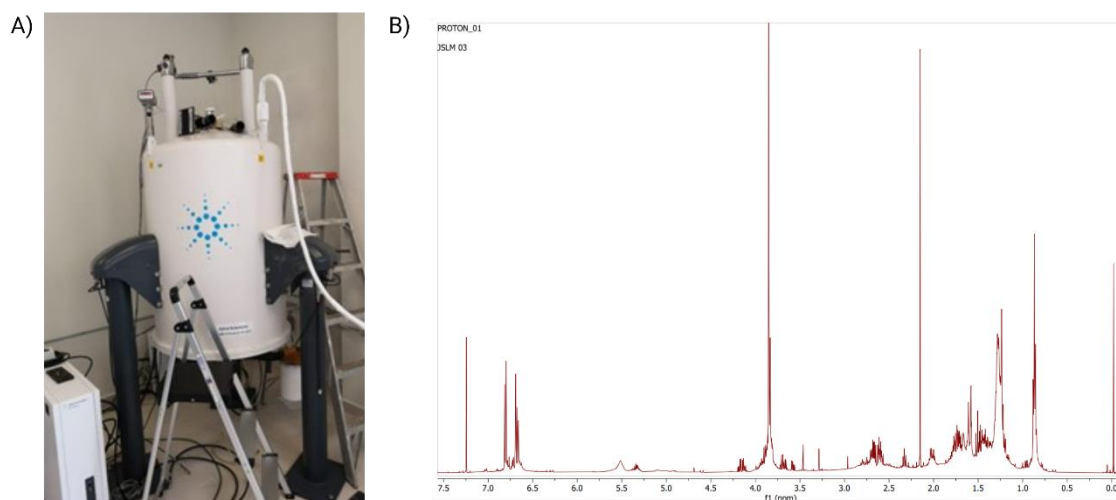


Fig. 35 A) Espectrofotómetro de RMN de 500 MHz Agilent Technologies y B) Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H

4.2 Diseño de experimentos para la elaboración de nanopartículas

En la elaboración de nanopartículas existen múltiples parámetros que pueden dar como resultado variaciones en el tamaño de partícula, potencial zeta, polidispersión o porcentaje de liberación de proteína variable [16]. Los parámetros que pueden ser modificados y que afectan el tamaño de partícula y características superficiales son pH, método de agitación y concentración quitosano/tripolifosfato [14, 21, 171]. La técnica utilizada para la elaboración de nanopartículas fue la de gelificación iónica descrita por Calvo et al. en 1997 [18], basado en lo descrito previamente por Bodmeier, Oh y Prammar [88] la cual se basa en lograr una concentración variable TPP:CS, añadiendo un volumen variable de solución de TPP gota a gota en una solución de CS en un matraz o vaso de precipitados con agitación constante, el pH de la solución puede ser regulada y el método de agitación puede variar. Los parámetros variables, que son concentración TPP:CS, pH y método de agitación fueron seleccionados a base de investigaciones previamente realizadas:

- El pH fue seleccionado debido al valor pK_a reportado entre los valores 6-7 que indica una solubilidad en medios ácidos, sugiriéndose así un pH de 4, 4.5, 4.75 y 5 con la finalidad de observar procesos de hinchamiento/encogimiento [22, 90].

- La proporción tripolifosfato/quitosano fue 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1, estos valores fueron propuestos de acuerdo a los resultados obtenidos previamente por Zhang et al. [44, 90].
- Los métodos de agitación fueron ultrasonido, agitación magnética por parrilla, homogeneizador y espumador comercial, todos estos sugeridos en base a los equipos encontrados con mayor frecuencia en los laboratorios de la Universidad Veracruzana.

Las variables utilizadas en este experimento asumen un número limitado de magnitudes, los cuales fueron 4 para cada parámetro y se muestran en la Tabla 4; estos valores fueron basados en el estado del arte y lo disponible en los laboratorios del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey campus Estado de México (ITESM CEM) y la Universidad Veracruzana. Esta investigación determinará el efecto de los métodos de agitación, pH y concentración quitosano/tripolifosfato sobre las propiedades de tamaño de partícula, polidispersión y potencial zeta.

Tabla 4. Variables y valores seleccionados en el diseño experimental.

Parámetros	Magnitudes
Método de Agitación	Ultrasonido, Agitador Magnético, Homogeneizador y Espumador
pH	4.0, 4.5, 4.75 y 5
Concentración Tripolifosfato/Quitosano	3:1, 4:1, 5:1 y 6:1

Al final del proceso de obtuvieron 64 experimentos diferentes combinando los valores mostrados en la tabla, el esquema de las posibles combinaciones se muestra a continuación en la figura 36. Las pruebas fueron realizadas por triplicado para lograr mayor veracidad en los resultados finales.

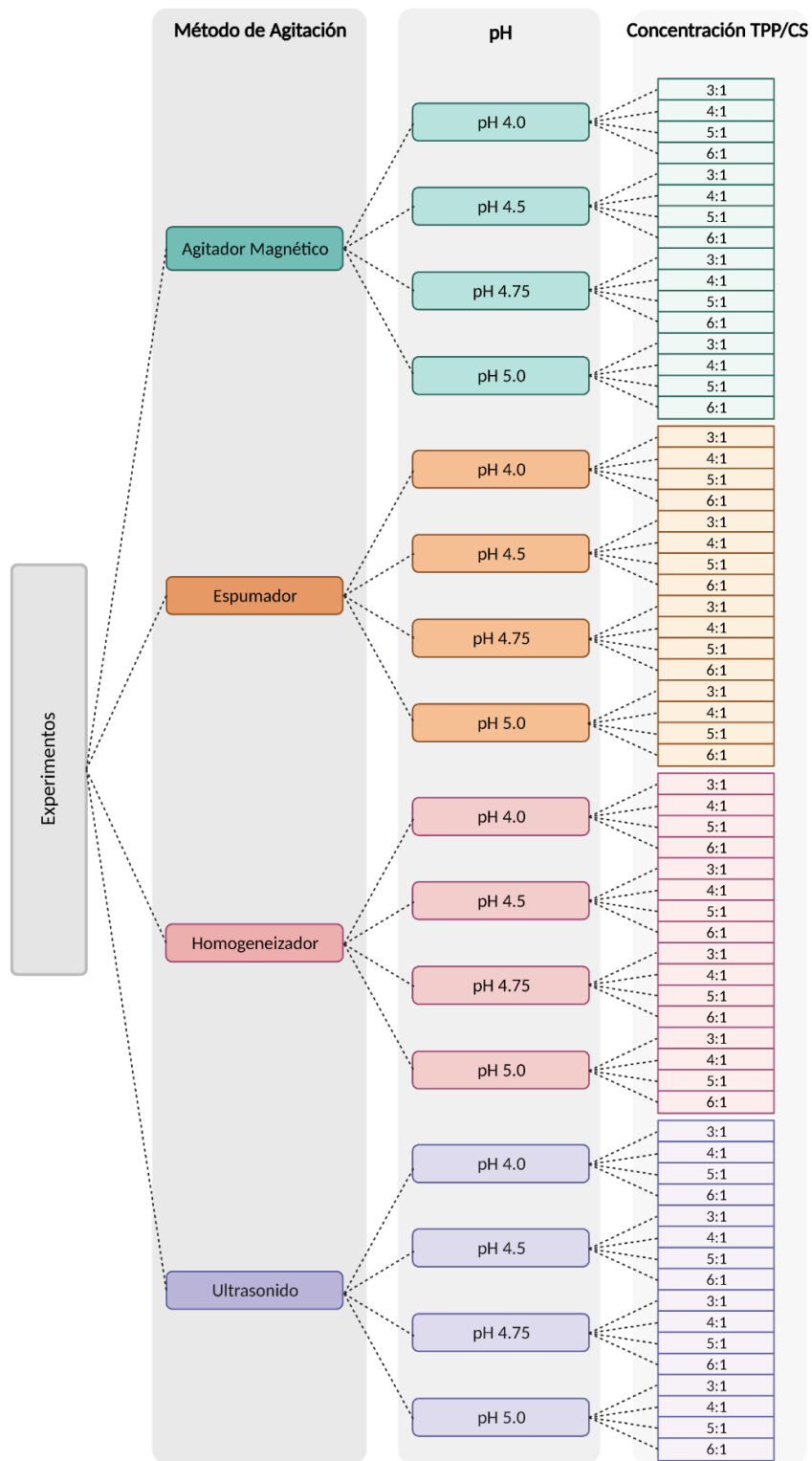


Fig. 36 Diagrama de combinaciones de variables para el desarrollo de experimentos posibles.

4.2.1 Preparación de nanopartículas

Las nanopartículas de quitosano (CSNP) fueron elaboradas siguiendo dos técnicas diferentes, estas fueron las reportadas por Calvo et al. [18] y el grupo iGEM TEC CEM 2018 (grupo iGEM campus CEM del Instituto Tecnológico y de estudios superiores de Monterrey); como resultado fue sugerida una técnica modificada basada en las dos técnicas mencionadas previamente. La técnica planteada por Calvo et al en 1997 que se muestra en la fig. 37 consistió en añadir un volumen variable de la solución de TPP (0,25, 1,0, 2,0, 2,5 y 3 ml) a diversas concentraciones [0.05%, 0.1%, 0.5% y 1% (p / v)]; a 5 ml de la solución de CS a diversas concentraciones CS [0.05%, 0.1%, 0.5% y 1% (p / v)] en ácido acético 1 M con agitación magnética a temperatura ambiente.

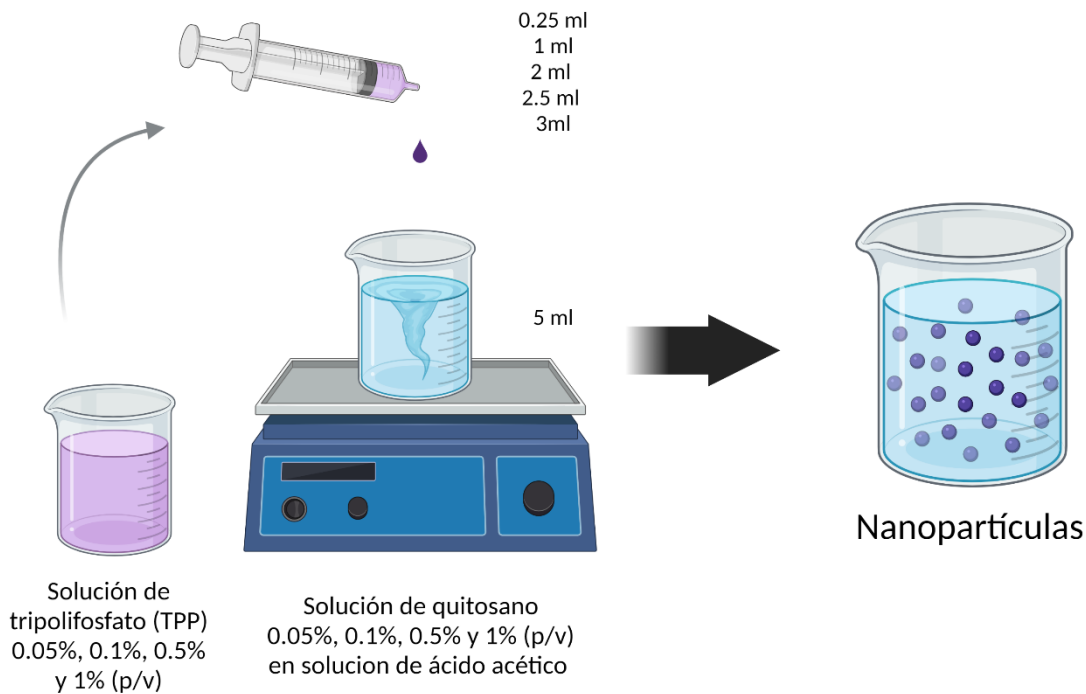


Fig. 37 Esquema general de creación de nanopartículas de quitosano planteado por Calvo et al en 1997 (creado con BioRender.com)

El grupo iGEM TEC CEM en 2018 desarrolló nanopartículas de quitosano-tripolifosfato siguiendo la técnica mostrada en la fig. 38 y descrita a continuación:

1. Preparar una solución de quitosano, pesando 30 mg de quitosano de bajo peso molecular para después mezclar en 10 ml de agua destilada, obteniendo así una concentración final de la solución de 3mg/ml.

2. Añadir 100 μ l de ácido acético 1 M en agitación continua a 1100 rpm con ayuda de un agitador magnético; ajustar el pH a 6.5 añadiendo solución de hidróxido de sodio 1 M. Validar pH con un potenciómetro.
3. Preparar una solución de tripolifosfato pesando 10 mg y añadiéndolos a 10 ml de agua destilada para lograr una concentración final de 1 mg/ml.
4. Colocar 1 ml de la solución de quitosano regulada a pH 6 en un vaso de precipitados y mantener en agitación continua a una velocidad de 1100 rpm.
5. Añadir 1 ml de solución de tripolifosfato gota a gota y mantener la agitación por 1 hora.

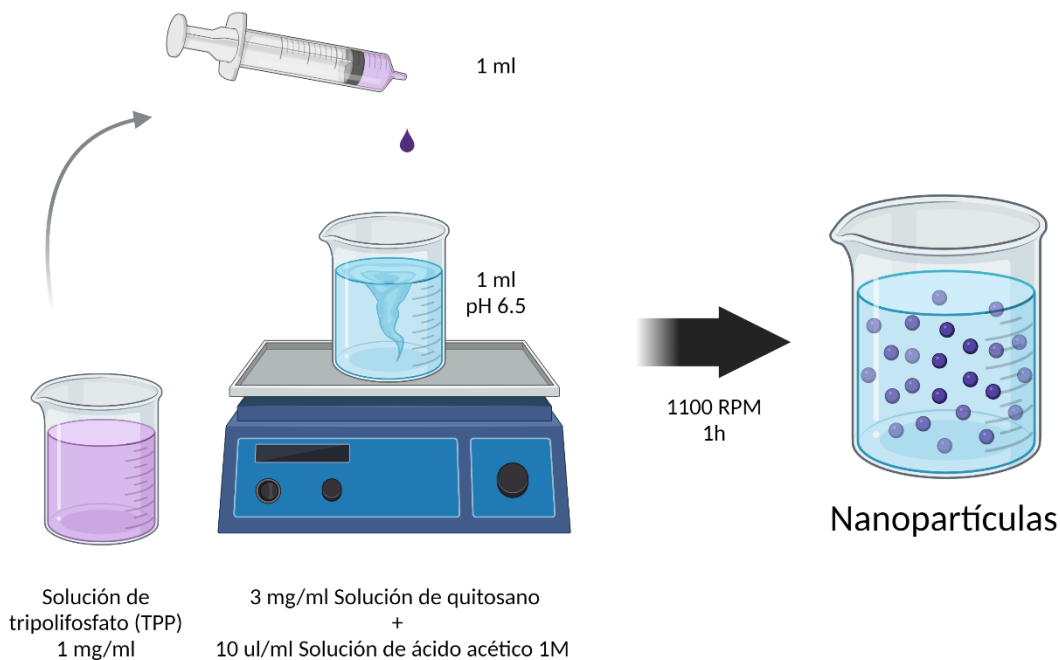


Fig. 38 Esquema general de creación de nanopartículas de quitosano planteado por iGEM TEC CEM 2018 (creado con BioRender.com).

Como resultado del análisis de las técnicas anteriores fueron sugeridos algunos cambios representados en la fig. 39 y descritos a continuación:

1. Preparar una solución de quitosano, pesando 30 mg de quitosano de bajo peso molecular (50-190 kDa) marca comercial Sigma Aldrich®, para después mezclar en 10 ml de agua destilada, obteniendo así una concentración final de la solución de 3mg/ml.
2. Añadir 30 μ l de ácido acético glacial ACS (95% pureza) a una concentración 1 M en agitación continua a 1100 rpm con ayuda de un agitador magnético hasta solubilizar el quitosano; ajustar el pH al adecuado (4.0, 4.5, 4.75 y 5.0)

- de acuerdo sea el caso, añadiendo solución de hidróxido de sodio en escamas grado reactivo en solución 1M. Validar pH con un potenciómetro.
3. Preparar una solución de tripolifosfato pesando 10 mg del reactivo grado técnico con pureza del 85% de la marca comercial Sigma-Aldrich® y añadiéndolos a 10 ml de agua destilada para lograr una concentración final de 1 mg/ml.
 4. Colocar 1 ml de la solución de quitosano regulada a pH 6 en un vaso de precipitados y mantener en agitación continua con agitador magnético a 1100 rpm, homogeneizador a 9,000 rpm, espumador a velocidad única de 14,000 rpm o ultrasonido a 20kHz a una 55 de amplitud.
 5. Añadir 3 ml de solución de tripolifosfato gota a gota con ayuda de una jeringa para obtener una concentración 3:1 de TPP: CS. Para las demás soluciones añadir 4, 5, 6 ml de solución de Tripolifosfato para lograr las concentraciones 4:1, 5:1, 6:1 respectivamente.
 6. Mantener la agitación durante 1h en caso de ocupar agitador magnético, 5 min con uso de homogeneizador, 10 min con espumador y 500 segundos con ultrasonido.
 7. Tomar la solución final con una jeringa y acoplar un filtro de jeringa de celulosa de 0.45 y 0.22 μm y colocar en tubos para centrifuga tipo Falcon®.
 8. Centrifugar a 10,000 \times g durante 30 min a temperatura ambiente.
 9. Retirar cuidadosamente la capa sobrenadante y suspender en tampón fosfato salino (Solución PBS) con un pH 7.4
 10. Repetir el proceso por lo menos 2 veces más, para obtener resultados por triplicado.

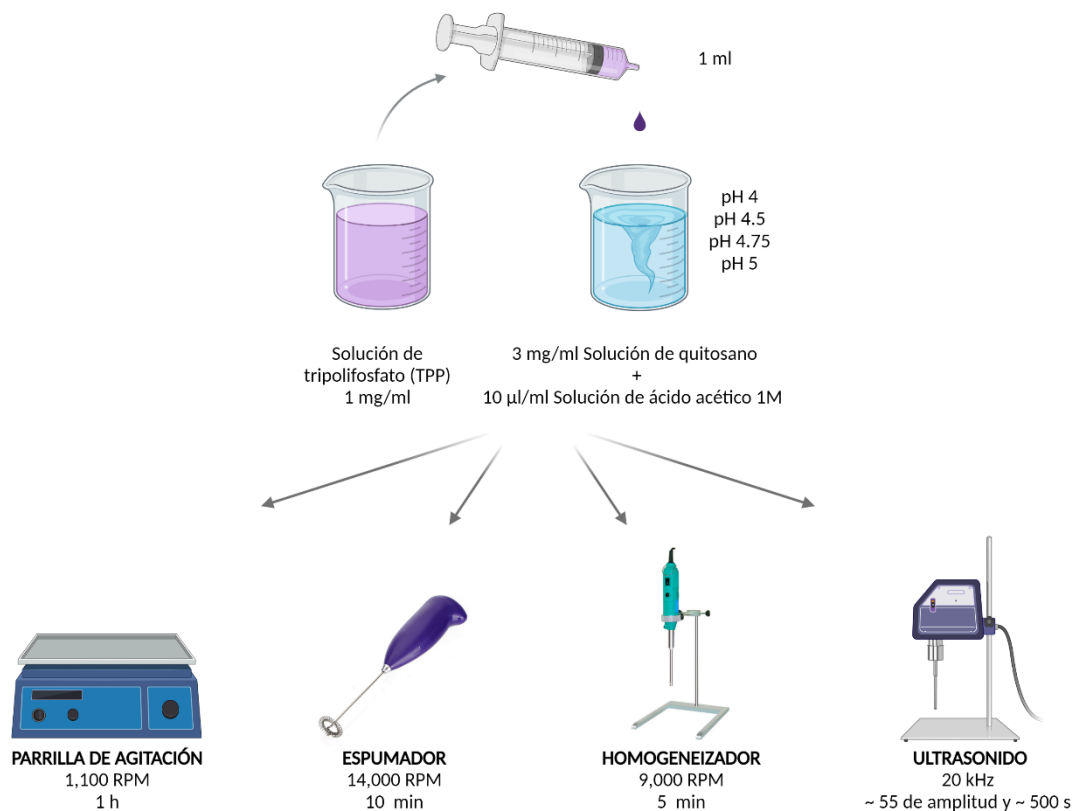


Fig. 39 Esquema general de creación de nanopartículas de quitosano técnica modificada. (creado con BioRender.com)

Se determinaron parámetros de tiempo y velocidad diferentes dependiendo de cada uno de los métodos de agitación utilizados (agitación magnética, espumador, homogeneizador y ultrasonido). Para las nanopartículas de quitosano realizadas con agitación magnética fue empleada una velocidad de 1,100 rpm durante 1 hora en una parrilla de agitación digital de cerámica mostrada en la figura 40A (SP131015, Thermo Scientific, Malasia); para las nanopartículas realizadas con espumador fue empleada una velocidad fija de 14,000 RPM durante 10 min con un espumador comercial mostrado en la figura 40B (Zulay Kitchen, Florida, EE.UU.); las nanopartículas realizadas con homogeneizador se realizaron agitando a 9,000 RPM con la ayuda de un homogeneizador como el mostrado en la fig. 40C (D500, Wiggen Hausser, Alemania) durante 5 minutos; y finalmente las nanopartículas por ultrasonido requirieron un procesador ultrasónico de 750 vatios (Cole Parmer, Illinois, EE.UU.) operando a 20 kHz mostrado en la fig. 40D, se sometieron a ultrasonido 5 ml de la solución final de quitosano-TPP colocadas en vidrio universal (vidrio de 10 ml) a temperatura ambiente en modo continuo, ~ 55 de amplitud y ~ 500 s mientras la sonda se sumergía 1 cm en la muestra [85].

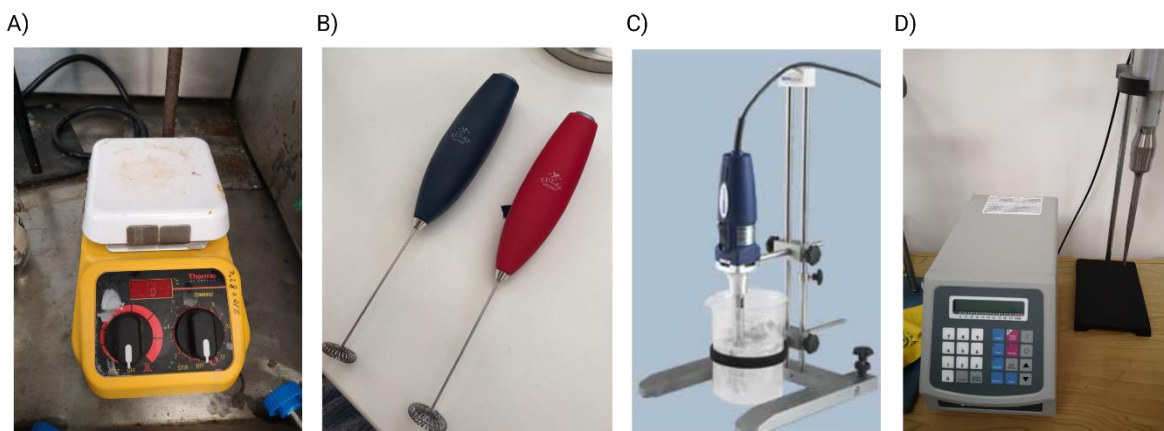


Fig. 40 A) Parrilla con agitación Thermo-Scientific SP131015, B) Espumador comercial marca Zulay Kitchen, C) Homogeneizador modelo D500 de Wiggan Hauser y D) Procesador ultrasónico Cole Parmer de 750 Watt.

Las nanopartículas funcionalizadas con el compuesto 6-gingerol se realizaron basándose en la técnica descrita por [172], en donde se realizan una emulsión con la solución de quitosano al añadir la oleorresina a una velocidad de al menos 13,000 rpm. La técnica de gelificación iontrópica ocupada fue la misma que la empleada en la elaboración de nanopartículas de quitosano sin funcionalizar, como se muestra en la fig. 41 y que se describe a continuación:

1. Preparar una solución de quitosano, pesando 15 mg de quitosano de bajo peso molecular (50-190 kDa) marca comercial Sigma Aldrich®, para después mezclar en 5 ml de agua destilada, obteniendo así una concentración final de la solución de 3mg/ml.
2. Añadir 30 μ l de ácido acético glacial ACS (95% pureza) a una concentración 1 M en agitación continua a 1100 rpm con ayuda de un agitador magnético hasta solubilizar el quitosano; ajustar el pH al adecuado (4.0, 4.5, 4.75 y 5.0) de acuerdo sea el caso, añadiendo solución de hidróxido de sodio en escamas grado reactivo en solución 1M. Validar pH con un potenciómetro.
3. Realiza una emulsión aceite en agua, al añadir 7 μ g de oleorresina en la solución de quitosano previamente realizada mediante agitación a una velocidad de 14,000 rpm con ayuda de un espumador comercial (Zulay kitchen) durante 10 min.
4. Preparar una solución de tripolifosfato pesando 5 mg del reactivo grado técnico con pureza del 85% de la marca comercial Sigma-Aldrich® y añadiéndolos a 5 ml de agua destilada para lograr una concentración final de 1 mg/ml.
5. Colocar .5 ml de la solución de quitosano regulada a pH 6 en un vaso de precipitados y mantener en agitación continua con agitador magnético a 1100 rpm o espumador a velocidad única de 14,000 rpm.

6. Añadir 1.5 ml de solución de tripolifosfato gota a gota con ayuda de una jeringa para obtener una concentración 3:1 de TPP: CS. Para las demás soluciones añadir 4, 5, 6 ml de solución de Tripolifosfato para lograr las concentraciones 4:1, 5:1, 6:1 respectivamente.
7. Mantener la agitación durante 1h en caso de ocupar agitador magnético, 5 min con uso de homogeneizador, 10 min con espumador y 500 segundos con ultrasonido.
8. Tomar la solución final con una jeringa y acoplar un filtro de jeringa de celulosa de 0.45 y 0.22 μm y colocar en tubos para centrifuga tipo Falcon®.
9. Centrifugar a 10,000 \times g durante 30 min a temperatura ambiente.
10. Retirar cuidadosamente la capa sobrenadante y suspender en tampón fosfato salino (Solución PBS) con un pH 7.4
11. Repetir el proceso por lo menos 2 veces más, para obtener resultados por triplicado.

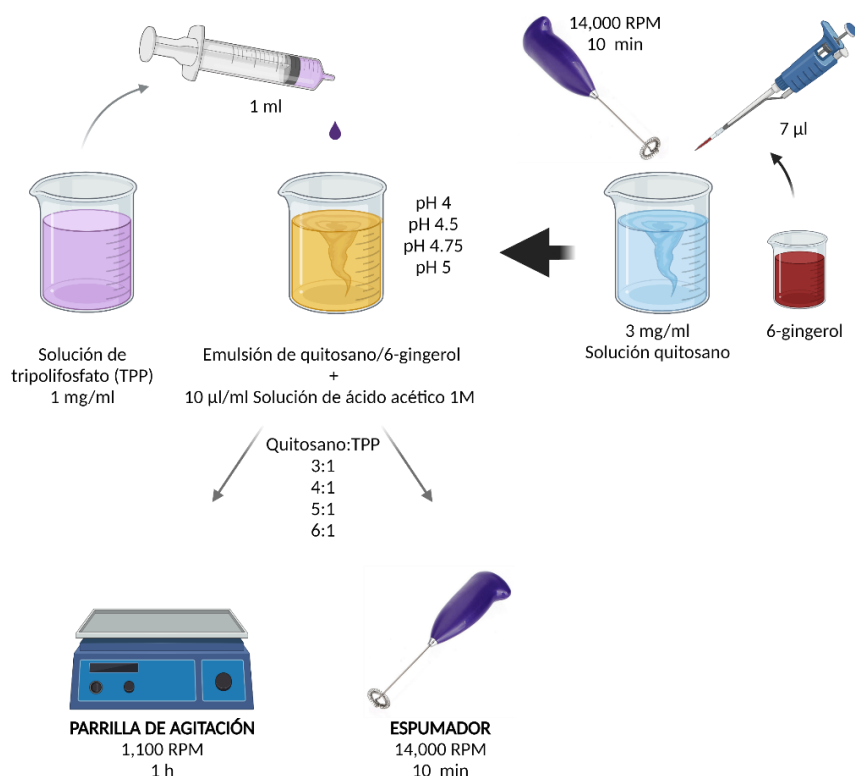


Fig. 41 Esquema general de creación de nanopartículas de quitosano funcionalizadas técnica modificada (creado con BioRender.com)

4.2.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de quitosano

El tamaño de partícula, distribución de tamaños y potencial Zeta, fueron determinados mediante dispersión dinámica de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) llevado a cabo en un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments,

Worcestershire, Reino Unido) mostrado en la fig.42A. Todas las muestras se filtraron previamente a la lectura a través de filtros de jeringa de 0.45 y 0.22 μm . Se utilizaron cubetas DTS1060 como la que se muestra en la fig.42B, realizando las mediciones a temperatura ambiente 25 $^{\circ}\text{C}$. Las muestras fueron leídas por triplicado.

