Lic. en Microbiología. Ariadna Fernanda Martínez Ávila

Evaluación del efecto del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) micro y nano-encapsulado sobre la proliferación de células de cáncer de colon SW480.

2026

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Biomedicina

Evaluación del efecto del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) micro y nano-encapsulado sobre la proliferación de células de cáncer de colon SW480

Tesis

Que como parte de los requisitos para

obtener el Grado de

Maestra en Ciencias en Biomedicina

Presenta

Lic. en Microbiología. Ariadna Fernanda Martínez Ávila

Dirigido por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Co-Director:

Dr. Gabriel Luna Bárcenas

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Octubre de 2026

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Biomedicina

Evaluación del efecto del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) micro y nano-encapsulado sobre la proliferación de células de cáncer de colon SW480

Tesis

Que como parte de los requisitos para

obtener el Grado de

Maestra en Ciencias en Biomedicina

Presenta

Lic. en Microbiología. Ariadna Fernanda Martínez Ávila

Dirigido por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Co-Director:

Dr. Gabriel Luna Bárcenas

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Presidente

Dr. Gabriel Luna Bárcenas

Secretario

Dr. Diego Alberto Bravo Alfaro

Vocal

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga

Vocal

Dr. Pablo García Solís

Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Octubre de 2026

Dedicatoria

Para mi familia y amigos que me acompañaron durante el camino y para los que se adelantaron pero se fueron confiando en mí.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a la Dra. Haydé por darme la oportunidad de trabajar con ella, por apoyarme, estar presente ante cualquier situación y en todo momento.

A mi familia (Kaya,Thunder, papá, hermana, abuelos, tíos, primos) y amigos (Sara, Zai, Dam, Raúl, Monse, Toni, Lili) que estuvieron ahí para apoyarme, distraerme y sacarme una sonrisa en los momentos de triunfo y momentos donde todo parecía no tener rumbo. A mi pareja que ha estado para mí tanto para festejar un logro como para resolver un problema. A mis compañeras de clase (Chio, Diana, Majo y Bren) que hicieron más ameno y llevadero el proceso durante este capítulo y me sacaron más de una sonrisa.

A mis compañeras del grupo de investigación (Yan, Edel, Mariana, Fátima, Carmila, y Arturo) que siempre estuvieron ahí para apoyarme, ayudarme a resolver alguna duda, enseñarme algo nuevo, escucharme cuando lo necesité y darme palabras de aliento, y por su puesto esas pláticas donde los experimentos parecían no tener fin y las salidas de convivencia.

Al Dr. Gabriel por estar al pendiente en todo momento, al Dr. Diego por su pacencia infinita y la disposición de compartir su conocimiento.

A la Dra. Gaby y el Dr. Pablo por su apoyo y compresión durante el proceso.

Y como olvidar a los que se unieron en el camino y me apoyaron de una forma u otra (Sarah, Jess).

Finalmente, agradezco a la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihiti) por el financiamiento para este proyecto, al igual que a la facultad de Medicina, al centro de investigación biomédica avanzada (CIBA), al Tecnológico de Monterrey y al Cinvestav unidad Querétaro.

Índice

Resumen 12

Abstract 14

1 Introducción 16

2 Antecedentes 17

2.1 Epidemiología del cáncer de colon 17

2.2 Etiología del cáncer de colon 17

2.3 Fisiopatología del cáncer de colon 18

2.4 Muerte celular 19

2.5 Tratamientos contra el cáncer de colon 21

2.6 Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) y su composición 23

2.7 Compuestos bioactivos 25

2.8 Tratamientos emergentes: Sistemas de liberación controlada 27

2.9 Sistema de liberación de fármacos auto-nanoemulsificables (SNEDDS) 28

2.10 Microcápsulas de alginato de sodio 29

2.11 Efecto de compuestos bioactivos encapsulados 30

3 Hipótesis 32

4 Objetivos 32

4.1 Objetivo general 32

4.2 Objetivos específicos 32

5 Metodología 32

5.1 Extracción de compuestos fenólicos solubles e insolubles 32

5.2 Síntesis del SNEDDS 33

5.3 Síntesis de las microcápsulas 34

5.4 Análisis morfológico....34
5.5 Análisis fisicoquímico....34
5.6 Digestión gastrointestinal *in vitro*....35
5.7 Fermentación *in vitro*....35
5.8 Ensayo de Folin- Ciocalteu....36
5.9 Mantenimiento de las células SW480....36
5.10 Preparación de tratamientos....37
5.11 Viabilidad celular....37
5.12 Curva dosis respuesta....38
5.13 Ensayo de muerte celular....38
5.14 Análisis estadísticos....39
6 Resultados y discusión....39
6.1 Evaluación y caracterización de los sistemas de encapsulación....39
6.1.1 Evaluación del diseño experimental de SNEDDS....39
6.1.2 Caracterización mediante FTIR de SNEDDS y microcápsulas de alginato 47
6.1.3 Análisis de TGA y DSC de las microcápsulas de alginato....52
6.1.4 Análisis de morfología de las microcápsulas de alginato....54
6.2 Digestión *in vitro* (INFOGEST) de SNEDDS y microcápsulas....56
6.2.1 Digestión de SNEDDS....56
6.2.2 Evaluación de la digestión de las perlas de alginato....58
6.2.3 Evaluación de la fermentación....61
6.3 Viabilidad celular....64
6.3.1 Curva dosis respuesta....64

6.3.2 Determinación de la IC_{50} 71
6.4 Ensayo de muerte celular 73
7 Conclusiones 76
8 Referencias 79

Índice de tablas.

Tabla 1. Tipos de terapias para el cáncer de colon. 21
Tabla 2. Efecto de compuestos bioactivos y su efecto sobre líneas celulares cancerosas.....23
Tabla 3. Efecto de compuestos bioactivos encapsulados sobre líneas celulares cancerosas.....30
Tabla 4. Cantidad de componentes para el modelo factorial 2^3.....33
Tabla 5. Cantidad del porcentaje (%) representado en µg/ mL de cada uno de los componentes del SNEDD.....37
Tabla 6. Cantidad de los componentes de cada formulación del diseño experimental 1.....40
Tabla 7. Resultados de tamaño de gota e índice de polidispersidad (PDI) de las formulaciones del diseño experimental 1.....40
Tabla 8. Resultado del análisis multivariado del diseño experimental 1.....41
Tabla 9. Resultados de DLS del tamaño de gota y PDI de las formulaciones del diseño experimental 2.....42
Tabla 10. Resultado del análisis de la segunda formulación del diseño experimental 2.....43
Tabla 11. Formulaciones correspondientes al diseño de superficie de respuesta.43
Tabla 12. Evaluación del tamaño de gota y PDI de los tratamientos con extracto incorporado.....47
Tabla 13. Números de onda asociado a los grupos funcionales del EHG y componentes del SNEDD. 49
Tabla 14. Números de onda asociado a los grupos funcionales del EMG y el alginato. 51
Tabla 15. Valores de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de los diferentes tratamientos en células SW480. 72
Tabla 16. Porcentaje de tipo de muerte celular de los tratamientos fermentados. 73
Tabla 17. Imágenes representativas de cada tratamiento y muerte celular. 73

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la carcinogénesis del cáncer de colon. 18
Figura 2. Esquema representativo de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. 20
Figura 3. Representación del garambullo (Myrtillocactus geometrizans). 23
Figura 4. Tipos de sistemas de liberación. 28
Figura 5. Esquema representativo de la preparación de SNEDDS. 29
Figura 6. Estructura del alginato, ácido β- d -manurónico (M); α- l- gulurónico (G). B) reticulación del alginato con iones Ca^{+2}. 30
Figura 7. Fotos representativas de las emulsiones. 41
Figura 8. Gráficas de superficie de respuesta del A) tamaño de gota y B) PDI. ...45
Figura 9. Diagrama ternario. 46
Figura 10. Espectro de FTIR de los componentes de SNEDD, el extracto hexánico de garambullo (EMG) y T2. 48
Figura 11. Espectro de FTIR de los componentes de las microcápsulas de alginato 2% y el extracto metanólico de garambullo. 50
Figura 12. Análisis de A) TGA y B) DSC de las microcápsulas huecas. 53
Figura 13. Micrografías SEM de microcápsulas de Alg 2% con y sin extracto metanólico de garambullo (EMG). 56
Figura 14. Comportamiento del tamaño de gota durante la digestión in vitro. 57
Figura 15. Comportamiento del PDI durante la digestión *in vitro*. 58
Figura 16. Liberación de compuestos fenólicos (mg/mL equivalente de ácido gálico) del EMG libre y encapsulado en alginato 2 % durante la digestión *in vitro.* 59
Figura 17. Liberación de compuestos fenólicos (mg/mL equivalente de ácido gálico) del EMG libre y encapsulado en alginato 2 % durante la fermentación a 0 h, 6 h, 12 h y 24 h. 61
Figura 18. Evaluación del pH en el proceso de fermentación a lo largo de 0 h, 6 h, 12 h y 24. 63

Figura 19. Curva dosis-respuesta del EHG sobre la viabilidad de células SW480. 64
Figura 20. Curva dosis-respuesta de SNEDDS + EHG sobre la viabilidad de células SW480. 66
Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular del SNEDDS, Cremophor EL, Capryol 90 y Gelucire 59/14 tras la exposición a diferentes concentraciones sobre células SW480 a 24 h. 69
Figura 22. Curva dosis-respuesta del EHG fermentado 12 h sobre la viabilidad de células SW480. 70
Figura 23. Curva dosis-respuesta del SNEDD+EHG fermentado 12 h sobre la viabilidad de células SW480. 71

Abreviaturas y siglas

SNEDDS: Self-nanoemulsifying drug delivery systems

EHG: Extracto hexánico de garambullo

EMG: Extracto metanólico de garambullo

Alg: Alginato

FTIR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

DLS: Dispersión de luz dinámica

PDI: Índice de polidispersidad

HLB: Equilibrio hidrofílo-lípofilo

SEM: Microscopia electrónica de barrido

TGA: Análisis termogravimétrico

DSC: Análisis de calorimetría diferencial de barrido

EDS: Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

SFB: Suero Fetal Bovino

Resumen

El cáncer de colon es una neoplasia maligna que ocupa el tercer lugar en prevalencia y el segundo en mortalidad tanto en México como el mundo, por lo que se han buscado alternativas terapéuticas basadas en compuestos nutracéuticos y sistemas de nanoencapsulación con la capacidad de reducir los efectos secundarios, evitar resistencia a fármacos y aumentar la calidad de vida.

En este sentido, el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans)*, es un fruto con potencial terapéutico gracias a su alta concentración de compuestos fitoquímicos. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue evaluar un extracto hidrofílico de garambullo microencapsulado y uno lipofílico nanoencapsulado sobre la proliferación de células de cáncer de colon SW480.

El extracto lipofílico se integró en un sistema de liberación de fármacos autonanoemulsificante (SNEDDS), con diseño 2^3 compuesto de Gelucire 59/14 (40%) y Cremophor EL (60%) como surfactante, Capryol 90 como cosurfactante y Labrafac Lipophile WL 1349 como fase oleosa. Seleccionando la formulación T2 (63.64% de surfactante, 9.09% de surfactante, 27.27% de aceite y 8% EHG) para la incorporación del extracto, obteniendo tamaños de gota de 27.66 nm y 32.635 nm. Por otra parte, las microcápsulas con alginato al 2% integraron el extracto hidrofílico (EMG) de garambullo al 1% mediante gelificación iónica en una solución de $CaCl_2$ 0.1 M. Ambos sistemas de encapsulación se sometieron a una digestión gastrointestinal (INFOGEST) y fermentación *in vitro*, obteniendo los compuestos derivados de cada fase, sin embargo, los SNEDDS presentaron mayor eficacia.

Se evaluó la viabilidad celular en SW480 mediante el ensayo de MTT del EHG y SNEDDS+EHG sin fermentar y fermentados a 12 h, observando un efecto dosis-dependiente. La IC_{50} obtenida fue de 46 µg/mL (EHG), 35 µg/mL (SNEDDS + EHG) y 50 µg/mL (EHG fermentado 12 h) y 26 µg/mL (SENDDS + EHG fermentado 12 h).

Posteriormente, se llevó a cabo el ensayo de detección de muerte celular mediante el Kit Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit donde se obtuvo que ambos tratamientos

fermentados mostraron en su mayoría viabilidad por encima del 97%, 1.45% de apoptosis y 1.17% necrosis con el tratamiento de SNEDDS+EHG fermentado.

Con base en los resultados presentados anteriormente, se evidencia que la formulación con características más favorables fue el sistema de nanoemulsión, observándose que protegió al compuesto lipofílico y disminuye la viabilidad de células de cáncer de colon humano. No obstante, los resultados del ensayo de tipo de muerte celular no fueron suficiente evidencia para determinar el tipo de muerte.

Palabras clave: Cáncer de colon, garambullo, SNEDDS, alginato, polifenoles.

Abstract

Colon cancer is a malignant neoplasm that ranks third in prevalence and second in mortality both in Mexico and worldwide; consequently, researchers have sought therapeutic alternatives based on nutraceutical compounds and nanoencapsulation systems capacty to reduce the secondary effects, preventing drug resistance, and improving quality of life.

In this sense, garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) is a fruit with therapeutic potential due to its high concentration of phytochemicals. Therefore, the objective of this project was to evaluate a microencapsulated hydrophilic garambullo extract and a nanoencapsulated lipophilic garambullo extract on the proliferation of SW480 colon cancer cells.

The lipophilic extract was incorporated into a self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS), formulated with Gelucire 59/14 (40%) and Cremophor EL (60%) as surfactants, Capryol 90 as a cosurfactant, and Labrafac Lipophile WL 1349 as the oil phase. Formulation T2 (63.64% surfactant, 9.09% surfactant, 27.27% oil, and 8% EHG) was selected for incorporating the extract, obtaining droplet sizes of 27.66 nm and 32.635 nm. On the other hand, microcapsules containing 2% alginate incorporated 1% of the hydrophilic garambullo extract (EMG) through ionic gelation in a 0.1 M $CaCl_2$ solution. Both encapsulation systems were subjected to gastrointestinal digestion (INFOGEST) and in vitro fermentation, obtaining the compounds derived from each phase; however, the SNEDDS demonstrated greater efficacy.

Cell viability was assessed in SW480 cells using the MTT assay for EHG and SNEDDS+EHG both unfermented and fermented for 12 hours, revealing a dose-dependent effect. The IC_{50} values obtained were 46 µg/mL (EHG), 35 µg/mL (SNEDDS + EHG), 50 µg/mL (EHG fermented for 12 h), and 26 µg/mL (SNEDDS + EHG fermented for 12 h).

Subsequently, a cell death assay was performed using the Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit, which revealed that both fermented treatments showed viability levels above 97%, with 1.45% apoptosis and 1.17% necrosis observed with the fermented SNEDDS+EHG treatment.

Based on the results presented previously, it is evident that the formulation with the most favorable characteristics was the nanoemulsion system, which was observed to protect the lipophilic compound and reduce the viability of human colon cancer cells, but the results didn’t reveal the type of cellular death.

Keywords: Colon cancer, garambullo, SNEDDS, alginate, polyphenols.

1 Introducción

El cáncer de colon es la tercera neoplasia maligna tanto en México como en el mundo y el segundo en mortalidad, donde los tratamientos actuales tienden a ser inespecíficos y causar efectos secundarios, principalmente de resistencia a fármacos. Es por ello que se ha propuesto el uso de terapias alternativas a base de frutos o plantas con la finalidad de disminuir los efectos secundarios y a al mismo tiempo actuar sobre las células cancerosas. En este caso mediante el uso del garambullo, un fruto endémico de México, explotando su alto valor nutrimental y presencia de fitoquímicos de carácter hidrofílico y lipofílico incorporados en sistemas de encapsulación. La encapsulación surge como una solución práctica e innovadora para protección contra la degradación enzimática y pH en el tracto gastrointestinal tanto a nivel microescala a base materiales poliméricos como matriz y nanoescala como el sistema de liberación autonanoemulsificante (SNEDDS) con la composición base de una emulsión clásica.

Así, esta propuesta sienta las bases para el desarrollo de un tratamiento dirigido hacia el área de salud como un tratamiento alternativo y novedoso para tratar el cáncer de colon, de tal manera que se desarrollen cápsulas de nivel micro y nano con la capacidad de proteger los fitoquímicos del garambullo, mismos que se espera que aumenten su biodisponibilidad en colon, se liberen y produzcan efectos anti proliferativos sobre células cancerosas.

A continuación, se muestran los antecedentes y fundamentos relevantes para el sustento de este trabajo de investigación, la metodología utilizada para la síntesis de las micro y nanocápsulas, caracterizaciones fisicoquímicas, evaluación *in vitro* de la digestión y fermentación, finalmente los ensayos en la línea celular de cáncer de colon SW480 de viabilidad y tipo de muerte celular.

2 Antecedentes

2.1 Epidemiología del cáncer de colon

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por alteraciones genéticas y epigenéticas, llevando a las células a una división descontrolada (Pool et al., 2018; Wang et al., 2019). El cáncer colorectal se ha posicionado como el tercer tipo más común a nivel mundial, con una incidencia de 1, 926, 425 casos con 904,019 fallecimientos en 2022 según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2024). Sin embargo, esta cifra continúa en aumento. Los datos más recientes del GLOBOCAN 2024, reportaron una incidencia de 2,041,007 con una mortalidad de 917,895 por año (Sung et al., 2026). En el caso de México, el cáncer colorectal en 2022 presentó una incidencia de 16, 082 casos y el segundo en mortalidad con 8, 283 fallecimientos según el registro de la Secretaría de Salud en 2022 (Rodríguez-Wong & Rodríguez-Medina, 2024; Secretaría de salud, 2024). Así, para 2024 la incidencia de casos fue de 15, 697 pero la mortalidad aumentó a 8, 539 defunciones posicionándose como la primera causa de muerte en el país (GLOBOCAN, 2026).

2.2 Etiología del cáncer de colon

El desarrollo del cáncer de colon puede deberse a diversos factores de riesgo entre ellos los no modificables como el género, sexo y predisposición genética y los modificables que son la dieta y estilo de vida (La Vecchia et al., 2024; Wang et al., 2019). Se ha observado que una alimentación a base de carnes rojas, alimentos procesados y grasas saturadas, consumo de alcohol y tabaco aumenta el riesgo de padecerlo (Thanikachalam & Khan, 2019). Por el contrario, el consumo de alimentos ricos en minerales, vitaminas, fibra y fitoquímicos ayuda a prevenir la oxidación de macromoléculas y DNA al tener la capacidad de neutralizar los efectos perjudiciales de las especies reactivas de oxígeno, entre otros mecanismos moleculares (Jaganathan et al., 2014; Sandoval-Salazar et al., 2023).

2.3 Fisiopatología del cáncer de colon

El epitelio del colon sano puede verse afectado inicialmente por mutaciones en el gen APC y la vía de señalización Wnt, originando una displasia en el epitelio denominado adenoma temprano que conlleva a mutaciones en el gen K-ras y BRAF, posteriormente avanza a adenoma tardío acumulando mutaciones en el gen de SMAD4 y CDC4, evolucionando en adenoma tardío donde también se presentan mutaciones en los genes TGF-β, Bax, IGF-2R y posteriormente mutaciones en p53 dando origen a lo que se denomina carcinoma (**Figura 1**) (Malki et al., 2021).

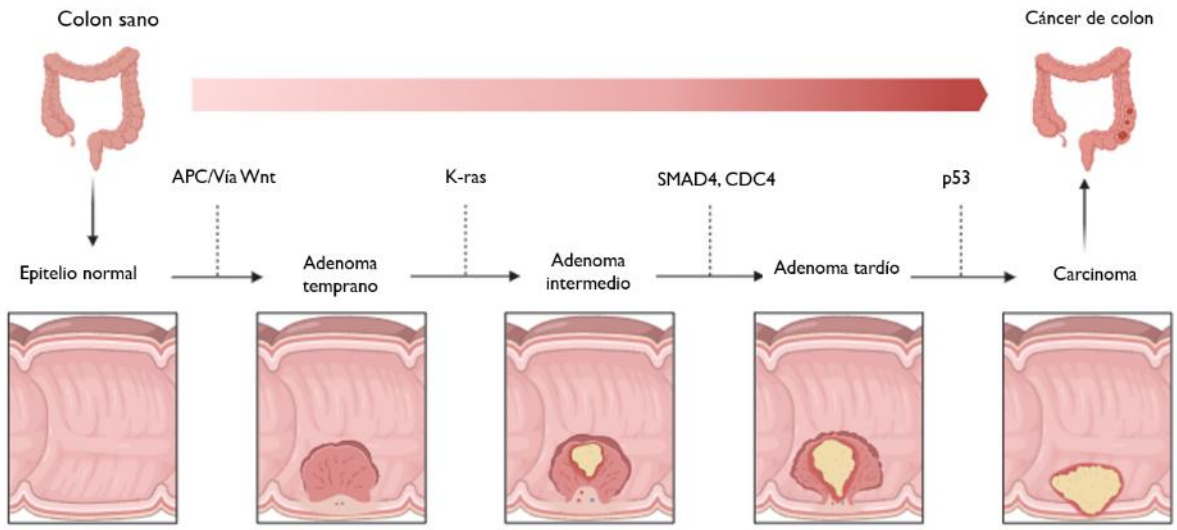


Figura 1. Esquema de la carcinogénesis del cáncer de colon.

Modificado de Malki et al., (2021).

Se ha visto que el cáncer de colon tiende a la formación de pólipos en el intestino grueso o recto, en algunos casos se vuelve metastásico afectando principalmente a hígado, peritoneo, nódulos regionales y pulmón (Labianca et al., 2010; Thanikachalam & Khan, 2019). El desarrollo de metástasis también se ha asociado a la presencia de microsatélites estables e inestables, mutaciones en la ADN polimerasa POLE o POLD1, en genes APC, KRAS, PIK3CA, SMAD4 y TP53, así como a la desregulación de las vías de señalización Wnt/β-catenina (proliferación celular), Notch (proliferación), NF-κB (inflamación), EGFR (angiogénesis) y

JAKs/STAT3 (supervivencia celular). Llevando a la alteración de diversos procesos celulares siendo la más relevante la supervivencia celular y la inhibición de la apoptosis puesto que no ocurre muerte celular (Malki et al., 2021).

2.4 Muerte celular

La muerte celular es un proceso esencial para mantener el equilibrio entre la proliferación y muerte celular, mediante procesos apoptóticos, de autofagia y necrosis siendo críticos en la formación de tumores (Handan Özdemir, 2023). La proteína p53 es conocida como el guardián del genoma puesto que está implicada en procesos de reparación del ADN, arresto del ciclo celular, senescencia y apoptosis. Cuando existe una mutación en esta proteína se restringe su función, por ende, ya no hay control sobre la proliferación o apoptosis (Marei et al., 2021).

La apoptosis también llamada muerte celular programada, se caracteriza por la formación de cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y del ADN cromosomal, en respuesta al estrés oxidativo, daño al DNA y ausencia del factor de crecimiento, está regulada principalmente por la proteína p53, cIAP y la vía NF-κB (Chen et al., 2023; Handan Özdemir, 2023). Molecularmente se lleva a cabo por vía intrínseca o extrínseca, involucrando una serie de eventos que llevan a la formación del apoptosoma compuesto por Apaf-1, procaspasa-9 y citocromo C. La vía extrínseca comienza con la unión de ligando Fas y TNF, posteriormente se ensambla el complejo DISC formado por la proteína FADD y procaspasa-8/10 que activan las caspasas efectoras 3, 6 y 7 culminando con la muerte celular, o activando la vía intrínseca o mitocondrial mediada por las proteínas de la familia Bcl-2 que a su vez modulan la liberación de citocromo C para regular la permeabilidad de la membrana mitocondrial y posteriormente la formación del apoptosoma para la muerte celular (**Figura 2**) (Handan Özdemir, 2023; Su et al., 2015; Xie et al., 2020).

