



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación del efecto de la microencapsulación sobre la capacidad antitumoral de extractos vegetales de *Lepidium meyenii*, *Bactris gasipaes* y *Petiveria alliacea*

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTOR: Fabián Carlos Castillo Solís

TUTOR: Orestes Darío López Hernández, PhD

Ambato – Ecuador

Marzo - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 07 de febrero de 2023

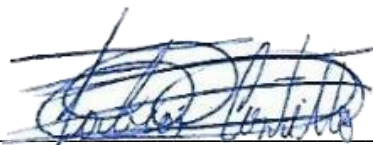
Ph.D. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Fabián Carlos Castillo Solís, manifiesto que los resultados obtenidos en el Informe Final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Fabián Carlos Castillo Solís

C.I. 180463483-8

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente

PhD. Mirari Yosune Arancibia Soria

C.I. 180214246-1

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

C.I. 180425690-5

M Sc. Danae Fernández Rivero


C.I. 175718120-9

Ambato, 06 de marzo de 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Fabián Carlos Castillo Solís', is written over a horizontal line.

Fabián Carlos Castillo Solís

C.I. 180463483-8

AUTOR

DEDICATORIA

*A Dios por brindarme salud,
vida y guiarme en los caminos
que me permitieron cumplir
este sueño.*

*A mi madre Cecilia Solís por
todo el amor y apoyo
brindado para cumplir esta
meta. Te amo.*

*A mí por todo el esfuerzo que
hice durante estos 5 años para
alcanzar esta meta*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rebeca González Pastor, por ser el eje fundamental en este proyecto, una excelente cotutora, mentora y fuente de inspiración en mí. Gracias por aceptarme como tesista y seguir conmigo frente a todas las dificultades que se pudieron presentar, por todos los conocimientos impartidos, por su infinita paciencia, por la dedicación en revisar mi trabajo, por ayudarme a ser más organizado, por sus consejos, por su confianza y por su tiempo. Sin duda son cosas que me servirán a lo largo de mi vida profesional y en cualquier lugar a donde me lleve la vida la recordaré con los gestos más lindos que hizo por mí. ¡Dios la bendiga!

A Cristina Rodríguez por su amistad, por inspirarme confianza, ayudarme con los ensayos antitumorales durante mis viajes, y por sus consejos de vida que seguro me servirán más adelante.

Al Dr. Orestes López por todo su tiempo invertido en el presente proyecto, por su paciencia y por guiarme de la mejor manera.

A la Dra. Linda Guamán por ser un modelo a seguir en el campo científico, por facilitarme los recursos y permitirme realizar mi proyecto de investigación en CENBIO.

A la vida por permitirme conocer a las personas que influyeron en mi amor por la ciencia.

A mi madre por su incansable lucha en brindarme todo lo que necesito para cumplir mis sueños y hacerme feliz.

A todas mis hermanas por el apoyo brindado, especialmente, a Mariuxi y Maritza por sus palabras de aliento, y a Cristina, que junto a mi cuñado Carlos permitieron que sea posible mi estadía en Quito.

A mi tía Flor y mi prima Doménica por la acogida en su hogar durante las primeras etapas de mi investigación.

A Juli, Oscar, Ari, Saskia, Joha, y Carlos por su amistad, por los conocimientos que me transmitieron y por sus anécdotas que fueron muy útiles durante las etapas más frustrantes de mi investigación.

A mis grandes amigos Jennifer, Alison y Ostz por compartir los mejores momentos durante mi etapa universitaria

*A mi amiga Gaby P. por ser tan cool y enseñarme cosas al principio de mi investigación.
(Somos 1) xD*

A amiga Anabell M. por responderme los miles de WhatsApp y ayudarme cuando le preguntaba algo xD

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Definición del cáncer	1
1.1.2. Incidencia del cáncer	1
1.1.2.3. En el mundo.....	1
1.1.2.4. En el Ecuador	2
1.1.3. Factores de riesgo asociados al cáncer	2
1.1.4. Importancias del estudio de las especies vegetales presentes en el Ecuador	
3	
1.1.4.1. Características y propiedades medicinales de <i>L. meyenii</i>	4
1.1.4.2. Características y propiedades medicinales de <i>B. gasipaes</i>	4
1.1.4.3. Características y propiedades medicinales de <i>P. alliacea</i>	5
1.1.5. Microencapsulación.....	5

1.1.5.1.	Secado por aspersión	6
1.1.5.2.	Polímeros utilizados en la microencapsulación.....	7
1.1.5.3.	Características de las microcápsulas y microesferas	9
1.1.6.	Análisis de la actividad citotóxica en líneas celulares de mamífero.....	10
1.1.6.1.	Ensayo de proliferación celular con MTT.....	10
1.1.6.2.	Ensayo de viabilidad celular con cristal violeta	11
1.2.	Objetivos	12
1.2.1.	Objetivo General.....	12
1.2.2.	Objetivos Específicos	12
CAPÍTULO II		13
METODOLOGÍA		13
2.2.	Metodología	16
2.2.1.	Metodologías de obtención de los extractos vegetales	16
2.2.2.	Eliminación del disolvente de los extractos vegetales.....	18
2.2.3.	Cuantificación de metabolitos presentes en los extractos.....	18
2.2.3.4.	Determinación de sólidos totales.....	20
2.2.4.	Microencapsulación de los extractos vegetales	20
2.2.4.1.	Microencapsulación de <i>B. gasipaes</i>	21
2.2.4.2.	Microencapsulación de <i>L. meyenii</i>	21
2.2.4.3.	Microencapsulación de <i>P. alliacea</i>	21
2.2.4.4.	Evaluación de la eficiencia de la microencapsulación por FT-IR....	22
2.2.5.	Evaluación antitumoral	22
2.2.5.1.	Procedimientos de descongelación de las células de mamífero	22
2.2.5.2.	Protocolo general de mantenimiento y pasaje de células de mamífero de flask a placas de 96 pocillos	23
2.2.5.4.	Ensayo para determinar la proliferación celular (MTT).....	26
2.2.5.5.	Ensayo para evaluar la viabilidad celular (cristal violeta).....	27

CAPÍTULO III.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
3.1. Obtención de los extractos vegetales	28
3.2. Microencapsulación de los extractos vegetales.....	31
3.3. Evaluación de la eficiencia de la microencapsulación por FT-IR.....	32
3.3.1. FT-IR en el microencapsulado de <i>L. meyenii</i>	33
3.3.2. FT-IR en el microencapsulado de <i>B. gasipaes</i>	35
3.3.3. FT-IR en el microencapsulado de <i>P. alliacea</i>	36
3.4. Evaluación antitumoral de los extractos vegetales mediante en ensayo de proliferación con MTT	37
3.5. Evaluación de los IC50 obtenidos en el ensayo de proliferación con MTT mediante cristal violeta.	45
CAPÍTULO IV.....	48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
4.1. Conclusiones.....	48
4.2. Recomendaciones	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las especies vegetales utilizadas	4
Tabla 2. Equipos de laboratorio	13
Tabla 3. Materiales de laboratorio.....	14
Tabla 4. Materiales e insumos de escritorio.....	15
Tabla 5. Reactivos de laboratorio.....	15
Tabla 6. Material vegetal.....	16
Tabla 7. Líneas celulares.....	16
Tabla 8. Resultados obtenidos del proceso de obtención de los extractos vegetales	28
Tabla 9. Resultados del proceso de microencapsulación de los extractos vegetales	31
Tabla 10. IC50 obtenidos en el ensayo de proliferación celular con MTT	40
Tabla 11. IC50 obtenidos en el ensayo de proliferación celular con MTT en función de los sólidos totales.....	41
Tabla 12. Índices terapéuticos (IT)	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la maltodextrina.....	8
Figura 2. Estructura molecular de la goma arábica	9
Figura 3. Estructura de las microcápsulas y microesferas	9
Figura 4. Mecanismo de acción del ensayo MTT.....	11
Figura 5. Ejemplo de un ensayo de viabilidad con cristal violeta.....	11
Figura 6. Cámara del hemocitómetro.....	24
Figura 7. Resultados obtenidos de la espectroscopia infrarroja en <i>L. meyenii</i>	33
Figura 8. Resultados obtenidos de la espectroscopia infrarroja en <i>B. gasipaes</i>	35
Figura 9. Resultados obtenidos de la espectroscopia infrarroja en <i>P. alliacea</i>	36
Figura 10. Gráficas del ensayo de proliferación celular con MTT	38
Figura 11. Gráficas de viabilidad celular por cristal violeta	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Distribución de extractos vegetales en placas de 96 del ensayo de MTT ..	62
Anexo 2. Distribución de extractos vegetales en placas de 96 del ensayo de MTT ..	62
Anexo 3. Espectroscopia FT-IR del extracto líquido de <i>L. meyenii</i>	63
Anexo 4. Espectroscopia FT-IR del microencapsulado de <i>L. meyenii</i>	63
Anexo 5. Espectroscopia FT-IR del extracto líquido de <i>B. gasipaes</i>	64
Anexo 6. Espectroscopia FT-IR del microencapsulado de <i>B. gasipaes</i>	64
Anexo 7. Espectroscopia FT-IR del extracto líquido de <i>P. alliacea</i>	65
Anexo 8. Espectroscopia FT-IR del microencapsulado de <i>P. alliacea</i>	65
Anexo 9. cantidad de sólidos totales y de maltodextrina presentes en las diluciones del microencapsulado de <i>L. meyenii</i> , utilizados en los ensayos de proliferación celular MTT	66
Anexo 10. cantidad de sólidos totales y de MIX presentes en las diluciones del microencapsulado de <i>B. gasipaes</i> en los ensayos de proliferación celular MTT.....	66
Anexo 11. cantidad de sólidos totales y de MIX presentes en las diluciones del microencapsulado de <i>P. alliacea</i> en los ensayos de proliferación celular MTT.....	67
Anexo 12. IC50 obtenidos del ensayo de proliferación celular MTT del Cisplatino (CDDP)	67
Anexo 13. IC20 obtenidos del ensayo de proliferación celular MTT en los polímeros encapsulantes.....	68
Anexo 14. Resultados obtenidos de la viabilidad celular por cristal violeta	68
Anexo 15. Curva Patrón con ácido gálico para la cuantificación de polifenoles en <i>P. alliacea</i>	69
Anexo 16. Absorbancias a 472 nm para la determinación de carotenoides.....	69
Anexo 17. Resultados obtenidos del análisis de alcaloides en <i>L. meyenii</i>	70
Anexo 18. Imágenes de microscopía a las concentraciones máximas evaluadas	71
Anexo 19. Recolección y lavado del material vegetal.....	71
Anexo 20. Secado del material vegetal.....	72
Anexo 21. Obtención de los extractos vegetales	72
Anexo 22. Retiro del material vegetal excedente mediante centrifugación y filtración	72
Anexo 23. Rotaevaporación de los extractos vegetales	73

Anexo 24. Cuantificación de sólidos totales y determinación de metabolitos	73
Anexo 25. Proceso de la microencapsulación mediante secado por aspersión.....	73
Anexo 26. Proceso de cultivo celular	74
Anexo 27. Adición de extractos vegetales y ensayos de proliferación y viabilidad..	74

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que amenaza la vida de la población actual y proyecta ser uno de los problemas de salud más graves en los próximos años. Motivo por el que es importante el estudio de las especies vegetales, a fin de descubrir nuevos principios activos que presenten actividad antitumoral. Además, de métodos que les atribuyan estabilidad frente a condiciones adversas y mejoren su actividad biológica. El presente proyecto tuvo como objetivo evaluar la influencia de la microencapsulación en la actividad antitumoral de extractos vegetales de *L. meyenii*, *B. gasipaes* y *P. alliacea*. Los extractos fueron obtenidos y microencapsulados para posteriormente ser evaluados en tres líneas tumorales y una línea no tumoral utilizando el ensayo de proliferación con MTT y el ensayo de viabilidad con cristal violeta. Los resultados del MTT demostraron que los microencapsulados requirieron mayor concentración de sólidos totales en comparación con los líquidos para inhibir el 50 por ciento de la proliferación celular. En los extractos líquidos y microencapsulados, *B. gasipaes* y *P. alliacea* fueron los más eficientes respectivamente. Sin embargo, considerando su influencia sobre las células normales mediante el índice terapéutico, resultaron ser más eficientes el extracto microencapsulado de *P. alliacea* frente a HT-29 y el extracto líquido de *L. meyenii* para inhibir todas las líneas tumorales. Estos resultados fueron contrastados con el cristal violeta y en algunos casos se obtuvieron los mismos resultados, y en otros se demostró que ciertos extractos solo inhibieron la proliferación, pero no causaron muerte celular.

Palabras clave: Cáncer, Microencapsulación, Extractos vegetales, MTT, Cristal violeta

ABSTRACT

Cancer is a life-threatening disease that currently affects the population and is projected to be one of the most serious health problems in the coming years. This is why the study of plant species is important in order to discover new active principles with antitumoral activity. In addition, methods that provide stability against adverse conditions and improve their biological activity are also important. The present project aimed to evaluate the influence of microencapsulation on the antitumoral activity of plant extracts from *L. meyenii*, *B. gasipaes* and *P. alliacea*. The extracts were obtained and microencapsulated, and then evaluated on three tumor lines and one non-tumor line using the MTT proliferation assay and the viability assay with crystal violet. The MTT results showed that the microencapsulated extracts required a higher concentration of total solids compared to the liquids to inhibit 50 percent of cell proliferation. Among the liquid and microencapsulated extracts, *B. gasipaes* and *P. alliacea* were the most efficient, respectively. However, considering their influence on normal cells through the therapeutic index, the microencapsulated extract of *P. alliacea* was more efficient against HT-29 and the liquid extract of *L. meyenii* was most effective in inhibiting all tumor lines. These results were contrasted with crystal violet and in some cases the same result was obtained, while in others it was demonstrated that certain extracts only inhibited proliferation but did not cause cell death.

Keywords: Cancer, Microencapsulation, Plant extracts, MTT, Crystal violet

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Definición del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la proliferación exagerada de células que han perdido su capacidad de morir al adquirir propiedades que las mantienen inmortalizadas. Desarrollando tumores y mecanismos que conducen a su diseminación por otros tejidos hasta afectar en sus funciones y repercutir sobre la vitalidad de la persona (**Organización Mundial de la Salud, 2022**).

1.1.2. Incidencia del cáncer

1.1.2.3. En el mundo

En la actualidad se estima que el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (**Instituto Nacional del Cáncer, 2020**). De acuerdo con la **OMS (2022)** en el año 2020, aproximadamente 9.9 millones de personas murieron a causa de este padecimiento, y surgieron 19.2 millones de enfermos en el mundo. En base a sus proyecciones, para el año 2040 el número de diagnósticos con cáncer alcanzará un estimado de 28.9 millones de casos, y el número de muertes llegará a 16.2 millones de personas. Siendo así que actualmente, los tipos de cáncer que presentan mayor incidencia a nivel mundial son el de mama, pulmón, colorrectal, piel y gástrico. Sin embargo, jerárquicamente los que presentan mayor mortalidad son el de pulmón, colorrectal, hepático, gástrico y de mama (**Sung et al., 2021**).

1.1.2.4. En el Ecuador

Una perspectiva en el Ecuador señala que durante el 2020 fallecieron 15.123 personas, se registraron 29.273 casos nuevos y 76.062 pacientes llevan luchando contra esta enfermedad durante los últimos cinco años. Reflejando así que el cáncer es un serio problema de salud para la población ecuatoriana (NCI, 2020). De los casos diagnosticados principalmente destacan su incidencia, el de mama, próstata, colorrectal, estómago y tiroides. Sin embargo, los más mortíferos en el país se son el de estómago, colorrectal, próstata y pulmón (Global Cancer Observatory, 2022).

1.1.3. Factores de riesgo asociados al cáncer

Las principales causas con las que se asocia esta enfermedad son la transmisión hereditaria, infecciones virales, condiciones ambientales como exposición a agentes químicos mutagénicos y radiación ionizante. Además, malos hábitos de vida como consumo excesivo de alcohol, tabaco, sobrepeso y baja ingesta de alimentos antioxidante. Factores que impiden la neutralización de las especies reactivas de oxígeno capaces de causar daños en el material genético (Valle et al., 2017).

American Cancer Society (2021) señala que, si bien el cáncer puede llegar a ser una enfermedad mortal, existen algunos casos que pueden ser curables y otros no, esto en función del tipo, la etapa en la que se encuentra y el tratamiento con el que se lo enfrenta. De manera que un diagnóstico oportuno permite acceder de manera temprana a tratamientos como la intervención quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, etc. (**Instituto Nacional del Cáncer, 2022**). Sin embargo, el problema radica en un diagnóstico oportuno de la enfermedad, ya que en algunos casos existe ausencia de síntomas durante las primeras fases y a veces hasta en la etapa terminal. Otro problema es que cuando ya se están administrando las terapias se producen efectos secundarios a causa de la citotoxicidad de sus componentes (**CDC, 2022**). Motivo por el que es importante la búsqueda de principios activos dirigidos a células tumorales sin que repercutan considerablemente en las células sanas.

1.1.4. Importancias del estudio de las especies vegetales presentes en el Ecuador

El Ecuador es uno de los países con mayor diversidad en el mundo, ya que cuenta con alrededor del 10% de las especies vegetales que existen en la tierra. Esto a causa de su variabilidad climática, que le permite una distribución de alrededor de 10 mil especies en la región norte de la Sierra, 8200 en la del Oriente y aproximadamente 250 especies introducidas y 600 nativas en las Islas Galápagos. Sin mencionar las 25 mil especies de árboles presentes en todo el Ecuador (**Velasteguí, 2018**).

Según la **Organización Mundial de la Salud (2022)** el 80% de la población mundial tiene aceptación por medicamentos basados en plantas medicinales. Motivo por el que es fundamental el estudio de estas especies en el Ecuador, a fin de descubrir nuevos principios activos que tengan funciones terapéuticas frente a enfermedades como el cáncer. Generando un punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos y terapias que reduzcan la incidencia de esta enfermedad. Es así que a lo largo de la historia el uso de extractos vegetales ha sido común en la medicina tradicional, ya que ha permitido obtener buenos resultados para resolver varias dolencias. Sin embargo, su aprovechamiento no siempre ha sido el más óptimo debido a las vías de administración y degradación de los metabolitos durante los procesos de extracción y fraccionamiento (**Schäfer et al., 2016**).

La utilización de extractos crudos en comparación con moléculas independientes ha presentado una gran ventaja, debido a que los extractos vegetales presentan muchos componentes bioactivos que pueden actuar de manera sinérgica sobre uno o diferentes targets contra una enfermedad (**Barba et al., 2022**). No obstante, para la evaluación de la actividad biológica de un extracto vegetal es necesario estudiar sus componentes juntos y fraccionados a fin de corroborar la influencia de cada metabolito, dado que en ocasiones también podría presentarse un efecto antagónico entre cada uno de sus componentes (**Pérez et al., 2017**). Es así, que para el presente proyecto de investigación se han seleccionado tres especies vegetales para ser estudiadas, mismas que se describen taxonómicamente en la **Tabla 1**.

Tabla 1.*Clasificación taxonómica de las especies vegetales utilizadas*

Nombre común	Maca	Chonta	Anamú
Dominio	Eucariota	Eucariota	Eucariota
Reino	Plantae	Plantae	Plantae
División	Tracheophyta	Tracheophyta	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Orden	Brassicales	Arecales	Caryophyllales
Familia	Brassicaceae	Arecáceae	Phytolaccaceae
Género	<i>Lepidium</i>	<i>Bactris</i>	<i>Petivería</i>
Especie	<i>meyenii</i>	<i>gasipaes</i>	<i>alliacea</i>

Fuente: (ITIS, 2022).**1.1.4.1. Características y propiedades medicinales de *L. meyenii***

L. meyenii, comúnmente conocida como maca, es una planta herbácea que ha sido cultivada por sus efectos medicinales durante 1300 – 2000 años en Perú, y en China desde el año 1900. A esta planta se le atribuye principalmente beneficios en la salud sexual y reproductiva por aumentar la producción y motilidad de los espermatozoides, incrementar el lívido, combatir la hiperplasia prostática benigna, reducir los síntomas de la menopausia, la ansiedad, el estrés y la fatiga (**Beharry & Heinrich, 2018**). Además, investigaciones recientes señalan que tiene un efecto antitumoral frente a las líneas celulares de cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama y leucemia (**Fu et al., 2021**).