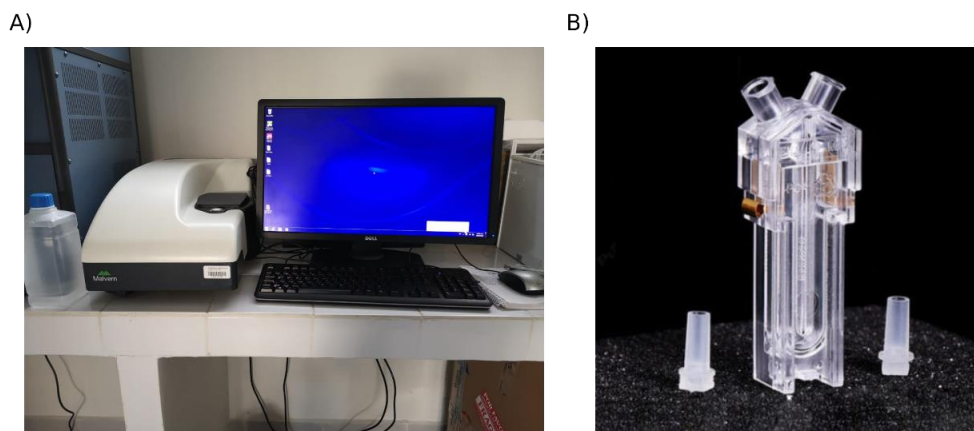


Fig. 42 A) Zetasizer Nano-ZS acoplado a computador y B) Cubeta DTS1060

El pH de las suspensiones de partículas se midió a temperatura ambiente utilizando un pHmetro Hanna HI8424 (Woonsocket, EE.UU.) como el que se muestra en la Fig.43, este fue calibrado con buffer de referencia de pH de 4.0, 7.0 y 10.0 (Wöhler, CDMX). Los pH utilizados para la elaboración de nanopartículas fueron 4, 4.5, 4.75 y 5, se utilizaron solución de NaOH y ácido acético, ambas 1 M.

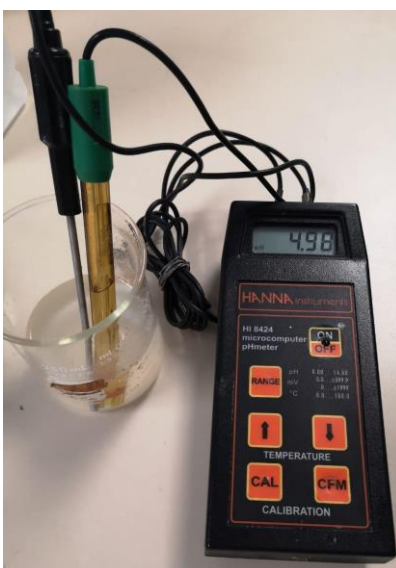


Fig. 43 Medidor Portátil de pH / mV Hanna HI8424.

Al final del proceso de lectura, se obtendrá un informe con los valores de potencial zeta, tamaño de partícula y polidispersión (PDI) como el que se muestra en la figura 44, los valores serán extraídos de manera manual.

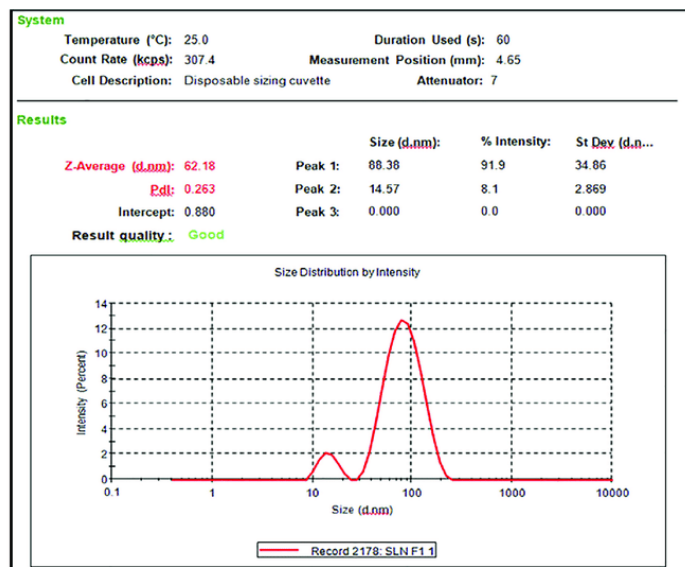


Fig. 44 Informe resultante de un análisis de potencial zeta del equipo Zetasizer nano-ZS.

4.2.3 Preparación de nanopartículas cargadas con albúmina de suero bovino (BSA).

Las nanopartículas con carga de albúmina de suero bovino (BSA) de marca Sigma-Aldrich® con una pureza $\geq 98\%$; se formaron tras la adición de una solución de TPP a una solución de quitosano con diversas concentraciones de BSA en un vaso de precipitados, se mezcla a 1100 rpm con ayuda de una parrilla de agitación. Los factores probados tenían concentración inicial de BSA (0,26, 0,52, 0,78, 1,04, 1,4 mg / ml), concentración de quitosano (3, 4, 5, 6 mg / ml) y pH (4, 4,5, 4,75, 5).

4.2.3.1 Derivación de curva estándar

Para derivar una curva estándar para una proteína estándar (BSA, por ejemplo) fue empleado un ensayo de Bradford. El ensayo de Bradford se utiliza para la determinación de concentración de proteínas en solución, se basa en el principio de colorante azul brillante G-250 de Coomassie en respuesta a concentraciones variables de proteína, lo que da como resultado dos cambios de color, rojo y azul. La técnica se puede observar en la figura 45, y se describe a continuación:

1. Preparar una solución madre con proteína BSA en agua desionizada en una proporción de 10 mg/ml.
2. Preparar 6 diluciones a partir de la solución madre según la tabla 5 que se muestra a continuación:

Tabla 5. Diluciones para derivación de curva estándar usando Buffer tampón fosfato salino (PBS). Adaptación a pequeña escala de técnica adjunta de Sigma Aldrich para ensayo de Bradford en las diluciones preparadas realizada por el equipo iGEM 2018 TecCem.

Dilución	Concentración de proteína estándar (mg/mL)	Volumen de solución madre (µL)	Volumen de agua desionizada (µL)	Volumen Final (µL)
0	0	0	100	100
1	0.26	2.6	97.4	100
2	0.52	5.2	94.8	100
3	0.78	7.8	92.2	100
4	1.04	10.4	89.6	100
5	1.4	14	86	100

3. Tomar de cada dilución 6.5 µL y colocar en un pocillo de la microplaca
4. Añadir 193.5 µL de reactivo de Bradford en cada uno de los pocillos con dilución para lograr un volumen final de 200 µL, dejar reaccionar por 5-45 minutos.
5. Leer la absorbancia de las diluciones a 595 nm

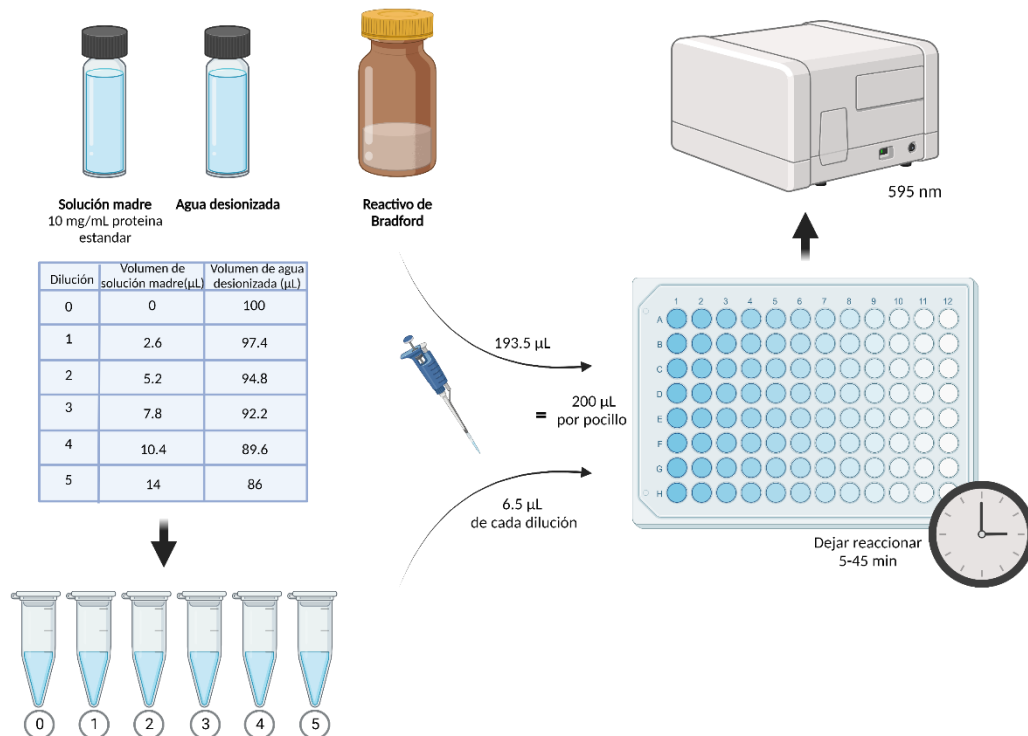


Fig. 45 Diagrama de proceso de realización de derivación de curva estándar por ensayo de Bradford.

El equipo utilizado para la lectura de las muestras fue un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Madrid, España) como el que se muestra en la figura 46A, con apoyo de una placa de 96 pocillos de 350 µL como la mostrada en la figura 46B, usando la dilución 0 como blanco. Las lecturas de absorbancia se representaron gráficamente frente a la concentración.

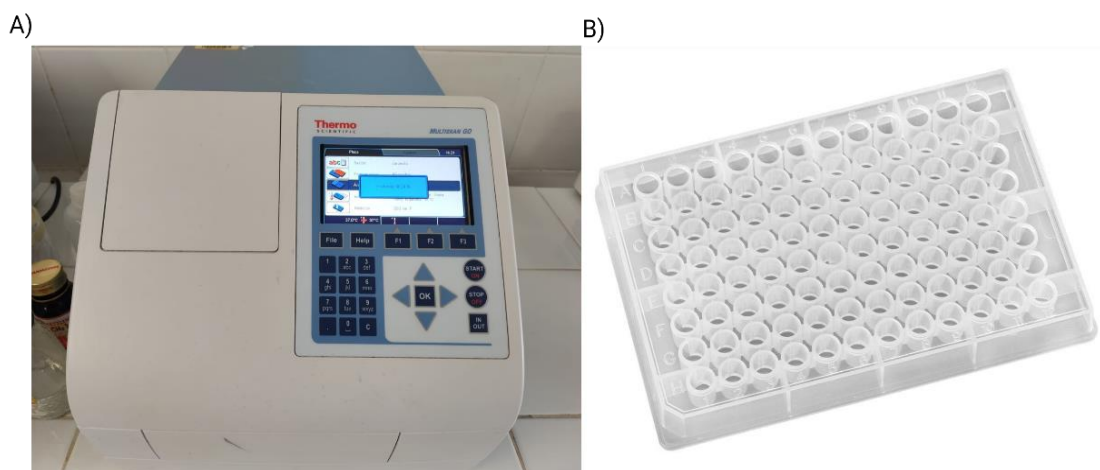


Fig. 46 A) Espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO y B) placa de 96 pocillos de 350 uL cada uno marca CTR Scientific.

Como resultado se obtuvo un gráfico de referencia, la cual fue utilizada para determinar la eficiencia de encapsulación de proteína y porcentaje de liberación, la cual se muestra en la figura 47. Los datos fueron procesados en el software Graph Prism 9, en donde se pudo obtener la regresión lineal y valor de R^2 .

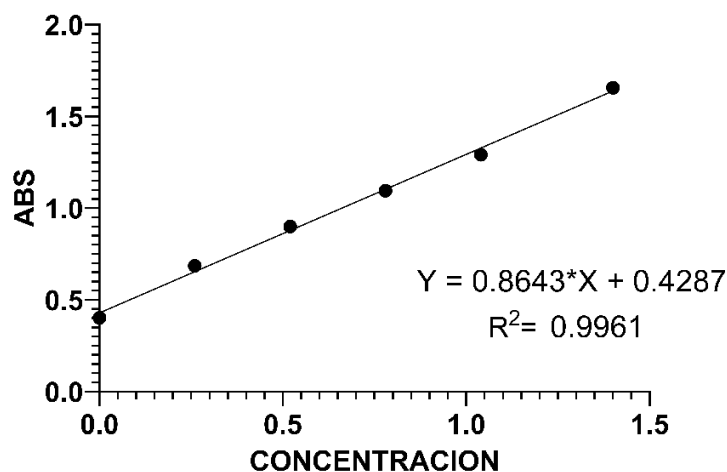


Fig. 47 Curva de calibración patrones de BSA usando el método de Bradford.

4.2.3.2 Evaluación de la eficiencia de encapsulación de proteína BSA en nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas cargadas con proteínas se prepararon en las mismas condiciones que las nanopartículas vacías (agitación, temperatura, pH y concentraciones de reactivo). Se utilizó una muestra de sobrenadantes de encapsulación vacíos como blanco. Se mezclaron volúmenes de sobrenadante (100, 97,4, 94,8, 92,2, 89,6 y 86 uL) con volúmenes de solución madre de BSA (0, 2,6, 5,2, 7,8, 10,4 y 14 uL) para obtener diluciones de concentraciones de proteína conocidas. Las nanopartículas de quitosano-TPP cargadas con BSA se transfirieron cuidadosamente a un microtubo de centrifuga de 1,5 ml después de la carga de proteínas. Las nanopartículas se separaron de la solución mediante ultra centrifugación a 13°C, 400 rpm durante 30 min (Fig. 48).

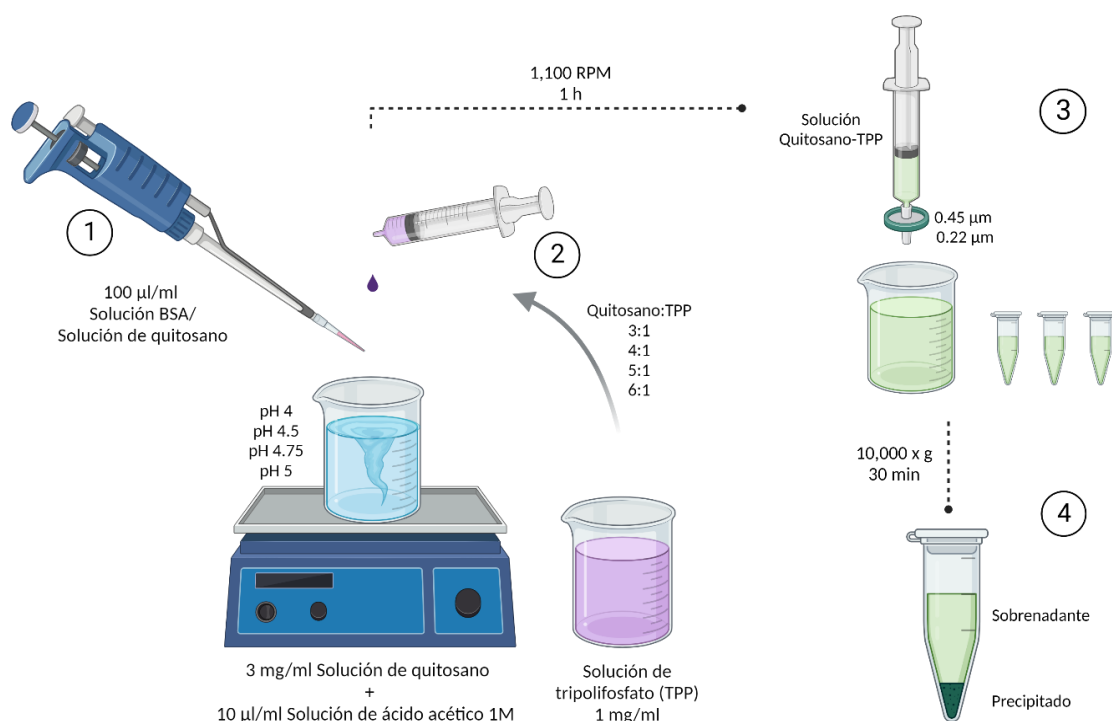


Fig. 48 Diagrama para encapsulación y recuperación de nanopartículas de quitosano con albumina de suero bovino encapsulado. (Creado en BioRender.com)

El sobrenadante de la centrifugación se recuperó cuidadosamente y se analizó con un espectrofotómetro UV a 595 nm usando el ensayo de proteínas de Bradford para derivar la curva. Se analizaron muestras por triplicado en cada dilución; la eficiencia de encapsulación de BSA (EE) se calculó usando la ecuación 6:

Ecuación [5]

$$EE = \frac{(Cantidad\ total\ de\ BSA - Cantidad\ libre\ de\ BSA\ en\ el\ sobrenadante)}{Cantidad\ Total\ BSA} \times 100$$

Para los estudios de liberación de proteínas, las nanopartículas de sedimento recuperadas en el procedimiento de encapsulación fueron resuspendidas al volumen original de 1 mL con buffer PBS pH 7.4. Se recolectaron 50 uL de cada muestra en diferentes tiempos de recolección especificados (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 h), estas se centrifugan a 20,000 rpm durante 20 min. Se añadió un volumen de 193.5 uL del reactivo de Bradford y se mezcló con 6.5 uL del sobrenadante resultado de la centrifugación previa, se mezcló suavemente con un Agitador Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Nueva York, EEUU). El tubo fue incubado a temperatura ambiente (24°C) por 20 minutos, para posteriormente transferir 50 µL a una microplaca de 96 pocillos y medir la absorbancia a 595 nm. Se calculo la concentración de proteínas en el sobrenadante utilizando la curva estándar derivada anteriormente, utilizando como blanco PBS pH 7,4 + reactivo de Bradford como se indicó anteriormente. Dado que ya conoce la eficiencia de encapsulación de proteínas, los cálculos de liberación de proteínas se pueden realizar con la ecuación 7:

$$\text{Liberación (\%)} = \frac{\text{Proteína libre en el sobrenadante}}{\text{Monto inicial en proteína encapsulada}} * 100$$

Ecuación [6]

4.3 Modelado computacional: parámetros farmacocinéticos.

El kit de herramientas de cálculo del proyecto en línea Molinspiration y DataWarrior de Osiris se utilizaron como exploradores de propiedades para verificar la fidelidad farmacéutica de 6-gingerol y quiflapon MK-591, MK-886 y Zileuteon como moléculas de comparación. El procedimiento a seguir se muestra en la figura 49.

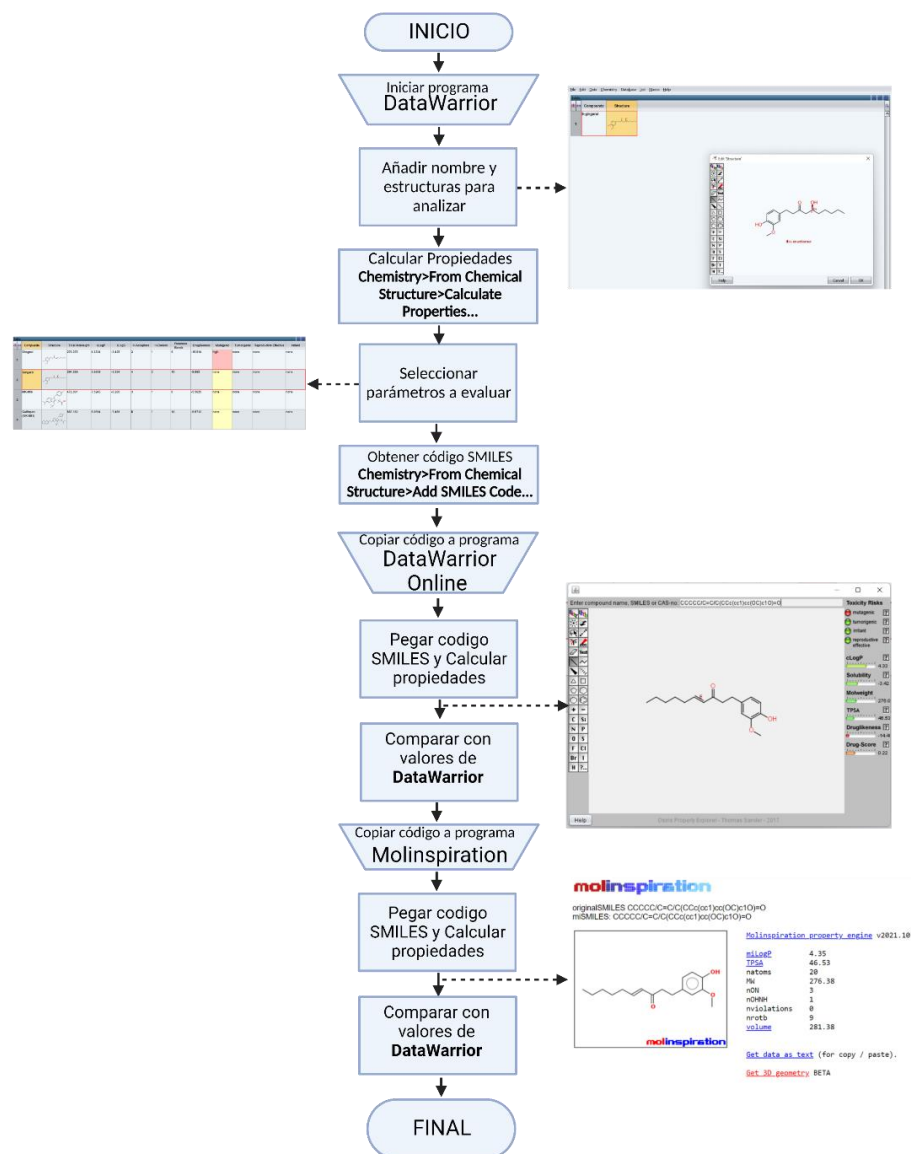


Fig. 49 Diagrama de flujo de proceso de cálculo de parámetros farmacocinéticos con programa DataWarrior y Molinspiration. (Creado en BioRender.com)

Se calcularon descriptores moleculares, como $m\text{LogP}$, $m\text{LogS}$, aceptores de enlaces de hidrógeno, donantes de enlaces de hidrógeno, masa molecular (MW), área de superficie topológica (TPSA), número de enlaces rotativos (n-ROTB) y violaciones de la regla de cinco de Lipinski. El porcentaje de absorción (% ABS) se calculó mediante la ecuación 8 según el método de Zhao et al.[173].

Ecuación [7]

$$\%ABS = 109 - 0.345 \times TPSA$$

Para el cálculo del potencial de toxicidad se utilizó el software de acceso libre Osiris DataWarrior para analizar los posibles parámetros de toxicidad del 6-gingerol y los compuestos de comparación, obteniendo los atributos del fármaco, como la toxicidad, la similitud del fármaco y la puntuación del fármaco.

4.3.1 Docking Molecular

La estructura de la proteína 5-LOX la cual se muestra en la figura 50A, se obtuvo del RCSB Protein Data Bank (PDB) con el código PDB 6N2W, siguiendo el diagrama de proceso de la figura 50B. Esta estructura cristalina viene con el ligando NDGA para realizar un acoplamiento dirigido en el sitio catalítico del complejo NDGA/6N2W.

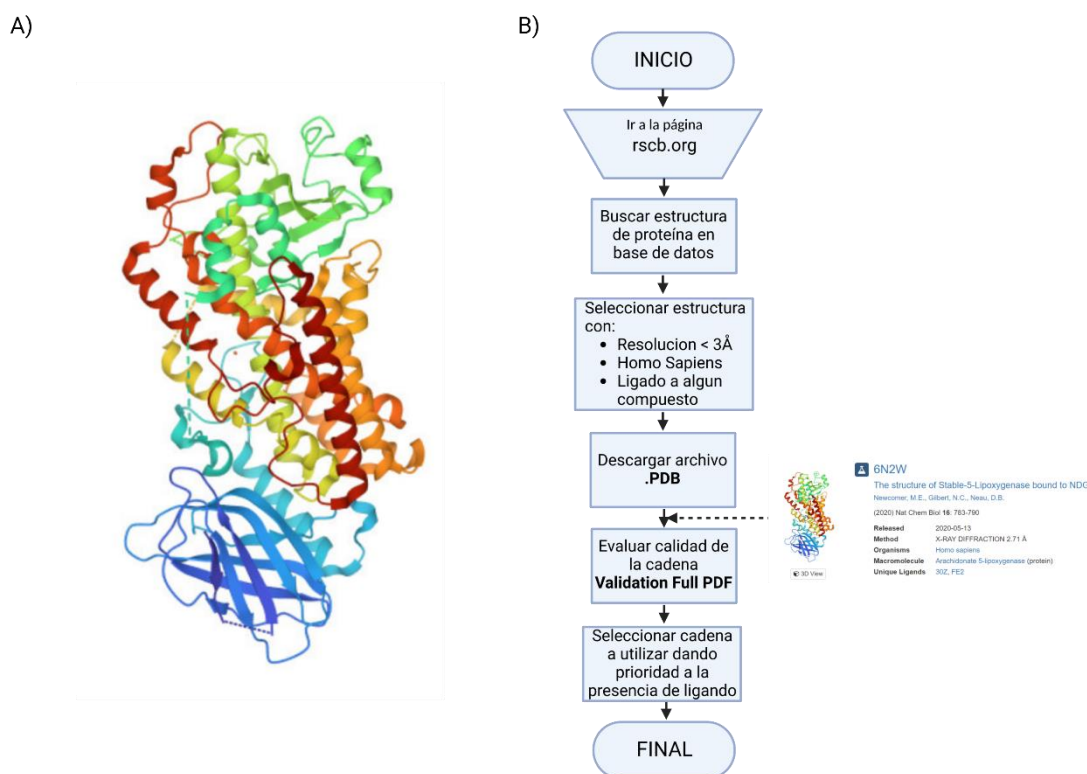


Fig. 50 A) Estructura cristalina de proteína 6N2W y B) Diagrama de flujo de proceso de selección y descarga de proteína. (Creado en BioRender.com)

Para la preparación de ligandos, la estructura de 6-gingerol, quiflapon, zileuteon y MK-886 se dibujó en ChemDraw 8.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, EE. UU.) y la geometría se optimizó utilizando la función de campo de fuerza MMFF94 utilizando el software Avogadro (<https://avogadro.cc>) como se representa en la figura 51A y 51B respectivamente. Todos los compuestos se guardaron como mol2 para estudios posteriores de acoplamiento.

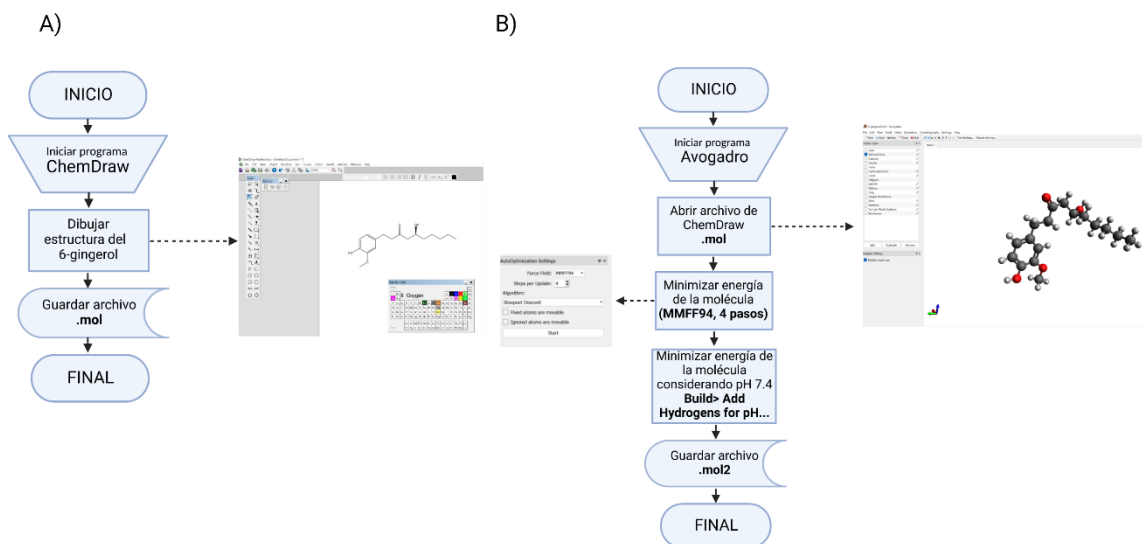


Fig. 51 A) Diagrama de flujo de dibujo de estructura 6-gingerol. y B) Diagrama de flujo de optimización de energía en el software Avogadro. (Creado en BioRender.com)

La preparación del receptor de proteínas se realizó con una estructura cristalográfica 3D de la araquidonato 5-lipoxigenasa se descargó del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) utilizando el cristal ID: 3O8Y con una resolución de 2,39 Å, el proceso de descarga de la proteína se muestra en la Figura. La proteína se preparó utilizando el software UCSF Chimera (v1.16, San Francisco, California, EE. UU.), se eliminaron las moléculas de agua y se agregaron los átomos de hidrógeno faltantes. El sitio activo presenta residuos clave como His-367, His-372, His-550 y Leu-673, que están directamente asociados con la inhibición de 5-LOX. Se eligió el sitio de unión de la cadena A para el acoplamiento. La estructura de ALOX5 no contiene un ligando cocrystalizado, por lo que se realizó un acoplamiento ciego comparando los diferentes bolsillos que se obtuvieron con DogSiteScorer. El proceso en el Software de Chimera se muestra en la figura 52.

