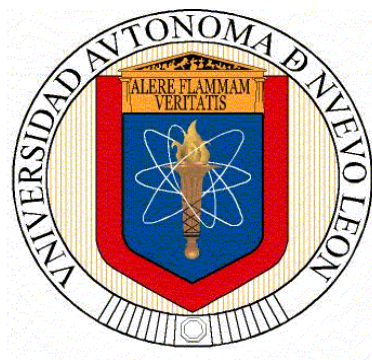


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE POLIFENOLES
ENCAPSULADOS EN NANOPARTÍCULAS BIOCOMPATIBLES
CONTRA EL PSEUDOVIRUS SARS-CoV-2**

POR

L.B.G. AMALIA MARICELA MARTÍNEZ RUÍZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE POLIFENOLES
ENCAPSULADOS EN NANOPARTÍCULAS BIOCOMPATIBLES
CONTRA EL PSEUDOVIRUS SARS-CoV-2**

POR

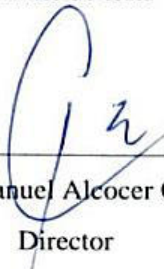
L.B.G. AMALIA MARICELA MARTÍNEZ RUÍZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

2024

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE POLIFENOLES ENCAPSULADOS
EN NANOPARTÍCULAS BIOCOMPATIBLES CONTRA EL PSEUDOVIRUS SARS-CoV-2

Comité de tesis



Dr. Juan Manuel Alcocer González

Director



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretaria



Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal



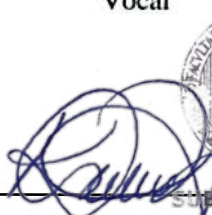
Dra. Cynthia Aracely Alvizo Báez

Vocal



Dra. Lydia Guadalupe Rivera González

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Nino

Subdirectora de posgrado

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación de tesis se llevará a cabo en la Unidad de Inmunología Molecular, perteneciente al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Alcocer González.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, jefa del laboratorio de Inmunología, gracias por permitirme entrar a un laboratorio en donde se me proporcionaron las herramientas necesarias para la elaboración del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González, por su invaluable guía en la toma de decisiones a lo largo de este camino, por confiar en mí y proponer soluciones en conjunto para resolver los problemas enfrentados a lo largo de estos dos años. Gracias por no olvidar el factor humano que se encuentra detrás de todas las personas y permitirme ver mi valor como individuo, así como brindarme de su tiempo para orientarme en la toma de decisiones futuras.

A la Dra. Itza E. Luna Cruz, por confiar en mí y abrirme las puertas de este laboratorio que me ha permitido desarrollarme en cada aspecto de mi vida aprendiendo más de lo que siquiera pensaba que sería capaz. Gracias por su tiempo y su orientación en temas que van más allá de la ciencia y por recordarme que está bien sentir de la manera que siento.

Gracias a los doctores Cynthia Aracely Alvizo Baez, Ashanti Concepción Uscanga Palomeque, Humberto Antonio Salazar Sesatty y Luis Daniel Terrazas Armendáriz, por orientarme en la búsqueda de información requerida sin hacerme sentir mal al respecto.

A todos mis compañeros de laboratorio Mónica, Azael, Barbie, Katia, Mariana, Fernanda, Ariadna, Lili y Lore, gracias por darle color y alegría a cada uno de mis días a pesar de enfrentarnos a las fallas que involucra ser un investigador. Gracias por hacerme sentir segura entre tantos juegos y molestias, me han hecho sentir parte de una familia.

A mis compañeros de generación Ana, Diana, Becky, Alexia y Azael, no pude haber pedido un mejor grupo de personas con las que compartir estos dos años de mi vida, personas inteligentes en el sentido académico y en la vida, que me han enseñado que siempre después de la tormenta viene la calma.

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a mis padres Maricela Ruíz y Antonio Martínez, unas palabras no bastan para expresar el inmenso agradecimiento y amor que me llena, pero intentaré expresarlo primero con decirles gracias. Muchas gracias por su amor incondicional, por apoyarme para tomar cualquier decisión que yo vea necesaria para crecer y estar conmigo para enfrentar las consecuencias. Son las personas más importantes en mi vida, me hacen sentir apreciada porque siempre hablan con orgullo de como su hija “está haciendo la maestría” y “como es biotecnóloga”, espero se den cuenta que todo es gracias a ustedes, pues la verdadera fuente de mi éxito hasta ahora es que ustedes me han brindado todos los privilegios para llegar aquí, no solo económicos sino emocionales también. Los amo más de lo que pueden imaginarse y de nuevo muchas gracias por todo.

A mi hermana Fátima, mi compañera de vida. Gracias por acompañarme en las noches de estrés y ansiedad, aunque mi ánimo no sea el más agradable. Gracias por hacerme reír cuando creo que el mundo se acabó y por saber cuándo simplemente necesito tu presencia sin necesidad de hacer más que ver Tiktoks. Eres la razón por la cual me animo a ser más auténtica y a intentar descubrir que puede hacerme feliz, muchas gracias por impulsarme siempre.

Gracias a mis amigas Ari, Paulina, Elena, Gaby, Paloma, Melissa y Marlon, porque cuando el mundo parece que se vuelve gris, sé que en el momento que les mande mensaje pidiendo ayuda ustedes van a estar ahí. Son personas increíbles y me ayudan a apreciar mi vida desde cada ángulo, gracias por alentarme durante estos dos años presumiéndome como la maestra.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	III
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y APREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1.	1
2.	3
2.1. SARS-CoV-2	3
2.1.1. Historia	3
2.1.2. Generalidades de SAR-CoV-2	4
2.1.3. Ciclo de replicación	4
2.1.4. Proteína S y su participación en el ciclo de replicación como blanco antiviral	5
2.2. Antivirales contra SARS-CoV-2	6
2.2.1. Efecto antiviral de polifenoles	8
2.2.1.1. Quercetina	8
2.2.1.2. Curcumina	10
2.3. Nanopartículas con fines biomédicos	12
2.3.1. Nanopartículas de Quitosán	14
2.3.2. Nanopartículas Magnéticas para envío dirigido de fármacos antivirales	15
2.4. Modelos de infección de SARS-CoV-2 <i>in vitro</i>	17
2.4.1. Pseudovirus de SARS-CoV-2	17
3.	20
4.	21
5.	21
5.1. Objetivos específicos	21
6.	22
6.1. Diagrama General	22
6.2. Síntesis de Nanopartículas	22
6.2.1. Nanopartículas de quitosán	22
6.2.2. Nanopartículas de quitosán con polifenoles encapsulados	23

6.2.3. Nanopartículas Magnéticas	23
6.2.4. Nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán con polifenoles	24
6.3. Caracterización de las nanopartículas	25
6.3.1. Caracterización de tamaño y carga superficial de las nanopartículas	25
6.3.2. Caracterización de tamaño y dispersión de las nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)	25
6.3.3. Caracterización de composición de las nanopartículas por espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	26
6.3.4. Porcentaje de encapsulación y perfil de liberación de fármacos	27
6.3.4.1. Curva de calibración de fármacos	27
6.3.4.1.1. Quercetina	27
6.3.4.1.2. Curcumina	27
6.3.4.2. Eficiencia de encapsulación de los polifenoles	27
6.3.4.3. Perfil de liberación de los fármacos	28
6.4. Evaluación de la citotoxicidad	28
6.4.1. Evaluación de la citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular VeroE6	28
6.4.2. Evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas sobre la línea celular VeroE6	29
6.5. Caracterización de las nanopartículas Ensayo de neutralización de pseudovirus	30
6.5.1. Producción de pseudovirus SARS-CoV-2	30
6.5.2. Ensayo de neutralización del pseudovirus <i>in vitro</i>	31
7. 34	
7.1. Síntesis de las Nanopartículas	34
7.1.1. Síntesis de nanopartículas de quitosán	34
7.1.2. Nanopartículas Magnéticas	34
7.1.3. Síntesis de nanoacarreadores de nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán	35
7.1.4. Síntesis de nanopartículas con quercetina encapsulada	35
7.1.5. Síntesis de nanopartículas con curcumina encapsulada	36
7.2. Caracterización de las Nanopartículas	36
7.2.1. Caracterización de las nanopartículas de Quitosán por tamaño y carga superficial	36
7.2.2. Caracterización de las nanopartículas magnéticas	37
7.2.3. Caracterización de las nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán	37

7.2.4. Caracterización de las nanopartículas con polifenoles encapsulados	38
7.2.4.1. Caracterización de las nanopartículas con Quercetina por DLS	38
7.2.4.2. Caracterización de las nanopartículas con Curcumina por DLS	39
7.2.4.3. Caracterización de la carga superficial de las nanopartículas con Quercetina	39
7.2.4.4. Caracterización de la carga superficial de las nanopartículas con Curcumina	40
7.3. Caracterización de tamaño y forma por microscopía electrónica de barrido (SEM)	40
7.3.1. Caracterización de las nanopartículas con Quercetina por SEM	40
7.3.2. Caracterización de las nanopartículas con Curcumina por SEM	41
7.4. Caracterización de composición de las nanopartículas por espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	42
7.4.1. Caracterización de las nanopartículas con Quercetina encapsulada por FTIR	42
7.4.2. Caracterización de las nanopartículas con Curcumina por FTIR	43
7.5. Porcentaje de encapsulación y perfil de liberación de los polifenoles	44
7.5.1. Curva de calibración de los polifenoles	44
7.5.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación de los polifenoles en nanopartículas	44
7.5.2.1. Eficiencia de encapsulación de Quercetina en nanopartículas	44
7.5.2.2. Eficiencia de encapsulación de Curcumina en nanopartículas	45
7.5.3. Perfil de liberación de los fármacos	46
7.5.3.1. Perfil de liberación de Quercetina de las Q-QNPs	46
7.5.3.2. Perfil de liberación de Quercetina de las Q-QMNPs	46
7.5.3.3. Perfil de liberación de curcumina de los C-QNPs	47
7.5.3.4. Perfil de liberación de curcumina de los C-QMNPs	47
7.6. Evaluación de citotoxicidad	48
7.6.1. Evaluación de citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6	48
7.6.2. Evaluación de citotoxicidad de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6	49
7.7. Ensayo de neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 <i>in vitro</i>	50
7.7.1. Neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> de las nanopartículas con Quercetina	51
7.7.2. Neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> de las nanopartículas con Curcumina	52
8.	54
9.	60

- 10. 63
- 11. 64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cuantificación espectrofotométrica de quercetina para medir la eficiencia de encapsulación en Q-QNPs.
Tabla 2	Cuantificación espectrofotométrica de quercetina para medir la eficiencia de encapsulación en Q-QMNPs.
Tabla 3	Cuantificación espectrofotométrica de quercetina para medir la eficiencia de encapsulación en C-QNPs.
Tabla 4	Cuantificación espectrofotométrica de quercetina para medir la eficiencia de encapsulación en C-QMNPs.
Tabla 5	Concentración citotóxica media (CC50) de los componentes de las nanopartículas.
Tabla 6	Concentración citotóxica media (CC50) de las nanopartículas
Tabla 7	Porcentaje de neutralización promedio de los nanocomplejos con quercetina encapsulada, así como los controles de las nanopartículas solas y quercetina libre.
Tabla 8	Porcentaje de neutralización promedio de las nanopartículas con curcumina encapsulada, así como los controles de las nanopartículas solas y curcumina libre

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Estructura de la proteína S trimérica del SARS-CoV-2 mediante criomicroscopía electrónica.
- Figura 2** Blancos potenciales de inhibición de replicación de SARS-CoV-2 y posibles tratamientos.
- Figura 3** Mecanismos antivirales de acción de la quercetina y derivados
- Figura 4** Posibles blancos de inhibición viral por curcumina en el ciclo de replicación de SARS-CoV-2
- Figura 5** Estrategias para la generación de pseudovirus de SARS-CoV-2 basadas en los sistemas de empacamiento
- Figura 6** Estrategia experimental general
- Figura 7** Metodología de síntesis de las nanopartículas de quitosán por gelación iónica
- Figura 8** Metodología de síntesis de las nanopartículas de quitosán con polifenoles encapsulados mediante el método de gelación iónica
- Figura 9** Metodología de síntesis de las nanopartículas magnéticas por co-precipitación
- Figura 10** Metodología de síntesis de las nanopartículas magnéticas recubiertas por una red de quitosán con los polifenoles encapsulados
- Figura 11** Metodología para la evaluación de tamaño, polidispersión y carga superficial de las nanopartículas
- Figura 12** Metodología de caracterización de tamaño y forma por microscopia electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas
- Figura 13** Metodología para la caracterización de composición de las nanopartículas por espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)
- Figura 14** Generación de las curvas de calibración de quercetina y curcumina
- Figura 15** Evaluación del porcentaje de encapsulación de los polifenoles en las nanopartículas
- Figura 16** Evaluación del perfil de liberación de los polifenoles por las nanopartículas
- Figura 17** Evaluación de la citotoxicidad celular sobre la línea Vero E6

- Figura 18** Metodología para la generación de pseudovirus SARS-CoV-2 en la línea celular HEK293T
- Figura 19** Protocolo de neutralización del pseudovirus por las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6
- Figura 20** Cambio colorimétrico y opacidad por la formación de nanopartículas de quitosán.
- Figura 21** Nanopartículas magnéticas.
- Figura 22** Nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán en solución.
- Figura 23** Nanopartículas de quitosán con quercetina encapsulada.
- Figura 24** Nanopartículas de quitosán con curcumina encapsulada
- Figura 25** Caracterización de nanopartículas de quitosán sintetizadas por gelación iónica.
- Figura 26** Caracterización de nanopartículas magnéticas sintetizadas por coprecipitación.
- Figura 27** Caracterización de nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán sintetizadas mediante gelación iónica.
- Figura 28** Caracterización de tamaño y polidispersión de las nanopartículas con quercetina encapsulada por DLS.
- Figura 29** Caracterización de tamaño y polidispersión de las nanopartículas con curcumina encapsulada por DLS.
- Figura 30** Caracterización de carga superficial de las nanopartículas con quercetina encapsulada por potencial zeta.
- Figura 31** Caracterización de carga superficial de las nanopartículas con curcumina encapsulada por potencial zeta.
- Figura 32** Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas con quercetina encapsulada
- Figura 33** Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas con curcumina encapsulada.
- Figura 34** Análisis de composición química de las nanopartículas de quercetina por FTIR.

- Figura 35** Análisis de composición química de las nanopartículas de curcumina por FTIR.
- Figura 36** Curvas de calibración de los polifenoles.
- Figura 37** Perfil de liberación de quercetina de las nanopartículas Q-QNPs.
- Figura 38** Perfil de liberación de quercetina de las nanopartículas Q-QMNPs.
- Figura 39** Perfil de liberación de curcumina de las nanopartículas C-QNPs.
- Figura 40** Perfil de liberación de curcumina de las nanopartículas C-QMNPs.
- Figura 41** Citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6 determinada por MTT a 48 horas.
- Figura 42** Citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6 determinada por MTT a 48 horas.
- Figura 43** Caracterización de la proteína Spike en el pseudovirus.
- Figura 44** Neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 por quercetina y nanopartículas con quercetina
- Figura 45** Neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 por curcumina y nanopartículas con curcumina encapsulada

LISTA DE SÍMBOLOS Y APREVIATURAS

°C	Grados Celsius
CC₅₀	Concentración Citotóxica media
IC₅₀	Concentración Inhibitoria media
DMEM/F12	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
rpm	Revoluciones Por Minuto
mL	Mililitro
μL	Microlitro
g	Gramo
G	Gauss
mg	Miligramo
nm	Nanómetros
QNPs	Nanopartículas de quitosán
MNPs	Nanopartículas Magnéticas
QMNP_s	Nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán
Q-QNPs	Nanopartículas de quitosán con quercetina encapsulada
Q-QMNP_s	Nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán con quercetina encapsulada
C-QNPs	Nanopartículas de quitosán con quercetina encapsulada
C-QMNP_s	Nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán con curcumina encapsulada
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
PBS	Buffer de fosfato salino
SFB	Suero Fetal Bovino
TPP	Tripolifosfato de sodio
Quit	Quitosán
Que	Quercetina
URL	Unidades Relativas de Luminiscencia
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
pdi	índice de polidispersidad
ζ	Potencial Zeta
NH₄OH	Hidróxido de amonio

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se desarrollaron nanoacarreadores biocompatibles basados en nanopartículas de quitosán y nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán para encapsular a los polifenoles quercetina y curcumina, con la finalidad de desarrollar nuevas terapias para COVID-19. Las nanopartículas sintetizadas mediante gelación iónica demostraron tamaños pequeños que en promedio no exceden los 235 nm, presentan cargas superficiales positivas, morfología esférica y carecen de un efecto citotóxico considerable sobre la línea Vero E6 a las concentraciones de 83.4 μM o 167 μM para las nanopartículas con quercetina, así como 5 y 10 μM para las nanopartículas con curcumina.

La actividad neutralizante de las nanopartículas fue evaluada utilizando un pseudovirus de la variante Alfa de SARS-CoV-2 en células Vero E6, una línea celular permisiva para SARS-CoV-2 debido a su alta cantidad de receptores celulares ACE2 similares al humano. Se demostró una inhibición de la variante Alfa hasta del 80.8% por parte de las Q-QNPs y 79.03% por las Q-QMNPs, superando la capacidad neutralizante de la quercetina libre que neutraliza un máximo de 57.21% en la dosis más alta. La neutralización por estas nanopartículas no fue dosis dependiente, posiblemente debido a los diversos blancos de inhibición viral que presenta la quercetina contra el SARS-CoV-2, los cuales no se limitan a la inhibición de entrada.

