



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

---

**“Evaluación del efecto biológico de microencapsulados del  
extracto de *Ruta chalepensis* L. y del aceite esencial *Syzygium  
aromaticum* L. en un modelo *in vitro* de infección por  
*Entamoeba histolytica*”**

## **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**Doctora En Ciencias Y Tecnología Farmacéutica**

**PRESENTA:**

**M. en C. y T.F Euridice Ladisu Mejía Argueta**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Jonnathan G. Santillán Benítez**

**CODIRECTOR**

**Dra. Miriam V. Flores Merino**

**TUTOR**

**Dra. Claudia Cervantes Rebolledo**





## Contenido

Índice de figuras.....	5
Resumen .....	7
<b>1. Introducción .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Mecanismo de virulencia.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Estrategias posibles para crear nuevos tratamientos.....</b>	<b>14</b>
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Plantas medicinales.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Sistemas de liberación.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Planteamiento de Problema .....</b>	<b>18</b>
<b>4. Justificación .....</b>	<b>19</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Objetivo General.....</b>	<b>20</b>
<b>6.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>20</b>
<b>7. Materiales y métodos .....</b>	<b>21</b>
<b>7.1 Estrategia metodológica .....</b>	<b>21</b>
<b>7.2 Variables de estudio.....</b>	<b>21</b>
<b>7.3 Criterios .....</b>	<b>21</b>
<b>7.4 Implicaciones Bioéticas .....</b>	<b>22</b>
<b>7.5 Colecta del material vegetal y caracterización.....</b>	<b>22</b>
a) Cromatografía en capa fina (TLC).....	22
b) Otros análisis fitoquímicos .....	23
c) Análisis de la composición química por GC-MS .....	23
<b>7.6 Microencapsulación .....</b>	<b>24</b>
a) Rendimiento y eficiencia de encapsulación .....	24
b) Microscopia de contrastes de fases .....	25
c) Degradación de las microesferas .....	25
d) Cinética de liberación .....	25
e) Prueba de esterilidad.....	28
f) Hemocompatibilidad .....	28
<b>7.7 Actividad antiparasitaria .....</b>	<b>29</b>
<b>7.8 Eritrofagocitosis.....</b>	<b>30</b>
<b>7.9 Actividad hemolítica.....</b>	<b>30</b>

<b>7.10</b>	<b>Actividad proteolítica</b> .....	<b>30</b>
<b>7.11</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>31</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de alginato sódico con CaCl <sub>2</sub> formando la caja de huevo.....	17
Figura 2. Cromatografía en capa fina de RuME .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 3. Microesferas secas obtenidas de RuME, RuME+mzl, CIEO, CIEO+mzl respectivamente.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 5. A; Microesferas en tamiz de no. 40 aún húmedas y B; microesferas secas en tamiz no. 20 y 10. .	
Figura 6. Comparación de cinética de la inhibición de crecimiento de E. histolytica con los diferentes tratamientos. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 7. Degranulación de leucocitos (a, b, c, d) y agregación de plaquetas (A, B, C, D). RuME (a, A) RuME+mzl (b, B), CIEO (c,C), CIEO+mzl (d, D) a 100x.....	
Figura 8. Ensayo de hemocompatibilidad de las microesferas de izquierda a derecha RuMe, RuME+mzl, CIEO, CIEO+mzl, control + (H <sub>2</sub> O) y control - (solución salina) .....	



## Resumen

La *Entamoeba histolytica* es la segunda causa de muerte por un parásito protozoario que produce enfermedades gastrointestinales o abscesos hepáticos. Su tratamiento es el metronidazol, pero los tratamientos prolongados provocan neurotoxicidad, genotoxicidad, citogenotoxicidad, etc. Por ello, es necesario investigar otros compuestos biológicos, por ejemplo, los metabolitos secundarios de las plantas. El extracto metanólico de *Ruta chalepensis* L. (RME) y el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (CIEO) fueron sometidos a pruebas de actividad antiamebiana solos y combinados con metronidazol (MZL). El CIEO contenía eugenol y alfa-cariofileno, mientras que el RME tenía flavonoides y fenoles. El CIEO combinado con MZL tuvo la mayor actividad antiamebiana en sus diferentes concentraciones (240 mg/mL con 0,05 mg/mL respectivamente) con una inhibición del crecimiento del 66,66 %. El análisis estadístico mostró diferencias significativas para los tratamientos, las concentraciones y el tiempo con sus interacciones (Inhibición del crecimiento\*Tratamiento, Inhibición del crecimiento\*Concentración, Tratamiento\*Concentración, Inhibición del crecimiento\*Concentración\*Tratamiento) a las 24 h.

Además, se prepararon las microesferas de alginato con extracto de metanol de ruda y aceite esencial de clavo con metronidazol para evaluar las actividades biológicas y fisicoquímicas. Estas tuvieron una esfericidad igual a uno, con una eficacia de encapsulación superior al 50 % (excepto CIEO en 220 nm). Su degradación se registró entre el 8-12 % en pH ácido y básico. Además, su cinética de liberación tuvo una constante de estallido en casi todos los tratamientos, siendo el comportamiento de Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin de comportamiento pseudoficticio. Las microesferas fueron hemocompatibles según la normativa (<10%) y además disminuyeron los factores

de virulencia de la ameba, como las actividades hemolíticas, proteolítica y eritrofagocítica.

Dichos productos de esta investigación pueden ser prometedores para uso como adyuvantes. No obstante, deben determinarse otros parámetros de toxicidad (es decir, citotoxicidad, citocompatibilidad, bioseguridad, peso corporal, riesgo de mortalidad, índice de peso multiorgánico, histopatología de daños en órganos, bioquímica sérica, etc.). Y los parámetros fisicoquímicos (es decir, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopia infrarroja de transformación de Fourier, viscosidad).

## 1. Introducción

Las infecciones parasitarias se encuentran entre las 20 principales causas de enfermedad en México, 53% de la población total diagnosticada con enteroparásitos<sup>1</sup>. La amebiasis es producida por *E. histolytica* y más comúnmente, evoluciona cuando el parásito se propaga por contigüidad a la región perianal y genital en infecciones secundarias. La prevalencia en México es de 49.1 % en niños y en 53 % de la población en general<sup>2-4</sup>.