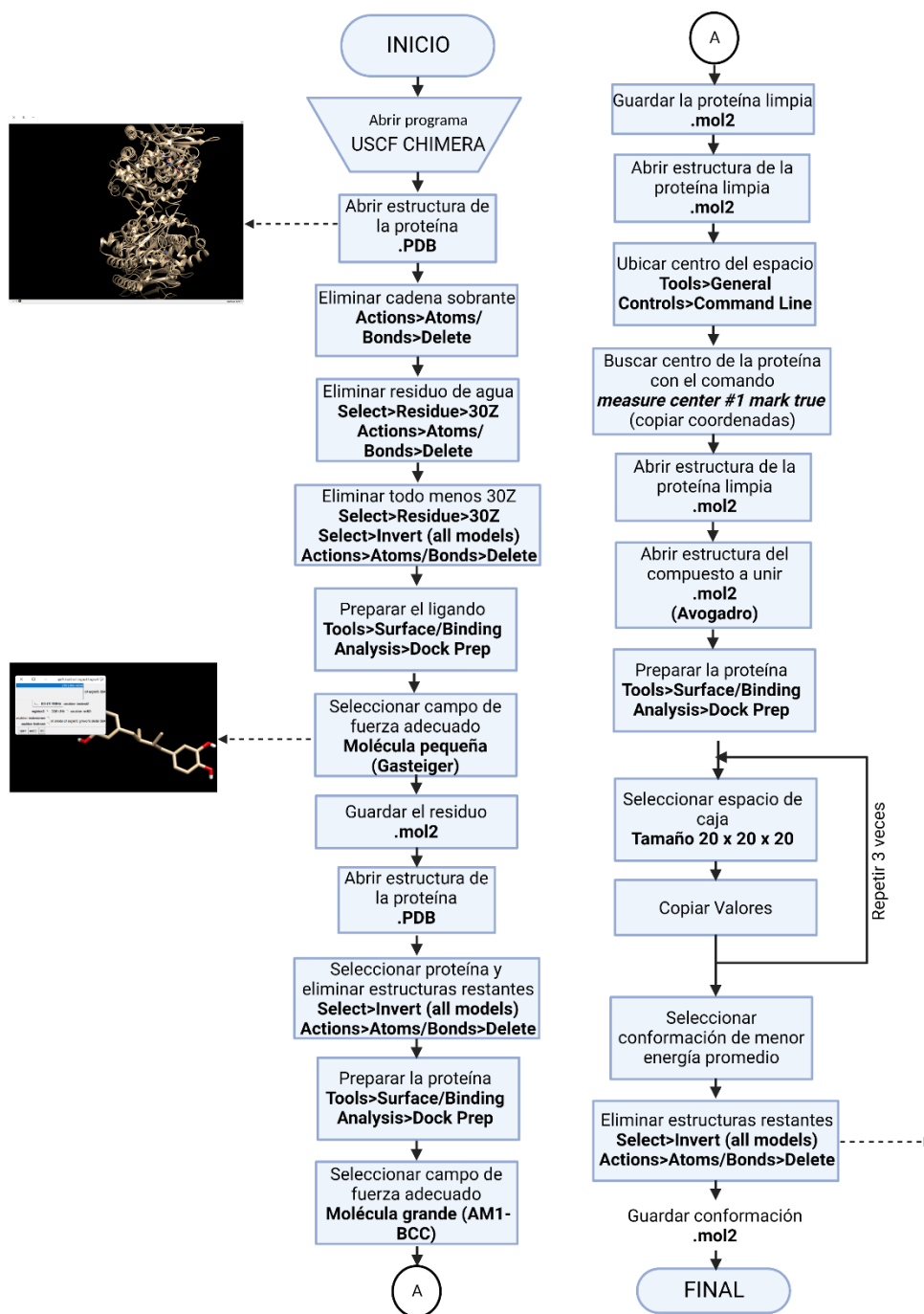


Fig. 52 Diagrama de flujo de proceso de preparación de proteína y receptor en el software Chimera (Creado en BioRender.com)

El procedimiento estándar para el acoplamiento molecular fue utilizar una proteína rígida (3O8Y) y un ligando flexible cuyos ángulos de torsión se identificaron (para diez carreras independientes por ligando). Se realizó un acoplamiento dirigido para cada uno de los ligandos en el bolsillo que tenía la puntuación de fármaco más alta obtenida de la predicción del software DogSiteScorer. Los estudios de acoplamiento

se realizaron con el programa UCSF Chimera. Se agregaron hidrógenos polares y cargas parciales de Gasteiger, y se creó una cuadrícula con las herramientas Autodock Vina en UCSF Chimera. Los resultados y el análisis del acoplamiento se visualizaron con Discovery Studio Visualizer. Al final del acoplamiento, se analizaron las mejores poses para el enlace de hidrógeno o interacciones π , así como su energía de unión al ligando libre (ΔG , kcal / mol), y los resultados se compararon con Zileuton porque es el único fármaco comercializado que se utiliza como inhibidor de 5-ALOX.

Para la predicción in silico de 6 sitios de metabolismo del gingerol (som) se utilizó el software Xenosite, el cual es un software en línea para predecir sitios metabólicos potenciales en estructuras químicas de xenobióticos y otras moléculas orgánicas. Este software propone los sitios atómicos donde las moléculas orgánicas pueden ser modificadas por las 9 principales isoenzimas de la enzima citocromo p450 (CYP450), que son: CYP1A2, CYP2B6, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C8, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, CYP2 y microsomas hepáticos humanos (HLM). La ventaja de este software es que el tiempo de ejecución es muy corto, y los resultados de los sitios de metabolismo de las moléculas se presentan mediante una escala de color que va del rojo al azul, donde el color corresponde a una probabilidad cero de metabolismo, el blanco corresponde a una probabilidad de observar un sitio de metabolismo aleatorio y el rojo corresponde a una probabilidad de 1 de que se considere un sitio de metabolismo.

CAPITULO 5. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 Extracción y purificación del compuesto 6-gingerol

La extracción y purificación del compuesto 6-gingerol es de importancia al ser un compuesto que depende de factores como el lugar y tipo de cultivo, permitiendo que los rendimientos finales del compuesto puedan variar [174, 175]. Las muestras frescas y secas se pesaron para determinar el peso de humedad, el cual es determinado al utilizar la ecuación 9, en donde el peso de la muestra seca expresado en gramos es restado del peso de la muestra fresca en gramos, el resultado obtenido se ocupó para determinar el contenido de humedad (%). El contenido de la humedad se refiere a la cantidad de agua contenida en una muestra en forma natural y se puede observar en la ecuación 10, en donde el Peso de la humedad es el valor previamente obtenido con la ecuación 9 y es dividido por el peso de la muestra fresca en gramos, el valor resultante es multiplicado por 100 y expresado como porcentaje.

Ecuación [8]

$$\text{Peso de la humedad} = \text{Peso de muestra fresca (g)} - \text{Peso muestra seca (g)}$$

Ecuación [9]

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{\text{Peso de la humedad (g)}}{\text{Peso de la muestra fresca (g)}} \times 100$$

La muestra seca recuperada, la cual se refiere a la cantidad de materia sin presencia de agua libre, es calculada utilizando la ecuación 11, en donde el peso de la muestra seca expresada en gramos es dividido por el peso de la muestra fresca en gramos, el valor resultante es multiplicado por 100 y expresado en porcentaje.

Ecuación [10]

$$\text{Muestra seca recuperada (\%)} = \frac{\text{Peso de muestra seca (g)}}{\text{Peso de muestra fresca (g)}} \times 100$$

El porcentaje de humedad reportado de cultivos en Nigeria e India es de hasta un 85% y un porcentaje de hasta el 15% en muestra seca recuperada [43, 86, 176–178]; mientras que, en cultivos realizados en México, Ecuador y algunas zonas del sur de India los valores fueron mayores alcanzando un valor de hasta 89% y, por lo tanto, 11% de muestra seca recuperada [174, 179]. El peso de la muestra fresca total fue de 52.6 kg o 52,600 g, alcanzando una reducción de hasta 10 veces al finalizar las 72h de secado con un peso de muestra seca total de 4.5094 kg o 4,509.4 gr. Estos valores se sustituyeron dentro de las ecuaciones 9, 10 y 11. El peso del contenido de humedad total como se muestra en la ecuación 12 fue de 48,090.6 g o 48.0906 Kg, mientras que el porcentaje de contenido de humedad total mostrado en la Ecuación 13 fue del 91.42% y el porcentaje de muestra seca total mostrado en la ecuación 14 fue del 8.57%.

Ecuación [11]

$$\text{Peso de la humedad} = 52,600 \text{ g} - 4,509.4 \text{ g} = 48,090.6 \text{ g}$$

Ecuación [12]

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{48,090.6 \text{ g}}{52,600 \text{ g}} \times 100 = 91.42\%$$

Ecuación [13]

$$\text{Muestra seca recuperada (\%)} = \frac{4,509.4 \text{ g}}{52,600 \text{ g}} \times 100 = 8.57\%$$

Al comparar los resultados con lo previamente publicado por otros autores, se observa que el peso de la humedad y contenido de humedad (%) son mayores, mientras que la muestra seca recuperada (%) es menor. Esta diferencia observada puede ser atribuida a las diferencias en composición y propiedades texturales del rizoma de jengibre utilizado para cada investigación, ya que las variaciones de las propiedades físicas y químicas del jengibre están relacionadas con el estado de maduración y con factores asociados con su origen y con las condiciones de cultivo [174, 178].

Las rodajas secas de jengibre se someten a una extracción metanólica, la cual consiste en colocar material vegetal en un contenedor para ser cubierto por metanol y obtener como resultado los aceites grasos esencial u oleorresina presente en el jengibre. El rendimiento del aceite esencial se determina utilizando la ecuación 15, en donde la cantidad de aceite esencial obtenido en gramos es dividida por la materia prima utilizada en gramos, el resultado es multiplicado por 100.

Ecuación [14]

$$\text{Rendimiento del aceite esencial (\%)} = \frac{\text{Cantidad de aceite esencial obtenido (g)}}{\text{Materia Prima utilizada (g)}} \times 100$$

En experimentos anteriores se reportó un rendimiento entre 6.3-14.6% de oleorresina de color café oscuro obtenido de rizoma de jengibre [25, 145, 180]. Lo cual coincide con lo obtenido al realizar la extracción metanólica que se muestra en la figura 53A, en donde se observa la obtención de un solvente rojo oscuro, sin embargo, al concentrar la solución recuperada se observa un líquido con múltiples fases, el cual se observa en la figura 53B. La presencia de múltiples fases se atribuye a la presencia de agua y es eliminada al adicionar sulfato de sodio (Na_2SO_4) y realizar un posterior al filtrado. La oleorresina concentrada tiene un aroma picante además de ser de color café oscuro con tonos amarillentos como se muestra en la figura 53C; el volumen total de oleorresina obtenido fue de 376.59 g. El rendimiento total del aceite esencial fue calculado usando la ecuación 15 previamente descrita, sustituyendo los valores de cantidad de aceite esencial obtenido (376.59 g) y materia prima utilizada (4,509.4 g) como se muestra en la ecuación 16, resultando un rendimiento de 8.35%.

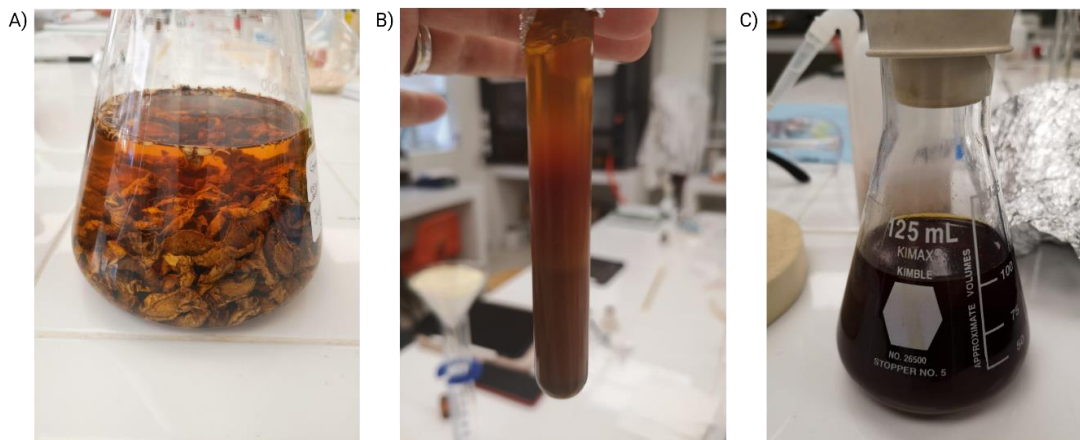


Fig. 53 A) Jengibre (*Zingiber Officinale*) en metanol, B) Extracción metanólica con múltiples fases visibles y C) Extracción metanólica de Jengibre.

Ecuación [15]

$$\text{Rendimiento del aceite esencial}(\%) = \frac{376.59 \text{ g}}{4,509.4 \text{ g}} \times 100 = 8.35\%$$

La oleorresina recuperada se procesó en una columna cromatográfica, ya que al ser la oleorresina una mezcla de diversos componentes, este tipo de cromatografía nos facilita la separación y análisis de los componentes. Una vez recuperadas las fracciones de los componentes como se muestran en la figura 54A, se analizan con cromatografía en capa fina (TLC) para determinar si las fracciones presentan un mismo corrimiento, como se observa en la figura 54B, en donde se observan dos compuestos con un mismo corrimiento; una vez comprobado que tienen el mismo corrimiento se juntan las fracciones.



Fig. 54 A) Fracciones recolectadas y B) Placa de sílica para cromatografía en capa fina con corrimiento de dos puntos de fracciones recolectadas.

Al finalizar la extracción de las fracciones recolectadas, estas se concentraron para facilitar la presencia de impurezas, las cuales fueron identificadas al aparecer más de una zona oscura en la placa de sílica para cromatografía. De un total de 8

compuestos obtenidos que se muestran en la figura 55, se puede observar en la figura 55A el corrimiento de los compuestos 1 y 2, de los cuales el compuesto 1 muestra la presencia de 5 compuestos distintos, mientras que el compuesto 2 muestra únicamente 2; en la figura 55B, se observan los compuestos 3, 4 y 5, los cuales muestran una única zona oscura alargada; en la figura 55C se observa el nuevamente el compuesto 5, el cual es comparado con el compuesto 6, mostrando una sola zona oscura mientras que el compuesto 6 está conformado por 4; por último se puede observar en la figura 55D el compuesto 7 conformado a su vez por 3 compuestos y el compuesto 8 conformado por dos compuestos.

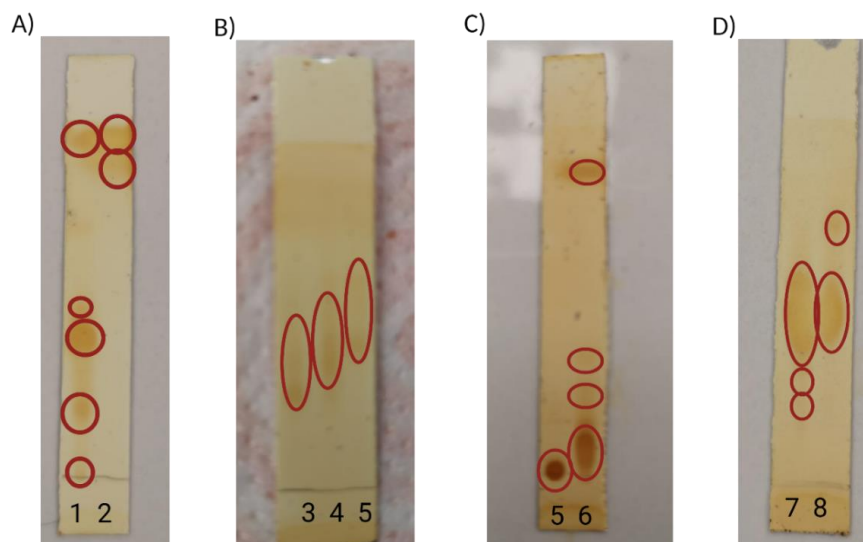


Fig. 55 A) Compuesto 1 y 2; B) Compuesto 3,4 y 5; C) Compuesto 5 y 6; y compuesto 7 y 8 en placas de sílica para cromatografía en capa fina (TLC)

Debido a la presencia de múltiples compuestos se optó por analizar aquellos que solo mostraban una zona oscura, descartando así los compuestos 1,2,6,7 y 8. Los compuestos 3,4 y 5 presentaron un total de muestra de 28.6, 264.2 y 122.6 mg respectivamente, estos valores fueron sustituidos en la ecuación 17 para determinar el rendimiento del aceite esencial (%) como se muestra en la tabla 6, utilizando como materia prima el valor de 2 gr, la cual fue la cantidad empleada en la elaboración de la cromatografía en columna. Los rendimientos finales fueron del 1.43%, 13.21% y 6.13% respectivamente. Los compuestos obtenidos presentaron una coloración amarilla como se muestra en la figura 56, color asociado a el compuesto 6-gingerol, el cual sería un color amarillo intenso.[24, 31, 150, 181]

Ecuación [16]

$$\text{Rendimiento del aceite esencial}(\%) = \frac{\text{Cantidad de aceite esencial obtenido (g)}}{\text{Materia Prima utilizada (g)}} \times 100$$

Tabla 6. Compuestos purificados obtenidos por el método de cromatografía en columna y su rendimiento del aceite esencial (%)

Compuesto	Cantidad de aceite esencial obtenido (g)	Materia prima utilizada (g)	Rendimiento del aceite esencial (%)
3	.0286	2 gr	1.43
4	.2642		13.21
5	.1226		6.13

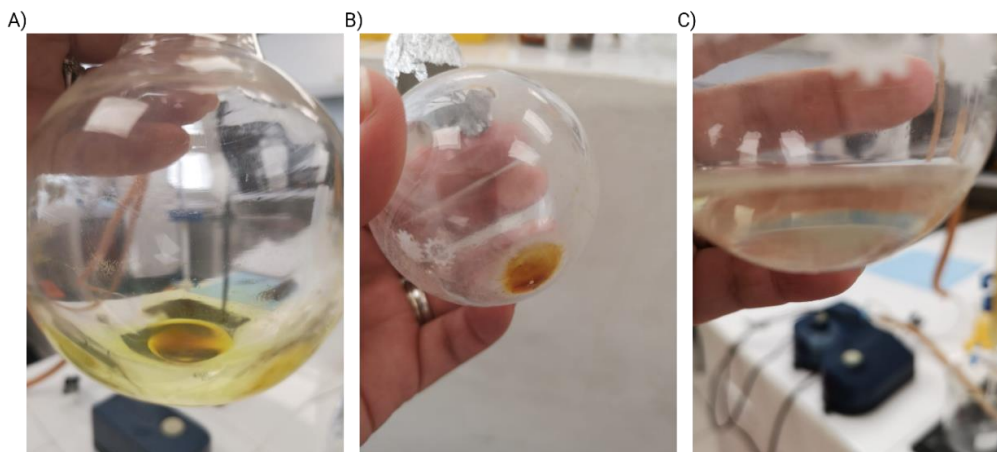


Fig. 56 A) Compuesto recolectado 3, B) Compuesto recolectado 4 y C) Compuesto recolectado 5

5.1.1 Elucidación del compuesto 6 gingerol

Los compuestos 3,4 y 5 recolectados por cromatografía en columna fueron elucidados mediante resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H , en donde se obtienen espectros que al ser analizadas apoyan a la identificación de compuestos con una posición específica y en conjunto forman una molécula [68, 182, 183]. El espectro obtenido por Gan et al. [184] que se muestra en la figura 57A se empleó como referencia para la determinación de los compuestos previamente obtenidos. El compuesto 3, el cual se observa en la figura 57B muestra una zona la cual está marcada por un rectángulo de color verde, el cual comparado con la figura de referencia 57A se observan múltiples señales adicionales, las cuales, al ser señales anchas con picos amplios, es traducido como resultados de baja calidad o reproducibilidad [185, 186]; sin embargo, al observar el espectro obtenido del compuesto 4 en la figura 57C, se observan las mismas señales que el espectro de referencia. El compuesto 5 se observa en la figura 57D en donde se puede observar que a pesar de no mostrar ruido carece de una señal la cual es mostrada tanto en el espectro del compuesto como en el espectro de referencia por un rectángulo de color naranja.

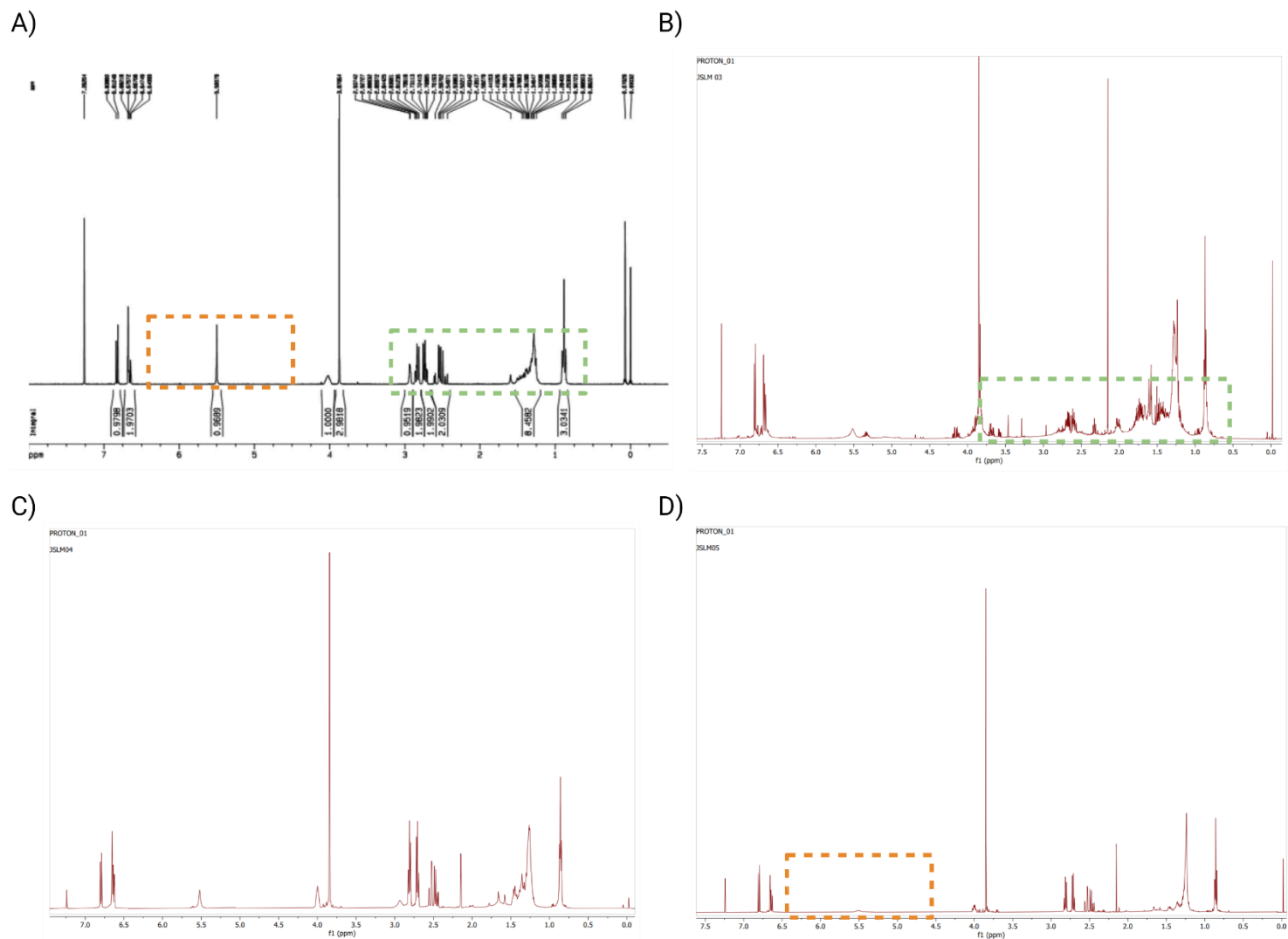


Fig. 57 A) Espectro de RMN de compuesto 6-gingerol realizado por Gan et. al, B) Espectro de RMN de compuesto 3, C) Espectro de RMN de compuesto 4 y D) Espectro de RMN de compuesto 5.

Al observar la similitud del compuesto 4, este es analizado mediante resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H y ^{13}C permitiendo la obtención de desplazamientos químicos, los cuales corresponden a la posición de los átomos que conforman un compuesto, como los mostrados en la figura 58 pertenecientes al compuesto 6-gingerol; estos permiten identificar el compuesto presente en la muestra analizada. Los desplazamientos químicos obtenidos del análisis ^1H y ^{13}C por resonancia se muestran en la tabla 7 y fueron complementados por experimentos homonucleares y heteronucleares de resonancia magnética nuclear bidimensional (^1H - ^1H COSY y HSQC) y cuyos espectros se muestran en la figura 60A y 60B. Los datos espectrales de ^1H incluidos dentro de la tabla 7 mostraron señales correspondientes a un anillo de benceno trisustituido en 1', 3', 4' [δH 6,72 - 6,67 (^1H , m, H2'), 6,82 (^1H , d, J = 8,0 Hz, H5'), 6.65 (^1H , ddt, J = 8.0, 2.0, 0.6 Hz, H6')], se observa una correlación homonuclear entre H5'-H6' en el espectro ^1H - ^1H COSY mostrado en la figura 59A. Se observaron señales correspondientes a dos grupos metilo en RMN de ^1H y ^{13}C [δH 0,89 - 0,86 (3H, t, H10), δC 14,50 (C10) y δH 3,87 (3H, s, H7'), δC 56,28 (C7')] los cuales al compararse con el experimento HSQC de la imagen 59B se puede inferir que uno corresponde al metilo del metoxilo (H10 y C10) y otro corresponde al metilo de la cadena alquílica (H7' y C7'). Los datos espectrales de ^{13}C de la tabla 7 mostraron que C3 [δC 211.83] correspondía al grupo carbonilo de la gingerol acetona que, junto con los carbonos cuaternarios del anillo de benceno trisustituido, no mostró correlación en HSQC mostrados en la figura 59B. El espectro ^{13}C descrito en la tabla 7 mostró la presencia de 8 carbonos correspondientes a metilenos (C1, C2, C4, C6, C7, C8 y C9) y un carbono metino (C5) los cuales fueron verificados mediante experimentos de resonancia magnética nuclear bidimensionales como lo fue HSQC y sus correspondientes hidrógenos con ^1H - ^1H COSY mostrados en la figura 59A y 59B.

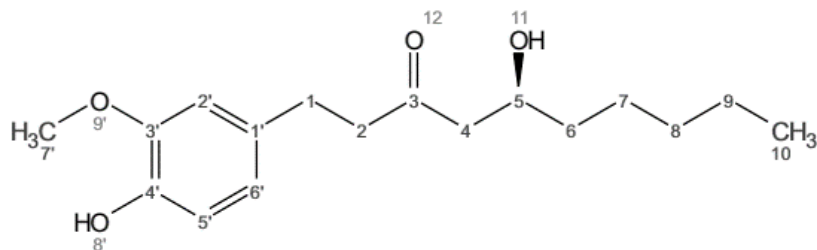


Fig. 58 Estructura del compuesto 6-gingerol y las respectivas posiciones de sus átomos.