1.1.4.2. Características y propiedades medicinales de *B. gasipaes*

B. gasipaes, también llamada chontaduro en el Ecuador, es una de las primeras palmeras que han sido domesticadas por los pueblos indígenas precolombinos, esto debido a que su fruto resulta ser comestible y su madera tiene una amplia variedad de

utilidades. Sus condiciones de cultivo están por debajo de los 800 msnm con una temperatura media anual mayor a 24 °C y una precipitación de 2000 a 5000 mm. Con respecto a su ubicación geográfica, se señala que se encuentra distribuida desde el suroeste y oeste de la Amazonia, pasando por la costa del Ecuador hasta el sur de Centroamérica (**Galluzzi et al., 2015**). En función a estudios preliminares, se ha determinado que esta especie vegetal tienen un bajo índice de sodio y azúcar, es rica en fibra, tiene grasas, 8 aminoácidos esenciales y altos niveles de betacarotenos. Motivo por el que se la considera como una planta que combate el estrés oxidativo y ayuda a prevenir las enfermedades asociadas a este, como el cáncer (**Martínez et al., 2017**).

1.1.4.3. Características y propiedades medicinales de *P. alliacea*

P. alliacea es un arbusto perenne originario de la Selva amazónica. Sin embargo, también se lo puede encontrar en otras regiones del mundo como en el Caribe, sureste de Estados Unidos, Centroamérica y algunas zonas tropicales (**Cal et al., 2022**). La literatura menciona que esta especie vegetal cuenta con propiedades diuréticas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antitumorales y tiene la capacidad de actuar como un analgésico frente a dolores de cabeza (**Fiorentino & Urueña, 2018**).

1.1.5. Microencapsulación

Los extractos vegetales son una mezcla compleja de sustancias bioactivas con efectos antimicrobianos, antioxidantes, antivirales, antitumorales, entre otros (**Rodríguez & López, 2021**). De manera que, muchos de sus constituyentes presentan desafíos de estabilidad con respecto al tiempo. Principalmente por las condiciones de almacenamiento ligadas a la temperatura, exposición al oxígeno ambiental, luz o simplemente interacción entre sí que produzcan cambios en el pH y repercutan sobre su actividad biológica (**Enaru et al., 2021**). Con base en esta premisa, se requiere métodos que brinden estabilidad fisicoquímica a aquellos metabolitos ante condiciones que los puedan afectar. Siendo la microencapsulación uno de los métodos de conservación más utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica de componentes activos (**Peanparkdee et al., 2016**). Mismo que se fundamenta en la

encapsulación de sustancias líquidas, sólidas y gaseosas usando una matriz polimérica que puede ser de origen natural o sintético (Sousa et al., 2022). Cualidades que impiden el daño por oxidación de los principios activos y facilitan la administración de productos alimenticios y farmacéuticos al enmascarar olores y sabores desagradables (López, 2010).

En la industria farmacéutica, la microencapsulación ha permitido elaborar medicamentos biocompatibles con liberación controlada sobre sitios específicos del organismo a fin de incrementar su efecto terapéutico (Long et al., 2015). Los procesos de microencapsulación se pueden ejecutar a través de principios fisicoquímicos, químicos y mecánicos. Técnicas como la coacervación, polimerización *in situ*, secado por pulverización, secado en frío, fluidos supercríticos, electropulverización coaxial y revestimiento de lecho fluidizado (Ozkan et al., 2019). De los que destaca el secado por aspersion, dado que es el más utilizado por ser rápido, económico, eficiente y escalable a nivel industrial (Rodríguez & López, 2021).

1.1.5.1. Secado por aspersion

Es un método que consiste en atomizar una solución, emulsión o una suspensión para someterla a una corriente de gas caliente (generalmente aire) a temperaturas de entrada de 100 – 200 °C, con el objetivo de eliminar el líquido de las gotas de manera radial a través del secado (Esquivel et al., 2015). Generando simultáneamente un recubrimiento esférico con un polímero a medida que desciende la temperatura entre 50-80 °C (Hernández et al., 2016). Permitiendo la generación de microcápsulas o microesferas de 20 µm - 200 µm de tamaño (López, 2010).

1.1.5.1.2. Ventajas de la microencapsulación mediante el secado por aspersión

- Altos niveles de rendimiento y eficiencia
- Producto en polvo fácil de manejar
- Resultados reproducibles
- Bajo costos de operación
- Permite la utilización de compuestos con diferente composición y polaridad
- Corto tiempo de operación
- Aplicabilidad industrial

(Calderón & Ponce, 2022).

1.1.5.1.3. Desventajas de la microencapsulación mediante el secado por aspersión

- No recomendado para partículas no uniformes
- Puede generar agregados

(Calderón & Ponce, 2022).

1.1.5.2. Polímeros utilizados en la microencapsulación

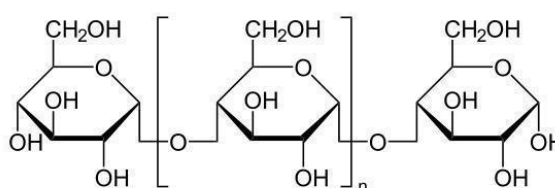
En el campo de la biomedicina, la microencapsulación suele realizarse con polímeros de origen natural o sintético. Con respecto a los naturales se dice que son susceptibles a sufrir variabilidad en su pureza al dejar residuos tóxicos utilizados durante su extracción, dentro de este grupo de polímeros se puede mencionar al alginato. En función a los sintéticos se puede decir que permiten controlar de mejor manera su funcionalidad, un claro ejemplo es el poli(etilenglicol) (PEG) mismo que es comúnmente utilizado en ensayos biológicos por su baja toxicidad y alta biocompatibilidad (Marikar et al., 2022). Existen muchos otros tipos de polímeros como el colágeno, gelatina, fibrina, poli acetato de vinilo, quitosano, hialuronato, etc. (Olabisi, 2015). Sin embargo, los que se usan en el presente proyecto de investigación son la maltodextrina y la goma arábica.

1.1.5.2.1. Maltodextrina:

Es un tipo de polímero perteneciente al grupo de oligosacáridos por poseer varias unidades de D-glucosa formada a partir de la hidrólisis del almidón, lo que la hace fácilmente digerible al emplearla como aditivo alimentario (*Figura 1*). Con respecto a sus propiedades se puede decir que es inolora, tiene baja higroscopicidad, es soluble en agua, no es tóxica y puede ser consumida (**Kowalska et al., 2022**).

Figura 1.

Estructura molecular de la maltodextrina



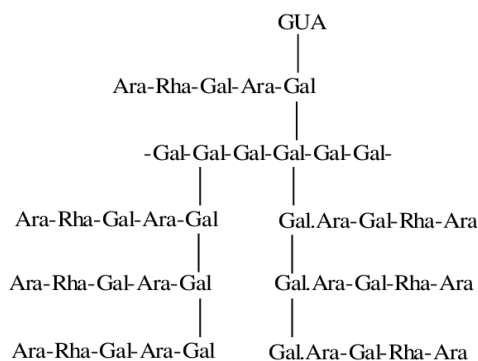
Fuente: Guntero et al. (2021).

1.1.5.2.2. Goma arábica:

Es un polímero natural obtenido a partir de especies vegetales del género *Acacia*, específicamente de *A. Senegal*, planta que crece en el continente africano. Las características más relevantes de este polímero son su baja viscosidad, propiedades emulsionantes y alta solubilidad en agua. Motivo por el que es usada directamente en ensayos biológicos (**Kowalska et al., 2022**). Con respecto a su estructura se puede decir que es altamente ramificada, ya que contiene D-galactosa (Gal), L-arabinosa (Ara), ácido D-glucurónico (GUA) y L-ramnosa (Rha) unidades D-galactopiranosas (*Figura 2*), lo que la hace estable en un amplio rango de pH (**Arteaga & Arteaga, 2016**).

Figura 2.

Estructura molecular de la goma arábica



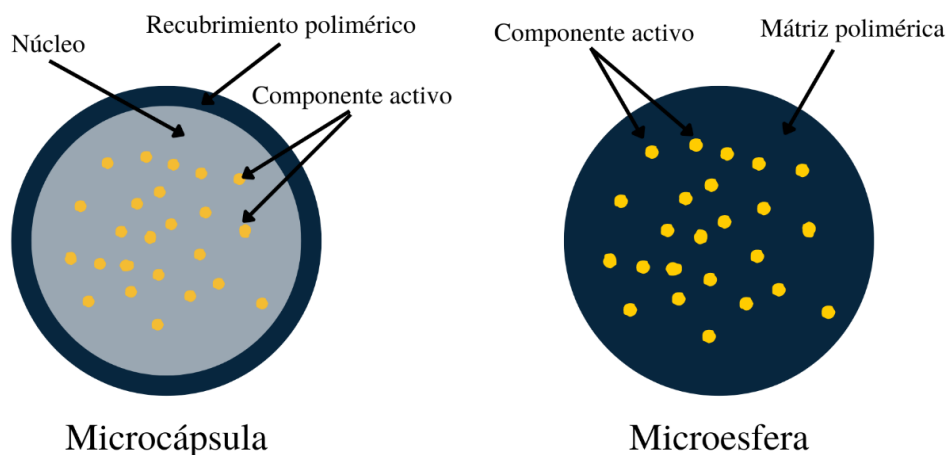
Fuente: Vicente (2018).

1.1.5.3. Características de las microcápsulas y microesferas

Las microcápsulas tienen una estructura constituida por un núcleo donde se encuentran partículas sólidas, líquidas o gaseosas recubiertas por una superficie externa de algún tipo de polímero. Por otro lado, las microesferas se caracterizan por poseer el agente activo de manera dispersa a través del polímero que conforma el sistema matricial (*Figura 3*) (Sousa et al., 2022).

Figura 3.

Estructura de las microcápsulas y microesferas



Adaptado de: Sousa et al. (2022).

1.1.6. Análisis de la actividad citotóxica en líneas celulares de mamífero

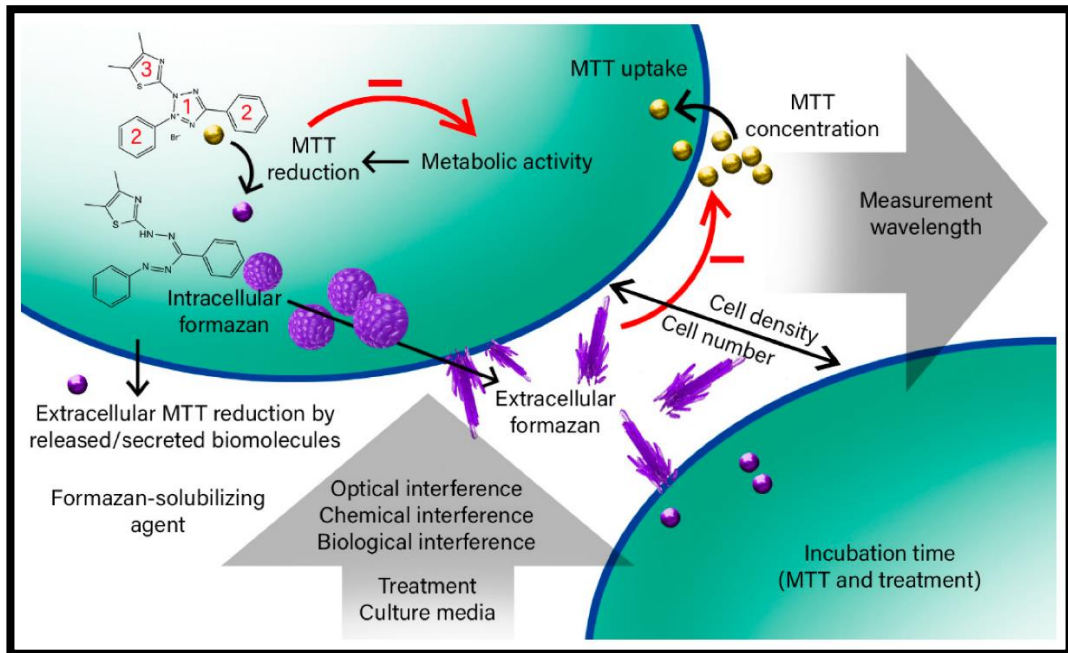
En la búsqueda de moléculas con actividad antitumoral es fundamental la realización de ensayos de citotoxicidad *in vitro*, ya que representan una alternativa rentable y reproducible en comparación con otros modelos de estudio, como en animales, donde se tiene dificultades con respecto a costos y limitaciones por la respuesta diferente de la fisiología entre las especies (**Ling et al., 2019**). Los estudios de citotoxicidad se fundamentan en una gran variedad de ensayos que se enfocan en determinar aspectos como la integridad de la membrana celular, fragmentación de ADN, actividad de las oxidoreductasas, caspasas y telomerasas, cuantificación de la población celular y determinación de los mecanismos de muerte (**Gordon et al., 2018**). De manera que para tener una mejor comprensión de los efectos citotóxicos se recomienda realizar varios de estos ensayos paralelamente (**Barba et al., 2022**).

1.1.6.1. Ensayo de proliferación celular con MTT

El ensayo de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio (MTT), es uno de los más aceptados en las pruebas de citotoxicidad (**Van Tonder et al., 2015**). El mecanismo consiste en que el reactivo de MTT atraviesa la membrana celular y mitocondrial gracias a sus propiedades lipofílicas y a la carga positiva presente en el anillo de tetrazol cuaternario que contiene su estructura. Una vez en el interior del organelo, el reactivo se reduce por acción de las oxidoreductasas, deshidrogenasas y donantes de electrones como el NADPH, produciendo una molécula insoluble de color azul denominada formazán (**Figura 4**), misma que al encontrarse en forma de cristal se disuelve en un solvente orgánico para ser leída a 570 nm. Obteniendo un resultado directamente proporcional a la actividad metabólica de la célula (**Ghasemi et al., 2021**).

Figura 4.

Mecanismo de acción del ensayo MTT



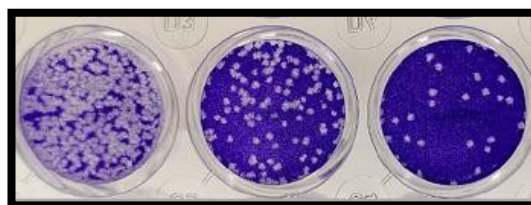
Fuente: Ghasemi et al. (2021).

1.1.6.2. Ensayo de viabilidad celular con cristal violeta

Es un método que se fundamenta en la capacidad de las células vivas en mantenerse adheridas a la superficie de cultivo. Característica que se aprovecha para retirar las células muertas mediante absorción y dejar únicamente las células viables para ser teñidas con el reactivo de cristal violeta. Mismo que presenta afinidad por el material genético y permite la estimación de células viables. (*Figura 5*) (Gajski et al., 2016).

Figura 5.

Ejemplo de un ensayo de viabilidad con cristal violeta



Fuente: Díaz et al. (2020).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la microencapsulación sobre la capacidad antitumoral de extractos vegetales de *L. meyenii*, *B. gasipaes* y *P. alliacea*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obtener los extractos líquidos de *L. meyenii*, *B. gasipaes* y *P. alliacea*.
- Microencapsular mediante secado por aspersion los extractos obtenidos, empleando maltodextrina y goma arábica como agentes encapsulantes.
- Estudiar la actividad antitumoral de los extractos líquidos y microencapsulados sobre las líneas celulares a través del ensayo MTT y de viabilidad celular por Cristal Violeta.

1.3. Hipótesis

Las hipótesis de esta investigación son:

- **Hipótesis nula**

La microencapsulación de los extractos vegetales no representa una ventaja sobre su capacidad antitumoral para la eliminación de células tumorales.

- **Hipótesis alternativa**

La microencapsulación de los extractos vegetales representa una ventaja sobre su capacidad antitumoral para la eliminación de células tumorales.

1.4. Variables

Como **variable dependiente** se tiene la proliferación y viabilidad de las células SK-MEL-103, MDA-MB-231, HT-29 y NIH3T3, después de ser sometidas a los extractos. Por otro lado, como **variables independientes** se tiene las concentraciones y presentaciones del extracto (microencapsulado o líquido). Además, los tipos de especies vegetales utilizadas.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales y recursos

Tabla 2.

Equipos de laboratorio

Equipos	Cantidad
Cabina de flujo laminar ESCO	1
Centrífuga HERMLE	1
Equipo de Baño María Tecnoescala	1
Espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific	1
Espectroscopio infrarrojo TF Perkin Elmer	1
Homogeneizador de alta velocidad IKA	1
Incubadora de CO ₂ ESCO	1
Microscopio Euromex	1
Mini spray dryer Bunchi – B295	1
Molino de piedras	1
Plancha de calentamiento VWR	1
Refrigerador Indurama	1
Secador de bandeja Smartheat Technology	1
Sistema de detección multimodo Cytation5 BioTek	1
Tanque criogénico Thermo	1
Rotavapor IKA	1
Balanza analítica Ohaus	1
Balanza de humedad KERN	1

Tabla 3.*Materiales de laboratorio*

Materiales	Cantidad
Celda de cuarzo	1
Cubreobjetos	2
Embudo (8,3 cm)	1
Espátula	2
Flasks T75 Thermo scientific	32
Frasco ámbar (1000 mL)	6
Fundas zipper ziploc	6
Hemocitómetro Marienfeld	1
Membrana filtrante de 0,22 μm Whatman	3 rollos
Micropipeta (10-100) μL	1
Micropipeta (100-1000) μL	1
Papel filtró Whatman	1 rollo
Pipetas Serológicas (10 mL) Eppendorf	4
Pipetas Serológicas (5 mL) Eppendorf	100 unidades
Placa de 96 pocillos Thermo Scientific TM	48
Placas de 48 pocillos Thermo Scientific TM	10
Probeta (100 mL)	4
Puntas de micropipeta 100 μl Thermo	1000 unidades
Puntas de micropipeta 200 μL Thermo	1000 unidades
Recipiente plástico	2
Tubos de centrifuga de 15 mL Falcon	6
Vaso de precipitación (600 mL)	3
Vasos de precipitación (100 mL)	3
Viales de criopreservación (5 mL) Fisher Scientific	20

Tabla 4.*Materiales e insumos de escritorio*

Materiales	Cantidad
Calculadora	1
Cofia	Caja x 100 unidades
Cuaderno de laboratorio	1
Gafas de seguridad	1
Guantes de nitrilo	1 cajas x 50 pares
Lápiz	1
Mandil de laboratorio	1
Mascarillas	2 cajas x 100 unidades
Papel teresita	1 rollo

Tabla 5.*Reactivos de laboratorio*

Reactivos	Cantidad
Agua destilada	3 L
Maltodextrina	700 g
Goma arábica	700 g
Etanol (70%)	4 L
Etanol (96%)	1 L
DMEM/F-12 (Corning)	1000 mL
Suero Fetal Bovino (FBS)	25 mL
Penicilina / Estreptomicina	50 mL
Nitrógeno líquido	5 L
Tampón fosfato salino (PBS)	50 mL
Dimetilsulfóxido (DMSO)	50 mL
Azul de tripán	10 mL
Tripsina	10 mL
Bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo	25 mL
Cristal violeta	25 mL

Reactivos	Cantidad
Paraformaldehído	25 mL

Tabla 6.

Material vegetal

Material Vegetal	Cantidad
Bayas de Chonta (<i>B. gasipaes</i>)	3 kg
Harina de maca (<i>L. meyenii</i>)	3 kg
Hojas de Anamú (<i>P. alliacea</i>)	3 kg

Tabla 7.

Líneas celulares

Material Celular	Cantidad
HT-29 (carcinoma colorrectal humano) ATCC	1 línea
SK-MEL-103 (melanoma humano) ATCC	1 línea
MDA-MB-231 (carcinoma de mama humano) ATCC	1 línea
NIH3T3 (fibroblastos de embriones de ratón NIH suizo) ATCC	1 línea

2.2. Metodología

2.2.1. Metodologías de obtención de los extractos vegetales

2.2.1.1. Maca: *L. meyenii*

En un vaso de precipitación de 600 mL, se colocó una proporción 1:10 de harina de maca (*L. meyenii*) - etanol al 70%. Se llevó a la plancha de calentamiento (VWR) a una temperatura de 50 °C con agitación máxima de 1150 rpm, durante 30 minutos. La temperatura fue constante y el tiempo transcurrido inicio desde que el material

vegetal entro en contacto con el disolvente (solvente). Este proceso se realizó 4 veces para obtener la suficiente cantidad de extracto. Los extractos fueron filtrados, en primera instancia con un lienzo y luego con un matraz kitosato y papel filtro de 0,22 μm (Whatman) dentro de un embudo Butchner. Se almacenó el extracto en un recipiente ámbar de 500 mL a fin de protegerlo de la luz y se llevó a refrigeración (Sevilla, 2017).