La mayoría de las infecciones por *E. histolytica* son asintomáticas<sup>5</sup>; sin embargo, algunos individuos pueden desarrollar colitis amebiana y abscesos potencialmente mortales.<sup>6,7</sup> *E. histolytica* es la segunda causa de muerte debida a un parásito<sup>8</sup>. La transmisión de *E. histolytica* suele producirse por la excreción fecal de quistes seguida de la ingestión oral de agua potable o alimentos contaminados.<sup>9</sup>

*E. histolytica*, puede presentar dos formas: trofozoíto o quiste. El trofozoíto es la forma activa, que se reproduce mediante fisión binaria, y que es capaz de invadir los tejidos del hospedador. Los trofozoítos (10-60  $\mu\text{m}$ ) se caracterizan por ser uninucleados y moverse rápidamente emitiendo pseudópodos anchos, unidireccionales. Tienen capacidad fagocítica y pueden ingerir microorganismos en el intestino delgado, así como glóbulos rojos durante la invasión al hospedador, constituyendo la fagocitosis uno de los factores determinantes de la virulencia del parásito<sup>10,11</sup>.

Para *E. histolytica* la principal fuente de energía es la glucosa, pero no desarrolla el ciclo de Krebs ni la fosforilación oxidativa. La glucólisis se produce en el citosol y el paso último de piruvato a acetil-CoA está mediado por piruvato ferredoxin óxido reductasa. La activación del fármaco por excelencia, el metronidazol, está ligado a este sistema enzimático. La ferredoxina cede los electrones al grupo nitro del fármaco, un profármaco, activándolo. Las especies reactivas (nitroimidazol) generadas serán las que ostenten la actividad antiparasitaria<sup>12</sup>.

*E. histolytica* es anaerobio o microaerófilo, pero puede acceder al torrente circulatorio, donde la presión parcial de oxígeno es superior, y debe afrontar el estrés oxidativo. Esto se debe a que puede acceder al torrente circulatorio, donde la presión parcial de oxígeno es superior, y debe afrontar el estrés oxidativo. Cuenta con una protección antioxidante muy notable que está relacionada con su virulencia y que le permite sobrevivir en el proceso de diseminación, así como hacer frente a la respuesta defensiva del hospedador que involucra a neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos secretan una gran variedad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como enzimas proteolíticas<sup>13</sup>.

### **1.1 Mecanismo de virulencia**

El ciclo biológico de *E. histolytica* es un ciclo directo que consiste en que los quistes tetranucleados (10-20 µm) entran en el hospedador por vía oral (agua o alimentos contaminados) y avanzan por el tubo digestivo llegando al intestino grueso, donde se abren y emerge un organismo tetranucleado, que sufre una serie de divisiones que originan ocho pequeños trofozoítos metaquísticos, que pueden establecerse en el colon o el recto. Los trofozoítos se establecen en el intestino grueso donde el peristaltismo es menor y allí se multiplican por fisión binaria. En la mayoría de los casos, *E. histolytica* se comporta como un comensal y los trofozoítos que son arrastrados a la parte distal se enquistan y son eliminados, con las heces, al medio externo. En un 10 % de los casos, el parásito invade la pared intestinal<sup>13</sup>, destruyendo la mucosa y la capa muscular; cuando se encuentra en la submucosa se extiende radialmente en lo que se conoce como úlcera en “botón de camisa” o “cuello de botella”.

En la fase invasiva, el trofozoíto debe destruir la capa de mucina que recubre el epitelio del colon como el principal obstáculo para invadirlo, por lo que se han desarrollado sofisticados mecanismos para penetrarla<sup>14</sup>. Para que los trofozoítos de *E. histolytica* logren acceder al epitelio por proteólisis de la mucina MUC2 (principal componente glucoproteico de la mucosa intestinal)<sup>15,16</sup> y ejerza su potencial patógeno sobre las células del huésped, es necesario que se establezca un contacto

directo por medio de la interacción entre lectinas del parásito (Gal/GalNAc) y las glucoproteínas presentes en la mucina del colon<sup>13,17</sup>.

La adherencia se realiza gracias a la acción citolítica de las enzimas proteolíticas que el parásito posee, como proteasas y amebaporos<sup>15,18</sup>. La extensión y profundidad de la acción citolítica determinan la aparición de úlceras de diversos tamaños, las cuales, generalmente, terminan en la perforación de la luz de la pared intestinal.<sup>13,18,19</sup>

La muerte celular por invasión con *E. histolytica* depende del contacto; por lo tanto, la adherencia a las células del huésped es de importancia crítica en la patogénesis de la amebiasis intestinal y, también, en el desarrollo del absceso amebiano.<sup>13,20</sup>

La citólisis dependiente del contacto ocasiona el aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e induce la apoptosis; además, la lectina Gal/GalNAc (que permite la colonización, enquistamiento, invasión y evasión del sistema inmune) es la responsable de la citotoxicidad directa que causa en los hepatocitos, reflejado *in vitro* por los cambios morfológicos (vacuolización) y la presencia de núcleos picnóticos típicos del fenómeno apoptótico, lo que demuestra que tiene una participación mayor en la patogénesis del absceso hepático de la que se creía<sup>21</sup>.

Por otro lado, los amebaporos son enzimas proteolíticas (colagenasas y proteasas) que facilitan la invasión de los tejidos, permeabilizan la membrana y se insertan en la bicapa lipídica de la membrana de la célula diana por la unión con fosfolípidos aniónicos a bajo pH; esto ocasiona la degradación del colágeno y los oligosacáridos de la matriz celular, formándose canales por los que se difunden el agua, los iones (salida de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y otras pequeñas moléculas; en consecuencia, el medio celular interno cambia y se produce la lisis celular por choque osmótico<sup>11,22,23</sup>. Su función es eliminar las bacterias ingeridas dentro de las vacuolas digestivas<sup>24</sup> y pueden inducir la necrosis de células epiteliales y leucocitos durante la invasión del parásito<sup>15</sup>. Los amebaporos comprenden tres isoformas, amebaporo A, amebaporo B y amebaporo C.