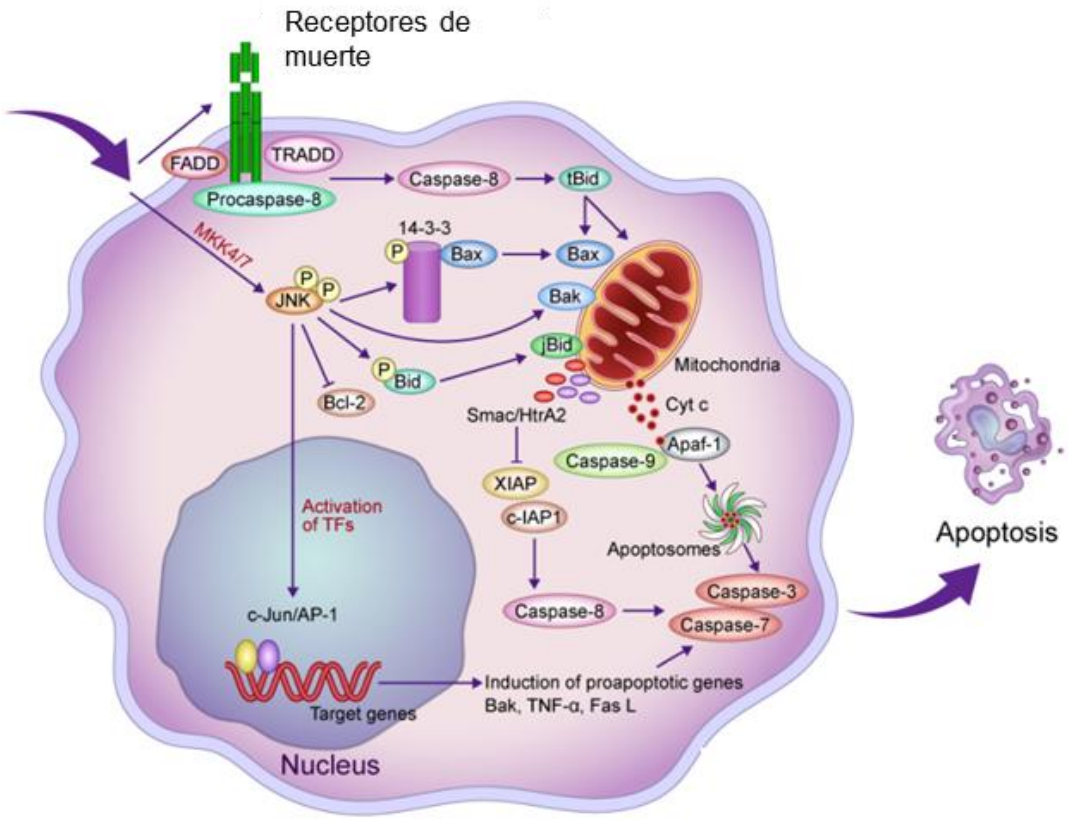


Figura 2. Esquema representativo de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

Tomado de (Kim et al., 2024).

La necrosis es otro tipo de muerte celular donde los orgánulos y células se hinchan, ocurre un cambio en la permeabilidad y ruptura de la membrana citoplasmática que resulta en la liberación del contenido celular, originando una necrosis no regulada o necrosis regulada. Algunas proteínas implicadas en estos procesos son las quinasas MLKL, RIPK3 y RIPK4 (Zhao et al., 2022). Los estímulos capaces de inducir necrosis son la familia TNF, FasL, el factor TRAI y patógenos (X. Zhang & Chen, 2016). La activación de la necrosis regulada comienza con la fosforilación de RIPK1 y RIPK3 llevando a la formación del necrosoma que a su vez induce la fosforilación de MLKL. Posteriormente MLKL se une a la membrana celular causando la ruptura y liberación del contenido celular (Handan Özdemir, 2023).

Ambos procesos son fundamentales en la progresión y formación de tumores puesto que están implicados en la eliminación de células anormales o dañadas, por ello, se ha estudiado su influencia en la progresión del cáncer y los quimioterapéuticos que van dirigidos hacia estos (Handan Özdemir, 2023; Xie et al., 2020).

2.5 Tratamientos contra el cáncer de colon

Los tratamientos que se aplican en cáncer de colon incluyen quimioterapia con 5-fluoracil (5-FU), oxaliplatino y metrotexato cuando el cáncer está en etapa III o más avanzado; radioterapia y cirugía en las etapas tempranas; e inmunoterapia cuando hay presencia de microsatélites (**Tabla 1**). Sin embargo, estos tratamientos presentan efectos secundarios a largo plazo, siendo el principal la resistencia a fármacos el cual conlleva a una disminución de procesos pro-apoptóticos y persistencia de células cancerosas (Bukowski et al., 2020).

Tabla 1. Tipos de terapias para el cáncer de colon.

Tratamiento		Mecanismo	Efectos	Referencias
Quimioterapia	5-fluorouracilo (5-FU)	Se incorpora al DNA y RNA puesto que tiene similitud a la pirimidina, este es un compuesto aromático heterocíclico análogo de uracilo con un grupo flúor en el C5.	• Modificación de la unión citoplasmática a p53. • Inhibición de GSK3β regula positivamente a β-catenina y negativamente a Bcl2 y E2F1. • Activación de la vía NF-κB/AKT/β-catenina/ZEB1 induce quimiorresistencia al 5-FU.	Blondy et al., 2020.
	Cisplatino	Se une al ADN genómico o mitocondrial	• Aumento de la reparación del ADN.	Ghosh, 2019.

	creando lesiones en el ADN e induciendo estrés oxidativo.	• Toxicidad (nefrotoxicidad, ototoxicidad, hepatotoxicidad, gastrointestinal, neurotoxicidad). • Inactivación del fármaco con glutatión y metalotioneínas.	
Inmunoterapia	• Bloqueo del punto de control inmunitario (ICB) • Bloqueo de la muerte programada-1 (PD-1) • Receptor de antígeno quimérico (CAR)-T	• Síndrome de liberación de citocinas (SLC). • Toxicidad neurológica.	Ghazi et al., 2022; J. Xu et al., 2021.
Cirugía	• Robótica • Laparoscópica • Abierta	• Recaída después de la resección quirúrgica • Muerte 5 años después de la cirugía.	Yuval et al., 2023.
Radioterapia	Como terapia adyuvante en conjunto con quimioterapia e inmunoterapia	• Inespecífico • Toxicidad en intestino.	H. Zhang et al., 2024.

Por lo que se han buscado terapias alternativas a base alimentos que tengan la capacidad de disminuir los efectos secundarios y que puedan administrarse en etapas iniciales del cáncer (Li et al., 2022). En especial frutas y verduras ya que son ricas en fibra, vitaminas, minerales y compuestos fitoquímicos siendo estos últimos, compuestos bioactivos (carotenoides, alcaloides, polifenoles, tocoferoles, etc.) con la capacidad de contrarrestar el estrés producido por especies reactivas de oxígeno. Entre los frutos se ha destacado el consumo de manzanas, moras, arándanos, fresas y cerezas (Jaganathan et al., 2014), mostrando en estudios *in vitro* que el jugo de manzana disminuyó la presencia de especies reactivas de oxígeno en las

líneas celulares Caco-2 y HT29 (Kresty et al., 2001), mientras que los frutos rojos presentaron disminución del crecimiento celular en las líneas HCT-15, HT29 y HCT-116 (Olsson et al., 2004). Nuestro grupo de trabajo determinó, que el garambullo disminuye la viabilidad celular en la línea SW480 con respuesta dosis-dependiente (Maldonado-Cano et al., 2026).

2.6 Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) y su composición

El *Myrtillocactus geometrizans* mejor conocido como garambullo (**Figura 3**), es un fruto endémico de México que pertenece a la familia de las cactáceas encontrado en los estados de Guanajuato, Querétaro, Puebla y San Luis Potosí. Este fruto ha tomado importancia gracias a su alto valor nutricional, es rico en fibra, minerales como potasio, magnesio, hierro, cobre, zinc; vitaminas A, B y C; compuestos fitoquímicos como polifenoles, flavonoides, betalaínas, tocoferoles y carotenoides mismos compuestos que se ha reportado influyen negativamente proliferación celular de líneas cancerosas (**Tabla 2**) (Montiel-Sánchez et al., 2021; Sánchez-Recillas et al., 2022; Sandoval-Salazar et al., 2023).



Figura 3. Representación del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*).

Tabla 2. Efecto de compuestos bioactivos y su efecto sobre líneas celulares cancerosas.

Compuesto	Línea celular	Efecto	Referencia
Genisteína	HT29	Inhibe la proliferación celular e induce apoptosis.	Pool et al., 2018.
Eriocitrina	MCF-7	Induce apoptosis regulando las vías de señalización JAK2/STAT3 y JNK/p38.	Zhou et al., 2023.
Ácido ferúlico hexóxido	CT26	Inhibe la proliferación celular e induce apoptosis, activando la fosforilación de ERK y JNK (BCL-2 y BAX).	Chen et al., 2023.
Betanina	HT-29 Caco-2	Inhibición del crecimiento e inducción de apoptosis aumentando la expresión de genes pro-apoptóticos (BAD, Caspasa-3, Caspasa-8, Caspasa-9, y Fas-R) y disminución del gen anti-apoptótico Bcl-2.	Saber et al., 2023.
Miricetina ramnósido	A2780 CP70	Induce apoptosis y arresto del ciclo celular en fase G1.	Y. Zhang et al., 2018.
Ácido vanílico	HCT116	Inhibe la angiogénesis, induce detención de la fase G1 e inhibe la proliferación celular.	Gong et al., 2019.
β-sitosterol	HCT116	Suprime el crecimiento, migración celular, induce apoptosis y regula negativamente la expresión de LEF-1.	Gu et al., 2023.

En el estudio realizado por Sánchez-Recillas et al., (2022) se identificaron los componentes del garambullo antes y después de una digestión *in vitro*, observando la bioaccesibilidad de los compuestos digeribles y no digeribles incluyendo isoflavonas, flavanoles, flavonoles, tocoferoles, fitoesteroles, ácidos fenólicos, entre otros. En los resultados se observó que la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos (isoflavonas, quercetina, tocoferoles, etc.) y ácidos fenólicos (hidroxibenzoícos e hidroxicinámicos) disminuyen a lo largo del tracto

gastrointestinal, lo cual puede ser a causa a las variaciones de pH y degradación enzimática. En el caso de los fitoesteroles y la quercetina, se identificaron en garambullo antes de digerir, pero no lograron ser identificados a lo largo de la digestión.

2.7 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos encontrados en el fruto de garambullo por (Sánchez-Recillas et al., 2022) tienen propiedades de polaridad distinta, tal es el caso de los compuestos hidrófilos como polifenoles, betaínas y azúcares; o lipófilos como fitoesteroles y tocoferoles (Davidson et al., 2023; Fraga et al., 2019). En otras matrices alimentarias, estos compuestos han demostrado producir beneficios sobre la salud actuando como antiinflamatorios, inmunomoduladores, antitumorales y antioxidantes (Bucekova et al., 2018). Al tener propiedades antioxidantes ayudan a neutralizar las especies reactivas de oxígeno y prevenir la oxidación de proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA, por lo cual son una prometedora alternativa como tratamiento alternativo en el control de enfermedades a causa de estrés oxidativo.

Los compuestos lipofílicos o insolubles se pueden encontrar como fitoesteroles o tocoferoles; los fitoesteroles están conformados por una estructura parecida al colesterol, pero con 28 o 29 carbonos, doble enlace en el carbono 22-23 y grupos etilo o metilo en la cadena lateral compuestos que tienen la capacidad de disminuir el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer (Jefrei et al., 2024). Los tocoferoles tienen un anillo de cromanol, se clasifican como α-, β-, γ- y δ- dependiendo del número y la ubicación de los grupos metilo en el anillo, además los carbonos no metilados tienen capacidad electrófila la cual ayuda a capturar radicales libres lipídicos, además su cola de 16 carbonos aproximadamente le brinda propiedad lipofílica (Yang et al., 2010). En muestras de garambullo liofilizado se encontraron fitoesteroles: β-sitoesterol (0.08 ± 0.00 µg), colestanol (0.01 ± 0.00 µg), brassicasterol (0.03 ± 0.00 µg) y escotenol (0.01 ± 0.00 µg). Y tocoferoles: α-tocoferol (0.53 ± 0.00 µg) y β-tocoferol (0.28 ± 0.02 µg) (Sánchez-Recillas et al., 2022).

Por otro lado, los compuestos hidrófilos o solubles como los polifenoles están compuestos de uno a tres anillos de benceno unidos a grupos hidroxilo, los cuales se pueden clasificar como ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos lignanos, flavonoides como isoflovonas, flavonoles, flavonas y antocianinas los cuales tienen propiedades benéficas en la salud como capacidad antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria, entre otras (Okpoghono et al., 2024). La cantidad encontrada de los polifenoles mayoritarios en el garambullo liofilizado según lo reportado por Sánchez-Recillas et al., (2022) fue de eriocitrina (1.34 ± 0.10 µg), quercetina (5.39 ± 0.25 µg), kaempferol (3.27 ± 0.09 µg), ácido vinílico (4.35 ± 0.04 µg), ácido ferúlico (4.18 ± 0.17 µg), Betanidina (3.01 ± 0.20 µg), entre otros.

A pesar de tener grandes propiedades terapéuticas, aún existen diversas complicaciones puesto que son sensibles a la temperatura, luz, pH, y solubilidad ya que los lipofílicos son poco solubles en agua y los hidrófilos demasiado solubles en agua, ambos resultando en una mala absorción y baja disponibilidad (Okpoghono et al., 2024). Recientemente se reportó que algunos compuestos bioactivos se encuentran unidos a la fracción no digerible de garambullo, aumentando su biodisponibilidad hasta llegar al intestino grueso donde son liberados con ayuda de la microbiota local y llevan a cabo su función (Godínez-Santillán et al., 2024).

Sánchez-Recillas et al., (2024) analizaron los metabolitos generados a partir de los compuestos no digeribles del garambullo mediante fermentación *in vitro,* cuantificando los metabolitos a diferentes tiempos de fermentación (0 h, 6 h y 24 h). Encontraron compuestos que se presentaron durante las 24 h como el 1,3-di-tert-butilbenceno, 2,4-di-tert-butilfenol, el isobutirato 3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentilo, *p*-cresol, fenol, 1-nonamol, dodecanal, ácido 2-hidroximandélico, éster etílico, di-TMS, indol, 2,6,8-trimetildecano, formato de octilo, indol y octametil-ciclotetrasiloxano, sin embargo, los compuestos restantes presentaron variación en la aparición, lo cual se especula puede estar asociado al metabolismo de la microbiota y sus metabolitos secundarios como el caso del 3,4-dihidroxifenil acético, 4-dihidroxifenil acético y el ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil acético. Si bien la presencia de algunos compuestos

es constante durante las 24h no se encuentran en la misma concentración a lo largo del tiempo, así como los metabolitos secundarios.

Por ello, se han buscado alternativas para aumentar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos, siendo una el uso de la encapsulación de compuestos en diferentes matrices poliméricas (Okpoghono et al., 2024).

2.8 Tratamientos emergentes: Sistemas de liberación controlada

Los biomateriales son una nueva tecnología que se ha implementado en el área médica ya sea como acarreadores de fármacos, en liberación controlada, diagnóstico o regeneración de tejidos (Xu et al., 2023). Los polímeros y estructuras que se han utilizado con frecuencia como acarreadores de fármacos y moléculas de interés en el área biomédica se encuentran el quitosano, alginato, oro, plata, liposomas y nanoemulsiones debido a sus propiedades biocompatibles (**Figura 4**) (Alven & Aderibigbe, 2020; Matica et al., 2019; Sarhan et al., 2016). En tratamientos de cáncer las ventajas que ofrecen radican en la protección del compuesto bioactivo contra la degradación o modificación de la molécula de interés, ya que le permiten atravesar barreras físicas y químicas característicos de los ambientes cancerosos (Ahmadi et al., 2022; Li et al., 2022).

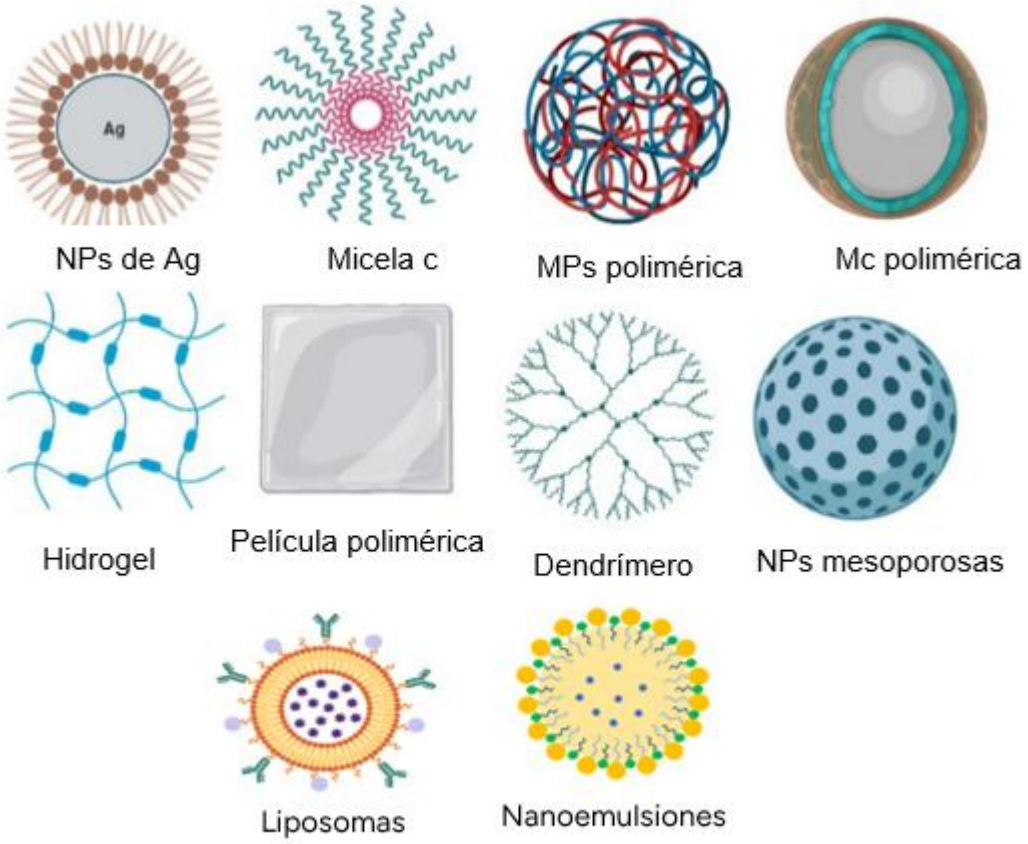


Figura 4. Tipos de sistemas de liberación.

2.9 Sistema de liberación de fármacos auto-nanoemulsificables (SNEDDS)

El sistema de administración de fármacos nano-autoemulsificante (SNEDDS) está conformado de surfactante, co-surfactante y aceite en el que se solubiliza la molécula con interés farmacéutico (Bravo-Alfaro et al., 2022), el sistema funciona como un nanoacarreador para transportar el fármaco. El tamaño de gota puede encontrarse entre 20 a 200 nm y tiene la cualidad de emulsificar espontáneamente en medios acuosos en agitación constante (**Figura 5**) (Sailor G., 2021). En estudios recientes Sampieri-Morán et al., (2025), reportaron que los extractos Magnolol y Honokiol encapsulados en SNEDDS presentaron una mayor viabilidad y estabilidad en estudios *in vitro* de una simulación digestiva en comparación a los extractos libres.

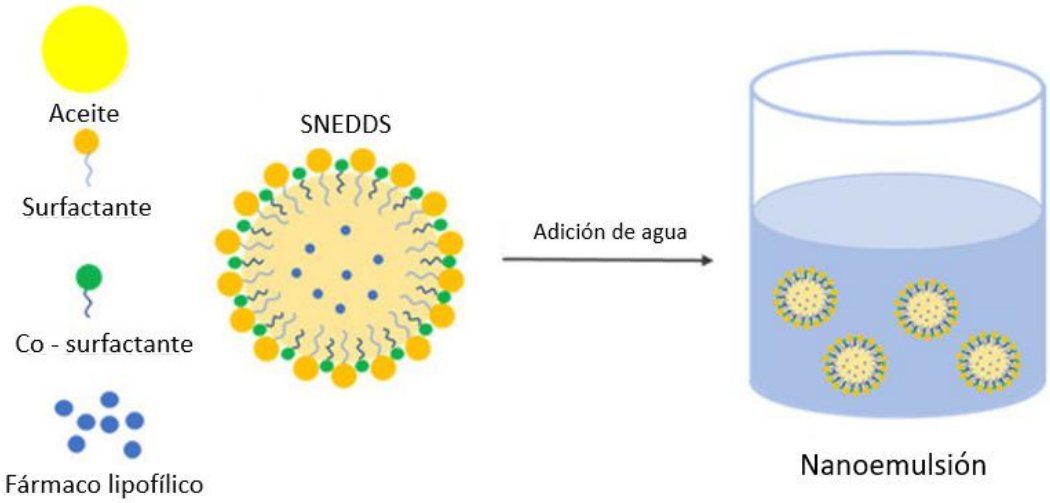


Figura 5. Esquema representativo de la preparación de SNEDDS.

Modificado de Sailor G (2021).

2.10 Microcápsulas de alginato de sodio

El alginato es un polisacárido considerado un biopolímero natural biocompatible, biodegradable y no tóxico, es cual está compuesto estructuralmente por ácido β- d -manurónico (M) unido al ácido α- l- gulurónico (G) por un enlace 1,4-glicosídico los cuales forman bloques MG y GM que con ayuda de iones de iones de Ca^{+2} se forma una red tridimensional el cual se asemeja a una caja de huevo (**Figura 6**). (Frent et al., 2022; H. Zhang et al., 2021). El alginato se ha utilizado en la encapsulación de compuestos bioactivos, como el estudio reportado por Wongverawattanakul et al., (2022) en donde encapsularon en alginato los polifenoles de *Mesona chinensis* Benth observando que tras una digestión simulada el contenido de polifenoles se incrementó un 25% más en comparación con el extracto libre. Además, reportaron que la liberación de extracto fue gradual mejorando la bioaccesibilidad de los compuestos.

.

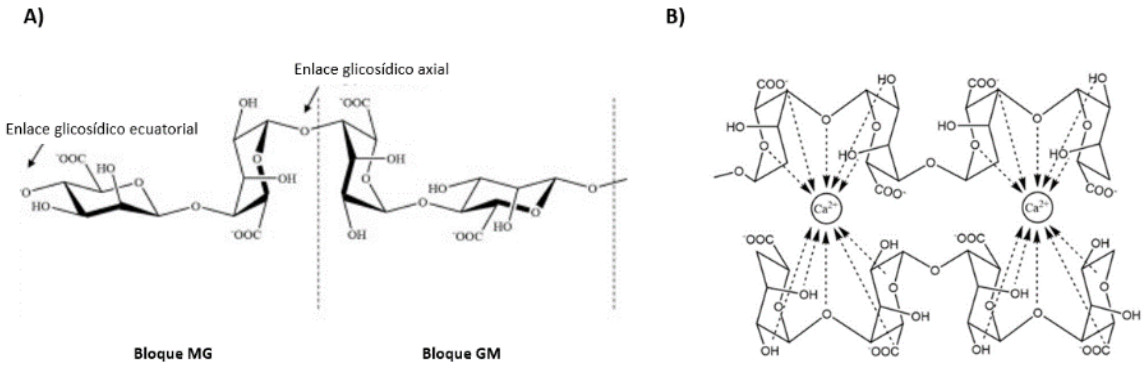


Figura 6. Estructura del alginato, ácido β- d -manurónico (M); α- l- gulurónico (G). B) reticulación del alginato con iones Ca^{+2}.

Modificado de H. Zhang et al., (2021).

2.11 Efecto de compuestos bioactivos encapsulados

La implementación de la nanotecnología en los sistemas de liberación de compuestos bioactivos ha tenido un gran impacto en los últimos años ya que se han visto mejoras en la eficacia del tratamiento y disminución de toxicidad (**Tabla 3**). Los compuestos incorporados en SNEDDS presentan mayor captación celular gracias a las propiedades intrínsecas y estructura de los tensoactivos que tienen la capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana celular. Por otro lado, los compuestos incorporados en matrices de alginato presentan mayor estabilidad y por tanto eficacia sobre líneas celulares cancerosas.