Por otro lado, las C-QNPs presentaron una neutralización de 71.24% y 79.17% para las C-QMNPs, contrastante con el 27.3% de la curcumina libre a la concentración de 5 μM , tendencia que no se mantuvo a la concentración de 10 μM , en donde la última obtuvo una neutralización del 92.58%, mientras que las C-QNPs inhibieron un 79.22% y las C-QMNPs un 87.17%, una neutralización inferior no significativa debido a la liberación del fármaco de las nanopartículas.

Con tales datos se abre la posibilidad de que las nanopartículas sintetizadas en este proyecto sean evaluados en un modelo experimental *in vivo*, con la finalidad de tomar ventaja de las cualidades que presentan sobre las moléculas libres en un sistema no estático, determinando si son una alternativa de tratamiento efectiva para combatir el COVID-19.

ABSTRACT

In the present work, biocompatible nanocarriers based on chitosan nanoparticles and chitosan-coated magnetic nanoparticles were developed to encapsulate the polyphenols quercetin and curcumin, with the aim of developing new therapies for COVID-19. The nanoparticles synthesized by ionic gelation demonstrated small sizes that on average do not exceed 235 nm, have positive surface charges, spherical morphology and lack a considerable cytotoxic effect on the Vero E6 cell line at concentrations of 83.4 μ M or 167 μ M for the nanoparticles with quercetin, as well as 5 and 10 μ M for the nanoparticles with curcumin.

The neutralizing activity of the nanoparticles was evaluated using a pseudovirus of the Alpha variant of SARS-CoV-2 in Vero E6 cells, a permissive cell line for SARS-CoV-2 thanks to their high number of ACE2 cellular receptors similar to those of humans. The neutralization of the Alpha variant reached up to 80.8% by the Q-QNPs and up to 79.03% by the Q-QMNPs, exceeding the neutralizing capacity of free quercetin that neutralizes a maximum of 57.21% at the higher dose. Neutralization by these nanoparticles was not dose-dependent, possibly due to the various viral inhibition targets that quercetin has against SARS-CoV-2, which are not limited to entry inhibition.

On the other hand, the C-QNPs presented a neutralization of 71.24% and 79.17% for the C-QMNPs, contrasting with the 27.3% of free curcumin at the concentration of 5 μ M, a trend that was not maintained at the concentration of 10 μ M, where the latter obtained a neutralization of 92.58%, while the C-QNPs inhibited 79.22% and the C-QMNPs 87.17%, a non-significant lower neutralization possibly due to the slow release of the drug from the nanoparticles.

With such data, the possibility opens up for the nanoparticles synthesized in this project to be evaluated in an *in vivo* experimental model, in order to take advantage of the qualities they present over free molecules in a non-static system, determining if they are an alternative effective treatment to combat COVID-19.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad COVID-19 ha generado la pérdida de cerca de 7 millones de vidas y ha infectado a casi 700 millones de personas, dejando daños irreparables en el sector salud, económico y social. El virus SARS-CoV-2 es el agente causal de esta y tiene su origen en el mercado de mariscos mayoristas de Hunan en Wuhan China, a mediados de diciembre de 2019. El SARS-CoV-2 cobró relevancia a menos de un mes de su aparición debido a que las celebraciones de año nuevo chino permitieron su diseminación en todo el país, por lo que la OMS fue alertada el 31 de diciembre del mismo año y por la gravedad denominó al virus como emergencia sanitaria el 30 de enero del siguiente, implementando restricciones con la finalidad de proteger a la población mundial.

El principal factor de preocupación para virus emergentes como este es la falta de tratamientos y vacunas para contrarrestarlos. Al inicio el tratamiento para COVID-19 consistía en tratar los síntomas y monitorear el nivel de oxigenación para evitar una progresión mortal. Fue en mayo del 2020 cuando la FDA en Estados Unidos aceptó el primer tratamiento de emergencia, un antiviral denominado Remdesivir cuya administración intravenosa resultaba efectiva en pacientes con un cuadro grave de la enfermedad, lo que marcó la pauta para la implementación del reposicionamiento de fármacos como una estrategia importante de combatir al SARS-CoV-2.

Si bien actualmente la FDA cuenta con más de 700 fármacos en espera de su aprobación como terapias para COVID-19, hay numerosas publicaciones que resaltan la importancia de los compuestos naturales como agentes antivirales y antiinflamatorios, lo cual los posicionan como una buena estrategia para combatir a este virus, sin embargo, el problema recae en la inestabilidad y falta de biodisponibilidad en condiciones fisiológicas lo que reduce su eficacia.

Para librar estos obstáculos, el presente trabajo de investigación propone la encapsulación de moléculas como la quercetina y curcumina en nanoacarreadores biocompatibles como lo son las nanopartículas de quitosán y nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán, que además de contar con previos reportes de actividad antiviral, permiten tomar ventaja de las cualidades hidrofóbicas de estos compuestos para ser

encapsulados en mayor proporción y protegidos en su interior, para posteriormente ser evaluados con un novedoso modelo de pseudovirus de SARS-CoV-2.

2. ANTECEDENTES

2.1. SARS-CoV-2

2.1.1. Historia

La enfermedad COVID-19 vio su origen a mediados de diciembre de 2019 con el primer brote de casos en Wuhan, una provincia China, después de que 27 pacientes dispersos en múltiples hospitales de la región presentaran neumonía con causa desconocida. Desde el inicio se pensó que la posible causa de esta se tratara de un coronavirus, puesto que la enfermedad compartía síntomas semejantes a brotes anteriores de estos, como el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SAR-CoV-2) en 2002 y el Coronavirus del síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) en 2012 (Zhu et al. 2020; Deng y Peng 2020).

El brote inicial de estos 27 pacientes fue rastreado al mercado mayorista de mariscos de Huanan, clasificado como un “mercado húmedo” definido comúnmente por grandes cantidades de puestos al aire libre con ventas de mariscos frescos, carne, frutas, verduras y en donde incluso se sacrifica a los animales en el sitio, incluidos pollos, pescado y mariscos. Poco tiempo después de ese brote inicial, personas que no habían entrado en contacto con el mercado comenzaron a presentar los mismos síntomas, lo cual significaba una vía de transmisión humano-humano (Maron 2020). Esto denota la severidad de las advertencias de epidemiólogos quienes han expuesto diversas razones por las cuales los mercados húmedos son puntos de preocupación para eventos zoonóticos debido a la falta de higiene, tamaño y por supuesto, transporte de animales exóticos ilegales, entre otros (Lin et al. 2021).

El 31 de diciembre la Comisión de Salud Municipal de Wuhan informó al público, así como a la Organización Mundial de la Salud sobre un brote de neumonía de causa desconocida, pero a las fiestas de inicio del año lunar chino combinado con la alta tasa de infección, esta nueva enfermedad fue diseminada en las 34 provincias de China en menos de un mes. Esto causó que la OMS declarara al brote del nuevo coronavirus como una emergencia de salud pública de importancia internacional el 30 de enero de 2020. Fue el 11 de febrero del mismo año cuando se nombró al nuevo coronavirus "SARS-CoV-2" por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, a la par que la OMS nombraba como "COVID-19" a la enfermedad causada por este (Deng y Peng 2020; Hu et al. 2020).

2.1.2. Generalidades de SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 forma parte de la familia *Coronaviridae* y a la subfamilia *betacoronaviridae*, se trata de un virus de ARN monocatenario sentido positivo con un tamaño del virión de 70 a 90 nm (Pastrian 2020). Sus vías de transmisión conocidas es inhalación de virus, depósito de virus en las membranas mucosas expuestas y tocar las membranas mucosas con las manos contaminadas (Organización Mundial de la Salud, 2021). La infección por SARS-CoV-2 genera una enfermedad con diversos síntomas dependiendo de la variante de la cual el paciente se haya contagiado, siendo los más frecuentes: fiebre con un 81.2% incidencia, tos 58.5%, fatiga 38.5%, disnea 26.1% y esputo 25.8% (Alimohamadi et al. 2020).

El desarrollo de la enfermedad desde un punto de vista clínico suele presentarse en 3 fases, en la inicial, hay una rápida replicación viral dentro de los pulmones y es acompañada de fiebre, tos y otros síntomas que pueden resolverse en unos días; sin embargo, de no ser el caso, la enfermedad puede progresar a la segunda fase, caracterizada por fiebre alta e hipoxemia, derivando en síntomas de neumonía. Con las primeras cepas registradas aproximadamente el 20% de pacientes con COVID-19 que progresaron a la fase dos progresan a la tercera fase, presentando el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y con frecuencia la muerte.

Al igual que el SARS-CoV y el MERS-CoV, este virus causa principalmente enfermedades de las vías respiratorias inferiores, que en el peor de los casos puede derivar en una neumonía mortal caracterizada por una rápida replicación del virus, respuestas elevadas de citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 y TGF β) y quimiocinas (CCL2, CXCL10, CXCL9 e IL-8), junto con niveles bajos de la citocina antiinflamatoria IL-10 y quimiocinas. La infiltración de células inflamatorias como los monocitos-macrófagos y neutrófilos que se acumulan en los pulmones pueden ser los responsables de los aumentos de las citocinas y quimiocinas previamente descritas (Sowers et al. 2020).

2.1.3. Ciclo de replicación

El inicio de replicación está marcado por la unión de las múltiples copias de la proteína S glicosiladas que se encuentran dispuestas en la superficie de la membrana lipídica del SARS-CoV-2 al receptor celular llamado enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), el responsable de mediar la entrada de la partícula viral. Cuando la proteína S se une al receptor, la serina proteasa TM serina 2 (TMPRSS2) ubicada en la membrana de la célula huésped

promueve la entrada del virus a la célula al activar la proteína S. Una vez al interior, el virus libera el ARN viral, las poliproteínas se traducen del genoma de ARN y la replicación y transcripción del genoma se produce a través de la fragmentación de las poliproteínas en proteínas, ensamblando el complejo replicasa-transcriptasa, el cual que permite la replicación, así como síntesis, ensamblado y empaquetado las proteínas estructurales en el interior de la célula huésped, las cuales posteriormente serán liberadas de la célula tomando una sección de su membrana lipídica a donde ha migrado la proteína S y generando una nueva partícula viral infectiva (Huang et al. 2020).

El objetivo de conocer el ciclo de replicación permite determinar los blancos moleculares que podrían ayudar a inhibir o combatir la infección viral desde 4 puntos importantes, la regulación de la respuesta inmune, inhibidores de la ARN polimerasa viral, los modificadores del medio intracelular y los inhibidores de proteasas (Figura 2) (Moneriz y Castro, 2020).

2.1.4. Proteína S y su participación en el ciclo de replicación como blanco antiviral

Como ya se describió brevemente, la proteína Spike (S) del SARS-CoV-2 es la responsable del reconocimiento del receptor y el proceso de fusión de la membrana celular. La proteína S se compone de dos subunidades, S1 y S2, la primera presenta un dominio de unión al receptor (RBD) que reconoce y se une a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), el receptor del hospedero, mientras que la subunidad S2 media la fusión de la membrana celular viral al formar un haz de seis hélices a través del dominio repetido de dos heptadas.

La estructura de la proteína S trimérica del SARS-CoV-2 se determinó mediante criomicroscopía electrónica y presenta una apariencia de un halo bulboso similar a una corona que rodea a la partícula viral, lo que le confiere su nombre (Figura 1). La proteína S cuenta con un peso molecular de entre 180 a 200 kDa, se compone de 1273 aminoácidos y su dominio de unión al receptor (RBD) se encuentra en los residuos 319 a 541 residuos (Huang et al. 2020).

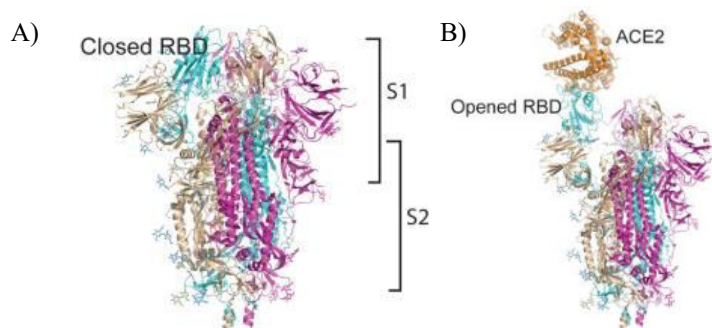


Figura 1. Estructura de la proteína S trimérica del SARS-CoV-2 mediante criomicroscopía electrónica. A) Proteína S con su sitio de unión a receptor cerrado. B) Proteína S reestructurada por la interacción con ACE2 (Huang et al. 2020).

Debido a que el reconocimiento del receptor es mediado por esta proteína y con esto el inicio del ciclo de replicación, así como su alto grado de conservación entre los coronavirus humanos, la proteína S es uno de los objetivos más importantes para el diseño de vacunas y terapias contra el COVID-19 (Huang et al. 2020), sobre todo por la posibilidad de utilizar otros mecanismos no virales o pseudovirales que simulen la entrada celular mediada por esta proteína sin el riesgo de una infección proliferativa, permitiendo el desarrollo de nuevas terapias que cuenten con esta molécula como blanco en laboratorios con un nivel de bioseguridad 2.

2.2. Antivirales contra SARS-CoV-2

Las estrategias para contrarrestar al SARS-CoV-2 comenzaron con tratamientos sintomáticos enfocados a los malestares más comunes como fiebre y su consecuente malestar generalizado. Los AINE (Antiinflamatorios no esteroides) como el ibuprofeno son los medicamentos más recetados para este tipo de aproximación, pues se encargan de reducir el dolor, fiebre e inflamación. Sin embargo, el objetivo del desarrollo o reposicionamiento de fármacos y antivirales está enfocado a detener el ingreso viral a la célula y/o su ciclo de replicación.

Actualmente, la FDA ha registrado más de 700 fármacos en estudios para posibles tratamientos contra el COVID-19. Estos se dividen en tres categorías principales: fármacos antivirales (3 aprobados) enfocados en reducir la replicación viral; fármacos inmunomoduladores (4 aprobados), que tienen como objetivo reducir la hiperinflamación causada por la tormenta de citocinas, y anticuerpos monoclonales, que se centran en neutralizar la entrada del virus en la célula al inhibir la interfaz S-ACE2. Sin embargo, debido a la alta tasa

de mutación del virus, la FDA actualmente no reconoce ninguna de las terapias basadas en anticuerpos monoclonales como seguras (FDA, 2023).

Dentro de la categoría de antivirales, el primer fármaco autorizado fue Remdesivir (Veklury), un análogo de nucleótidos que se administra por vía intravenosa en adultos y niños mayores de 12 años que requieren oxígeno suplementario o que corren con mayor riesgo de enfermarse gravemente. Actualmente, tanto la FDA como la COFEPRIS aprobaron dos tratamientos más. El primero es el Molnupiravir, un antiviral recetado para tratar COVID-19 de leve a moderado, pero que corren un mayor riesgo de enfermarse gravemente y que no pueden recurrir a otras opciones de tratamiento (Gobierno de México, 2022). El segundo es el Paxlovid, recetado para la misma categoría de pacientes, con la ventaja añadida de que se trata de un tratamiento oral que combina dos fármacos en un solo producto: el Nirmatrelvir, que bloquea la actividad de la proteasa 3CLpro, una enzima necesaria para la replicación viral, y el Ritonavir, que ayuda a ralentizar la descomposición del Nirmatrelvir (Gobierno de México, 2023).

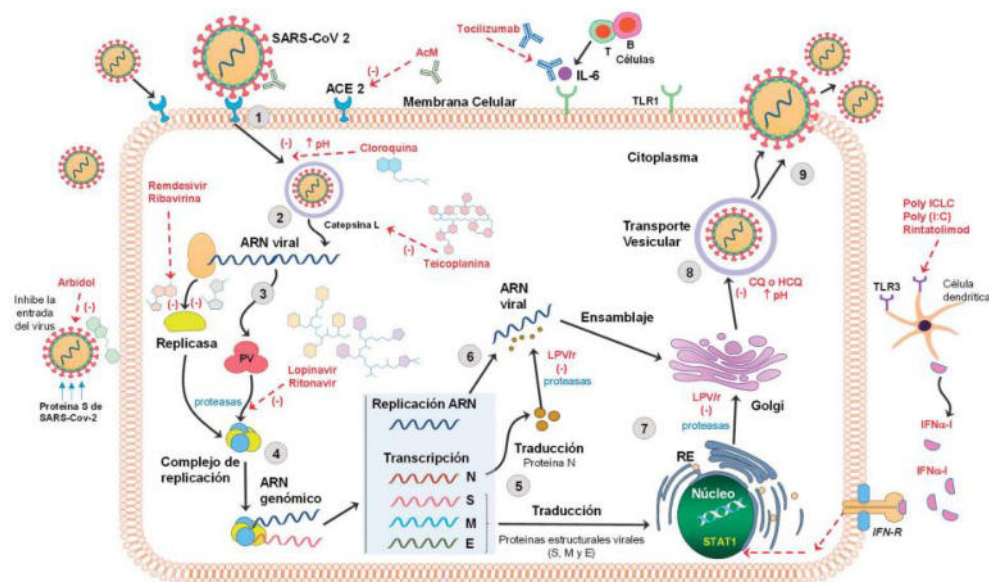


Figura 2. Blancos potenciales de inhibición de replicación de SARS-CoV-2 y posibles tratamientos (Moneriz y Castro, 2020).

Actualmente continúa la búsqueda de compuestos que puedan combatir el SARS-CoV-2 mediante la inhibición de la entrada viral o la replicación en el interior de la célula, siendo el uso de moléculas de origen natural con propiedades antivirales como los polifenoles una de las aproximaciones más prometedoras.