Otros factores de virulencia de esta ameba son las proteasas de cisteína son enzimas proteolíticas secretadas por la ameba dentro de su microambiente, destruyen los tejidos humanos, pues degradan distintos componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágeno, entre otros)<sup>25</sup> y separan las células, facilitando la invasión. Las proteasas de cisteína se consideran como uno de los ejes centrales de las interacciones de la *E. histolytica* con la respuesta inmune y no inmune del huésped. Están involucradas en la evasión de la respuesta inmune debido a que degradan inmunoglobulinas, como IgA e IgG, componentes de la respuesta humoral inmune, y también degradan la proteína precursora proIL-18, responsable de la maduración de la citocina IL-18, clave en los procesos proinflamatorios y una importante mediadora de la respuesta Th1; además, inducen la activación de macrófagos y la secreción del IFN, eventos primordiales en el ataque contra los trofozoítos<sup>26</sup>. Como las proteasas de cisteína también están involucradas en el reclutamiento de células inflamatorias para la respuesta local a la invasión, activan el complemento por la vía alterna, por escisión directa de la cadena alfa del C3, pero degradan el C3a y C5a, anafilotoxinas generadas por la activación de la cascada del complemento<sup>25</sup>.

En este sentido, las proteasas EhCP1, EhCP2 y EhCP5 están localizadas dentro de las vacuolas digestivas, pero, además, las EhCP5 y EhCP112 están presentes en la superficie del trofozoíto. EhCP5 rompe la capa de mucina en su dominio carboxi-terminal, lo cual favorece la invasión y favorece la diseminación a hígado<sup>27</sup>.

Además, la fagocitosis es un proceso activo en *E. histolytica* que durante mucho tiempo se ha considerado un indicador de virulencia (eritrofagocitosis) para diferenciar microscópicamente *E. histolytica* de *E. dispar*, ya que en esta última no se presenta<sup>28</sup>.

Este proceso involucra la polimerización de la actina por un gran número de preteínas y contribuye al daño que realiza en el tejido este parásito<sup>29</sup>, es el paso final en la vía de la apoptosis y sirve para limitar la inflamación, previniendo el derrame al medio del contenido intracelular tóxico de las células muertas. En *E.*

*histolytica*, la ingestión de células muertas podría limitar igualmente la respuesta inflamatoria del huésped y permitir que este protozoo establezca una infección persistente.

En el caso de la amibiasis, la tensión de oxígeno puede ser uno de los factores que pueden condicionar su sobrevivencia. En cultivo *in vitro*, este parásito microaerófilo puede tolerar hasta un 5 % de concentración de oxígeno; sin embargo, durante la invasión tisular el parásito tiene que lidiar con el mayor contenido de oxígeno. En tejidos la concentración parcial de oxígeno va de un 4 a 14 %; además en los tejidos invadidos por los trofozoítos se presentan especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) derivadas del huésped<sup>22</sup>.

Para manejar estos ambientes de alta tensión de oxígeno y de radicales libres. La ameba ha desarrollado vías de reducción de oxígeno amebiano (ORP), entre las que se encuentran:

oFDP (Proteína flavodiiron): transforma  $O_2$  en  $H_2O$  por el uso de Fe como su reductor.

oNADPH (Flavin Oxidoreductasa: Eh34): reduce el  $O_2$  en  $H_2O_2$  en el gasto de oxidación de NADPH.

oPRX (Peroxiredoxina: Eh29): detoxifica el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ .

La regulación de la proteína PRX ha mostrado que, en tejidos oxigenados como el hígado, ocurre detoxificación del  $H_2O_2$  intracelular generado por la reducción de  $O_2$  por la Eh34, el cual es importante para la supervivencia amebiana y por lo tanto para su patogenicidad. Así el papel principal de FDP, Eh34 y PRX, es posiblemente la generación de un ambiente hipóxico intracelular a nivel tolerable para el metabolismo de la ameba. Los datos sugieren que a mayor nivel de ORP mostrado por *E. histolytica* permite su sobrevivencia en los tejidos al disminuir y detoxificar oxidantes intracelulares y reparar las proteínas dañadas para permitir flujos metabólicos, replicación y evasión inmune<sup>30</sup>.

En este sentido cabe resaltar la importancia de la actividad antiinflamatoria, ya que es un mecanismo fisiopatológico básico, la magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial pues una respuesta inflamatoria insuficiente resulta en inmunodeficiencia, lo cual puede conducir desde una infección hasta cáncer<sup>31</sup>.

Por ello, es importante buscar fármacos que sean más efectivos respecto a los que se tienen en el mercado ya que el metronidazol al menos para tratamiento de infecciones amebicas tiene algunas desventajas como efectos adversos a largo plazo (es decir, neurotoxicidad, genotoxicidad, citogenicidad, etc.)<sup>32-34</sup>. Por ello, los productos naturales representan una opción para buscar y desarrollar nuevos fármacos que sean selectivos, efectivos y de menor costo<sup>35,36</sup>.

## **1.2 Estrategias posibles para crear nuevos tratamientos**

Tomando en cuenta que los efectos adversos provocados por metronidazol en tratamientos prolongados han incrementado a lo largo de los años, entonces las plantas medicinales podrían ser una excelente alternativa ya que son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana. En este sentido, existen estudios realizados por la OMS mostraron que entre el 70 y 80 % de la población recurre a las plantas para curar diversos padecimientos que van desde un resfriado hasta enfermedades de tipo gastrointestinal, dermatitis, antiinflamatorios, antioxidantes<sup>37,38</sup>, de las 30 000 especies de plantas registradas para México, se calcula que al menos el 50 % se utiliza para satisfacer alguna necesidad humana y las plantas medicinales ocupan el principal porcentaje<sup>39</sup>. Es importante mencionar que la existencia de esta medicina tradicional en México tiene el tercer lugar de la clasificación mundial<sup>40</sup> y la mayoría de personas recurren a su uso. Entre las que se encuentra el uso de *Ruta chalepensis* L. y *Syzygium aromaticum* L.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Plantas medicinales

Los extractos de plantas han sido empleados por el hombre en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Estos son mezclas complejas de metabolitos secundarios lipófilos volátiles, que son extraídos de las plantas con disolventes y destilación por arrastre de vapor<sup>41</sup>. Los factores ambientales, la etapa de crecimiento y la salud de la planta determinan las concentraciones de los extractos<sup>42</sup>. Por lo que en esta sección se muestran estudios realizados acerca de la ruda y el clavo como antimicrobianos.