Tabla 3. Efecto de compuestos bioactivos encapsulados sobre líneas celulares cancerosas.

Compuesto	Matriz de encapsulación	Efecto	Referencia
Curcumina	Formulación de SNEDDS con aceite de canela, Tween 80 y PEG 200.	Se evaluó la citotoxicidad en la línea Caco-2, encontrando que 50 µM de extracto de curcumina (CMN) libre mostró una citotoxicidad del 67.09 ± 2.41% en comparación con el extracto	Kanwal et al., 2021.

		encapsulado CMN-SNEDDS con 88.83 ± 2.85% de actividad.	
β-sitosterol	Matriz de alginato/quitosano funcionalizado con ácido fólico.	Observaron que la IC_{50} fue de 37.41 ± 5.30 µM para β-SIT-Alg/Ch-NPs-FA y 189 ± 10.23 µM para β-SIT en suspensión los cuales presentaron efecto antiproliferativo en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	Karim et al., 2022.
Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal)	Formulación de SNEDDS con aceite de coco, Tween 80 y DMSO.	Evaluaron la formulación en la línea celular SW620 y HT29, los resultados mostraron que las células fueron más sensibles al compuesto encapsulado a 72 h. La línea más susceptible fue la SW620 (16.50 ± 0.87 µg/mL) en comparación con la HT29 (34.10 ± 0.30 µg/mL).	Izham et al., 2019.
Extracto de hoja de olivo	Matriz de alginato de calcio (CA).	Se evaluó la citotoxcicidad en la línea celular MCF-7, donde encontraron que 1000 µg/mL presentaron 66% de viabilidad celular con el extracto libre y encapsulado un 32%. Siendo la IC_{50} de 865.4 µg/mL.	Bal et al., 2023.

Con base en los antecedentes en el presente trabajo se buscó evaluar el extracto hidrofílico de garambullo encapsulado en alginato y el extracto lipofílico en SNEDDS sobre la proliferación de células de cáncer de colon SW480.

3 Hipótesis

Los extractos de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) micro y nanoencapsulados reducirán de manera más efectiva la proliferación de células de cáncer de colon SW480 en comparación con los extractos no encapsulados.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) micro y nano-encapsulado sobre la proliferación de células de cáncer de colon SW480.

4.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar microcápsulas con compuestos solubles del extracto de garambullo y nanocápsulas cargadas con compuestos lipofílicos.
2. Cuantificar los compuestos bioactivos derivados de cada fase de la digestión *in vitro* del garambullo micro y nanoencapsulado.
3. Determinar la viabilidad celular e IC_{50} en células de cáncer de colon SW480, así como el tipo de muerte celular inducida (apoptosis y necrosis).

5 Metodología

5.1 Extracción de compuestos fenólicos solubles e insolubles

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) se recolectó, se lavó con agua y se liofilizó a -40°C, 133 × 10^{-3} mBAR por 7 días, la muestra obtenida se mantuvo almacenada a -80°C hasta su uso para la extracción de compuestos hidrofílicos y lipofílicos. Para la extracción de compuestos hidrofílicos, se utilizó una solución metanol-agua proporción 80:20 v/v. Brevemente, 10 g de garambullo liofilizado fueron disueltos en 100 mL de la solución metanol-agua en agitación por 10 min a 7000 rpm, en Ultraturrax por 10 min a 10 000 rpm. Después se colocó en un baño ultrasónico por 30 min, se centrifugó por 5 min a 4000 rpm, se colectó el

sobrenadante, se ultracongeló a -80°C, se liofilizó y finalmente se congeló a -4 °C hasta su uso.

Para la extracción de los compuestos lipofílicos se tomaron 5 g de garambullo al cual se le añadieron 50 mL de hexano, se agitó por 4 h a 7000 rpm, se centrifugó por 10 min a 4000 rpm y se transfirió el sobrenadante a tubos de 20 mL. El solvente se evaporó en un horno de vacío, una vez evaporado el solvente se almacenó a 4 °C (Sánchez-Recillas et al., 2022).

5.2 Síntesis del SNEDDS

Para la elaboración de los SNEDDS se evaluó la solubilidad del extracto hexánico de garambullo (EHG) en aceite, 20 mg de extracto EHG en 20 µL de Labrafac Lipophile WL 1349. Se realizó un modelo factorial 2^3 (**Tabla 4**) con dos modelos distintos. Para el primero se utilizó Gelucire-59/14 (60%) + Cremophor EL (40%) (surfactante), Labrafil M1944 (co-surfactante) y Labrafac Lipophile WL 1349 (aceite); y la segunda compuesta de Gelucire-59/14 (40%) + Cremophor EL (60%) (surfactante), Capryol 90 (co-surfactante) y Labrafac Lipophile WL 1349 (aceite). Se mezclaron en viales de 2 mL y se homogenizó manualmente formando la emulsión mediante la adición de la mezcla anterior a 20 mL de agua destilada en agitación de 300 rpm por 12 min (Bravo-Alfaro et al., 2022).

Tabla 4. Cantidad de componentes para el modelo factorial 2^3.

	Surfactante	**%**	**Co-surfactante**	**%**	**Aceite**	**%**
T1	700 µL	73.68	100 µL	10.52	150 µL	15.78
T2	700 µL	63.63	100 µL	9.09	300 µL	27.27
T3	700 µL	60.86	300 µL	26.08	150 µL	13.04
T4	700 µL	53.84	300 µL	23.07	300 µL	23.07
T5	500 µL	66.66	100 µL	13.33	150 µL	20
T6	500 µL	55.55	100 µL	11.11	300 µL	33.33
T7	500 µL	52.63	300 µL	31.57	150 µL	15.78
T8	500 µL	45.45	300 µL	27.27	300 µL	27.27

5.3 Síntesis de las microcápsulas

Se realizaron dos tipos de microcápsulas, libres de extracto metanólico de garambullo (EMG) compuestas de alginato de sodio de bajo peso molecular al 2% mediante gelación iónica con $CaCl_2$ 0.1 M, y otras con extracto EMG al 1% incorporado con alginato de sodio con respecto al volumen total de éste (Kurtulbaş et al., 2022). Ambas se elaboraron con ayuda de un encapsulador al cual se le programaron los siguientes parámetros:

Frecuencia	**500 Hz**
Voltaje	1000 V
Presión	300 mbar
Boquilla	1000 µm

5.4 Análisis morfológico

La morfología de se evaluó por microscopía de transmisión de barrido (SEM) preparadas en un soporte de cobre con un recubrimiento de carbono secándose a 50 °C, analizadas en bajo vacío. Complementario a ello se realizó un análisis de espectroscopia de energía dispersiva (EDS) en alto vacío ambos con recubrimiento de carbono (Ochoa-Sanchez et al., 2024).

5.5 Análisis fisicoquímico

Se utilizó el análisis por espectrofotometría infrarroja transformada Fourier (FTIR) para la detección de los grupos funcionales presentes en cada muestra de nanoemulsión y microcápsulas con un rango de 600-4000 cm^{-1}, el análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) para observa el tamaño de partícula (Humphreys Salas et al., 2023). También se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) y de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un intervalo de 30°C a 450°C, con una

tasa de calentamiento de 10°C/min, bajo atmósfera de nitrógeno (Bravo-Alfaro et al., 2022).

5.6 Digestión gastrointestinal *in vitro*

La metodología se basó modelo de digestión simulada de Sampieri-Morán et al., (2024), donde mediante el uso de enzimas y electrolitos se simuló la digestión oral, gástrica e intestinal. Para la fase de digestión oral se utilizó amilasa, mucina porcina y una solución de saliva con electrolitos KCl (15.1 mM), KH_2PO_4 (3.7 mM), $NaHCO_3$ (13.6 mM), $MgCl_2(H_2O)$ (0.15 mM), $(NH_4)_2CO_3$ (0.06 mM), HCl (0.09 mM) y $CaCl_2(H_2O)_2$ (1.5 mM) todo en condiciones de pH 7 a una temperatura de 37 °C en agitación constante por 10 min. Posteriormente para la fase gástrica se modificó el pH a 3, se añadió pepsina, lipasa gástrica y la solución de los siguientes electrolitos: KCl (6.9 mM), KH_2PO_4 (0.9 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), NaCl (47.2 mM), $MgCl_2(H_2O)$ (0.12 mM), $(NH_4)_2CO_3$ (0.5 mM), HCl (15.6 mM) y $CaCl_2(H_2O)_2$ (0.15 mM) en agitación constante por 2 h a 37 °C; finalmente para la fase intestinal se modificó a pH 7, se añadieron tripsina, sales biliares y los siguientes electrolitos KCl (6.9 mM), KH_2PO_4 (0.9 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), NaCl (47.2 mM), $MgCl_2(H_2O)$ (0.12 mM), $(NH4)_2CO_3$ (0.5 mM), HCl (15.6 mM) y $CaCl_2(H2O)_2$ (0.15 mM) en agitación constante por 4 h a 37 °C. La cantidad de enzimas se determinó con ayuda de una aplicación en línea: http://www.proteomics.ch/IVD/

Al final de las fases oral y gástrica se tomó una alícuota de, en el caso de la fase intestinal la toma fue cada 30 min durante 4 h (Sampieri-Morán et al., 2025).

5.7 Fermentación *in vitro*

Se utilizó el modelo de fermentación simulado de Campos-Vega et al., (2009), para el cual se prepararon 500 mL de medio de cultivo basal compuesto de 1 g de peptona de caseína, 1 g de extracto de levadura, 0.2 g de K_2HPO_4, 0.05 g de NaCl, 0.2 g de KH_2PO_4, 0.005 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 g de $NaHCO_3$,0.25 g de L-cisteína, 0.025 g de sales biliares, 1 mL de Tween-40, 5 µL de vitamina K1 y 0.025 g de hematina porcina diluida en 5 mL de NaOH 1 M ajustado

a pH 7. Se inocularon 3 g de dos muestras fecales en 27 mL de buffer de fosfato 0.1 M ajustado a pH 7, de este se añadió 1 mL, 200 mg de las muestras digeridas en 9 mL en medio de cultivo basal previamente gasificado con una mezcla de H_2:CO_2:N_2, 10:10:80. Posteriormente las muestras se llevaron al equipo de fermentación a temperatura de 37 °C, donde se tomó muestra a 0 h, 6 h, 12 h y 24 h.

5.8 Ensayo de Folin- Ciocalteu

La cuantificación de compuestos fenólicos del EMG libre y encapsulado en perlas de alginato derivados de la digestión *in vitro* (fase oral, gástrica e intestinal) y fermentación a 6 h, 12 h y 24 h se llevó a cabo mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, donde éste actúa como compuesto oxidante y los fenoles como donante de electrones en presencia de carbonato de sodio (Pérez et al., 2023). Como primer paso se realizó una curva de calibración con ácido gálico a 10 concentraciones diferentes (0.20, 0.18, 0.16, 0.14, 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04 y 0.02). Se añadieron 12 µL de cada stock en una placa de 96 pozos, 50 µL de agua desionizada y 13 µL del reactivo de Folin, se incubó durante 6 minutos y posteriormente se añadieron 125 µL de Na_2CO_3 (carbonato de sodio) y 100 µL de agua desionizada. Transcurridos 90 minutos la placa se leyó en un lector de placas de Elisa a 750 nm (Kupina et at., 2019).

5.9 Mantenimiento de las células SW480

Se utilizó la línea celular ATCC SW480 de un adenocarcinoma colorectal de tipo B, la cual presenta los oncogenes: myc+; myb+; ras+; fos+; sis+; p53+; abl-; ros-; src-; con mutaciones relevantes los codones 273 y 309 de p53.

Las células se mantuvieron en medio Dulbeccos`s Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibiótico-antimicótico al 1%. Se sembraron en cajas de 60 mm manteniéndose en incubación en condiciones aerobias con 5 % de CO_2 a 37ºC hasta alcanzar 80% de confluencia celular para experimento o transferencia mediante el uso de tripsina.

5.10 Preparación de tratamientos

Con base en los resultados obtenidos de caracterización se decidió continuar los experimentos biológicos con las nanocápsulas, SNEDDS. Se realizaron preparaciones de SNEDDS libres de extracto y con extracto sin fermentar en agua desionizada utilizando las siguientes concentraciones, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005 y 0.001 tomando como volumen total 1 mL (**Tabla 5**). Se utilizaron las mismas concentraciones para el extracto, pero este se solubilizó con ayuda de dimetilsulfóxido (DMSO) al 20 mM del volumen total (J R Salazar, 2011), los fermentados de 12 h de SNEDDS y extracto. Así mismo, se evaluó cada componente de forma individual utilizando la cantidad de µL proporcional a la preparación en conjunto.

Tabla 5. Cantidad del porcentaje (%) representado en µg/ mL de cada uno de los componentes del SNEDD.

Concentración	SNEDDS (µg/mL)	EHG (µg/mL)	Cremophor EL (µg/mL)	Gelucire 59/14 (µg/mL)	Capryol 90 (µg/mL)
0.001	0.2	0.01	0.07	0.05	0.01
0.005	1	0.05	0.38	0.25	0.09
0.01	2	0.10	0.76	0.51	0.18
0.02	4	0.22	1.53	1.02	0.36
0.05	10	0.71	3.85	2.57	0.91
0.1	20	2.55	7.79	5.19	1.85

5.11 Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) por la reducción de tetrazolio a formazán, mediado por las células con un metabolismo activo observando que las enzimas mitocondriales NADH reductoras son las responsables de la conversión (Riss et al., 2016). Por ello la cantidad de formazán es directamente proporcional al número de

células viables y los cristales se solubilizan con ayuda de un solvente orgánico como el DMSO antes de leer la absorbancia mediante espectrofotometría a 570 nm.

En placas de 96 pozos se sembraron 10,000 células por pozo contadas previamente con ayuda de la cámara de Neubauer, se incubaron por 24 h con medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Posteriormente, se retiró el medio y se añadieron los tratamientos correspondientes en medio DMEM suplementado con 2% SFB teniendo un volumen total de 200 µL por pozo. Después de 24h de incubación se retiró el medio con tratamiento y se agregó la solución de MTT 5 mg/mL, se incubó durante 1 h y después de retirar la solución de MTT, se agregó DMSO y se midió la absorbancia en un lector de placas de Elisa (Al-Qahtani et al., 2022).

5.12 Curva dosis respuesta

La curva dosis respuesta se realizó con las concentraciones previamente mencionadas de los tratamientos (0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005 y 0.001) extracto y SNEDDS sin fermentar, así como de ambos tratamientos fermentados a 12 h. Donde la viabilidad de obtuvo a partir de la siguiente fórmula (Karim et al., 2022):

$$Viabilidad\ (\%) = \frac{DO\ células\ con\ tratamiento}{DO\ células\ control} x\ 100$$

Con base a la gráfica obtenida el IC_{50} del extracto y SNEDDS sin fermentar, así como de ambos tratamientos fermentados a 12 h se obtuvo mediante la sustitución de valores utilizando la ecuación de la recta.

5.13 Ensayo de muerte celular

Para el ensayo de muerte celular se utilizó el Kit Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit, para detectar muerte por apoptosis o necrosis. Para lo cual se utilizó una placa de 6 pozos, donde se sembraron 500, 000 células por pozo incubándose a 5 % de CO_2 a 37ºC durante 24 h con medio DMEM 10% SFB, pasado el tiempo se les agregó el tratamiento (SNEDDS + EHG y EHG fermentados 12 h) con medio DMEM al 2% y se incubaron durante 24 h. Luego, se lavaron con ayuda de un cell scraper, se retiraron las células de la placa, se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL, se

centrifugó 2 veces durante 5 minutos a 1500 rpm para eliminar el medio y resuspendieron en PBS al 1%. Posteriormente se tomó una alícuota de 20 µL de muestra, 20 µL de Anexina V y 5 µL de yoduro de propidio (PI), se incubaron durante 20 minutos en condiciones de total oscuridad. Se utilizó un control positivo, donde las células fueron tratadas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y un control negativo libre de tratamiento (Waghela et al., 2015; Zhang et al., 2021). Se colocó la mezcla en un portaobjetos y se llevó al microscopio. El porcentaje de muerte celular se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$Muerte\ celular\ (\%) = \frac{Células\ con\ Anexina\ V/PI}{Células\ totales} x\ 100$$

5.14 Análisis estadísticos

Las gráficas se obtuvieron de la media de las muestras evaluadas en cada experimento, así como la desviación estándar, se utilizaron ANOVA´s multivariados y de dos vías para obtener las diferencias estadísticas, se utilizó la comparación de medias de Tukey como prueba *post hoc*. Se tomaron como diferencias estadísticamente significativas las muestras que presentaron un mayor igual o menor al valor de p= 0.05.

6 Resultados y discusión

6.1 Evaluación y caracterización de los sistemas de encapsulación

6.1.1 Evaluación del diseño experimental de SNEDDS

En la **Tabla 6** se muestra el diseño experimental 1 de la SNEDD compuesta de Gelucire 59/14 (60%) + Cremophor EL (40%) como surfactante, Labrafil M 1944 CS como co-surfactante y Labrafac Lipophile WL 1349 como aceite y en la **Tabla 7** se muestran el tamaño de gota y el PDI. De acuerdo a los parámetros esperados (tamaño de gota entre 50 nm - 25 nm y un PDI de 0.07 - 0.14) para las SNEDDS no se cumplió con lo esperado. El tamaño de gota fue de 138 nm influenciado por el co-surfactante y el PDI promedio resultó de 0.25 influenciado por el aceite (**Tabla 8**)

(Bravo-Alfaro et al., 2022; Izham et al., 2019). Además la emulsión no fue homogénea ya que tuvo una apariencia lechosa por lo que se considera una emulsión de tipo C (Izham et al., 2019) (**Figura 7**).

Tabla 6. Cantidad de los componentes de cada formulación del diseño experimental 1.

	S	CoS	A	S %	CoS %	A %
T1	700 µL	100 µL	150 µL	73.68	10.52	15.78
T2	700 µL	100 µL	300 µL	63.63	9.09	27.27
T3	700 µL	300 µL	150 µL	60.86	26.08	13.04
T4	700 µL	300 µL	300 µL	53.84	23.07	23.07
T5	500 µL	100 µL	150 µL	66.66	13.33	20
T6	500 µL	100 µL	300 µL	55.55	11.11	33.33
T7	500 µL	300 µL	150 µL	52.63	31.57	15.78
T8	500 µL	300 µL	300 µL	45.45	27.27	27.27

Donde S: surfactante (Gelucire 59/14 (60%) + Cremophor EL (40%)), CoS: Co-surfactante (Labrafil M 1944 CS), A:aceite (Labrafac Lipophile WL 1349).

Tabla 7. Resultados de tamaño de gota e índice de polidispersidad (PDI) de las formulaciones del diseño experimental 1.

	Tamaño de gota	PDI
T1	68.7 ± 23.74	0.230 ± 0.002
T2	144.2 ± 1.27	0.245 ± 0.007
T3	128.6 ± 15.13	0.219 ± 0.009
T4	176.0 ± 0.70	0.263 ± 0.016
T5	126.5 ± 77.90	0.244 ± 0.022
T6	179.9 ± 14.14	0.306 ± 0.082
T7	133.8 ± 15.34	0.233 ± 0.004
T8	184.0 ± 19.51	0.329 ± 0.074

Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes, con 2 mediciones.

A) **B)** **C)**



Figura 7. Fotos representativas de las emulsiones.

A) T2 de diseño experimental 1, B) T2 del diseño experimental 2, C) T2 + EHG.

La interacción de los compuestos puede estar asociada al equilibrio hidrófilo – lipófilo (HLB), Gelucire 59/14 de 14, Cremophor EL de 12/14, Labrafil M 1944 CS de 9 y Labrafac Lipophile WL 1349 de 1, por lo que el Labrafil al tener un HLB de 9 tiene poca afinidad con el aceite y el extracto hexánico de garambullo. Siendo lo ideal que el surfactante posea mayor HLB y el co-surfactante un menor HLB, el resultado muestra que el surfactante y el co-surfactante poseen un HLB considerado hidrófilo de 14 y 9 respectivamente, lo cual puede afectar la formación de las gotas (Bravo-Alfaro et al., 2022).

Tabla 8. Resultado del análisis multivariado del diseño experimental 1.

	PDI		**Tamaño de gota**	
	Valor p	**Media**	**Valor p**	**Media**
Surfactante	0.1869	0.2588	0.0584	138.3205
Co-surfactante	0.4620	0.2549	0.0017	138.0505
Aceite	0.0119	0.2549	0.0000	138.3175

Los valores-p prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Valores-P menores que 0.05 tienen un efecto estadísticamente significativo sobre tamaño de gota con un 95.0% de nivel de confianza. Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes, con 2 mediciones.

Para la evaluación del diseño experimental 2 se utilizó Gelucire 59/14 (40%) + Cremophor EL (60%) como surfactante, Capryol 90 como co-surfactante y Labrafac

Lipophile WL 1349 como aceite (**Tabla 9**). Se obtuvo un equilibrio HLB, ya que el Capryol 90 tiene un HLB de 5 considerado lipófilo cumpliendo la condición de que el surfactante posee mayor HLB que el co-surfactante. Esto ayuda a obtener una composición anfifílica contribuyendo a la formación espontánea de gotas e incrementando el área interfacial entre aceite-agua (Bravo-Alfaro et al., 2022).

Tabla 9. Resultados de DLS del tamaño de gota y PDI de las formulaciones del diseño experimental 2.

	Tamaño de gota	PDI
T1	19.6 ± 0.15	0.101 ± 0.032
T2	27.6 ± 0.84	0.094 ± 0.010
T3	21.4 ± 0.41	0.057 ± 0.006
T4	35.6 ± 0.75	0.138 ± 0.003
T5	20.8 ± 0.51	0.050 ± 0.010
T6	31.6 ± 0.70	0.080 ± 0.004
T7	25.7 ± 0.58	0.072 ± 0.006
T8	59.1 ± 0.56	0.135 ± 0.007

Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes, con 2 mediciones.

Asimismo, se observó que los tres componentes tienen efecto sobre el tamaño de gota, resultando en un promedio de 30.2 nm. Por otro lado, ninguno de los compuestos mostró efecto sobre el PDI el cual tiene un promedio de 0.0913 (**Tabla 10**). Los resultados obtenidos se asemejan a lo obtenido por Bravo-Alfaro et al., (2022) donde realizaron una formulación con ácido caprílico (fase oleosa), Cremophor EL (surfactante) y Labrafil M1944CS (co-surfactante) reportando en el análisis de DLS 0.07 - 0.14 de PDI y un tamaño entre 26 nm y 32 nm. Además, mencionan que las partículas pequeñas mostraron mejor estabilidad y confirmando que concentraciones altas de surfactante disminuye la región interfacial.

Con base en ello se eligió el diseño experimental 2, debido a que presentó un PDI estable y un mínimo tamaño de gota, además visualmente presentó una apariencia

transparente, lo cual la clasifica como una emulsión de tipo A según Izham et al., (2019) (**Figura 7**).

Tabla 10. Resultado del análisis de la segunda formulación del diseño experimental 2.

	PDI		Tamaño de gota	
	Valor p	**Media**	**Valor p**	**Media**
Surfactante	0.5036	0.0913	0.0026	30.2190
Co-surfactante	0.3452	0.0913	0.0005	30.2190
Aceite	0.0589	0.0913	0.0000	30.2190

Los valores-p prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Valores-P menores que 0.05 tienen un efecto estadísticamente significativo sobre tamaño de gota con un 95.0% de nivel de confianza. Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes, con 2 mediciones.

Antes de incorporar el extracto hexánico, se realizó un diseño de superficie de respuesta para minimizar el tamaño de gota, el cual constó de 15 tratamientos (**Tabla 11**), de las cuales se evaluó el tamaño de gota y PDI mediante DLS. Se obtuvieron los modelos de superficie de respuesta representados con un gradiente de color, donde a menor intensidad (azul) menor tamaño de gota o PDI y mayor intensidad (rojo) mayor tamaño de gota o PDI (**Figura 8**). En general se observó que cantidades bajas de surfactante y altas de co-surfactante o aceite resultan en un tamaño de gota mayor o PDI elevado, en cambio cuando el surfactante se encuentra presente en mayor cantidad y menor de co-surfactante o aceite el tamaño de gota es pequeño y el PDI bajo, lo cual quiere decir que son emulsiones estables (Bravo-Alfaro et al., 2022; Villarreal et al., 2022).