2.2.1.2. Chonta: *B. gasipaes*

Las bayas de *B. gasipaes* se lavaron con abundante agua y después se cortaron en trozos para extraer las semillas y desecharlas. Los trozos se colocaron en un secador de bandeja (Smartheat Technology) a 60 °C, durante un tiempo de 72 horas. Cuando el material vegetal estuvo completamente seco se lo molió en un molino de piedra (INOX-EQUIP) a fin de obtener un polvo fino. Consecutivamente, el polvo se almacenó en fundas ziploc en un sitio fresco y seco (Calle, 2020).

En un vaso de precipitado de 600 mL se adicionó el polvo obtenido y etanol al 96% en una proporción 1:70. Después, se realizó un tratamiento térmico a 70 °C durante 60 minutos y con agitación magnética de 200 rpm en una plancha de calentamiento (VWR). El material vegetal se dejó enfriar para centrifugarlo a 3000 rpm durante 10 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y se desechó el material vegetal precipitado. Finalmente, el extracto obtenido (sobrenadante) se almacenó en un frasco ámbar en refrigeración (Calle, 2020). Este proceso se realizó hasta utilizar un aproximado de 224,57 g de material vegetal.

2.2.1.3. Anamú: *P. alliacea*

Se realizaron algunas modificaciones a la metodología propuesta por Camacho (2014). De manera que, el material vegetal de esta especie fue lavado con abundante agua y posteriormente secado a 60 °C durante 72 horas. Se pulverizó en un molino de piedras a fin de obtener un polvo. Se mezcló en una proporción 1:10 del material vegetal molido y etanol al 70 % respectivamente en un vaso de precipitado de 1000 mL. Después se llevó a agitación a 200 rpm durante 1 hora a 35 °C. La mezcla se

filtró en un matraz kitosato con la ayuda de un embudo Butchner y una membrana de 0,22 μm (Whatman). Finalmente, se almacenó en botellas ámbar para ser refrigerado en un lugar donde no entre en contacto con la luz. El proceso de extracción se repitió hasta utilizar un total de 400 g de material vegetal.

2.2.2. Eliminación del disolvente de los extractos vegetales

Todos los extractos vegetales fueron sometidos a rotaevaporación, con la finalidad de eliminar el etanol utilizado durante el proceso de extracción. Las condiciones óptimas en esta etapa para *B. gasipaes* fueron de 68 °C de temperatura y 220 rpm. Para *L. meyenii* fueron de 68°C y 230 rpm, y para *P. alliacea* de 35°C y 210 rpm. El proceso terminó cuando la columna de condensación detuvo el descenso de etanol.

2.2.3. Cuantificación de metabolitos presentes en los extractos

Para constatar la presencia de metabolitos en los extractos se determinó moléculas de referencias contenidas en los mismos, considerando su participación antitumoral directa o indirectamente, y que el método de análisis sea rápido y económico.

2.2.3.1. Alcaloides en *L meyenii*

Para *L. meyenii* se cuantificó alcaloides debido a que señala que estos tienen actividad biológica contra el cáncer y por eso son utilizados comúnmente en la síntesis de fármacos inhibidores de mitosis y de topoisomerasas (**American Cancer Society, 2019**). Se preparó una solución de ácido cítrico al 0,2 M, una solución buffer de fosfato y una solución de verde bromocresol. Posteriormente, se preparó una solución estándar de cocaína de 1000 ppm (teórica). Luego, se preparó cuatro soluciones a concentraciones de 80,80 ppm, 40,40 ppm, 20,20 ppm y 10,10 ppm en tubos de ensayo de 50 mL a partir de la solución estándar experimental de cocaína previamente elaborada (**Ajanal et al., 2012**).

En la siguiente etapa se añadió 5 g de extracto de *L. meyenii* junto a 5 mL de solución buffer de fosfato, 5 mL de solución de ácido cítrico (2M), 5 mL de solución bromocresol y 10 mL de cloroformo, se mezcló bien. Después se realizó el mismo proceso para las soluciones de la curva patrón en vez del extracto. Se dejó reposar hasta que se formaron dos fases. Se tomó una alícuota de la fase inferior para realizar una lectura en el espectrofotómetro UV-VIS (Fisher Scientific) a 470 nm. Se hizo una lectura de una alícuota de cloroformo como blanco a 470 nm y se graficó la curva en Excel y los cálculos de la concentración de alcaloides en la muestra (Ajanal et al., 2012).

2.2.3.2. Carotenoides en *B. gasipaes*

En *B. gasipaes* se determinó la presencia de carotenoides mediante el espectrofotómetro UV-VIS (Fisher Scientific) a 472 nm. En donde se colocó una celda etanol al 96% como blanco y en otra celda la muestra de extracto diluida a 10^4 en etanol (96%), se hizo una diferencia de las absorbancias para eliminar el ruido y finalmente se calculó utilizando la ecuación 1 (Strati & Oreopoulou, 2011).

$$C = \frac{A * 10^4}{E}$$

Ecuación 1. Cálculo de la concentración a partir de la absorbancia.

Donde:

A: Absorbancia del extracto a 472 nm

E: Coeficiente de absortividad de los carotenoides ($3950 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)

C: concentración en mg/L

2.2.3.3. Polifenoles en *P. alliacea*

Se utilizó el ensayo colorimétrico de Folin & Ciocalteu. Se preparó una solución de Na_2CO_3 (7%) y una solución stock de ácido gálico (1mg/mL). Se preparó la curva patrón haciendo diluciones de 10 ppm, 25 ppm, 50 pmm, 100 ppm, 150 ppm y 200 ppm de ácido gálico. Posteriormente, en una placa de 96 se colocó en el primer

pocillo de 10 uL de agua destilada y en los seis pocillos siguientes 10 µL de cada dilución respectivamente y en el resto de los pocillos se colocó 10 uL de diluciones del extracto a 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 . En todos los pocillos ya utilizados se completó con 130 µL de agua destilada y seguidamente con 10 µL del reactivo de Folin & Ciocalteu. Se cubrió con papel aluminio durante 6 minutos y se añadió 100 µL de Na_2CO_3 (7%). Se incubó durante 130 minutos y se leyó a 750 nm en el espectrofotómetro UV-VIS (Fisher Scientific). Los resultados se calcularon en Excel, dando una respuesta en ppm de equivalente a ácido gálico (**Baek et al., 2021**).

2.2.3.4. Determinación de sólidos totales

Se añadió 3 mL de cada uno de los extractos concentrados en la balanza de humedad y posteriormente se dejó secar a una temperatura de 120 °C hasta que el equipo indicó la eliminación completa del componente líquido. El cálculo se realizó con la siguiente ecuación.

$$\% ST = 100 - \% \text{ humedad}$$

Ecuación 2. Sólidos totales.

2.2.4. Microencapsulación de los extractos vegetales

Cada uno de los extractos se microencapsuló en función a metodologías aplicadas en anteriores proyectos de investigación realizados por **Calle (2020)** y **Sevilla (2017)**. Esto con la finalidad de obtener resultados similares y economizar el tiempo de análisis de los tipos de polímeros que se podrían utilizar. De manera que en la microencapsulación *B. gasipaes* y *P. alliacea* se utilizó una mezcla polimérica de goma arábiga y maltodextrina, y para *L. meyenii* se utilizó únicamente maltodextrina.

2.2.4.1. Microencapsulación de *B. gasipaes*

Para microencapsular el extracto obtenido de *B. gasipaes*, se preparó una emulsión de extracto, maltodextrina, y goma arábica en proporción 1:1:1, esto a través de un homogeneizador de alta velocidad a 2000 rpm durante un tiempo de 10 minutos con la finalidad de obtener una emulsión de alto grado de dispersión. Luego, la emulsión fue sometida a un secado por aspersion mediante un mini spray dryer (Bunchi – B295). En donde el contenido ingreso manualmente a través de una manguera de alimentación. Una vez en su interior se sometió a las siguientes condiciones previamente configuradas en el equipo.

- Temperatura de entrada: 150 °C
- Temperatura de salida: 90 °C
- Flujo de aire de secado: 100%
- Flujo de aire de atomización 500 L/h

Finalmente, el polvo obtenido se almacenó en una funda zipper, evitando el ingreso de humedad (Calle, 2020).

2.2.4.2. Microencapsulación de *L. meyenii*

El extracto obtenido se mezcló en una plancha de calentamiento a 50 °C con maltodextrina, en una proporción 7:3 respectivamente. Luego, se llevó hasta el spray dryer (Bunchi – B295) en donde se programó los siguientes parámetros.

- Temperatura de entrada: 150 °C
- Temperatura de salida: 80 °C

Cuando termino el proceso de secado, se recolectó las partículas y fueron almacenadas en fundas ziploc (Sevilla, 2017).

2.2.4.3. Microencapsulación de *P. alliacea*

El extracto de *P. alliacea*, se mezcló en un homogeneizador de alta velocidad en una proporción de sólidos totales, maltodextrina y goma arábica de 20:40:40 respectivamente. La mezcla se llevó al alimentador del Spray dryer para ser microencapsulada con una temperatura de entrada de 150 °C y 80 °C de salida.

2.2.4.4. Evaluación de la eficiencia de la microencapsulación por FT-IR

Se añadió una pequeña cantidad de cada uno de los extractos microencapsulados en el espectroscopio infrarrojo a fin de comenzar las lecturas, mismas que se desarrollaron a un rango de longitud de onda de 500 - 4000 nm. Proceso que se repitió con los extractos líquidos a fin de superponer las gráficas para interpretar más fácilmente los resultados obtenidos.

2.2.5. Evaluación antitumoral

El estudio de la actividad antitumoral se ejecutó mediante el ensayo de proliferación con MTT y de viabilidad con cristal violeta. El ensayo MTT permitió determinar la capacidad de proliferación celular y el ensayo de cristal violeta permitió analizar la viabilidad celular. Esto a fin de contrastar los resultados, ya que pueden existir compuestos activos que, a pesar de que inhiban los procesos de proliferación, no induzcan muerte. Además, se destaca la utilización de 3 líneas celulares cancerígenas (MDA-MB-231, HT-29, SK-MEL-103) y un control (NIH3T3) perteneciente a un fibroblasto de ratón suizo.

2.2.5.1. Procedimientos de descongelación de las células de mamífero

El primer día de evaluación antitumoral consistió en descongelar las líneas celulares mencionadas en el proyecto. El primer paso fue precalentar el medio completo (Medio DMEM Eagle modificado por Dulbecco con nutrientes F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1 % de penicilina/estreptomicina-Corning) a 37 °C en un equipo de baño maría (Tecnoescala). Se extrajeron del tanque de almacenamiento (Thermo) los viales que contenían las líneas celulares de interés. Se sumergieron de manera parcial en baño maría (Tecnoescala) y fueron descongelados a 37 °C. Posteriormente, se resuspendió todo el contenido de cada una en tubos de centrífuga de 15 mL con PBS. Luego, el contenido se centrifugó durante 5 minutos y 1400 rpm, esto con el fin de posteriormente eliminar el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.

El sedimento celular se resuspendió mediante la adición de 5 mL de medio inicialmente precalentado. Se recolectó una pequeña cantidad de muestra para determinar la viabilidad de las células, este procedimiento se realizó a través de la coloración con azul de tripán que se detalla en el punto 2.2.5.2.1. Se añadió 6 mL de medio en los flasks y sobre este se cultivó 5 mL de las suspensiones celulares. Se colocaron los recipientes de cultivo en el incubador a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas para que las células se adhirieran al fondo del recipiente, pero antes se hizo ligeros movimientos en cruz a fin de permitir una distribución homogénea de las células por toda la superficie.

2.2.5.2. Protocolo general de mantenimiento y pasaje de células de mamífero de flask a placas de 96 pocillos

Después de 72 horas los recipientes cultivados en el incubador fueron obtenidos para determinar de manera visual y microscópica si existió algún tipo de contaminación o un exceso de células muertas. Una vez que se verificó que todos los cultivos estuvieran bien, se les retiró el medio consumido. Se añadió 5 mL de PBS con la finalidad de lavarlas para retirar las células muertas o los precipitados del medio. Se retiró el PBS y se añadió 3 mL de tripsina. Se incubó a 37 °C durante 5 minutos y se realizó movimientos ligeros facilitando la separación. Luego, la tripsina fue inhibida mediante la adición de 6 mL de medio completo. Se transfirió el contenido de los flasks a tubos de 15 mL. Los tubos se sometieron a centrifugación durante 5 minutos a 1400 rpm. Se les retiró el sobrenadante y se resuspendió cada uno con 4 o 5 mL. Se realizó el recuento de células viables a través de la observación en el hemocitómetro con el azul de tripán de una pequeña alícuota extraída de la solución celular presente en cada tubo.

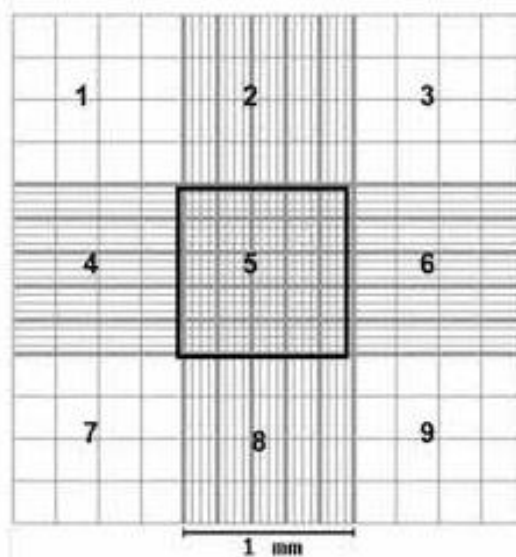
2.2.5.2.1. Recuento celular en el hemocitómetro

El primer paso fue extraer 100 μL de suspensión celular y colocarlos en tubos de microcentrífuga, después se añadió 10 μL de azul de tripán y se mezcló correctamente. Luego, se colocó la solución celular preparada en la parte interna del cubreobjetos. Se llevó hasta el microscopio y se observó haciendo un conteo de las células viables en los cuadrados 1,3,7 y 9 (*Figura 6*).

- Células viables: Sin color.
- Células inviables: Color azul.

Figura 6.

Cámara del hemocitómetro



Finalmente, se determinó la densidad celular aplicando la ecuación 3

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \text{promedio del \# de células por cuadro} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

Ecuación 3. Cálculo de la concentración de células por cada mL.

En base a las concentraciones celulares que se determinaron de cada línea celular, se realizaron cálculos a fin de establecer la cantidad de medio y de suspensión celular necesaria para preparar soluciones de 1×10^5 células/mL. Debido a que esta concentración fue posible el cultivo de 1×10^4 células/pocillo al añadir 100 μ L de esta en cada uno de los pocillos de 96. El cálculo se realizó mediante la siguiente ecuación.

$$C1V1 = C2V2$$

Ecuación 4. Volumen necesario de extracto

C1: concentración celular de la suspensión evaluada en el hemocitómetro

V1: Volumen necesario de suspensión celular

C2: 1×10^5 células/mL

V2: Volumen final necesario (4 placas x 5 réplicas x 100 μ L x 2) = 4 mL

Posteriormente, se calculó la cantidad de medio para llegar a la concentración requerida mediante la siguiente ecuación 5.

$$V_{DMEM} = V2 - V1$$

Ecuación 5. Volumen necesario de medio DMEM

Haciendo uso de una micropipeta multicanal se recolectó 100 μ L de suspensión celular en las 8 puntas simultáneamente y se transfirió el volumen en cada uno de los pocillos de las placas correspondientes a la línea celular. Este proceso se lo realizó rápidamente y cada cierto tiempo con movimientos de los reservorios a fin de impedir la precipitación de las células y evitar que afecte a la homogeneidad de sus suspensión. La suspensión celular sobrante en los tubos de 15 mL de cada línea celular se recolectó aproximadamente 500 μ L o 750 μ L y se los añadió sobre 10 mL de medio presentes en nuevos flask para llevarlos a la incubadora y utilizarlos en los próximos ensayos.

2.2.5.3. Adición de los extractos sobre las líneas celulares

Se realizaron cálculos del volumen necesario de cada uno de los stocks de los extractos líquidos y microencapsulados, y también la cantidad de medio necesario para complementar las soluciones y obtener concentraciones óptimas para la evaluación antitumoral. De manera que para los extractos líquidos 5 mg/mL fue lo más concentrado, para los microencapsulados 71,5 mg/mL y para los controles de (maltodextrina y mezcla maltodextrina + goma arábica) fue de 50 mg/mL. Luego de 24 horas de cultivo de las placas, se retiró el medio de cada uno de los pocillos y se añadió los extractos en solución con el DMEM previamente preparadas de menor (control, solo medio DMEM) a mayor concentración, siguiendo el orden que se aprecia en el *anexo 1 y 2*. Finalmente, se llevó a cultivo durante 72 horas a 37 °C, y con una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

2.2.5.4. Ensayo para determinar la proliferación celular (MTT)

Transcurridas las 72 horas, se utilizó el ensayo de colorante MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) siguiendo el protocolo que indica el proveedor. Se añadió, 10 µL de MTT (Stock = 5mg/mL) en cada pocillo (Sin retirar el medio de cultivo) y se incubó a 37 °C durante 1-2 horas, pasado este tiempo se retiró el medio y se adicionó 50 µL de DMSO en cada pocillo, proceso algo similar a como lo explica **Rivas et al., (2016)**. Luego, se agitó durante 5 minutos a fin de solubilizar los cristales de formazán para finalmente medir la absorbancia en un sistema de detección multimodo Cytation5 (BioTek) a 570 nm (**Ghasemi et al., 2021**).

Con los datos obtenidos se realizó el cálculo del IC₅₀ (concentración mínima de extracto que se necesita para inhibir el 50% de la proliferación celular). Así mismo se generaron curvas de dosis-respuesta en Prism (GraphPad) utilizando células no tratadas como control de proliferación celular al 100%. Los índices terapéuticos (TI) se calcularon como la inhibición diferencial de la proliferación entre las células no tumorales y las células tumorales, utilizando la ecuación 6.

$$TI = \frac{IC_{50} \text{ de células no tumorales}}{IC_{50} \text{ de células tumorales}}$$

Ecuación 6. Cálculo de los Índices Terapéuticos

2.2.5.5. Ensayo para evaluar la viabilidad celular (cristal violeta)

Se sembraron las células en placas de 48 pocillos y se incubaron con las concentraciones correspondientes a los IC_{50} de cada compuesto obtenido en el ensayo anterior. Después de la incubación con los compuestos de prueba, las células se lavaron con PBS y fueron fijadas en una placa mediante la adición de paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el paraformaldehído, se lavó con PBS y tñó con cristal violeta durante 30 minutos. Finalmente, se escanearon y cuantificaron las absorbancias mediante un sistema de detección multimodo Cytation (BioTek) a 570 nm. Se debe mencionar que las células no tratadas se utilizaron como control de viabilidad celular al 100% (**Geserick et al., 2009**).

2.2.6. Análisis de datos

Los resultados obtenidos de la proliferación celular en la evaluación antitumoral se registraron en una tabla de Excel para calcular las medias en función a las réplicas de cada uno de los experimentos. Los valores de las medias se transfirieron al programa Prism (GraphPad), en donde los datos se transformaron a escala logarítmica. Posteriormente, se generaron las gráficas de IC_{50} . Una vez obtenidas las gráficas, se compararon con los resultados del IC_{50} , entre los resultados de las presentaciones líquidas y microencapsuladas de un mismo tipo de planta. Luego, se compararon en función del tipo de cada línea celular, a fin de esperar que su efecto no sea muy agresivo en la línea no cancerígena NIH3T3 y finalmente se comparó el efecto de manera general entre las especies vegetales.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de los extractos vegetales

En función a los parámetros expuestos en la **Tabla 8**, se puede decir que los 5 primeros representan las condiciones empleadas en cada uno de los procesos de obtención de los extractos, mientras que los 6 últimos corresponden a los resultados obtenidos para cada especie vegetal.

Tabla 8.