Pathak *et al.* (2006) y Pandey *et al.* (2011-2012) demostraron que el extracto hidroalcohólico de hojas de ruda puede ser usado como un potente antiparasitario, antioxidante y antimicrobiano. Pandey *et al.* demostraron que el extracto de ruda (*Ruta graveolens* L.) disminuyó la incidencia y gravedad de diarreas en ratones. Los constituyentes químicos del aceite esencial de ruda son: carvacrol, timol, terpineno, limoneno y linalol; dependiendo del origen y tipo de planta poseen efectos antimicrobianos, antifúngicos y antioxidantes<sup>43-45</sup>.

Otro ejemplo son los extractos metanólico y de acetato de etilo de *S. aromaticum* que presentaron actividad contra el parásito *Plasmodium falciparum*, reportando  $CI_{50}$  de 6.25 y 13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>46</sup>. Se encontró que el ácido betulínico aislado de las hojas del clavo tiene potencial anticancerígeno frente a la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 con una  $CI_{50}$  de  $33 \pm 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>47</sup>; además se evaluaron extractos y aceites esenciales de esta planta contra células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, DU-145 (líneas de cáncer uterino, adenocarcinoma de mama, cáncer de mama, cáncer prostático respectivamente), siendo los aceites esenciales los de mayor actividad antiproliferativa<sup>48,49</sup>.

Y para aumentar su focalización de estos principios activos es necesario tener una forma farmacéutica para así disminuir la degradación, volatilidad.

## **2.2 Sistemas de liberación**

La microencapsulación es una técnica que favorece la protección y retención de sustancias líquidas, sólidas, gaseosas mediante un polímero tal como el alginato de sodio el cual forma una pared que evita que el principio activo se volatilice, degrade o reaccione con otras sustancias<sup>50</sup>. El alginato de sodio es un polímero biodegradable y biocompatible compuesto por algas pardas que actúa como estabilizante, aglutinante, espesante, brindando una liberación del principio activo encapsulado<sup>51</sup>. Es un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones. La microencapsulación es la técnica de obtención de una barrera que retarda las reacciones químicas con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del producto, la liberación gradual del compuesto encapsulado e incluso facilitando su manipulación al convertir un material líquido o gaseoso a una forma sólida llamada microcápsula esta, consiste en una membrana esférica, semipermeable, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que varía de pocos micrones a 1000  $\mu\text{m}$ . El núcleo que compone la microcápsula es también denominado fase interna o principio activo, así como a la membrana se puede nombrar capa externa o matriz<sup>52</sup>.

Los hidrocoloides han sido empleados como matriz debido a su capacidad para absorber agua, fácil manipulación e inocuidad. El alginato es un hidrocoloide que posee tanto estas características como propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes, también es descrito como un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico proveniente de algas marinas conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) y el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) que se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM-) o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-). Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen

de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido en G.<sup>53</sup>

El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes (excepto el magnesio) donde el ión calcio es el más empleado por la industria alimentaria. La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre un G-bloque de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro G-bloque contenido en otra molécula de alginato a través del ion calcio (Figura 1).<sup>53</sup>

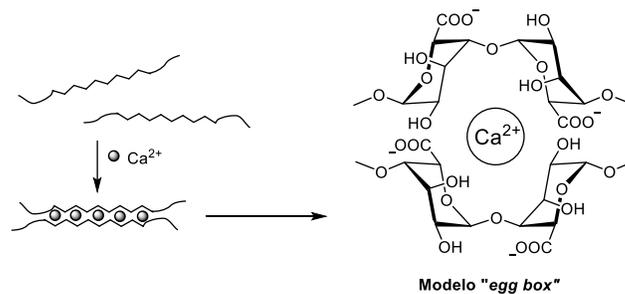


Figura 1. Mecanismo de alginato sódico con  $\text{CaCl}_2$  formando la caja de huevo.

La característica esencial que deben poseer los biomateriales para ser empleados en el campo de la biomedicina es la biocompatibilidad que se refiere a la característica del biomaterial de tener la habilidad de desarrollar su función con una respuesta favorable del huésped hacia él mismo en una aplicación delimitada. La capa o andamio generado, una vez en uso, se encontrará en contacto con el ambiente de la herida o zona afectada, por lo que el material debe ser compatible con las células nativas del huésped sin provocar efectos citotóxicos<sup>54</sup>.

Las pruebas de biocompatibilidad son una estrategia para evaluar materiales para regenerar tejidos funcionales, en esta estrategia se estudian los procesos fisiopatológicos *in vivo* e *in vitro* mediante selección de células y materiales de acuerdo con las condiciones metabólicas y mecánicas de la zona por reparar. Es por esto por lo que los biomateriales deben tener propiedades y características específicas respecto a la superficie a reparar. Tan importante es el proceso de biocompatibilidad que los estudios realizados en este ámbito deben ser realizados

de acuerdo a la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), siguiendo la guía internacional ISO-10993 (estudios de biocompatibilidad)<sup>55</sup>.

En la actualidad hay una extensa búsqueda de terapias como adyuvantes antimicrobianos para combatir patógenos como es la *E. histolytica* causante amebiasis, por lo que este estudio se enfoca en determinar la actividad antiparasitaria de las microesferas de alginato del extracto y del aceite esencial, así como su hemocompatibilidad.

### **3. Planteamiento de Problema**

Las infecciones parasitarias se encuentran entre las 20 principales causas de enfermedad en México, con un 53 % de la población diagnosticada con enteroparásitos<sup>1</sup>. La mayoría de las infecciones por *E. histolytica* son asintomáticas<sup>5</sup>; sin embargo, algunos individuos pueden desarrollar colitis amebiana y abscesos potencialmente mortales<sup>6,7</sup>. *E. histolytica* es la segunda causa de muerte debida a un parásito protozoario<sup>8</sup>. En este sentido, el principal tratamiento actual para la amebiasis son los compuestos de nitroimidazol, aunque no eliminan los parásitos de la luz del colon, por lo que es necesario un régimen de tratamiento multimedicamentoso. Por ejemplo, el metronidazol, un compuesto de 5-nitroimidazol, es eficaz contra las bacterias anaerobias, enfermedades protozoarias, y el tratamiento por excelencia. Aunque provoca efectos adversos (i.e., neurotoxicidad, genotoxicidad, citogenicidad, etc.)<sup>32-34</sup>. Por esta razón, es fundamental la investigación de fármacos ameboides más seguros que el metronidazol. Así, los productos naturales representan una opción para tratamientos selectivos, seguros y de menor costo<sup>35,36</sup>.