2.2.1. Efecto antiviral de polifenoles

Los polifenoles son la clase de compuestos bioactivos no energéticos más grandes en la naturaleza y presentan la capacidad de modular la actividad de diferentes enzimas y, con esto interferir en mecanismos de señalización de distintos procesos celulares. Los polifenoles participan en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción, parcialmente debido a sus características fisicoquímicas (Quiñones et al. 2012), por lo que se ha demostrado que además de presentar actividad antiinflamatoria y antioxidante, también poseen actividad antiviral contra distintos virus de interés que por su transmisión por vías aéreas y su replicación en el tracto respiratorio, como el Virus de Epstein-Barr, enterovirus 71, virus del herpes simple (HSV), virus de la influenza y coronavirus (Annunziata et al. 2020).

2.2.1.1. Quercetina

La quercetina es el principal representante de los flavonoides, una subclase de polifenoles altamente estudiados que se encuentra principalmente en espárragos, cebollas, manzanas y moras (Nishimuro et al. 2015). Dentro de sus propiedades más importantes se conocen sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, inmunoprotectores, actividades anticancerígenas y antidiabéticas (Xu et al. 2019; Carullo et al. 2017), sin embargo, debido a su alta hidrofobicidad y fácil degradación, su aplicación está limitada en sistemas alimentarios hidrofílicos (Frenzel y Steffen, 2015).

Reportes previos señalan a la quercetina como una molécula de amplio espectro antiviral, con efecto en las familias *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Retroviridae*, *Picornaviridae*, *Pneumoviridae*, *Filoviridae* y la de mayor importancia para este proyecto, *Coronaviridae*. Su rango de acción va desde la inhibición de la actividad de NS3 de manera dosis específica dependiente para el virus de la hepatitis C (Bachmetov et al. 2012) hasta la inhibición de la neuraminidasa (NA) expresada en la envoltura del virus de influenza H1N1, lo cual limita la liberación de las partículas virales y, por lo tanto, su capacidad para infectar células nuevas (Liu et al. 2016).

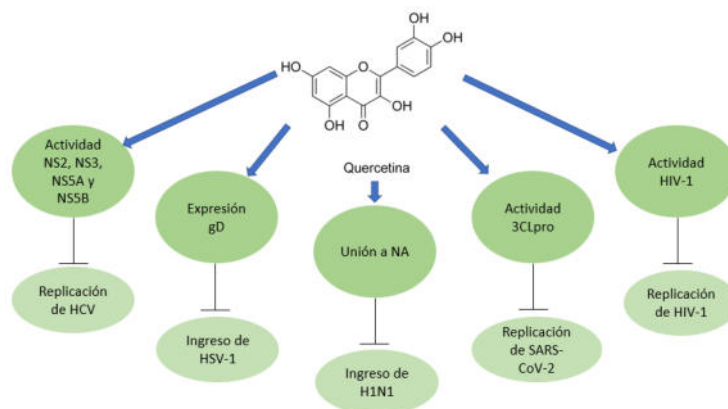


Figura 3. Mecanismos antivirales de acción de la quercetina y derivados (Di Petrillo et al. 2021).

El interés hacia uso de quercetina como un posible tratamiento para COVID-19 va más allá de sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, las cuales podrían aminorar los efectos de la tormenta de citocinas generada por la infección de SARS-CoV-2. El enfoque de este proyecto se basa en reportes previos que mencionan la afinidad de la molécula tanto para el dominio de unión a receptor (RBD) de la proteína S como para el receptor celular (ACE2), por lo cual podría interponerse en la interfaz proteína-receptor inhibiendo el reconocimiento inicial para dar inicio al ciclo de replicación, posicionándola como una molécula estratégica para neutralizar la replicación viral.

Adicionalmente reportes previos identifican las distintas EC_{50} e IC_{50} de quercetina contra SARS-CoV sobre distintos blancos moleculares en el ciclo de replicación, encontrando que el IC_{50} de la interacción entre la proteína S con ACE2 es de $83.4 \mu M$, para la inhibición de la actividad 3CLpro es un $IC_{50} 52.7 \mu M$, la inhibición de la actividad de PLpro tiene un $IC_{50} 8.6 \mu M$ y la actividad helicasa se inhibe con un IC_{50} de $8.1 \mu M$ (Prasansuklab et al. 2020) con un CC_{50} de $301.5 \mu M$ sobre la línea celular Vero E6 (Kandeil et al. 2021), lo que la denota como una molécula inocua que puede ser utilizada como profiláctico y como tratamiento para COVID-19 sin riesgos superiores de efectos secundarios negativos para los pacientes.

Estudios clínicos previos demuestran que la quercetina ayuda a la disminución de síntomas, así como del periodo de tiempo de enfermedades del tracto respiratorio superior e inferior cuando se ingiere en mayores proporciones. Dos de los estudios fueron aplicados a maratonistas y encontraron una disminución estadísticamente significativa de síntomas de infección del tracto respiratorio superior dos semanas posteriores al maratón (Nieman et al.

2007), así como que en adultos de 40 años o más que tomaron una dosis de 1000 mg diaria de quercetina oral adicionada con vitamina C mostraron una reducción del 36% en la gravedad de infección del tracto respiratorio superior y una reducción del 31% en el total de días de enfermedad en comparación con el placebo (Heinz et al. 2010).

Actualmente se está desarrollando un estudio clínico en Turquía (NCT04377789) titulado “Quercetina para la profilaxis y tratamiento de COVID-19” para evaluar el efecto profiláctico de la quercetina glicosilada, una molécula más soluble y altamente biodisponible en la luz del intestino, esto con la justificación de que el COVID-19 está acompañado de una reacción inmunitaria excesiva en los casos graves, por lo que fuerte actividad antiinflamatoria y antioxidante de la quercetina puede ser eficaz tanto como profiláctico como en el tratamiento de los casos con COVID-19 (Brito et al. 2021).

2.2.1.2. Curcumina

La curcumina es el segundo compuesto de interés, se trata de un pigmento polifenólico obtenido de los tallos subterráneos de la planta Cúrcuma, perteneciente a la familia del jengibre, nativa del sur y sudeste de Asia tropical que a través de la historia ha sido utilizada como colorante de telas, saborizante, remedio para diversos padecimientos gastrointestinales, entre otros trastornos de la salud, por lo que es uno de los polifenoles de mayor interés en el área biomédica (González et al. 2015).

Sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes han contribuido a múltiples estudios en donde se evalúa su actividad en el control de afecciones oxidativas, inflamatorias, síndrome metabólico, la hiperlipidemia y artritis (Hewlings et al. 2017), así como su actividad antimutagénica y anticancerígena (Wright et al. 2013).

La curcumina puede actuar como un compuesto antifúngico y antibacteriano, pero también como un compuesto antiviral, inhibiendo la replicación en una amplia gama de virus transmitido por diversos mecanismos (Jennings y Parks, 2020), desde los transmitidos por un vector como el Dengue, al ser capaz de inhibir entrada del virus por medio de una reorganización de los filamentos de actina (Balasubramanian et al. 2019), los virus de transmisión sexual como VIH, del cual inhiben la replicación por su capacidad antiinflamatoria y antioxidativa (Ferreira et al. 2015) e incluso de virus respiratorios como la influenza tipo A al inhibir la hemaglutinina (HA) con lo cual se inhibe la entrada viral (Richart et al. 2018).

En estudios *in vitro* se ha reportado que la curcumina posee una acción antiviral de la contra el virus SARS-CoV en células Vero-E6, pudiendo inhibir la replicación viral en concentraciones de 3–10 μM (Wen et al. 2007). Esta inhibición llevó a la evaluación por modelado molecular de la interacción de la curcumina con la proteína S del SARS-CoV-2 y se encontró que al igual que la quercetina, la curcumina tiene una alta afinidad tanto por la proteína S como por su receptor celular, estableciendo seis enlaces de hidrógeno en el sitio catalítico de la glicoproteína S (Maurya et al. 2020).

La curcumina presenta múltiples posibles sitios blancos en donde podría inhibir la replicación viral de SARS-CoV-2 adicionales a la neutralización de la unión de la proteína S al receptor ACE2, pues además podría inhibir la acidificación endosomal y el procesamiento de las proteínas virales (Mpro) necesarias para la liberación viral al citoplasma, entre otros (Rocha y Assis, 2020).

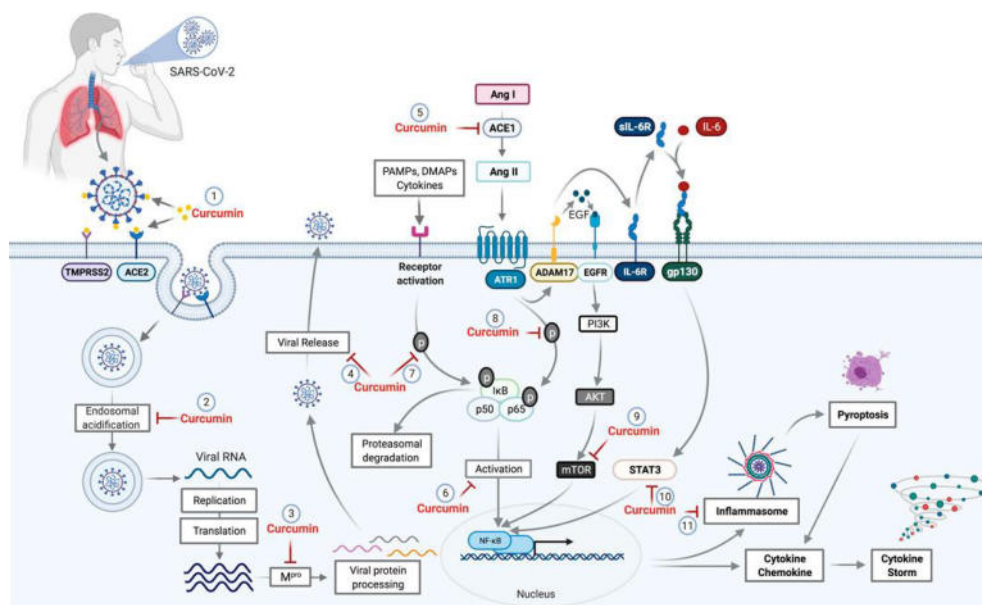


Figura 4. Posibles blancos de inhibición viral por curcumina en el ciclo de replicación de SARS-CoV-2 (Rocha y Assis, 2020).

Sin embargo, debido a que en el presente proyecto se simulará la infección de SARS-CoV-2 mediada por un pseudovirus con la proteína S nativa del SARS-CoV-2, únicamente se puede evaluar la inhibición de la entrada de este, por lo que se ha recurrido a la literatura para encontrar una concentración efectiva para su inhibición y se encontró que el EC_{50} de 4.06 $\mu\text{g/mL}$, lejano su CC_{50} de 16.5 $\mu\text{g/mL}$, lo que asegura que en una concentración efectiva no

efectuará daño celular significativo (Marín et al. 2021). Sin embargo, el principal problema en el uso de curcumina y otros polifenoles como tratamiento recae en su alta hidrofobicidad, lo que deriva en una baja biodisponibilidad y absorción, por lo que en el cuerpo presentan una baja efectividad en dosis reducidas. Debido a esto, se ha implementado el uso de nanoacarreadores como agentes encapsulantes que permitan sobrepasar las barreras previamente descritas para su administración en humanos (Herández et al. 2019).

Actualmente existen dos estudios clínicos que han demostrado los efectos positivos de la curcumina nanoencapsulada en pacientes con COVID-19, en los cuales se observó una reducción significativa de las manifestaciones clínicas de COVID-19 (fiebre, tos y disnea) en el grupo tratado con nanocurcumina (pacientes con enfermedad leve y grave) disminuyendo significativamente los niveles en la expresión y secreción de IL-6 y IL-1 β en suero y sobrenadante respecto al grupo de pacientes enfermos de COVID-19 sin tratamiento (Valizadeh et al. 2020). En el segundo estudio se observó una disminución significativa en la cantidad de células Th17, así como la regulación a la baja de los factores relacionados con estas células y de los niveles de citocinas relacionadas con las células Th17 en pacientes con COVID-19 leve y grave (Tahmasebi et al. 2020), lo que nos habla de las ventajas de su encapsulación en nanopartículas.

2.3. Nanopartículas con fines biomédicos

Las nanopartículas se definen como a partículas con tamaños inferiores a 1 μm (Brigger et al. 2002), pero que generalmente se encuentran en el rango de 1 a 500 nm. Estas son elaboradas de distintos materiales y polímeros, los cuales son responsables de brindarles su funcionalidad y efectividad debido a su composición química y los métodos de fabricación utilizados, lo que deriva en tamaño, forma y carga superficial específicos de cada metodología y composición (Nikzamir et al. 2021).

A lo largo de los años las nanopartículas se han utilizado para diversas aplicaciones energéticas, ambientales y, más recientemente biomédicas. El uso de estas en el área biomédica se debe principalmente a la posibilidad de ser administradas por diversas vías de entrada como la oral, la vacunación o el aerosol, dependiendo del requerimiento terapéutico basándose en la ubicación del objetivo, el tiempo de retención del fármaco, las barreras fisiológicas y la patobiología de la enfermedad diana (Raliya et al. 2016).

Los distintos tipos de nanopartículas se agrupan en liposomas, micelas, nanopartículas metálicas, nanopartículas magnéticas y las poliméricas (Gómez, 2014). En el presente trabajo de investigación se trabajará con las nanopartículas poliméricas y magnéticas.

En biomedicina las nanopartículas tienen cuatro campos principales: diagnóstico de enfermedades, administración de fármacos, imágenes y aplicaciones de detección biomédica (Raliya et al. 2016). Su origen se remonta a los años 70s cuando Speiser y colaboradores desarrollaron nanopartículas como medio de liberación de vacunas y moléculas activas (Kreuter, 2007). Actualmente los objetivos del desarrollo de este tipo de nanopartículas es el mejoramiento de la estabilidad física y química de los compuestos que se desean encapsular, permitiendo que moléculas no hidrosolubles puedan ser entregadas en el cuerpo en su forma activa mientras se mejora de la absorción de estas, lo que les confiere mayor biodisponibilidad.

Otro de los objetivos de encapsular en nanopartículas los compuestos es la permisibilidad de alcanzar tejidos o barreras específicas que el compuesto activo no podría por sí solo, todo con la finalidad de disminuir los efectos adversos y la toxicidad propia del fármaco administrado de manera libre (Gómez, 2014), teniendo en cuenta que el uso de las nanopartículas con fines biomédicos cumplen con una serie de parámetros preestablecidos como tener inocuidad, baja toxicidad y ser biodisponibles (Nikzamir et al. 2021).

Las nanopartículas poseen diversas características que les conceden intrínsecamente propiedades antivirales que actúan por diversos mecanismos como que el pequeño tamaño de la partícula brinda una alta relación entre el área y la carga superficial, así como el volumen (Caron et al. 2010). Adicionalmente se ha demostrado que las nanopartículas pueden mostrar características biomiméticas que ejercen una actividad antiviral intrínseca (Lara et al. 2010), además de poder ser diseñadas para mejorar significativamente la administración de fármacos con el uso de fracciones dirigidas que reconocen receptores o biomarcadores incrementando la especificidad a las células, tejidos o compartimentos subcelulares blanco y así optimizar la administración de las dosis (Boroumand et al. 2021) o con el uso de una fracción magnética recubierta de un polímero biocompatible como el quitosán que permita dirigir las nanopartículas o nanocomplejos al sitio de interés utilizando un campo magnético externo.

2.3.1. Nanopartículas de Quitosán

El quitosán es un polímero natural derivado de la N-desacetilación de la quitina, un polisacárido muy abundante en la naturaleza encontrado principalmente en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y la pared celular de hongos (Mármol et al. 2011). Esta molécula cuenta con propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, hemostático, bacteriostático, anticancerígeno, antimicrobianas y es capaz de formar estructuras como nanopartículas, así como filmes que cuentan con grandes aplicaciones en los campos de la industria, alimentación y medicina (Macea et al. 2015).

Si bien las nanopartículas de quitosán pueden sintetizarse por diversos métodos entre los que se encuentran la coprecipitación, reticulación química y emulsificación, la más más utilizada por su simplicidad y reproducibilidad es denominada gelación iónica (Carmona et al. 2018).

Las nanopartículas de quitosán tienen su origen documentado en 1997, con los dos artículos publicados por Calvo y colaboradores en donde se describe la generación de estas utilizando un método denominado gelación iónica (o ionotrópica), el cual consiste en la adición de una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) a una solución de quitosán con o sin un copolímero en condiciones de agitación. Las nanopartículas se generan debido a las interacciones electrostáticas del grupo amino de quitosán con el grupo polianión de TPP y estas presentaron un tamaño de 200 a 1000 nm, así como un potencial zeta de 20 a 60 mV de acuerdo a la relación de masa quitosán/TPP o el peso molecular del quitosán. Adicionalmente, Calvo y colaboradores demostraron que las nanopartículas tienen la capacidad de encapsular compuestos cuando sintetizaron nanopartículas con la proteína albúmina sérica bovina y la vacuna toxoide diftérico en su interior (Hoang et al. 2022).

Las nanopartículas de quitosano han sido utilizadas en la administración de fármacos por vía oral, pulmonar, mucosa y nasal, entre otras para una variedad de terapias como la terapia génica y la terapia avanzada contra el cáncer; sin embargo debido a su propiedad mucoadhesiva se ha impulsado la administración de estas por vía intranasal, por ser una técnica no invasiva a través de la cual los medicamentos llegan al cerebro, circulación sistémica y lo más importante para tratamientos para SARS-CoV-2, al sistema respiratorio (Hoang et al. 2022).