Resultados obtenidos del proceso de obtención de los extractos vegetales

Parámetros	Extractos		
Especie vegetal	<i>L. meyenii</i>	<i>B. gasipaes</i>	<i>P. alliacea</i>
Tiempo de extracción (min)	30	60	30
Temperatura de extracción (°C)	50	70	35
Relación MV:D	1:10	1:70	1:10
Disolvente	Etanol 70%	Etanol 96%	Etanol 70%
Volumen de extracto obtenido (mL)	144	45	250
Metabolito de referencia	Alcaloides	Carotenoides	Polifenoles
Concentración de metabolitos (mg/mL)	0,090 ¹	$1,07 \times 10^{-3} \pm 1,07 \times 10^{-42}$	$7,92 \pm 0,96^3$
% Humedad	$57,86 \pm 0,26$	$27,82 \pm 0,13$	$84,82 \pm 0,24$
Sólidos totales (mg/mL)	$421,4 \pm 2,65$	$721,8 \pm 1,3$	$151,8 \pm 2,42$
% Rendimiento ⁴	$39,92 \pm 0,25$	$14,46 \pm 0,02$	$9,48 \pm 0,15$

¹La concentración carece de desviación estándar, dado que se realizó un único análisis con 25 mL de extracto a causa de la baja cantidad que se obtuvo. Se destaca que el resultado fue representativo y que el laboratorio donde se realizó las mediciones posee acreditación ISO/IEC 17025:2006.

²La concentración está expresada en mg-eq de licopeno /mL.

³La concentración está expresada en mg-eq de ácido gálico (GAE) /mL.

⁴Rendimiento de sólidos totales obtenidos en función de la cantidad de material vegetal utilizado.

MV: Material vegetal; D : Disolvente (Solvente)

A partir del porcentaje de humedad fue posible calcular la cantidad de sólidos totales y el rendimiento de extracción mediante una relación con la cantidad de material

vegetal utilizado en cada uno de los procesos de extracción. Como se puede apreciar en la **Tabla 8**, *B. gasipaes* presentó el menor porcentaje de humedad, pero la cantidad de sólidos totales obtenidos fue mayor; por otro lado, *P. alliacea* presentó el mayor porcentaje de humedad, pero la cantidad de sólidos totales obtenidos fue menor. Por último, *L. meyenii* presentó el proceso de extracción con mayor rendimiento.

Dado que existen múltiples factores ligados a la concentración de metabolitos y sólidos totales presentes en un extracto vegetal, los resultados obtenidos pueden ser muy diversos en comparación con la literatura. De acuerdo con **Elgersma & Søgaard (2018)** existen diferencias significativas entre diferentes especies, incluso iguales cultivadas en un ambiente cercano (**Koutsoukis et al., 2019**). Esto podría ser una de las causas de haber obtenido una concentración de alcaloides en *L. meyenii* de 85,19 mg/kg (0,090 mg/mL) frente a los 75,3 mg/kg obtenidos de la metodología original. Por otra parte, el valor obtenido fue menor a 0,17 mg/mL reportado por **Zheng et al. (2000)**. En función al porcentaje de humedad ($57,86 \pm 0,26$ %) se puede decir que fue bastante cercano a $56,49 \pm 0,19$ % de un análisis de maca (*L. peruvianum*) descrito por **Chacón (1990)**. Efecto que sugiere que la cantidad de sólidos totales también fue cercano al obtenido de $421,4 \pm 2,65$ mg/mL. En un estudio de **Reyes & Yabar. (2011)**, el porcentaje de sólidos de un extracto de *L. meyenii* fue menor, tanto con agua (18,43%, 184,3 mg/mL) como con etanol (21,5 %, 215 mg/mL). Lo que demuestra que la presente investigación obtuvo resultados bastante favorables en comparación con otras investigaciones similares.

De acuerdo con los resultados obtenidos en *B. gasipaes*, la concentración de carotenoides fue de $1,07 \times 10^{-3} \pm 1,07 \times 10^{-4}$ mg/mL, resultado mucho menor en comparación con 7,16 mg/mL del estudio de **Calle (2020)**, a pesar de ver utilizado la misma metodología. Esta diferencia tiene cierto grado de influencia por la madurez del fruto, ya que en el presente estudio se emplearon frutos a un 65% de madurez en comparación con los usados en la metodología precedente. Este suceso se contrasta con una explicación de **Kapoor et al. (2022)**, donde señala el aumento de la síntesis de carotenoides a medida que los frutos maduran. En un estudio similar, **Ordóñez et al. (2015)** menciona que la concentración máxima obtenida de carotenoides en *B. gasipaes* mediante extracción asistida por ultrasonido fue de 163,47 mg/100 g de

material vegetal (MV), y en otra investigación desarrollada por **Noronha et al. (2019)** se indica que con una mezcla de acetato de etilo con cetona fue posible extraer 7,3 mg/100 g MV. Demostrando que en ambos estudios los resultados fueron superiores en comparación con el conseguido en la presente investigación de 0,214 mg/100g MV (en las mismas unidades).

Con respecto a *P. alliacea*, se obtuvo una concentración $7,92 \pm 0,96$ mg GAE/mL, valor que se encuentra dentro de los resultados conseguidos por **Sariego et al. (2015)**, donde describe concentraciones de entre 0,06 y 41,50 mg GAE/mL. La concentración obtenida en el presente estudio demuestra ser superior al valor de 7,57 mg/mL, alcanzado de una extracción por percolación con etanol al 80% y una proporción MV-solvente 1:8 realizado por **Ochoa et al. (2013)**. No obstante, en ese mismo estudio, se obtuvo una concentración de sólidos totales de 252,2 mg/mL (25,22 mg/100 mL), mucho mejor en comparación al resultado de $151,8 \pm 2,42$ mg/mL obtenido de la presente investigación.

En resumen, se puede decir que los resultados obtenidos de cada extracto se sustentan con las condiciones manejadas durante el proceso de extracción y con la calidad del material vegetal. En ese sentido, **Zhang et al. (2018)** menciona que el método de maceración utilizado para los tres extractos no es tan eficiente en comparación a extracciones por soxhlet, reflujo y percolación. No obstante, también indica que controlar parámetros que faciliten la solubilidad y difusividad, como la temperatura, tamaño de partículas del material vegetal y el correcto solvente, pueden aumentar el rendimiento de extracción.

Por otro lado, se destaca la influencia que tiene el solvente y la temperatura en cada uno de los procesos de extracción. **Strati & Oreopoulou. (2011)** señala que la extracción con etanol puede aumentar su eficiencia a 70 °C, al mejorar la difusión y colapsar completamente los constituyentes celulares que albergan los metabolitos. Sin embargo, en la presente investigación las temperaturas fueron de 50, 70 y 35 °C, con base en metodologías previamente estandarizadas que aseguran la integridad de principios activos. Esto particularmente en los carotenoides de *B. gasipaes*, ya que

Gheonea et al. (2020) indica que estos tienden a isomerizarse y perder actividad biológica al estar expuestos a temperaturas demasiado altas.

El efecto del solvente se puede apreciar en el estudio de **Strati & Oreopoulou. (2011)**, donde se evaluaron las mejores condiciones de extracción de carotenoides a partir del tomate. Obteniendo un mejor resultado con el lactato de etilo en comparación con el etanol. Esto debido a que el etanol es una molécula polar, que si bien permite solubilizar a los carotenoides, tiene mayor afinidad por las xantofilas (carotenoides menos apolares) que por los carotenos (carotenoides apolares). Mientras que el lactato de etilo, al ser un solvente de polaridad media, permite una mejor interacción ante ambos tipos de carotenoides, incrementando el rendimiento de extracción (**Kua et al., 2016**). Suceso también apreciado en la extracción de polifenoles, dado que **Cheuib et al. (2018)** señala que las mezclas hidroetanólicas son mucho más eficiente para obtener estos metabolitos.

3.2. Microencapsulación de los extractos vegetales

Tabla 9.

Resultados del proceso de microencapsulación de los extractos vegetales

Extractos	Parámetro de microencapsulación				
	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	Polímeros	Proporción (ST:Polímero)	Rendimiento (%)
<i>L. meyenii</i>	150	80	Mdx ¹	7:3	63,21
<i>B. gasipaes</i>	150	90	Mix ²	1:1:1	66,94
<i>P. alliacea</i>	150	80	Mix ²	20:40:40	82,97

¹ Mdx: Maltodextrina

² Mix: Maltodextrina + Goma arábica

En función a los resultados obtenidos, se puede concluir que *P. alliacea* presentó un mayor rendimiento (82,97 %) en comparación con el resto de microencapsulados. Debido a que su proporción con los polímeros permitió mayor ingreso de masa. Lo

que atribuyó que las pérdidas producidas por la adhesión de los microencapsulados en la superficie de la cámara del spray dryer no sean tan significantes (**Liu et al., 2022**). Efecto que si fue considerable en los microencapsulados de *L. meyenii* y *B. gasipaes* por la menor cantidad de masa que fue ingresada.

Rodríguez et al. (2022) menciona que el secado por aspersion es un método que permite obtener altos rendimientos de compuestos microencapsulados. No obstante, en función a los resultados expuestos en la **Tabla 9**, se puede decir que los rendimientos de microencapsulación en *L. meyenii* (63,21 %) y en *B. gasipaes* (66,94 %) fueron inferiores en contraste con investigaciones similares. En dos estudios donde se utilizaron mezclas de maltodextrina y gomara arábica como agentes encapsulantes se obtuvieron rendimientos de 92,36 % para un extracto de *L. meyenii* (**Sevilla, 2017**), y 71,87 % para microencapsulados de β caroteno obtenido a partir de *B. gasipaes* (**Ordoñez et al., 2017**). De manera similar, **Figuroa et al. (2016)** menciona haber obtenido un rendimiento del 84,2 % en microencapsulados con goma arábica y 86 % con maltodextrina del aceite de *Rubus glaucus*. Por otro lado, **Pastuña et al. (2016)** menciona haber alcanzó un rendimiento del 82,10% de microencapsulado de aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) con una mezcla de maltodextrina y goma arábica.

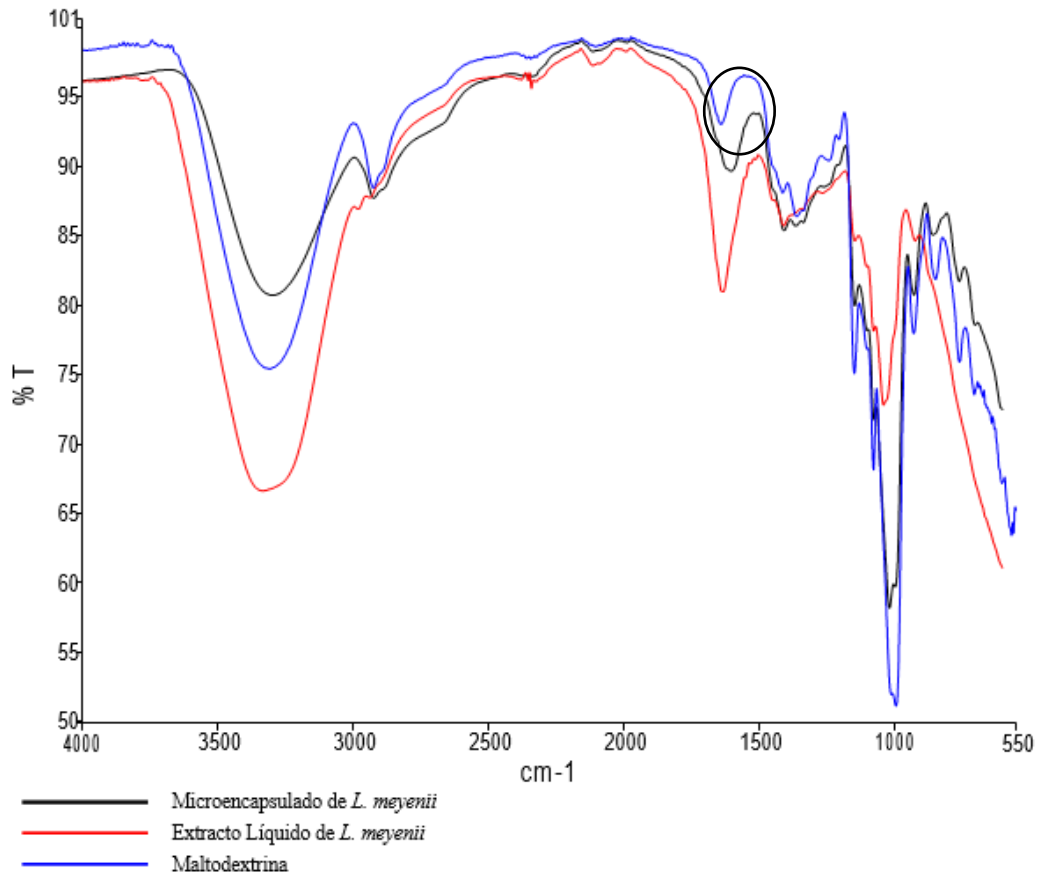
3.3. Evaluación de la eficiencia de la microencapsulación por FT-IR

Cada uno de los extractos y microencapsulados fueron analizados mediante espectroscopia FT-IR. Una técnica que consiste en la interacción de una muestra con la radiación infrarroja, a fin de excitar los enlaces que constituyen los grupos funcionales y obtener información a través de bandas para dilucidar las estructuras químicas presentes (**Mata et al., 2017**).

3.3.1. FT-IR en el microencapsulado de *L. meyenii*

Figura 7.

*Resultados obtenidos de la espectroscopia infrarroja en *L. meyenii**



Se observa tres ensayos superpuestos, correspondientes a la maltodextrina como polímero encapsulante, al extracto líquido y al microencapsulado de *L. meyenii*.

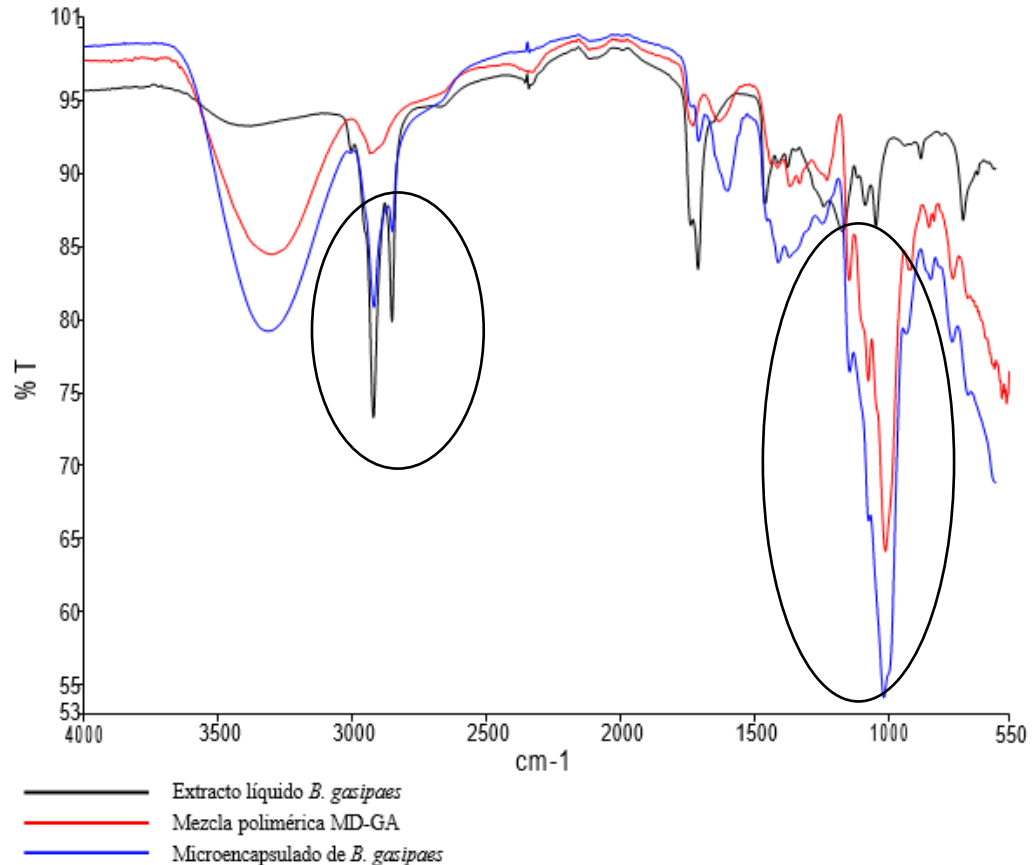
Se realizó una comparación entre las tres bandas obtenidas (roja, negra y azul) (**Figura 7**), evidenciando la gran similitud que existe entre la del microencapsulado (negra) y la de la maltodextrina (azul). Contrariamente, a la diferencia notable que hubo con la del extracto líquido (roja). Esto debido al enmascaramiento de los componentes activos del extracto después de la microencapsulación (**López et al., 2022**). Lo que causó que desaparezcan los picos pertenecientes a dichos metabolitos y que únicamente se reflejen picos de los grupos funcionales pertenecientes al polímero encapsulante.

Siendo así que en función al *anexo 3*, los picos correspondientes al extracto líquido fueron de $3334,03\text{ cm}^{-1}$ perteneciente a enlaces del tipo O-H encontrados en estructuras como el agua y las macaridinas (Cichosz & Masek, 2019). 1632 cm^{-1} de enlaces C=C y N-H presentes en alcaloides como las lepidinas A y B; y ácidos grasos como macamidas y macaenos (Escobar et al., 2021). Por otro lado, es importante señalar que se observó un desplazamiento y reducción en la banda del microencapsulado en comparación con la de la maltodextrina. Esto debido a las interacciones débiles intramoleculares generadas en los complejos de inclusión (Ozdikicierler et al., 2014). Siendo así que los principales enlaces identificados fueron picos de 3296 cm^{-1} perteneciente a grupos O-H, 2925 cm^{-1} y 1407 cm^{-1} de los enlaces C-H característicos en estructuras de la maltodextrina. (Anexo 4) (Salim et al., 2021).

3.3.2. FT-IR en el microencapsulado de *B. gasipaes*

Figura 8.

*Resultados obtenidos de la espectroscopia infrarroja en *B. gasipaes**



Se observa tres ensayos superpuestos correspondientes a la mezcla polimérica como agente encapsulante, al extracto líquido y microencapsulado de *B. gasipaes*.

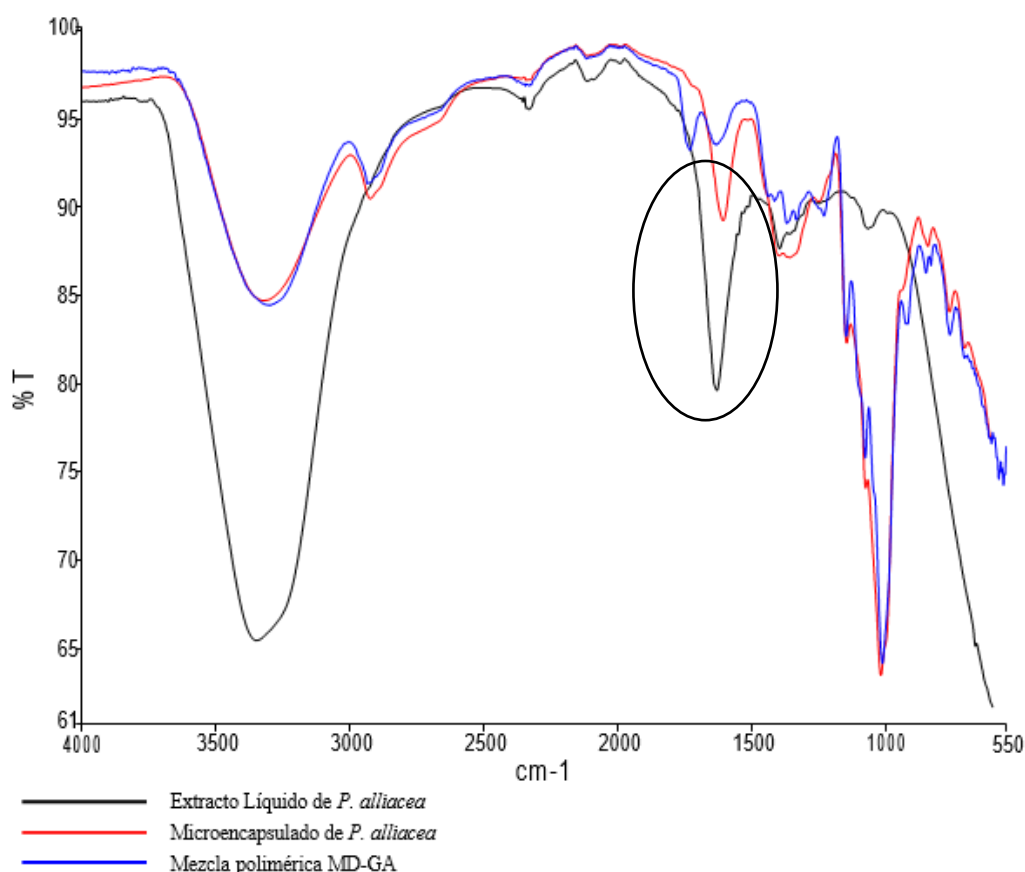
Con respecto a los resultados de FT-IR en *B. gasipaes* (**Figura 8**), se puede decir que las bandas de espectroscopia demostraron que el microencapsulado (azul) y la mezcla polimérica (maltodextrina + goma arábica) (rojo) tuvieron similitud. Mientras que la banda correspondiente al extracto líquido (negra), evidenció un comportamiento distinto. No obstante, a pesar de su diferencia, estas compartieron similitudes en los picos señalados de 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} , mismos que correspondieron a enlaces C-H (**Munajad et al., 2018**). Indicando que la eficiencia de microencapsulación disminuyó, dado que parte de las moléculas del licopeno quedaron adheridas en la superficie de la microcápsula. Esto debido a que según **López et al. (2022)** la eficiencia de microencapsulación nunca llega al 100%.