En el caso de la ruda y del clavo son usados en nuestro país y se sabe que son capaces de combatir algunas enfermedades microbianas, pues se ha observado en algunos estudios que los extractos y aceites inhiben el crecimiento de

patógenos gastrointestinales en bacterias gran negativas<sup>43,44</sup> o en parásitos como *Plasmodium*<sup>46</sup> y podrían tener un efecto antiparasitario sobre *E. histolytica*.

Por lo cual la pregunta a este estudio es; ¿los microencapsulados del extracto metanólico de ruda y del aceite esencial de clavo tendrán actividad antiparasitaria sobre *E. histolytica in vitro*, además de una hemocompatibilidad?

#### **4. Justificación**

*E. histolytica* es una ameba la cual es un protozoo que tiene dos estadios (trofozoíto como forma invasiva quiste como fase infectiva) causando amebiasis, colitis amebiana, infecciones cutáneas y abscesos hepáticos. El tratamiento por excelencia para combatirla es el metronidazol pero en usos prolongados se ve afectada la integridad del paciente por sus efectos secundarios (es decir, neurotoxicidad, genotoxicidad, citogenicidad, etc.)<sup>32-34</sup>. Debido a lo anterior se buscan nuevas alternativas de tratamiento para diferentes enfermedades infecciosas siendo los extractos de plantas un posible tratamiento debido a la eficacia en comunidades rurales. Además, que existen estudios que han probado su eficacia con algunos parásitos como *Plasmodium*<sup>46</sup>. Adicionalmente, el uso de biomateriales se ha extendido como una alternativa a los métodos tradicionales de liberación de medicamentos. Es por lo que la microencapsulación con alginato que tienen la capacidad de liberar fármacos de manera controlada representa una alternativa terapéutica interesante ante diferentes patologías debido al poder de encapsulamiento o mejora de liberación de principios activos difíciles de administrar como lo son los activos de plantas medicinales por ejemplo del extracto metanólico de ruda o del aceite esencial de clavo con posible actividad antiparasitaria sobre *E. histolytica*.

## 5. Hipótesis

Los microencapsulados de alginato del extracto metanólico de *Ruta chalepensis* L. y del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L, tendrán actividad antiparasitaria sobre *Entamoeba histolytica* y serán hemocompatibles *in vitro*.

## 6. Objetivo General

Evaluar la actividad antiparasitaria sobre *Entamoeba histolytica* y la hemocompatibilidad *in vitro* de los microencapsulados de alginato-extracto metanólico de *Ruta chalepensis* L. y alginato-aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L solos y con metronidazol.

### 6.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar los microencapsulados alginato-extracto metanólico de *R. chalepensis* y alginato-aceite esencial de *S. aromaticum* solos y con metronidazol.
- Determinar la cinética de liberación, modelos, así como la eficiencia de encapsulación de los microencapsulados del extracto metanólico de *R. chalepensis* y del aceite esencial de *S. aromaticum* solos y con metronidazol.
- Evaluar la hemocompatibilidad en eritrocitos, plaquetas y linfocitos a través de la prueba de hemólisis, agregación plaquetaria; degranulación, al estar en contacto con los microencapsulados solos y con metronidazol.
- Evaluar la actividad antiparasitaria del extracto y aceite esencial sobre *Entamoeba histolytica in vitro* así como su concentración inhibitoria.
- Determinar la actividad proteolítica, hemolítica y eritrofagocítica de *E. histolytica*.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Estrategia metodológica

- **Diseño:** Experimental.
- **Universo:** No aplica por la naturaleza del tipo de estudio. Sólo en la prueba de hemocompatibilidad se requieren adultos sanos entre 18 y 60 años.
- **Tipo de muestreo:** No aplica por la naturaleza del tipo de estudio, sólo en la prueba de hemocompatibilidad será por conveniencia, participantes con una edad entre 18 y 60 años.
- **Tamaño de muestra:** Cada experimento se realizará por triplicado, incluida la prueba de hemocompatibilidad.

### 7.2 Variables de estudio

- **Independientes.** Concentración del extracto metanólico de ruda y el aceite esencial de clavo cargado en el microencapsulado, método de microencapsulación.
- **Dependientes:** Tamaño de gota del microencapsulado, porcentaje de liberación del extracto y/o aceite esencial del microencapsulado, estabilidad, eficiencia de encapsulación, rendimiento de encapsulación, % de hemólisis, agregación plaquetaria, degranulación, grado de inhibición de los microorganismos de prueba *in vitro* e *in vivo*, eritrofagocitosis, actividad hemolítica y proteolítica.
- **Intervinientes:** Calidad de la microencapsulación, condiciones de obtención de muestras y características idiosincráticas del donador de sangre periférica.

### 7.3 Criterios

Inclusión, exclusión y eliminación, no aplican por la naturaleza del estudio. Sólo en la prueba de hemocompatibilidad se incluirán 3 adultos sanos, entre 18 y 60 años, de sexo femenino o masculino; se excluirán y eliminarán aquellos adultos que

presenten alguna enfermedad de cualquier etiología o que hayan consumido algún fármaco que altere el número y la morfología de los eritrocitos (aspirina, AINES, antibióticos, entre otros) entre las 24 y 48 h previas a la muestra de sangre.

#### **7.4 Implicaciones Bioéticas**

Todos los estudios que involucran el uso de muestras de humanos donadas fueron realizados bajo el artículo 323 de la Ley general de Salud sobre el consentimiento expreso de la donación de sangre, la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la clasificación y especificaciones de manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos y la declaración de Helsinki (Brasil, 2013). Los métodos utilizados para recoger muestras de sangre humana fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación del Centro de Investigación en Ciencias Médicas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM, 2019/P23), y con número de registro aprobado por el Comité 2019/26 del CEI/CICMED.

#### **7.5 Colecta del material vegetal y caracterización**

Se recolectó la ruda (*R. chalepensis*) y se compró clavo (*S. aromaticum*) en el municipio de El Oro, México con coordenadas geográficas 19° 48'03 " N 100° 07'53 " W. El extracto de ruda (RuME) se obtuvo por maceración, luego se filtró y se evaporó utilizando un evaporador rotatorio; sus componentes se analizaron mediante TLC (para el extracto) y CG-MS. El aceite esencial de clavo (CIEO) se obtuvo por hidrodestilación, y sus componentes se analizaron mediante CG-MS.