Tabla 11. Formulaciones correspondientes al diseño de superficie de respuesta.

	S %	**CoS %**	**A %**	**Tamaño de gota**	**PDI**
T1	50	20	30	36.985 ± 0.67	0.0935 ± 0.003
T2	50	20	30	60.43 ± 0.74	0.1385 ± 0.021
T3	50	20	30	32.725 ± 0.27	0.072 ± 0.004
T4	46.15	30.76	23.07	44.37 ± 0.43	0.218 ± 0.007
T5	42.85	14.28	42.85	54.04 ± 1.82	0.1925 ± 0.003

T6	66.66	13.33	20	23.19 ± 0.42	0.067 ± 0.007
T7	40	24	36	60.82 ± 1.04	0.1565 ± 0.010
T8	33.33	33.33	33.33	71.37 ± 1.41	0.203 ± 0.010
T9	63.63	9.09	27.27	27.785 ± 0.72	0.114 ± 0.016
T10	47.61	9.52	42.85	72.305 ± 2.12	0.221 ± 0.007
T11	31.57	21.05	47.36	83.65 ± 1.23	0.145 ± 0.001
T12	51.85	14.81	33.33	31.72 ± 0.83	0.0895 ± 0.0007
T13	53.84	23.07	23.07	41.72 ± 0.77	0.205 ± 0.002
T14	52.63	31.57	15.78	25.37 ± 0.65	0.0755 ± 0.0007
T15	66.66	19.04	14.28	18.165 ± 0.30	0.0505 ± 0.006

Cantidad de los componentes de cada formulación donde S: surfactante (Gelucire 59/14 (*40*%) + Cremophor EL (*60*%)), CoS: Co-surfactante (*Capryol 90*), A:aceite (Labrafac Lipophile WL 1349).

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Kanwal et al., (2021) donde evaluaron aceite de canela (aceite), Tween 80 (surfactante) y PEG 200 (co-surfactante), observando que un aumento de la concentración de surfactante y disminución del co-surfactante genera un tamaño de gota pequeño; mientras que la concentración de aceite influye directamente en el tamaño, ya que a mayor concentración mayor tamaño y menor concentración disminuye el tamaño de gota.

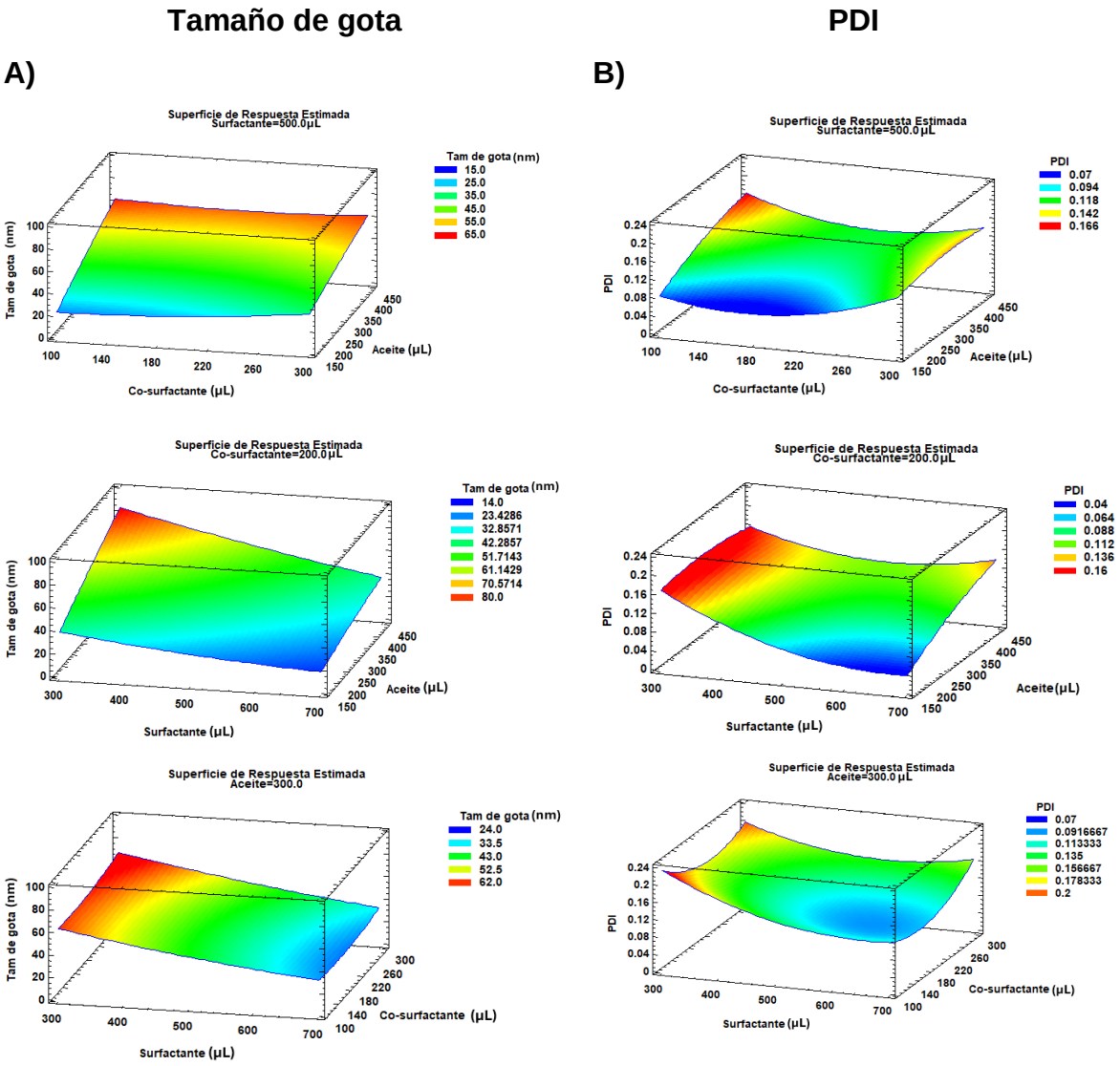


Figura 8. Gráficas de superficie de respuesta del A) tamaño de gota y B) PDI.

En el diagrama ternario se representaron las emulsiones del diseño de superficie de respuesta (15) más las emulsiones del diseño experimental (8) siendo un total de 23 (**Figura 9**), esto con finalidad de observar la región de emulsificación espontánea con base en la proporción de surfactante (Gelucire 59/14 (40%) + Cremophor EL (60%)), co-surfactante (Capryol 90) y aceite (Labrafac Lipophile WL 1349) (Morakul et al., 2024). Con base a ello se eligieron tres formulaciones para la incorporación del EHG (**Tabla 12**), T14: aceite 20%, surfactante 66.66, co-surfactante 13.33; T6: aceite 33.33%, surfactante 55.55 %, co-surfactante 11.11% y T2: aceite 27.27%,

surfactante 63.63% y co-surfactante 9.09%. Dichas concentraciones mostraron tener la capacidad de formar una nanoemulsión en medios acuosos debido a la miscibilidad de cada compuesto (Villarreal et al., 2022).

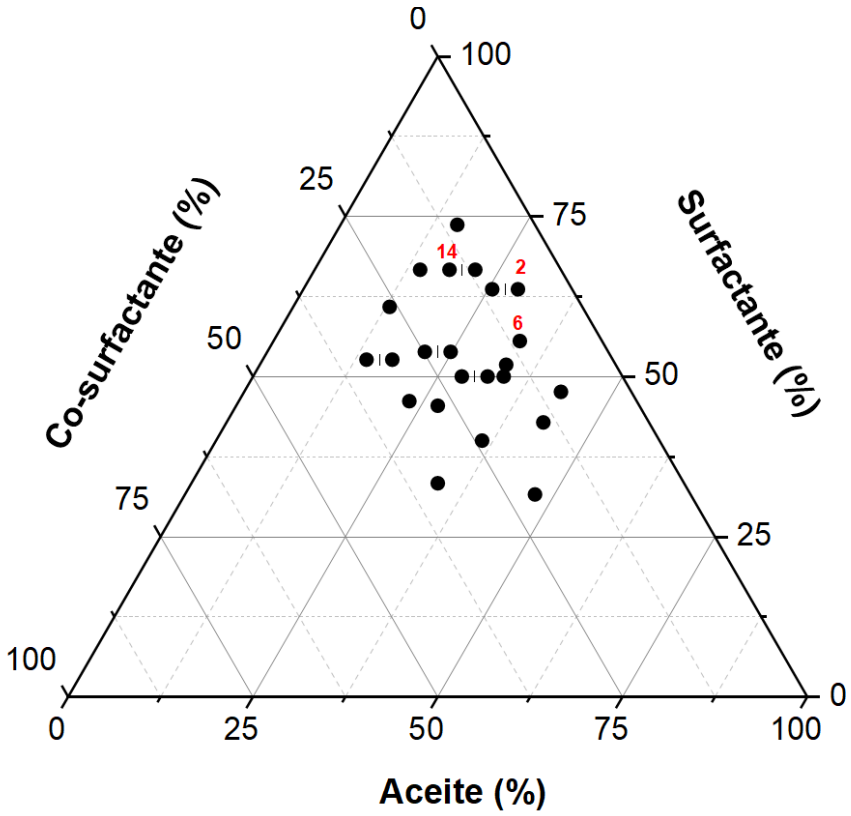


Figura 9. Diagrama ternario.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Villarreal et al., (2022) donde evaluaron Tween 80, Gelucire 48/16, Kolliphor EL, Labrafil M2125CS y Lauroglicol 90 como surfactante, Polietilenglicol y Transcutol HP como co-surfactantes, y aceites como Labrafac lipófilo WL1349, Maisine CC, Propilenglicol y Lauroglicol FCC. Obteniendo el diagrama ternario con las concentraciones óptimas para la formación de una emulsión, las cuales se encontraron entre 50% a 90% de surfactante, co-surfactante y aceite entre 5% a 45%. Los autores mencionan que concentraciones altas de tensoactivos se asocian a una mejor solubilización de la

emulsión, además, la cantidad adecuada del co-surfactante le brinda fluidez a la interfase y favorece la formación de estructuras coloidales.

Tabla 12. Evaluación del tamaño de gota y PDI de los tratamientos con extracto incorporado.

F	S %	Co-S %	A %	Libres de extracto		Extracto incorporado	
				Tamaño de gota	PDI	Tamaño de gota	PDI
2	63.64	9.09	27.27	27.66 ± 0.84	0.094 ± 0.010	32.63 ± 3.93	0.111 ± 0.014
6	55.55	11.11	33.34	31.65 ± 0.700	0.080 ± 0.004	39.06 ± 6.95	0.160 ± 0.028
14	66.66	13.33	20.01	23.19 ± 0.424	0.067 ± 0.007	30.21 ± 2.10	0.124 ± 0.006

Cantidad de los componentes de cada formulación (F) donde S: surfactante (Gelucire 59/14 (*40*%) + Cremophor EL (*60*%)), CoS: Co-surfactante (*Capryol 90*), A: aceite (Labrafac Lipophile WL 1349). Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes, con 2 mediciones.

6.1.2 Caracterización mediante FTIR de SNEDDS y microcápsulas de alginato

En el espectro de FTIR (**Figura 10, Tabla 13**) se observaron las bandas características del surfactante Cremophor EL en 2925 y 2857 cm^{-1} correspondiente a C-H, 1731 cm^{-1} de C=O, 1098 cm^{-1} de C-O y Gelucire 59/14 en 2924 cm^{-1} y 2886 cm^{-1} asociado a estiramientos C-H, 1738 cm^{-1} de C=C y 1103 cm^{-1} de un estiramiento C-O (Bravo-Alfaro et al., 2022; Morakul et al., 2024). Así mismo, en el co-surfactante Capryol 90 y el aceite Labrafac Lipophile WL 1349 presentaron bandas en 2950-2956 cm^{-1} y 2925 cm^{-1} asociados a C-H, 1378 cm^{-1} y 1169 cm^{-1} de C-O-C, 952 y 960 cm^{-1} de =C-H. Dichos grupos funcionales se pueden asociar con la estructura de los aceites de cadena media (Kanwal et al., 2021; Mahmoud et al., 2023). Una vez que se analizó la muestra EHG+Labrafac, se observó que se conservaron grupos funcionales asociados al extracto hexánico de garambullo como C-H en 2920 cm^{-1}, C=O en 1711 y C-H aromático en 721 así como grupos asociados al Labrafac Lipophile WL 1349. En el caso de T2 se conservaron bandas en 2925 y 2856 asociados a C-H, 1740 C=C, 1462 de $C\text{-}H_2$ principalmente de los

componentes de la nanoemulsión y 958 cm^{-1} de O-H y 840 -721 cm^{-1} característicos de C-H de anillos aromáticos presentes en el extracto hexánico de garambullo debido a la presencia de tocoferoles y esteroles (Bravo-Alfaro et al., 2022; Sánchez-Recillas et al., 2022).

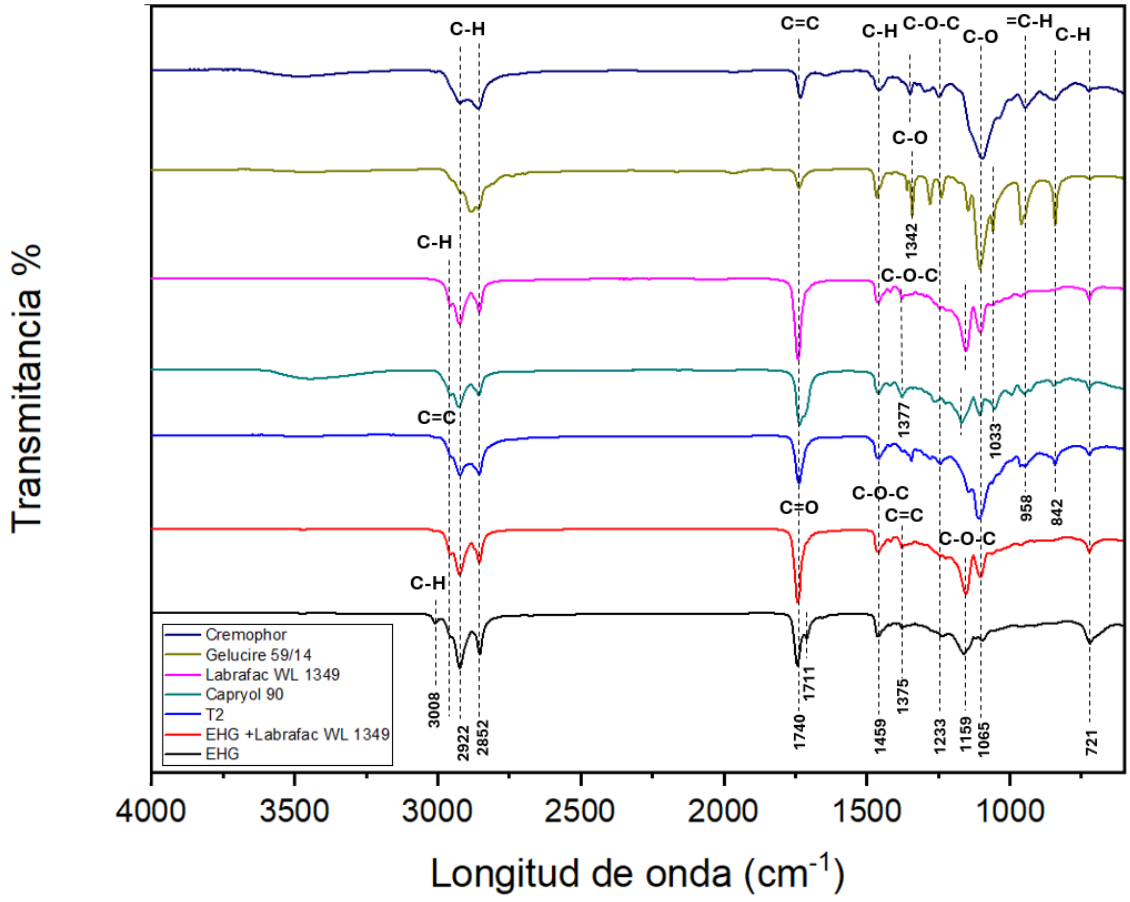


Figura 10. Espectro de FTIR de los componentes de SNEDD, el extracto hexánico de garambullo (EMG) y T2.

La aproximación de los compuestos encontrados en el extracto hexánico se propone con base en lo reportado por Dienaitė et al., (2021) quienes evaluaron el extracto lipofílico de *Viburnum opulus* encontrando la presencia de β-sitosterol, campesterol, estigmasterol, el ergosterol y colestanol. Así mismo, Sánchez-Recillas et al., (2022) cuantificó por UPLC-MS el extracto hexánico de garambullo reportando tocoferoles

(α-tocoferol, β-tocoferol, β-sioesterol, colestanol, brasicasterol y escotenol) y esteroles (peniocenol, macdougalina y chichipegenina).

Tabla 13. Números de onda asociado a los grupos funcionales del EHG y componentes del SNEDD.

Grupos funcionales	Cremophor EL		Gelucire 59/14	Labrafac Lipophile WL 1349	Capryol 90	T2	EHG+ Labrafac	EHG
C-H	2925	2857	2924 2886 2735 2696	2956 2925	2950 2925 2857	2925 2856	2922 2854	2920 2854
C=O	1731		-	-	-	-	1740 1711	1740 1711 1065
C=C			1738	1740	1740	1740		
C-H2	1461		1466 1360	1463	1460	1462	1459	1459
C=C								1378
C-O-C	1350	1293	1146	1377 1154	1378 1169	1150	1161	1240 1161
C-O	1249 1033	1098	1238 1103	1103	1108 1055	1246 1107	1093	915
O-H	-		-	-	-	958	-	958
=C-H	946		958	960	952			
C-H aromático	-		-	-	-	840 721	723	840 721

En el caso de las microcápsulas se observaron bandas características del alginato (**Figura 11**, **Tabla 14**) en 3300 cm^{-1} asociado a OH, 2920 cm^{-1} a C-H de la cadena, 1594 cm^{-1} y 1416 cm^{-1} de COO-. Especialmente la banda 1594 cm^{-1} en Alg 2% + EMG se puede asociar a la reticulación de los bloques de ácido manurónico y glucónico con iones Ca^{2+} (Pablo et al., 2025b; Wongverawattanakul et al., 2022), en 1082 cm^{-1} de C-O-C posiblemente por la interacción de los compuestos bioactivos

y el alginato por la formación de enlaces H reportado por Plazinski & Plazinska, (2011) quienes mencionan que el alginato puede formar enlaces entre los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos, lo cual ayuda a mejorar la estabilidad.

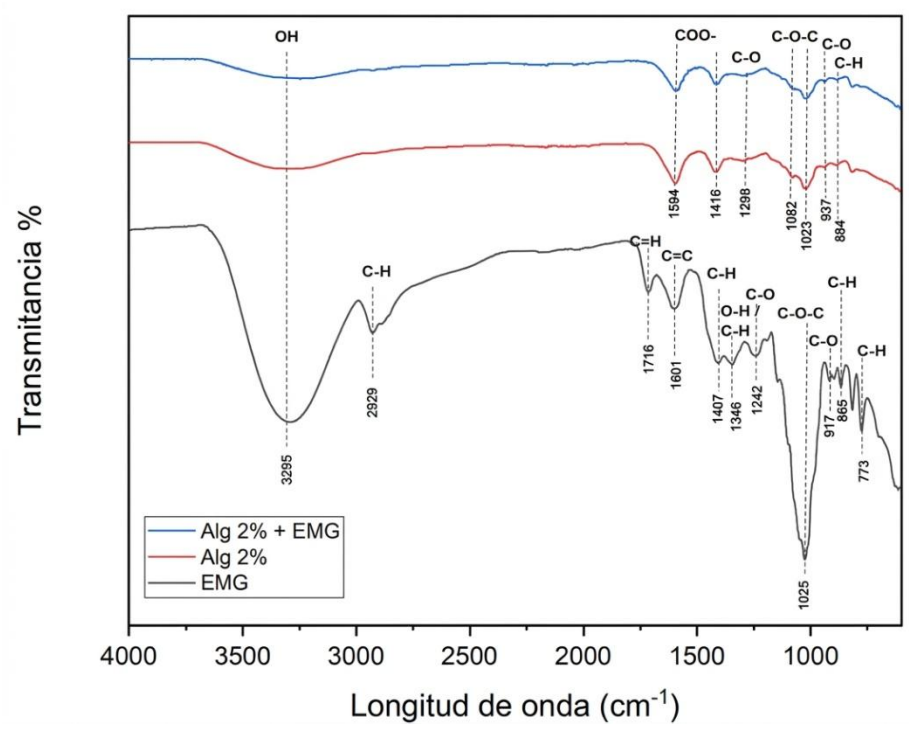


Figura 11. Espectro de FTIR de los componentes de las microcápsulas de alginato 2% y el extracto metanólico de garambullo.

En el EMG en 3295 cm^{-1} OH que puede estar asociado a la presencia de azúcares, 2929 cm^{-1} relacionado a estructuras secundarias, 1716 cm^{-1} de C=O de anillos,1346 cm^{-1} y 1242 asociado a C-O, 1601 cm^{-1} C=O correspondientes a anillos aromáticos (Krysa et al., 2022). Dichos anillos y estructuras, podrían estar asociados a compuestos fenólicos como flavonoides entre ellos los flavonoles, flavonones, isoflavonas y antocianinas, ácidos fenólicos como ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, y betalaínas (Fraga et al., 2019). Sin embargo, la línea correspondiente al EMG se asemeja a un espectro de miel según lo reportado por Şalva et al., (2023) donde la miel presentó una banda en 3300 cm^{-1} asociado a azúcares unidos a moléculas de agua, además de bandas asociadas a glucosa y

fructosa en 2910 cm^{-1} de C-H, 1650 cm^{-1} en C=O y 1054 cm^{-1} de C-O FTIR de miel de abeja (**Tabla 14**).

Con base en los hallazgos, se especuló que el EMG contenía mayor cantidad de azúcares, ya que algunos polifenoles por su naturaleza tienden a estar unidos a azúcares (Serra et al., 2012). Esto se corroboró con la medición de los grados brix con ayuda de un refractómetro, el cual mide el índice de refracción considerando la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio analizado. La medición se vio influenciada por la longitud de onda y la temperatura de la muestra, además de la presencia de polifenoles (Jaywant et al., 2022). El EMG presentó 96 °Bx, que significa que hay 96% de azúcares en 100 g de solución (1◦Brix = 1% de azúcar), lo cual puede estar asociado a dos factores. El primero es el estado de maduración del fruto donde existe un proceso de hidrólisis del almidón y degradación de la pectina, el segundo asociado a una gran pérdida de agua debido al proceso de liofilización (López-Palestina et al., 2018)

Tabla 14. Números de onda asociado a los grupos funcionales del EMG y el alginato.

Grupos funcionales	**Alg 2% EMG**	**Alg 2%**	**EMG**
O-H	3300	3300	3295
C-H	-	-	2929
COO	1594 1416	1598	-
C-O/O-H	1298		
C=O grupos carbonilo	-	-	1716
C-H			1407
C=C aromático	-	-	1601
O-H/C-H			1346
C-O fenólico	-	1171	1242
C-O/ C-O-C			1150
C-O-C	1082 1023	1087 1023	1025
C-O	937	941	917

C1-H	885	-	865
Residuos de ácido manurónico	816	816	
C-H			773 700

6.1.3 Análisis de TGA y DSC de las microcápsulas de alginato

La caracterización mediante TGA ayudó a identificar las etapas de pérdida de masa y el análisis de DSC a determinar los cambios asociados a eventos endotérmicos como la pérdida de agua o exotérmicos, asociados a la degradación y transformación de los componentes. Esto con la finalidad de evaluar la estabilidad térmica de las microcápsulas de alginato con y sin extracto metanólico de garambullo (EMG).