En adición a lo anterior, el quitosán incrementa la permeabilidad de los fármacos hidrofílicos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos a través del epitelio nasal (Garg et al. 2019); uno de los casos reportados con mayor importancia para su uso como terapia antiviral es la generación de nanopartículas de quitosán encapsulantes de un inhibidor de proteasa de VIH denominado saquinavir, el cual pudo ser encapsulado en un 75 % de encapsulación pero presentó una eficiencia en direccionamiento celular superior a 92 %, así como un mejor control de la proliferación viral en comparación con el fármaco soluble en dos cepas de VIH diferentes (NL4-3 e Indie-C1) en CEM-CCR5 y Jurkat, así como en dos tipos diferentes de células T (Ramana et al. 2014), apuntando a que el quitosán no solo tiene un efecto en el mejoramiento de la administración del fármaco, sino en la activación de las células del sistema inmune como las células T en mayor proporción.

Debido a las propiedades previamente descritas, este mecanismo de encapsulación y entrega de fármacos ya se ha aplicado para la encapsulación de antivirales para contrarrestar al SARS-CoV-2 *in vitro* como la silimarina (Sil), un flavonolignano con propiedades antivirales que actúa inhibiendo la entrada del virus a la célula en nanopartículas de 82 nm, disminuyendo el IC₅₀ de 12 µg mL⁻¹ propio del fármaco libre a 0.8 µg mL⁻¹ en ensayos virucidas/de replicación utilizando cristal violeta (Loutfy et al. 2022) poniendo en perspectiva la reducción de los efectos adversos manteniendo o mejorando el efecto antiviral al utilizar este tipo de vectores para entrega de fármacos. Por lo que surge la pregunta de qué pasaría con estos efectos de poder direccionar los nanocomplejos colocando alguna molécula como un anticuerpo que reconozca un antígeno en superficie celular o nanopartículas magnéticas que puedan ser direccionadas con campos magnéticos externos.

2.3.2. Nanopartículas Magnéticas para envío dirigido de fármacos antivirales

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro son una de las sustancias más prometedoras en dos áreas de gran importancia, la de diagnóstico clínico y la de aplicaciones terapéuticas, áreas que en conjunto se denominan como teranóstica (Ho et al. 2011; Ahmed et al. 2012). El superparamagnetismo mostrado por las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro hace que los ferroimanes sean útiles para su aplicación en ciencias biomédicas; pues si bien las nanopartículas magnéticas carecen de gran biocompatibilidad, esta se puede mejorar implementando recubrimientos con otros nanomateriales biocompatibles, como sílice,

fosfolípidos de ácidos grasos orgánicos y biopolímeros como el quitosán, que previamente se ha descrito por poder encapsular otros agentes en el proceso y que en adición al núcleo magnético estos pueden dirigirse al sitio diana al controlarlos con un campo magnético externo (Gul et al. 2019).

La idea de la utilización de nanopartículas magnéticas en estudios de envío dirigido de fármacos se remonta a los años 60s en los estudios de Freeman y colaboradores, quienes propusieron la idea de generar nanopartículas de hierro que viajaran en el cuerpo mediante el sistema vascular y las cuales podrían ser llevadas a un punto en específico utilizando campos magnéticos externos para poder entregar el fármaco deseado a los sitios específicos en donde es requerido, reduciendo así los efectos secundarios y la dosis necesaria para que actúe sobre la patología de interés (Peña, 2019; Mohammed et al. 2017).

Adicionalmente, su uso en este proyecto se señala porque estudios previos resaltan los efectos inhibitorios intrínsecos de las nanopartículas magnéticas sobre los virus. Se ha observado su eficacia como tratamiento antiviral al recubrir nanopartículas de óxido de hierro con polietilenglicol (PEG), lo que ha permitido la inhibición de la infección por el virus de la Influenza H1N1 hasta 8 veces más comparadas con el control. Señalando a las interacciones electrostáticas estables entre las nanopartículas cargadas negativamente y la glicoproteína de superficie del virus H1N1 como el mecanismo subyacente de este efecto (Kumar et al., 2014).

Estudios de acoplamiento molecular han revelado que las nanopartículas Fe_2O_3 y Fe_3O_4 también son capaces de interactuar eficazmente con el RBD de la S1 del SARS-CoV-2, formando complejos estables (Abo et al., 2020; Jat et al., 2021), por lo que su administración en una terapia combinada de nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán y con quercetina o curcumina encapsuladas al interior, presenta un panorama altamente prometedor como tratamiento para COVID-19.

Durante la fase inicial del desarrollo de un tratamiento antiviral, es crucial determinar el modelo experimental para la evaluación, asegurándose de elegir uno que permita una interpretación precisa y que no comprometa la seguridad de los investigadores. Esto incluye seleccionar el tipo de célula en el cual se llevarán a cabo las pruebas, así como la plataforma utilizada para evaluar la inhibición o neutralización viral.

2.4. Modelos de infección de SARS-CoV-2 *in vitro*

El desarrollo de nuevos antivirales o el reposicionamiento de fármacos existentes suele comenzar con estudios *in vitro*. Los primeros estudios de SARS-CoV-2 utilizaron un aislado de un paciente del estado de Washington, Estados Unidos, obtenido en enero de 2020 para evaluar la replicación viral en líneas celulares humanas, incluyendo adenocarcinoma pulmonar (A549), hepatocitos (HUH7.0) y células renales embrionarias (HEK-293T), así como en células renales de mono verde africano (Vero) E6 y Vero CCL81. Los resultados mostraban que estas últimas líneas celulares presentan un efecto citopático (CPE), con títulos de replicación superiores a 10^7 unidades formadoras de placa (PFU) a las 24 horas post-infección con títulos ligeramente más altos en las células Vero E6 debido a que tienen una versión del receptor celular de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) que es casi idéntica a la de su homólogo humano. Por otro lado, las células HUH7.0 y 293T mostraron una replicación viral deficiente y las células A549 no mostraron signos de replicación viral (Harcourt et al. 2020) por lo que se recomienda el uso de la línea celular Vero E6 para estudios de neutralización viral, tomando en cuenta de no comprometer la salud de los investigadores que no cuenten con un laboratorio con nivel de bioseguridad 3.

2.4.1. Pseudovirus de SARS-CoV-2

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes tienen un impacto negativo significativo en la salud pública. Dado que muchos de estos patógenos deben manejarse en laboratorios de bioseguridad de nivel 3 o 4, la investigación y el desarrollo de antivirales o vacunas se ven obstaculizados. Por este motivo, se ha implementado el uso de pseudovirus que presenten envolturas virales con estructuras conformacionales similares a las de los virus nativos que se desean estudiar, pero con un genoma de un virus inocuo para el humano y que no es replicativo, permitiendo realizar investigaciones sobre la entrada viral y evaluar posibles terapias como anticuerpos neutralizantes, así como fármacos con afinidad a los receptores o al RBD de las proteínas de reconocimiento, de manera segura (Li et al., 2018).

Se ha informado sobre su uso en múltiples enfermedades virales emergentes en una serie de ensayos de neutralización basados en pseudovirus (PBNA). Los pseudovirus no se ven limitados por el tipo de infección y han sido utilizados para simular tanto virus respiratorios

como sistémicos, incluyendo MERS-CoV, el virus de la rabia, el virus del Ébola, el virus Marburg, el virus Chikungunya y el virus Nipah, entre otros (Pérez et al., 2020).

Los pseudovirus son partículas virales recombinantes que utilizan el núcleo y proteínas de envoltura derivadas de un virus, cuyos genes han sido modificados para que no puedan producir la proteína de superficie por sí mismos. Por lo tanto, es necesario transfectar simultáneamente un plásmido adicional que contenga la proteína de superficie deseada en una línea celular estable para que la exprese. De esta manera, se pueden obtener partículas virales capaces de realizar solo una ronda de replicación en las células que presenten el RBD para la proteína insertada en la membrana, lo que las convierte en candidatas adecuadas para su manipulación en laboratorios con un nivel de bioseguridad tipo 2 (Welch et al., 2016).

El SARS-CoV-2 no es diferente a los virus mencionados previamente, su alta infectividad, patogenicidad y la falta de tratamientos efectivos en un inicio, hace que el SARS-CoV-2 activo deba manipularse en laboratorios con nivel de bioseguridad 3, lo que ha impedido la investigación del SARS-CoV-2 para el desarrollo de vacunas y terapias evolucione de manera lo suficientemente rápida (Yang et al. 2021).

La generación de los pseudovirus se puede desarrollar de tres maneras diferentes basadas en distintos sistemas de empaquetamiento pero manteniendo su en células HEK 293T; las primeras dos metodologías consisten en la transfección de las células HEK 293T con un plásmido codificante para el esqueleto, ya sea de origen lentiviral o un construcción de empaquetamiento MLV Gag–Pol junto con el vector de transferencia MLV, que codifica un indicador de luciferasa y un plásmido que expresa la proteína S de SARS–CoV–2 (de cualquier variante que se desee evaluar), luego se recolecta el medio de las células transfectadas en donde se puede encontrar partículas lentivirales pseudotipadas con proteína S o partículas de MLV pseudotipadas con proteína S capaces de infectar células que expresan el receptor ACE2. La última metodología

consiste en la transfección de células HEK 293T con el plásmido de expresión de proteína S de SARS-CoV-2 simultánea a su infección con VSV*ΔG (Fluc) que codifica la luciferasa de luciérnaga (Chen & Zhang, 2021).

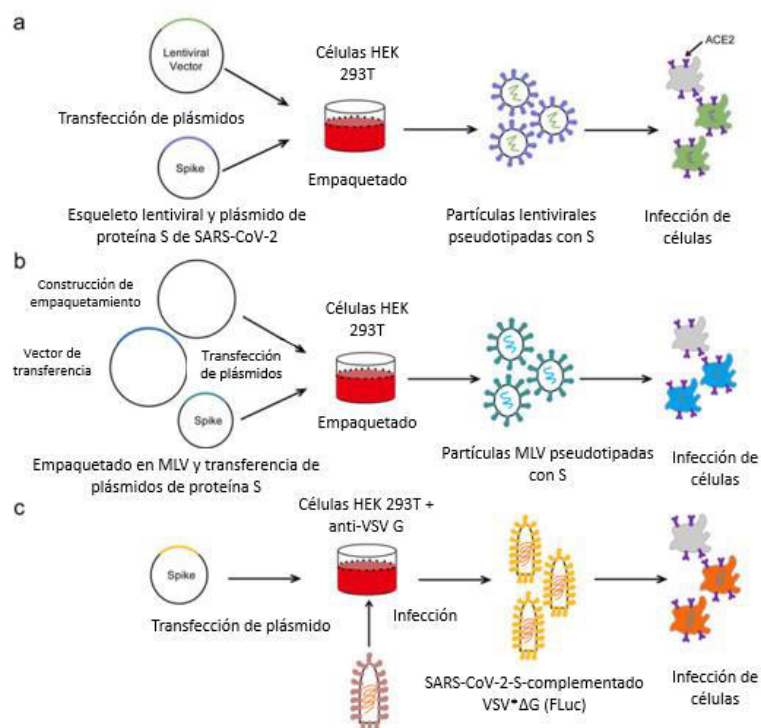


Figura 5. Estrategias para la generación de pseudovirus de SARS-CoV-2 basadas en los sistemas de empacamiento (Chen & Zhang, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La contingencia de salud generada por el virus SARS-CoV-2 ha sido la mayor emergencia sanitaria a nivel mundial desde la epidemia de la influenza H1N1 en el 2009. Desde su descubrimiento a finales del año 2019, los daños humanos, sociales y económicos provocados por este virus han sobrepasado los efectos de otros brotes en las últimas décadas, con el número de casos acercándose a los 700 millones y las defunciones superando los 6.9 millones a nivel global. La humanidad ha sido marcada para siempre por este evento y los remanentes de este daño perduraran por un tiempo indefinido.

La familia de virus *Coronaviridae* ha generado tres brotes importantes en este siglo. El primer gran brote en humanos fue registrado en 2002 con el SARS-CoV, seguido por el brote de MERS-CoV en 2012 y, finalmente, la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2 en 2020. Este patrón subraya la importancia de la investigación de estrategias que puedan inhibir la replicación de estos virus, pues no solo es crucial para frenar la contingencia actual, sino también como medida de protección contra posibles brotes futuros.

El reposicionamiento de moléculas naturales, como la quercetina y la curcumina, ha surgido como una estrategia importante en el desarrollo de nuevos tratamientos para COVID-19. Estas moléculas han demostrado tener propiedades inhibitorias de la entrada del virus mediante interacciones con el RBD de la proteína S y el receptor celular ACE2. Además, su actividad antiinflamatoria, antioxidante e inmunomoduladora, sugiere que podrían servir como terapias que no solo prevendrían la infección inicial por el virus, sino que también ayudarían a mitigar los efectos secundarios ocasionados por la tormenta de citocinas característica de la infección sistémica por SARS-CoV-2.

Sin embargo, el uso de esos compuestos se ve limitado debido a su alta hidrofobicidad e inestabilidad en condiciones ambientales, por lo que no son adecuadas para su administración en forma libre. Por lo cual surge la propuesta de encapsularlas en nanopartículas de quitosán, así como en nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán, como una posible solución para superar los obstáculos mencionados anteriormente.

4. HIPÓTESIS

Algunos polifenoles encapsulados en nanopartículas biocompatibles son capaces de presentar una actividad antiviral contra el pseudovirus SARS-CoV-2.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiviral de algunos polifenoles encapsulados en nanopartículas biocompatibles mediante un bioensayo de neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2.

5.1. Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de quitosán y nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán con quercetina y curcumina encapsuladas.
2. Evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas de quitosán y las nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán con quercetina y curcumina encapsuladas.
3. Determinar la actividad neutralizante de las nanopartículas de quitosán y las nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán con quercetina y curcumina encapsuladas en un modelo de neutralización de pseudovirus SARS-CoV-2.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diagrama General

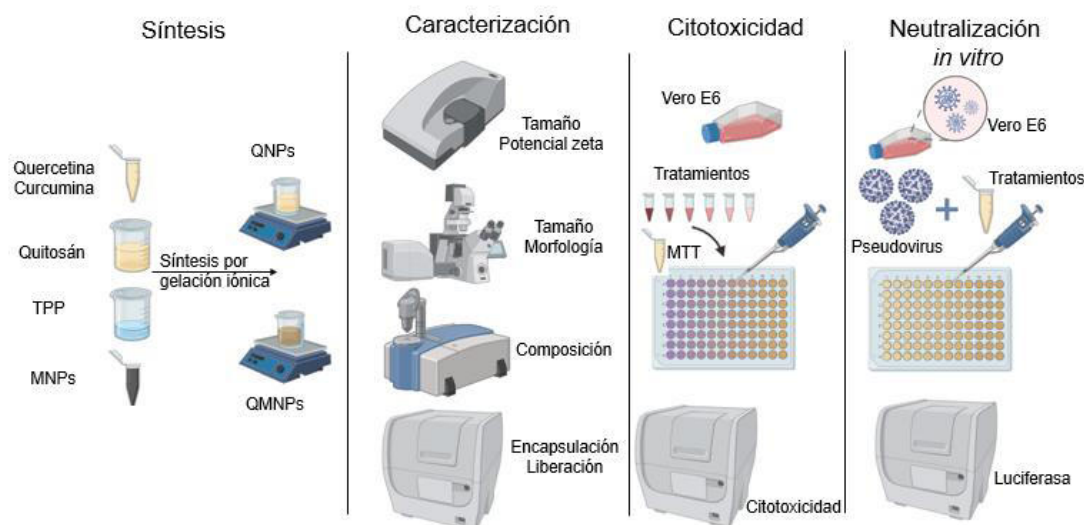


Figura 6. Estrategia experimental general.

6.2. Síntesis de Nanopartículas

6.2.1. Nanopartículas de quitosán

La síntesis de las nanopartículas de quitosán se realizó conforme a la técnica de gelación iónica descrita por Calvo y colaboradores; 1997, utilizando la proporción 1:2 quitosán a TPP. Brevemente, se colocaron 5 mL de quitosán de bajo peso molecular (Coyote foods) a una concentración de 2 mg/mL en agua MiliQ a pH 5.5, en un vaso de precipitado de 10 ml y con un agitador magnético de 1.5 cm, dicha solución se calentó a 45°C y se mantuvo una agitación de 990 rpm en una parrilla magnética (MS7-H550-Pro, D Lab). Una vez alcanzada la temperatura, se agregó por goteo constante 2.5 mL de TPP (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.86 mg/mL en agua MiliQ a pH 3 y a 4 °C. Finalmente, se dejó incubar la mezcla durante 10 minutos y se almacenó en solución a 4 °C.

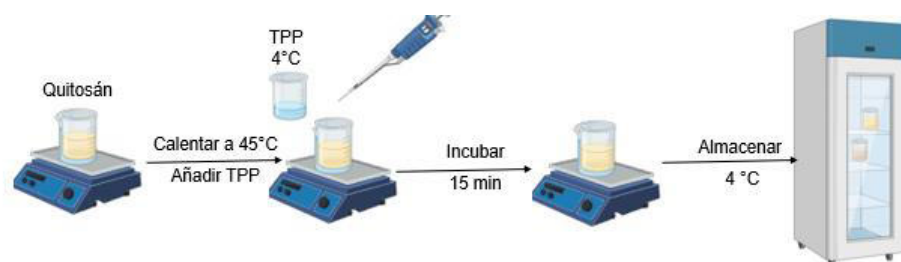


Figura 7. Metodología de síntesis de las nanopartículas de quitosán por gelación iónica.