##### **a) Cromatografía en capa fina (TLC)**

Cromatografía de capa fina unidimensional ascendente, en sílice (gel 60 F254: 20 x 20 cm (Merck), y como eluyente se utilizó una mezcla de acetato de etilo y hexano en una proporción de 70:30 % (v/v) de fase superior y otra capa con metanol y acetona 50: 50 % (v/v). Las placas se visualizaron con luz ultravioleta a una longitud

de onda de 366 nm, y la segunda placa se reveló rociando el reactivo Neu. Los estándares fueron la quercetina, la naringina, la luteolina y el kaempferol, adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.), se prepararon como soluciones al 0.5 % en metanol y se utilizaron 10  $\mu$ L en la placa cromatográfica.

#### b) Otros análisis fitoquímicos

La presencia de flavonoides y fenoles se determinó cualitativamente para E con los métodos de Folin-Ciocalteu (fenoles) y Shinoda (flavonoides). Posteriormente, un nanoespectrofotómetro (UV-VIS) escaneó a 0.001 mg / mL para determinar la longitud de onda de los picos máximos.

#### c) Análisis de la composición química por GC-MS

Se inyectó 1 $\mu$ L de extracto metanólico de ruda y aceite esencial de clavo en el equipo a una concentración de 3mg/mL. Se utilizó un cromatógrafo 6850 Network GC System de Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas 5975C VL MSD con detector de triple eje de la misma marca, equipado con una columna capilar RTX de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu$ m de espesor. Compuesta por dimetilpolisiloxano (95 %) y fenilpolisiloxano (5 %).

El modo de inyección utilizado fue un Split, radio 80:1, flujo corriente 37 cm/seg. La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: temperatura inicial de 70 °C durante dos minutos, después se incrementó a un ritmo de 8 °C/min hasta alcanzar los 270 °C y después a 10 °C/min durante seis minutos El tiempo total fue de 75 min; temperatura de la línea de transferencia 290 °C. Los espectros de masas obtenidos por impacto electrónico; se obtuvieron con 70 electronvoltios (eV) y se detectaron en un rango de masas de 35 a 600 m/z. Se utilizó helio como gas de arrastre. La identificación de los componentes individuales se realizó utilizando las bibliotecas espectrales GC-MS (NIST 2008 y Wiley 8NO8) y el PubMed Compound del National Center of Biotechnology Information (NCBI)<sup>56</sup>.

## 7.6 Microencapsulación

Las emulsiones de alginato con el extracto y el aceite esencial seleccionadas se prepararon con una solución de alginato de sodio (1.5 % p / v) y de CaCl<sub>2</sub> (1.3 % p/v) por disolución en agua destilada a 35 °C. La dilución se dejará agitar a 200 rpm en un agitador magnético durante 2 horas c/u<sup>57,58</sup>. Las emulsiones se prepararon mediante la mezcla de aceite esencial de clavo o el extracto y ambos con metronidazol con la solución de alginato para alcanzar una concentración final para el aceite de 240 mg/mL, para el aceite con metronidazol 240 mg/mL+ 0.05 mg/mL, para el extracto 100 mg/mL y extracto con metronidazol de 100 mg/mL + 0.05 mg/mL (la concentración del aceite esencial o del extracto se determinó en la prueba de cinética liberación).

El proceso es por extrusión con una jeringa a través de una pipeta de 10 mL y se gotean en una solución de CaCl<sub>2</sub>. Solución gelificante de CaCl<sub>2</sub> (1.3 % p / v) para formar microesferas cargadas con el extracto y aceite esencial con y sin metronidazol. La punta de la aguja se fija a 10 cm por encima de la superficie del baño de gelificación. La tasa de caída se fija en 30 gotas por minuto. Posteriormente se filtran, tamizan y secan en estufa a 40 °C por 12 h.

### a) Rendimiento y eficiencia de encapsulación

El rendimiento de las microesferas se determinó comparando el peso total de las microesferas formadas con el peso combinado del copolímero y el fármaco<sup>59</sup>.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{masa de microesferas obtenidas}}{\text{peso total del extracto o aceite y alginato}} \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

Y para determinar el % de eficiencia de encapsulación, se suspendieron cantidades exactamente pesadas (200 mg) de microesferas en 30 mL de tampón fosfato (pH= 7.4) y se agitaron en sonicador o baño ultrasónico en baño maría hasta la completa disolución de las microesferas. A continuación, la solución se centrifugó a 9000 rpm durante 5 min y se determinó el contenido de total en el sobrenadante mediante UV-

VIS a las longitudes de onda respectivas de los barridos. El % se calculó mediante la siguiente ecuación<sup>60</sup>:

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{cantidad total cargada de microesfera}}{\text{cantidad inicial de microesfera}} \times 100 \text{ (Ec. 2)}$$

b) Microscopia de contrastes de fases

Para examinar las muestras se utilizó un tipo de imagen de contraste de fase (PCI) que utiliza dos microscopios de contraste de fase invertidos TCM 400 (LABOMED, China). Las muestras se montaron en portaobjetos de vidrio y se observaron con diferentes aumentos de 4, 20 y 40x<sup>61</sup>.

c) Degradación de las microesferas

La degradación de estos materiales se midió después de obtener y secar las microesferas. El procedimiento consistió en colocar 1 microesfera por tratamiento en solución de PBS pH=7.4 y una solución de HCl a pH=1.2 en condiciones estáticas y de T ambiente. Finalmente, la tasa de degradación de todos los materiales se midió como degradación (D) hasta que el peso total de la muestra se estabilizó. El peso máximo fue el inicial fijándose 100 %. El DR se calculó de acuerdo con la (Ec. 3)<sup>62</sup>:

$$D = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) * 100 \text{ (Ec. 3)}$$

d) Cinética de liberación

El extracto o aceite esencial con y sin metronidazol liberado se cuantifica por espectrofotometría a 220, 300, 320 nm para el aceite y para el extracto a 220, 300 y 320 de acuerdo con los barridos haciendo uso de un disolutor (PT-DDS4 - Pharma Test) colocando 5 microesferas por tratamiento a un pH de 1.2 (2 g de NaCl en 7 mL de HCl conc.) y otro de 7.2 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) realizando alícuotas a los 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 y 120 min utilizando el método de las paletas (método II) en un disolutor previamente calibrado, la velocidad de agitación de las paletas fue de 75 rpm a una temperatura de 37 ± 0.5°C en vaso de 900 mL tomando alícuotas de 3 mL en cada tiempo sin recuperar el buffer<sup>63-65</sup>.