En la **Figura 12** se observó que el primer evento ocurrió en 104°C y 101°C asociado a una pérdida de masa de 14.5 % (Alg 2%) y 9.3 % (Alg 2% + EMG), correspondiente a un evento endotérmico asociado a la pérdida de agua absorbida o retenida en la matriz de alginato. Además, se observó que las perlas con EMG presentan un menor porcentaje de pérdida de masa, lo cual se puede asociar a la modificación de las interacciones entre el agua o componentes del extracto. Este evento ha sido reportado y asociado principalmente a procesos de deshidratación (Kučuk et al., 2024; Wongverawattanakul et al., 2022). Por tanto, la presencia del EHG en las microcápsulas de alginato puede modificar la capacidad de retención del agua.

El segundo evento se presentó en 181.67°C y 287.59°C con pérdida de masa del 20 % (Alg 2%) y 21.1 % (Alg 2% + EMG) y fue de carácter endotérmico asociado a la degradación de la red de alginato debido a la oxidación del ácido glucurónico y manurónico resultando en la ruptura de la red de alginato (Karali et al., 2025). No obstante, los resultados parecen indicar que la incorporación del EHG a la matriz de alginato puede modificar la respuesta del alginato frente al calentamiento.

El tercer evento fue exotérmico observándose en 273.3 °C y 269 °C con pérdida de masa del 16 % y 17.38 %, este evento es una etapa de avanzada de degradación térmica de los compuestos orgánicos de la matriz de alginato donde ocurre una transformación de los residuos. Finalmente se presentó un último evento exotérmico en las cápsulas Alg 2% en 441.09°C el cual se puede asociar a la oxidación de los residuos de carbono generados en las etapas anteriores de degradación (Wongverawattanakul et al., 2022). En conjunto los resultados confirman la formación de la red de alginato en ambas microcápsulas, además se observó que la incorporación del EHG posiblemente interactuó con la matriz de alginato llegando a modificar sus propiedades térmicas.

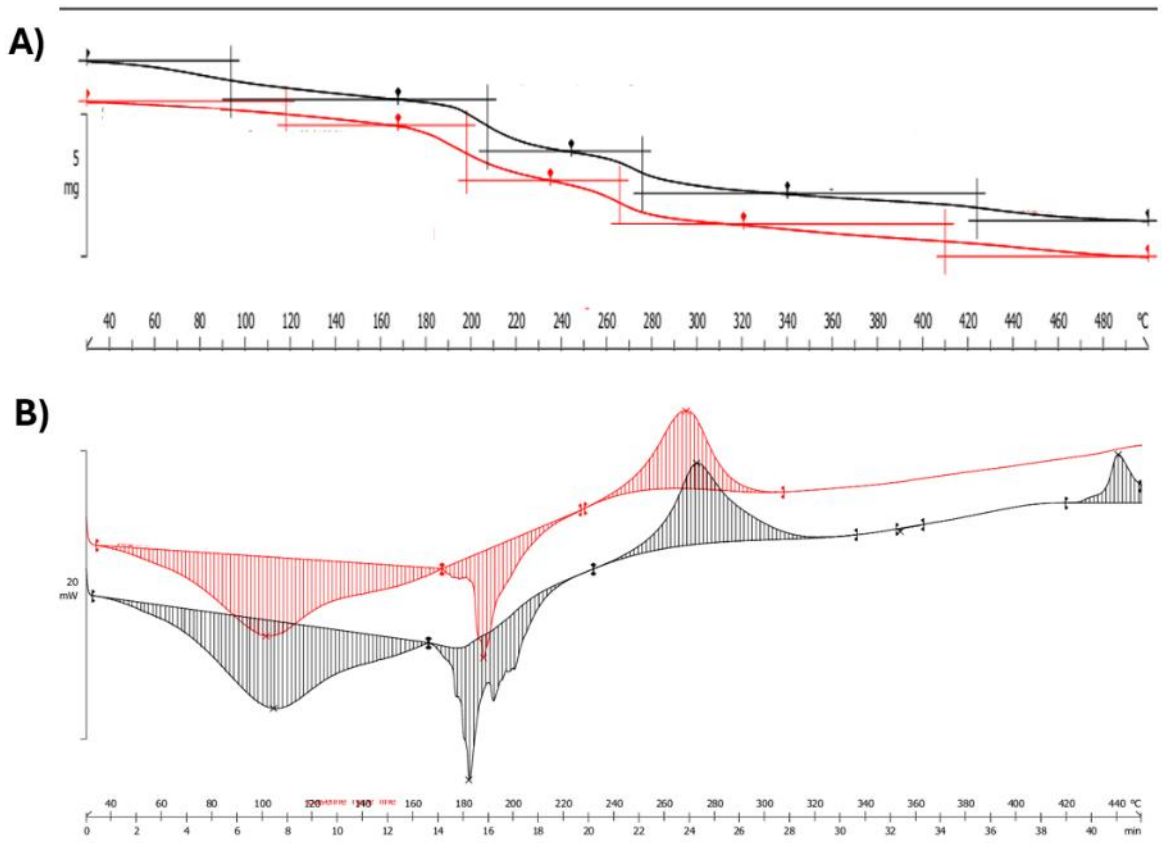


Figura 12. Análisis de A) TGA y B) DSC de las microcápsulas huecas.

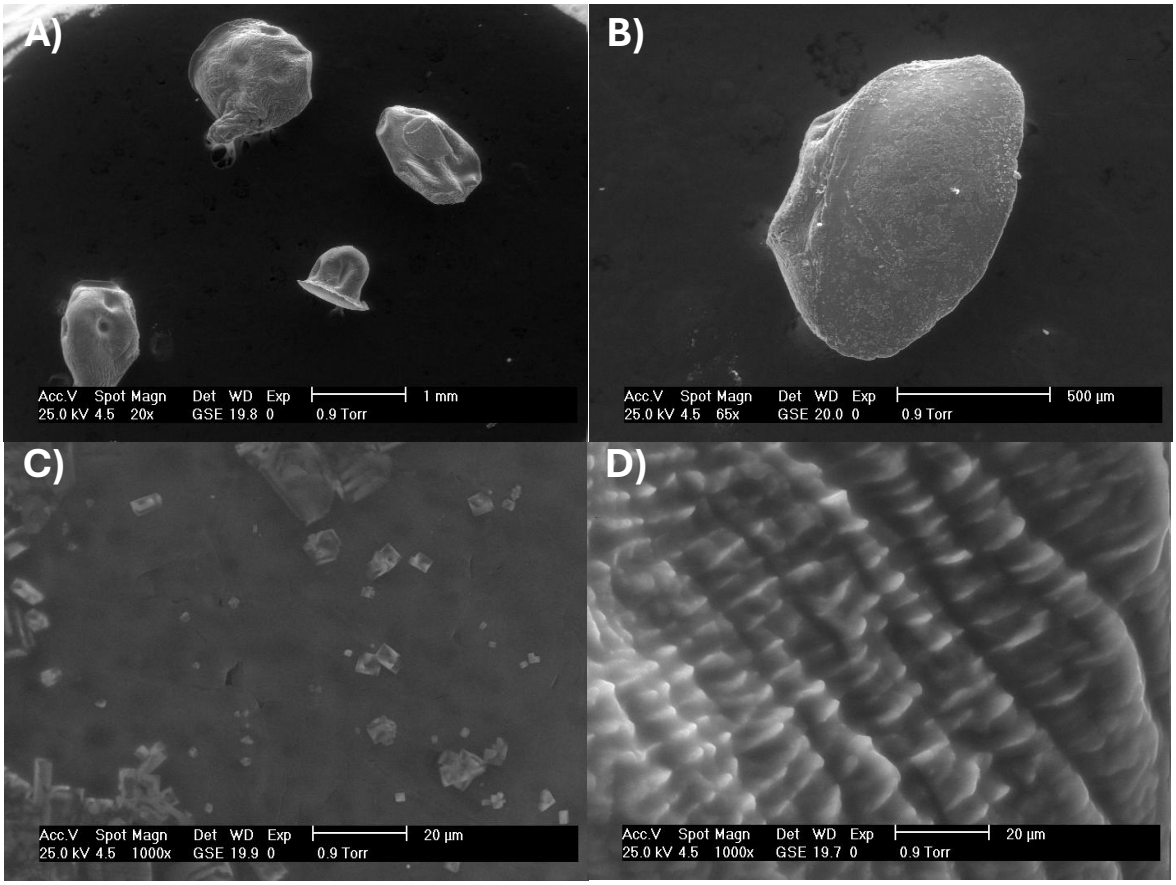
6.1.4 Análisis de morfología de las microcápsulas de alginato

La **Figura 13 A-D** mostró la morfología de las microcápsulas la cual fue irregular a 20x en el control de Alg 2%, la superficie presentó algunas imperfecciones en 65 x las cuales se observaron a 1000 x donde se observó la presencia de cristales remanentes probablemente de $CaCl_2$ (Wongverawattanakul et al., 2022). En algunas se observó una superficie rugosa lo cual puede ser a causa de deshidratación asociado al método de secado de las microcápsulas, según lo reportado por Santos-Moriano et al., (2015) quienes observaron que las microcápsulas presentaron líneas paralelas dando una imagen visual rugosa, así como la presencia de cristales NaCl y de $CaCl_2$.

Las microcápsulas con extracto incorporado también presentaron morfología irregular a 20x, mientras que a 65x las irregularidades son visibles y a 1000x se apreciaron cristales y pliegues al igual que las microcápsulas control (**Figura 13 E-H**). Estas irregularidades se pueden explicar por el proceso de secado, inicialmente con el proceso de gelificación iónica el grupo carboxilo interactúa con Ca^{2+} y forma la esperada red tridimensional, por ello, durante el secado el agua presente en esa red se elimina. Dicha eliminación causa una contracción y pérdida de volumen. Sin embargo, si la contracción no ocurre de forma homogénea, la superficie tiende a colapsar y formar pliegues, rugosidades, ondulaciones y depresiones. (Kučuk et al., 2024). Además, la presencia de estas irregularidades tiende a aumentar el área superficial favoreciendo el área de contacto con el medio y ayudando a su liberación en pH neutro o ligeramente alcalino (Martinović et al., 2023).

Estos resultados presentaron similitud con lo obtenido por, Tsirigotis-Maniecka, (2020) quienes desarrollaron microcápsulas de alginato a diferentes concentraciones con extracto de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*) incorporado, observando en la evaluación de microscopía electrónica de barrido (SEM) una forma esférica, irregular y con pliegues. Ellos atribuyen estas irregularidades a la forma de secado y la presencia del extracto.

Dicho esto, en el presente estudio la presencia de irregularidades en la superficie de las microcápsulas de alginato con y sin extracto metanólico de garambullo se puede asociar a la forma de secado, así mismo el EGH también puede contribuir a estas deformaciones por la interacción con el alginato. Además, la presencia de estas irregularidades puede influir en la liberación del contenido según lo reportado por (Martinović, et al., 2023) quienes evaluaron cómo diferentes métodos de secado (vacío, liofilización y temperatura ambiente) pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas de alginato cargadas con extracto de orujo de uva. Los autores reportaron que el secado por liofilización presentó mayor liberación de compuestos fenólicos durante la fase intestinal de una digestión *in vitro*, en segundo lugar, el secado a vacío y finalmente las que fueron secadas a temperatura ambiente. Ellos mencionaron que una estructura porosa puede favorecer la interacción con el medio acuoso y ayudar la liberación de los compuestos.



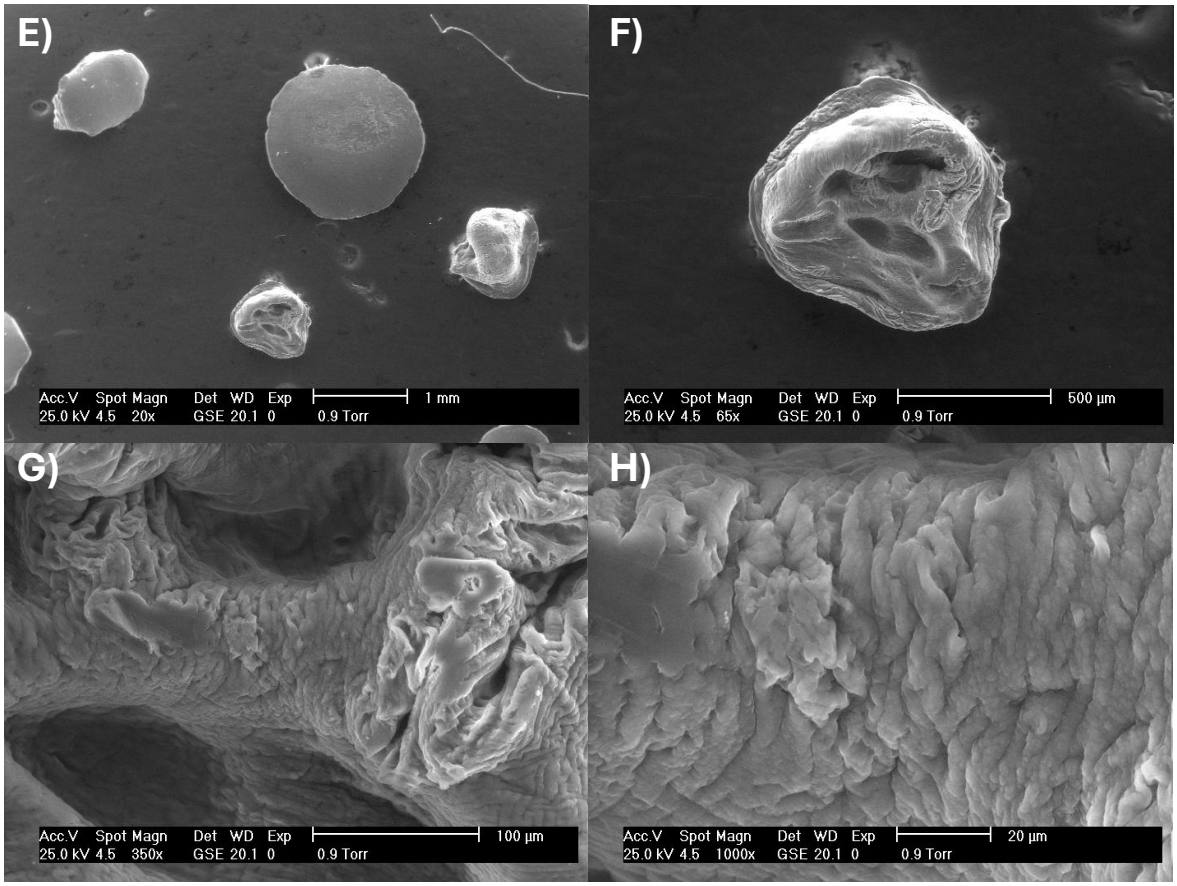


Figura 13. Micrografías SEM de microcápsulas de Alg 2% con y sin extracto metanólico de garambullo (EMG).

A) Vista general a 20×, B) morfología individual a 65×, C) y D) superficie externa a 1000×; Alg 2% + EMG, E) Vista general a 20×, F) morfología individual a 65×, G) y H) superficie externa a 1000×.

6.2 Digestión *in vitro* (INFOGEST) de SNEDDS y microcápsulas

6.2.1 Digestión de SNEDDS

Una vez incorporado el extracto en las tres formulaciones mencionadas anteriormente, la que demostró tener mayor estabilidad fue la F2 (**Tabla 12**), con un PDI de 0.111 ± 0.014 y un tamaño de gota de 32.635 ± 3.93. Cabe mencionar que esta formulación contiene un 8 % del EHG siendo la formulación que presentó mejores características del modelo planteado (Bravo-Alfaro et al., 2022).

La F2 fue sometida a una digestión *in vitro* mediante el método de INFOGEST (Brodkorb et al., 2019), observando que el tamaño de gota se modificó a lo largo del proceso de digestión (**Figura 14**). En fase oral mostró un tamaño promedio de 41.18 nm y en fase gástrica de 41.74 nm considerándose estable, esto debido a la presencia de surfactantes no iónicos como el Cremophor EL y Gelucire 14/59 los cuales le brindan protección al EHG contra las enzimas orales y gástricas (Villarreal et al., 2022). Posteriormente, en fase intestinal aumentó de 49.62 nm en 30 min a 89.89 nm en 210 min lo cual representó el tamaño máximo de gota y finalmente a los 240 min disminuyó a 69.22 nm. Este comportamiento puede estar asociado a la interacción de las sales biliares con la interfaz de la emulsión, las cuales desplazan al surfactante y desencadenan el proceso de lipólisis catalizado por lipasas, enzimas encargadas de hidrolizar los fosfolípidos en ácidos grasos libres (Sampieri-Morán et al., 2025).

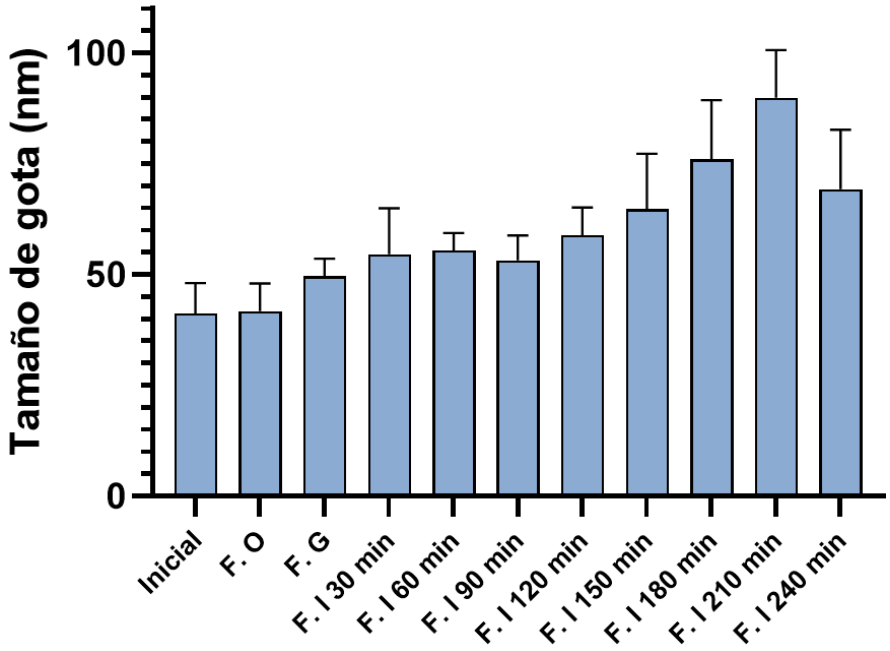


Figura 14. Comportamiento del tamaño de gota durante la digestión *in vitro*.

ANOVA de una vía: F= 8.041, p = 0.0442. Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. El tiempo tuvo efecto significativo

sobre el tamaño de gota, sin diferencias significativas entre réplicas (p = 0.2329). F.O: fase oral, F.G: fase gástrica, F.I: fase intestinal.

El PDI (**Figura 15**), presentó variaciones en los valores a lo largo de la digestión *in vitro* pero sin ser mayor a 0.3, lo cual confirma la formación de micelas mixtas e indica que las vesículas lipídicas muestran homogeneidad según lo reportado por Badran, (2014) quién menciona que una nanoemulsión se considera estable cuando el PDI se encuentra por debajo de 0.4 y un tamaño de gota menor a 200 nm.

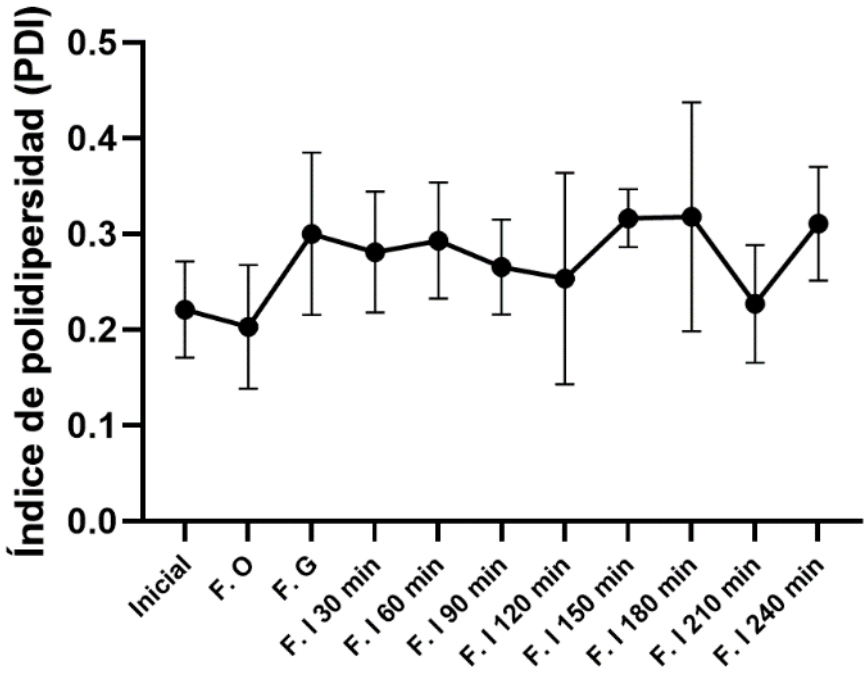


Figura 15. Comportamiento del PDI durante la digestión *in vitro*.

ANOVA de una vía: F= 1.261, p = 0.3788. Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. No se observaron diferencias significativas en el PDI entre los tiempos evaluados. F.O: fase oral, F.G: fase gástrica, F.I: fase intestinal.

6.2.2 Evaluación de la digestión de las perlas de alginato

En la **Figura 16** se observa que el extracto libre presentó mayor liberación de polifenoles en la fase oral, en fase gástrica disminuyó y en fase intestinal se mantuvo constante. En el extracto encapsulado la liberación se vio ligeramente disminuida

en comparación con el extracto libre, los cual puede atribuirse a una mayor presencia de azúcares en el EMG o una pérdida de polifenoles durante el proceso de encapsulación (López-Palestina et al., 2018).

No obstante, el alginato cumplió su función de liberación controlada ya que en medio ácido asociado a la fase gástrica el contenido se mantuvo en la cápsula debido la protonación del grupo carboxilo y la interacción entre los enlaces hidrógeno del alginato-calcio que le brindan estabilidad a la matriz disminuyendo la liberación de los compuestos en el medio (Tsirigotis-Maniecka, 2020). En fase intestinal el contenido comenzó a presentar una liberación constante, debido a la repulsión entre las moléculas altamente cargadas que también está asociado a la expansión de la cadena polimérica por hinchamiento (Moreira Mar et al., 2021). El fenómeno de liberación constante en intestino fue reportado por Moreira Mar et al., (2021) quienes encapsularon extracto de *Clidemia rubra* en matrices de alginato, observando que el pH básico favoreció la liberación del contenido de las microcápsulas.

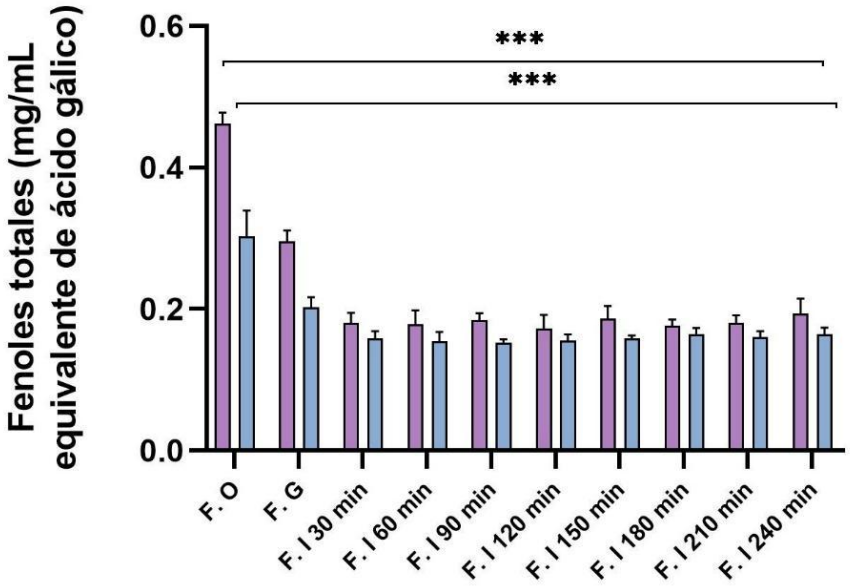


Figura 16. Liberación de compuestos fenólicos (mg/mL equivalente de ácido gálico) del EMG libre y encapsulado en alginato 2 % durante la digestión *in vitro.*

ANOVA de dos vías: tiempo ($p < 0.0001$), tratamiento ($p = 0.0002$), interacción ($p < 0.0001$). Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ***$p < 0.0001$. F.O: fase oral, F.G: fase gástrica, F.I: fase intestinal.