De manera que los principales enlaces identificados en el extracto líquido de *B. gasipaes* (**Anexo 5**) fueron C-H a números de onda de 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} (Munajad et al., 2018). Además, enlaces C=C a 1711 cm^{-1} y C-H₂ a 1460 cm^{-1} (Socrates, 2004). Mismos que se encuentran asociados a estructuras de carotenoides. Resultado que se contrasta con el estudio de Lóránd et al. (2002) donde se obtuvo gráficos FT-IR de varios tipos de carotenoides similares al del presente trabajo. Por otro lado, en el microencapsulado (**Anexo 6**), también se observaron picos de 3319 cm^{-1} correspondientes a enlaces O-H de los constituyentes de la mezcla polimérica y de 1601 cm^{-1} a C=C de los anillos aromáticos característicos en la goma arábiga (Escobar et al., 2021).

3.3.3. FT-IR en el microencapsulado de *P. alliacea*

Figura 9.

*Resultados obtenidos de la espectroscopia infrarroja en *P. alliacea**



Se observa tres ensayos superpuestos correspondientes a la mezcla polimérica como agente encapsulante, al extracto líquido y microencapsulado de *P. alliacea*.

El resultado FT-IR en *P. alliacea* (**Figura 9**), permitió observar que la banda correspondiente al microencapsulado (rojo) tuvo gran parecido con la perteneciente a la mezcla polimérica (maltodextrina + goma arábica) (azul). Diferenciándose claramente con la banda del extracto líquido (negra). Lo que demuestra una alta eficiencia de microencapsulación por la desaparición de los picos del extracto líquido que dejaron en su lugar a los picos característicos de los polímeros de la mezcla (**López et al., 2022**). Sin embargo, esto también corroboró que parte de los compuestos fenólicos con enlaces C=C no fueron incorporados tan eficientemente dentro de las microcápsulas como se señala en 1630 cm^{-1} .

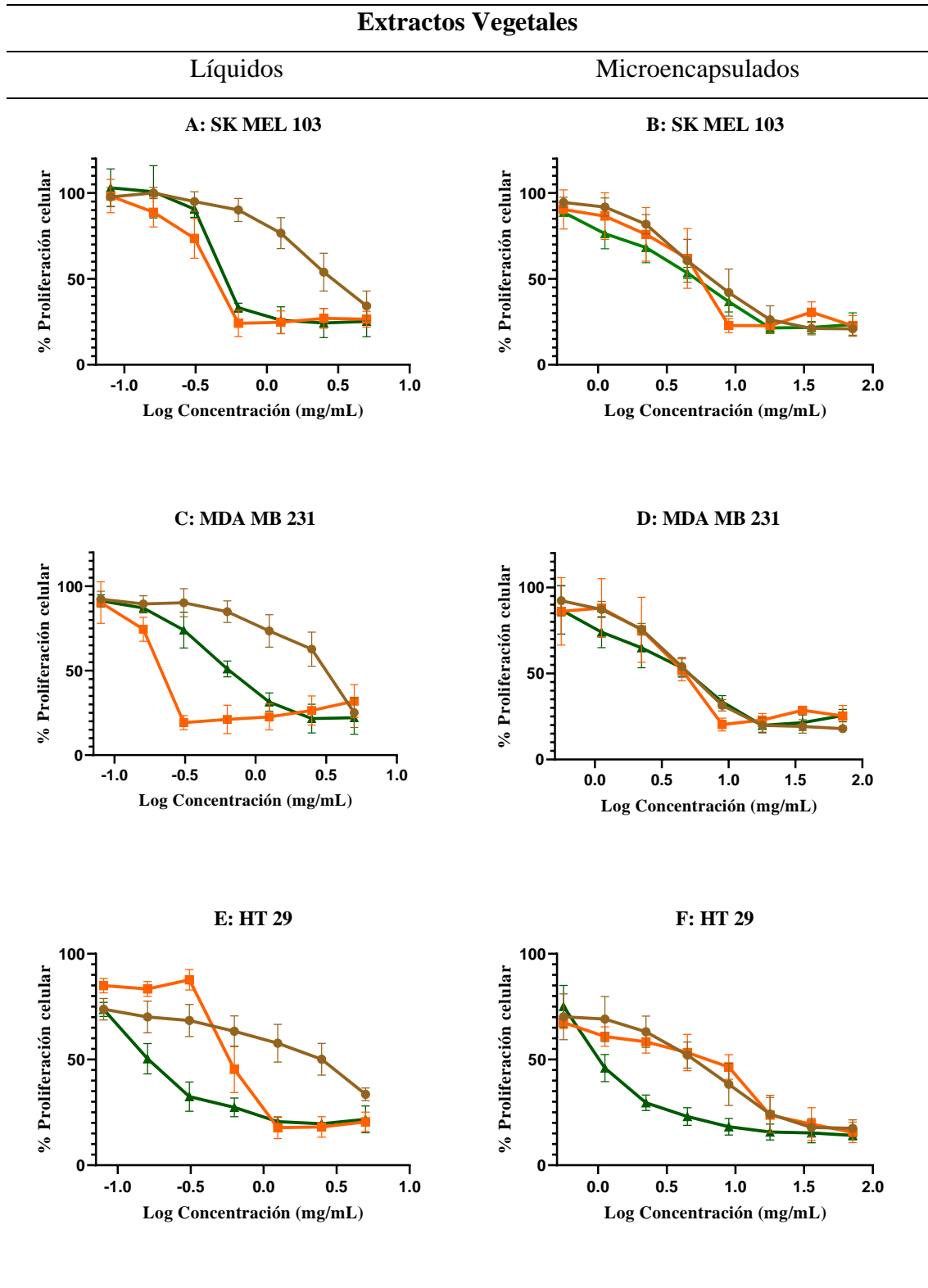
De manera que los principales picos del espectro en la muestra líquida (**Anexo 7**) permitieron identificar enlaces C=C a 1630 cm^{-1} constituyentes del anillo aromático de los compuestos fenólicos y enlaces metilo -CH₃ a 1395 cm^{-1} que se encuentran en gran parte de compuestos activos. Por otro lado, con respecto al microencapsulado (**Anexo 8**), fue posible identificar un número de onda de 3320 cm^{-1} de enlaces O-H y a 2925 cm^{-1} enlaces C-H presentes en la estructura de cada uno de los polímeros encapsulantes y a 1607 cm^{-1} enlaces C=C de anillos aromáticos de la goma arábica (**Socrates, 2004**).

3.4. Evaluación antitumoral de los extractos vegetales mediante en ensayo de proliferación con MTT

Se determinó la actividad antitumoral de los extractos vegetales mediante el ensayo de proliferación MTT. Un método que consiste en la reducción de una sal de tetrazolio por la actividad de las oxidoreductasas presentes en las células viables con actividad proliferativa (**Ghasemi et al., 2021**). A continuación se observa (**Figura 10**), el comportamiento de las curvas dosis-respuesta de cada uno de los extractos vegetales, tanto líquidos como microencapsulados. Para lo cual, se representó a *L. meyenii* con la banda de color café, a *B. gasipaes* con la banda de color naranja y a *P. alliacea* con la banda de color verde, en cada una de las líneas celulares evaluadas.

Figura 10.

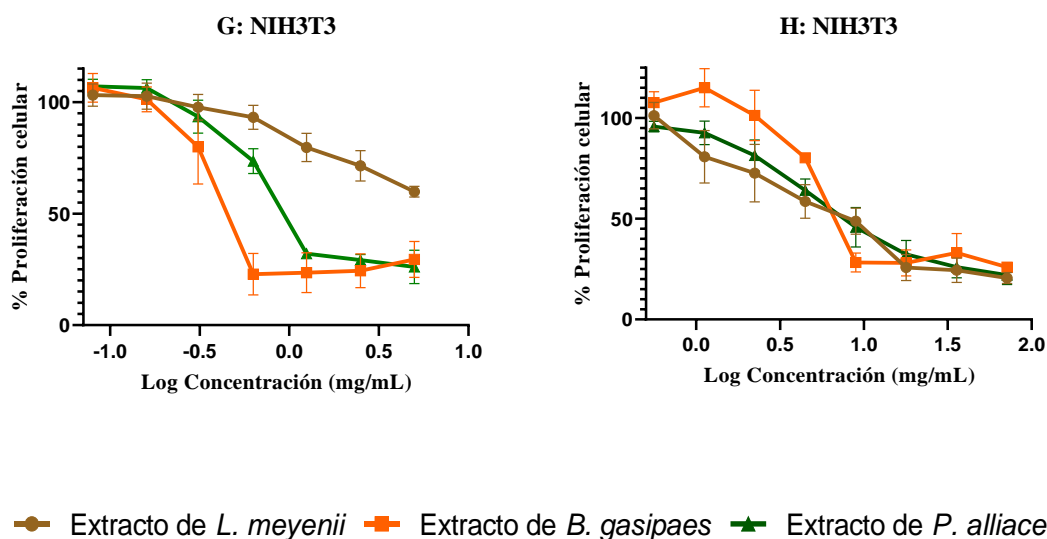
Gráficas del ensayo de proliferación celular con MTT



Extractos Vegetales

Líquidos

Microencapsulados



Las concentraciones evaluadas de los extractos líquidos fueron 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16, 0,08 y 0 mg de ST /mL y las concentraciones de los extractos microencapsulado fueron 71,5; 35,75; 17,88; 8,94; 4,47; 2,23; 1,12; 0,56 y 0 mg de microencapsulado/mL.

Las gráficas de la **Figura 10** fueron realizadas a partir de datos obtenidos de 4 o 5 ensayos de MTT, que a su vez tuvieron 4 réplicas experimentales. Esto permitió obtener valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (IC50) representadas en la **Tabla 10** y la **Tabla 11**. La concentración máxima evaluada en los ensayos líquidos fue de 5 mg/mL de sólidos totales (ST), mientras que en los ensayos con microencapsulados fue de 71,5 mg/mL de microencapsulado (sólidos totales + polímero). El rango de concentraciones investigadas se determinó con base en la concentración necesaria para alcanzar el 100% de inhibición de la proliferación que permitiera obtener el dato de IC50, siendo estas concentraciones más altas para los microencapsulados que para los extractos líquidos.

De manera que las concentraciones correspondientes a los constituyentes de los microencapsulados se indican en los **Anexos 9, 10 y 11**. Estas fueron calculadas mediante la relación de sólidos totales - polímero empleados durante el secado por aspersión. Por otro lado, se debe mencionar que se utilizaron concentraciones de 0-10 µg/mL de cisplatino como control positivo, un fármaco ampliamente empleado en la terapia contra el cáncer (**Anexo 12**) (**Ghosh, 2019**).

Tabla 10.*IC50 obtenidos en el ensayo de proliferación celular con MTT*

Líneas celulares	Extractos Vegetales					
	Líquidos			Microencapsulados		
	<i>L. meyenii</i>	<i>B. gasipaes</i>	<i>P. alliacea</i>	<i>L. meyenii</i>	<i>B. gasipaes</i>	<i>P. alliacea</i>
SK-MEL-103	2,96	0,33	0,43	5	4,8	3,9
MDA-MB-231	2,82	0,27	0,53	4,2	4	3,7
HT-29	1,85	0,63	0,18	6,8	10,5	1,16
NIH3T3	6,74	0,32	0,68	7,68	4,91	5,2

Los IC50 de los extractos líquidos están expresados en mg de ST/mL. Los IC50 de los extractos microencapsulados están expresados en mg de microencapsulado/mL.

Mediante un análisis de dosis – respuesta realizado en GraphPad se obtuvieron los valores IC50 correspondientes a las versiones líquidas y microencapsuladas de cada uno de los extractos evaluados sobre las líneas celulares indicadas en la **Tabla 10**. Todos los extractos demostraron tener actividad antitumoral; sin embargo, algunos presentaron ciertas ventajas en comparación con otros. En los extractos líquidos se evidenció que para inhibir el 50% de la proliferación celular destacó el extracto líquido de *B. gasipaes* por haber presentado valores más bajo de IC50. En función a la literatura, no se han reportado ensayos antitumorales en esta especie vegetal. No obstante, autores como **Ordoñez et al. (2019)** le atribuyen esta capacidad gracias a la presencia de moléculas preventivas que han sido evaluadas en estudios similares. De manera que **Milani et al. (2017)** señala que 10 µg/mL de β-caroteno induce la apoptosis y 10 µM de licopeno detienen el ciclo celular en la línea celular MDA-MB-231.

El efecto antitumoral de *L. meyenii* obtenido en el presente estudio, se contrasta con una investigación de **Bizinelli et al. (2022)**, donde se demostró que el extracto seco de esta especie vegetal tuvo un efecto significativo en la reducción de la proliferación de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 a una concentración de 2 mg/mL. Este efecto también fue apreciado por **Fu et al. (2021)** en otra línea de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hígado y leucemia. En la investigación propuesta por **Lenzi et al. (2021)**, se señala que las fracciones del extracto de *L. meyenii* denominadas Lm II y Lm III (de acuerdo con su composición de

glucotropaeolina y glucolimnantina), demostraron inhibición al 50 % de la proliferación celular de HT-29 a concentraciones de 0,102 y 0,071 mg/mL respectivamente. Según **Yábar & Reyes. (2019)** y **Sifuentes et al. (2015)**, la actividad antitumoral de esta especie vegetal se debe a la presencia de glucosinolatos, alcaloides, isotiocianatos, macaridinas, macamidas y macaenos que actúan sinérgicamente para detener el ciclo celular e inhibir la expresión de genes inductores de angiogénesis.

Los resultados obtenidos en función a la actividad antitumoral de *P. alliacea* se sustentan con los resultados expuestos por **Hernández et al. (2017)**, donde se demostró un efecto inhibitor en líneas celulares de cáncer de mama y colón, con valores IC50 de 0,03 y 0,08 mg/mL respectivamente. De acuerdo con **Urueña et al. (2008)**, la actividad antitumoral se atribuye al dibencil trisulfuro y sus derivados que actúan sinérgicamente con otros metabolitos, causando alteraciones en el citoesqueleto, deteniendo el ciclo celular e induciendo apoptosis. Con respecto a los extractos microencapsulados se pudo observar que *P. alliacea* presentó una mejor actividad antitumoral en las tres líneas cancerígenas, dado que los IC50 obtenidos son menores en comparación con los microencapsulados de *L. meyenii* y *B. gasipaes*.

Tabla 11.

IC50 obtenidos en el ensayo de proliferación celular con MTT en función de los sólidos totales

Líneas celulares	Extractos vegetales					
	<i>L. meyenii</i>		<i>B. gasipaes</i>		<i>P. alliacea</i>	
	Liq ¹	ME ²	Liq ¹	ME ²	Liq ¹	ME ²
SK-MEL-103	2,96	3,50	0,33	1,58	0,43	0,78
MDA-MB-231	2,82	2,94	0,27	1,32	0,53	0,74
HT-29	1,85	4,76	0,63	3,47	0,18	0,23
NIH3T3	6,74	5,38	0,32	1,62	0,68	1,04

¹ Liq: Líquido; ² ME: Microencapsulado. Los IC50 están expresados en mg de ST/mL.

Como se aprecia en la **Tabla 11**, para responder la hipótesis de la investigación fue necesario comparar el IC50 de cada extracto líquido con su versión

microencapsulada en función al contenido de sus sólidos totales. En términos generales, es posible decir que los resultados reflejan que los microencapsulados requieren de una mayor concentración de sólidos totales para inhibir el 50% de la proliferación celular en comparación con los extractos líquidos en todas las líneas celulares. Esto demuestra una mayor actividad antitumoral de los extractos en condiciones líquidas que microencapsuladas. Por otro lado, se observó un resultado contradictorio a los demás ensayos, en donde el microencapsulado de *L. meyenii* demostró inhibir más eficientemente el 50% de la proliferación celular de NIH3T3 frente a su versión líquida.

Para conocer si la influencia está dada realmente por los metabolitos del extracto, se realizaron ensayos con MTT de los polímeros encapsulantes en todas las líneas celulares evaluadas (**Anexo 13**). Se consideró que los polímeros presentaban una inhibición significativa de la proliferación a partir del 20% de reducción de la proliferación en comparación con el control. Así, los resultados demostraron que la cantidad de polímero de maltodextrina (2,3 mg/mL en *L. meyenii*) y mix (6,93 mg/mL en *B. gasipaes* y 4,16 mg/mL en *P. alliacea*) presentes en las concentraciones inhibitorias (IC50) de los microencapsulados no tienen una influencia relevante sobre la proliferación celular.

Tabla 12.

Índices terapéuticos (IT)

Líneas celulares	Extractos Vegetales					
	Líquidos			Microencapsulados		
	<i>L. meyenii</i>	<i>B. gasipaes</i>	<i>P. alliacea</i>	<i>L. meyenii</i>	<i>B. gasipaes</i>	<i>P. alliacea</i>
SK-MEL-103	2,28	0,97	1,58	1,54	1,02	1,33
MDA-MB-231	2,39	1,19	1,28	1,83	1,23	1,41
HT-29	3,64	0,51	3,78	1,13	0,47	4,48

Los índices terapéuticos de los extractos líquidos están expresados en mg de ST/mL y los índices terapéuticos de los extractos microencapsulados están expresados en mg de microencapsulado/mL.

En aspectos de seguridad, los IC50s obtenidos en la línea control no tumoral (NIH3T3) fueron relacionados con los obtenidos en las células tumorales a través de la ecuación del índice terapéutico (IT) (**Tabla 12**). De acuerdo con **Tamargo et al. (2015)**, el IT se define como el intervalo de dosis necesario para que un principio

activo sea eficiente sin producir efectos tóxicos adversos. El principio se fundamenta en que un IT alto representa un nivel más amplio de seguridad, mientras que un IT bajo sugiere que podría generarse toxicidad (NIH, 2021). Por tanto, se busca que los extractos inhiban la proliferación de las células tumorales afectando mínimamente a las células no tumorales.

Se puede concluir que los resultados de la **Tabla 13** demuestran que el extracto líquido y microencapsulado de *P. alliacea* presentaron un mayor nivel de seguridad para combatir el adenocarcinoma colorrectal (HT-29). Este efecto también fue apreciado en el extracto líquido de *L. meyenii* para todas las líneas tumorales. Por otro lado, también se evidenció que el extracto líquido y microencapsulado de *B. gasipaes* a pesar de haber manifestado una excelente actividad antitumoral, tiene ITs demasiado bajos, lo que demuestra que su capacidad antiproliferativa también afecta las células normales.

De acuerdo con **Tomaro et al. (2013)** la microencapsulación de principios activos tiene un potencial terapéutico bastante amplio. Sin embargo, en el presente estudio, los resultados demostraron una disminución de su efectividad en comparación con los líquidos. Un resultado similar reportado por **Liu et al. (2022)**, señala que los microencapsulados formados con altas temperaturas tuvieron una disminución de la efectividad, tomando como base el aumento del IC50 en la línea MDA-MB-231. Por otro lado, **Bartoli et al. (2008)** menciona que obtuvo una actividad antitumoral deficiente con estructuras nanocapsulares de paclitaxel (Taxol) frente a su versión libre después de 48 h de tratamiento, pero a las 96 h se obtuvo un efecto antitumoral más potente con los nanoencapsulados en comparación con su versión libre, lo que demuestra la importancia de conocer el tiempo de liberación de los principios activos y como interactúan a nivel celular.