6.2.2. Nanopartículas de quitosán con polifenoles encapsulados

Se sintetizaron dos nanopartículas de quitosán, unas con quercetina y otras con curcumina siguiendo el protocolo previamente mencionado. Para la obtención de las nanopartículas de quercetina, los 5 mL de quitosán fueron suplementados con 380 μ L de quercetina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 2 mg/mL en etanol, mientras que para las nanopartículas con curcumina se añadieron 41.4 μ L de curcumina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 μ g/mL en etanol. La solución resultante se calentó a 65 °C y se incubó durante 10 minutos con una agitación constante de 990 rpm en una placa magnética. Después de la incubación, se redujo la temperatura a 45 °C, momento en el cual se agregaron 2.5 mL de TPP a 4 °C por goteo constante. Finalmente, la mezcla se dejó incubar durante 15 minutos y se almacenó en solución a 4 °C.



Figura 8. Metodología de síntesis de las nanopartículas de quitosán con polifenoles encapsulados mediante el método de gelación iónica.

6.2.3. Nanopartículas Magnéticas

Para la síntesis de las nanopartículas magnéticas, se empleó el método de coprecipitación. Se agregaron 202.6 mg de sulfato de hierro (II) heptahidratado (Sigma-Aldrich) y 546 mg de cloruro de hierro (III) hexahidrato (Sigma-Aldrich) a 100 mL de agua MiliQ a 80 °C, con agitación a 910 rpm en una parrilla magnética. Inmediatamente después de agregar los precursores, se desplazó el oxígeno del matraz de 3 bocas inyectando argón y se incorporaron 9 mL de NH₄OH (Productos Químicos Monterrey) gota a gota a una velocidad de una gota cada 4 segundos hasta completar el volumen. Tras finalizar la adición de NH₄OH, la solución se incubó durante 1 hora bajo las mismas condiciones y se dejó enfriar.

Posteriormente, se realizaron una serie de 20 ciclos de lavado de acetona, metanol y agua MiliQ, captando las nanopartículas magnéticas con un magneto de 12,000 Gauss, seguida de su

resuspensión en 50 mL de agua desionizada o en la cantidad necesaria para obtener una concentración de 1 mg/mL (Bae et al., 2012). Para la caracterización de tamaño y carga superficial se realizaron diluciones que se sometieron a sonicación en vidrio durante 30 minutos en agua fría.

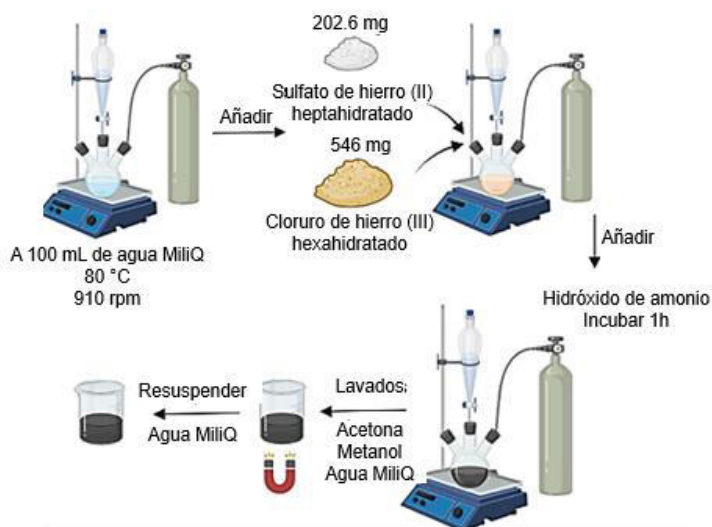


Figura 9. Metodología de síntesis de las nanopartículas magnéticas por co-precipitación.

6.2.4. Nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán con polifenoles

La síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas de una red de quitosán con polifenoles encapsulados se llevó a cabo de nueva cuenta adaptando el método de gelación iónica previamente descrito, con una variación específica. En este caso, se agregaron 50 μ L de nanopartículas magnéticas a una concentración de 1 mg/mL a los 5 mL de quitosán (2 mg/mL en agua MiliQ), junto con 380 μ L de quercetina (2 mg/mL en etanol) o 41.4 μ L de curcumina (1 μ g/mL en etanol). La solución resultante se calentó a 65 °C y se incubó a esta temperatura durante 10 minutos con una agitación de 990 rpm. Posteriormente, la temperatura se redujo a 45 °C y se añadieron 2.5 mL de TPP (0.86 mg/mL) a 4 °C por goteo constante. Después de completar este proceso, la mezcla se dejó incubar durante 15 minutos y se almacenó a 4 °C en solución.

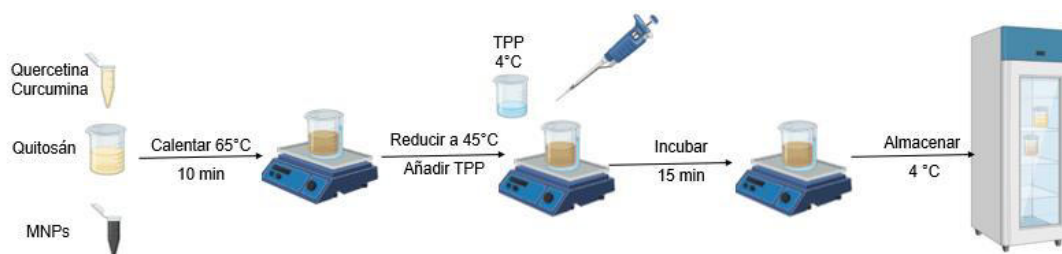


Figura 10. Metodología de síntesis de las nanopartículas magnéticas recubiertas por una red de quitosán con los polifenoles encapsulados.

6.3. Caracterización de las nanopartículas

6.3.1. Caracterización de tamaño y carga superficial de las nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas se llevó a cabo realizando diluciones a distintas concentraciones, de 1:10 a 1:100000 en 1 mL de agua MiliQ, las cuales se sonicaron durante 10 min. El tamaño y carga superficial de las nanopartículas se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y el potencial Zeta (ζ), respectivamente. Para las mediciones de DLS se utilizaron celdas de poliestireno cuadradas de 12 mm (Malvern) y para el potencial Zeta se utilizaron celdas capilares plegadas desechables (Malvern). Todas las lecturas se realizaron por triplicado utilizando el dispositivo Zeta sizer Nano ZS90 (Malvern).

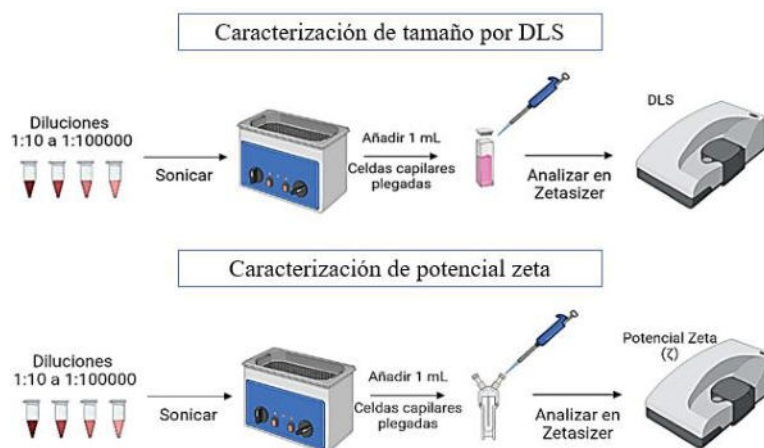


Figura 11. Metodología para la evaluación de tamaño, polidispersión y carga superficial de las nanopartículas.

6.3.2. Caracterización de tamaño y dispersión de las nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la evaluación por microscopía electrónica de barrido se realizaron diluciones de 1:1000 a 1:1000000 en agua MiliQ de las nanopartículas en solución y se sonicaron por 30 min.

Posteriormente se colocaron 5 μL de cada muestra en una cinta de carbono (Electron Microscopy Sciences) y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 a 48 h. Esta muestra fue colocada al interior del microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 250) con un voltaje de 10kV y con una amplificación de X30000.

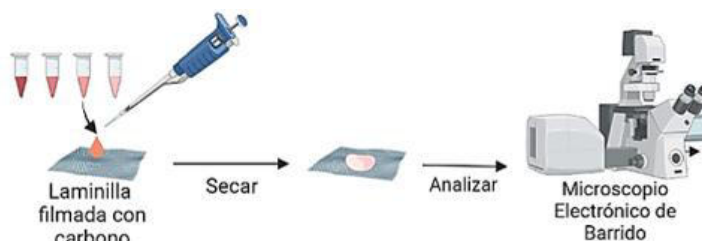


Figura 12. Metodología de caracterización de tamaño y forma por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas.

6.3.3. Caracterización de composición de las nanopartículas por espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

La determinación de la composición química de las nanopartículas se llevó a cabo mediante espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (Bruker Vertex 70). Para esto se centrifugaron 3 mL de la solución de cada nanopartícula durante 15 min a 10000 rpm, el sobrenadante se retiró con pipeta y se dejó secar el pellet a 60 °C por 1h. El pellet se llevó a FTIR colocando la muestra en el lector y presionando el embolo hasta que no se detectara más ruido. Una vez obtenidas las lecturas se graficaron los compuestos en Origin (OriginLab).



Figura 13. Metodología para la caracterización de composición de las nanopartículas por espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).

6.3.4. Porcentaje de encapsulación y perfil de los polifenoles

6.3.4.1. Curva de calibración de los polifenoles

6.3.4.1.1. Quercetina

Se realizó una curva de concentraciones conocidas de quercetina disolviéndola en etanol al 96% grado biología molecular en un rango de concentraciones de 50 a 500 μM en una microplaca de 96 pozos (Corning). Las mediciones de absorbancias se realizaron a 380 nm en un Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific).

6.3.4.1.2. Curcumina

La curva de concentraciones conocidas de curcumina igualmente se realizó en un rango de concentraciones de 1 a 150 μM en etanol al 96% grado biología molecular. Las mediciones de las absorbancias se realizaron a 428 nm en un Varioskan LUX Multimode Microplate Reader.

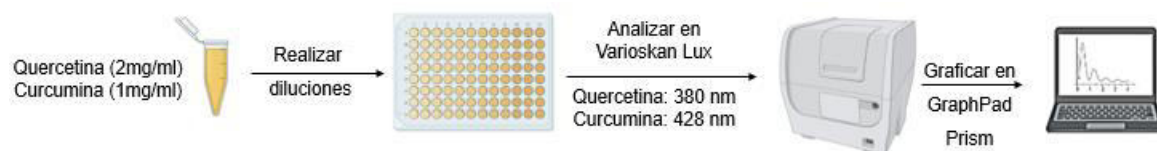


Figura 14. Generación de las curvas de calibración de quercetina y curcumina.

6.3.4.2. Eficiencia de encapsulación de los polifenoles

La eficiencia de encapsulación se obtendrá adaptando el protocolo establecido por Nathiya y colaboradores, 2014. Para esto, 1 mL de nanopartículas se centrifugaron inmediatamente después de su síntesis a 10,000 rpm por 15 min, se tomó el sobrenadante y se leyó a las absorbancias previamente descritas para cada molécula en un lector de placa Varioskan LUX Multimode Microplate Reader. Posteriormente los resultados obtenidos se extrapolaron con una regla de 3 simple utilizando un valor en la curva de calibración para conocer la concentración en el sobrenadante, la cual será restada a la concentración colocada para la síntesis y así poder conocer por descarte la concentración encapsulada.



Figura 15. Evaluación del porcentaje de encapsulación de los polifenoles en las nanopartículas.

6.3.4.3. Perfil de liberación de los fármacos

El perfil de liberación se realizó añadiendo 1 mL de las nanoacarreadores a un tubo eppendorf de 1.5 mL, con una agitación de 450 rpm a 37 °C en termomixer (eppendorf), seguido de una centrifugación por 15 min a 10,000 rpm, para recuperar el sobrenadante, el cual fue leído a 380 nm para quercetina y 428 nm para curcumina. Las mediciones se realizaron cada hora las primeras 6 h, reemplazando el sobrenadante con PBS a pH 7.4 y a pH 7.4 adicionado con el 10% de etanol (Nathiya et al. 2014) y lisozima (Sigma-Aldrich) a 0.2 mg/mL (Islam et al. 2019). Posteriormente se realizó una medición a las 12 h y luego una cada 24 h hasta que el fármaco ya no sea detectado en el sobrenadante.

Las absorbancias obtenidas se extrapolaron con base a las curvas de concentraciones conocidas realizadas en el apartado anterior utilizando una regla de 3 simple para obtener la concentración de los fármacos en el sobrenadante.

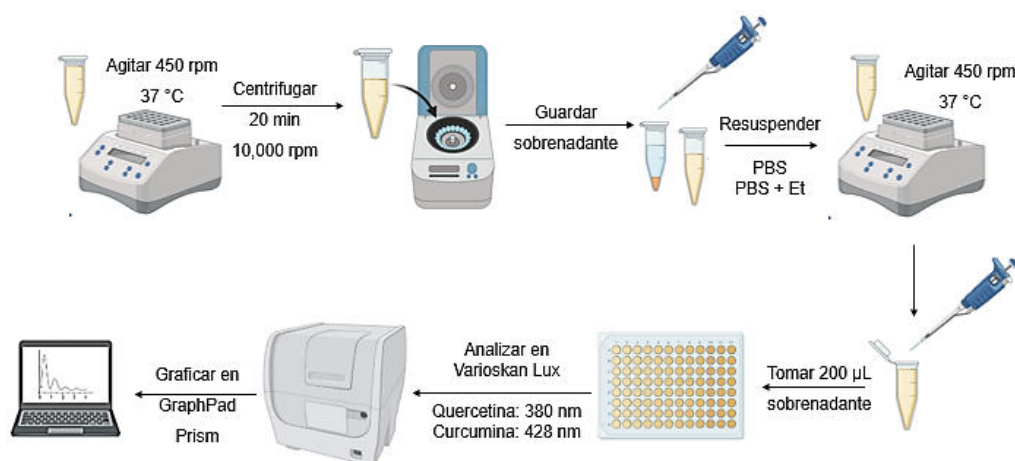


Figura 16. Evaluación del perfil de liberación de los polifenoles por las nanopartículas.

6.4. Evaluación de la citotoxicidad

6.4.1. Evaluación de la citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular VeroE6

Para conocer las concentraciones citotóxicas de los componentes de las nanopartículas se revisó la citotoxicidad mediante el ensayo de reducción de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (Sigma-Aldrich), mejor conocido como MTT. Para llevarlo a cabo se sembraron 2×10^4 células de la línea celular Vero E6 (ATCC crl-1586) en placas de 96 pozos

con 100 μ L Dulbecco's Medio Eagle 29 modificado (Thermo Fisher Scientific) suplementado con SFB al 10% y AA al 1%. Posterior a su plaqueo se colocaron TPP, quitosán, querceína y curcumina a diferentes concentraciones y se dejaron incubar por 48h a 37 °C con CO₂ al 5%. Una vez terminado el periodo de incubación se retiró el medio y se añadieron 50 μ l del medio de cada pozo junto con 50 μ L de MTT (5mg/mL) previamente filtrado. Se dejó incubar por 3 horas y se eliminó el medio con MTT invirtiendo la placa con rapidez. Para finalizar se añadieron 150 μ l de DMSO (Sigma-Aldrich) para disolver los cristales de formazan y después de una incubación de 10 min en agitación a temperatura ambiente se leyó a 590 nm en Varioskan LUX Multimode Microplate Reader.

Para determinar la viabilidad y la CC₅₀ se sustituyeron los valores obtenidos en las siguientes fórmulas:

Fórmula para determinar el % de viabilidad celular:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} * 100$$

Fórmula para determinar la concentración citotóxica media (CC₅₀):

$$CC50 = \frac{50 - b}{m} * 100$$

6.4.2. Evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas sobre la línea celular VeroE6

Después de obtener la citotoxicidad de los compuestos individuales, se evaluó la citotoxicidad de las nanopartículas, tomando en consideración las IC₅₀ previamente reportadas para el SARS-CoV-2 de quercetina y curcumina. El método para evaluar la viabilidad de igual forma fue MTT y para llevarlo a cabo se siguió el protocolo previamente descrito, colocando las nanopartículas a concentraciones de 41.7, 83.4, 130 y 167 μ M en caso de los Q-QNPs y Q-QMNPs; mientras que de las C-QNPs y C-QMNPs se colocaron 3, 5, 9 y 12 μ M. Una vez terminado el protocolo se sustituyeron los valores en las fórmulas previamente descritas para conocer la viabilidad celular y la CC₅₀.

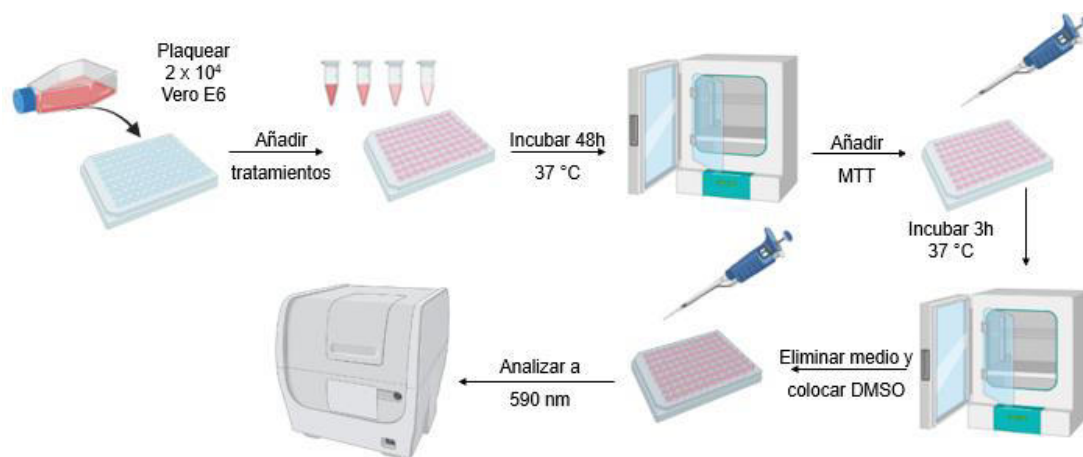


Figura 17. Evaluación de la citotoxicidad celular sobre la línea Vero E6.