Tabla 7. RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz, r.t.) desplazamientos químicos de 6-gingerol, δ en ppm en cloroformo-d (CDCl_3)

Posición	δ_{H}	δ_{C}
1	2.83 (2H, ddd, $J = 7.8, 6.0, 1.0$ Hz)	29.73 (-CH ₂)
2	2.73 (2H, ddd, $J = 8.1, 6.9, 1.0$ Hz)	45.85 (-CH ₂)
3	NA	211.83 (-CO)
4	1.43 – 1.33 (2H, m)	36.87 (-CH ₂)
5	4.02 (1H, ddq, $J = 8.8, 4.7, 3.1$ Hz)	68.08 (-CH)
6	2.60 – 2.44 (2H, m)	49.77 (-CH ₂)
7	1.25 (2H, m, $J = 1.6$ Hz)	32.31 (-CH ₂)
8	1.25 (2H, m, $J = 1.6$ Hz)	30.01 (-CH ₂)
9	1.25 (2H, m, $J = 1.6$ Hz)	23.06 (-CH ₂)
10	0.89 – 0.86 (3H, t)	14.50 (-CH ₃)
1'	NA	133.04 (-C)
2'	6.72 – 6.67 (1H, m)	111.39 (-CH)
3'	NA	146.85 (-C)
4'	NA	144.39 (-C)
5'	6.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	114.79 (-CH)
6'	6.65 (1H, ddt, $J = 8.0, 2.0, 0.6$ Hz)	121.14 (-CH)
7'	3.87 (3H, s)	56.28 (-CH ₃)

NA: No aplica

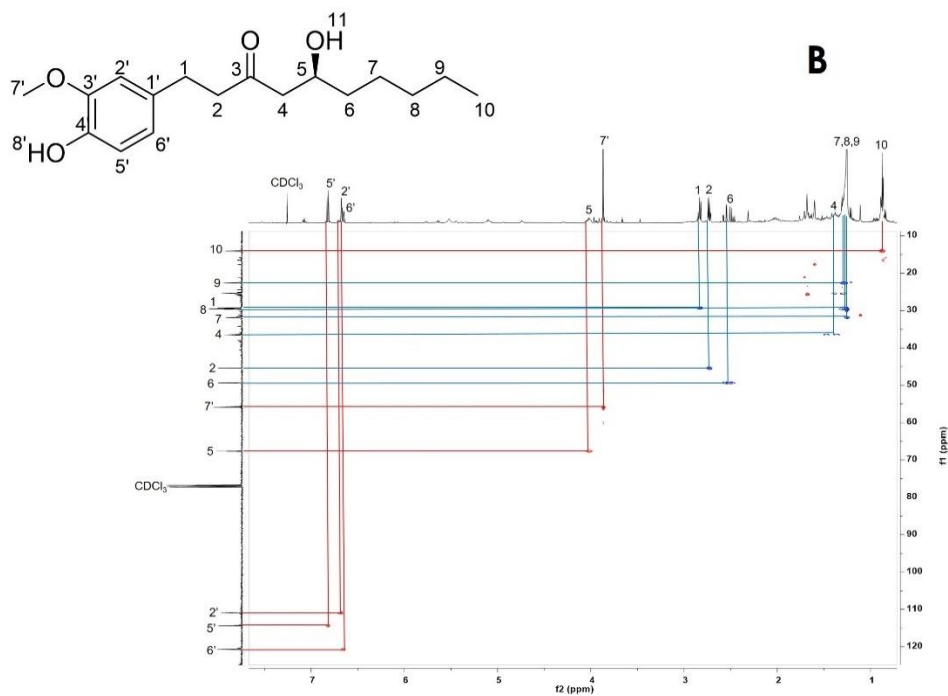
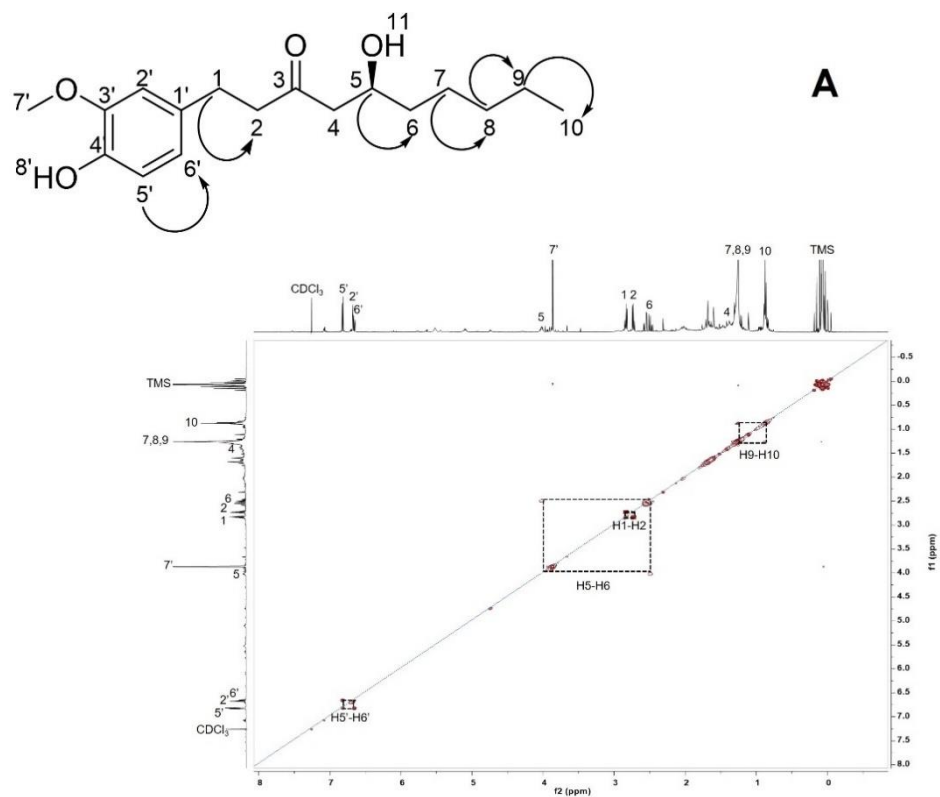


Fig. 59 A) Experimento de RMN homonuclear 2D (^1H - ^1H COSY) de 6-gingerol y B) Experimento RMN heteronuclear 2D (HSQC) de 6-gingerol

Al analizar los resultados obtenidos por los espectros de resonancia ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H y COSY podemos concluir que el compuesto 4 recuperado es 6-gingerol ($\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4$, 294,39 g/mol), del cual se obtuvo un rendimiento de 13.21% como se muestra en la tabla 6, lo cual es alto comparado con los valores entre 6-12.2%, que es lo que ha sido reportado previamente [143, 146, 187–189]. Esto puede ser atribuido a los factores como temporada de cosecha, especie y maduración del rizoma, en donde se ha visto que, a mayor tiempo de maduración, menor será la concentración del compuesto 6-gingerol, indicando así que el rizoma utilizado durante la experimentación se encontraba más tierno [143, 146, 190, 191]. Otro factor para considerar y que afecta el rendimiento de extracción del compuesto 6-gingerol es el método de extracción y tipo de solvente utilizados para la extracción, ya que la continua prolongación a temperaturas elevadas puede favorecer la transformación del compuesto 6-gingerol a 6-Shogaol y por lo tanto reducir su rendimiento final [86, 146, 181, 192].

5.2 Elaboración de nanopartículas: caracterización fisicoquímica de nanopartículas de quitosano

El sistema de nanopartículas fue preparado mediante la técnica de gelificación iónica, la cual implica la interacción iónica entre los grupos amino con carga positiva ($-\text{NH}^{+3}$) del quitosano y los grupos fosfato con carga negativa ($-\text{P}_3\text{O}_5^{-10}$) del tripolifosfato (TPP). Se variaron múltiples parámetros durante la fabricación de la nanopartícula como lo fue el método de agitación (Agitador magnético, homogeneizador, espumador y ultrasonido), el pH de la mezcla (4.0, 4.5, 4.75 y 5.0) y la concentración de Tripolifosfato/ quitosano (3:1, 4:1, 5:1 y 6:1); esto con la finalidad de obtener un tamaño de partícula menor a 100 nm, potencial zeta mayor a ± 10 mV y polidispersión (PDI) menor a .5. Como resultado de la modificación de los métodos de agitación, pH y concentración, se obtuvieron múltiples valores, los cuales se encuentran resumidos en la tabla 8.

Tabla 8. Tamaño de partícula, carga superficial y polidispersión de nanopartículas de quitosano con diferente método de homogeneización, pH y concentración TPP: Quitosano

Método de homogeneización	pH	Concentración (TPP: Quitosano)	Tamaño de partícula (nm)			Potencial zeta (mV)			PDI		
				±			±			±	
Agitador magnético	4	3:1	170.10	±	11.33	-7.71	±	1.34	0.48	±	0.04
		4:1	145.90	±	10.28	-4.73	±	2.59	0.54	±	0.12
		5:1	62.72	±	4.79	-5.35	±	1.75	0.27	±	0.05
		6:1	90.42	±	8.74	-8.22	±	2.43	0.36	±	0.02
	4.5	3:1	97.78	±	7.01	-9.05	±	1.64	0.53	±	0.04
		4:1	83.51	±	5.30	0.18	±	3.48	0.28	±	0.03
		5:1	51.07	±	7.55	-19.53	±	1.50	0.51	±	0.02
		6:1	61.62	±	2.80	-5.67	±	1.97	0.46	±	0.17
	4.75	3:1	51.83	±	9.20	-10.90	±	0.44	0.42	±	0.03
		4:1	51.11	±	7.48	-11.40	±	1.27	0.42	±	0.09
		5:1	30.42	±	7.75	-15.71	±	2.79	0.40	±	0.03
		6:1	42.88	±	1.52	-13.83	±	0.40	0.47	±	0.04
	5	3:1	89.16	±	3.11	-18.77	±	4.00	0.29	±	0.05
		4:1	67.54	±	6.32	-13.23	±	2.35	0.33	±	0.06
		5:1	64.31	±	9.51	-8.78	±	2.70	0.36	±	0.04
		6:1	66.53	±	6.72	-14.33	±	3.91	0.25	±	0.01
Homogeneizador	4	3:1	168.79	±	16.53	-10.71	±	1.89	0.27	±	0.02
		4:1	138.29	±	2.56	-8.76	±	1.00	0.38	±	0.07
		5:1	95.60	±	7.71	-10.31	±	2.18	0.42	±	0.06
		6:1	117.57	±	6.81	-7.66	±	0.75	0.27	±	0.11
	4.5	3:1	130.44	±	9.19	-12.08	±	1.31	0.33	±	0.06
		4:1	86.87	±	3.05	-7.32	±	1.45	0.29	±	0.08
		5:1	78.05	±	10.09	-13.49	±	1.92	0.27	±	0.02
		6:1	97.43	±	3.80	-10.55	±	0.83	0.26	±	0.02

	4.75	3:1	90.84	±	5.17	-10.28	±	0.37	0.34	±	0.06	
		4:1	68.25	±	5.32	-8.99	±	0.57	0.36	±	0.09	
		5:1	29.56	±	10.20	-13.50	±	2.15	0.28	±	0.07	
		6:1	46.81	±	10.78	-7.12	±	2.25	0.30	±	0.08	
	5	3:1	120.65	±	6.27	-6.77	±	1.69	0.34	±	0.01	
		4:1	88.14	±	1.94	-2.56	±	1.97	0.27	±	0.04	
		5:1	70.83	±	2.52	-10.74	±	1.61	0.33	±	0.02	
		6:1	94.33	±	3.51	-5.83	±	1.63	0.28	±	0.02	
Espumador	4	3:1	131.64	±	13.60	-8.82	±	2.25	0.41	±	0.13	
		4:1	111.27	±	11.96	-9.03	±	0.69	0.38	±	0.11	
		5:1	102.90	±	4.97	-10.86	±	4.92	0.55	±	0.05	
		6:1	115.54	±	16.98	-9.25	±	0.51	0.51	±	0.09	
	4.5	3:1	112.74	±	10.10	-7.23	±	0.36	0.61	±	0.10	
		4:1	102.79	±	12.01	-11.80	±	0.46	0.80	±	0.15	
		5:1	81.36	±	2.30	-7.66	±	4.65	0.54	±	0.07	
		6:1	82.57	±	6.07	-0.77	±	2.23	0.53	±	0.08	
	4.75	3:1	91.18	±	4.28	-0.10	±	2.99	0.62	±	0.10	
		4:1	72.10	±	11.54	-6.46	±	1.30	0.30	±	0.01	
		5:1	49.72	±	7.96	-9.00	±	1.44	0.42	±	0.02	
		6:1	57.47	±	11.06	-5.97	±	0.80	0.63	±	0.09	
	5	3:1	115.08	±	8.40	-9.50	±	2.57	0.45	±	0.08	
		4:1	98.55	±	6.91	-5.59	±	3.77	0.55	±	0.09	
		5:1	68.37	±	8.71	-4.09	±	1.60	0.44	±	0.13	
		6:1	88.25	±	3.80	-10.13	±	3.32	0.69	±	0.16	
		4	3:1	400.65	±	42.94	0.66	±	0.36	0.96	±	0.08
			4:1	395.85	±	38.01	-0.06	±	0.32	0.91	±	0.06
			5:1	232.54	±	55.69	-3.48	±	1.88	0.91	±	0.13

Ultrasonido		6:1	224.57	±	30.97	-0.96	±	0.25	0.94	±	0.06
	4.5	3:1	427.43	±	92.18	-0.04	±	0.69	0.84	±	0.06
		4:1	416.01	±	33.99	-0.65	±	3.07	0.88	±	0.07
		5:1	247.10	±	54.32	-0.38	±	2.42	0.78	±	0.05
		6:1	254.99	±	10.32	-0.83	±	1.28	0.89	±	0.12
	4.75	3:1	204.20	±	7.83	-0.25	±	0.75	0.75	±	0.10
		4:1	164.09	±	6.42	1.36	±	0.77	0.98	±	0.03
		5:1	177.12	±	28.98	-4.68	±	1.11	0.88	±	0.12
		6:1	181.14	±	25.70	-0.47	±	0.80	0.94	±	0.06
	5	3:1	254.86	±	29.45	-0.51	±	2.97	0.99	±	0.01
		4:1	178.54	±	24.67	-0.02	±	0.90	0.88	±	0.11
		5:1	169.83	±	23.50	-2.28	±	1.62	0.86	±	0.09
		6:1	158.43	±	20.79	-4.79	±	0.74	0.90	±	0.11

Los resultados mostrados en la tabla 8, fueron analizados para determinar la influencia de la proporción de los componentes tripolifosfato / quitosano (TPP:CS), el cual es un parámetro de gran importancia para la obtención de nanopartículas de un tamaño inferior a 100 nm y una polidispersión menor a .5, debido a que la disponibilidad de componentes permite la óptima formación de cadenas de quitosano, dando como resultado la creación de partículas compactas de tamaño inferior a los 100 nm [12, 13, 160]. El mayor tamaño de partícula obtenido fue en una relación de masa TPP:CS de 3:1 independientemente del método utilizado de homogenización y pH empleado en la elaboración de las nanopartículas. Este valor disminuyó linealmente a 5:1, para incrementar nuevamente en la proporción de 6:1. Este mismo tipo de comportamiento fue reportado previamente por Antoniou et al. [44], en donde en concentraciones de 3:1 se presenta el mayor tamaño de partícula, el cual va en descenso hasta valores de 9:1 donde se presenta un incremento. Como se observa en la figura 60, en proporciones de masa 5:1 de TPP:CS y pH de 4.75, se presentaron los tamaños de partícula más pequeños, los cuales en los métodos de homogenización por homogeneizador observado en la figura 60A y espumador observado en la figura 60C se alcanzaron valores de tamaño de partícula por debajo de 100 nm; por el método de agitación magnética mostrado en la figura 60B, el tamaño de partícula llegó a ser menor a 50 nm, mientras que por el método de ultrasonido observado en la figura 60D los valores mínimos de tamaño de partícula fueron cercanos a los 150 nm.

La variación de tamaños debido a la proporción de TPP:CS, puede ser atribuida a que durante la formación de la nanopartícula existe una incorporación adicional del anión para aumentar el entrecruzamiento entre las cadenas de quitosano dentro de la nanopartícula, lo que explicaría la disminución del tamaño de las nanopartículas de quitosano con el aumento del TPP; este aumento en la reticulación interna hace que las cadenas de quitosano se unan más estrechamente en la partícula, por lo que esta se condensa llevando a una disminución gradual de tamaño [12, 13, 22, 109, 160, 193]. El método de homogenización puede favorecer la producción de partículas homogéneas y de menor tamaño, sin embargo, si esta no es la adecuada las partículas pequeñas se agregarán formando partículas de mayor tamaño a la inicial como resultado de la destrucción de la fuerza repulsiva entre las partículas, como se observa con el método de ultrasonido. [12, 44, 194, 195].

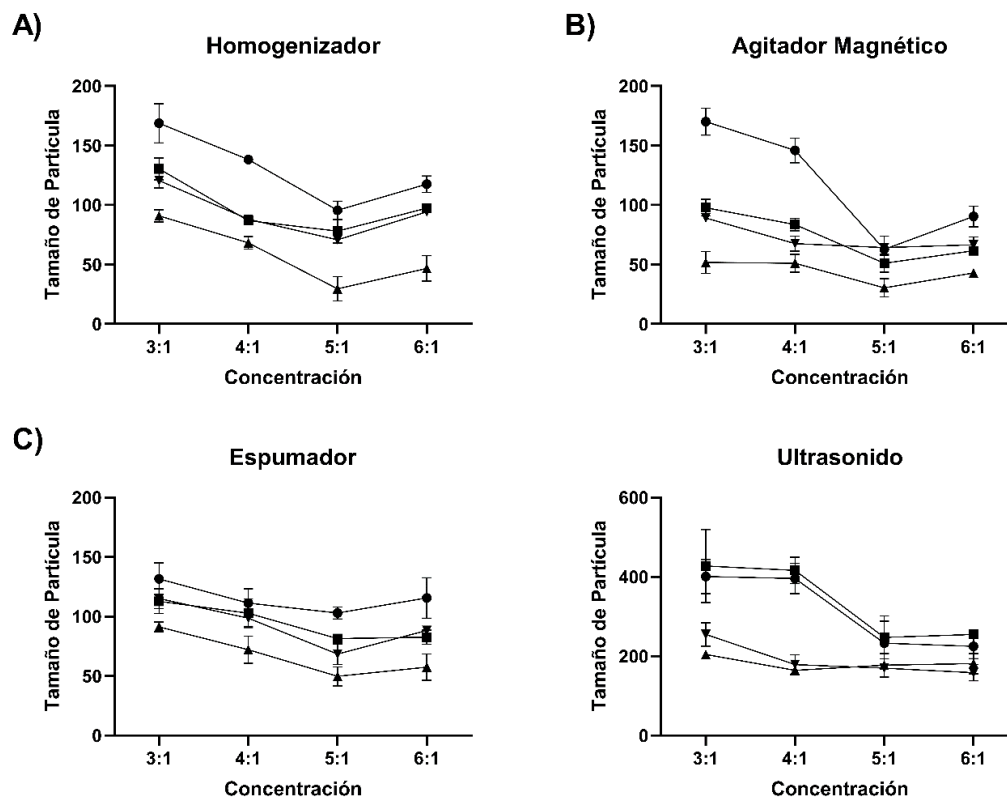


Fig. 60 Efecto de la relación de masa TPP:CS en tamaño de partícula a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Homogeneizador, B) Agitador Magnético, C) Espumador y D) Ultrasonido

Los resultados obtenidos en la tabla 8, fueron analizados para determinar la influencia del pH de la solución del quitosano (CS) inicial en el tamaño de partícula, ya que este afecta la solubilización del CS, el cual al ser una polibase débil y esta se ve reforzada por la protonación del grupo NH_2 cuando se disuelve en medio ácido. Dado que la formación de la nanopartícula está impulsada por la interacción iónica entre CS y TPP, es razonable concluir que el entrecruzamiento iónico entre CS y TPP depende del pH [22, 44]. Como se puede observar en la figura 60, a un pH de 4.75 se observan los tamaños de partícula más pequeños con los métodos de homogenización por homogeneizador con partículas entre 19.36-96.01 nm como se observa en la figura 60A; por el método de agitador magnético con partículas entre 22.67-61.03 nm como se observa en la figura 60B; y por el método de espumador con valores entre 41.76-95.46 nm como se observa en la figura 9C; mientras que, por el método de ultrasonido mostrado en la figura 60D, los valores fueron superiores a los 100 nm. Esto puede ser atribuido al pKa de 6.3 del CS, parámetro que indica la disociación en medio acuoso, indicando que, en el caso del quitosano, este es más soluble en medios ácidos e insoluble en pH neutro o alcalino permitiendo que las cadenas de CS se extiendan debido a la protonación de los grupos amino, y bajo estas condiciones, más iones NH^{+3} están expuestos a ser reticulados por iones TPP, formando una red polimérica más compacta y partículas más pequeñas. [22, 44, 158, 159, 196-198]; sin embargo, en pH con valor cercano

o menor a 4 ocurre un hinchamiento de las nanopartículas permitiendo que esta sea más permeable y se llene de partículas de agua [25]. En el caso de pH más cercanos al básico, se presenta una ausencia de fuerzas electrostáticas repulsivas que afectan a las interacciones intramoleculares e intermoleculares permitiendo que las nanopartículas sin carga se agreguen y se observe un mayor tamaño [22, 198].

El potencial zeta es otro parámetro que varía al modificar las variables de proporción tripolifosfato/ quitosano, pH y método de homogenización. Este valor se refiere a un valor de potencial eléctrico en la doble capa eléctrica de una partícula coloidal frente al potencial en la masa; por lo tanto, sus propiedades dependen tanto del medio circundante como de la propia partícula [199–201]. El potencial zeta puede variar entre los valores de 200 a +200 mV, y determinan parámetros como la estabilidad de las partículas coloidales contra la coagulación o la agregación [202–204]. La influencia de la proporción TPP:CS fue analizada en la figura 61, ya que esta variable afecta al potencial zeta ya que las cargas de los compuestos modifican la carga presente en el medio circundante alrededor de la partícula en una suspensión [199, 200]. Al observar la figura 61, no se observa una variación que pueda ser atribuida en a la concentración en todos los métodos de homogenización empleados; sin embargo, se puede ver un ligero incremento en el potencial zeta en las concentraciones 5:1 y 6:1 por el método de homogeneizador y de ultrasonido alcanzando como valor máximo 15.41 mV y 5.36 mV respectivamente. En los métodos de homogeneizador, agitador magnético y espumador, mostrados en la figura 61A, 61B y 61C; todos los valores obtenidos presentaron tendencia a valores negativos. Los valores negativos de potencial zeta son atribuidos a la presencia de TPP, el cual al ser un polianión no polimérico pequeño y de carácter aniónico está asociado con la disociación de los grupos fosfato, otorgándoles valores en medios ácidos en el rango de -25 y -45 mV para pH 4,5 y 6,5, respectivamente [74, 171, 205–207].

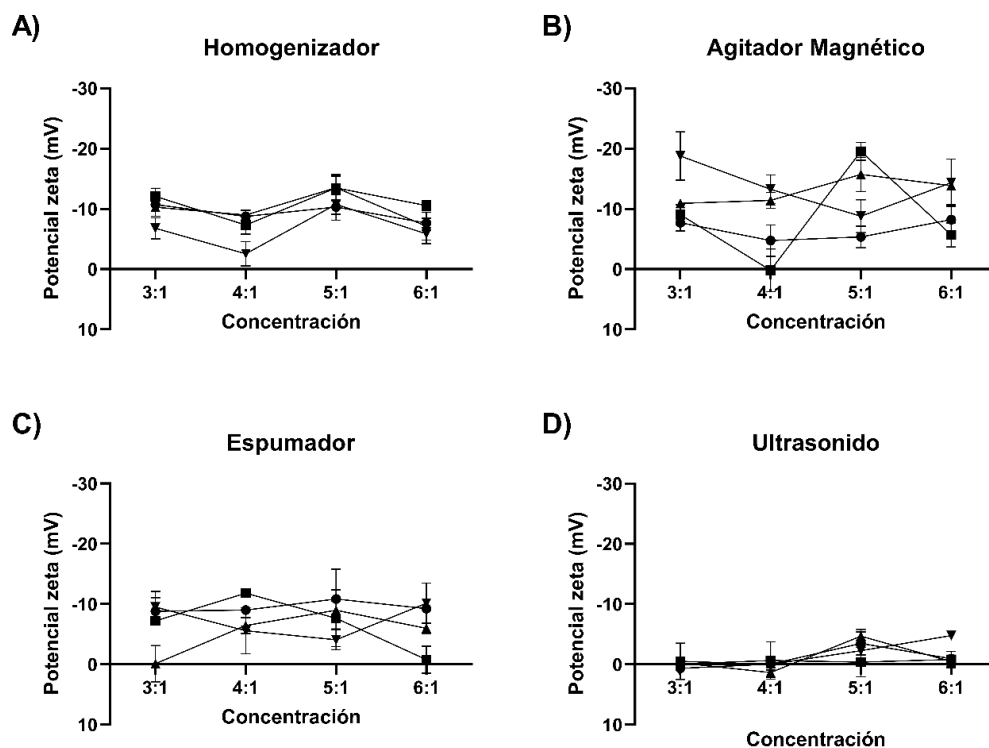


Fig. 61 Efecto de la relación de masa TPP:CS en potencial zeta a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Homogenizador, B) Agitador Magnético, C) Espumador y D) Ultrasonido

Se observa la influencia del método de homogenización en el potencial zeta, el cual puede verse afectado por la estabilidad de las nanopartículas al momento de la medición [84, 160, 202, 208, 209]. Al analizar la figura 61 se observó que los valores de potencial zeta en el método de ultrasonido eran muy cercanos a 0, como se observa en la figura 61D; seguidos por los métodos de espumador y homogeneizador con un valor máximo de -15 mV como se observa en la figura 61C y 61A respectivamente; mientras que los valores más alejados fueron aquellos realizados por agitador magnético con valores entre -10 a -20 mV como se muestra en la figura 61B, lo cual indica que las nanopartículas de quitosano realizadas por el método de ultrasonido mostraban la menor estabilidad que aquellas realizadas con el agitador magnético que son más estables, sin embargo; podría existir aglomeración inducida por la fuerza de Van der Waals durante almacenamiento prolongado [193, 199–201].

Otro parámetro analizado es el índice de polidispersión (PDI), este valor está relacionado con la estabilidad de las nanopartículas y la uniformidad de la formación [12, 210, 211]. El rango del índice de polidispersión es de 0 a 1, un índice más cercano a 0 indica un tamaño homogéneo en las nanopartículas, mientras que los valores superiores a 0,5 representan tamaños de partículas heterogéneos [211–213]. Se puede observar en la figura 62, que los valores más homogéneos se observaron en nanopartículas realizadas por el método de homogeneizador mostrado en la figura 62A, al reportar una polidispersión menor a .5, seguido de las

nanopartículas realizadas por agitador magnético y espumador en donde el valor de PDI se encontró entre .25-.66 y .29-.7 respectivamente y que se observan en la figura 62B y 62C; mientras que las nanopartículas más heterogéneas fueron las realizadas por el método de ultrasonido con valores superiores a .7 y 1 como se observa en la figura 62D . Al comparar la figura 61 y 62, podemos observar que el comportamiento de los gráficos fue muy similar en el potencial zeta y PDI, en donde el método de homogeneizador mostrado en las figuras 61A y 62A; y ultrasonido mostrado en las figuras 61D y 62D; mostraron valores más con un comportamiento más definido, mientras que los gráficos pertenecientes al agitador magnético mostrado en las figuras 61B y 62B; y espumador mostrado en las figuras 61C y 62C; las fueron más dispersos. El valor de polidispersión está ampliamente relacionado con el potencial zeta, ya que a mayor potencial zeta las fuerzas iónicas del medio evitan la agregación de las nanopartículas, estabilizándolas y reduciendo su tendencia a la agregación, lo cual es representado por valores de PDI menores a .5 [196, 201, 210, 213–215]. En el caso de la polidispersión mostrada en el método de ultrasonido, el cual fue muy cercano a 1, se puede concluir que las partículas tienen una distribución de tamaño muy heterogénea, esto atribuido al poco potencial zeta, el cual indica que presenta poca resistencia a la agregación [211–213].

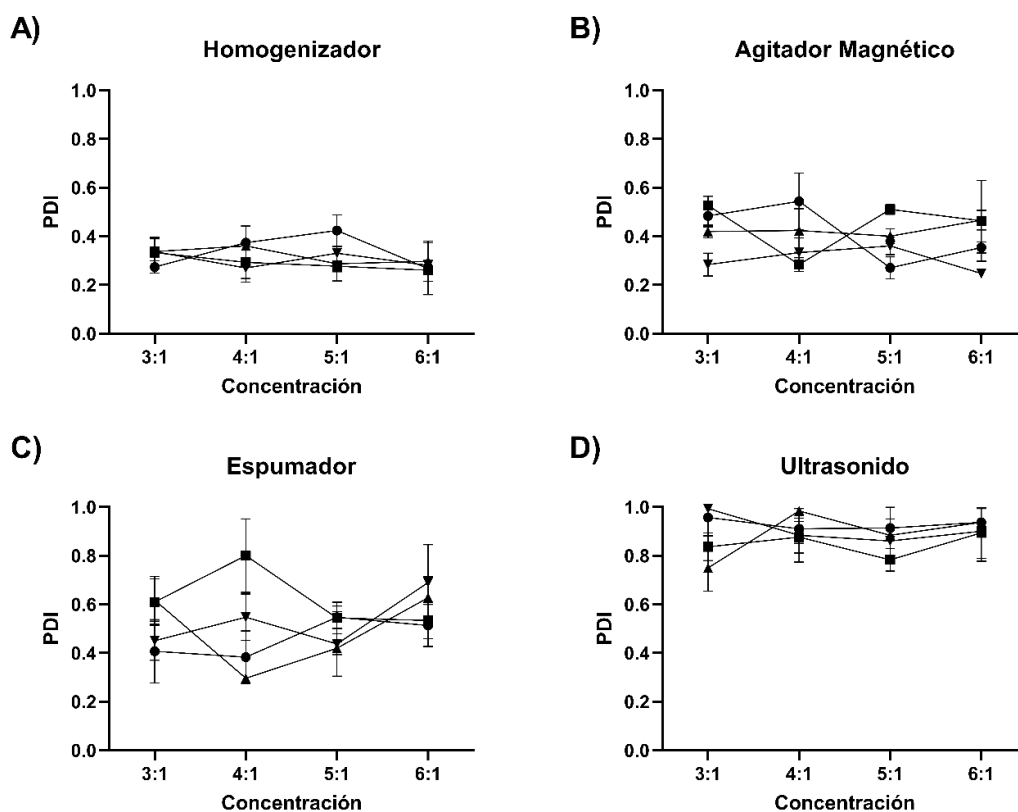


Fig. 62 Efecto de la relación de masa TPP:CS en la polidispersión a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Homogenizador, B) Agitador Magnético, C) Espumador y D) Ultrasonido

5.2.1 liberación de proteína

La liberación de proteína y la eficiencia de encapsulación fueron determinadas empleando albúmina de suero bovino (BSA) como modelo de fármaco proteico, al encapsular la BSA en nanopartículas de quitosano a través de la interacción iónica mediante la técnica de gelificación ionotrópica. La capacidad de carga de BSA de las nanopartículas se denomina eficiencia de encapsulación [171] y esta se refiere al porcentaje de BSA que se encuentra encapsulado entre las cadenas quitosano[12, 171, 216–218]. La determinación de la eficiencia de encapsulación en nanopartículas de quitosano se realizó empleando un ensayo de Bradford. La eficiencia de encapsulación se muestra en la tabla 9, en donde se puede observar que la máxima eficiencia fue de 80.62% en pH 5.0 a una proporción 6:1, mientras que la menor eficiencia es de 66.52 y se observa en pH 4.0 con una proporción 5:1. Los resultados obtenidos son consistentes con lo encontrado por Gan y Wang[219] quienes determinaron que a una concentración de quitosano de 3 mg/ml se observan eficiencias de encapsulación del 60-88%. Este comportamiento puede atribuirse a que la eficiencia de encapsulación de BSA aumenta con el aumento del pH, porque al ser partículas con dimensiones más grandes puede favorecer la encapsulación de proteínas [171, 216].