Por otro lado, se puede decir que los microencapsulados obtenidos presentaron una estructura polinuclear, similar a las de un estudio donde se determinó que los lípidos microencapsulados de la semilla de *Curcubita pepo* incrementaron la actividad biológica al favorecer la dispersión de principios activos y formar nanoemulsiones de 9-32 nm, que permitieron una mejor interacción con las células y redujeron considerablemente edemas inducidos en ratas Wistar (**López et al., 2010; López et**

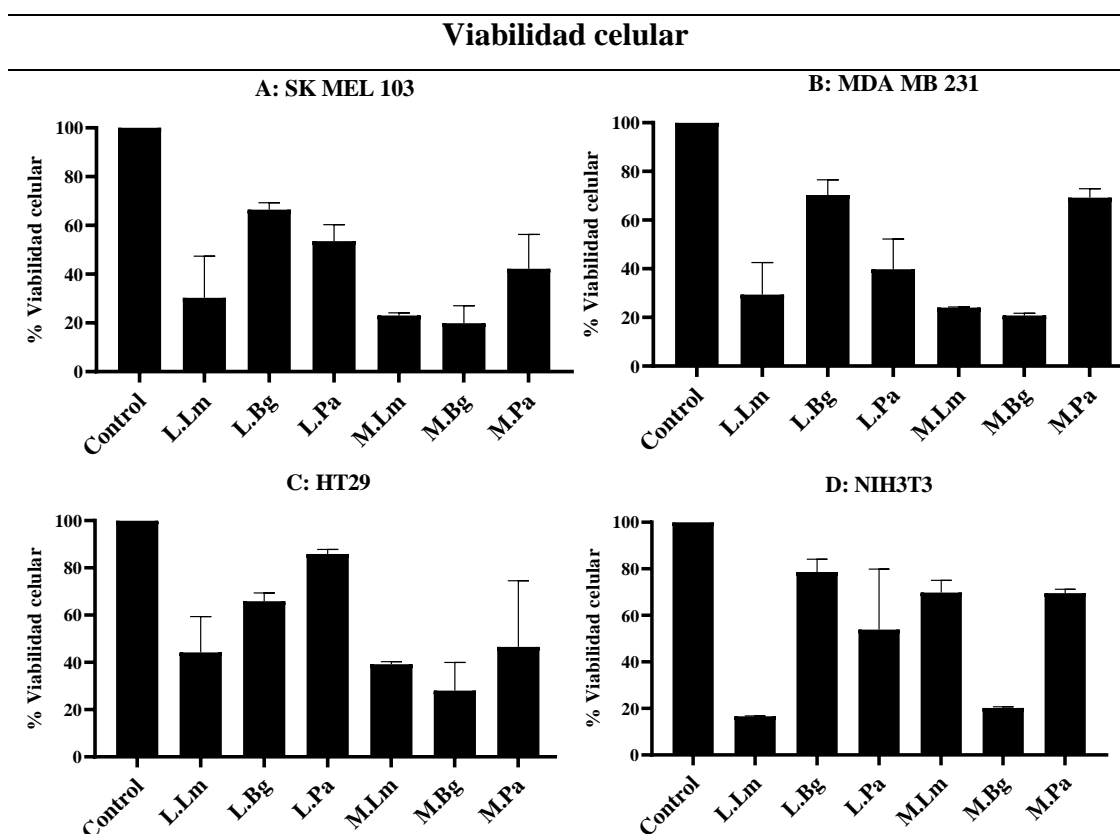
al., 2015). No obstante, la actividad biológica de aquel estudio es contradictoria a la obtenida en la presente investigación, Esto principalmente por ser un ensayo *in vivo*. Dado que la literatura menciona que la microencapsulación en ensayos *in vivo* otorga ventajas como, aumento de la estabilidad de los principios activos frente a posibles daños, dosificación, fácil administración, liberación gradual y controlada (**Lengyel et al., 2019; Lam & Gambari, 2014; Singh et al., 2010**)

3.5. Evaluación de los IC50 obtenidos en el ensayo de proliferación con MTT mediante cristal violeta.

Los IC50 obtenidos en el ensayo de proliferación celular con MTT fueron contrastados con el ensayo de viabilidad con cristal violeta (Garg et al., 2018), debido a que el ensayo MTT no es capaz de diferenciar entre las células muertas e inactivas, mientras que el cristal violeta determina todas las células viables (Mirzayans et al., 2017).

Figura 11.

Gráficas de viabilidad celular por cristal violeta



L.Lm: Líquido de *L. meyenii*; L.Bg: Líquido de *B. gasipaes*; L.Pa: Líquido de *P. alliacea*

M.Lm: microencapsulado de *L. meyenii*; M.Bg: Microencapsulado de *B. gasipaes*;

M.Pa: Microencapsulado de *P. alliacea*

Nota: Las medias y desviaciones fueron obtenidas a través de 3 réplicas experimentales, donde se evaluaron los IC50 correspondientes para cada línea celular en función al tipo de extracto vegetal. Los porcentajes de viabilidad fueron calculados tomando como 100 % los tratamientos con únicamente medio de cultivo DMEM. **Anexo 14.**

Los resultados se aprecian en las gráficas de la **Figura 11** y el **Anexo 14**. De manera que los tratamientos que obtuvieron porcentajes de viabilidad cercanos al 50 % de

proliferación celular fueron el extracto líquido de *L. meyenii* en HT-29, el extracto líquido de *P. alliacea* en SK-MEL-103, MDA-MB-231 y NIH3T3, y el microencapsulado de *P. alliacea* en SK-MEL103 y HT-29. Estos resultados confirmaron los porcentajes obtenidos con el ensayo de proliferación celular MTT. Por otro lado, se obtuvieron viabilidades mayores al 50%, demostrando que los extractos vegetales a dichas concentraciones fueron capaces de inhibir la proliferación celular al 50%, pero no de inducir apoptosis en el mismo porcentaje. Este efecto se evidenció en el extracto líquido de *B. gasipaes* para todas las líneas celulares, también se apreció en el extracto líquido de *P. alliacea* en la línea HT-29, en el microencapsulado de *L. meyenii* en NIH3T3, y en el microencapsulado de *P. alliacea* en MDA-MB-231 y NIH3T3. Hay que destacar que en la línea no tumoral NIH3T3 todos los extractos produjeron viabilidades superiores al 50 % y solo se observó un efecto de viabilidad menor cuando se evaluaron los IC50 del extracto líquido de *L. meyenii* y el microencapsulado de *B. gasipaes*. Este efecto también fue evidenciado con el microencapsulado de *B. gasipaes* en todas las líneas celulares, en el microencapsulado de *L. meyenii* para todas las líneas a excepción de NIH3T3 y para el extracto líquido de *L. meyenii* en todas las líneas a excepción de HT-29.

Por otro lado, los resultados inferiores al 50 % fueron contradictorio a los resultados obtenidos con MTT. Esto se puede explicar considerando que el cristal violeta es un método susceptible a falencias en pasos cruciales como la fijación y el enjuague, que si no se ejecutan de manera correcta, pueden levantar las células e influir significativamente en comparación con otros ensayos (**Mangis et al., 2019**). No obstante, autores como **Sultan (2016)** mencionan que a pesar de que este método no puede medir la proliferación celular, si es capaz de brindar resultados bastante sólidos con respecto a la viabilidad celular (**Papadimitriou et al., 2019**).

Por otra parte, **Sazonova et al. (2022)** menciona que el ensayo de MTT es uno de los métodos más utilizados para determinar moléculas con actividad antitumoral. Incluso es considerado por **Kari et al. (2022)** como un estándar de oro al proporcionar resultados altamente sensibles y con un alto nivel de reproducibilidad (**Mangis et al., 2019**). Estas cualidades, en conjunto con las repeticiones del ensayo, proporcionan resultados bastante sostenibles que permiten responder la hipótesis de la

investigación. Es importante mencionar que **Barba et al. (2022)** señala que todos los ensayos de citotoxicidad presentan cierto grado de limitaciones, y utilizar un único ensayo, conlleva el riesgo de obtener resultados con baja fiabilidad (**Śliwka et al., 2016**). Por tanto, se recomienda el uso de varios ensayos enfocados en diferentes parámetros como la integridad de la membrana, actividad enzimática, metabolismo, etc; que permitan obtener un resultado con mayor veracidad (**Kumar et al., 2018**).

3.6. Verificación de la hipótesis

Hipótesis nula se acepta

En función a los resultados obtenidos del ensayo de proliferación con MTT. Es posible afirmar que en el presente estudio la microencapsulación no atribuyó ninguna ventaja, dado que se requirió mayor concentración de sólidos totales para inhibir el 50 % de la proliferación de células tumorales en comparación con el extracto líquido.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se obtuvieron tres extractos vegetales, el extracto de *L. meyenii* presento un rendimiento del 39,92 %, alcanzó una concentración de sólidos totales de $421,4 \pm 2,65$ mg/mL y una cantidad de alcaloides de 0,090 mg/mL. Con respecto al extracto de *B. gasipaes*, el rendimiento fue del $14,46 \pm 0,02$ %, la concentración de sólidos totales fue de $721,8 \pm 1,3$ mg/mL y la concentración de carotenoides de $1,07 \times 10^{-3} \pm 1,07 \times 10^{-4}$ mg/mL. En el extracto de *P. alliacea* el rendimiento fue $9,48 \pm 0,15$ %, la concentración de sólidos totales de $151,8 \pm 2,42$ mg/mL y la concentración de polifenoles de $7,92 \pm 0,96$ mg/mL.
- Se microencapsuló el extracto de *L. meyenii* con maltodextrina, y los extractos de *B. gasipaes* y *P. alliacea* con una mezcla polimérica (goma arábica-maltodextrina), obteniendo rendimientos de 63,21 %, 66,4 % y 82,97 % respectivamente. Además, se determinó la eficiencia de microencapsulación cualitativamente mediante FT-IR, donde se observó que todos los microencapsulados almacenaron correctamente los bioactivos del extracto. No obstante, se determinó que parte del licopeno quedo adherido en la superficie de la microcápsula en *B. gasipaes* y algunos compuestos fenólicos en la superficie del microencapsulado de *P. alliacea*.
- Se demostró que los extractos microencapsulados son menos eficientes en comparación con los extractos líquidos, dado que requieren mayor cantidad de sólidos totales para inhibir el 50% de la proliferación de células tumorales. Además, se determinó mediante el ensayo de proliferación MTT, que en los extractos líquidos, *B. gasipaes* presentó IC50 más bajos, mientras que en los microencapsulados fue el de *P. alliacea*. No obstante, considerando su incidencia sobre las células normales, se evidenció que los que tienen mayor

índice terapéutico son ambas versiones del extracto de *P. alliacea* en HT-29, y el extracto líquido de *L. meyenii* en todas las líneas tumorales.

- Los IC50 de proliferación obtenidos mediante el ensayo MTT, se contrastaron con los porcentajes de viabilidad con cristal violeta, confirmando la inhibición de la proliferación por muerte celular al 50 % en algunos casos; y en otros obteniendo valores superiores al 50 % de viabilidad, lo que demuestra que varios extractos solo inhibieron la proliferación, pero no indujeron muerte celular. Además, también se obtuvieron resultados contradictorios menores al 50 %, como consecuencia de posibles falencias ligadas a la susceptibilidad del método de cristal violeta.

4.2. Recomendaciones

- Realizar una caracterización fitoquímica de cada uno de los extractos vegetales, para posteriormente fraccionarlos y estudiarlos de manera independiente y combinada, a fin de determinar el efecto antitumoral que presenta cada uno de los compuestos extraídos.
- Estudiar de manera integral cada uno de los microencapsulados, en aspectos de morfología, tamaño, estabilidad fisicoquímica y perfil de liberación a través del tiempo en medio de cultivo celular y diferentes tipos de solventes.
- Contrastar los resultados obtenidos del ensayo de proliferación MTT y de viabilidad por cristal violeta con métodos que evalúen otros parámetros de viabilidad en las células.
- Evaluar si existe un efecto sinérgico de la actividad antitumoral cuando los extractos son probados junto a fármacos antitumorales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajanal, M., Gundkalle, M. B., & Nayak, S. U. (2012). Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. *Ancient Science of Life*, 31(4), 198. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.107361>
- American Cancer Society. (2019). *Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia*. Quimioterapia. <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>
- American Cancer Society. (2021). *¿Es el cáncer una enfermedad curable? Cómo Comprender Su Diagnóstico*. <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/es-el-cancer-una-enfermedad-curable.html#references>
- Arteaga, A., & Arteaga, H. (2016). Optimización de la capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y capacidad de rehidratación en polvo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) microencapsulado con mezclas de hidrocoloides. *Scientia Agropecuaria*. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.05>
- Baek, S. H., Cao, L., Jeong, S. J., Kim, H. R., Nam, T. J., & Lee, S. G. (2021). The Comparison of Total Phenolics, Total Antioxidant, and Anti-Tyrosinase Activities of Korean Sargassum Species. *Journal of Food Quality*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6640789>
- Barba, C., Carrera, S. E., Gonzalez, R., Heredia, J., Mayorga, A., Rodríguez, C., Zúñiga, J., Arias, B., & Guamán, L. P. (2022). Evaluation of Biological Activity of Natural Compounds: Current Trends and Methods. *Molecules*, 27(14). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27144490>
- Bartoli, M., Boitard, M., Fessi, H., Beriel, H., Devissaguet, J., Picot, F., & Puisieux, F. (2008). In vitro and in vivo antitumoral activity of free, and encapsulated taxol. *Revista de Microencapsulación*, 7(2), 191–197. <https://doi.org/10.3109/02652049009021832>
- Beharry, S., & Heinrich, M. (2018). Is the hype around the reproductive health claims of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) justified? *Journal of Ethnopharmacology*, 211, 126–170. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2017.08.003>
- Bizinelli, D., Flores, F., & Lima, F. (2022). Maca Root (*Lepidium meyenii*) Extract

- Increases the Expression of MMP-1 and Stimulates Migration of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 74(1), 346–356. <https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1882511>
- Cal, B., Araújo, L., Nunes, B., da Silva, C., Oliveira, M., Soares, B., Leitão, A., De Pádula, M., Nascimento, D., Chaves, D., Gagliardi, R., & Dantas, F. (2022). Cytotoxicity of Extracts from *Petiveria alliacea* Leaves on Yeast. *Plants*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11233263>
- Calderón, M., & Ponce, E. (2022). The Role of Microencapsulation in Food Application. *Molecules*, 27(5). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27051499>
- Calle, D. (2020). *Extracción y microencapsulación de carotenoides de chonta (Bactris gasipaes)* [Tesis de grado no publicada]. Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/32085>
- Camacho, O. (2014). Contribución a la estandarización del Proceso de obtención de un extracto de hojas de *Petiveria alliacea* L. (Anamú) a escala de laboratorio. In *Universidad Nacional de Colombia*. https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/62923/Doc_Final_Msc_Farmaceutica-Oscar_Camacho.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2022). *Efectos secundarios del tratamiento contra el cáncer*. Los Sobrevivientes Del Cáncer. <https://www.cdc.gov/spanish/cancer/survivors/patients/side-effects-of-treatment.htm>
- Chacón, G. (1990). La Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov.) y su Habitat. *Revista Peruana de Biología*, 3(2), 171–267. <https://doi.org/10.15381/rpb.v3i2.8305>
- Cheuib, D., El Darra, N., Rajha, H., Maroun, R., & Louka, N. (2018). Systematic and Empirical Study of the Dependence of Polyphenol Recovery from Apricot Pomace on Temperature and Solvent Concentration Levels. *Scientific World Journal*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8249184>
- Cichosz, S., & Masek, A. (2019). Cellulose fibers hydrophobization via a hybrid chemical modification. *Polymers*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/POLYM11071174>
- Díaz, F. J., Aguilar, W., Flórez, L., Valencia, G., Laiton, K., Franco, C., Álvarez, D., Mercado, M., & Rugeles, M. (2020). Isolation and characterization of an early

- SARS-CoV-2 isolate from the 2020 epidemic in Medellín, Colombia. *Biomedica*, *40*(2), 148–158. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.5834>
- Elgersma, A., & Sjøegaard, K. (2018). Changes in nutritive value and herbage yield during extended growth intervals in grass–legume mixtures: effects of species, maturity at harvest, and relationships between productivity and components of feed quality. *Grass and Forage Science*, *73*(1), 78–93. <https://doi.org/10.1111/GFS.12287>
- Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation. *Antioxidants*, *10*(12), 1967. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10121967>
- Escobar, D., Avendaño, J., Santos, J., Lozano, J., Mardones, C., von Baer, D., Luengo, J., Lamuela, R. M., Vallverdú, A., & Gómez, C. (2021). Encapsulation of phenolic compounds from a grape cane pilot-plant extract in hydroxypropyl beta-cyclodextrin and maltodextrin by spray drying. *Antioxidants*, *10*(7), 1130. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10071130/S1>
- Esquivel, B., Ocho, A., & Rutiaga, O. (2015). Microencapsulación mediante secado por Aspersión de Compuestos Bioactivos. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, *16*(2), 180–192.
- Figuroa, P., Ceballos, M., & Hurtado, A. (2016). Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (*Rubus glaucus*) extraído con CO₂ supercrítico. *Revista Colombiana de Química*, *45*(2), 39–47. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.57481>
- Fiorentino, S., & Urueña, C. (2018). La fitoterapia como fuente de medicamentos reguladores del metabolismo tumoral y activadores de la respuesta inmunitaria. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *42*(163), 132–144. <https://doi.org/10.18257/RACCEFYN.542>
- Fu, L., Wei, J., Gao, Y., & Chen, R. (2021). Antioxidant and antitumoral activities of isolated macamide and macaene fractions from *Lepidium meyenii* (Maca). *Talanta*, *221*, 121635. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.121635>
- Gajski, G., Čimbora, T., Rak, S., Osmak, M., & Garaj-Vrhovac, V. (2016). Antitumour action on human glioblastoma A1235 cells through cooperation of bee venom and cisplatin. *Cytotechnology*, *68*(4), 1197. <https://doi.org/10.1007/S10616-015-9879-4>

- Galluzzi, G., Dufour, D., Thomas, E., Van Zonneveld, M., Salamanca, A. F. E., Toro, A. G., Rivera, A., Duque, H. S., Baron, H. S., Gallego, G., Scheldeman, X., & Mejia, A. G. (2015). An Integrated Hypothesis on the Domestication of *Bactris gasipaes*. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0144644>
- Garg, S., Huifu, H., Kaul, S. C., & Wadhwa, R. (2018). Integration of conventional cell viability assays for reliable and reproducible read-outs: Experimental evidence. *BMC Research Notes*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13104-018-3512-5/FIGURES/3>
- Geserick, P., Hupe, M., Moulin, M., Wong, W. W. L., Feoktistova, M., Kellert, B., Gollnick, H., Silke, J., & Leverkus, M. (2009). Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *The Journal of Cell Biology*, 187(7), 1037. <https://doi.org/10.1083/JCB.200904158>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/IJMS222312827/S1>
- Gheonea, I., Aprodu, I., Enachi, E., Horincar, G., Bolea, C., Bahrim, G., Râpeanu, G., & Stănciuc, N. (2020). Investigations on thermostability of carotenoids from tomato peels in oils using a kinetic approach. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(1), e14303. <https://doi.org/10.1111/JFPP.14303>
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2019.102925>
- Global Cancer Observatory. (2022). *International Agency for Research on Cancer*. Cancer Today. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group
- Gordon, J. L., Brown, M. A., & Reynolds, M. M. (2018). Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer. *Diseases*, 6(4), 85. <https://doi.org/10.3390/DISEASES6040085>

- Guntero, V., Peralta, M., Noriega, P., Kneeteman, M., & Ferretti, C. (2021). One-Pot Selective Functionalization of Polysaccharides with Urea. *Chemistry Precedings*, 74. <https://doi.org/10.3390/ECSOC-24-08346>
- Hernández, C., Iliana, A., Ventura, J., & Belmares, R. (2016). La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar Cuba*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420003>
- Hernández, J., Urueña, C., Sandoval, T., Cifuentes, M., Formentini, L., Cuezva, J. M., & Fiorentino, S. (2017). A cytotoxic *Petiveria alliacea* dry extract induces ATP depletion and decreases β -F1-ATPase expression in breast cancer cells and promotes survival in tumor-bearing mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.09.008>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2020). *Estadísticas del cáncer*. Estadísticas Del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2022). *Tipos de tratamiento*. Instituto Nacional Del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- ITIS. (2022). *Sistema Integrado de Información Taxonómica*. Sistema Integrado de Información Taxonómica. <https://doi.org/https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>
- Kapoor, L., Simkin, A., Priya, G., & Siva, R. (2022). Fruit ripening: dynamics and integrated analysis of carotenoids and anthocyanins. *BMC Plant Biology*, 22(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S12870-021-03411-W>
- Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I. A., Murugesan, A., Yli-Harja, O., & Kandhavelu, M. (2022). Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*, 27(7), 482–508. <https://doi.org/10.1007/S10495-022-01735-Y>
- Koutsoukis, C., Roukos, C., Demertzis, P., Kandrelis, S., & Akrida-Demertzi, K. (2019). The variation of the chemical composition of the main plant species in a subalpine grassland in northwestern Greece. *Legume Science*, 1(1), e23. <https://doi.org/10.1002/LEG3.23>
- Kowalska, E., Ziarno, M., Ekielski, A., & Żelaziński, T. (2022). Materials Used for the Microencapsulation of Probiotic Bacteria in the Food Industry. *Molecules*, 27(10). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27103321>
- Kua, Y. L., Gan, S., & Morris, A. (2016). Ethyl lactate as a potential green solvent to