6.5. Caracterización de las nanopartículas Ensayo de neutralización de pseudovirus

6.5.1. Producción de pseudovirus SARS-CoV-2

La producción del pseudovirus se llevó a cabo en el laboratorio de Unidad de Inmunología Molecular con base a la metodología descrita por Nie y colaboradores, 2020. En tubos etiquetados como “tubo A” y “tubo B” se prepararon dos soluciones, en el tubo A se añadieron 0.75 mL de Opti-MEM (Gibco™) junto con 30 µg de plásmido pcDNA3.1.S2, 30 µL de P3000 (Invitrogen™) y se mezcló con una pipeta, para después dejar incubar por 5 min a temperatura ambiente. En el tubo B se mezclaron 0.75 mL de Opti-MEM con 30 µl de Lipofectamina 3000 (Invitrogen™), se mezcló por pipeteo gentilmente y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente. Se añadió la solución del tubo B al tubo A gota a gota y se mezcló por inmersión gentilmente 5 veces, para después incubar a temperatura ambiente por 15 a 20 min. Durante ese tiempo de incubación se retiró el medio de una botella T75 con células HEK293 a una confluencia del 70 al 90%, se le añadieron 15 ml de DMEM adicionado con el 10% de SFB y AA con VSV*ΔG (Fluc) a una concentración de 7.0×10^4 TCID₅₀/mL. Después de 6 horas se retiró el medio, se realizaron tres lavados con PBS estéril colocándolo por la pared gentilmente para evitar despegar las células que presentan efecto citopático y se colocaron 15 mL de Dulbecco's Medio Eagle modificado (Thermo Fisher Scientific) adicionado con el 10% de SFB y AA 1%. El medio se retiró a las 24 horas y se almacenó a 4 °C, para colocar 15 mL de medio nuevo y repetir el

mismo paso a las 48 h. Los sobrenadantes de los dos días se mezclaron y se dejaron congelar por 24 h a -80 °C.

Para la titulación del pseudovirus fueron plaqueadas 2×10^4 células Vero E6 (ATCC cri-1586) por pozo en una placa de 96 con DMEM suplementado con SFB al 10% y AA al 1%. Estas células se sometieron a diluciones de 1:10 a 1: 65610 del pseudovirus previamente sintetizado y dejaron incubarse por 48h a 37 °C con CO₂ al 5%. Una vez terminado el periodo de incubación, se midió la infección por Unidades Relativas de Luz (URL) emitidas por la luciferasa, colocando el sustrato ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega), dejando incubarse 10 minutos para lisar y leyendo en una placa negra con fondo transparente (Corning®). Los datos se colocaron en la hoja de Excel brindada por Niel y colaboradores, 2021 para obtener el TCID₅₀ (Nie et al. 2020).

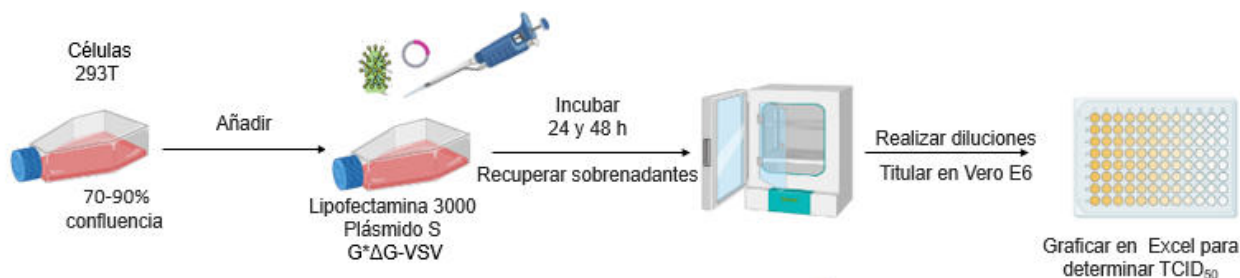


Figura 18. Metodología para la generación de pseudovirus SARS-CoV-2 en la línea celular HEK293T.

6.5.2. Caracterización de la proteína de superficie del pseudovirus por Western Blot

La identidad de la proteína de superficie de los pseudovirus se determinó mediante la metodología de Western Blot. Para ello, se llevó a cabo un SDS-PAGE calentando 30 µL de las muestras con 6 µL de buffer de muestra al 6X. Las muestras se cargaron en el siguiente orden: proteína Spike liofilizada (1.5 µg/mL), seguido de una muestra de la proteína S conjugada con la proteína N del virus de influenza H1N1, y finalmente, distintas producciones de los pseudovirus. Posteriormente, se realizó una transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa, proceso que se llevó a cabo durante toda una noche a 4 °C. Luego, la membrana se colocó en incubación durante 1 hora en un buffer de bloqueo, compuesto por leche descremada al 5% disuelta en TBS con Tween al 20%. Después del bloqueo, se realizó un lavado con TBS Tween durante 10 minutos en una placa de agitación.

Acto seguido, se colocó el anticuerpo primario Anti-SARS-CoV-2 Spike RBD Monoclonal antibody (Creative Diagnostics), previamente preparado en una solución mitad buffer de bloqueo y mitad

buffer TBS Tween, para incubar toda la noche a 4 °C en una placa de agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con buffer de lavado. Se procedió entonces a incubar la membrana con el anticuerpo secundario de adsorción cruzada anti-IgG Fc humana de cabra, HRP (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente, en una placa de agitación. Después de esta etapa, se realizaron tres lavados de 15 minutos con buffer de lavado. Luego, se aplicaron 1 mL de los reactivos A y B del Reactivo de Luminol para Western Blot (Santa Cruz Biotechnology), teniendo precaución de cubrir principalmente el área donde se espera encontrar la proteína, debido a que esta tiene un peso molecular de 180 a 200 kDa y se encuentra en la parte superior de la membrana. Finalmente, el revelado se llevó a cabo en un cuarto oscuro con presencia de un foco rojo utilizando el kit de Kodak. Se colocó el film en contacto con la membrana en un casete de revelado de Kodak durante 30 segundos, seguido de la colocación en la solución reveladora durante 15 segundos. Después se lavó con agua corriente y se colocó en la solución fijadora para observar las bandas.

6.5.3. Ensayo de neutralización del pseudovirus *in vitro*

El porcentaje de neutralización se obtuvo sembrando 2×10^4 células de la línea celular Vero E6 en placas de 96 pozos con 100 μ L DMEM suplementado con SFB al 10% y AA al 1%. Posterior a su plaqueo se colocaron los tratamientos de nanopartículas, así como las moléculas diluidas en etanol en base al IC₅₀ reportado de los fármacos para la inhibición del SARS-CoV o SARS-CoV-2, siendo 83.4 μ M y 167 μ M para quercetina (Prasansuklab et al., 2021) 5 a 10 μ M para curcumina (Wen et al. 2007), a la par de 50 μ L pseudovirus SARS-CoV-2 y suplementando con el medio necesario para alcanzar 200 μ L de volumen final por pocillo. Las placas fueron incubadas por 48 h a 37 °C con CO₂ al 5%. Al finalizar el periodo de incubación se retiraron 100 μ L de medio y se le agregarán 100 μ L de ONE-Glo™ Luciferase Assay System a cada pozo, seguido de una incubación durante 10 min a temperatura ambiente en una placa de agitación. El contenido de cada pocillo se resuspendió con ayuda de una pipeta para asegurar la lisis celular, se tomaron 150 μ L para pasar a una placa negra con fondo transparente de 96 pozos y se analizó con la función de luminiscencia del Varioskan LUX Multimode Microplate Reader.

El porcentaje de neutralización se calculó en base a la fórmula de porcentaje de neutralización, en donde la media de las unidades relativas de luz del control positivo (URL C+), es decir los pozos infectados con el pseudovirus sin tratamientos, se toma como 100 % de la infección, mientras que se sustituyen los valores de URL en los pocillos tratados y se someten

a una regla de tres simple. Finalmente se restará a 100, lo cual equivale al inverso de la infección, es decir, neutralización.

Fórmula para conocer el porcentaje de neutralización:

$$\text{Neutralización (\%)} = \frac{URL\ C + \frac{URL\ T}{X}}{100\%} - 100$$



Figura 19. Protocolo de neutralización del pseudovirus por las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6.

7. RESULTADOS

7.1. Síntesis de las Nanopartículas

7.1.1. Síntesis de nanopartículas de quitosán

La síntesis de nanopartículas de quitosán con TPP mediante el método de gelación iónica se observó mediante el cambio de un color amarillo intenso y translúcido de la solución de quitosán (figura 7, A) a color amarillo claro y opalescente (figura 7, B).

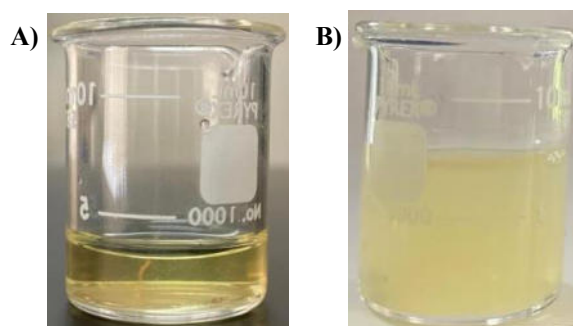


Figura 20. Cambio colorimétrico y opacidad por la formación de nanopartículas de quitosán. A) Quitosán a pH 5.5, B) Nanopartículas de quitosán sintetizadas por gelación iónica (QNPs).

7.1.2. Nanopartículas Magnéticas

Las nanopartículas magnéticas en solución presentan una coloración negra completamente opaca al encontrarse a una concentración de 1mg/mL (figura 8, A). Es posible apreciar la capacidad magnética de estas nanopartículas al colocar un imán de 12,000 Gauss en contacto con la pared del recipiente en donde se almacenan (figura 8, B), pues en cuestión de 15 segundos la solución se vuelve transparente y se observa una capa de nanopartículas magnéticas pegadas a la pared en donde el imán entra en contacto.

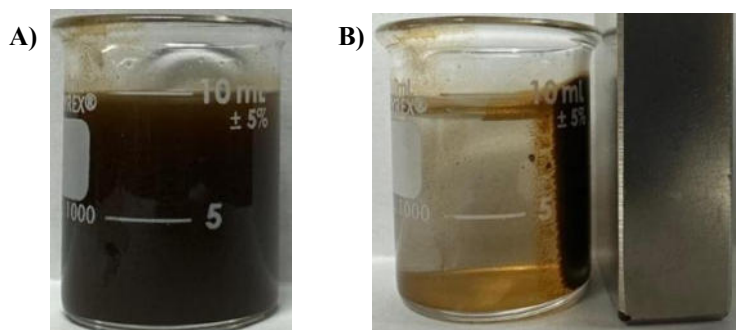


Figura 21. Nanopartículas magnéticas. A) Nanopartículas magnéticas en solución, B) Respuesta magnética de las nanopartículas frente a un campo magnético de 12,000 G.

7.1.3. Síntesis de nanoacarreadores de nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán

Las nanopartículas de quitosán con nanopartículas magnéticas manifiestan el mismo cambio de tonalidad, así como la opacidad previamente descrita (figura 9), sin embargo, debido a la presencia de nanopartículas magnéticas tanto la solución inicial como la final tienen una coloración más oscura que las nanopartículas de quitosán realizadas por gelación iónica por sí solas.

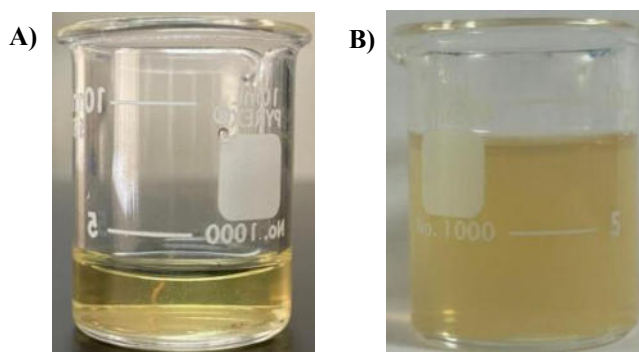


Figura 22. Nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán en solución. A) Quitosán a pH 5.5 previo a la adición de TPP, B) Nanopartículas magnéticas encapsuladas en una red de quitosán por gelación iónica (QMNP).

7.1.4. Síntesis de nanopartículas con quercetina encapsulada

Las Q-QNPs presentan una coloración amarilla más intensa que las de quitosán sin fármaco encapsulado debido al color amarillo intenso que tiene la quercetina, aunque es posible apreciar la disminución de la intensidad de los colores después de añadir el TPP y formar las nanopartículas, así como el incremento en la opacidad mucho mayor a las nanopartículas sin fármaco (figura 10, A). Por otro lado, Q-QMNP (figura 10, B) presentan una coloración más marrón debido a la adición de las nanopartículas magnéticas durante su síntesis, pero mantiene el aspecto opaco significativo de la formación de nanopartículas.

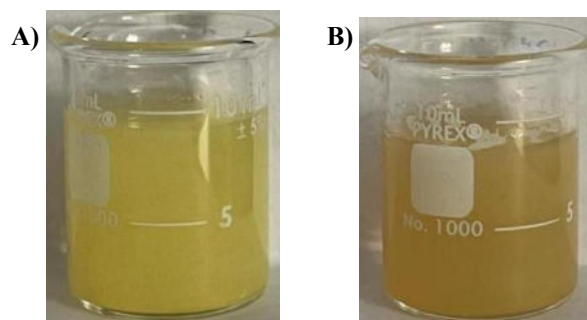


Figura 23. Nanopartículas de quitosán con quercetina encapsulada. A) Q-QNPs, B) Q-QMNPs.

7.1.5. Síntesis de nanopartículas con curcumina encapsulada

Al igual que las nanopartículas de quercetina, las nanopartículas de quitosán con curcumina presentan una coloración amarilla más intensa a las de quitosán sin polifenol añadido debido al color amarillo intenso que tiene la curcumina por si sola, pero sigue siendo posible apreciar la disminución de la intensidad de los colores después de añadir el TPP y formar las nanopartículas, así como el incremento en la opacidad (figura 11, A). Con respecto a la apariencia de las C-QMNPs es posible apreciar un color amarillo más oscuro, también debido a la presencia de las nanopartículas magnéticas al igual que la opacidad que indica la presencia de nanopartículas (figura 11, B).

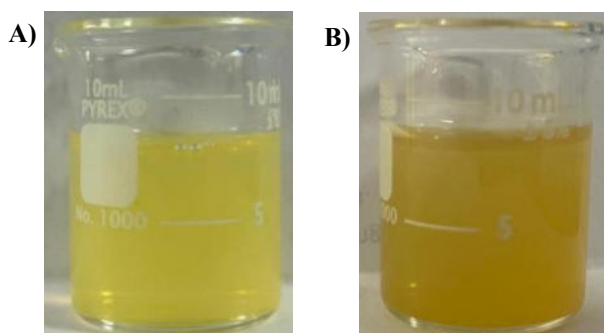


Figura 24. Nanopartículas de quitosán con curcumina encapsulada. A) C-QNPs, B) C-QMNPs.

7.2. Caracterización de las Nanopartículas

7.2.1. Caracterización de las nanopartículas de Quitosán por tamaño y carga superficial

Las nanopartículas de quitosán realizadas mediante el método de gelación iónica tienen un tamaño medio de 137.1 nm y un índice de polidispersión de 0.138, con calidad buena (figura 12, A). En la gráfica se aprecia que todas las repeticiones comparten el mismo patrón, sin diferencia significativa en la intensidad de este. Adicionalmente, las nanopartículas de quitosán presentan una carga superficial de 32.3 mV, con una desviación de 7.89 mV y calidad buena (figura 12, B).

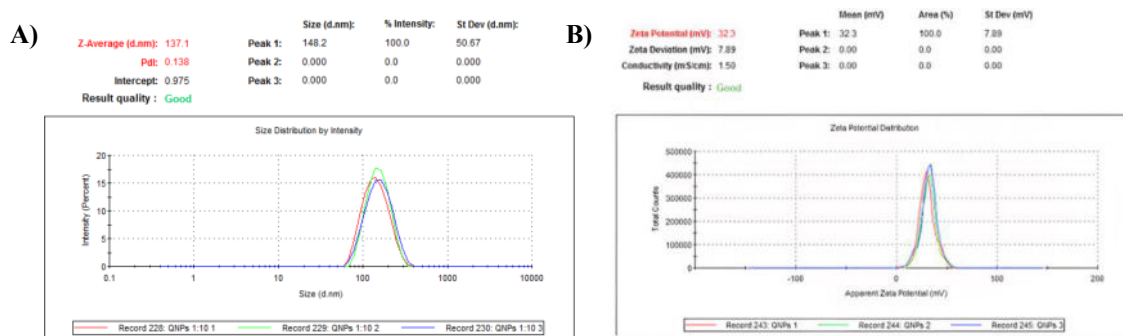


Figura 25. Caracterización de nanopartículas de quitosán sintetizadas por gelación iónica. A) Análisis de tamaño y dispersión por DLS de nanopartículas de quitosán. B) Carga superficial de las nanopartículas de quitosán evaluadas mediante potencial zeta.