Además de ello se realizarán modelos matemáticos sobre las cinéticas de liberación que se mencionan a continuación;

- Orden 0: Es un modelo ampliamente utilizado para sistemas de dosificación que no se desagregan haciendo muy lenta la liberación del fármaco. Para este modelo, se asume que el área de la tableta no cambia considerablemente y que no se forman condiciones de equilibrio material. Este es expresado a partir de la siguiente ecuación:

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde  $Q_t$  es la cantidad de fármaco disuelto en el tiempo  $t$ ,  $Q_0$  es la cantidad de droga inicial en la solución (la mayoría de las veces  $Q_0 = 0$ ) y  $k_0$  corresponde a la constante de liberación de orden cero<sup>66</sup>.

- Orden 1: Este modelo es utilizado para describir la absorción y la liberación de algunos fármacos desde matrices porosas. La liberación de los fármacos que siguen esta cinética se puede expresar mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Log}C_1 = \text{Log}C_0 - \frac{k_1}{2.303} t \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde  $C_t$  es la cantidad de fármaco remanente al tiempo  $t$ ,  $C_0$  es la cantidad inicial de fármaco en la solución y  $k_1$  es la constante de liberación de primer orden. A medida que la cantidad de fármaco en estado sólido disminuye, la concentración del medio de disolución se va enriqueciendo con el soluto, por lo que el proceso de liberación es condicionado por el punto de saturación del soluto<sup>66</sup>.

- Korsmeyer-Peppas: Este modelo permite explicar mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz, siendo un modelo generalizado de la ecuación de Higuchi. Ha sido ampliamente usado para describir la liberación de fármacos desde sistemas poliméricos. La ecuación es la siguiente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_r t^n \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde  $M_t/M_\infty$  corresponde a la fracción de fármaco liberado al tiempo  $t$ ;  $K_r$  es la constante de liberación que es característica para las interacciones polímero-fármaco, mientras que  $n$  es igual al exponente de difusión que es característico del mecanismo de liberación. Un valor de  $n$  igual a 0.5, indica que el mecanismo de liberación del fármaco es de tipo fickiano; valores entre 0.5 y 1 indican un mecanismo de liberación no fickiano, mientras que  $n$  igual a 1, sugiere que el mecanismo es similar a una cinética de liberación de orden cero. Para valores mayores a 1, la liberación del fármaco depende de la relajación de las cadenas poliméricas en la matriz, que pasan de un estado vídrioso a uno gomoso de mayor movimiento cinético. La determinación del exponente  $n$  se debe realizar con el 60 % del fármaco disuelto<sup>67</sup>.

- Peppas-Sahlin: En el sistema de película fina (geometría plana), el mecanismo de liberación puede clasificarse como difusión fickiana ( $n \leq 0,5$ ), difusión no fickiana (anómala) ( $0,5 < n < 1$ ), y difusión de caso II ( $n = 1$ ), según los valores de  $n$ . Dicho modelo se describe mediante la ecuación siguiente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_d t^m + K_r t^{am} \text{ (Ec. 7)}$$

Donde  $M_t/M_\infty$  corresponde a la fracción de fármaco liberado al tiempo  $t$ ,  $K_d$  es constante cinética de Fickian,  $K_r$  es la constante de velocidad de erosión, y  $m$  es el exponente de difusión de Fickian. El mecanismo de liberación puede clasificarse como difusión ( $|K_d / K_r| > 1$ ), erosión (o relajación) ( $|K_d / K_r| < 1$ ), y coexistencia de difusión y erosión ( $|K_d / K_r| = 1$ ), según la relación  $|K_d / K_r|$ <sup>68,69</sup>.

- Weibull: Se ha aplicado a un gran número de mecanismos para estudiar la cinética de procesos heterogéneos y para ajustar la liberación de fármacos por nanosistemas la cual sigue la siguiente ecuación:

$$Q_t = (100 - Q_0) \left[ 1 - e^{-\left(\frac{t}{T_d}\right)^\beta} \right] \text{ (Ec. 8)}$$

Donde  $Q_0$  es tiempo de liberación,  $Q_t$  es el % de fármaco liberado en el tiempo  $t$ ;  $T_d$ , tiempo después de la liberación del 63,2% del fármaco de la formulación;  $\beta$ ,

parámetro de forma en el modelo de Weibull;  $a$ ,  $b$ , pendiente e intersección del gráfico que representa el proceso de liberación<sup>70,71</sup>.

e) Prueba de esterilidad

Las microesferas se colocan en frascos estériles colocándose en la campana de flujo laminar por 10 min en luz UV. La esterilidad de las microesferas se confirma incubando una parte del lote estéril a una T de incubación de 37 °C en caldo nutritivo por 5 d<sup>65,72</sup>.

f) Hemocompatibilidad

Previo al ensayo las muestras de microesferas se desinfectan en campana de flujo laminar. Se colectarán muestras sanguíneas de voluntarios en tubos Vacutainer con heparina. El ensayo hemolítico se determina por medio de los métodos de contacto directo, de acuerdo con la norma ISO 10 993-4 (1992) con los requisitos generales para la evaluación de las interacciones de los dispositivos médicos con sangre, en función de la actividad hemolítica de los geles de alginato.

Prueba de hemólisis: Las muestras de sangre se centrifugan a 3000 rpm durante un min se retiran con pipeta Pasteur y se lavan con solución salina, se centrifugan tres veces y se obtiene la suspensión total de eritrocitos hasta obtener una solución de 5 % de eritrocitos. Posteriormente se colocan en cada tubo 1000 uL de eritrocitos al 5 % y las microesferas de cada tratamiento y controles (250 uL) para incubarse 1 h a 37 °C bajo condiciones estáticas. Esta técnica se lee utilizando 150 uL de cada muestra en una placa a una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de emisión de 630 nm en un lector de microplacas (Stat Fax 2100 Microplate Reader, Awareness Technology Inc.). Después, se calcularon los porcentajes de hemólisis utilizando la absorbancia de la muestra y los datos de los controles (el negativo solución salina y el positivo, agua destilada).

$$\% \text{ hemolisis} = \frac{\text{Absorbancia problema} - \text{Absorbancia control negativo}}{\text{Abs control positivo} - \text{Abs control negativo}} \times 100 \text{ (Ec. 8)}$$

Prueba de activación plaquetaria: Las muestras de sangre se centrifugan a 1200 rpm. durante 10 min para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). La separación

de los elementos de la sangre se realizará en función de la densidad. Las microesferas se incubarán con PRP durante 1 h a 37 °C bajo condiciones estáticas, posteriormente se realiza un frotis y se realiza la tinción Wright. El porcentaje de activación plaquetaria se realiza en función del número de agregados plaquetarios observados en microscopio.