Tabla 9. Porcentaje de Eficiencia de encapsulación (EE%) de BSA en nanopartículas de quitosano a pH 4.0, 4.5, 4.75 y 5.0 a proporciones 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1 de TPP:CS.

Proporción TPP:CS	pH 4.0	pH 4.5	pH 4.75	pH 5.0
3:1	66.63	78.38	80.59	81.63
4:1	68.15	76.27	79.29	81.77
5:1	66.52	76.72	78.12	82.72
6:1	68.86	80.08	78.23	80.62

La liberación de proteína BSA fue obtenida al medir el sobrenadante de suspensión de nanopartículas en una cinética en un periodo de 24h con la finalidad de determinar la cantidad de proteína liberada por nanopartículas funcionalizadas con la proteína BSA empleando una curva de referencia[12, 171, 216–218]. En la figura 63 se puede observar que durante el análisis de liberación de proteína se o presentan dos etapas de importancia de acuerdo a su tasa de liberación, en la primera etapa, la proteína BSA se liberó rápidamente de las nanopartículas de quitosano dentro de las primeras 2h de forma independiente al pH y proporciones de tripolifosfato/quitosano; dando como resultado una liberación de BSA entre 23.1-27.88% en pH 4.0, 20-26.5% en pH 4.5, 26.71-30.98% en pH 4.75 y 20.02-27.83% en pH 5.0, siendo pH 4 y 4.5 los que mostraron menor porcentaje de liberación. En la segunda etapa, la BSA se liberó de una manera gradual a partir de las 2 h hasta las 24 h, lo que resultó en una liberación acumulativa de BSA de menos del 40% para pH 5.0, más del 40% en pH 4 y pH 4.5; y casi del 50% para pH 4.75. Este comportamiento fue analizado previamente por Markam y Bajpai [25], quienes observaron que el pH afecta la liberación, la cual es más alta en medios ácidos, mientras que el mínimo de liberación lo obtienen a pH alcalino de 7.4, esto debido

a que menor pH se observó mayor hinchamiento permitiendo así la entrada de moléculas de agua que acarrearán moléculas hacia el medio de liberación [25, 196, 220]. De manera visual podemos determinar que a una proporción 6:1 de TPP:CS se da el menor porcentaje de liberación, mientras que la mayor se presenta en 4:1. Este comportamiento se debe al reducir la proporción de quitosano del sistema, ya que un exceso del compuesto TPP puede causar un aumento de las cargas superficiales negativas de las moléculas de proteína favoreciendo las interacciones electroestáticas entre el quitosano y las moléculas de BSA [79, 187, 216, 219, 221, 222].

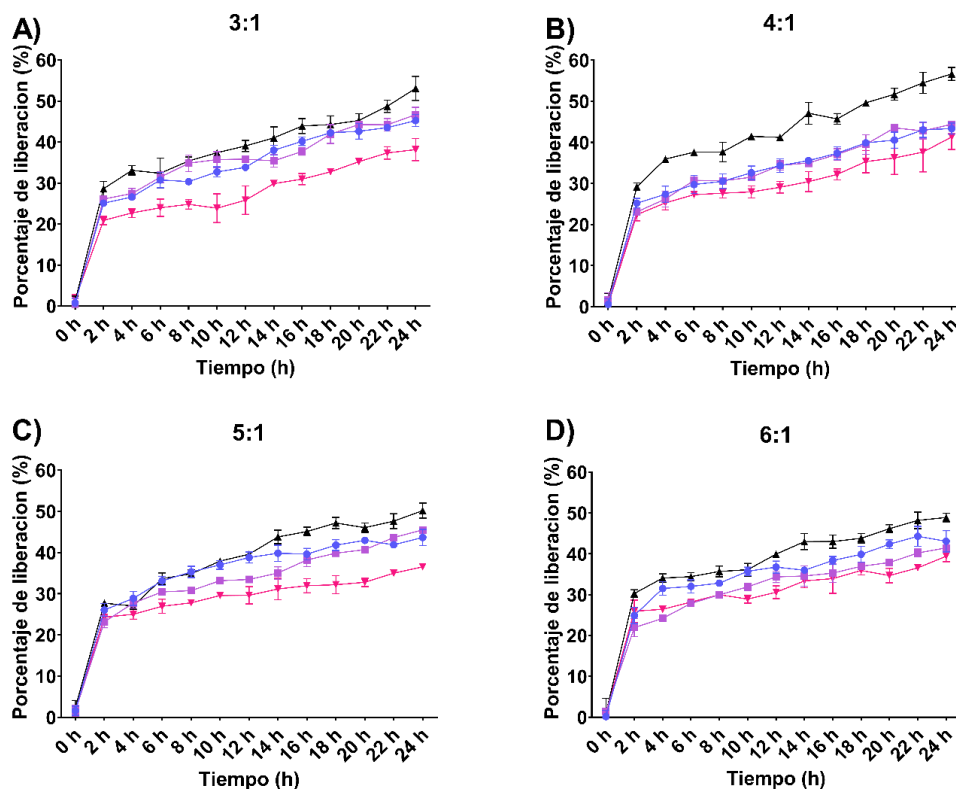


Fig. 63 Liberación de proteína (%) a concentraciones 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1 con diferentes pH A) 4.0 (●), B) 4.5 (■), C) 4.75 (▲) y D) 5 (▼)

5.2.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de quitosano con 6-gingerol

El sistema de nanopartículas con el compuesto 6-gingerol fue preparado mediante la interacción iónica por gelificación iónica, adicionando el compuesto 6-gingerol en la solución de quitosano el cual fue reticulado con la aplicación del compuesto tripolifosfato. Se utilizaron dos métodos de homogenización, los cuales fueron Agitador magnético y espumador, siendo estos métodos de homogenización seleccionados por el fácil acceso a ellos, además de presentar un PDI cercano a .5, Potencial zeta mayor a 0 y tamaños de partícula de hasta 30 nm durante la elaboración de nanopartículas sin funcionalizar. Como resultado de estas variantes se obtuvieron múltiples resultados, los cuales se encuentran resumidos en la tabla 5, los cuales serán analizados posteriormente.

Tabla 10. Tamaño de partícula, carga superficial y polidispersión de nanopartículas de quitosano con diferente método de homogeneización, pH y concentración TPP: Quitosano

Método de homogeneización	pH	Concentración (TPP, Quitosano)	Tamaño de partícula (nm)			Potencial zeta (mV)			PDI		
Agitador magnético	4	3:1	183.74	±	13.93	-22.43	±	2.38	0.27	±	0.06
		4:1	135.34	±	9.36	-26.18	±	2.68	0.18	±	0.05
		5:1	75.55	±	4.21	-29.18	±	2.10	0.22	±	0.10
		6:1	102.02	±	1.82	-29.40	±	1.06	0.28	±	0.05
	4.5	3:1	115.79	±	6.45	-23.23	±	2.40	0.17	±	0.03
		4:1	109.77	±	2.51	-26.58	±	2.94	0.22	±	0.03
		5:1	73.91	±	2.14	-28.47	±	2.37	0.21	±	0.05
		6:1	76.18	±	2.78	-28.74	±	0.71	0.16	±	0.04
	4.75	3:1	66.82	±	2.96	-23.92	±	0.51	0.25	±	0.04
		4:1	69.13	±	1.93	-27.39	±	1.37	0.20	±	0.03
		5:1	49.06	±	3.77	-30.08	±	1.05	0.25	±	0.07
		6:1	62.91	±	6.14	-27.48	±	1.91	0.27	±	0.05
	5	3:1	107.81	±	2.49	-23.36	±	1.79	0.27	±	0.02
		4:1	76.25	±	3.81	-26.36	±	2.10	0.29	±	0.12
		5:1	70.71	±	7.41	-29.63	±	2.37	0.24	±	0.07
		6:1	70.32	±	1.19	-28.13	±	0.80	0.28	±	0.02

Espumador	4	3:1	177.09	±	16.75	-23.39	±	2.10	0.29	±	0.06
		4:1	128.52	±	14.73	-26.88	±	1.69	0.23	±	0.04
		5:1	123.26	±	11.50	-28.96	±	2.69	0.21	±	0.06
		6:1	125.25	±	12.41	-28.62	±	2.51	0.30	±	0.02
	4.5	3:1	152.23	±	4.48	-21.13	±	0.92	0.29	±	0.07
		4:1	123.29	±	6.74	-28.31	±	0.62	0.18	±	0.02
		5:1	119.92	±	7.81	-28.62	±	1.98	0.15	±	0.04
		6:1	108.34	±	3.96	-27.71	±	2.15	0.30	±	0.02
	4.75	3:1	113.87	±	4.30	-22.28	±	2.91	0.23	±	0.04
		4:1	97.22	±	3.45	-25.94	±	2.08	0.21	±	0.03
		5:1	67.94	±	15.03	-26.53	±	2.22	0.29	±	0.03
		6:1	71.83	±	2.40	-29.83	±	2.60	0.21	±	0.04
	5	3:1	138.93	±	20.57	-22.44	±	3.16	0.21	±	0.06
		4:1	117.08	±	14.95	-26.25	±	2.74	0.18	±	0.05
		5:1	91.52	±	7.85	-26.53	±	1.58	0.21	±	0.05
		6:1	119.92	±	8.25	-26.99	±	1.26	0.24	±	0.06

Al igual que en las nanopartículas de TPP:CS vacías, se evaluó el efecto de proporción de masa TPP:CS al variar diferentes valores de concentración que iban desde el 3:1 a 6:1 con una concentración constante de quitosano de 3 mg/ml. En la tabla 10 se puede observar que el mayor tamaño de partícula obtenido fue de 183.74 ± 13.93 nm con el uso del agitador magnético, un pH de 4 y relación 3:1; mientras que el menor tamaño de partícula fue de 49.06 ± 3.77 nm y se obtuvo mediante el mismo método de homogenización, pH 4.75 y una relación 5:1. Se observó una disminución del tamaño de partícula de manera lineal hasta llegar a la proporción 5:1 en ambos métodos de homogenización y los diferentes pH; en la proporción 6:1 se observó nuevamente un incremento en los tamaños de partícula. Al comparar los resultados obtenidos entre las nanopartículas vacías y las funcionalizadas con el compuesto 6-gingerol, se observa un ligero incremento de tamaño, comportamiento previamente reportado por otros autores al comparar nanopartículas vacías con aquellas ya funcionalizadas [196, 223].

En proporciones de masa 5:1 de TPP:CS en ambos métodos de homogenización se presentó el menor tamaño de partícula, siendo el realizado por agitador magnético el que arrojó menores tamaños de partícula alcanzando tamaños de hasta 46 nm como se observa en la figura 64A; mientras que por espumador se alcanzaron tamaños de hasta 52 nm como se observa en la figura 64B. La diferencia de tamaño de las diferentes proporciones de TPP:CS puede deberse a que la presencia de mayor proporción de TPP favorece la interacción iónica, aumentando el entrecruzamiento entre las cadenas de CS dentro de las partículas de manera más estrecha [12, 22, 65, 109, 160, 193, 210]. En la figura 64 se puede observar que el pH tiene una influencia relevante en el tamaño final de las nanopartículas, observándose los menores tamaños de partícula a un pH de 4.75, siendo las partículas de mayor tamaño aquellas obtenidas en un pH 4 en ambos métodos. En nanopartículas funcionalizadas se ha observado que a pH bajo (3.5) los grupos amino del quitosano y TPP se protonan, conduciendo a una menor densidad de carga, dando como resultado una reticulación insuficiente y partículas de mayor tamaño como resultado [44, 158, 159, 197, 198, 224]. Mientras que a pH mayores de 5.5 se indica que el grado de protonación en la superficie de las partículas se reduce, lo que conduce a la agregación de partículas, llevando al mismo resultado, un incremento de tamaño de las nanopartículas finales [22, 159, 198, 224].

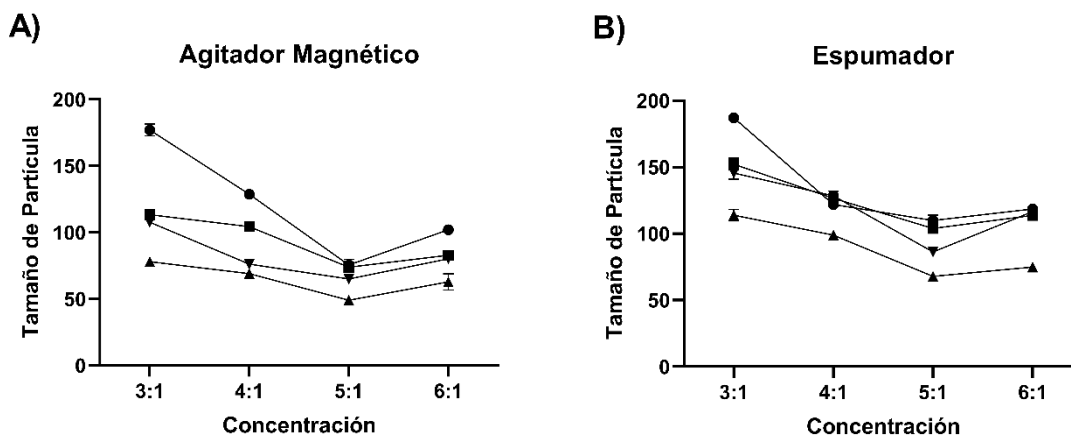


Fig. 64 Efecto de la relación de masa TPP:CS en tamaño de partícula a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Agitador Magnético y B) Espumador.

El potencial zeta fue analizado con la figura 65, en donde el potencial zeta puede variar entre los valores de 200 a +200 mV, y estos al ser más alejados del valor 0 determinan una mayor estabilidad en las partículas coloidales [202–204]. En la figura 65 se observa que tanto las nanopartículas realizadas por el método de agitador magnético, mostrado en la figura 65A; y el método de espumador, mostrado en la figura 65B; los valores de potencial zeta fueron mayores a -20 mV; en el método de agitador magnético se puede observar que a una concentración 5:1 se presenta el mayor potencial de carga alcanzando valores de -31.20 mV; mientras que con el espumador los valores altos son en concentración 4:1, 5:1 y 6:1 alcanzando valores de -28.99, 31.65 y 32.43 mV respectivamente; indicando con esto que a estos valores obtenidos por agitador magnético y espumador, se logra una mayor estabilidad y menor posibilidad de agregación [84, 134, 199–201]. El comportamiento presentado por las nanopartículas puede atribuirse a la proporción de los compuestos empleados, los cuales pueden causar variación en el potencial zeta [199, 200]; como lo es el uso del compuesto 6-gingerol, el cual favorece a la formación de anión fenóxido (C₆H₆O⁻) debido a la naturaleza fenólica del gingerol, lo que aumentaría la magnitud del potencial zeta hacia el lado negativo [25, 207]; a su vez, la proporción de TPP empleado presenta características de polianión, otorgando valores en medios ácidos en el rango de -25 y -45 mV para pH 4,5 y 6,5, respectivamente [171, 205, 207].

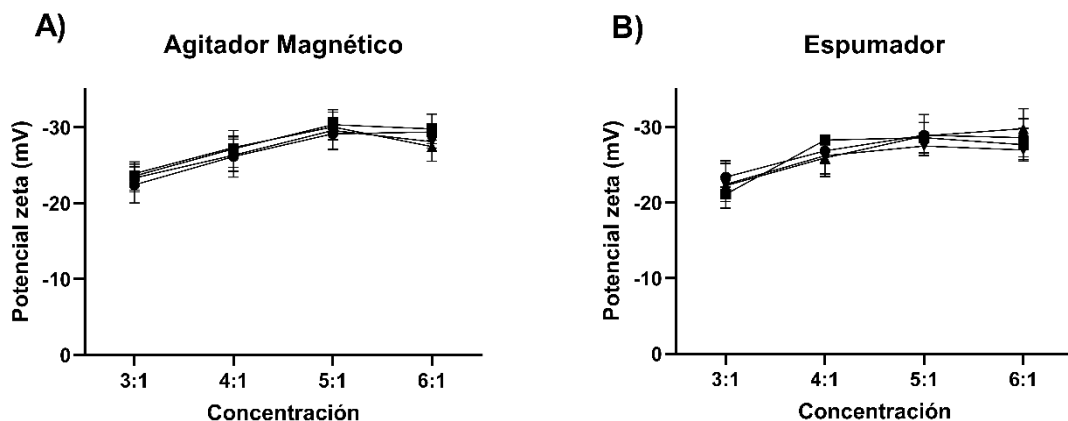


Fig. 65 Efecto de la relación de masa TPP:CS en potencial zeta a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Agitador Magnético y B) Espumador.

El comportamiento del índice de polidispersión (PDI) fue analizado en la figura 15, el cual está relacionado con la estabilidad de las nanopartículas y la uniformidad de la formación, en donde partículas con PDI menor a .5 son partículas más estables con menor tendencia a la agregación y menor variación de tamaño entre ellas [210, 211]. Al encontrar previamente en la figura 65, valores de potencial zeta cercanos a -30 mV podemos inferir que son suspensiones estables con partículas con poca tendencia a la agregación, lo cual se reafirma al observar la figura 66, en donde el valor de PDI es menor .4 independientemente del pH y método de agitación; esto confirma que existe homogeneidad en los tamaños de partícula obtenidos [211–213]. A diferencia de las nanopartículas vacías mostradas previamente en la figura 62B y 62C en donde las nanopartículas tuvieron PDI variable entre .3-.7, este comportamiento ha sido previamente reportado por múltiples autores, en donde las partículas tienen menor tendencia a la agregación al ser funcionalizadas, por lo que el PDI es menor a .5 [225–228].

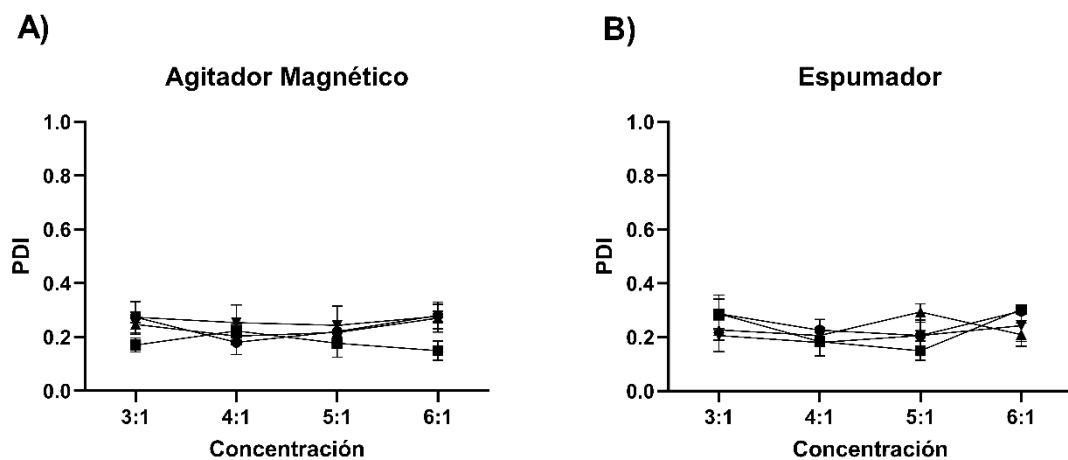


Fig. 66 Efecto de la relación de masa TPP:CS en la polidispersión a pH 4 (●), pH 4.5 (■), pH 4.75 (▲) y pH 5 (▼) con diferentes métodos de homogenización con A) Agitador Magnético y B) Espumador.

El método de homogenización es un factor relevante en la elaboración de nanopartículas, el cual puede determinar el tamaño final de las nanopartículas realizadas, lo que se puede observar en la figura 63, siendo las realizadas por agitadas las que presentan un menor tamaño, alcanzando partículas de hasta 45.29 nm a un pH de 4.75 y una proporción de tripolifosfato quitosano 5:1. Esto es atribuido a que a una baja velocidad las partículas son más estables y homogéneas, mientras que al incrementar la velocidad podemos obtener partículas pequeñas. [12, 44, 194, 195, 224]

5.3 Evaluación in silico de propiedades farmacológicas y toxicológicas del 6-gingerol: predicción de propiedades farmacocinéticas

El cálculo de las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas fue realizado mediante el uso de los kits de herramientas computacionales Molinspiration y Osiris Data Warrior con el objetivo de evaluar y analizar a los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol como posibles candidatos inhibidores de la enzima 5-lipoxigenasa (5-LOX) empleando como base la regla de los cinco de Lipinski. La regla de los cinco de Lipinski establece que para que un fármaco pueda ser administrado por vía oral las moléculas deben tener un (a) peso molecular menor de 500 g/mol, (b) un coeficiente de reparto o coeficiente de partición (cLogP) con un valor menor o igual a 5, (c) cinco o menos sitios donantes de enlaces de hidrógeno, (d) diez o menos sitios aceptores de enlaces de hidrógeno y (e) debe haber menos de 10 enlaces rotativos; por lo que las moléculas que violan al menos una de estas reglas; pueden presentar una baja absorción, biodisponibilidad y acción farmacológica [229–231]. Los resultados obtenidos fueron comparados con los inhibidores comerciales Zileuton y Atreleuton; y otros candidatos inhibidores mostrados en la tabla 11. Los resultados de la evaluación de las propiedades farmacocinéticas mostraron que ni el 6-gingerol ni el 6-shogaol presentaron violaciones de las reglas de Lipinski, lo cual nos permite sugerir que las moléculas pueden ser candidatas adecuadas para la inhibición de la 5-LOX, presentando una buena biodisponibilidad, absorción y acción farmacológica; a su vez, al ser comparados con los inhibidores comerciales Zileuton y Atreleuton; los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol mostraron propiedades farmacocinéticas similares [230, 232]

Tabla 11. Propiedades farmacocinéticas de 6-shogaol y 6-gingerol en comparación con los inhibidores redox de 5-LOX obtenidos del software Osiris Data Warrior y Molinspiration.

Compuesto	%ABS ^a	TPSA(Å ²) ^b	MW ^c	cLogP ^d	HBD ^e	HBA ^f	n-ROTB ^g	Violación de la regla de Lipinski's
Regla	-	-	<500	≤5	≤5	≤10	≤10	≤1
6-Shogaol	92.95	46.53	276.37	4.33	1	3	9	0
6-Gingerol	85.97	66.76	294.39	3.56	2	4	10	0
Zileuton	67.30	94.80	236.29	1.23	2	4	2	0
Atreleuton	86.04	66.56	318.10	2.94	2	4	3	0
3f	96.73	35.57	325.43	3.12	1	4	4	0
BWb70c	82.85	75.79	316.33	2.63	2	5	5	0
NDGA	81.09	80.91	302.37	3.82	4	4	5	0
CP209	88.03	60.77	273.33	2.79	2	4	3	0
Acido cafeico	82.18	77.75	180.16	0.78	3	4	2	0
CAPE	85.97	66.76	284.31	3.05	2	4	6	0

^a Porcentaje de absorción (%ABS); ^b área de superficie polar topológica (TPSA); ^c peso molecular (MW); ^d logaritmo del coeficiente de partición entre n-octanol y agua (cLogP); ^e número de donantes de enlaces de hidrógeno (HBD); ^f número de aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA); ^g número de enlaces rotativos (n-ROTB).

* Inhibidores redox comerciales de 5-LOX.

El análisis del área de superficie polar topológica (TPSA), permite predecir computacionalmente la biodisponibilidad oral del 6-gingerol y 6-shogaol. Se ha informado que este descriptor se correlaciona con el transporte molecular pasivo a través de las membranas y, por lo tanto, permite la predicción de las propiedades de transporte de los fármacos incluidas la absorción intestinal, la penetración de la barrera hematoencefálica y la permeabilidad de las células CaCo-2 y se ha relacionado con la biodisponibilidad del fármaco [173, 233]. Según la regla de Veber para que una molécula tenga una buena biodisponibilidad oral, el número de enlaces giratorios debe ser menor o igual a 10 y los valores de TPSA deben ser menores 140 Å² [231, 232, 234]. Se ha demostrado que el número de enlaces giratorios es un muy buen descriptor de la biodisponibilidad oral de los fármacos. El enlace giratorio se define como cualquier enlace único que no sea de anillo, unido a un átomo pesado no terminal (es decir, que no sea de hidrógeno).

Los resultados del parámetro TPSA y enlaces rotatorios para el 6 gingerol fueron de 66.76 Å² y 10 enlaces rotables respectivamente, mientras, que para el 6-shogaol sus valores de TPSA y enlaces rotatorios fueron de 46.53 Å² y 9 enlaces rotables, respectivamente como se observa en la tabla 11 [231–234]. Estos resultados muestran que tanto el 6-gingerol como el 6-shogaol pueden tener una buena biodisponibilidad oral debido a que pueden tener una buena absorción oral mediante un transporte molecular pasivo [173, 231, 232]. De acuerdo con Zhao et al. [173], los resultados de TPSA y de enlaces rotatorios se correlacionan con los resultados de porcentaje de absorción obtenidos mediante la ecuación 18. El 6-Shogaol presentó un porcentaje de absorción de 92.95%, el cual fue superior en comparación con todos los demás candidatos inhibidores de 5-LOX, excepto al candidato 3f mostrado en la tabla 11; cuyo valor fue ligeramente superior. El comportamiento del porcentaje de absorción fue inversamente proporcional al valor del TPSA, es decir, que a menores valores de TPSA los compuestos presentaron un mayor porcentaje de absorción obteniendo porcentajes de absorción para el 6-gingerol (85.97%) y 6-shogaol (92.95%), en donde valores mayores a 50% son considerados aceptables [173, 231–233].

Ecuación [17]

$$\%ABS = 109 - 0.345 \times TPSA$$

Los compuestos activos de *Zingiber officinale* (6-gingerol y 6-shogaol) muestran una inhibición redox de 5-LOX, al presentar interacciones específicas en su sitio catalítico [35, 169]. Usando una evaluación in silico de la toxicidad, las propiedades farmacocinéticas y sus interacciones con el sitio catalítico de 5-LOX mostraron que estos compuestos eran adecuados y, en algunos casos, mostraron puntajes de fármaco más altos que los inhibidores comerciales informados o aprobados [31, 232, 235]. Los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol siguieron las reglas de Lipinski, lo que sugiere que las moléculas se pueden administrar por vía oral y poseen propiedades farmacocinéticas similares a los inhibidores comparados en la tabla 11 [35, 232, 235].

5.3.1 Puntuación de fármacos y análisis de toxicidad

La toxicidad de los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol, fue determinada empleando la herramienta computacional Osiris Data Warrior y admetSAR, los cuales se emplean para calcular los parámetros de riesgo de toxicidad, como lo son mutagenicidad, la tumorigenicidad, la irritación y las toxicidades reproductivas comparándola con los inhibidores de la 5-LOX mostrados en la tabla 12. Como se observa en la tabla 12, los resultados se visualizaron usando códigos de colores, donde el verde indicaba baja toxicidad y el rojo indicaba alta toxicidad. El compuesto 6-gingerol no presentó ningún riesgo de toxicidad; mientras que el compuesto 6-shogaol no presentó riesgo de tumorigenicidad, irritante o efecto sobre la reproducción; sin embargo, presentó una alta posibilidad de mutagenicidad, lo cual es atribuido a la influencia que tiene el doble enlace de la cadena hidrocarbonado lo que hace que sea más reactivo y que pueda generar especies reactivas durante su biotransformación metabólica [173, 232].

La semejanza de fármaco fue determinada mediante el software Osiris Data Warrior, el cual permite calcular la semejanza de un fármaco basada en la fragmentación y la puntuación del fármaco de una molécula orgánica mediante el cálculo de sus propiedades moleculares [236]. Los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol mostraron una mejor puntuación de fármaco en comparación con el inhibidor comercial Atreleuton y los candidatos inhibidores de 5-LOX (NDGA, ácido cafeico y CAPE) mostrados en la tabla 12; a pesar de que, se observa poca semejanza con otros fármacos inhibidores, se abre la posibilidad emplear estos compuestos naturales como posibles inhibidores de 5-LOX debido a que exhiben resultados óptimos en el análisis farmacocinético y toxicológico [232].