Sin embargo, la liberación de polifenoles resultó lo contrario a lo reportado por Ruíz-Aguilar et al., (2024), quienes encapsularon un extracto polifenólico de garambullo en goma arábiga (GA) y aislado de proteína de soya (SPI). Tras una digestión simulada cuantificaron la presencia de polifenoles en cada fase, encontrando que el extracto libre en fase oral tiene un alto contenido, sin embargo, en fase gástrica e intestinal sufrió una disminución de compuestos fenólicos del 68.2 %. Por el contrario, los polifenoles encapsulados en ambas matrices comenzaron una liberación desde la fase gástrica 29.07 % (GA) y 32.49 % (SPI) presentado mayor concentración en fase intestinal 64.94 % (GA) y 59.15 % (SPI) indicando que ambas encapsulaciones aumentaron la bioaccesibilidad.

En la **Figura 17** se observó que la presencia de polifenoles durante la fermentación *in vitro* fue ligeramente menor en las microcápsulas en comparación con el extracto libre a 6 h y 12 h. Sin embargo, a 12 h se observó mayor liberación de las microcápsulas en comparación con el extracto libre, fenómeno que puede estar asociado al punto máximo de expansión de la cadena y la desprotonación del grupo carboxilo del alginato rompiendo los enlaces de hidrógeno que causa el debilitamiento de la matriz ayudando a la liberación de los compuestos (Agüero et al., 2017; Tsirigotis-Maniecka, 2020; Wongverawattanakul et al., 2022).

Si bien se llevó a cabo la liberación de compuestos fenólicos de las microcápsulas de alginato, la cantidad fue menor en comparación con el extracto libre, por lo que se especula pudo existir una pérdida de polifenoles durante el proceso de encapsulación (López-Palestina et al., 2018). Caso que ha sido reportado por (Pablo et al., 2025a) quienes evaluaron la incorporación de polifenoles derivados de grosella de la india mediante gelificación iónica por dos métodos, uno con $CaCl_2$ en solución de agua y otro con $ClCa_2$ en extracto de compuestos fenólicos. Los autores encontraron que el segundo método presentó mejores resultados y mayor

incorporación de compuestos en comparación del primero. Por lo que se podría explicar la baja presencia de polifenoles en la presente formulación.

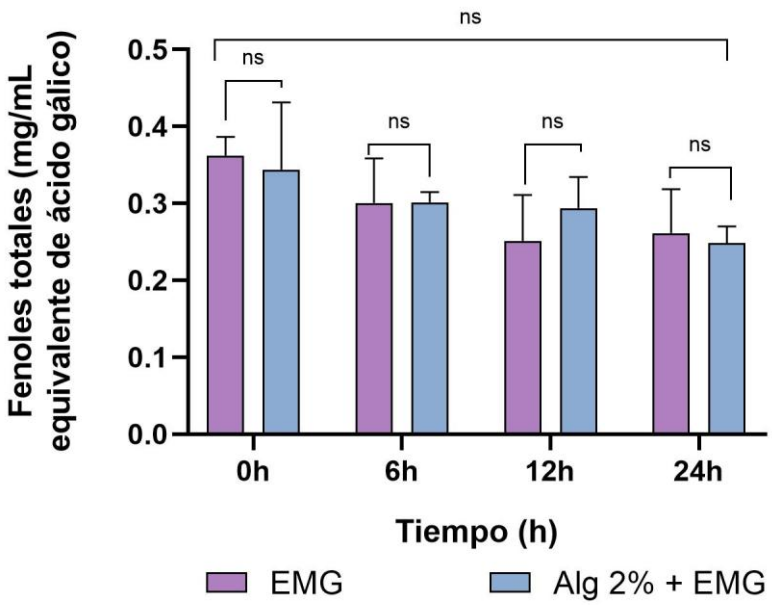


Figura 17. Liberación de compuestos fenólicos (mg/mL equivalente de ácido gálico) del EMG libre y encapsulado en alginato 2 % durante la fermentación a 0 h, 6 h, 12 h y 24 h.

ANOVA de dos vías: tiempo ($p = 0.0555$), tratamiento ($p = 0.8286$), interacción ($p = 0.8214$). Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes. ns = no significativo ($p > 0.05$).

6.2.3 Evaluación de la fermentación

En el proceso de fermentación (**Figura 18**) se observó que el control positivo (inulina) disminuyó el pH a lo largo tiempo, mismo que es un indicador del metabolismo de polisacáridos y oligosacáridos. La disminución de pH se ha asociado a la producción de ácido acético por la fermentación de polisacáridos no digeribles por parte de los Bacteroidetes. En el caso de los extractos EHG y EMG la disminución de pH se observó desde las 6 h (7.35 y 7.31) y 12 h (7.13 y 7.14) respectivamente debido a la producción de ácido acético por el metabolismo bacteriano. Sin embargo, a 24 h el pH aumentó (7.22 y 7.36), siendo el EMG el que

presentó mayor pH lo cual podría estar asociado a la disminución de los compuestos metabolizables y la producción de ácido butírico (Sánchez-Recillas et al., 2024). En el caso de los encapsulados en SNEDDS y Alg 2% + EMG, se observó que desde las 6 h estas últimas liberaron sus compuestos, lo cual puede estar asociado al pH básico y la desprotonación del alginato (Agüero et al., 2017; Tsirigotis-Maniecka, 2020). La degradación y metabolismo del alginato también puede asociarse a la presencia de Gammaproteobacteria, Bacteroidetes y Alphaproteobacteria, las cuales presentan una enzima conocida como alginato liasa con actividad endolítica que se pueden clasificar como liasa específica M, liasa G y liasa MG bifuncional (Sun et al., 2022)

Por otra parte, el SNEDD presentó menor variación de pH debido a la estructura química de los compuestos del extracto y el vehículo, ya que al ser compuestos lipofílicos tienden a formar micelas y tener carga neutra lo cual también puede contribuir a que el medio sea estable (Sampieri-Morán et al., 2025). Aunado a ello la hidrólisis de los componentes de SNEDDS y el compuesto lipofílico generan ácidos grasos libres por lo que el medio puede volverse ligeramente ácido (Sirvi et al., 2023). No obstante, en el presente trabajo el pH del EHG y SNEDDS+EHG se mantuvo neutro en rangos de entre 7 y 7.5.

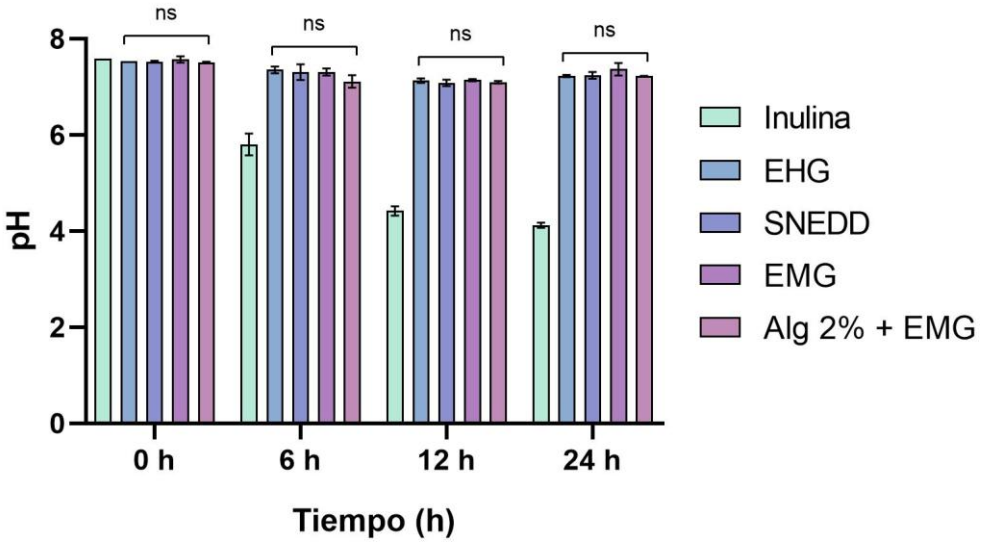


Figura 18. Evaluación del pH en el proceso de fermentación a lo largo de 0 h, 6 h, 12 h y 24.

Efecto significativo del tiempo ($p = 0.0046$); sin diferencias entre tratamientos ($p = 0.0967$) ni interacción tiempo × tratamiento ($p = 0.2990$). Los datos representan la media ± ES de n = 3 experimentos independientes. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

6.3 Viabilidad celular

6.3.1 Curva dosis respuesta

6.3.1.1 Extracto libre EHG

En la **Figura 19** se muestra el efecto dosis-respuesta del EHG libre evaluado a 24 h. La concentración de 0.1% disminuyó la viabilidad celular a 30% y la concentración de 0.001% aumentó la viabilidad a 102 %. Cilla et al., (2015) evaluaron el efecto de β-sitosterol, campesterol, estigmasterol y β-criptoxantina por separado sobre la línea celular de cáncer de colon Caco-2, y observaron que los compuestos disminuyen la viabilidad celular. Los resultados sugieren que la disminución de viabilidad celular se debe a la sinergia de los componentes bioactivos de la muestra evaluada.

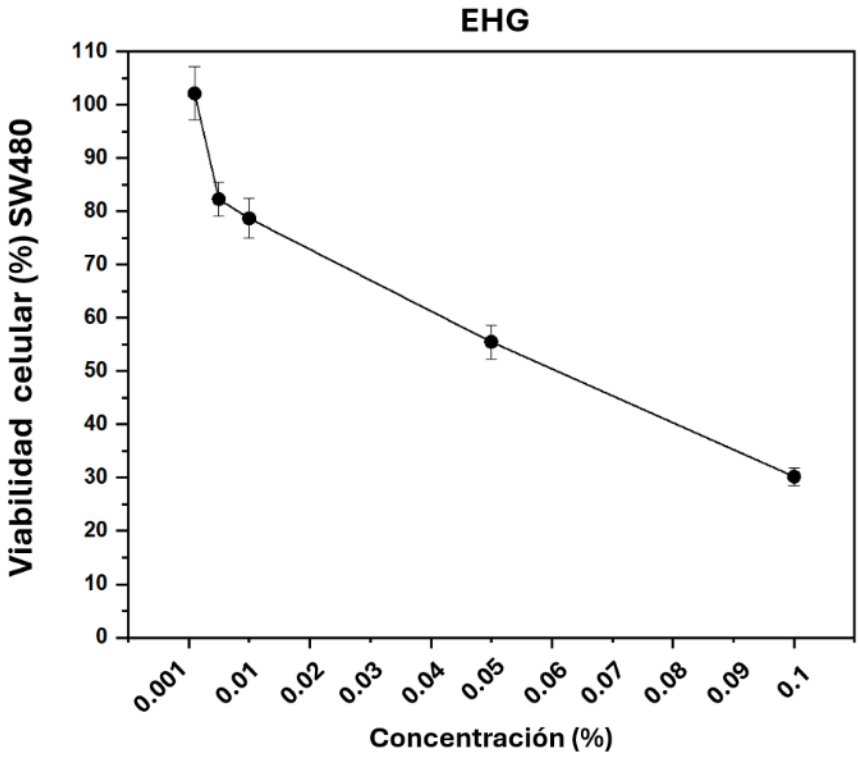


Figura 19. Curva dosis-respuesta del EHG sobre la viabilidad de células SW480.

Los valores representan el porcentaje de viabilidad celular respecto al control tras la exposición a diferentes concentraciones del extracto. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (n = 9). EHG (extracto hexánico de garambullo).

6.3.1.2 SNEDDS + EHG

Se obtuvo la curva dosis-respuesta de la formulación de SNEDDS+EHG evaluado a 24 h sobre las células SW480 (**Figura 20**), en donde se observó que en la concentración más baja (0.001%) presenta una viabilidad de 96%, mientras que en la mayor concentración (0.1%) disminuyó hasta 18%. Este fenómeno se puede asociar a la presencia de tensoactivos que ayudan a solubilizar el fármaco y aumentar la biodisponibilidad, que en sistemas *in vivo* es esencial para promover la absorción intestinal a través de los enterocitos y circulación sistémica (Chaturvedi et al., 2020). Los resultados se asemejan a lo reportado por Nazari-Vanani et al., (2025), donde demostraron que el varinostat incorporado a SNEDDS reduce la viabilidad celular 86% en la línea de cáncer de mama MCF-7 en mayor medida que el compuesto libre. Mismo caso para la cabecitamina, que encapsulada mostró una disminución del 72 % de la viabilidad en comparación con el compuesto libre.

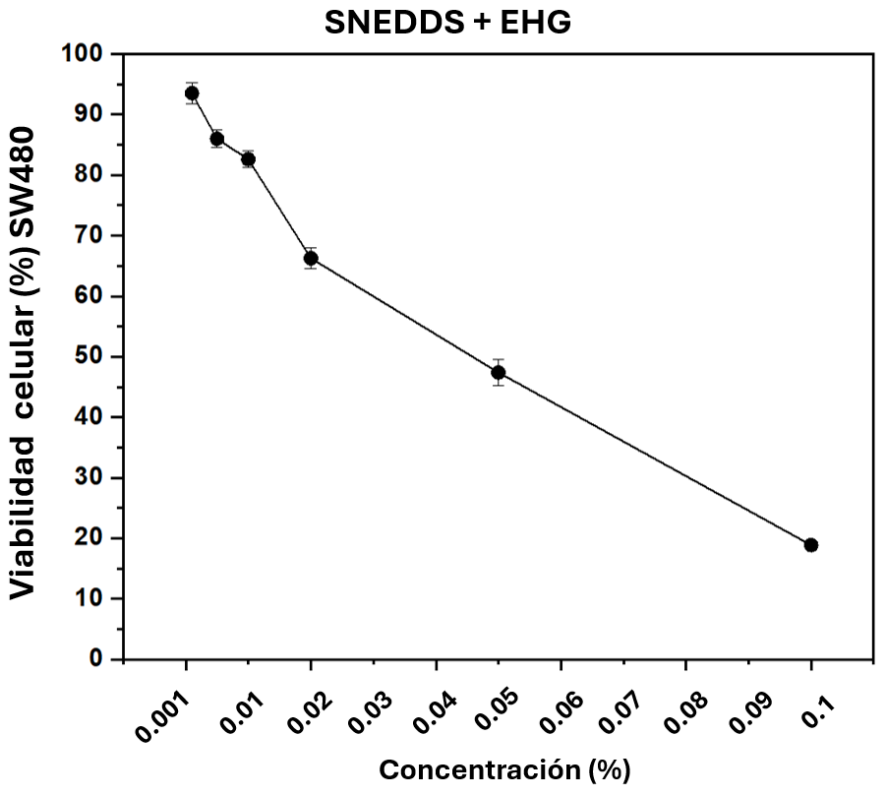


Figura 20. Curva dosis-respuesta de SNEDDS + EHG sobre la viabilidad de células SW480.

Los valores representan el porcentaje de viabilidad celular respecto al control tras la exposición a diferentes concentraciones del extracto. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (n = 9). EHG (extracto hexánico de garambullo).

Para corroborar que la respuesta fuera por el extracto y no por el vehículo se realizó una evaluación complementaria de viabilidad celular con los tensoactivos Gelucire 59/14, Cremophor EL, Capryol 90 de forma individual y la formulación de SNEDDS libre de extracto.

A pesar de que los resultados mostraron que la formulación de SNNEDS libre de extracto presentó reducción de la viabilidad celular con IC_{50} de 0.048% (**Tabla 15**) por separado los componentes no presentaron efecto importante sobre la viabilidad celular. El Cremophor EL presentó viabilidad del 99% en la mínima concentración (**Tabla 5**) y en la máxima de 70.5% (**Figura 21, B**), lo que se considera poco tóxico

ya que están muy por encima de la concentración usada para la formulación estudiada en este proyecto. Los resultados confirman lo reportado por Bu et al., (2016), quienes evaluaron el efecto citotóxico del Cremophor EL en células Caco-2, observando que a una concentración de 0.1% la viabilidad se mantiene en 100% después de 2 h de incubación y en concentraciones de 0.5% disminuye a un 40%. Sin embargo, estos autores hacen énfasis en la madurez de las células, ya que en células cultivadas durante 21 días mostraron mejores resultados de variabilidad celular, los cuales se discutieron previamente.

En el caso del Capryol 90 los resultados presentaron una viabilidad celular del 94% en la concentración más baja (0.001%) y de 85% en la más alta (0.1%) (**Figura 21, C**) respecto al control. Estos resultados confirman lo reportado por Bodnár et al., (2025) quienes evaluaron la viabilidad celular de los componentes de su formulación, entre ellos Capryol 90, en las líneas celulares Caco-2 y MCF-7, obteniendo que en ambas en concentraciones de 0.5% y 1% la viabilidad celular mantuvo por encima de 60%, consideradas como concentraciones seguras.

Para el Gelucire 59/14 los resultados muestran un aumento de la viabilidad celular en la concentración más baja (0.001%) siendo de 115 % y en la más alta (0.1%) con 75% de viabilidad (**Figura 21, D**) respecto al control. Estos resultados se asemejan a lo obtenido por Sachs-Barrable et al., (2007) quienes evaluaron la citotoxicidad del Gelucire 44/14 en la línea celular Caco-2 incubado por 24 h y reportaron que concentraciones por debajo del 0.02% no afectan significativamente la viabilidad celular ya que se mantiene en valores cercanos al 100% e incluso por encima de ésta. En cambio, con concentraciones de 0.1% y 0.2% la viabilidad disminuyó drásticamente por debajo de 10%.

Los resultados obtenidos del efecto del SNEDD libre de extracto sobre la viabilidad celular (**Figura 21, A**) son comparables con lo obtenido por Sobhani et al., (2018) quiénes evaluaron la citotoxicidad de nanoemulsiones cargadas con rapamicina utilizando diferentes fases oleosas (Capryol 90 y ácido oleico), surfactantes (Tween 20, Tween 80, Labrasol, Cremophor RH40) y cosurfactantes (Isopropanol,

Transcutol P, Propilenglicol (PG), PEG 400), en la línea celular SKBR-3 de cáncer de mama. Los autores encontraron que las formulaciones con Capryol 90 mostraron un aumento en el efecto citotóxico, lo cual asocian a la permeabilidad celular ya que favorece la solubilización y penetración de compuestos lipofílicos. Así mismo, evaluaron la permeabilidad celular en la línea Caco-2 donde las formulaciones con Capryol 90, presentaron una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial lo cual puede ser indicio de que la barrera celular está dañada y eso contribuye al aumento de la permeabilidad del fármaco. Este estudio podría ayudar a explicar por qué cada tensoactivo de forma individual no presenta una disminución significativa de la viabilidad celular, pero en conjunto la viabilidad celular disminuye.

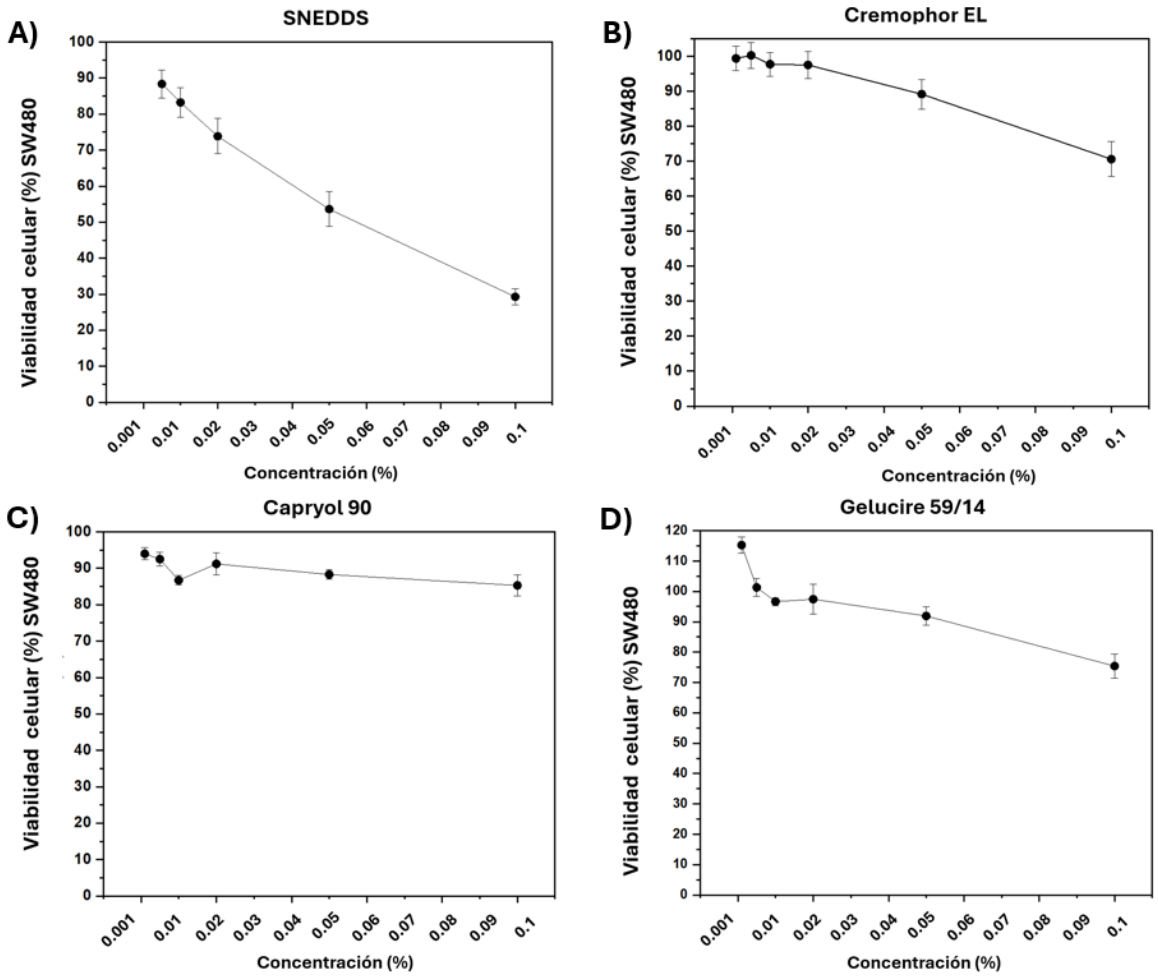


Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular del SNEDDS, Cremophor EL, Capryol 90 y Gelucire 59/14 tras la exposición a diferentes concentraciones sobre células SW480 a 24 h.

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (n = 6).

6.3.1.3 EHG fermentado 12 h

Se obtuvo la curva dosis respuesta del EHG fermentado a 12 h, observando que la concentración de 0.001 % presentó una viabilidad celular de 85 %, la de 0.02 % alcanzó el 50 % de viabilidad, siendo la concentración de 0.1% la que presentó el porcentaje más bajo de viabilidad celular en 32 % (**Figura 22**). Por lo que se puede observar que a mayor concentración de EHG fermentado menor viabilidad celular.

Nuestros resultados dosis respuesta se asemejan a lo reportado por (Couder-García et al., 2019) quienes evaluaron el efecto del peniocerol derivado del garambullo contra las líneas celulares de cáncer de colon HCT-116, HCT-15 y SW-620, observando que la concentración de 80 µM disminuyó la viabilidad celular en comparación con una concentración de 10 µM. Además, los fitoesteroles participan activamente en la regulación de la permeabilidad de la membrana celular, y en especial el β-sitosterol presenta efecto anti proliferativo en líneas celulares de cáncer de colon HT-29, HCT116, Colo 320, Caco-2. En modelos animales de rata se ha observado que tiene efecto antiinflamatorio y antiproliferativo (Al-Qahtani et al., 2022; Cilla et al., 2015).