- extract hydrophilic (polar) and lipophilic (non-polar) phytonutrients simultaneously from fruit and vegetable by-products. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 4, 21–31. <https://doi.org/10.1016/J.SCP.2016.07.003>
- Kumar, N., Afjei, R., Massoud, T., & Paulmurugan, R. (2018). Comparison of cell-based assays to quantify treatment effects of anticancer drugs identifies a new application for Bodipy-L-cystine to measure apoptosis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34696-x>
- Lam, P., & Gambari, R. (2014). Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *Journal of Controlled Release*, 178(1), 25–45. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2013.12.028>
- Lengyel, M., Kállai, N., Antal, V., Laki, A., & Antal, I. (2019). Scientia Pharmaceutica Review Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*. <https://doi.org/10.3390/scipharm87030020>
- Lenzi, R., Campestrini, L., Semprebon, S., Paschoal, J., Silva, M., Zawadzki, S., Mantovani, M., Petkowicz, C., & Maurer, J. (2021). Glucosinolate-Enriched Fractions from Maca (*Lepidium meyenii*) Exert Myrosinase-Dependent Cytotoxic Effects against HepG2/C3A and HT29 Tumor Cell Lines. *Nutrición y Cáncer*, 74(4), 1322–1337. <https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1952444>
- Ling, T., Lang, W. H., Maier, J., Centurion, M. Q., & Rivas, F. (2019). Cytostatic and Cytotoxic Natural Products against Cancer Cell Models. *Molecules*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24102012>
- Liu, Q., Hamid, N., Liu, Y., Kam, R., Kantono, K., Wang, K., & Lu, J. (2022). Bioactive Components and Anticancer Activities of Spray-Dried New Zealand Tamarillo Powder. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27092687>
- Long, Y., Liu, C., Zhao, B., Song, K., Yang, G., & Tung, C. (2015). Bio-inspired controlled release through compression–relaxation cycles of microcapsules. *NPG Asia Materials*, 7(1), e148–e148. <https://doi.org/10.1038/am.2014.114>
- López, O. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*, 44. https://www.researchgate.net/publication/262629994_Microencapsulacion_de_s

ustancias_oleosas_mediante_secado_por_aspersion/citation/download

- López, O., Núñez, Y., Ménendez, R., Nogueira, A., Reyes, M., Toledo, C., Pérez, E., & Agüero, S. (2010). Influencia del Proceso de Microencapsulación sobre el Efecto Farmacológico de los Lípidos Presentes en las Semillas de *Cucurbita pepo* L. *Latin America Journal Pharmacy*, 29(4), 612–616.
- López, O., Silva, M., & Hernández, Y. (2022). Recuperación de polifenoles a partir de residuos del proceso de fabricación de pulpa de mortiño. *Revista de Investigación Talentos*, 9(2), 65–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.33789/talentos.9.2.170>
- López, O., Turiño, W., & Nogueira, A. (2015). Microencapsulación de sabores mediante secado por aspersión. *Alimentos, Ciencia e Investigación*, 23(1), 58. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/3447>
- Lóránd, T., József, D., Molnár, P., & Gyula, T. (2002). FT-IR Study of Some Carotenoids. *HELVETICA*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1522-2675\(200206\)85:6%3C1691::AID-HLCA1691%3E3.0.CO;2-G](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1522-2675(200206)85:6%3C1691::AID-HLCA1691%3E3.0.CO;2-G)
- Mangis, J., Mansur, T., Kern, K., & Schroeder, J. (2019). Selection of an Optimal Cytotoxicity Assay for Undergraduate Research. *Bioscene: Journal of College Biology Teaching*, 45(1), 24–32.
- Marikar, S. N., El Osta, A., Johnston, A., Such, G., & Al Hasani, K. (2022). Microencapsulation based cell therapies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(7), 3. <https://doi.org/10.1007/S00018-022-04369-0>
- Martínez, J., Rodríguez, X., Pinzón, L. X., & Ordóñez, L. E. (2017). Caracterización fisicoquímica de harina de residuos del fruto de chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth, Arecaceae) obtenida por secado convectivo. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(3), 599–613. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num3_art:747
- Mata, M., Guerrero, C., Rojas, M., Delgado, R., González, C., Sánchez, V., Pérez, D., & Vázquez, G. (2017). Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 225–234. <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17>
- Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2017). Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*,

- 174(11), 1290–1324. <https://doi.org/10.1111/BPH.13625>
- Mirzayans, R., Andrais, B., & Murray, D. (2017). Impact of Premature Senescence on Radiosensitivity Measured by High Throughput Cell-Based Assays. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS18071460>
- Munajad, A., Subroto, C., & Suwarno. (2018). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis of transformer paper in mineral oil-paper composite insulation under accelerated thermal aging. *Energies*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/en11020364>
- NIH. (2021). *Glorario de términos relacionados con VIH SIDA*. Clinical Info. <https://clinicalinfo.hiv.gov/sites/default/files/glossary/Glossary-Spanish-HIVinfo.pdf>
- Noronha, K., Praia, D., Pereira, A. P., Zerlotti, A., & Campos, R. (2019). Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. *Food Chemistry*, 272, 216–221. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.08.053>
- Ochoa, A., Marin, J., Rivero, D., & Aguilera, E. (2013). Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(1), 52–59. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n1/v44n1a7.pdf>
- Olabisi, R. M. (2015). Cell microencapsulation with synthetic polymers. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 103(2), 846. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.35205>
- Ordoñez, L., Martínez, J., Rodríguez, D., Ordoñez, L., Martínez, J., & Rodríguez, D. (2019). Extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) peel by means of ultrasound application and vegetable oil. *DYNA*, 86(209), 91–96. <https://doi.org/10.15446/DYNA.V85N207.74840>
- Ordoñez, L., Martínez, J., & Villamizar, R. (2017). Encapsulación de β -caroteno extraído de residuos de palma de durazno: un estudio de estabilidad mediante dos procesos de secado por atomización. *DYNA*. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/dyna.v85n206.68089>
- Ordóñez, L., Pinzón, L., & González, L. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted

- extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 560–566. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2015.04.010>
- Organización Mundial de la Salud. (2022). *Cáncer*. Cáncer. https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Ozdikicierler, O., Dirim, S., & Pazir, F. (2014). The effects of spray drying process parameters on the characteristic process indices and rheological powder properties of microencapsulated plant (*Gypsophila*) extract powder. *Powder Technology*, 253, 474–480. <https://doi.org/10.1016/J.POWTEC.2013.12.004>
- Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272, 494–506. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.07.205>
- Papadimitriou, M., Hatzidaki, E., Papatirou, I., Papadimitriou, M., Hatzidaki, E., & Papatirou, I. (2019). Linearity Comparison of Three Colorimetric Cytotoxicity Assays. *Journal of Cancer Therapy*, 10(7), 580–590. <https://doi.org/10.4236/JCT.2019.107047>
- Pastuña, A., López, O., Debut, A., Vaca, A., Rodríguez, E., Vicente, R., Gonzalez, V., González, M., & Tapia, F. (2016). Microencapsulación de aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante secado por aspersion. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), 422–437. <https://doi.org/10.15446/RCCIQUIFA.V45N3.62029>
- Peanparkdee, M., Iwamoto, S., & Yamauchi, R. (2016). Microencapsulation: A Review Of Applications In The Food And Pharmaceutical Industries. *Reviews in Agricultural Science*, 4(0), 56–65. <https://doi.org/10.7831/RAS.4.56>
- Pérez, C., Sánchez, W., & Murillo, W. (2017). Acción antioxidante conjunta de extractos etanólicos de *Mollinedia lanceolata*, *Croton leptostachyus* y *Siparuna sessiliflora* Artículo original. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat*, 41(158), 64–70. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.425>
- Reyes, V., & Yabar, E. (2011). Estudio De Un Extracto De Maca (*Lepidium Meyenii* Walp) Con Alto Contenido De Compuestos Solubles. *Prospectiva Universitaria*, 8(1), 131–135.

<https://doi.org/10.26490/UNCP.PROSPECTIVAUNIVERSITARIA.2011.8.125>

6

- Rivas, C., Oranday, M. A., & Verde, M. J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. In *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/OMS.313>
- Rodríguez, M., Aragüez, Y., & Pinoa, J. (2022). Microencapsulation of vegetable oils by spray drying. *Afinidad*, 79(596), 4–15. <https://doi.org/10.55815/400725>
- Rodríguez, O., & López, O. (2021). Extractos De Plantas Microencapsuladas Con Potencial Actividad Antiviral: Una Revisión General. *Investigación y Desarrollo*, 14(1), 45–58. <https://doi.org/10.31243/id.v14.2021.1326>
- Salim, R., Asik, J., & Sarjadi, M. (2021). Chemical functional groups of extractives, cellulose and lignin extracted from native *Leucaena leucocephala* bark. *Wood Science and Technology*, 55(2), 295–313. <https://doi.org/10.1007/S00226-020-01258-2/TABLES/1>
- Sariego, S., Marin, J., Ochoa, A., Rivero, D., & Sariego, O. (2015). Determinación de metales, fenoles totales y flavonoides totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 46, 155–163.
- Sazonova, E., Chesnokov, M., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. (2022). Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. *Cell Death Discovery*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01207-x>
- Schäfer, M., Brütting, C., Baldwin, I. T., & Kallenbach, M. (2016). High-throughput quantification of more than 100 primary- and secondary-metabolites, and phytohormones by a single solid-phase extraction based sample preparation with analysis by UHPLC-HESI-MS/MS. *Plant Methods*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S13007-016-0130-X/FIGURES/7>
- Sevilla, J. (2017). *Obtención de un extracto rico en alcaloides a partir de harina de maca (Lepidium meyenii Walpers) para uso como ingrediente funcional* [Tesis de grado no publicada]. Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/25300>
- Sifuentes, G., León, S., & Paucar, L. M. (2015). Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), cultivo andino con propiedades terapéuticas. *Scientia Agropecuaria*, 6(2), 131–140. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2015.02.06>

- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 65. /pmc/articles/PMC3093624/
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K., Cierpień, T., Łyzwa, P., Kielbasiński, P., Jaromin, A., Flis, A., & Chilmoneczyk, Z. (2016). The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS ONE*, 11(5), 155772. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0155772>
- Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts* (3rd Editio). https://books.google.com.ec/books?id=LDoAAjMnwEIC&printsec=frontcover&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false
- Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of Essential Oils: A Review. *Polymers 2022, Vol. 14, Page 1730*, 14(9), 1730. <https://doi.org/10.3390/POLYM14091730>
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2011). Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(1), 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02496.x>
- Sultan, Ö. (2016). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Tamargo, J., Le Heuzey, J. Y., & Mabo, P. (2015). Narrow therapeutic index drugs: A clinical pharmacological consideration to flecainide. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(5), 549–567. <https://doi.org/10.1007/S00228-015-1832-0/TABLES/3>
- Tomaro, C., Saha, S., Malhotra, M., Kahouli, I., & Prakash, S. (2013). Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian

- and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions. *Journal of Pharmaceutics*, 2013, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2013/103527>
- Urueña, C., Cifuentes, C., Castañeda, D., Arango, A., Kaur, P., Asea, A., & Fiorentino, S. (2008). *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8, 60. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-60>
- Valle, T. D., Turrini, R. N. T., & De Brito Poveda, V. (2017). Intervening factors for the initiation of treatment of patients with stomach and colorectal cancer. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 25. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.1493.2879>
- Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13104-015-1000-8/FIGURES/3>
- Velasteguí, E. (2018). Consecuencias de la disminución de la flora endémica del Mundo, Ecuador y la Amazonia. *Conciencia Digital*, 1(2), 53–63. <https://doi.org/10.33262/concienciadigital.v1i2.859>
- Vicente, C. (2018). Estructura química de la goma arábiga. *Universidad Complutense de Madrid*. https://www.researchgate.net/figure/Estructura-quimica-de-la-goma-arabiga_fig5_324769211
- Yábar, E., & Reyes, V. (2019). La Maca (*lepidium meyenii* walpers) alimento funcional andino: bioactivos, bioquímica y actividad biológica. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21, 2–139. <https://doi.org/10.18271/ria.2019.457>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/S13020-018-0177-X/FIGURES/13>
- Zheng, B., He, K., Kim, C., Rogers, L., Shao, Y., Huang, Z., Lu, Y., Yan, S., Qien, L., & Zheng, Q. (2000). Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*, 55(4), 598–602. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(99\)00549-X](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(99)00549-X)

ANEXOS

Anexo 1.

Distribución de extractos vegetales en placas de 96 del ensayo de MTT

Extractos Líquidos											
<i>L. meyenii</i>				<i>B. gasipaes</i>				<i>P. alliacea</i>			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63
1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Los valores numéricos indican las concentraciones de cada extracto.

Anexo 2.

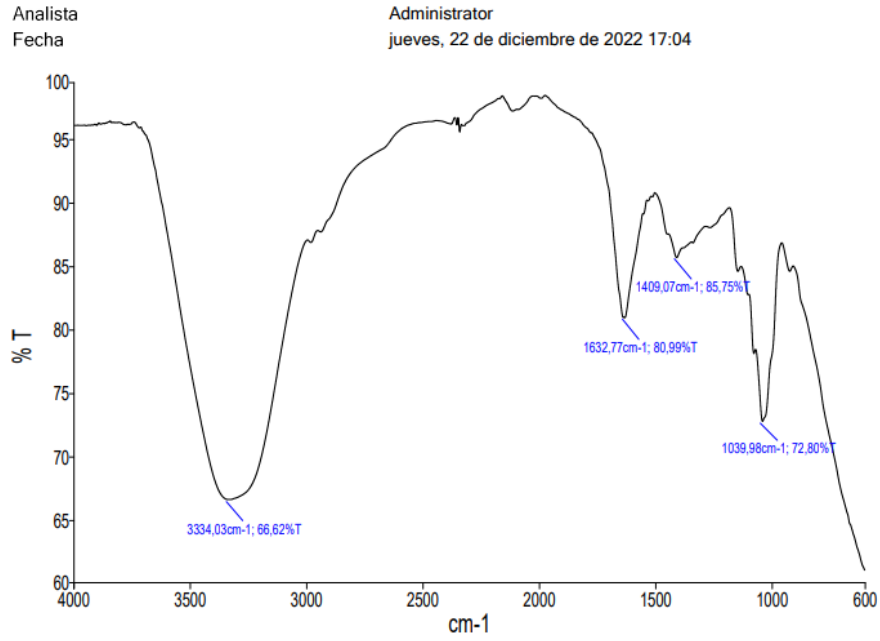
Distribución de extractos vegetales en placas de 96 del ensayo de MTT

Extractos Microencapsulados											
<i>L. meyenii</i>				<i>B. gasipaes</i>				<i>P. alliacea</i>			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,23	2,23	2,23	2,23	2,23	2,23	2,23	2,23	2,23	2,23	2,23	2,23
4,47	4,47	4,47	4,47	4,47	4,47	4,47	4,47	4,47	4,47	4,47	4,47
8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94
17,88	17,88	17,88	17,88	17,88	17,88	17,88	17,88	17,88	17,88	17,88	17,88
35,75	35,75	35,75	35,75	35,75	35,75	35,75	35,75	35,75	35,75	35,75	35,75
71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5

Los valores numéricos indican las concentraciones de cada extracto.

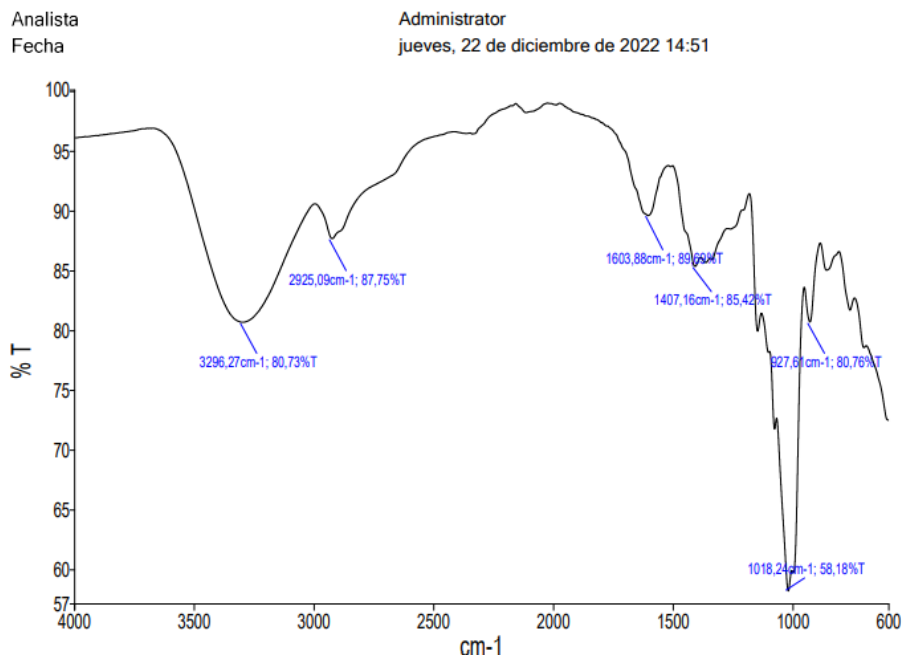
Anexo 3.

Espectroscopia FT-IR del extracto líquido de L. meyenii



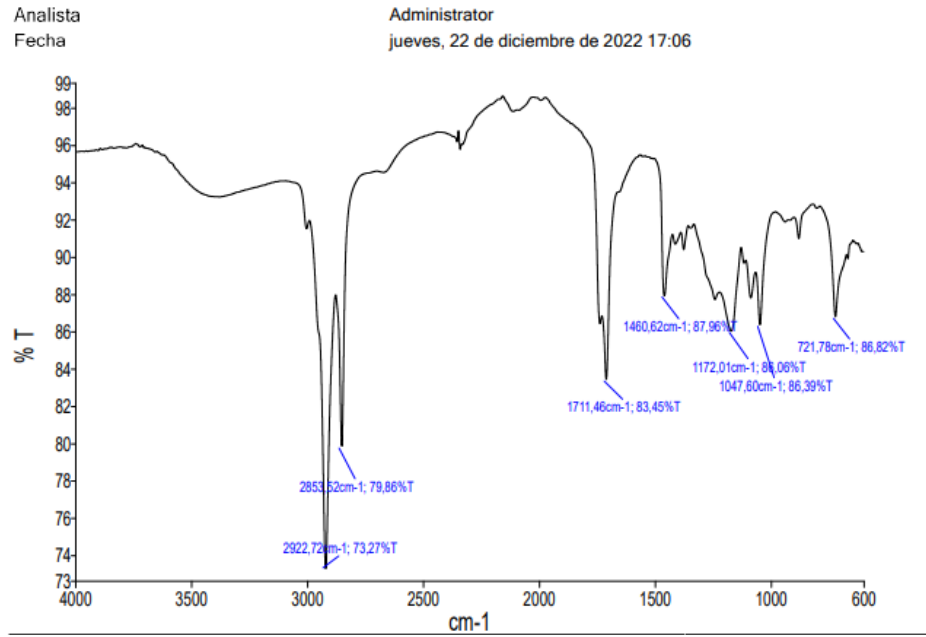
Anexo 4.