Tabla 12. Evaluación de la semejanza con el fármaco, la puntuación del fármaco y los riesgos de toxicidad del 6-shogaol y el 6-gingerol en comparación con los inhibidores redox de 5-LOX utilizando el software Osiris Data warrior.

Compuesto	Mutagénico	Tumorigénico	Irritante	Efecto reproductivo	Solubilidad	Semejanza a otros fármacos	Puntaje de fármaco
6-Shogaol	Rojo	Verde	Verde	Verde	-3.42	-15.81	0.37
6-Gingerol	Verde	Verde	Verde	Verde	-3.25	-9.06	0.4
Zileuton*	Verde	Verde	Verde	Verde	-3.24	1.84	0.86
Atreleuton*	Verde	Verde	Verde	Verde	-5.24	-2.98	0.35
3f	Verde	Verde	Verde	Rojo	-3.22	4.95	0.49
BWb70c	Verde	Verde	Verde	Verde	-5.32	-0.24	0.51
NDGA	Verde	Verde	Verde	Verde	-2.93	-2.42	0.34
CP 209	Verde	Verde	Verde	Verde	-2.31	0.53	0.81
Acido cafeico	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	-1.41	0.17	0.19
CAPE	Verde	Verde	Rojo	Verde	-2.97	-3.24	0.29

El color verde muestra una baja tendencia a la toxicidad, y el color rojo muestra una alta tendencia a la toxicidad.

* Inhibidores redox comerciales de 5-LOX.

El potencial general de los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol como inhibidores de la 5-LOX, fue obtenido mediante el software Osiris Data Warrior calculando la puntuación general del fármaco al combinar los parámetros de hidrofobicidad, similitud del fármaco, coeficiente de partición (cLogP), solubilidad acuosa, peso molecular y toxicidad. El 6-gingerol y el 6-shogaol presentaron puntuaciones farmacológicas de 0,40 y 0,37, respectivamente; siendo los valores más cercanos a uno los que tienen una mayor acción farmacológica [237–239]. Estos resultados fueron superiores al atreleutón y a los candidatos NDGA, ácido cafeico y CAPE. En la evaluación toxicológica, el 6-gingerol fue más seguro que el 6-shogaol porque presentó un mayor grado de mutagenicidad debido a un doble enlace en su estructura. Este hallazgo sugiere que si se va a utilizar 6-shogaol como inhibidor, se debe evaluar la dosis correcta para evitar este riesgo toxicológico, como se informó anteriormente [31, 240].

5.4 Docking entre 5-alox con el compuesto 6-gingerol y 6-shogaol

Los compuestos extraídos de zingiber officinale (6-gingerol y 6-shogaol) se acoplaron con el sustrato enzimático 5-LOX empleando Autodock Vina en el software UCSF Chimera con el objetivo de analizar las mejores uniones de los ligandos que en este caso fueron el 6-gingerol y el 6-shogaol con el sustrato enzimático que fue la 5-LOX. Se analizaron las conformaciones adecuadas para la formación de las uniones específicas que permiten la inhibición de la 5-LOX. El acoplamiento dirigido se realizó con la estructura cristalina del complejo 5-LOX/NDGA (código pdb: 6N2W) [235, 241, 242], cuyo sitio activo está compuesto por una tétrada de residuos catalíticos (His-367, His-372, His-550 y Leu-673) que se coordinan con el átomo de hierro, lo que permite su catálisis.[35, 243, 244] Se realizó un análisis conformacional para probar el acoplamiento molecular en 10 conformaciones de 6-gingerol y 6-shogaol. Se determinó la mejor conformación con la energía de enlace más baja (ΔG , kcal/mol). El 6-gingerol mostró una energía de enlace de -5,9 kcal/mol, mientras que el 6-shogaol mostró una energía de enlace de -6,2 kcal/mol. Ambos compuestos mostraron interacciones con dos histidinas (His-367 con 4,91 Å para 6-gingerol y 3,27 Å para 6-shogaol; e His-372 con 4,43 Å para 6-gingerol y 3,54 Å para 6-shogaol) implicadas en la inhibición de 5-LOX.

El 6-gingerol presentó interacciones con múltiples residuos como se muestra en la figura 67, con Phe-359 (distancia 4,03 Å), His-360 (distancia 3,46 Å), Gln-363 (distancia 1,98 Å), His-367 (distancia 4,91 Å), Leu-368 (distancia 3,48 Å), Ile-406 (distancia 4,60 Å), Ala-410 (distancia 3,51 Å), His-432 (distancia 3,15 Å), Pro-569 (distancia 3,53 Å), Arg-596 (distancia 1,89 Å), Trp-599 (distancia 4,40 Å) e His-600 (distancia 2,53 Å); mientras que el compuesto 6-Shogaol mostrado en la figura 68, mostró interacciones con los residuos Phe-359 (distancia 5,14 Å), His-360 (distancia 2,43 Å), Thr-364 (distancia 2,54 Å), Leu-368 (distancia 2,25 Å), Ala-410 (distancia 4,67 Å), His-432 (distancia 4,11 Å), Arg-596 (distancia 1,99 Å) y His-600 (distancia 2,87 Å). Los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol fueron colocados dentro del bolsillo catalítico y se estabilizó el 6-gingerol mediante interacciones de enlaces de

hidrógeno con Gln-363, Arg-596 e His-600; mientras que para el 6-shogaol se realizaron interacciones con Arg-596 e His-600. 6-Gingerol tuvo interacciones de tipo π - π con los residuos Phe-359 y Trp-599; e interacciones de π -alquilo con los residuos His-360, His-367, Leu-368, His-372, Ile-406, Ala-420 e His-432. El 6-Shogaol presentó interacciones de tipo π - π con el residuo de Phe-359; interacciones de tipo π -alquilo con los residuos His-360, His-367, Leu-368, Ala-410 e His-432; e interacciones π -sigma con el residuo His-372. Los enlaces de hidrógeno y las interacciones de tipo π -alquilo son las interacciones dominantes para estabilizar estos compuestos, y pueden interactuar adecuadamente con el sitio activo de 5-LOX [31, 35, 245].

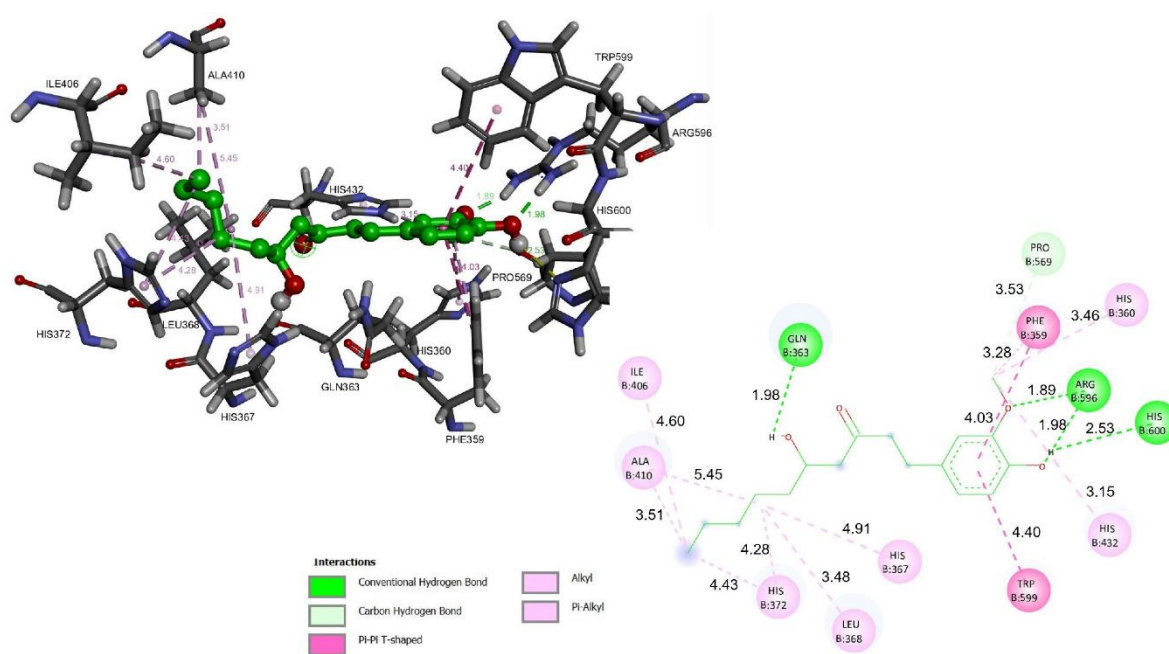


Fig. 67 Acoplamiento molecular de 6-gingerol con 5-LOX (PDB:6N2W). Los principales residuos implicados en la interacción proteína-ligando (izquierda) y las principales interacciones implicadas en la unión proteína-ligando (derecha) del 6-gingerol; las distancias se muestran como Å sobre las líneas.

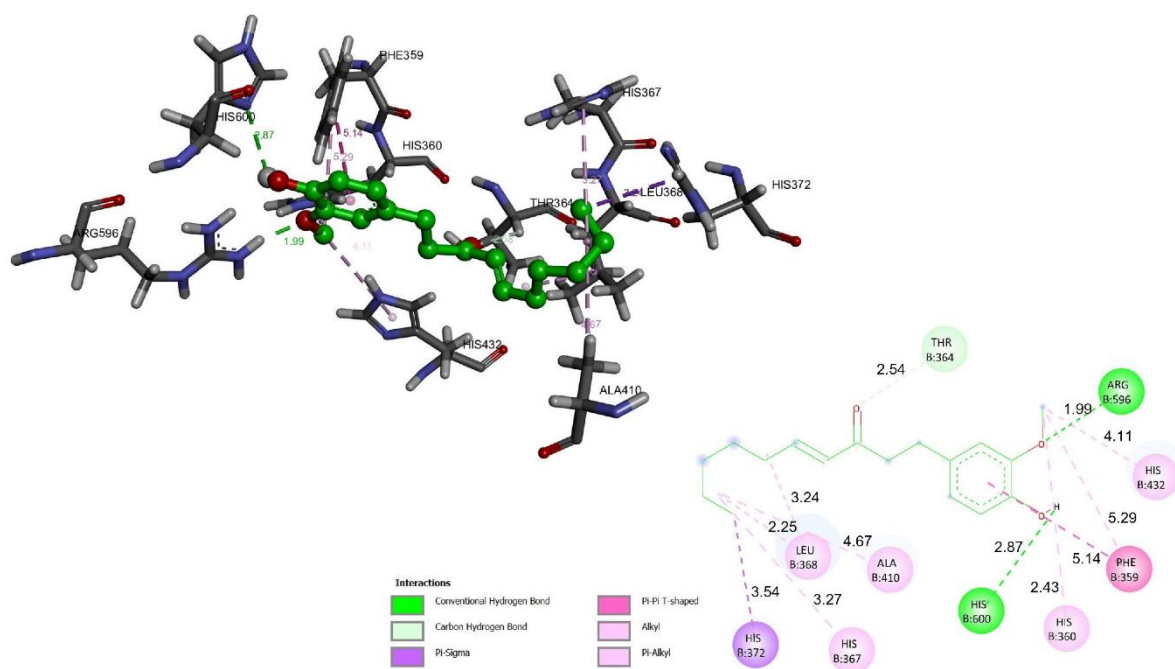


Fig. 68 Acoplamiento molecular de 6-shogaol con 5-LOX (PDB:6N2W). Los principales residuos involucrados en las interacciones proteína-ligando (izquierda) y las principales interacciones involucradas en la unión proteína-ligando (derecha) de 6-shogaol, las distancias se muestran como Å sobre las líneas.

La interacción entre 6-gingerol y 6-shogaol con 5-LOX mostró alta hidrofobicidad en la superficie, principalmente en la zona alquilo de ambas moléculas como se muestra en la figura 69 y 70. La Figura 69 muestra las áreas donadoras de enlaces de hidrógeno y las áreas aceptoras de enlaces de hidrógeno donde el grupo hidroxilo de la cadena alquílica del 6-gingerol presenta un área donante de enlaces de hidrógeno con el residuo Gln-363, y el grupo hidroxilo del anillo aromático presenta un área donante con los residuos Arg-596 y His-600 [245]; mientras que el compuesto 6-Shogaol mostrado en la figura 70, puede funcionar como donante de hidrógeno, ya que se une al Arg-596 y al His-600. 6-Gingerol y 6-shogaol son neutrales como se puede observar en la carga interpolada mostrada en las imágenes 69 y 70; por lo tanto, se puede inferir que tienen carga cero. En ambos casos, los valores del área superficial accesible al solvente (SAS) para la superficie de 6-gingerol y 6-shogaol son relativamente altos como puede observarse en las figuras 69 y 70.

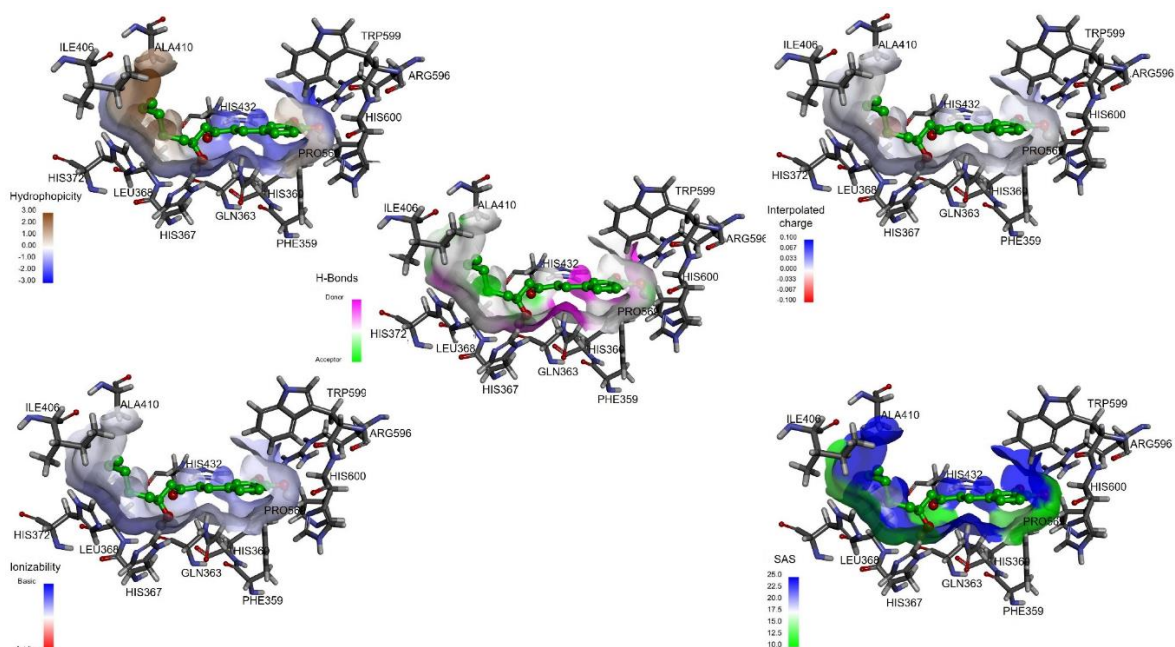


Fig. 69 Interacciones entre la superficie de 6-shogaol y 5-LOX (PDB:6N2W). Complejo fisicoquímico de 6-shogaol y 5-LOX evaluando la hidrofobicidad, puentes de hidrógeno, carga interpolada, ionización y superficie accesible al solvente (SAS).

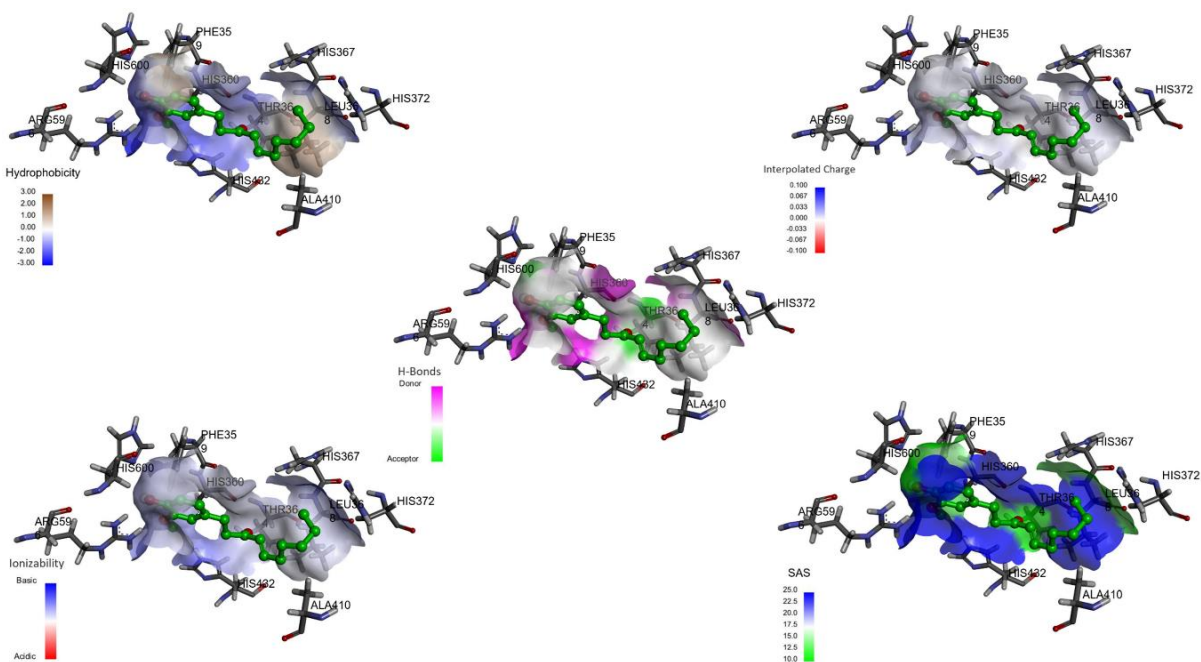


Fig. 70 Interacciones entre la superficie de 6-shogaol y 5-LOX (PDB:6N2W). Complejo fisicoquímico de 6-shogaol y 5-LOX evaluando la hidrofobicidad, puentes de hidrógeno, carga interpolada, ionización y superficie accesible al solvente (SAS).

El acoplamiento molecular mostró que tanto el 6-gingerol como el 6-shogaol tenían una alta afinidad por el bolsillo catalítico 5-LOX, ya que tenían interacciones significativas con dos (His-367 e His-372) de las tres histidinas involucradas en la inhibición de 5-LOX [1,2,13]. El 6-Shogaol demostró una energía de unión más baja porque mostró una interacción más significativa con las histidinas catalíticas para la inhibición y demostró mayores grados de interacción con los residuos que estaban involucrados en este bolsillo catalítico [232, 246]. Las puntuaciones del área superficial accesible al disolvente (SAS) para 6-gingerol y 6-shogaol fueron relativamente altas como se observa en la figura 69 y 70. Estos valores están relacionados con las fuerzas de van der Waals entre los ligandos y la 5-LOX, y la molécula enterrada en la proteína (lo que implica una interacción receptor-ligando). Otros trabajos publicados que muestran diferentes dianas para el 6-gingerol o el 6-shogaol atribuyen algunas de las propiedades obtenidas en nuestros resultados a posibles fármacos [31, 232, 245, 247]. Finalmente, en la evaluación metabólica, los compuestos presentaron diferentes sitios atómicos para la catálisis como era de esperar, siendo estos principalmente los grupos metileno y el grupo metoxilo. En consecuencia, estos compuestos podrían ser catabolizados de forma segura por el citocromo p450 en el hígado, sin producir catabolitos nocivos [31, 248, 249].

5.5 Evaluación in silico del metabolismo de 6-gingerol y 6-shogaol

Todos los fármacos deben pasar por procesos metabólicos, estos procesos permiten aumentar la polaridad de las moléculas con el objetivo de mejorar su excreción [248]. Por tal motivo, el conocimiento de las posibles rutas y sitios metabólicos que puede sufrir una molécula tiene una gran importancia al momento de sintetizar y utilizar moléculas orgánicas como posibles fármacos, ya que podemos resaltar intermediarios potenciales de alta energía que podrían contribuir a la toxicidad, identificación de metabolitos que en sí mismos pueden o no tener efectos farmacológicos [248, 250]. Para explicar las diferencias entre los sitios atómicos y calcular la probabilidad de que las enzimas del citocromo p450 (1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) sufran modificaciones metabólicas y metabolismo mediado por microsomas hepáticos humanos, realizamos un enfoque *in silico* utilizando la herramienta en línea Xenosite Cytochrome P450 Prediction Models [248, 251–254].

Los resultados como se observa en la figura 71 y 72 mostraron los principales sitios metabólicos dentro de las estructuras químicas del 6-gingerol y el 6-shogaol, representados mediante una escala de colores donde el rojo, que representa una mayor probabilidad de sufrir una biotransformación metabólica por cualquiera de las isoenzimas; hasta el azul o blanco, que sugiere que no hay posibilidad de metabolismo en esa zona. Según Xenosite, los sitios metabólicos del 6-gingerol eran el metilo del grupo metoxilo, que tiene una alta probabilidad de ser metabolizado por todas las isoenzimas. Como se observa en la figura 71 CYP2A6 puede metabolizar el sitio atómico donde se encuentran los grupos metileno y metilo de la cadena alquílica del 6-gingerol. Los sitios atómicos sugeridos para su

metabolismo en la estructura del 6-shogaol se muestra en la figura 72, y son el grupo metoxilo que está unido al anillo aromático y los grupos metileno y metilo que pertenecen a la cadena hidrocarbonada del 6-shogaol.

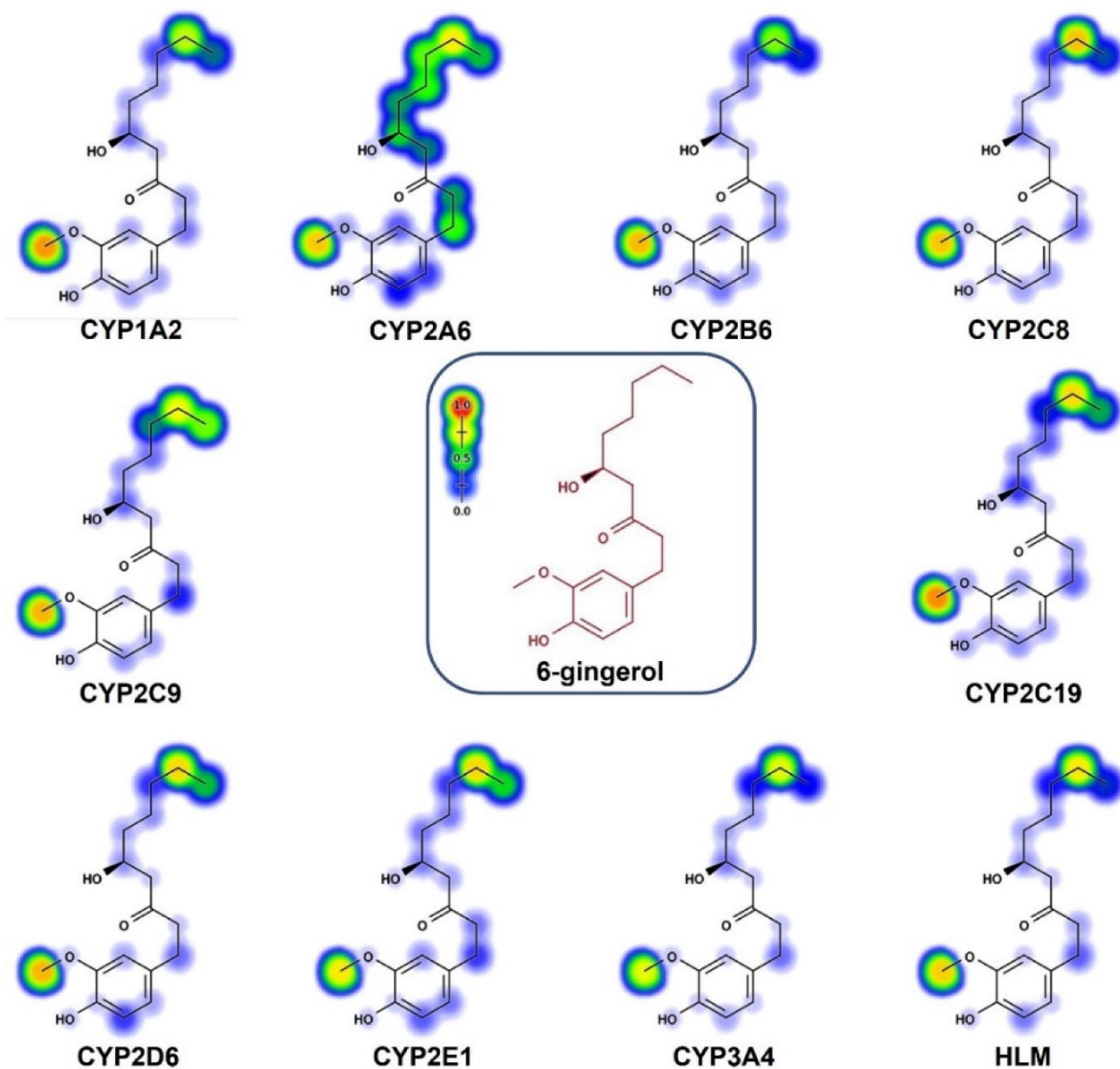


Fig. 71 Evaluación in silico del metabolismo del 6-gingerol. Sitios metabólicos (SOM) del 6-gingerol mediados por isoenzimas CYP450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 y HLM).

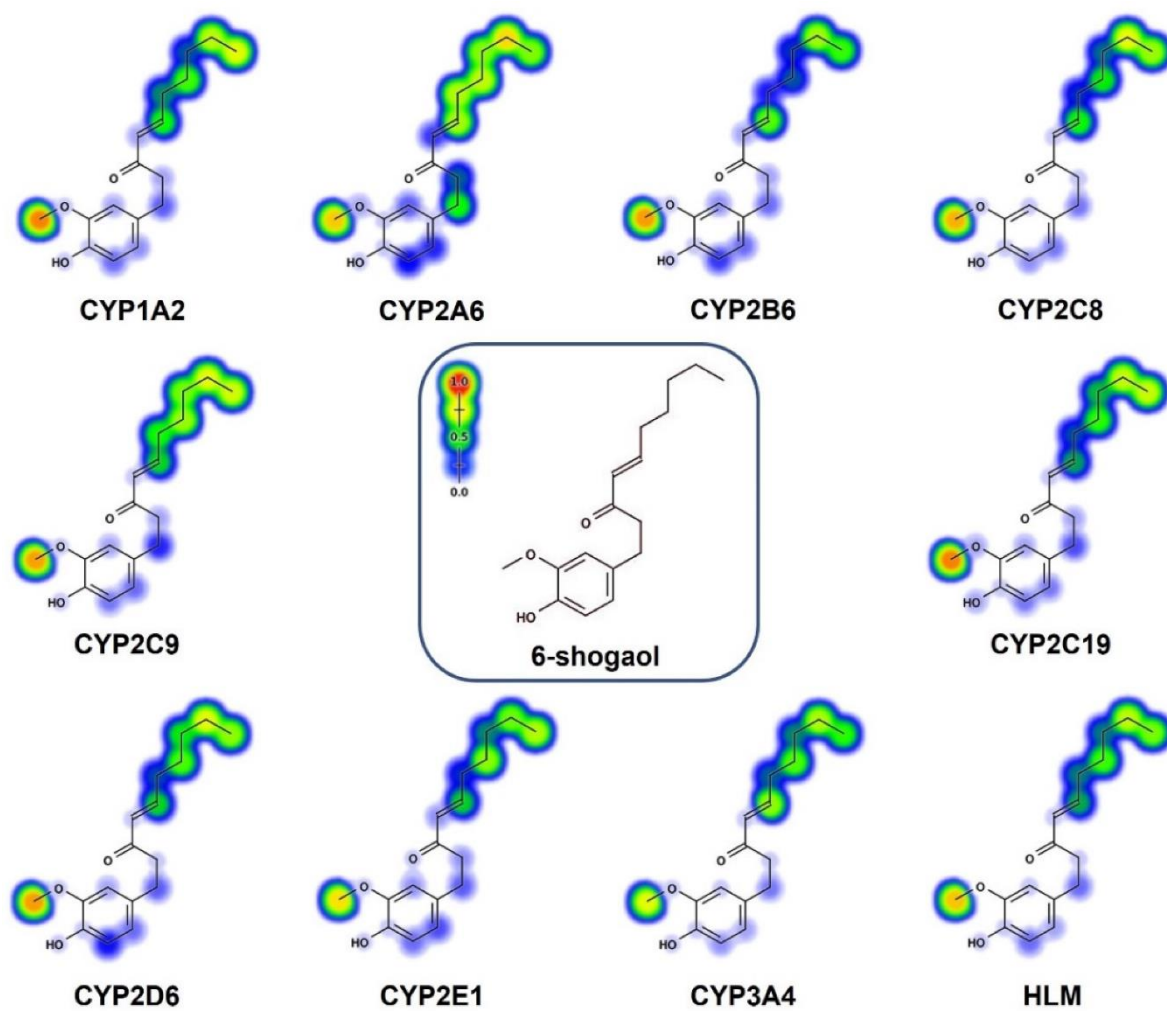


Fig. 72 Evaluación in silico del metabolismo del 6-shogaol. Sitios metabólicos (SOM) del 6-shogaol mediados por isoenzimas CYP450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 y HLM).