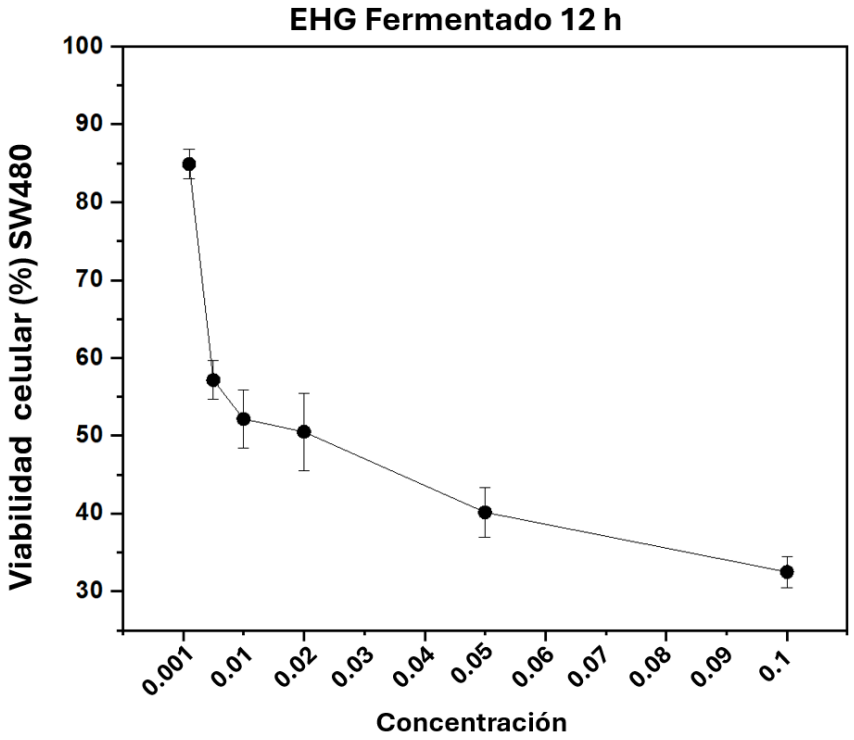


Figura 22. Curva dosis-respuesta del EHG fermentado 12 h sobre la viabilidad de células SW480.

Los valores representan el porcentaje de viabilidad celular respecto al control tras la exposición a diferentes concentraciones del extracto. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (n = 9). EHG (extracto hexánico de garambullo con 12 h de fermentación).

6.3.1.4 EHG SNEDDS fermentado 12 h

El fermentado de SNEDDS + EHG 12 h también presentó un comportamiento dosis respuesta, presentó una viabilidad celular de 78% en la concentración de 0.001 %, 45.2 % en la de 0.05 % y finalmente en la concentración más alta de 0.1% se observó una viabilidad celular de 37.5% (**Figura 23**).

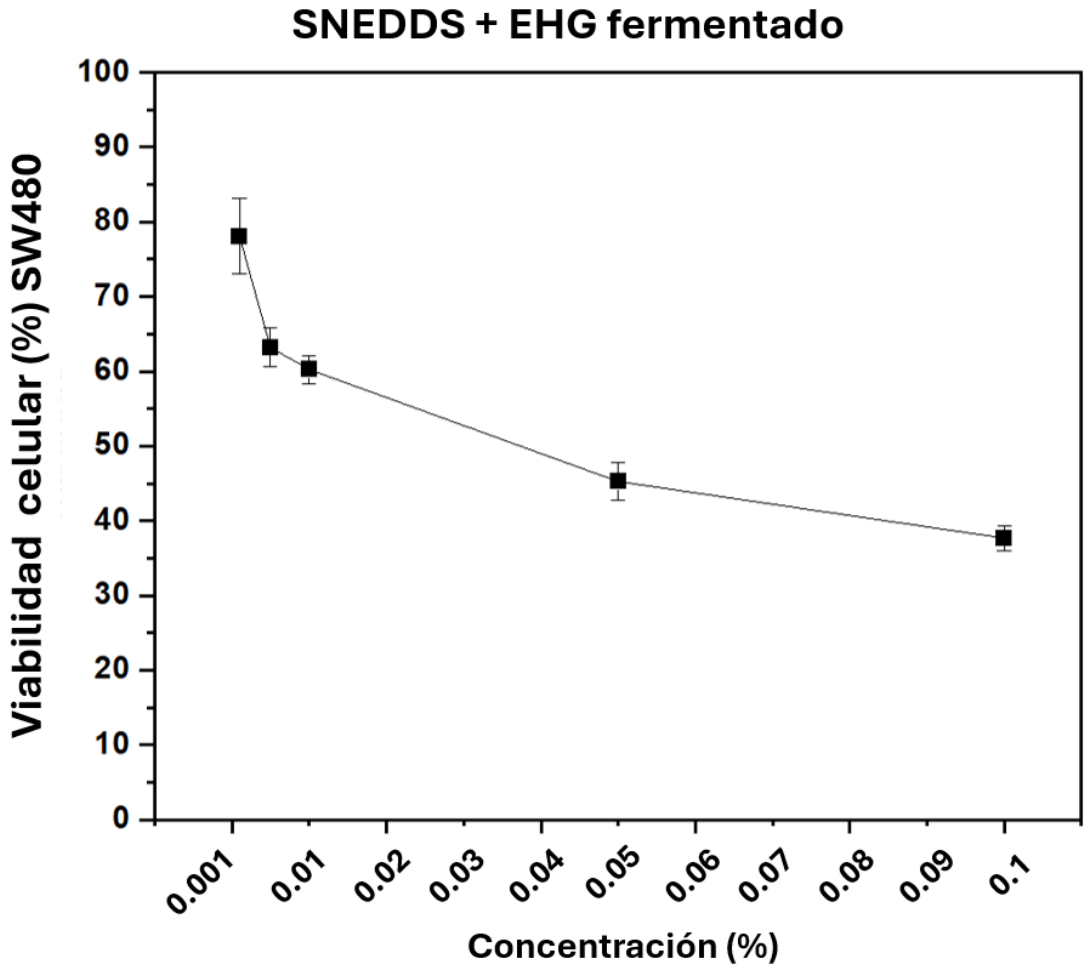


Figura 23. Curva dosis-respuesta del SNEDD+EHG fermentado 12 h sobre la viabilidad de células SW480.

6.3.2 Determinación de la IC_{50}

A partir de los gráficos de dosis respuesta de los tratamientos se obtuvo la concentración inhibitoria (IC) 50, donde el EHG presentó 0.115 ± 0.031 %. En el caso del extracto fermentado fue de 0.017 ± 0.030 % siendo una concentración

menor en comparación con el EHG no fermentado (**Tabla 15**). La disminución podría atribuirse al proceso de fermentación donde ocurre la oxidación de fitoesteroles resultando en derivados como: 7β-hidroxisitosterol, 7-ceto-sitosterol, 7-cetositosterol, 7-cetocampesterol, 7-cetobrassicasterol y 7-cetoestigmasterol entre otros, compuestos que se ha visto tienen la capacidad de suprimir la proliferación celular y efecto pro-apotótico (Kasprzak et al., 2023). Además, ambas IC_{50} resultaron ser menores en comparación con Bolaños-Carrillo et al., (2015) quienes evaluaron la viabilidad celular del peniocerol y macdougallina obtenidos del garambullo sobre la línea celular HCT-15. En el estudio reportaron una IC_{50} de 41.66 ± 0.41 µM de peniocerol a 24 h y de 37.67 ± 0.76 para macdougallina.

En el caso de SNEDDS + EHG se obtuvo una IC_{50} 0.035 ± 0.014%, observando que la concentración es menor que el EHG, por lo que se confirma que la incorporación del EHG en SNEDDS protege a los compuestos bioactivos y parcialmente incrementa su poder terapéutico. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Al-Qahtani et al., (2022) quienes obtuvieron una IC_{50} de 25.36 ± 2.77 µM de 2-metoxiestradiol tras ser evaluado en la línea celular MCF-7 y de 9.94 ± 0.88 µM una vez que el compuesto fue incorporado en SNEDDS.

Tabla 15. Valores de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de los diferentes tratamientos en células SW480.

Tratamiento	IC50 (%) a 24 h	µL/mL
EHG libre	0.046 ± 0.085	46
SNEDDS + EHG	0.035 ± 0.011	35
EHG fermentado 12 h	0.05 ± 0.038	50
SNEDDS + EHG fermentado 12 h	0.026 ± 0.020	26

SNEDDS (vehículo)	0.048 ± 0.044	48

Los datos corresponden a la evaluación tras 24 h de exposición y se expresan como el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado (n = 9).

6.4 Ensayo de muerte celular

En este ensayo se evaluó el tipo de muerte celular que causan los tratamientos ya fuese por apoptosis o necrosis. Los resultados muestran que el control negativo presenta 98.59 % ± 0.28 de células viables, 0.72 % ± 0.08 apoptóticas y 0.67 % ± 0.25. Por otro lado, el control positivo 98.29 % ± 0.10 células viables, 0.85 % ± 0.10 apoptóticas y 0.84 % ± 0.09 (**Tabla 16**). Este dato no es lo esperado para un control positivo, ya que el peróxido de hidrógeno utilizado en el presente estudio es ampliamente utilizado como método de disrupción de membranas celulares, liberación de LDH y ausencia de activación de caspasas (Sakuma et al., 2015).

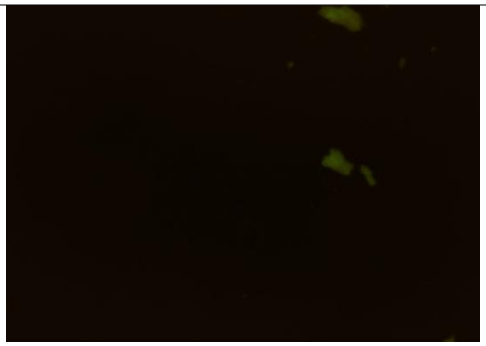
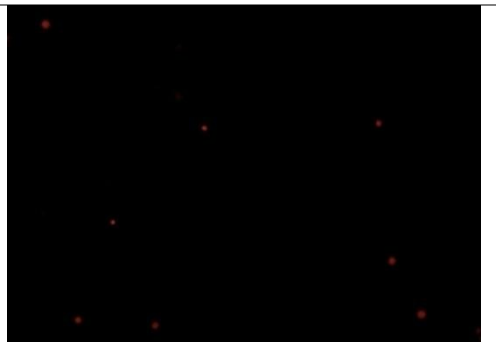
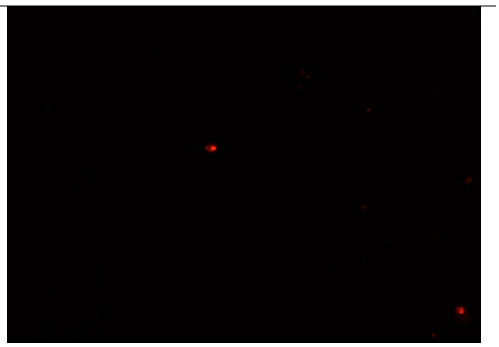
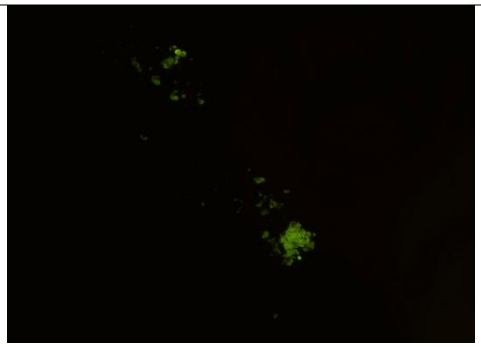
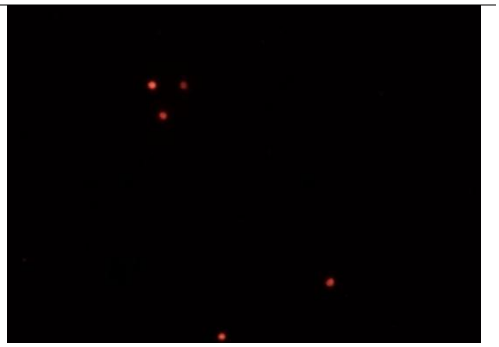
Por lo que el resultado esperado era de 100% de necrosis sin viabilidad celular. A su vez, en los tratamientos de SNEDDS+EHG se observó 1.45% de apoptosis y 1.17% necrosis, mientras que el tratamiento fermentado de EHG 0.40% de células apoptóticas con un 0.9% de células necróticas. Tampoco estos resultados son los esperados, ya que para este ensayo se utilizó la IC_{50} determinada previamente para ambos tratamientos. Por ello, se esperaba que la actividad metabólica disminuyera por lo menos al 50% y de ahí se partiera para determinar la inducción de ambos tipos de muerte.

Tabla 16. Porcentaje de tipo de muerte celular de los tratamientos fermentados.

	Control (-)	Control (+)	SNEDDS + EHG	EHG
Viables	98.59 % ± 0.28	98.29 % ± 0.10	97.37 % ± 1.78	98.65 % ± 0.46
Apoptosis	0.72 % ± 0.08	0.85 % ± 0.10	1.54 % ± 1.54	0.40 % ± 0.42
Necrosis	0.67 % ± 0.25	0.84 % ± 0.09	1.17 % ± 0.34	0.93 % ± 0.46

Tabla 17. Imágenes representativas de cada tratamiento y muerte celular.

Apoptosis	Necrosis

Control (-)		
Control (+)		
SNEDDS + EHG		

Los resultados mencionados pueden ser el resultado de un protocolo ejecutado de forma incorrecta. En el presente trabajo se realizó un raspado celular para disociar a las células de la placa y crear una suspensión unicelular. Sin embargo, Nowak-Terpiłowska et al. (2021) evaluaron en cinco líneas celulares (MDA-MB-23, PC-3, MSU-1.1, HEK-293 y NT14), tres métodos diferentes de desprendimiento celular un método mecánico con el uso de un raspador celular y otros dos enzimáticos uno

utilizando tripsina EDTA 0.25% y otro con acutasa. Posteriormente los autores reportaron que los métodos enzimáticos fueron los más efectivos, mostrando más del 80% de células viables en cuatro líneas celulares (MDA-MB-23, PC-3, MSU-1.1, HEK-293) en comparación con el raspador celular con un promedio de 60% de células viables. Otro dato importante a resaltar es que los autores utilizaron 5 µL de Anexina V y 1 µL de PI por cada 100 µL de suspensión celular. Y en los resultados mostrados (**Tabla 17**) se utilizaron 20 µL de Anexina V y 5 µL de yoduro de propidio (PI) para una suspensión celular de 20 µL.

Dada la revisión de la literatura y el análisis del procedimiento se propone realizar algunas modificaciones para trabajos futuros y así garantizar una correcta evaluación eliminando cualquier sesgo.

7 Conclusiones

Con base en la caracterización fisicoquímica se confirmó la incorporación del extracto lipofílico (EHG), en SNEDDS. Esto se confirmó con el análisis de DLS debido al aumento de tamaño de gota y el espectro de FTIR donde se observó la integración de los componentes sin sufrir interacciones no deseadas. En el caso de las microcápsulas de alginato se observó la incorporación del extracto hidrofílico (EMG) mediante el espectro de FTIR donde se descartaron interacciones no deseadas, así mismo se confirmó la integración del EMG con el análisis de TGA y DSC mediante la formación de la red de alginato y posteriormente la ruptura de esta. Tras la digestión *in vitro*, las SNEDDS presentaron un tamaño máximo de 80 nm a 210 min siendo un tamaño estable y un PDI con variaciones a lo largo del tiempo debido a la formación de micelas; sin embargo, el promedio fue de 0.27 indicando que el sistema mantiene su estabilidad. En el caso de las microcápsulas, el compuesto libre presentó mayor cantidad de polifenoles en la fase oral, en cambio cuando se encapsula esta liberación disminuye, especulando que puede estar asociado a una presencia alta de azúcares en el extracto y una presencia menor de polifenoles. Ya que, en fase intestinal la presencia de polifenoles es menor en el EMG encapsulado en comparación con el EMG libre, lo mismo sucede en la evaluación de polifenoles después de la fermentación in vitro (6 h, 12 h y 24 h).

La evaluación *in vitro* sobre células SW480 mostró que la viabilidad celular es menor en la formulación de SNEDDS + EHG en comparación con el EHG libre, de mismo modo la IC_{50} se vio disminuida en el EHG integrado en SNEDDS con 0.035 ± 0.014 en comparación con el EHG libre 0.115 ± 0.031. Sin embargo, se observó que el vehículo llega a presentar efecto sobre la disminución celular en conjunto, pero individualmente no.

Por ello, tanto los SNEDDS como las microcápsulas incorporaron el extracto correctamente, sin embargo, el EMG presentó mayor cantidad de azúcares y una ligera disminución de polifenoles en el EMG encapsulado. En cambio, el EHG podría estar compuesto de tocoferoles y fitoesteroles. Cabe destacar que, a pesar de la

naturaleza de cada extracto, ambas formulaciones protegieron el extracto correspondiente durante la digestión *in vitro*, hasta llegar a la fermentación donde se observó la presencia de los compuestos de interés. Es por ello que la técnica de encapsulación para la protección de los compuestos es una alternativa prometedora para transportarlos hasta el colon.

Con base en los resultados previamente obtenidos, se seleccionó el tratamiento de SNEDDS para su evaluación en la línea celular SW480, donde los resultados de IC_{50} fueron los siguientes: EHG libre = 0.046%, SNEDDS + EHG = 0.035 ambos tratamientos sin fermentar, los fermentados a 12 h de EHG = 0.05 y SNEDDS + EHG = 0.026 obteniendo que el compuesto incorporado en los SNEDDS aumentó la bioaccesibilidad y biodisponibilidad debido a la protección por parte de los tensoactivos. Aunado a ello, la evaluación de la viabilidad celular de los tensoactivo demostró que las cantidades utilizadas son seguras para la línea celular SW480 y su efecto se ve potenciado cuando se agregan en conjunto.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian el potencial que tienen los sistemas de encapsulación en la protección y aumento de la disponibilidad de los compuestos bioactivos del garambullo durante la digestión *in vitro*, donde destacó el sistema de SNEDDS favoreciendo las propiedades del extracto lipofílico frente a células SW480 y manteniendo este efecto después de la fermentación. Una de las ventajas principales de esta formulación es que permite la incorporación de compuestos lipofílicos, les brinda protección y aumenta su solubilidad. No obstante, entre las principales limitaciones del estudio se encuentran la disminución de la liberación de polifenoles del EMG incorporado en las microcápsulas de alginato, la variabilidad observada durante la digestión y fermentación, así como la identificación y cuantificación de los compuestos presentes en el extracto. Por otra parte, los resultados de muerte celular muestran que se requiere estandarizar el protocolo con la finalidad de obtener una determinación correcta sobre el tipo de muerte celular.

Finalmente, a pesar de las limitaciones del presente trabajo, los resultados obtenidos son prometedores y respaldan el uso de sistemas de encapsulación como una alternativa para aumentar la estabilidad y el potencial biológico de los compuestos lipofílicos e hidrofílicos del garambullo. En futuras investigaciones se buscará optimizar las condiciones de encapsulación, mejorar la retención y liberación controlada de los compuestos bioactivos y ampliar la caracterización de los metabolitos generados durante la fermentación.

8 Referencias

Agüero, L., Zaldivar-Silva, D., Peña, L., & Dias, M. (2017). Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. *Carbohydrate Polymers* (168), 32–43. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.033

Ahmadi, F., Sodagar-Taleghani, A., Ebrahimnejad, P., Pouya Hadipour Moghaddam, S., Ebrahimnejad, F., Asare-Addo, K., & Nokhodchi, A. (2022). A review on the latest developments of mesoporous silica nanoparticles as a promising platform for diagnosis and treatment of cancer. *International Journal of Pharmaceutics* (625). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122099

Al-Qahtani, S. D., Bin-Melaih, H. H., Atiya, E. M., Fahmy, U. A., Binmahfouz, L. S., Neamatallah, T., Al-Abbasi, F. A., & Abdel-Naim, A. B. (2022). Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of 2-Methoxyestradiol Exhibits Enhanced Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Activities in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Life*, *12*(9). https://doi.org/10.3390/life12091369

Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2020). Chitosan and cellulose-based hydrogels for wound management. *International Journal of Molecular Sciences* 21(24,) 1–30. https://doi.org/10.3390/ijms21249656

Badran, M. (2014). Formulation and *in vitro* evaluation of Flufenamic acid loaded deformable liposomes for improved skin delivery. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9(1) 83-91.

Bal, Y., Sürmeli, Y., & Şanlı-Mohamed, G. (2023). Antiproliferative and Apoptotic Effects of Olive Leaf Extract Microcapsules on MCF-7 and A549 Cancer Cells. *ACS Omega*, *8*(32), 28984–28993. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01493

Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., & Christou, N. (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical

pathways to promising processes. *Cancer Science* 111(9) 3142–3154). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/cas.14532

Bodnár, K., Marminon, C., Perret, F., Haimhoffer, Á., Papp, B., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Jose, J., Le Borgne, M., Bácskay, I., & Józsa, L. (2025). Formulation and Evaluation of Alginate Microcapsules Containing an Uncompetitive Nanomolar Dimeric Indenoindole Inhibitor of the Human Breast Cancer Resistance Pump ABCG2 with Different Excipients. *Pharmaceutics*, *17*(12). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17121587

Bolaños-Carrillo, M. A., Ventura-Gallegos, J. L., Saldivar-Jiménez, A. D., Zentella-Dehesa, A., & Martínez-Vázquez, M. (2015). Effect of Sterols Isolated from Myrtillocactus geometrizans on Growth Inhibition of Colon and Breast Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/589350

Bravo-Alfaro, D. A., Ochoa-Rodríguez, L. R., Villaseñor-Ortega, F., Luna-Barcenas, G., & García, H. S. (2022). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) improves the oral bioavailability of betulinic acid. *Journal of Molecular Liquids*, *364*. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119946

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Bu, P., Narayanan, S., Dalrymple, D., Cheng, X., & Serajuddin, A. T. M. (2016). Cytotoxicity assessment of lipid-based self-emulsifying drug delivery system with Caco-2 cell model: Cremophor EL as the surfactant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *9(1)*, 162–171. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.011

Bucekova, M., Buriova, M., Pekarik, L., Majtan, V., & Majtan, J. (2018). Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-27449-3

Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9). https://doi.org/10.3390/ijms21093233

Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (Coffea arabica L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, *77*, 156–161. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024

Chaturvedi, S., Verma, A., & Saharan, V. A. (2020). Lipid drug carriers for cancer therapeutics: An insight into lymphatic targeting, P-gp, CYP3A4 modulation and bioavailability enhancement. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10 (4) 524–541). https://doi.org/10.34172/apb.2020.064

Chen, S., Zhao, D., Luan, C., Zheng, J., Liu, W., Feng, Z., Luo, R., Han, X., & Wang, D. (2023). Ferulic Acid Induces Autophagy and Apoptosis in Colon Cancer CT26 Cells via the MAPK Pathway. *Molecules*, *28*(16). https://doi.org/10.3390/molecules28166014

Cilla, A., Attanzio, A., Barberá, R., Tesoriere, L., & Livrea, M. A. (2015). Anti-proliferative effect of main dietary phytosterols and β-cryptoxanthin alone or combined in human colon cancer Caco-2 cells through cytosolic Ca+2 - and oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Functional Foods*, *12*, 282–293. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.001

Couder-García, B. del C., Jacobo-Herrera, N. J., Zentella-Dehesa, A., Rocha-Zavaleta, L., Tavarez-Santamaría, Z., & Martínez-Vázquez, M. (2019). The Phytosterol Peniocerol Inhibits Cell Proliferation and Tumor Growth in a Colon

Cancer Xenograft Model. *Frontiers in Oncology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01341

Davidson, M., Louvet, F., Meudec, E., Landolt, C., Grenier, K., Périno, S., Ouk, T.-S., & Saad, N. (2023). Optimized Single-Step Recovery of Lipophilic and Hydrophilic Compounds from Raspberry, Strawberry and Blackberry Pomaces Using a Simultaneous Ultrasound-Enzyme-Assisted Extraction (UEAE). *Antioxidants*, *12*(10). https://doi.org/10.3390/antiox12101793

Dienaitė, L., Baranauskienė, R., & Rimantas Venskutonis, P. (2021). Lipophilic extracts isolated from European cranberry bush (*Viburnum opulus*) and sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berry pomace by supercritical CO2 – Promising bioactive ingredients for foods and nutraceuticals. *Food Chemistry*, *348, 129047*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129047

Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and Function*, *10*(2), 514–528. https://doi.org/10.1039/c8fo01997e

Frent, O. D., Vicas, L. G., Duteanu, N., Morgovan, C. M., Jurca, T., Pallag, A., Muresan, M. E., Filip, S. M., Lucaciu, R. L., & Marian, E. (2022). Sodium Alginate—Natural Microencapsulation Material of Polymeric Microparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 23(20). https://doi.org/10.3390/ijms232012108

Ghazi, B., El Ghanmi, A., Kandoussi, S., Ghouzlani, A., & Badou, A. (2022). CAR T-cells for colorectal cancer immunotherapy: Ready to go? *Frontiers in Immunology*, *13*, 978195. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.978195

Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. In *Bioorganic Chemistry*, 88. Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925

GLOBOCAN. (2026). *Statistics at a glance, 2024 Top 5 most frequent cancers Number of new cases 201 137*.