Espectroscopia FT-IR del microencapsulado de L. meyenii



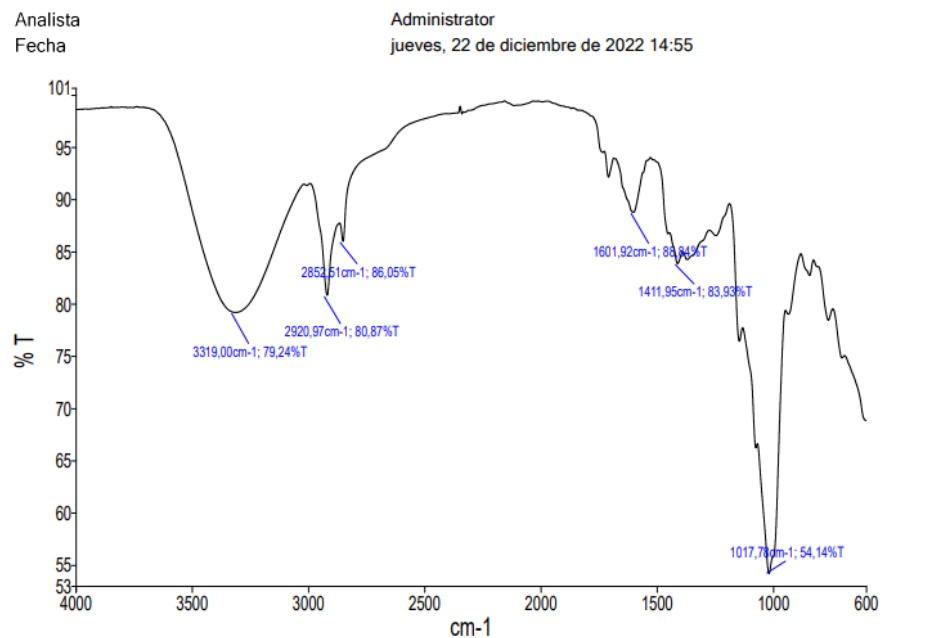
Anexo 5.

Espectroscopia FT-IR del extracto líquido de B. gasipaes



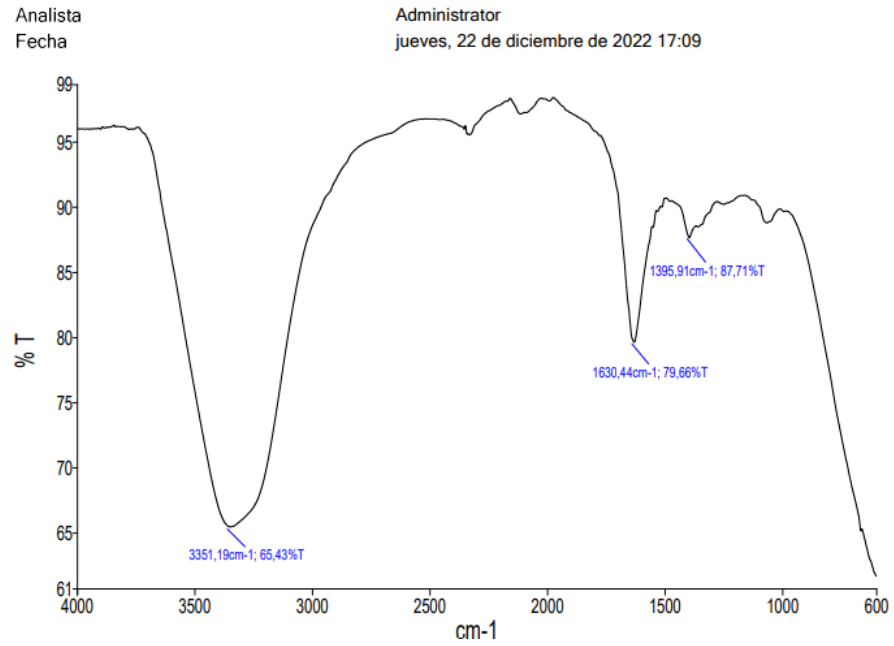
Anexo 6.

Espectroscopia FT-IR del microencapsulado de B. gasipaes



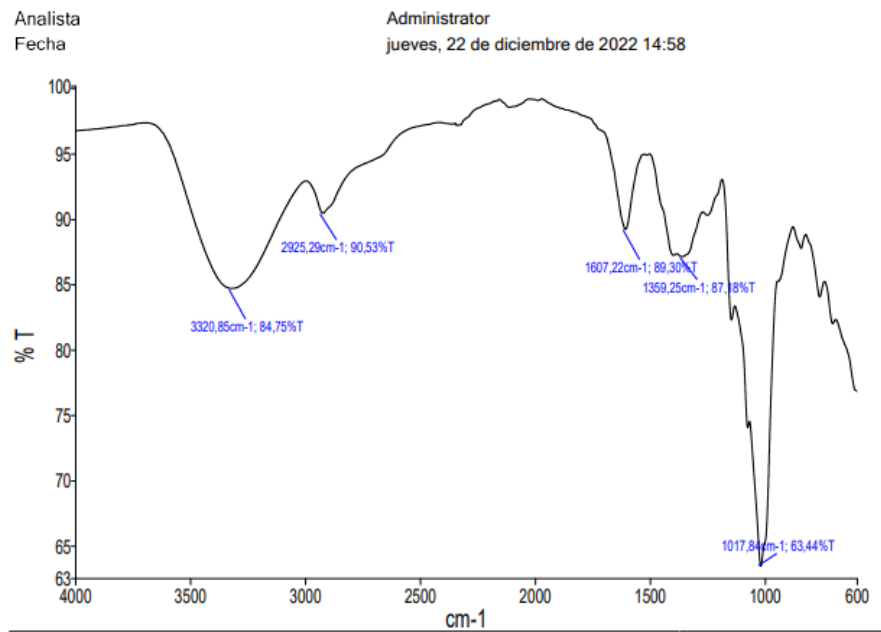
Anexo 7.

Espectroscopia FT-IR del extracto líquido de P. alliacea



Anexo 8.

Espectroscopia FT-IR del microencapsulado de P. alliacea



Anexo 9.

cantidad de sólidos totales y de maltodextrina presentes en las diluciones del microencapsulado de L. meyenii, utilizados en los ensayos de proliferación celular MTT

Microencapsulado de <i>L. meyenii</i> (mg/mL)	Sólidos totales (mg/mL)	Maltodextrina (mg/mL)
71,50	50,05	21,45
35,75	25,03	10,73
17,88	12,51	5,36
8,94	6,26	2,68
4,47	3,13	1,34
2,23	1,56	0,67
1,12	0,78	0,34
0,00	0,00	0,00

Anexo 10.

cantidad de sólidos totales y de MIX presentes en las diluciones del microencapsulado de B. gasipaes en los ensayos de proliferación celular MTT

Microencapsulado de <i>B. gasipaes</i> (mg/mL)	Sólidos totales (mg/mL)	Mezcla polimérica (MIX) (mg/mL)
71,50	23,60	47,19
35,75	11,80	23,60
17,88	5,90	11,80
8,94	2,95	5,90
4,47	1,47	2,95
2,23	0,74	1,47
1,12	0,37	0,74
0,00	0,00	0,00

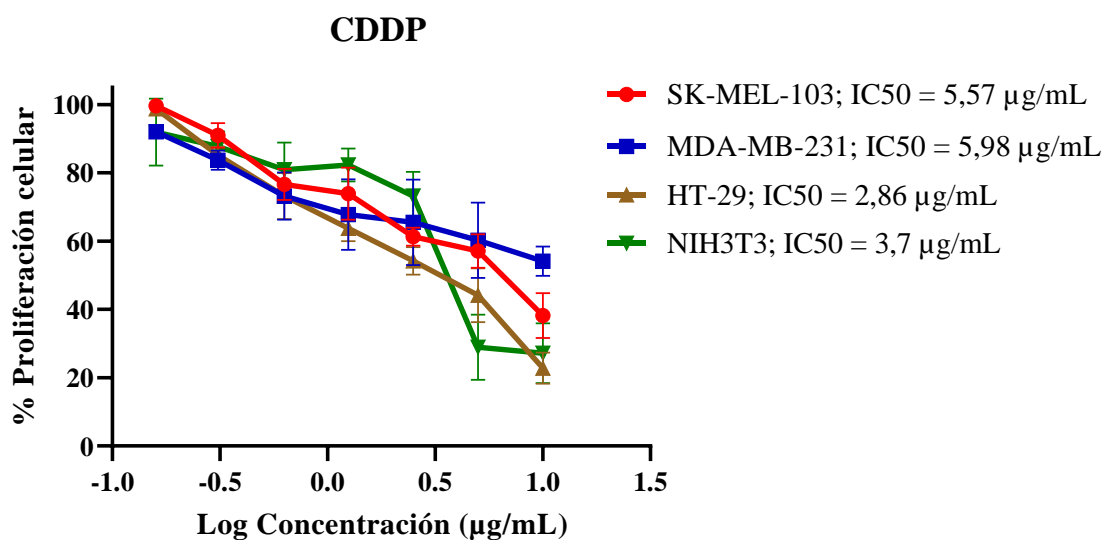
Anexo 11.

cantidad de sólidos totales y de MIX presentes en las diluciones del microencapsulado de *P. alliacea* en los ensayos de proliferación celular MTT

Microencapsulado de <i>P. alliacea</i> (mg/mL)	Sólidos totales (mg/mL)	Mezcla polimérica (MIX) (mg/mL)
71,50	14,30	57,20
35,75	7,15	28,60
17,88	3,58	14,30
8,94	1,79	7,15
4,47	0,89	3,58
2,23	0,45	1,79
1,12	0,22	0,89
0,00	0,00	0,00

Anexo 12.

IC50 obtenidos del ensayo de proliferación celular MTT del Cisplatino (CDDP)



Anexo 13.

IC20 obtenidos del ensayo de proliferación celular MTT en los polímeros encapsulantes

Línea celular	IC 20 de agentes microencapsulantes	
	Maltodextrina	Mix
SK-MEL-103	35,4	15,06
MDA-MB-231	88	13,92
HT-29	48	8,31
NIH3T3	21,45	11,07

Anexo 14.

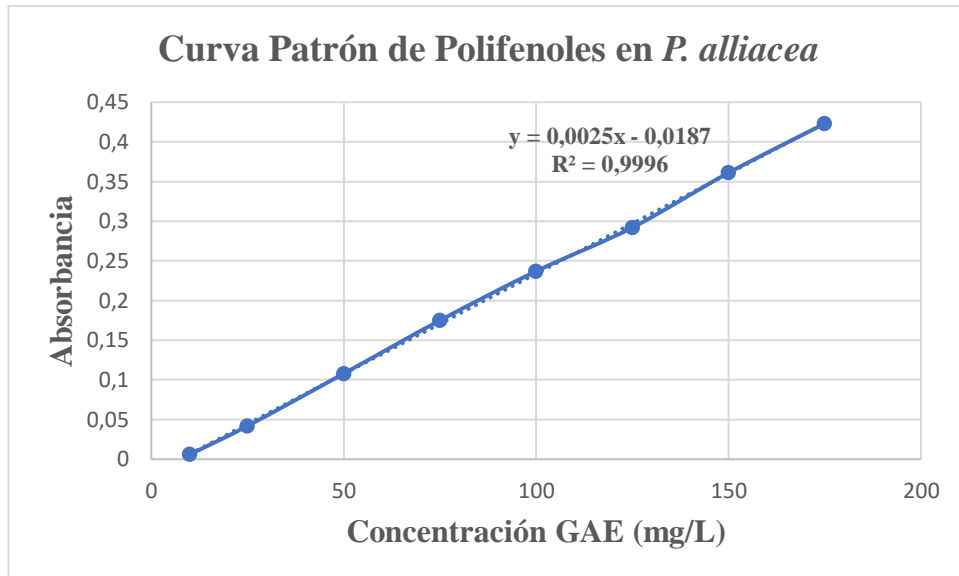
Resultados obtenidos de la viabilidad celular por cristal violeta

Extracto Vegetal	Líneas celulares							
	SK-MEL-103		MDA-MB-231		HT-29		NIH3T3	
	V.C.	D.E.	V.C.	D.E.	V.C.	D.E.	V.C.	D.E.
Control	100	0	100	0	100	0	100	0
Líqu. <i>L. meyenii</i>	30	17,04	29	13,2	44	15,16	17	0,24
Líqu. <i>B. gasipaes</i>	66	2,86	70	6,28	66	3,5	79	5,5
Líqu. <i>P. alliacea</i>	54	6,75	40	12,34	86	1,89	54	25,94
Micro. <i>L. meyenii</i>	23	1,08	24	0,18	39	1,06	70	5,26
Micro. <i>B. gasipaes</i>	20	7,21	21	0,92	28	11,95	20	0,5
Micro. <i>P. alliacea</i>	42	14,09	69	3,69	47	28,03	70	1,64

Liq: Líquido; Micro: Microencapsulado; V.C: Viabilidad celular; D.E: Desviación estándar

Anexo 15.

Curva Patrón con ácido gálico para la cuantificación de polifenoles en P. alliacea



Anexo 16.

Absorbancias a 472 nm para la determinación de carotenoides

Absorbancia	Concentración (mg/L)
0,41	1,05
0,39	0,99
0,47	1,20

Anexo 17.

Resultados obtenidos del análisis de alcaloides en *L. meyenii*



INFORME DE RESULTADOS IDR 33699-2022

Fecha: 19 de septiembre del 2022

DATOS DEL CLIENTE						
Nombre	CASTILLO SOLIS FABIAN CARLOS					
Dirección	Ambato					
Teléfono	0995227250					
Contacto	Sr. Fabian Castillo					
DATOS DE LA MUESTRA						
Tipo de muestra	Extracto de maca		Cantidad	Aprox. 25 mL		
No. de muestras	1 (n=1)		Lote	N/A		
Presentación	Frasco ámbar		Fecha de recepción	13 de septiembre del 2022		
Colecta de muestra	Realizado por el CLIENTE		Fecha colecta de muestra	N/A		
CONDICIONES DEL ANALISIS						
Temperatura (°C)	24.1		Humedad (%)	50.0		
Fecha de Inicio de Análisis	16 de septiembre del 2022					
Fecha de Finalización del análisis	16 de septiembre del 2022					
RESULTADOS						
CODIGO CLIENTE	CODIGO UBA	PARAMETROS	METODO	RESULTADOS	Unidad	Límite de Cuantificación
Extracto de Maca	UBA-33699-1	Alcaloides Totales	Rojas et. al. 2015 (Espectrofotometría)	90.67	mg/L	-
Observaciones:						
<ol style="list-style-type: none"> Los resultados emitidos en este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) recibidas por el laboratorio. No siendo extensivo a cualquier lote. Este reporte no debe ser reproducido parcial o totalmente, excepto con la aprobación escrita por parte del laboratorio. Nomenclatura: N.D. = No Detectable; N.A. = No aplica; AA = Aminoácidos La información relacionada con la toma de muestra fue proporcionada por el cliente. El Laboratorio no se responsabiliza de la veracidad de la información que ha sido proporcionada por el cliente y que puede afectar directamente a la validez de los resultados. 						

FOR ADM. 04 R01

Página 1 de 1



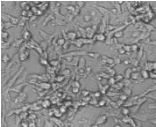
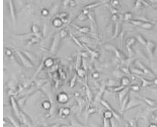
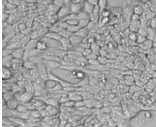
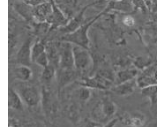
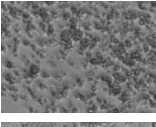
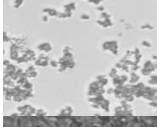
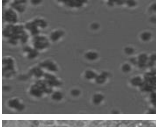
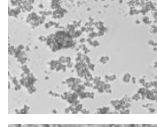
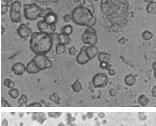
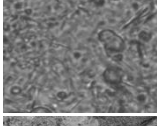
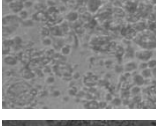
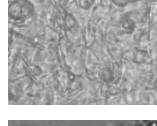
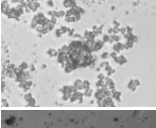
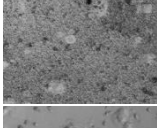
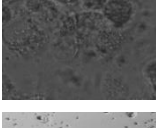
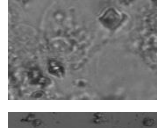
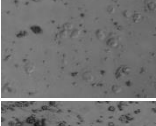
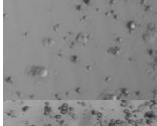
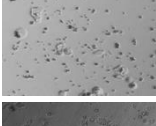
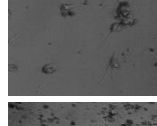
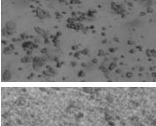
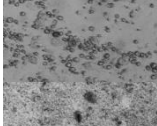
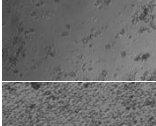
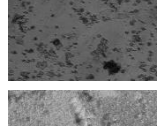
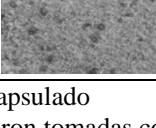
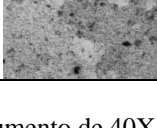
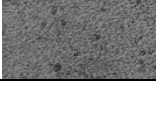
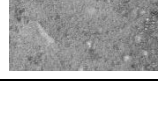
Av. Carlos L. Plaza Dañín, Cda. La FAE Mz. 20 solar 12 (Frente al primer bloque de la Atarazana)
 Conmutador: 04 2288 578 / 04 6017 745 Celular: 09 9273 7500 / 09 8478 0671
 Email: nmontoya@uba-lab.com
 Guayaquil - Ecuador

www.uba-lab.com

CERTIFICACIÓN ELECTRONICA
 MARCO CERTIF. DEL ECUADOR
 Firmado Digitalmente por: NELSON BOLIVAR MONTOYA VILLAMAR
 Razón Social: EXCELENCIA QUÍMICA SA EXCELOQUÍMICA
 Cargo: GERENTE GENERAL
 Hora oficial Ecuador: 19/09/2022 17:54

Anexo 18.

Imágenes de microscopía a las concentraciones máximas evaluadas

Extracto vegetal	SK-MEL-103	MDA-MB-231	HT-29	NIH3T3
Control				
Líquido <i>L. meyenii</i>				
Líquido <i>B. gasipaes</i>				
Líquido <i>P. alliacea</i>				
Micro. <i>L. meyenii</i>				
Micro. <i>B. gasipaes</i>				
Micro. <i>P. alliacea</i>				

Micro: Microencapsulado




Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 40X

Concentración máxima de los extractos líquidos: 5 mg ST/mL

Concentración máxima de los microencapsulados: 71,5 mg/mL

Anexo 19.

Recolección y lavado del material vegetal

<i>L. meyenii</i>	<i>B. gasipaes</i>	<i>P. alliacea</i>
		

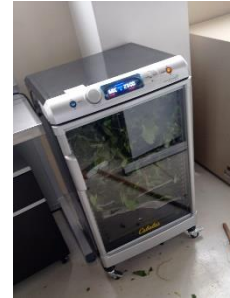
Anexo 20.

Secado del material vegetal

B. gasipaes



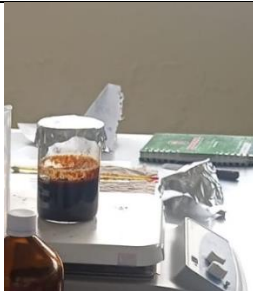
P. alliacea



Anexo 21.

Obtención de los extractos vegetales

L. meyenii



B. gasipaes



P. alliacea



Anexo 22.

Retiro del material vegetal excedente mediante centrifugación y filtración

L. meyenii



B. gasipaes






P. alliacea




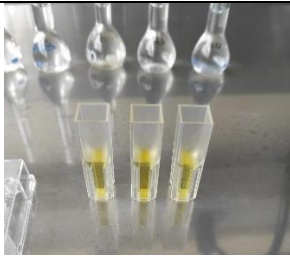
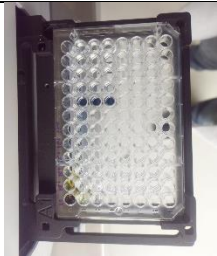
Anexo 23.

Rotaevaporación de los extractos vegetales

<i>L. meyenii</i>	<i>B. gasipaes</i>	<i>P. alliacea</i>
		

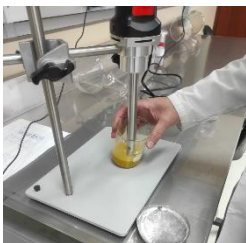


Anexo 24.

Cuantificación de sólidos totales y determinación de metabolitos

Medición de sólidos totales	Lectura de carotenoides	Folin-Ciocalteu
		

Anexo 25.

Proceso de la microencapsulación mediante secado por aspersión

Homogeneización de <i>B. gasipaes</i>	Homogeneización de <i>P. alliacea</i>	Secado por aspersión
		

Anexo 26.

Proceso de cultivo celular



Anexo 27.

Adición de extractos vegetales y ensayos de proliferación y viabilidad