7.2.2. Caracterización de las nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas presentan un tamaño medio de 164 nm con un índice de poli dispersión de 0.302, con un solo pico detectado de 141.3 nm con una intensidad del 100% y una desviación estándar de 33.34 (figura 13, A). El análisis de potencial zeta nos muestra una carga negativa de -8.63 mV, con una desviación estándar de 4.24 mV y una calidad buena (figura 13, B).

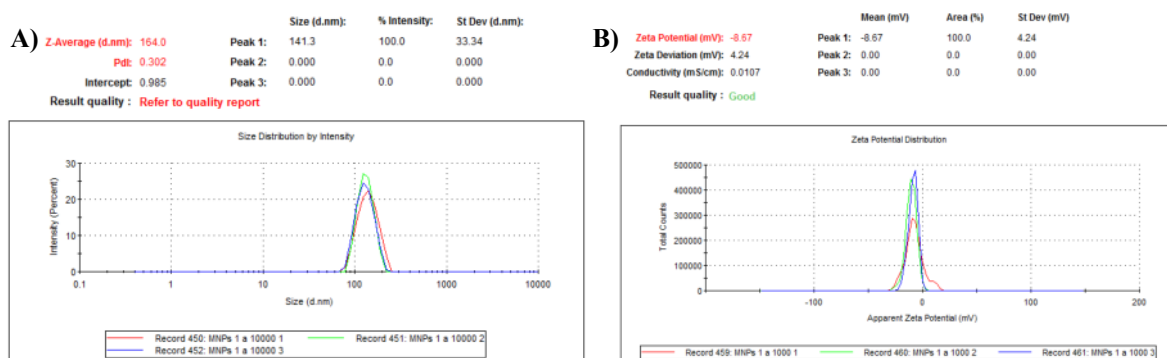


Figura 26. Caracterización de nanopartículas magnéticas sintetizadas por coprecipitación. A) Análisis de tamaño y dispersión por DLS de nanopartículas magnéticas. B) Carga superficial de las nanopartículas magnéticas evaluadas mediante potencial zeta.

7.2.3. Caracterización de las nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán

Las nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán presentan un tamaño medio de 200.4 nm con un índice de poli dispersión de 0.146, con un solo pico detectado de 222.3 nm, el cual tiene una intensidad del 100% y una desviación estándar de 82.67%, reportando una calidad

buena (figura 14, A). El potencial zeta de estas nanopartículas es de 28.6 mV, siendo el único pico y presentando una calidad buena (figura 14, B).

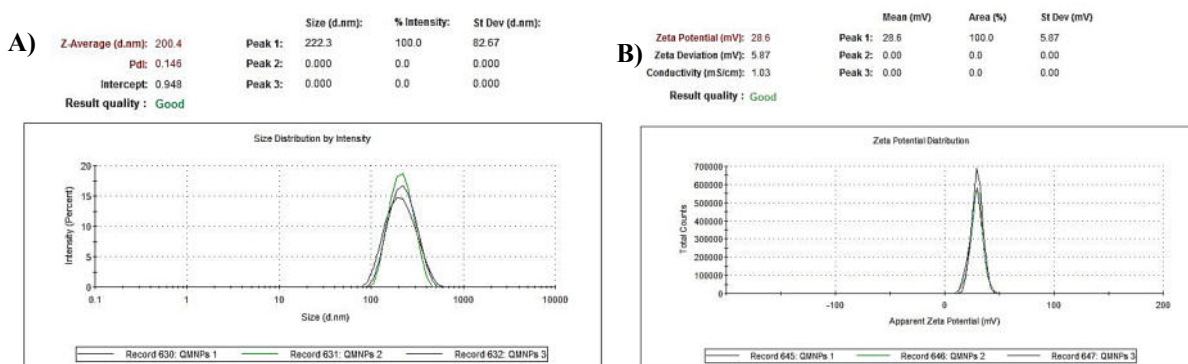


Figura 27. Caracterización de nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán sintetizadas mediante gelación iónica. A) Análisis de tamaño y dispersión por DLS de nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán. B) Carga superficial de las nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán.

7.2.4. Caracterización de las nanopartículas con polifenoles encapsulados

7.2.4.1. Caracterización de las nanopartículas con Quercetina por DLS

Las Q-QNPs presentan un tamaño medio de 185 nm con un índice de poli dispersión de 0.123. Estos cuentan con un solo pico detectado en 209.7 nm, con una intensidad del 100% (figura 15, A). Por otro lado, las Q-QMNPs tienen un tamaño medio de 222.5 nm con un Pdi de 0.188 y un solo pico a 265.3 nm con un 100% de intensidad (figura 15, B).

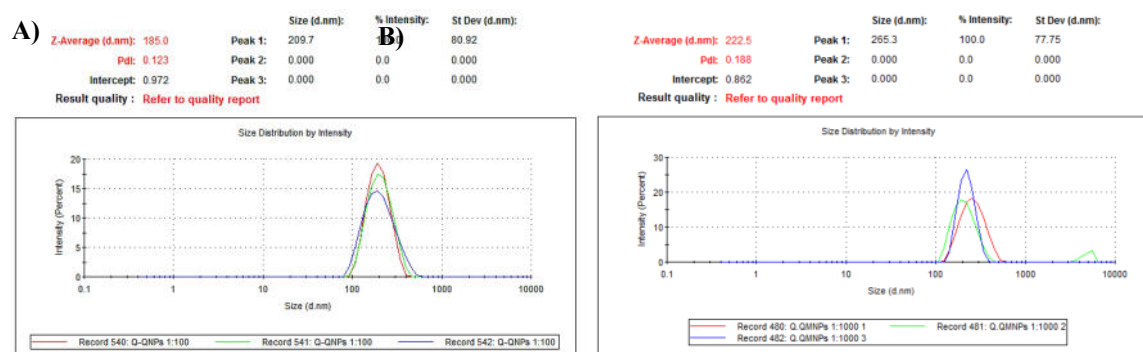


Figura 28. Caracterización de tamaño y polidispersión de las nanopartículas con quercetina encapsulada por DLS. A) Análisis de tamaño y dispersión por DLS de Q-QNPs, B) Análisis de tamaño y dispersión por DLS de Q-QMNPs.

7.2.4.2. Caracterización de las nanopartículas con Curcumina por DLS

Las C-QNPs presentan un tamaño medio de 188.9 nm con un índice de poli dispersión de 0.157 y un solo pico detectado de 206.2 nm con una intensidad del 100% (figura 16, A). En cuanto a las C-QMNPs, estas presentan un tamaño medio ligeramente superior de 233.6 nm con un Pdi de 0.188, un solo pico a 224.6 nm con un 100% de intensidad (figura 16, B).

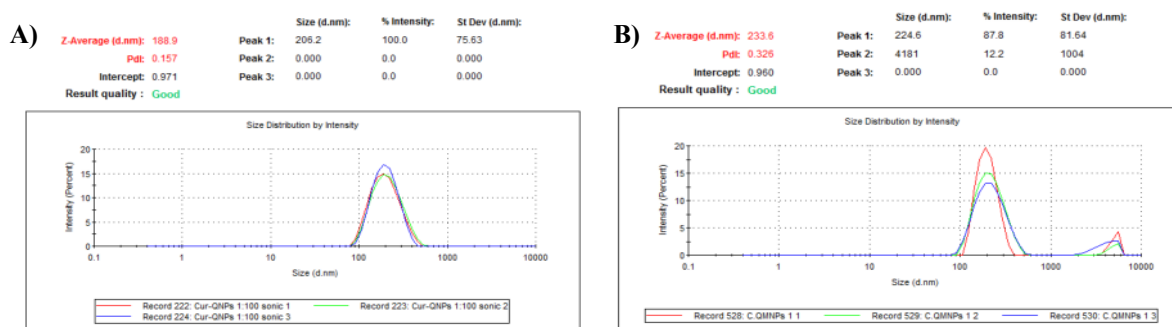


Figura 29. Caracterización de tamaño y polidispersión de las nanopartículas con curcumina encapsulada por DLS. A) Análisis de tamaño y dispersión por DLS de C-QNPs, B) Análisis de tamaño y dispersión por DLS de C-QMNPs.

7.2.4.3. Caracterización de la carga superficial de las nanopartículas con Quercetina

Las Q-QNPs presentan una carga superficial de 27.3 mV con una desviación estándar de 4.02 y con calidad buena (figura 17, A), mientras que las Q-QMNPs tienen una carga superficial de 2.03 mV con una desviación estándar de 3.51 y calidad buena (figura 17, B).

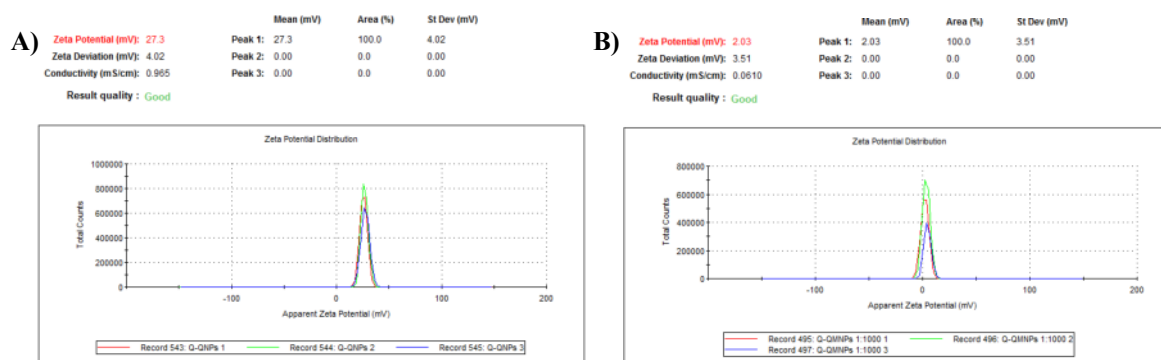


Figura 30. Caracterización de carga superficial de las nanopartículas con quercetina encapsulada por potencial zeta. A) Análisis de carga superficial de Q-QNPs, B) Análisis de carga superficial de Q-QMNPs.

7.2.4.4. Caracterización de la carga superficial de las nanopartículas con Curcumina

Las C-QNPs presentan una carga superficial de 26.9 mV con una desviación estándar de 4.37, con calidad buena (figura 18, A). Por otro lado, las C-QMNs tiene una carga superficial de 4.72 mV con una desviación estándar de 6.23 (figura 18, B).

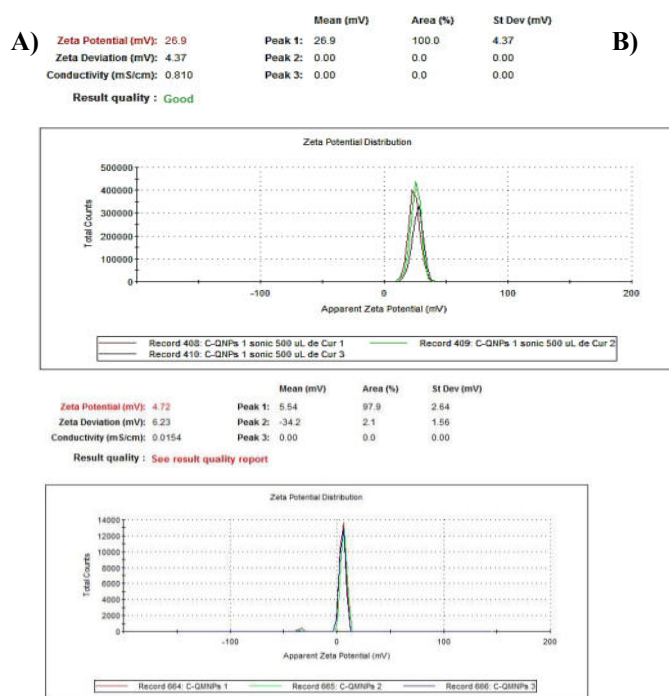


Figura 31. Caracterización de carga superficial de las nanopartículas con curcumina encapsulada por potencial zeta. A) Análisis de carga superficial de C-QNPs, B) Análisis de carga superficial de C-QMNs.

7.3. Caracterización de tamaño y forma por microscopía electrónica de barrido (SEM)

7.3.1. Caracterización de las nanopartículas con Quercetina por SEM

La caracterización de las nanopartículas con quercetina encapsulada por SEM demostró que las Q-QNPs tienen un tamaño promedio de 189.44 nm con alta homogeneidad y una apariencia esférica (figura 19, A). Por otro lado, las Q-QMNs presentan un tamaño promedio de 213.7 nm, sin embargo, aunque es posible apreciar homogeneidad de tamaños y forma, la cual comparten con las previamente mencionadas, también es posible ver la capa blanca que aparenta rodear ambas formulaciones.

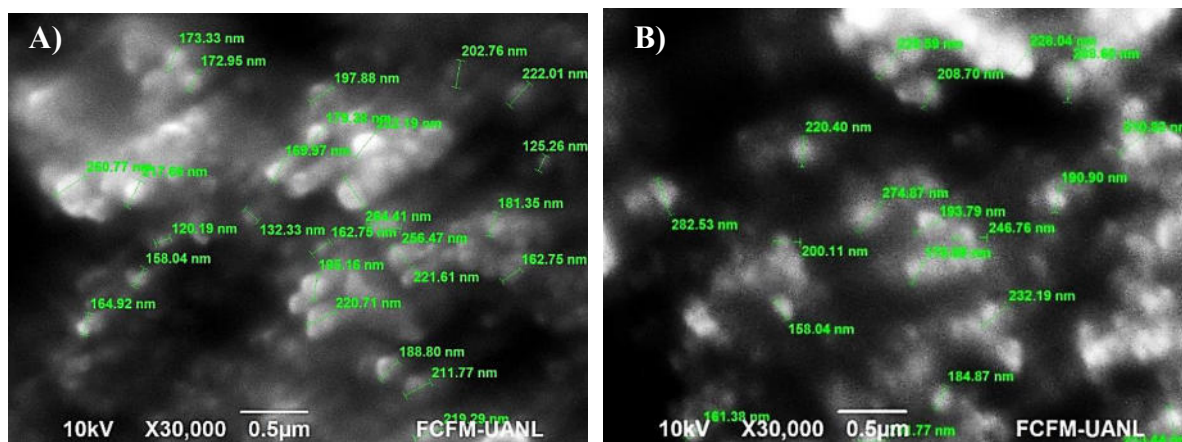


Figura 32. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas con quercetina encapsulada. A) Microscopía de las Q-QNPs por SEM donde se observa tamaño, forma y dispersión, B) Microscopía de las Q-QMNP por SEM donde se observa tamaño, forma y dispersión.

7.3.2. Caracterización de las nanopartículas con Curcumina por SEM

La caracterización de las nanopartículas con curcumina por SEM permitió observar que las C-QNPs presentan un tamaño promedio de 200.56 nm (figura 20, A) y que las C-QMNP presentan un tamaño promedio de 234.7 nm (figura 20, B). Además, es posible apreciar su homogeneidad en tamaño y forma esférica de ambas nanopartículas, así como su dispersión.

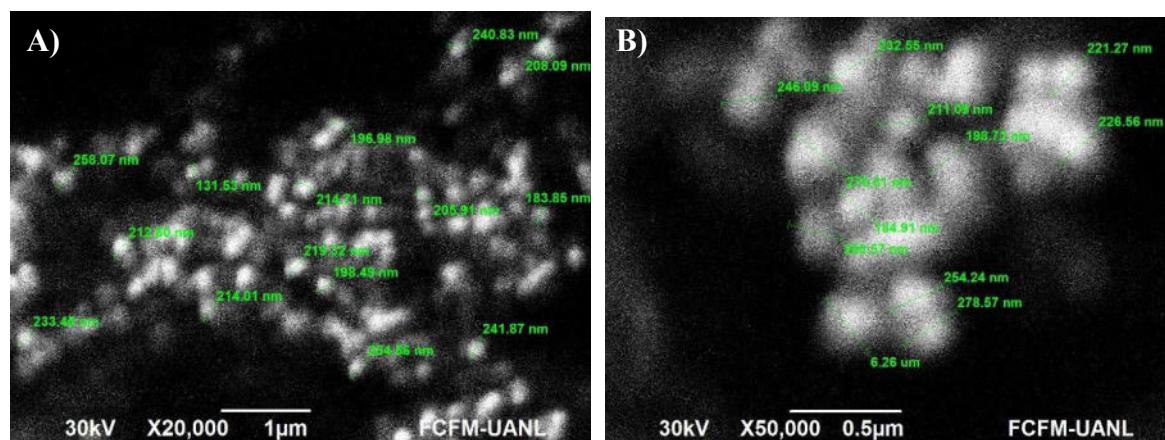


Figura 33. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas con curcumina encapsulada. A) Microscopía de las C-QNPs por SEM donde se observa tamaño, forma y dispersión, B) Microscopía de las C-QMNP por SEM donde se observa tamaño, forma y dispersión.

7.4. Caracterización de composición de las nanopartículas por espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

7.4.1. Caracterización de la composición de las nanopartículas con Quercetina encapsulada por FTIR

Mediante un análisis por FTIR se pudieron observar la presencia de quercetina en ambas nanopartículas, pues tanto las Q-QNPs como las Q-QMNP_s mostraron picos visibles aproximadamente en 1600 cm^{-1} , atribuidos a la vibración de estiramiento C=C del anillo aromático y las bandas observadas a aproximadamente 3408 y 3292 cm^{-1} corresponden al estiramiento fenólico-O-H atribuido a la presencia de quitosán en nanopartícula (Figura 21). Por otro lado, es posible observar la presencia de los picos a 582 cm^{-1} , relacionado a vibraciones de flexión de Fe-O, lo que indica la integración de la nanopartícula magnética a la síntesis de las Q-QMNP_s (figura 21, B).