CAPITULO 6. CONCLUSIONES

Nanopartículas de quitosano fueron producidas por el método de gelificación iontrópica variando el método de homogeneización (homogeneizador, agitador magnético, espumador y ultrasonido), pH (4.0, 4.5, 4.75 y 5.0) y proporción tripolifosfato/quitosano (3:1, 4:1, 5:1, 6:1), con la finalidad de crear nanopartículas reproducibles funcionalizadas y sin funcionalizar con el compuesto 6-gingerol; con un tamaño menor de 100 nm, potencial zeta mayor a -10mV y polidispersión menor a .5 como alternativa para inhibir la enzima 5-ALOX. El compuesto 6-gingerol de rizoma fresco de jengibre fue extraído y purificado mediante solventes; y elucidado mediante resonancia magnética nuclear. Para evaluar las características de tamaño de partícula, potencial zeta y polidispersión, las nanopartículas fueron analizadas mediante un equipo de luz dinámica. Un modelo in silico por docking molecular fue realizado para determinar la acción inhibitoria del compuesto 6-gingerol determinando el acoplamiento en el sitio catalíticos de la enzima con cada uno de los ligandos.

A partir del análisis de resultados, se ha concluido que el compuesto 6-gingerol es un optimo candidato como inhibidor de la 5-ALOX, lo cual ha sido concluido con las diversas pruebas in silico. El compuesto 6-gingerol puede ser extraído de rizoma fresco de jengibre de la zona de Tlacuilotepec, Puebla para ser encapsulado en nanopartículas de quitosano realizadas por el método de agitación magnética. Los parámetros ideales para realizar nanopartículas fucionalizadas con el compuesto 6-gingerol son pH 4.75, una proporción 5:1 de tripolifosfato quitosano, empleando el método de homogenización por agitador magnético.

Se estableció como solvente de extracción de oleorresina de Jengibre el solvente Metanol al 95%, lo cual coincide con lo encontrado en bibliografía.

Se estableció como mezcla de solventes para extracción por cromatografía en columna Hexano/ acetato de etilo en una proporción 6:4.

Se elucido el compuesto 4 realizando los experimentos de resonancia magnética nuclear ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H y COSY, concluyendo que el compuesto 4 obtenido corresponde con el compuesto 6-gingerol.

El menor tamaño de partícula fue en una proporción 5:1 con un pH 4.75. La variación de tamaños al incrementar la proporción de tripolifosfato se atribuye a la adición de aniones por el tripolifosfato, lo que aumentar el entrecruzamiento haciendo que las cadenas de quitosano se unan más estrechamente.

El menor tamaño de partícula en nanopartículas de tripolifosfato/quitosano con métodos de homogenización por agitador magnético, homogeneizador, espumador y ultrasonido, fue con el método de agitación magnética y homogeneizador.

El menor tamaño de partícula en nanopartículas de tripolifosfato/quitosano con pH 4.0, 4.5, 4.75 y 5, fue a un pH de 4.75 por el método de homogeneizador; mientras

que por el método de agitador magnético y espumador se obtuvieron partículas menores a 100 nm. Este comportamiento es atribuido al pKa de quitosano (6.3) el cual indica que es más soluble en medios ácidos e insoluble en pH neutro por ausencia de fuerzas electroestáticas repulsivas; sin embargo, si el pH es cercano a 4.0 ocurre un hinchamiento de las nanopartículas permitiendo que esta sea más permeable.

El potencial zeta en nanopartículas de tripolifosfato/quitosano con proporciones 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1, es mayor en concentraciones 5:1 y 6:1 por el método de homogeneizador y agitador magnético. Los valores negativos observados en todos los métodos se atribuyen al polianión tripolifosfato, el cual causa disociación de los grupos fosfato, otorgándoles valores negativos en medios ácidos.

Las nanopartículas de tripolifosfato/quitosano con métodos de homogenización por agitador magnético, homogeneizador, espumador y ultrasonido, tienen una distribución de tamaño más homogéneas por el método de homogeneizador al mostrar una polidispersión menor a .5.

La eficiencia de encapsulación en nanopartículas de quitosano empleando un ensayo de Bradford, en donde la máxima eficiencia fue pH 5.0 a una proporción 6:1, mientras que la menor eficiencia es pH 4.0 con una proporción 5:1. Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado en bibliografía.

La liberación de proteína BSA en un periodo de 24h mostro dos etapas, en la primera etapa durante las primeras 2 h, la proteína BSA se liberó rápidamente independiente al pH y proporciones de tripolifosfato/quitosano. En la segunda etapa, la BSA se liberó de manera gradual hasta las 24 h. El menor porcentaje de liberación se observa a una proporción 6:1 de TPP:CS, mientras que la mayor se presenta en la proporción 4:1. Esto se atribuye a que un exceso del compuesto TPP puede causar un aumento de las cargas superficiales negativas de las moléculas de proteína favoreciendo las interacciones electroestáticas entre el quitosano y las moléculas de BSA.

El menor tamaño de partícula en nanopartículas de tripolifosfato/quitosano funcionalizadas con 6-gingerol con proporciones 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1 fue por el método de homogenización, pH 4.75 y una relación 5:1. Al comparar los resultados obtenidos entre las nanopartículas vacías y las funcionalizadas con el compuesto 6-gingerol, se observo un ligero incremento de tamaño, comportamiento que coincide con lo reportado en bibliografía.

El menor tamaño de partícula en nanopartículas de tripolifosfato/quitosano funcionalizadas con 6-gingerol por el método de espumador y agitador magnético, fue en proporciones de masa 5:1 de TPP:CS en ambos métodos. Esto se atribuye a que con el incremento de tripolifosfato incrementa la interacción iónica, aumentando el entrecruzamiento entre las cadenas creando partículas de manera más estrecha.

El menor tamaño de partícula en nanopartículas de tripolifosfato/quitosano funcionalizadas con 6-gingerol con un pH 4.0, 4.5, 4.75 y 5.0 se observó a un pH de 4.75, siendo las partículas de mayor tamaño aquellas obtenidas en un pH 4 en ambos métodos. Lo que se atribuye a que en un pH ácido (3.5) los grupos amino del quitosano y TPP se protonan provocando una reticulación insuficiente y partículas de mayor tamaño como resultado; mientras que a pH mayores de 5.5 se indica que el grado de protonación en la superficie de las partículas se reduce, lo que conduce a la agregación de partículas, llevando al mismo resultado.

El potencial zeta en nanopartículas de tripolifosfato/quitosano funcionalizadas con 6-gingerol por el método de agitador magnético y espumador, fue mayor a -20 mV; a una proporción 5:1 y proporciones 4:1, 5:1 y 6:1 respectivamente. Este comportamiento se atribuye a la formación de anión fenóxido ($C_6H_6O^-$) debido a la naturaleza fenólica del gingerol, en conjunto con las características de polianión atribuidos al TPP, lo que aumentaría la magnitud del potencial zeta hacia el lado negativo.

La polidispersión en nanopartículas de tripolifosfato/quitosano funcionalizadas con 6-gingerol es menor a .4 independientemente del pH y método de agitación, indicando que existe homogeneidad en los tamaños de partícula obtenidos. Este comportamiento en nanopartículas funcionalizadas corresponde con lo encontrado en bibliografía.

El menor tamaño de nanopartículas de tripolifosfato/quitosano funcionalizadas con 6-gingerol fue por el método de agitador magnético. Esto es atribuido a que a una baja velocidad las partículas son más estables y homogéneas, mientras que al incrementar la velocidad podemos obtener partículas pequeñas, pero con mayor tendencia a la agregación.

Los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol mostraron propiedades farmacocinéticas similares a los inhibidores comerciales Zileuton y Atreleuton, al no presentar violaciones de las reglas de Lipinski, lo cual nos permite sugerir que los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol pueden ser candidatos adecuados para la inhibición de la 5-ALOX, presentando una buena biodisponibilidad, absorción y acción farmacológica.

El análisis del área de superficie polar topológica (TPSA) y enlaces rotatorios, indicaron que tanto el 6-gingerol como el 6-shogaol pueden tener una buena biodisponibilidad oral debido a que pueden tener una buena absorción oral mediante un transporte molecular pasivo, siendo el 6-Shogaol quien presentó el mayor porcentaje de absorción.

Los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol mostraron una inhibición redox de 5-ALOX, al presentar interacciones específicas en su sitio catalítico, esto al mostrar puntajes de fármaco más altos que los inhibidores comerciales informados o aprobados.

El compuesto 6-gingerol no presentó ningún riesgo de toxicidad; mientras que el compuesto 6-shogaol presentó una alta posibilidad de mutagenicidad, lo cual es atribuido a la influencia que tiene el doble enlace de la cadena hidrocarbonada lo que hace que sea más reactivo y que pueda generar especies reactivas durante su biotransformación metabólica.

Los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol mostraron una mejor puntuación de fármaco en comparación con el inhibidor comercial Atreleuton y los candidatos inhibidores de 5-LOX (NDGA, ácido cafeico y CAPE); además no encontrar reportes de fármacos semejantes en comparación con su estructura.

Los compuestos 6-gingerol y 6-shogaol mostraron interacciones específicas en el sitio catalítico de la 5-ALOX, mostrando acoplamiento con el residuo enzimáticos His-400, el cual es uno de los residuos involucrados en la inhibición de la 5-ALOX

Los principales sitios metabólicos dentro de la estructura 6-gingerol son el metilo del grupo metoxilo, que tiene una alta probabilidad de ser metabolizado por todas las isoenzimas; y los grupos metileno y metilo de la cadena alquílica que pueden ser metabolizados por la isoenzima CYP2A6. Los sitios atómicos en la estructura del 6-shogaol son el grupo metoxilo que está unido al anillo aromático y los grupos metileno y metilo que pertenecen a la cadena hidrocarbonada.

6.1 TRABAJO FUTURO

Al término de la realización de este proyecto, surgieron nuevas líneas de investigación y áreas de oportunidad para profundizar sobre la extracción de compuestos de origen vegetal, la elaboración de nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar de tripolifosfato/quitosano y evaluación in silico por docking molecular.

Basado en los resultados obtenidos se recomiendan los siguientes puntos para la extracción de compuestos de origen vegetal:

- Comparar el rendimiento de oleorresinas obtenido por rizoma de jengibre proveniente de Tlacuilotepec, Puebla contra rizomas adquiridos en otras zonas de la república mexicana.
- Emplear diversas mezclas de solventes durante la extracción de componentes por cromatografía en columna para favorecer la extracción de diversos compuestos por efecto de la polaridad.
- Complementar las pruebas de elucidación con experimentos de espectroscopia infrarroja, UV visible y cromatografía líquida.

Basado en los resultados obtenidos se recomiendan los siguientes puntos para la elaboración de nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar de tripolifosfato/quitosano:

- Realizar caracterización fisicoquímica de nanopartículas funcionalizadas homogenizadas por homogeneizador, ya que fue el método que mostro tamaños de partícula mas pequeños al realizar nanopartículas sin funcionalizar, alcanzando valores de hasta 20 nm
- Incrementar valores de pH ácido (3.0), neutro (7.0) y básico (9) en las variables para la elaboración de nanopartículas de quitosano funcionalizadas y sin funcionalizar, ya que la bibliografía reporta que a estos pH existen variaciones de carga que pueden incrementar el tamaño de partícula, favoreciendo así la liberación de los componentes encapsulados.
- Elaborar nanopartículas con variación de proporción de quitosano en nanopartículas de quitosano/tripolifosfato funcionalizadas y sin funcionalizar en proporciones 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1, dado que la bibliografía reporta que al existir un incremento de quitosano se obtienen menores tamaño de partícula, los cuales, al ser comparados con los valores previamente obtenidos en la elaboración de este trabajo, pueden arrojar información relevante para la elaboración de nanopartículas de un tamaño determinado.
- Determinar valores óptimos para la realización de nanopartículas de quitosano funcionalizadas y sin funcionalizar por método de ultrasonido y homogeneizador, ya que una agitación excesiva puede dar como resultado nanopartículas pequeñas, pero con alta agregación, debido a la ruptura de las fuerzas de repulsión de las partículas.
- Realizar pruebas complementarias de microscopia electrónica de barrido, microscopia electrónica de transmisión y análisis de seguimiento de partículas, para respaldar tamaños de partículas obtenidos.
- Evaluar parámetros de tamaño de partícula, potencial zeta y polidispersión en nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar posterior al almacenamiento, con la finalidad de determinar su agregación y cambios estructurales.
- Determinar parámetros óptimos para secado de nanopartículas funcionalizadas mediante liofilización para determinar mejor método de almacenamiento de nanopartículas.

Basado en los resultados obtenidos se recomiendan los siguientes puntos para la evaluación in silico:

- Evaluar la actividad farmacológica y toxicología de los diversos componentes del jengibre, con la finalidad de determinar si algún otro compuesto presente en el rizoma fresco puede ser empleado para inhibir la enzima 5-ALOX.
- Determinar valores de área de superficie polar topológica (TPSA) y enlaces rotatorios de compuestos del jengibre viables para la inhibición de 5-ALOX
- Determinar interacciones específicas de compuestos del jengibre en el sitio catalítico de la 5-ALOX

Basado en los resultados obtenidos se recomiendan los siguientes puntos para la evaluación in vitro:

- Determinar la inhibición mediante pruebas in vitro con células epiteliales bronquiales NHBE y BEAS-2B; y células epiteliales alveolares A549, empleadas en inflamación pulmonar y asma.

REFERENCIAS

1. Cuadros-Moreno A, Casañas Pimentel R, San Martín-Martínez E, Yañes Fernández J (2014) Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas I. INTRODUCCIÓN. *Am J Phys Educ* 8:
2. Bera A, Belhaj H (2016) Application of nanotechnology by means of nanoparticles and nanodispersions in oil recovery - A comprehensive review. *J Nat Gas Sci Eng* 34:1284–1309
3. Hasan S (2015) A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types
4. Prakash Sharma V, Sharma U, Chattopadhyay M, Shukla VN (2018) Advance Applications of Nanomaterials: A Review. In: *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, pp 6376–6380
5. Kolahalam LA, Kasi Viswanath I v., Diwakar BS, et al (2019) Review on nanomaterials: Synthesis and applications. In: *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, pp 2182–2190
6. Adams FC, Barbante C (2013) Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 86:3–13
7. Farmoudeh A, Shokoohi A, Ebrahimnejad P (2021) Preparation and evaluation of the antibacterial effect of chitosan nanoparticles containing ginger extract tailored by central composite design. *Adv Pharm Bull* 11:643–650. <https://doi.org/10.34172/APB.2021.073>
8. Hu G, Guo M, Xu J, et al (2019) Nanoparticles targeting macrophages as potential clinical therapeutic agents against cancer and inflammation. *Front Immunol* 10
9. Wu T, Tang M (2018) Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. *Journal of Applied Toxicology* 38:25–40
10. Garg U, Chauhan S, Nagaich U, Jain N (2019) Current advances in chitosan nanoparticles based drug delivery and targeting. *Adv Pharm Bull* 9:195–204
11. Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, et al (2012) Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine* 7:1253–1271
12. Rampino A, Borgogna M, Blasi P, et al (2013) Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *Int J Pharm* 455:219–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>
13. Caro-León FJ, López-Martínez LM, Lizardi-Mendoza J, et al Preparation methods of chitosan nanoparticles: a review
14. Bugnicourt L, Alcouffe P, Ladavière C (2014) Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely

- divided, spherical, and colloidally stable objects. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 457:476–486. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.06.029>
15. Zhang W, Zhang J, Jiang Q, Xia W (2012) Physicochemical and structural characteristics of chitosan nanopowders prepared by ultrafine milling. *Carbohydr Polym* 87:309–313. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.057>
 16. de Pinho Neves AL, Milioli CC, Müller L, et al (2014) Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 445:34–39. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.058>
 17. Gokce Y, Cengiz B, Yildiz N, et al (2014) Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 462:75–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.08.028>
 18. Calvo P, Remun˜aˆn C, Remun˜a R, et al (1997) Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers
 19. Naskar S, Koutsu K, Sharma S (2019) Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *J Drug Target* 27:379–393
 20. Goud K, Desai H (2016) Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances
 21. Abdel-Hafez SM, Hathout RM, Sammour OA (2014) Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs. *Int J Biol Macromol* 64:334–340. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.11.041>
 22. López-León T, Carvalho ELS, Seijo B, et al (2005) Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: Electrokinetic and stability behavior. *J Colloid Interface Sci* 283:344–351. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.186>
 23. Abo Mansour HE, El-Batsh MM, Badawy NS, et al (2020) Ginger Extract Loaded into Chitosan Nanoparticles Enhances Cytotoxicity and Reduces Cardiotoxicity of Doxorubicin in Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Nutr Cancer*. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1823436>
 24. Sampath SJP, Birineni S, Perugu S, et al (2021) Therapeutic efficacy of 6-Gingerol and 6-Shogaol in promoting browning of white adipocytes vis-à-vis enhanced thermogenesis portrayed in high fat milieu. *Food Biosci* 42:101211. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101211>
 25. Markam R, Bajpai AK (2020) Functionalization of ginger derived nanoparticles with chitosan to design drug delivery system for controlled release of 5-amino salicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel diseases: An in vitro study. *React Funct Polym* 149:.. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104520>

26. Mbaveng AT, Kuete V (2017) *Zingiber officinale*. In: *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*. Elsevier Inc., pp 627–639
27. Kiptiyah K, Widodo W, Ciptadi G, et al (2017) 10-Gingerol as an inducer of apoptosis through HTR1A in cumulus cells: In-vitro and in-silico studies. *J Taibah Univ Med Sci* 12:397–406. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2017.05.012>
28. M K, MR S, PA N, T B (2017) 6-Gingerol is the most Potent Anticancerous Compound in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *J Dev Drugs* 06: <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000167>
29. Wang S, Zhang C, Yang G, Yanzong Yang and Biological Properties of 6-Gingerol: A Brief Review
30. Brahmachari G (2019) 6-gingerol: A therapeutically potent lead candidate in anti-inflammatory drug discovery. In: *Discovery and Development of Anti-inflammatory Agents from Natural Products*. Elsevier, pp 283–295
31. Semwal RB, Semwal DK, Combrinck S, Viljoen AM (2015) Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry* 117:554–568
32. Tharuka MDN, Priyathilaka TT, Kim J, et al (2019) Molecular characterization of big-belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*) arachidonate 5-lipoxygenase (HaALOX5): First evidence of an immune defensive role by induced immunological stress in teleost. *Fish Shellfish Immunol* 86:230–238. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.042>
33. Sinha S, Doble M, Manju SL (2019) 5-Lipoxygenase as a drug target: A review on trends in inhibitors structural design, SAR and mechanism based approach. *Bioorg Med Chem* 27:3745–3759
34. Gilbert NC, Gerstmeier J, Schexnaydre EE, et al (2020) Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nat Chem Biol* 16:783–790. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0544-7>
35. Muthuraman S, Sinha S, Vasavi CS, et al (2019) Design, synthesis and identification of novel coumapherine derivatives for inhibition of human 5-LOX: Antioxidant, pseudoperoxidase and docking studies. *Bioorg Med Chem* 27:604–619. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.12.043>
36. Antonelli M, Kushner I (2017) It's time to redefine inflammation. *FASEB Journal* 31:1787–1791. <https://doi.org/10.1096/fj.201601326R>
37. Serhan CN, Petasis NA (2011) Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev* 111:5922–5943
38. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ (2012) Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 43:385–406
39. Nathan C, Ding A (2010) Nonresolving Inflammation. *Cell* 140:871–882

40. Ul-Haq Z, Khan N, Zafar SK, Moin ST (2016) Active site characterization and structure based 3D-QSAR studies on non-redox type 5-lipoxygenase inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 88:26–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.03.014>
41. Wouters OJ, McKee M, Luyten J (2020) Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009–2018. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 323:844–853
42. da Silva JA, Sampaio PA, Dulcey LJL, et al (2021) Preparation and characterization of [6]-gingerol/ β -cyclodextrin inclusion complexes. *J Drug Deliv Sci Technol* 61:. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102103>
43. Singh RP, Gangadharappa H v., Mruthunjaya K (2018) Phytosome complexed with chitosan for gingerol delivery in the treatment of respiratory infection: In vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 122:214–229. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.06.028>
44. Antoniou J, Liu F, Majeed H, et al (2015) Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 465:137–146. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.10.040>
45. Tosi MM, Ramos AP, Esposto BS, Jafari SM (2020) Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients. In: *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients*. Elsevier, pp 191–211
46. Maravajhala V, Papishetty S, Bandlapalli S, et al (2012) NANOTECHNOLOGY IN DEVELOPMENT OF DRUG DELIVERY SYSTEM. *IJPSR* 3:84–96
47. Sudha PN, Sangeetha K, Vijayalakshmi K, Barhoum A (2018) Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. In: *Emerging Applications of Nanoparticles and Architectural Nanostructures: Current Prospects and Future Trends*. Elsevier Inc., pp 341–384
48. Vijayaraghavan K, Ashokkumar T (2017) Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. *J Environ Chem Eng* 5:4866–4883
49. Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, et al (2017) Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* 11:2313–2381. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040>
50. Acebes-Fernández V, Landeria-Viñuela A, Juanes-Velasco P, et al (2020) Nanomedicine and onco-immunotherapy: From the bench to bedside to biomarkers. *Nanomaterials* 10:1–72
51. Caruso F, Hyeon T, Rotello VM (2012) Nanomedicine. *Chem Soc Rev* 41:2537–2538. <https://doi.org/10.1039/c2cs90005j>

52. Chauhan VP, Jain RK (2013) Strategies for advancing cancer nanomedicine. *Nat Mater* 12:958–962
53. Shi Y, Wan A, Shi Y, et al (2014) Experimental and mathematical studies on the drug release properties of aspirin loaded chitosan nanoparticles. *Biomed Res Int* 2014:. <https://doi.org/10.1155/2014/613619>
54. Lammers T, Ferrari M (2020) The success of nanomedicine. *Nano Today* 31
55. van der Meel R, Sulheim E, Shi Y, et al (2019) Smart cancer nanomedicine. *Nat Nanotechnol* 14:1007–1017. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0567-y>
56. Lechuga LM (2011) Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud
57. Sharma P, Sharma S (2016) Paradigm Shift in Plant Disease Diagnostics: A Journey from Conventional Diagnostics to Nano-diagnostics. pp 237–264
58. Fernandes C, Soares D, Yegeri MC (2018) Tumor Microenvironment Targeted Nanotherapy. *Front Pharmacol* 9
59. Kubinová Š, Syková E (2010) Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies* 19:144–156
60. Trautner BW, Lopez AI, Kumar A, et al (2012) Nanoscale surface modification favors benign biofilm formation and impedes adherence by pathogens. *Nanomedicine* 8:261–270. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.11.014>
61. Barclay TG, Day CM, Petrovsky N, Garg S (2019) Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery. *Carbohydr Polym* 221:94–112
62. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, et al (2012) PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 161:505–522
63. Poon C, Patel AA (2020) Organic and inorganic nanoparticle vaccines for prevention of infectious diseases. *Nano Express* 1
64. Efthimiadou EK, Metaxa AF, Koras GK (2015) Modified polysaccharides for drug delivery. In: *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Springer International Publishing, pp 1805–1835
65. George A, Shah PA, Shrivastav PS (2019) Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *Int J Pharm* 561:244–264
66. Hajizade A, Ebrahimi F, Salmanian A-H, et al (2014) All rights reserved for official publication of Baqiyatallah university of medical sciences© Nanoparticles in Vaccine Development
67. Bhatia S (2016) Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In: *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Springer International Publishing, pp 33–93
68. Saleh TA (2020) Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environ Technol Innov* 20

69. Abedini F, Ebrahimi M, Roozbehani AH, et al (2018) Overview on natural hydrophilic polysaccharide polymers in drug delivery. *Polym Adv Technol* 29:2564–2573
70. Watkins R, Wu L, Zhang C, et al (2015) Natural product-based nanomedicine: Recent advances and issues. *Int J Nanomedicine* 10:6055–6074
71. Bharali DJ, Siddiqui IA, Adhami VM, et al (2011) Nanoparticle delivery of natural products in the prevention and treatment of cancers: Current status and future prospects. *Cancers (Basel)* 3:4024–4045
72. Li J, Xiang H, Zhang Q, Miao X (2022) Polysaccharide-Based Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceuticals* 15:602. <https://doi.org/10.3390/ph15050602>
73. Muhammad DRA, Gonzalez CG, Sedaghat Doost A, et al (2019) Improvement of Antioxidant Activity and Physical Stability of Chocolate Beverage Using Colloidal Cinnamon Nanoparticles. *Food Bioproc Tech.* <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02271-5>
74. Cadoná FC, Machado AK, Bodenstein D, et al (2020) Natural product-based nanomedicine: polymeric nanoparticles as delivery cargoes of food bioactives and nutraceuticals for anticancer purposes. In: *Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents*. Elsevier, pp 37–67
75. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al (2010) Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *New Series* 328:1031–1035. <https://doi.org/10.1126/science.1186605>
76. Kurwadkar S, Asce M, Pugh K, et al (2014) Nanoparticles in the Environment: Occurrence, Distribution, and Risks. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515](https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515)
77. Buzea C, Pacheco I (2017) Nanomaterials and their classification. In: *Advanced Structured Materials*. Springer Verlag, pp 3–45
78. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H (2012) Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports* 64:1020–1037
79. Yadav A, Ghune M, Kumar Jain D (2011) Nano-medicine based drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 1:201–213
80. Lee JH, Yeo Y (2015) Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem Eng Sci* 125:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>
81. Capaldi Arruda SC, Diniz Silva AL, Moretto Galazzi R, et al (2015) Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta* 131:693–705
82. Hembram KC, Prabha S, Chandra R, et al (2016) Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 44:305–314

83. Garavand F, Cacciotti I, Vahedikia N, et al (2020) A comprehensive review on the nanocomposites loaded with chitosan nanoparticles for food packaging. *Crit Rev Food Sci Nutr*
84. Divya K, Jisha MS (2018) Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environ Chem Lett* 16:101–112
85. Esmaeilzadeh-Gharedaghi E, Faramarzi MA, Amini MA, et al (2012) Effects of processing parameters on particle size of ultrasound prepared chitosan nanoparticles: An Artificial Neural Networks Study. *Pharm Dev Technol* 17:638–647. <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.696269>
86. Roy SG, Shirsat NS, Mishra AC, et al (2018) A review on chitosan nanoparticles applications in drug delivery. *J Pharmacogn Phytochem* 7:01–04. <https://doi.org/10.22271/phyto.2018.v7.isp6.1.01>
87. Pedroso-Santana S, Fleitas-Salazar N (2020) Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polym Int* 69:443–447
88. Bodmeier R, Oh K-H, Pramart Y (1989) Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads
89. Fàbregas A, Miñarro M, García-Montoya E, et al (2013) Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Int J Pharm* 446:199–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.015>
90. Zhang H, Jung J, Zhao Y (2016) Preparation, characterization and evaluation of antibacterial activity of catechins and catechins-Zn complex loaded β -chitosan nanoparticles of different particle sizes. *Carbohydr Polym* 137:82–91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.036>
91. Waizel J, Waizel-Haiat S, Revilla-Peñaloza Francisco (2017) Los productos herbolarios, la coagulación sanguínea y la cirugía otorrinolaringológica. *Anales de otorrinolaringología mexicana* 62:115–142
92. Kumara M, Shylajab M, Nazeem P, Babu T (2017) 6-Gingerol is the most Potent Anticancerous Compound in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *J Dev Drugs* 06: <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000167>
93. Prasad S, Tyagi AK (2015) Ginger and its constituents: Role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2015
94. Mahomoodally MF, Aumeeruddy MZ, Rengasamy KRR, et al (2021) Ginger and its active compounds in cancer therapy: From folk uses to nano-therapeutic applications. *Semin Cancer Biol* 69:140–149
95. Wigner P, Bijak M, Saluk-bijak J (2021) The green anti-cancer weapon. The role of natural compounds in bladder cancer treatment. *Int J Mol Sci* 22