Godínez-Santillán, R. I., Kuri-García, A., Ramírez-Pérez, I. F., Herrera-Hernández, M. G., Ahumada-Solórzano, S. M., Guzmán-Maldonado, S. H., & Vergara-Castañeda, H. A. (2024). Characterization of Extractable and Non-Extractable Phenols and Betalains in Berrycactus (Myrtillocactus geometrizans) and Its Chemoprotective Effect in Early Stage of Colon Cancer *In Vivo*. *Antioxidants*, *13*(9). https://doi.org/10.3390/antiox13091112

Gong, J., Zhou, S., & Yang, S. (2019). Vanillic Acid Suppresses HIF-1α Expression via Inhibition of mTOR/p70S6K/4E-BP1 and Raf/MEK/ERK Pathways in Human Colon Cancer HCT116 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3). https://doi.org/10.3390/ijms20030465

Gu, S., Liu, F., Xie, X., Ding, M., Wang, Z., Xing, X., Xiao, T., & Sun, X. (2023). β-Sitosterol blocks the LEF-1-mediated Wnt/β-catenin pathway to inhibit proliferation of human colon cancer cells. *Cellular Signalling*, *104*. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110585

Handan Özdemir, B. (2023). Tumor Microenvironment: Necroptosis Switches the Subtype of Liver Cancer While Necrosis Promotes Tumor Recurrence and Progression. In *Experimental and Clinical Transplantation*, 21(4) 291–298). Baskent University. https://doi.org/10.6002/ect.2021.0457

Izham, M. N. M., Hussin, Y., Aziz, M. N. M., Yeap, S. K., Rahman, H. S., Masarudin, M. J., Mohamad, N. E., Abdullah, R., & Alitheen, N. B. (2019). Preparation and characterization of self nano-emulsifying drug delivery system loaded with citraland its antiproliferative effect on colorectal cells *in vitro*. *Nanomaterials*, *9*(7) 1028. https://doi.org/10.3390/nano9071028

Salazar, J. R., Martínez-Vazquez, M., Cespedes, C. L., Ramírez-Apan, T., Nieto-Camacho, A., Rodríguez-Silverio, J., & Flores-Murrieta, F. (2011). Anti-inflammatory and cytotoxic activities of chichipegenin, peniocerol, and

macdougallin isolated from Myrtillocactus geometrizans (Mart. ex Pfeiff.) Con. Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences, 66(1-2), 24–30.

Jaganathan, S. K., Vellayappan, M. V., Narasimhan, G., Supriyanto, E., Dewi, D. E. O., Narayanan, A. L. T., Balaji, A., Subramanian, A. P., & Yusof, M. (2014). Chemopreventive effect of apple and berry fruits against colon cancer. In *World Journal of Gastroenterology*, 20(45) 17029–17036). https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i45.17029

Jaywant, S. A., Singh, H., & Arif, K. M. (2022). Sensors and Instruments for Brix Measurement: A Review. *Sensors* 22(6). https://doi.org/10.3390/s22062290

Jefrei, E., Xu, M., Moore, J. B., & Thorne, J. L. (2024). Phytosterol and phytostanol-mediated epigenetic changes in cancer and other non-communicable diseases: a systematic review. *The British Journal of Nutrition*, *131*(6), 935–943. https://doi.org/10.1017/S0007114523002532

Kanwal, T., Saifullah, S., Rehman, J. ur, Kawish, M., Razzak, A., Maharjan, R., Imran, M., Ali, I., Roome, T., Simjee, S. U., & Shah, M. R. (2021). Design of absorption enhancer containing self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for curcumin improved anti-cancer activity and oral bioavailability. *Journal of Molecular Liquids*, *324*. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114774

Karali, V., Goula, P. E., Patroklou, G., Saitani, E. M., Baltatzis, G. E., Gatou, M. A., Kontaxis, L. C., Pavlatou, E. A., Zaoutsos, S. P., Trougakos, I., Valsami, G., Pippa, N., & Pispas, S. (2025). Preparation and evaluation of mixed alginate-cyclodextrin hydrogels: From physicochemical, thermotropic to swelling characterization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *721, 137199* . https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2025.137199

Karim, S., Akhter, M. H., Burzangi, A. S., Alkreathy, H., Alharthy, B., Kotta, S., Md, S., Rashid, M. A., Afzal, O., Altamimi, A. S. A., & Khalilullah, H. (2022). Phytosterol-Loaded Surface-Tailored Bioactive-Polymer Nanoparticles for

Cancer Treatment: Optimization, In Vitro Cell Viability, Antioxidant Activity, and Stability Studies. *Gels, 8*(4). https://doi.org/10.3390/gels8040219

Kasprzak, M., Rudzińska, M., Juzwa, W., & Olejnik, A. (2023). Anti-proliferative potential and oxidative reactivity of thermo-oxidative degradation products of stigmasterol and stigmasteryl esters for human intestinal cells. *Scientific Reports*, *13*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-023-34335-0

Kresty, L. A., Morse, M. A., Morgan, C., Carlton, P. S., Lu, J., Gupta, A., Blackwood, M., & Stoner, G. D. (2001). Chemoprevention of esophageal tumorigenesis by dietary administration of lyophilized black raspberries. *Cancer Research*, *61*(16), 6112–6119.

Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. In *Food Chemistry* (393). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133430

Kučuk, N., Primožič, M., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2024). Alginate Beads with Encapsulated Bioactive Substances from Mangifera indica Peels as Promising Peroral Delivery Systems. *Foods*, *13*(15). https://doi.org/10.3390/foods13152404

Kupina, S., Fields, C., Koerner, P. J., Krueger, D. A., Phillips, T., Rimmer, C. A., Schaneberg, B. T., Sullivan, D. M., Szpylka, J., Nutrisciences, M., You, H., & Zhou, J. (2019). Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13 AOAC Official Method 2017.13 Total Phenolic Content in Extracts. Journal of AoaC International, 102(1). https://doi.org/10.5740/jaoacint.2017.13

La Vecchia, M., Sala, G., Sculco, M., Aspesi, A., & Dianzani, I. (2024). Genetics, diet, microbiota, and metabolome: partners in crime for colon carcinogenesis. In *Clinical and experimental medicine*, 24(1), 248. https://doi.org/10.1007/s10238-024-01505-x

Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F., & Wils, J. (2010). Colon cancer. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(2), 106–133). https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.010

Li, S., Zhang, H., Chen, K., Jin, M., Vu, S. H., Jung, S., He, N., Zheng, Z., & Lee, M. S. (2022). Application of chitosan/alginate nanoparticle in oral drug delivery systems: prospects and challenges. *Drug Delivery*, *29*(1), 1142–1149. https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2058646

López-Palestina, C. U., Aguirre-Mancilla, C. L., Raya-Pérez, J. C., Ramírez-Pimentel, J. G., Gutiérrez-Tlahque, J., & Hernández-Fuentes, A. D. (2018). The effect of an edible coating with tomato oily extract on the physicochemical and antioxidant properties of garambullo (myrtillocactus geometrizans) fruits. *Agronomy*, *8*(11). https://doi.org/10.3390/agronomy8110248

Mahmoud, K. Y., Elhesaisy, N. A., Rashed, A. R., Mikhael, E. S., Fadl, M. I., Elsadek, M. S., Mohamed, M. A., Mostafa, M. A., Hassan, M. A., Halema, O. M., Elnemer, Y. H., & Swidan, S. A. (2023). Exploring the potential of intranasally administered naturally occurring quercetin loaded into polymeric nanocapsules as a novel platform for the treatment of anxiety. *Scientific Reports*, *13*(1) 1014. https://doi.org/10.1038/s41598-023-27665-6

Maioli, E., Torricelli, C., Fortino, V., Carlucci, F., Tommassini, V., & Pacini, A. (2009). Critical appraisal of the MTT assay in the presence of Rottlerin and uncouplers. *Biological Procedures Online*, *11*(1), 227–240. https://doi.org/10.1007/s12575-009-9020-1

Maldonado-Cano, Y. Y., Rojas-Flores, A. K., López-Álvarez, G. S., Luzardo-Ocampo, I., Kuri-García, A., Cuéllar-Núñez, M. L., & Vergara-Castañeda, H. A. (2026). Bioaccessible compounds generated during human colonic fermentation of *Myrtillocactus geometrizans* exert anticancer effects in colon

cancer cells. *Food & Function*, *17*(15), 6969–6979. https://doi.org/10.1039/D6FO00511J

Malki, A., Elruz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S., & Al Moustafa, A. E. (2021). Molecular mechanisms of colon cancer progression and metastasis: Recent insights and advancements. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22(1)1–24. https://doi.org/10.3390/ijms22010130

Marei, H. E., Althani, A., Afifi, N., Hasan, A., Caceci, T., Pozzoli, G., Morrione, A., Giordano, A., & Cenciarelli, C. (2021). p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell International*, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8

Martinović, J., Lukinac, J., Jukić, M., Ambrus, R., Planinić, M., Šelo, G., Klarić, A. M., Perković, G., & Bucić-Kojić, A. (2023). Physicochemical Characterization and Evaluation of Gastrointestinal *In Vitro* Behavior of Alginate-Based Microbeads with Encapsulated Grape Pomace Extracts. *Pharmaceutics*, *15*(3). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030980

Martinović, J., Lukinac, J., Jukić, M., Ambrus, R., Planinić, M., Šelo, G., Perković, G., & Bucić-Kojić, A. (2023). The Release of Grape Pomace Phenolics from Alginate-Based Microbeads during Simulated Digestion *In Vitro*: The Influence of Coatings and Drying Method. *Gels*, *9*(11). https://doi.org/10.3390/gels9110870

Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., & Ostafe, V. (2019). Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. In *International Journal of Molecular Sciences* 20(23). https://doi.org/10.3390/ijms20235889

Montiel-Sánchez, M., García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., García, H. S., & Cano, M. P. (2021). *In vitro* gastrointestinal stability, bioaccessibility and potential biological activities of betalains and phenolic compounds in cactus

berry fruits (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Chemistry*, *342*, 128087. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128087

Morakul, B., Teeranachaideekul, V., Limwikrant, W., & Junyaprasert, V. B. (2024). Dissolution and antioxidant potential of apigenin self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery. *Scientific Reports*, *14*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-024-59617-z

Moreira Mar, J., Souza da Silva, L., da S. Rabello, M., Moraes Biondo, M., Ferreira Kinupp, V., Henrique Campelo, P., Bruginski, E., Ramos Campos, F., de Araújo Bezerra, J., & Aparecido Sanches, E. (2021). Development of alginate/inulin carrier systems containing non-conventional Amazonian berry extracts. *Food Research International*, *139, 109838*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109838

Nazari-Vanani, R., Sattarahmady, N., Karimian, K., & Heli, H. (2025). An in Vitro Study on Anticancer Efficacy of Capecitabine-and Vorinostat-incorporated Self-nanoemulsions. *Journal of Biomedical Physics and Engineering*, *15*(4), 353–368. https://doi.org/10.31661/jbpe.v0i0.2405-1757

Nowak-Terpiłowska, A., Śledziński, P., & Zeyland, J. (2021). Impact of cell harvesting methods on detection of cell surface proteins and apoptotic markers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *54*(2), 1–7. https://doi.org/10.1590/1414-431X202010197

Okpoghono, J., Isoje, E. F., Igbuku, U. A., Ekayoda, O., Omoike, G. O., Adonor, T. O., Igue, U. B., Okom, S. U., Ovowa, F. O., Stephen-Onojedje, Q. O., Ejueyitsi, E. O., & Seigha, A. A. (2024). Natural polyphenols: A protective approach to reduce colorectal cancer. *Heliyon* 10(11). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32390

Olsson, M. E., Gustavsson, K.-E., Andersson, S., Nilsson, A., & Duan, R.-D. (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and

correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(24), 7264–7271. https://doi.org/10.1021/jf030479p

Pablo, A. G. P., Klinkesorn, U., & Tongchitpakdee, S. (2025). Optimized microencapsulation of phenolic- and vitamin C-rich juice from Indian gooseberry by calcium-alginate ionic-crosslinking. *Journal of Agriculture and Food Research*, *22*. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.102024

Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46) 17543–17553). Society. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022

Plazinski, W., & Plazinska, A. (2011). Molecular dynamics study of the interactions between phenolic compounds and alginate/alginic acid chains. *New Journal of Chemistry*, *35*(8), 1607–1614. https://doi.org/10.1039/c1nj20273a

Pool, H., Campos-Vega, R., Herrera-Hernández, M. G., García-Solis, P., García-Gasca, T., Sánchez, I. C., Luna-Bárcenas, G., & Vergara-Castañeda, H. (2018). Development of genistein-PEGylated silica hybrid nanomaterials with enhanced antioxidant and antiproliferative properties on HT29 human colon cancer cells. American journal of translational research, 10(8), 2306–2323.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. S. Markossian (Eds.) et. al., Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Rodríguez-Wong, U., & Rodríguez-Medina, U. (2024). *Epidemiología del cáncer de colon y recto Epidemiology of the colon and rectal cancer REVISTA MEXICANA DE CIRUGÍA DEL APARATO DIGESTIVO*, 13,(1).

Ruíz-Aguilar, I., Meza-Márquez, O. G., Osorio-Revilla, G., Gallardo-Velázquez, T., & Ramos-Monroy, O. A. (2024). Phytochemical Compounds, and Antioxidant, Anti-Hyperglycemic, and Anti-Inflammatory Activity of Microencapsulated Garambullo (Myrtillocactus geometrizans) Extract During *In Vitro* Digestion and Storage. *Processes*, *12*(11). https://doi.org/10.3390/pr12112526

Saber, A., Abedimanesh, N., Somi, M.-H., Khosroushahi, A. Y., & Moradi, S. (2023). Anticancer properties of red beetroot hydro-alcoholic extract and its main constituent; betanin on colorectal cancer cell lines. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *23*(1), 246. https://doi.org/10.1186/s12906-023-04077-7

Sachs-Barrable, K., Thamboo, A., Lee, S. D., & Wasan, K. M. (2007). Lipid excipients Peceol and Gelucire 44/14 decrease P-glycoprotein mediated efflux of rhodamine 123 partially due to modifying P-glycoprotein protein expression within Caco-2 cells. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques, 10(3), 319–331.

Sakuma, S., Abe, M., Kohda, T., & Fujimoto, Y. (2015). Hydrogen peroxide generated by xanthine/xanthine oxidase system represses the proliferation of colorectal cancer cell line Caco-2. Journal of clinical biochemistry and nutrition, 56(1), 15–19. https://doi.org/10.3164/jcbn.14-34

Şalva, E., Akdağ, A. E., Alan, S., Arısoy, S., & Akbuğa, F. J. (2023). Evaluation of the Effect of Honey-Containing Chitosan/Hyaluronic Acid Hydrogels on Wound Healing. *Gels*, *9*(11). https://doi.org/10.3390/gels9110856

Sampieri-Morán, J. M., Bravo-Alfaro, D. A., Uribe-Lam, E., Luna-Barcenas, G., Montiel-Sánchez, M., Velasco-Rodríguez, L. del C., Acosta-Osorio, A. A., Ferrer, M., & García, H. S. (2025). Delivery of Magnolia bark extract in nanoemulsions formed by high and low energy methods improves the

bioavailability of Honokiol and Magnolol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *208*. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2025.114627

Sánchez-Recillas, E., Almanza-Aguilera, E., Dufoo-Hurtado, E., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., & Vergara-Castañeda, H. A. (2024). Untargeted metabolomics of gut-derived metabolites from in vitro colonic fermentation of garambullo (*Myrtillocactus geometrizans). Journal of Functional Foods*, *114*. https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106063

Sánchez-Recillas, E., Campos-Vega, R., Pérez-Ramírez, I. F., Luzardo-Ocampo, I., Cuéllar-Núñez, M. L., & Vergara-Castañeda, H. A. (2022). Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*): effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of phytochemicals. *Food and Function*. https://doi.org/10.1039/d1fo04392g

Sandoval-Salazar, C., Jiménez-García, S. N., Beltrán-Campos, V., Vera-Becerra, L. E., & Núñez-Colín, C. A. (2023). Effect of berrycactus fruit (Myrtillocactus geometrizans) on glutamate, glutamine, and GABA levels in the frontal cortex of rats fed with a high-fat diet. *Open Life Sciences*, *18*(1). https://doi.org/10.1515/biol-2022-0529

Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Rodríguez Colinas, B., & Ballesteros, A. O. (2015). *Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides that stimulate the gut microbiota*. https://www.researchgate.net/publication/281943308

Sarhan, W. A., Azzazy, H. M. E., & El-Sherbiny, I. M. (2016). Honey/Chitosan Nanofiber Wound Dressing Enriched with Allium sativum and Cleome droserifolia: Enhanced Antimicrobial and Wound Healing Activity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *8*(10), 6379–6390. https://doi.org/10.1021/acsami.6b00739

Serra, A., Macià, A., Romero, M. P., Reguant, J., Ortega, N., & Motilva, M. J. (2012). Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones

and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, *130*(2), 383–393. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.055

Sirvi, A., Debaje, S., Guleria, K., & Sangamwar, A. T. (2023). Critical aspects involved in lipid dispersion and digestion: Emphasis on in vitro models and factors influencing lipolysis of oral lipid based formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, *321*, 103028. https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103028

Sobhani, H., Tarighi, P., Ostad, S. N., Shafaati, A., Nafissi-Varcheh, N., & Aboofazeli, R. (2018). Rapamycin-Loaded, Capryol TM 90 and Oleic Acid Mediated Nanoemulsions: Formulation Development, Characterization and Toxicity Assessment. In *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 17,(3).

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. In *Molecular Cancer* 14(1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5

Sun, X. K., Gong, Y., Shang, D. D., Liu, B. T., Du, Z. J., & Chen, G. J. (2022). Degradation of Alginate by a Newly Isolated Marine Bacterium Agarivorans sp. B2Z047. *Marine Drugs*, *20*(4). https://doi.org/10.3390/md20040254

Sung, H., Filho, A. M., Laversanne, M., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2026). Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 34 cancers in 186 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *76*(4). https://doi.org/10.3322/caac.70090

Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, 11(1), 164. https://doi.org/10.3390/nu11010164

Tsirigotis-Maniecka, M. (2020). Alginate-, Carboxymethyl Cellulose-, and κCarrageenan-Based Microparticles as Storage Vehicles for Cranberry Extract. *Molecules*, *25*(17). https://doi.org/10.3390/molecules25173998

Villarreal, O. S., Domínguez, A. I., Faustino-Vega, A., Quirino-Barreda, C. T., García-Gutiérrez, P., & Miranda-Calderón, J. E. (2022). Physicochemical

characterization and in vitro evaluation of selfemulsifying indomethacin release systems. *Revista Colombiana de Ciencias Quimico-Farmaceuticas(Colombia)*, *51*(1), 185–212. https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n1.95366

Waghela, B. N., Sharma, A., Dhumale, S., Pandey, S. M., & Pathak, C. (2015). Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells. *PLoS ONE*, *10*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117526

Wang, H., Wang, X., Xu, L., Zhang, J., & Cao, H. (2019). A molecular sub-cluster of colon cancer cells with low VDR expression is sensitive to chemotherapy, BRAF inhibitors and PI3K-mTOR inhibitors treatment. *Aging*, *11*(19), 8587–8603. https://doi.org/10.18632/aging.102349

Wongverawattanakul, C., Suklaew, P. O., Chusak, C., Adisakwattana, S., & Thilavech, T. (2022). Encapsulation of Mesona chinensis Benth Extract in Alginate Beads Enhances the Stability and Antioxidant Activity of Polyphenols under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Foods*, *11*(15). https://doi.org/10.3390/foods11152378

Xie, Q., Liu, Y., & Li, X. (2020). The interaction mechanism between autophagy and apoptosis in colon cancer. *Translational Oncology*, 13(12). https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100871

Xu, B., Li, S., Shi, R., & Liu, H. (2023). Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for biomedical applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01654-7

Xu, J., Meng, Q., Sun, H., Zhang, X., Yun, J., Li, B., Wu, S., Li, X., Yang, H., Zhu, H., Aschner, M., Relucenti, M., Familiari, G., & Chen, R. (2021). HER2-specific chimeric antigen receptor-T cells for targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *Cell Death and Disease*, *12*(12). https://doi.org/10.1038/s41419-021-04100-0

Yang, C. S., Lu, G., Ju, J., & Li, G. X. (2010). Inhibition of inflammation and carcinogenesis in the lung and colon by tocopherols. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1203*, 29–34. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05561.x

Yuval, J. B., Thompson, H. M., Verheij, F. S., Fiasconaro, M., Patil, S., Widmar, M., Wei, I. H., Pappou, E. P., Smith, J. J., Nash, G. M., Weiser, M. R., Paty, P. B., & Garcia-Aguilar, J. (2023). Comparison of Robotic, Laparoscopic, and Open Resections of Nonmetastatic Colon Cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, *66*(10), 1347–1358. https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000002637

Zhang, H., Cheng, J., & Ao, Q. (2021). Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Marine Drugs*, *19*(5). https://doi.org/10.3390/md19050264

Zhang, H., Li, Y., Xia, F., Sun, Y., Shen, L., Wan, J., Chen, Y., Wang, Y., Zhou, M., Wu, R., Zhou, S., Wang, Y., Liu, F., Cai, S., Zhang, Z., Zhang, Z., Liu, F., & Cai, S. (2024). Study protocol of short-course radiotherapy combined with CAPOX and PD-1 inhibitor for locally advanced colon cancer: a randomised, prospective, multicentre, phase II trial (TORCH-C). *BMJ Open*, *14*(2). https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-079442

Zhang, X., & Chen, L. (2016). The recent progress of the mechanism and regulation of tumor necrosis in colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *142*(2), 453–463. https://doi.org/10.1007/s00432-015-1997-z

Zhang, Y., Chen, G., Zhuang, X., & Guo, M. (2021). Inhibition of Growth of Colon Tumors and Proliferation of HT-29 Cells by Warburgia ugandensis Extract through Mediating G0/G1 Cell Cycle Arrest, Cell Apoptosis, and Intracellular ROS Generation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*. https://doi.org/10.1155/2021/8807676

Zhang, Y., Chen, S., Wei, C., Rankin, G. O., Ye, X., & Chen, Y. C. (2018). Flavonoids from Chinese bayberry leaves induced apoptosis and G1 cell cycle arrest via

Erk pathway in ovarian cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *147*, 218–226. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.084

Zhao, Q., Yang, L.-J., Zheng, Y.-B., & Gong, J.-H. (2022). Programmed Necrosis Inducers for Cancer Treatment. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*, *44*(2), 338–347. https://doi.org/10.3881/j.issn.1000-503X.13241

Zhou, H., Zhang, Y., Gan, C., Fan, X., Qi, Z., & Qi, S. (2023). Eriocitrin suppresses proliferation and migration of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells by promoting ROS production and activating the MAPK pathway. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, Journal of Southern Medical University*, *43*(3), 412–419. https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2023.03.11