Prueba de degranulación de leucocitos y viabilidad en células mononucleares. Se obtienen los leucocitos identificando la capa Buffy Coat (BC) que se refiere a la capa leuco-plaquetaria que se encuentra en la parte inmediata superior a la capa roja y que se obtiene centrifugando las muestras a 1200 r.p.m. durante 10 minutos. Esta capa contiene menos del 1 % del volumen total de la muestra de sangre, por lo que debe manejarse cuidadosamente. Las microesferas se incuban con la BC durante 1 h a 37 °C bajo condiciones estáticas, para permitir el contacto con el material evaluado. Por medio de la tinción Wright en el frotis se evaluará la actividad.

### **7.7 Actividad antiparasitaria**

Mantenimiento de cepa: Los trofozoitos de *E. histolytica* (HM1-IMSS) se resiembran con  $2 \times 10^4$  cel/mL tanto en el medio TYI-S-33 (MICROLAB laboratories), contenido en tubos de borosilicato de 16X150 mm con tapón de rosca, agregando a cada tubo 1 mL de suero (MICROLAB laboratories), 0.1mL de solución penicilina-estreptomicina (Sigma Aldrich) (1000 X) y posteriormente se incubarán a 37 °C durante 72 h.

Cinética de crecimiento: Para evaluar se cuentan  $6.25 \times 10^4$  trofozoitos colocados en 1.2 mL de medio de cultivo TYI-S-33 en tubos de poliestireno, con diferentes concentraciones de extracto (100, 50, 25, 13,5, 7- 25 mg / mL) o de aceite esencial (240, 120, 60, 30, 15 mg / mL), también se incluyeron controles de cultivo, tanto positivos (tratados con metronidazol 0.1 mg / mL) como negativos (sin tratamiento). En las otras dos cinéticas se utilizaron las concentraciones del extracto y del aceite descritas anteriormente, con una concentración diferente de metronidazol (0.025 y 0.05 mg / mL) para cada condición a 37 ° C. Para determinar la cinética de

crecimiento, se contó el número de trofozoítos a las 24, 48, y 72 h, donde los tubos colocados en hielo durante 5 min, a continuación, 50  $\mu$ L de alícuota añadido 50  $\mu$ L de azul de tripán (un colorante que permite diferenciar las células vivas de las células muertas) en la cámara de Neubauer.

### **7.8 Eritrofagocitosis**

Brevemente, se incubaron  $100 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica* con  $500 \times 10^6$  eritrocitos humanos (control), y los tratamientos (tres microesferas por tratamiento) se mantuvieron durante 15 min a 37 °C en 1 mL de PBS, y luego se centrifugaron a 500 g durante 3 min. Se utilizó el choque osmótico (0,4 mL de agua) y 1 mL de PBS para lisar los eritrocitos no fagocitados. A continuación, se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 g. El pellet se limpió añadiendo 0,5 mL de ácido fórmico y luego 0,5 mL de PBS. En un espectrofotómetro Lambda Bio+ se midió la absorbancia a 397 nm (PerkinElmer)<sup>73</sup>.

### **7.9 Actividad hemolítica**

Se mantuvieron tres microesferas por tratamiento durante una hora a 37 °C en 1 mL de PBS con trofozoítos de *E. histolytica* ( $100 \times 10^6$ ) y  $500 \times 10^6$  eritrocitos humanos (control). A continuación, se procedió a la centrifugación a 560 g durante 3 minutos para evaluar la absorbancia de la hemoglobina. En un espectrofotómetro Lambda Bio+ (PerkinElmer), se midió la absorbancia de la hemoglobina dentro del sobrenadante a 570 nm<sup>73</sup>.

### **7.10 Actividad proteolítica**

Se congelaron  $100 \times 10^6$  *E. histolytica* en 0,2 mL de solución salina tamponada con fosfato y 0,4 mL de azocaseína (2,5 mg/mL) para lisarlos. La reacción se terminó utilizando 0,6 mL de tricloroacético refrigerado durante cinco minutos a 4500 g, así como se midió la absorbancia en el sobrenadante a 366 nm en un espectrofotómetro Lambda Bio+ (PerkinElmer)<sup>74</sup>.

## 7.11 Análisis estadístico

Los datos obtenidos son las desviaciones estándar de al menos 3 experimentos diferentes. Dado que nuestros datos de inhibición del crecimiento amebiano no cumplían la normalidad al realizar pruebas estadísticas como el diagrama de dispersión y el ANOVA, decidimos realizar una regresión logística. Las diferencias significativas se compararon con la media de trofozoítos muertos (potencial de inhibición) para el tiempo, las concentraciones y los tratamientos utilizando un valor crítico de  $P < 0,05$  para todas las evaluaciones utilizando InfoStat 2020 con regresión logística binaria ( $r^2$ ), Akaike, SC y  $-2\log$  utilizando SAS 9.4. Los datos se presentaron como la media  $\pm$  SD.

Además, se utilizó un modelo de regresión logística (Ecuación 9) para analizar las posibles diferencias en la cinética, las concentraciones o la interacción entre las concentraciones de la cinética según los tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 h).

$$Y_{ij} = \beta_0 + K_i + C_j + K_i * C_j \dots\dots\dots (Ec. 9)$$

La investigación de la degradación se realizó mediante un ANOVA con bloqueo y una prueba post hoc de Tukey. Se utilizó un ANOVA de tres vías para determinar la cinética de liberación. Se empleó un ANOVA y una prueba post hoc de Tukey para determinar la hemocompatibilidad, mientras que se utilizaron pruebas t con muestras emparejadas para determinar las actividades hemolítica, proteolítica y eritrofagocítica. Al utilizar InfoStat 2020 para determinar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, un valor P inferior a 0,05 se consideró una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados. Se utilizó Origin Pro-2019 para graficar los datos como la media SD de las determinaciones triples y el porcentaje.