96. Ahmed SHH, Gonda T, Hunyadi A (2021) Medicinal chemistry inspired by ginger: exploring the chemical space around 6-gingerol. *RSC Adv* 11:26687–26699
97. de Lima RMT, dos Reis AC, de Menezes AAPM, et al (2018) Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* 32:1885–1907
98. Ahmed SHH, Gonda T, Hunyadi A (2021) Medicinal chemistry inspired by ginger: exploring the chemical space around 6-gingerol. *RSC Adv* 11:26687–26699
99. Mi H bo, Guo X, Li J rong (2016) Effect of 6-gingerol as natural antioxidant on the lipid oxidation in red drum fillets during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology* 74:70–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.029>
100. Lu DL, Li XZ, Dai F, et al (2014) Influence of side chain structure changes on antioxidant potency of the [6]-gingerol related compounds. *Food Chem* 165:191–197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.077>
101. Al-Nahain A, Jahan R, Rahmatullah M (2014) *Zingiber officinale* : A Potential Plant against Rheumatoid Arthritis . *Arthritis* 2014:1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/159089>
102. Aryaeian N, Mahmoudi M, Shahram F, et al (2019) The effect of ginger supplementation on IL2, TNF α , and IL1 β cytokines gene expression levels in patients with active rheumatoid arthritis: A randomized controlled trial. *Med J Islam Repub Iran*. <https://doi.org/10.34171/mjiri.33.154>
103. Iranshahy M, Javadi B Spectroscopic investigation on the interaction of DNA with superparamagnetic iron oxide nanoparticles doped with chromene via dopamine as cross linker
104. Zhang F, Zhang JG, Yang W, et al (2018) 6-Gingerol attenuates LPS-induced neuroinflammation and cognitive impairment partially via suppressing astrocyte overactivation. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 107:1523–1529. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.136>
105. Joshi D, Srivastav SK, Belemkar S, Dixit VA (2017) *Zingiber officinale* and 6-gingerol alleviate liver and kidney dysfunctions and oxidative stress induced by mercuric chloride in male rats: A protective approach. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 91:645–655. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.108>
106. Sampath SJP, Birineni S, Perugu S, et al (2021) Therapeutic efficacy of 6-Gingerol and 6-Shogaol in promoting browning of white adipocytes vis-à-vis enhanced thermogenesis portrayed in high fat milieu. *Food Biosci* 42:101211. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101211>
107. Tzeng TF, Chang CJ, Liu IM (2014) 6-Gingerol inhibits rosiglitazone-induced adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytotherapy Research* 28:187–192. <https://doi.org/10.1002/ptr.4976>

108. Kim TH, Shin S, Yoo SD, Shin BS (2018) Effects of phytochemical P-glycoprotein modulators on the pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin in mice. *Molecules* 23:.. <https://doi.org/10.3390/molecules23020349>
109. Majdoub YO el, Diouri M, Arena P, et al (2019) Evaluation of the availability of delphinidin and cyanidin-3-O-sambubioside from *Hibiscus sabdariffa* and 6-gingerol from *Zingiber officinale* in colon using liquid chromatography and mass spectrometry detection. *European Food Research and Technology* 245:2425–2433. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03358-1>
110. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E (2018) Markers of inflammation. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp 57–79
111. Petreski T, Piko N, Ekart R, et al (2021) Review on inflammation markers in chronic kidney disease. *Biomedicines* 9:1–16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020182>
112. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, et al (2018) The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World* 11:627–635
113. Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M, Teixeira MM (2019) Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends Immunol* 40:212–227
114. Lisset M, Regal L, Borges AA, et al Artículos de revisión Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares Inflammatory Acute Response. *Biochemical and Cellular Considerations*
115. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, et al (2018) The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World* 11:627–635
116. Dittmar T, Zaenker KS, Schmidt A (2006) Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis
117. Multhoff G, Molls M, Radons J (2012) Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol* 2
118. Bosmann M, Ward PA (2013) The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* 34:129–136
119. Bertha G, Robledo V (2008) Inmunología para el médico general Inflamación
120. Bennett M, Gilroy DW (2016) Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiol Spectr* 4:.. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mchd-0035-2016>
121. Feehan KT, Gilroy DW (2019) Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med* 25:198–214
122. Nimmo MA, Leggate M, Viana JL, King JA (2013) The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes Obes Metab* 15:51–60
123. Wan M, Tang X, Stsiapanava A, Haeggström JZ (2017) Biosynthesis of leukotriene B4. *Semin Immunol* 33:3–15

124. Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B (2015) 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1851:331–339
125. Merchant N, Bhaskar LVKS, Momin S, et al (2018) 5-Lipoxygenase: Its involvement in gastrointestinal malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 127:50–55
126. Haeggström JZ (2018) Leukotriene biosynthetic enzymes as therapeutic targets. *Journal of Clinical Investigation* 128:2680–2690
127. Kareti SR, Pharm SM (2020) In Silico Molecular Docking Analysis of Potential Anti-Alzheimer's Compounds Present in Chloroform Extract of *Carissa carandas* Leaf Using Gas Chromatography MS/MS. *Curr Ther Res Clin Exp* 93:. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2020.100615>
128. Chen Y, Pohlhaus DT (2010) In silico docking and scoring of fragments. *Drug Discov Today Technol* 7
129. Kumar Behera S, Rana M, Panda A, Singh Bisht S (2016) Molecular Docking Studies and In-silico Computational Analysis of Analogs of Anti-malarial Drugs Gut Microbiota and its role in different metabolic diseases View project Community structure of Avian fauna along altitudinal gradients of Sharda River System, Kumaun Himalaya View project Molecular Docking Studies and In-silico Computational Analysis of Analogs of Anti-malarial Drugs
130. Setiawan AA, Kumala S, Ratih D, Yuliana ND In Silico Study On S-Allyl Cysteine And Quercetin From Garlic (*Allium sativum* Linn) As Xanthine Oxidase Inhibitor
131. Buglak AA, Samokhvalov A v., Zherdev A v., Dzantiev BB (2020) Methods and applications of in silico aptamer design and modeling. *Int J Mol Sci* 21:1–25
132. Aamir M, Singh VK, Dubey MK, et al (2018) In silico prediction, characterization, molecular docking, and dynamic studies on fungal SDRs as novel targets for searching potential fungicides against fusarium wilt in tomato. *Front Pharmacol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01038>
133. Pinzi L, Rastelli G (2019) Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *Int J Mol Sci* 20
134. Agarwal S, Mehrotra R (2016) An overview of Molecular Docking. *JSM Chem* 4:1024
135. Chen YC (2015) Beware of docking! *Trends Pharmacol Sci* 36:78–95
136. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O (2009) Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *J Cell Mol Med* 13:238–248. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00665.x>
137. Agamah FE, Mazandu GK, Hassan R, et al (2020) Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Brief Bioinform* 21:1663–1675. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz103>

138. de Ruyck J, Brysbaert G, Blossey R, Lensink MF (2016) Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* 9
139. Gioia D, Bertazzo M, Recanatini M, et al (2017) Dynamic docking: A paradigm shift in computational drug discovery. *Molecules* 22:. <https://doi.org/10.3390/molecules22112029>
140. Mihășan M (2012) What in silico molecular docking can do for the “bench-working biologists.” *J Biosci* 37:1089–1095
141. Shaker B, Ahmad S, Lee J, et al (2021) In silico methods and tools for drug discovery. *Comput Biol Med* 137
142. Usman YO, Abechi SE, Benedict OO, et al (2013) Effect of solvents on [6]-Gingerol content of ginger rhizome and alligator pepper seed yusuf usman Effect of solvents on [6]-Gingerol content of ginger rhizome and alligator pepper seed. *Scholars Research Library Annals of Biological Research* 7–13
143. Kiran CR, Chakka AK, Amma KPP, et al (2013) Influence of cultivar and maturity at harvest on the essential oil composition, oleoresin and [6]-gingerol contents in fresh ginger from northeast India. *J Agric Food Chem* 61:4145–4154. <https://doi.org/10.1021/jf400095y>
144. Said PP, Arya OP, Pradhan RC, et al (2015) Separation of Oleoresin from Ginger Rhizome Powder Using Green Processing Technologies. *J Food Process Eng* 38:107–114. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12127>
145. Gautam B, Nepal R, Bhandari R, Gyawali S (2019) Evaluation of ginger extract’s yield, using cold extraction method and its antimicrobial activity against pathogens. *Asian Journal of Medical and Biological Research* 5:8–13. <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v5i1.41039>
146. Nagendra Chari KL, Manasa D, Srinivas P, Sowbhagya HB (2013) Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food Chem* 139:509–514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.099>
147. Ignat I, Volf I, Popa VI (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 126:1821–1835
148. Abdo M, Gad H, El-Ahmady S, Al-Azizi M (2018) Quality Assessment methods for Ginger (*Zingiber officinale*): A review. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University* 2:78–96. <https://doi.org/10.21608/aps.2018.18737>
149. Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A (2015) Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. *BMC Complement Altern Med* 15:. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0718-0>

150. Aly U, Abbas M, Taha H, Gaber E-S (2013) Characterization of 6-Gingerol for In Vivo and In Vitro Ginger (*Zingiber officinale*) Using High Performance Liquid Chromatography. *Global Journal Of Botanical Science* 1:9–17. <https://doi.org/10.12974/2311-858X.2013.01.01.2>
151. Unmesh K, Soumit P, Ss D, Bk S (2014) DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPTLC METHOD FOR DETERMINATION OF 6-GINGEROL IN SOFT GELATIN CAPSULE CONTAINING GINGER OLEORESIN. *International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine* 4:1532–1538
152. Wang J, Bai TY, Wang D, et al (2019) Pulsed vacuum drying of Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) slices: Effects on drying characteristics, rehydration ratio, water holding capacity, and microstructure. *Drying Technology* 37:301–311. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1423325>
153. El-Naggar MH, Mira A, Abdel Bar FM, et al (2017) Synthesis, docking, cytotoxicity, and LTA4H inhibitory activity of new gingerol derivatives as potential colorectal cancer therapy. *Bioorg Med Chem* 25:1277–1285. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.048>
154. Taha SM, Gadalla SA (2017) Development of an efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. *Talanta* 174:767–779. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.080>
155. Đức NL, Nguyễn L, Hoàng V, et al (2015) NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA 6-GINGEROL TỪ CỎ GỪNG (*Zingiber officinale-rosce*) Title: Extraction and bioactivity evaluation of 6-gingerol from Ginger (*Zingiber officinale-rosce*) root
156. Vedashree M, Asha MR, Roopavati C, Naidu MM (2020) Characterization of volatile components from ginger plant at maturity and its value addition to ice cream. *J Food Sci Technol* 57:3371–3380. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04370-0>
157. Nile SH, Park SW (2015) Chromatographic analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory activities of ginger extracts and its reference compounds. *Ind Crops Prod* 70:238–244. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.033>
158. Ramanery FP, Mansur AA, Mansur HS (2013) One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates
159. Athavale R, Sapre N, Rale V, et al (2022) Tuning the surface charge properties of chitosan nanoparticles. *Mater Lett* 308:.. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.131114>
160. Fàbregas A, Miñarro M, García-Montoya E, et al (2013) Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Int J Pharm* 446:199–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.015>

161. Hassani S, Laouini A, Fessi H, Charcosset C (2015) Preparation of chitosan-TPP nanoparticles using microengineered membranes - Effect of parameters and encapsulation of tacrine. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 482:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.04.006>
162. Jiang LQ, Wang TY, Wang Y, et al (2019) Co-disposition of chitosan nanoparticles by multi types of hepatic cells and their subsequent biological elimination: The mechanism and kinetic studies at the cellular and animal levels. *Int J Nanomedicine* 14:6035–6060. <https://doi.org/10.2147/IJN.S208496>
163. Shaheen S, Arafah MM, Alshanwani AR, et al (2021) Chitosan nanoparticles as a promising candidate for liver injury induced by 2-nitropropane: Implications of P53, iNOS, VEGF, PCNA, and CD68 pathways. *Sci Prog* 104:. <https://doi.org/10.1177/00368504211011839>
164. Tao W, Wang G, Wei J (2021) The role of chitosan oligosaccharide in metabolic syndrome: A review of possible mechanisms. *Mar Drugs* 19
165. Hadidi S (2022) Evaluation of the inhibitory activities of thyme compounds against corona-virus disease-19 (COVID-19) by molecular docking and molecular dynamic simulation. *Trends in Pharmaceutical Sciences* 2022:8. <https://doi.org/10.30476/TIPS.2022.94389.1137>
166. Rahman A, Ali MT, Shawan MMAK, et al (2016) Halogen-directed drug design for Alzheimer's disease: a combined density functional and molecular docking study. *Springerplus* 5:. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2996-5>
167. Azam F, Madi AM, Ali HI (2012) Molecular docking and prediction of pharmacokinetic properties of dual mechanism drugs that block MAO-B and adenosine A_{2A} receptors for the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Young Pharmacists* 4:184–192. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.100027>
168. Chibber S, Ahmed I (2016) Molecular docking, a tool to determine interaction of CuO and TiO₂ nanoparticles with human serum albumin. *Biochem Biophys Rep* 6:63–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.03.004>
169. Sisa M, Dvorakova M, Temml V, et al (2020) Synthesis, inhibitory activity and in silico docking of dual COX/5-LOX inhibitors with quinone and resorcinol core. *Eur J Med Chem* 204:. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112620>
170. Rampogu S, Baek A, Gajula RG, et al (2018) Ginger (*Zingiber officinale*) phytochemicals-gingerenone-A and shogaol inhibit SaHPPK: Molecular docking, molecular dynamics simulations and in vitro approaches. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 17:. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0266-9>
171. Abdelgawad AM, Hudson SM (2019) Chitosan nanoparticles: Polyphosphates cross-linking and protein delivery properties. *Int J Biol Macromol* 136:133–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.062>

172. Hasheminejad N, Khodaiyan F, Safari M (2019) Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chem* 275:113–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.085>
173. Zhao YH, Abraham MH, Le J, et al (2002) Rate-Limited Steps of Human Oral Absorption and QSAR Studies
174. Jaimez-Ordaz J, Contreras-López E, González-Mesillas F, et al (2021) Caracterización física y química de *Zingiber officinale* en diferentes estados de maduración para su uso potencial en la elaboración de bebidas saludables. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI* 9:82–87. <https://doi.org/10.29057/icbi.v9i17.7153>
175. Kumari A, Ramesh E, Mohan Babu Y, et al (2021) Effect of different drying methods and drying time on the sliced ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Rosc.). ~ 17 ~ *The Pharma Innovation Journal* 10:486–489
176. Ajav EA, Ogunlade CA (2014) Physical Properties of Ginger (*Zingiber Officinale*)
177. Singh V, Islam S, Meher J (2015) Effect of Slice Thickness on Recovery of Ginger Oil from Dry Ginger. Thermophysical and rheological studies of vegetable puree View project Post harvest structures, Storage technologies and Food habits in the context of Tribal and Rural Agriculture of India View project
178. Kumari A, Ramesh E, Mohan Babu Y, et al (2021) Effect of different drying methods and drying time on the sliced ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Rosc.). ~ 17 ~ *The Pharma Innovation Journal* 10:486–489
179. Shukla A, Goud V v., Das C (2019) Antioxidant potential and nutritional compositions of selected ginger varieties found in Northeast India. *Ind Crops Prod* 128:167–176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.086>
180. Ezez D, Tefera M (2021) Effects of Solvents on Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Ginger Extracts. *J Chem* 2021:.. <https://doi.org/10.1155/2021/6635199>
181. Ko MJ, Nam HH, Chung MS (2019) Conversion of 6-gingerol to 6-shogaol in ginger (*Zingiber officinale*) pulp and peel during subcritical water extraction. *Food Chem* 270:149–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.078>
182. Bharti SK, Roy R (2012) Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 35:5–26
183. Hatzakis E (2019) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18:189–220
184. Gan Z, Liang Z, Chen X, et al (2016) Separation and preparation of 6-gingerol from molecular distillation residue of Yunnan ginger rhizomes by high-speed counter-current chromatography and the antioxidant activity of ginger oils in

- vitro. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1011:99–107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.051>
185. Beale MH, Ward JL, Baker JM (2009) Establishing substantial equivalence: Metabolomics. *Methods in Molecular Biology* 478:289–303. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_17
 186. Torres AM, Price WS (2016) Common problems and artifacts encountered in solution-state NMR experiments. *Concepts Magn Reson Part A Bridg Educ Res* 45A: <https://doi.org/10.1002/cmr.a.21387>
 187. Katas H, Hussain Z, Awang SA (2013) Bovine serum albumin-loaded chitosan/dextran nanoparticles: Preparation and evaluation of ex vivo colloidal stability in serum. *J Nanomater* 2013:.. <https://doi.org/10.1155/2013/536291>
 188. Teng H, Seuseu KT, Lee WY, Chen L (2019) Comparing the effects of microwave radiation on 6-gingerol and 6-shogaol from ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Rosc). *PLoS One* 14:.. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214893>
 189. Ok S, Jeong WS (2012) Optimization of extraction conditions for the 6-shogaol-rich extract from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Prev Nutr Food Sci* 17:166–171. <https://doi.org/10.3746/pnf.2012.17.2.166>
 190. YASEER SUHAIMI M, ADZEMI MA, WAN ZALIHA WS (2018) EFFECT OF ORGANIC SUBSTRATES ON GINGER GROWTH, YIELD AND [6]-GINGEROL CONTENT CULTIVATED USING SOILLESS CULTURE SYSTEM. *AGROFOR* 3:.. <https://doi.org/10.7251/agreng1801122y>
 191. Aamir M, Singh VK, Dubey MK, et al (2018) In silico prediction, characterization, molecular docking, and dynamic studies on fungal SDRs as novel targets for searching potential fungicides against fusarium wilt in tomato. *Front Pharmacol* 9:.. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01038>
 192. Huang TC, Chung CC, Wang HY, et al (2011) Formation of 6-shogaol of ginger oil under different drying conditions. *Drying Technology* 29:1884–1889. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.589554>
 193. Agarwal M, Agarwal MK, Shrivastav N, et al (2018) Preparation of Chitosan Nanoparticles and their In-vitro Characterization. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research* 4:1713–1720. <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2018.4.2.17>
 194. Algharib SA, Dawood A, Zhou K, et al (2022) Preparation of chitosan nanoparticles by ionotropic gelation technique: Effects of formulation parameters and in vitro characterization. *J Mol Struct* 1252:.. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132129>
 195. Shariza Sahudin O, Article ZAHID HUSSAIN O, Sahudin S (2016) Cite this paper PREPARATION, CHARACTERISATION AND COLLOIDAL STABILITY OF CHITOSAN-TRIPOLYPHOSPHATE NANOPARTICLES: OPTIMISATION OF FORMULATION AND PROCESS PARAMETERS

196. Mattu C, Li R, Ciardelli G (2013) Chitosan nanoparticles as therapeutic protein nanocarriers: The effect of pH on particle formation and encapsulation efficiency. *Polym Compos* 34:1538–1545. <https://doi.org/10.1002/pc.22415>
197. Liu H, Gao C (2009) Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polym Adv Technol* 20:613–619. <https://doi.org/10.1002/pat.1306>
198. Mazancová P, Némethová V, Trel'ová D, et al (2018) Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation. *Carbohydr Polym* 192:104–110. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.030>
199. Doane TL, Chuang CH, Hill RJ, Burda C (2012) Nanoparticle ζ -potentials. *Acc Chem Res* 45:317–326. <https://doi.org/10.1021/ar200113c>
200. Feng Y, Kilker SR, Lee Y (2020) Surface charge (zeta-potential) of nanoencapsulated food ingredients. In: *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients*. Elsevier, pp 213–241
201. Ciro Y, Rojas J, Salamanca CH, et al (2020) Production and characterization of chitosan–polyanion nanoparticles by polyelectrolyte complexation assisted by high-intensity sonication for the modified release of methotrexate. *Pharmaceuticals* 13:. <https://doi.org/10.3390/ph13010011>
202. Karimi M, Avci P, Ahi M, et al (2014) Evaluation of Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles as a p-shRNA Delivery Vector: Formulation, Optimization and Cellular Uptake Study. *J Nanopharm Drug Deliv* 1:266–278. <https://doi.org/10.1166/jnd.2013.1027>
203. Cano-Sarmiento C, Téllez-Medina DI, Viveros-Contreras R, et al (2018) Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Reviews* 10:113–138
204. Bhattacharjee S (2016) DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235:337–351
205. dos Santos AM, Carvalho SG, Ferreira LMB, et al (2022) Understanding the role of electrostatic interactions on the association of 5-fluorouracil to chitosan-TPP nanoparticles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 640:. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128417>
206. Sharifi-Rad J, Quispe C, Butnariu M, et al (2021) Chitosan nanoparticles as a promising tool in nanomedicine with particular emphasis on oncological treatment. *Cancer Cell Int* 21
207. Ferreira LMB, dos Santos AM, Boni FI, et al (2020) Design of chitosan-based particle systems: A review of the physicochemical foundations for tailored properties. *Carbohydr Polym* 250
208. Swain SK, Sarkar D (2013) Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles. *Appl Surf Sci* 286:99–103. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.09.027>

209. Swain SK, Dey RK, Islam M, et al (2009) Removal of fluoride from aqueous solution using aluminum-impregnated chitosan biopolymer. *Sep Sci Technol* 44:2096–2116. <https://doi.org/10.1080/01496390902881212>
210. Mazyed EA, Badria FA, Elnaggar MH, et al (2022) Development of Cyclodextrin-Functionalized Transethoniosomes of 6-Gingerol: Statistical Optimization, In Vitro Characterization and Assessment of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Effects. *Pharmaceutics* 14:. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061170>
211. Rosyada A, Sunarharum WB, Waziroh E (2019) Characterization of chitosan nanoparticles as an edible coating material. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Institute of Physics Publishing
212. Budi S, Asih Suliasih B, Rahmawati I, Erdawati (2020) Size-controlled chitosan nanoparticles prepared using ionotropic gelation. *ScienceAsia* 46:457–461. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2020.059>
213. Kafshgari MH, Khorram M, Mansouri M, et al (2012) Preparation of alginate and chitosan nanoparticles using a new reverse micellar system. *Iranian Polymer Journal (English Edition)* 21:99–107. <https://doi.org/10.1007/s13726-011-0010-1>
214. Sawtarie N, Cai Y, Lapitsky Y (2017) Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 157:110–117. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.055>
215. Nazeri N, Avadi MR, Faramarzi MA, et al (2013) Effect of preparation parameters on ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 62:642–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.041>
216. Mirtajaddini SA, Najafi MF, Yazdi SAV, Oskuee RK (2021) Preparation of Chitosan Nanoparticles as a Capable Carrier for Antigen Delivery and Antibody Production. *Iran J Biotechnol* 19:32–40. <https://doi.org/10.30498/ijb.2021.247747.2871>
217. Gao P, Xia G, Bao Z, et al (2016) Chitosan based nanoparticles as protein carriers for efficient oral antigen delivery. *Int J Biol Macromol* 91:716–723. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.015>
218. Shrestha S, Diogenes A, Kishen A (2014) Temporal-controlled release of bovine serum albumin from chitosan nanoparticles: effect on the regulation of alkaline phosphatase activity in stem cells from apical papilla. *J Endod* 40:1349–1354. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.02.018>
219. Gan Q, Wang T (2007) Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces* 59:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.04.009>

220. Jarudilokkul S, Tongthammachat A, Boonamnuayvittaya V (2011) Preparation of chitosan nanoparticles for encapsulation and release of protein. *Korean Journal of Chemical Engineering* 28:1247–1251. <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0485-z>
221. Yadav P, Yadav AB (2021) Preparation and characterization of BSA as a model protein loaded chitosan nanoparticles for the development of protein-/peptide-based drug delivery system. *Futur J Pharm Sci* 7:. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00345-w>
222. Bhattarai N, Ramay HR, Chou SH, Zhang M (2006) Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *Int J Nanomedicine* 1:181–187. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.2.181>
223. Azevedo JR, Sizilio RH, Brito MB, et al (2011) Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. *J Therm Anal Calorim* 106:685–689. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1429-5>
224. Jain A, Thakur K, Sharma G, et al (2016) Fabrication, characterization and cytotoxicity studies of ionically cross-linked docetaxel loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym* 137:65–74. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.012>
225. Ali SW, Rajendran S, Joshi M (2011) Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydr Polym* 83:438–446. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.004>
226. Kang BS, Lee SE, Ng CL, et al (2015) Exploring the Preparation of Albendazole-Loaded Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles. *Materials* 8:486–498. <https://doi.org/10.3390/ma8020486>
227. Wei Q, Yang Q, Wang Q, et al (2018) Formulation, Characterization, and Pharmacokinetic Studies of 6-Gingerol-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *AAPS PharmSciTech* 19:3661–3669. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1165-2>
228. Pooja D, Babu Bikkina DJ, Kulhari H, et al (2014) Fabrication, characterization and bioevaluation of silibinin loaded chitosan nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 69:267–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.035>
229. Azam F, Amer AM, Rabulifa A, Elzwawi MM (2014) Ginger components as new leads for the design and development of novel multi-targeted anti-Alzheimer's drugs: A computational investigation. *Drug Des Devel Ther* 8:2045–2059. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S67778>
230. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2012) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 64:4–17
231. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, et al (2002) Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 45:2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>

232. Azam F, Amer AM, Rabulifa A, Elzwawi MM (2014) Ginger components as new leads for the design and development of novel multi-targeted anti-Alzheimer's drugs: A computational investigation. *Drug Des Devel Ther* 8:2045–2059. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S67778>
233. Ertl P, Rohde B, Selzer P (2000) Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* 43:3714–3717. <https://doi.org/10.1021/jm000942e>
234. Zhao YH, Abraham MH, Le J, et al (2002) Rate-Limited Steps of Human Oral Absorption and QSAR Studies
235. Gilbert NC, Gerstmeier J, Schexnaydre EE, et al (2020) Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nat Chem Biol* 16:783–790. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0544-7>
236. Sarfraz M, Rauf A, Keller P, Qureshi AM (2021) N,N'-dialkyl-2-thiobarbituric acid based sulfonamides as potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *Can J Chem* 99:330–345. <https://doi.org/10.1139/cjc-2020-0332>
237. de Sousa ACC, Combrinck JM, Maepa K, Egan TJ (2020) Virtual screening as a tool to discover new β -haematin inhibitors with activity against malaria parasites. *Sci Rep* 10:3374. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60221-0>
238. Aziz MdA, Mehedi M, Akter Mstl, et al (2019) In vivo and in silico evaluation of analgesic activity of *Lippia alba*. *Clinical Phytoscience* 5:. <https://doi.org/10.1186/s40816-019-0133-z>
239. Toepak EP, Tambunan USF (2017) In silico design of fragment-based drug targeting host processing α -glucosidase i for dengue fever. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. Institute of Physics Publishing
240. Ahn S il, Lee JK, Youn HS (2009) Inhibition of homodimerization of toll-like receptor 4 by 6-shogaol. *Mol Cells* 27:211–215. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0026-y>
241. Volkamer A, Kuhn D, Grombacher T, et al (2012) Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. In: *Journal of Chemical Information and Modeling*. American Chemical Society, pp 360–372
242. Chowdhury MRH, Bhuiyan MIK, Saha A, et al (2014) Identification and analysis of potential targets in *Streptococcus sanguinis* using computer aided protein data analysis. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* 7:45–54. <https://doi.org/10.2147/AABC.S67336>
243. Sinha S, Doble M, Manju SL (2019) 5-Lipoxygenase as a drug target: A review on trends in inhibitors structural design, SAR and mechanism based approach. *Bioorg Med Chem* 27:3745–3759
244. Chiasson AI, Robichaud S, Ndongou Moutombi FJ, et al (2020) New zileuton-hydroxycinnamic acid hybrids: Synthesis and structure-activity relationship

- towards 5-lipoxygenase inhibition. *Molecules* 25:.
<https://doi.org/10.3390/molecules25204686>
245. Dinh CP, Ville A, Neukirch K, et al (2020) Structure-based design, semi-synthesis and anti-inflammatory activity of tocotrienolic amides as 5-lipoxygenase inhibitors. *Eur J Med Chem* 202:.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112518>
 246. Saptarini NM, Sitorus EY, Levita J (2013) Structure-Based in Silico Study of 6-Gingerol, 6-Ghogaol, and 6-Paradol, Active Compounds of Ginger (*Zingiber officinale*) as COX-2 Inhibitors. *Int J Chem* 5:.
<https://doi.org/10.5539/ijc.v5n3p12>
 247. Dang N le, Matlock MK, Hughes TB, Swamidass SJ (2020) The Metabolic Rainbow: Deep Learning Phase i Metabolism in Five Colors. *J Chem Inf Model* 60:1146–1164. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00836>
 248. Zaretski J, Matlock M, Swamidass SJ (2013) XenoSite: Accurately predicting cyp-mediated sites of metabolism with neural networks. *J Chem Inf Model* 53:3373–3383. <https://doi.org/10.1021/ci400518g>
 249. Schleiff MA, Payakachat S, Schleiff BM, et al (2021) Impacts of diphenylamine NSAID halogenation on bioactivation risks. *Toxicology* 458:.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152832>
 250. le Dang N, Hughes TB, Krishnamurthy V, Swamidass SJ (2016) A simple model predicts UGT-mediated metabolism. *Bioinformatics* 32:3183–3189.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw350>
 251. Matlock MK, Hughes TB, Swamidass SJ (2015) XenoSite server: A web-available site of metabolism prediction tool. *Bioinformatics* 31:1136–1137.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu761>
 252. Alsubi TA, Attwa MW, Attwa MW, et al (2020) In silico and in vitro metabolism of ribociclib: A mass spectrometric approach to bioactivation pathway elucidation and metabolite profiling. *RSC Adv* 10:22668–22683.
<https://doi.org/10.1039/d0ra01624a>
 253. Lu L, Ge Y, Wang X, et al (2021) Rapid and sensitive multimode detection of *Salmonella typhimurium* based on the photothermal effect and peroxidase-like activity of MoS₂@Au nanocomposite. *Sens Actuators B Chem* 326:.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128807>
 254. Al-Shakliah NS, Attwa MW, Kadi AA, AlRabiah H (2020) Identification and characterization of in silico, in vivo, in vitro, and reactive metabolites of infigratinib using LC-ITMS: bioactivation pathway elucidation and in silico toxicity studies of its metabolites. *RSC Adv* 10:16231–16244.
<https://doi.org/10.1039/c9ra10871h>