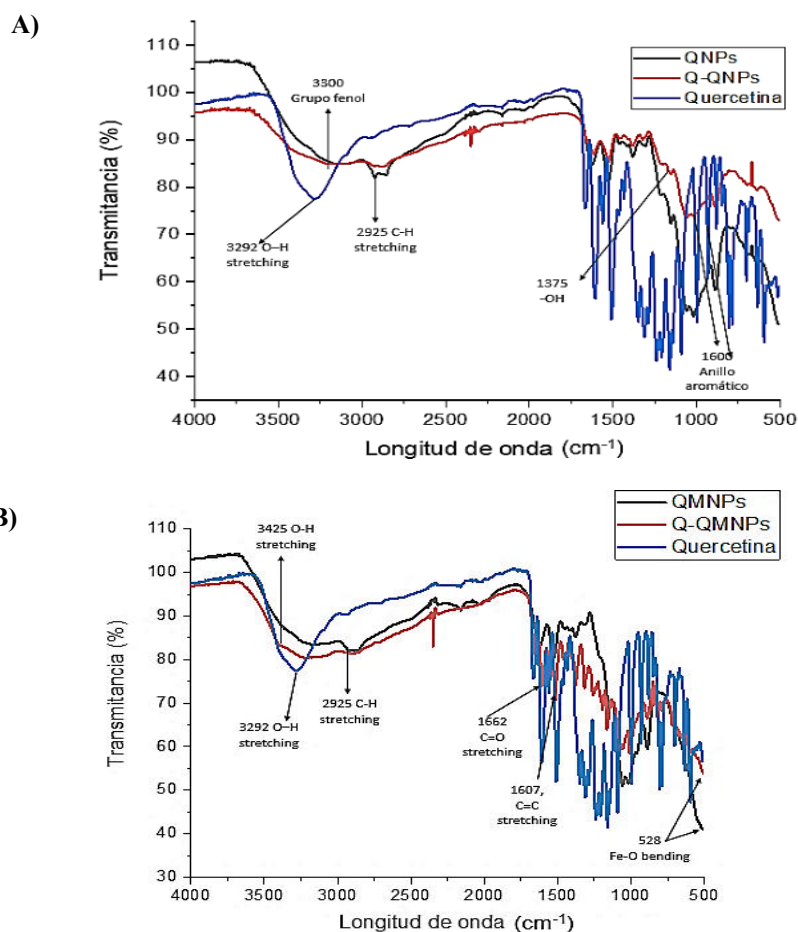


Figura 34. Análisis de composición química de las nanopartículas de quercetina por espectrometría de infrarrojos por FTIR. A) FTIR de Q-QNPs, B) FTIR de Q-QMNPs.

7.4.2. Caracterización de la composición de las nanopartículas con curcumina encapsulada por FTIR

El análisis de FTIR de las nanopartículas de curcumina muestra la presencia de curcumina al mostrar un desplazamiento del pico referente a CH₂ en la posición 2924 a 2875 cm⁻¹, al igual que el desplazamiento de 1412 cm⁻¹ a 1681 cm⁻¹, lo cual puede indicar que los grupos amonio del quitosano están unidos con grupos hidróxido de curcumina en nanopartículas (figura 22). Por otro lado, es posible observar la presencia del pico a 582 cm⁻¹, relacionado a vibraciones de flexión de Fe-O, al igual que el estiramiento O-H en 3400 cm⁻¹, que indica la presencia de nanopartículas magnéticas (figura 22, B).

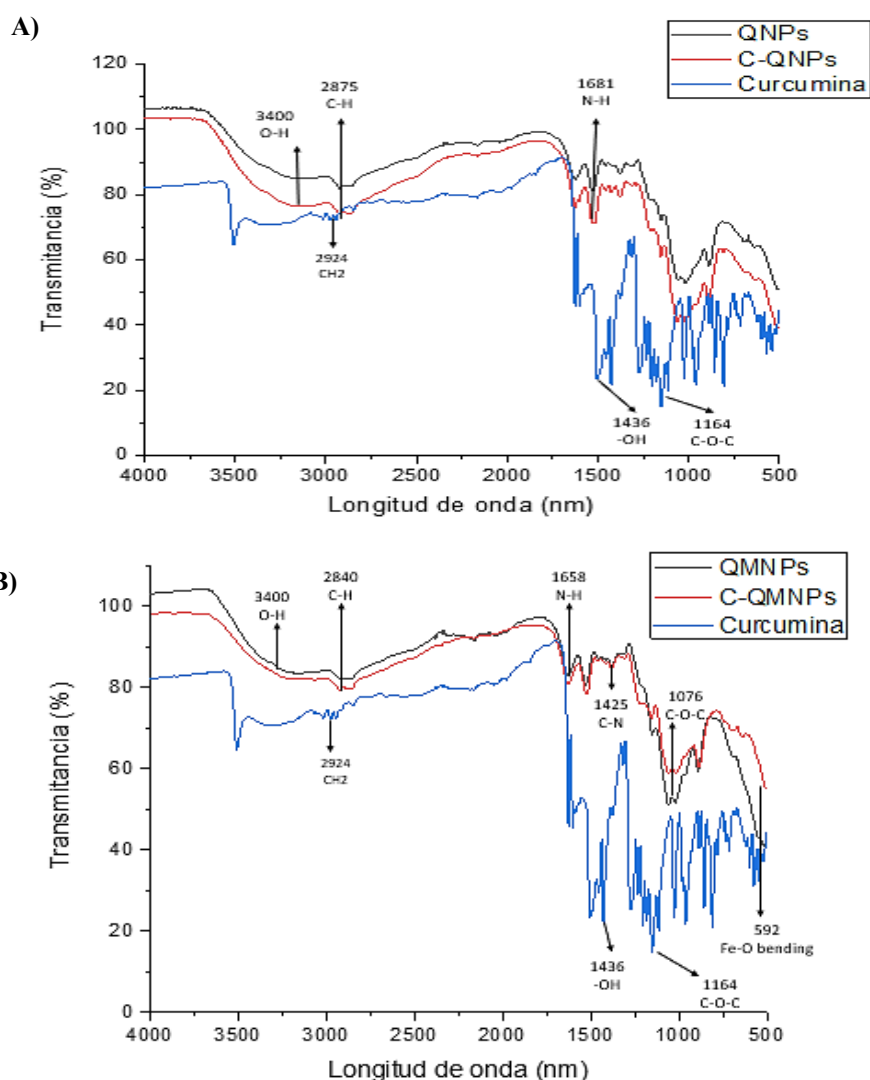


Figura 35. Análisis de composición química de las nanopartículas de curcumina por espectrometría de infrarrojos por FTIR. A) FTIR de C-QNPs, B) FTIR de C-QMNP.

7.5. Porcentaje de encapsulación y perfil de liberación de los polifenoles

7.5.1. Curva de calibración de los polifenoles

La curva de calibración de quercetina consiste en la absorbancia de 11 concentraciones conocidas de este fármaco que van desde 10 μM a 500 μM medidas a una longitud de onda de 380 nm, con lo que se obtuvo una gráfica con un coeficiente de relación de la gráfica (R^2) de 0.9975 (figura 23, A). Por otro lado, la curva de calibración de curcumina se realizó con 14 concentraciones de 0.5 μM a 15 μM midiéndose a una longitud de onda de 428 nm, con lo cual se obtuvo una curva con un R^2 de 0.9929 (figura 23, B).

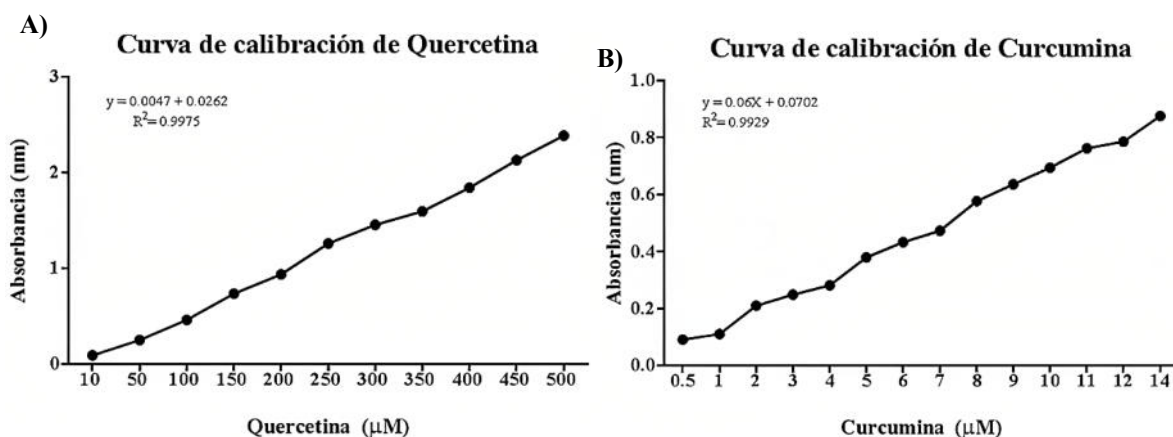


Figura 36. Curvas de calibración de los polifenoles. A) Curva de calibración de quercetina, B) Curva de calibración de curcumina.

7.5.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación de los polifenoles en nanopartículas

7.5.2.1. Eficiencia de encapsulación de Quercetina en nanopartículas

La encapsulación de quercetina registrada en las Q-QNPs fue del 81.3% (tabla 1), mientras que las Q-QMNP presentan una encapsulación ligeramente superior de 84.7% (tabla 2).

Tabla 1. Cuantificación espectrofotométrica de quercetina para medir la eficiencia de encapsulación en Q-QNPs.

	Concentración	Absorbancia (nm)	Porcentaje
--	---------------	------------------	------------

	333.6 μ M	3.423	100%
	51 μ M	0.619	18.7%
Porcentaje de encapsulación	100% - 18.7% = 81.3% de encapsulación de Quercetina		

Tabla 2. Cuantificación espectrofotométrica de quercetina para medir la eficiencia de encapsulación en Q-QMNP.

	Concentración	Absorbancia (nm)	Porcentaje
	333.6 μ M	3.423	100%
	51 μ M	0.523	15.3%
Porcentaje de encapsulación	100% - 15.3% = 84.7% de encapsulación de Quercetina		

7.5.2.2. Eficiencia de encapsulación de Curcumina en nanopartículas

La encapsulación de curcumina en las C-QNPs fue del 96.94% (tabla 3), mientras que las C-QMNP presentan una encapsulación ligeramente inferior, con 92.9% de curcumina encapsulada (tabla 4).

Tabla 3. Cuantificación espectrofotométrica de quercetina para medir la eficiencia de encapsulación en C-QNPs.

	Concentración	Absorbancia (nm)	Porcentaje
	15 μ M	2.177	100%
	0.46 μ M	0.140	3.06%
Porcentaje de encapsulación	100% - 3.06% = 96.94% de encapsulación de Curcumina		

Tabla 4. Cuantificación espectrofotométrica de quercetina para medir la eficiencia de encapsulación en C-QMNP.

	Concentración	Absorbancia (nm)	Porcentaje
	333.6 μ M	3.423	100%
	1.07 μ M	0.155	7.1%
Porcentaje de encapsulación	100% - 7.1% = 92.9% de encapsulación de Curcumina		

7.5.3. Perfil de liberación de los fármacos

7.5.3.1. Perfil de liberación de Quercetina de las Q-QNPs

En el perfil de liberación de quercetina en PBS a pH 7.4 presentó su pico máximo de liberación a las 72 horas, con una liberación final de 87.05 μM , sin embargo, es posible observar que el periodo en el que se observó la mayor liberación de fármaco es durante las primeras 6 h, obteniendo una concentración de 54.40 μM de quercetina liberada en este lapso. Por otro lado, el perfil de liberación de quercetina en PBS adicionada con 10% de etanol presentó casi el doble de concentración final liberada, pues esta fue de 146.82 μM en el mismo periodo de tiempo (figura 24), y de igual forma, la mayor parte de la liberación de fármaco se encontró en las primeras 6 h, liberando 96.68 μM de quercetina en ese tiempo.

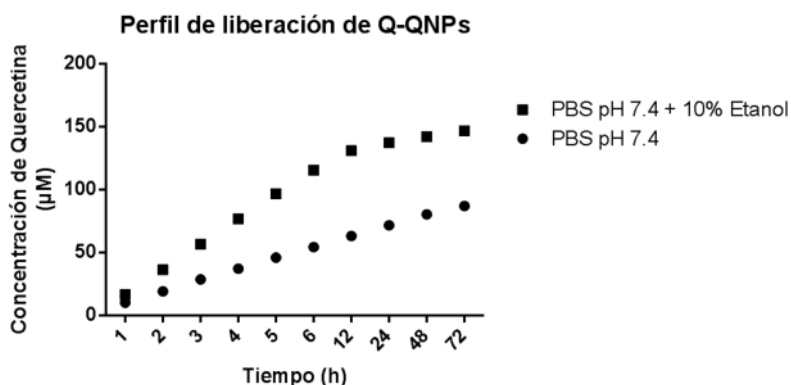


Figura 37. Perfil de liberación de quercetina de las nanopartículas Q-QNPs. Señalizado con cuadros se observa el perfil de liberación de quercetina en PBS a pH 7.4 adicionada con un 10% de etanol y con círculos se observa la liberación de quercetina en PBS a pH 7.4.

7.5.3.2. Perfil de liberación de Quercetina de las Q-QMNP

El perfil de liberación de quercetina de las nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán en PBS a pH 7.4 presentó su pico máximo de liberación a las 96 horas, con una liberación final de 103.89 μM , sin mostrar primero una liberación en fase exponencial para luego presentar una meseta, por lo que no tiene un punto en donde se presentara una liberación significativa al compararse con el resto de las lecturas. Por otro lado, la quercetina liberada en la solución de PBS a pH 7.4 adicionada con un 10% de etanol, presentó una liberación máxima de 227.33 μM (figura 25), siguiendo el mismo perfil que su contraparte sin etanol.

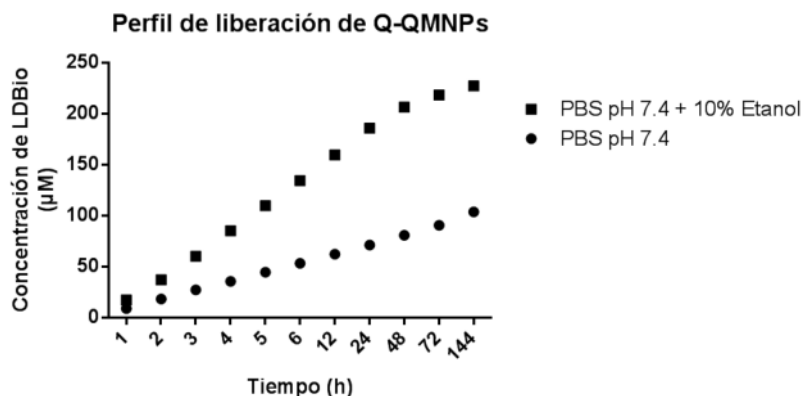


Figura 38. Perfil de liberación de quercetina de las nanopartículas Q-QMNP. Señalizado con cuadros se observa el perfil de liberación de quercetina en PBS a pH 7.4 adicionada con un 10% de etanol y con círculos se observa la liberación de quercetina en PBS a pH 7.4.

7.5.3.3. Perfil de liberación de curcumina de los C-QNPs

La liberación de curcumina en PBS a pH 7.4 obtuvo una liberación máxima de 10.20 μM a las 96 horas, con la liberación mayormente realizada en las primeras 24 horas, donde se alcanzó una liberación de 7.4 μM . Por otro lado, la liberación de curcumina en PBS adicionada con 10% de etanol presentó una concentración ligeramente superior de 11 μM (figura 26), manteniendo el mismo patrón de liberación que en el PBS solo.

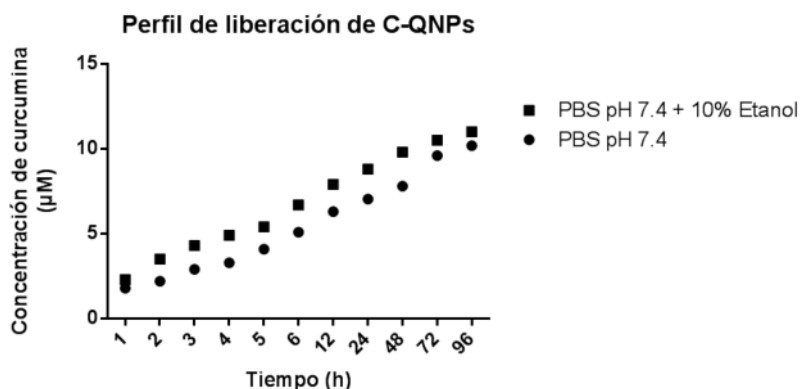


Figura 39. Perfil de liberación de curcumina de las nanopartículas C-QNP. Señalizado con cuadros se observa el perfil de liberación de curcumina en PBS a pH 7.4 adicionada con un 10% de etanol y con círculos se observa la liberación de curcumina en PBS a pH 7.4.

7.5.3.4. Perfil de liberación de curcumina de los C-QMNP

La liberación de curcumina de los C-QNP en PBS a pH 7.4 obtuvo una liberación máxima 9.6 μM también a las 96 horas, ligeramente inferior a la alcanzada por su contraparte sin nanopartícula

magnética, pero manteniendo la liberación al mismo ritmo. Esta tendencia se conservó para la liberación de la curcumina en PBS adicionada con 10% de etanol, liberando 10.4 μM (figura 27).

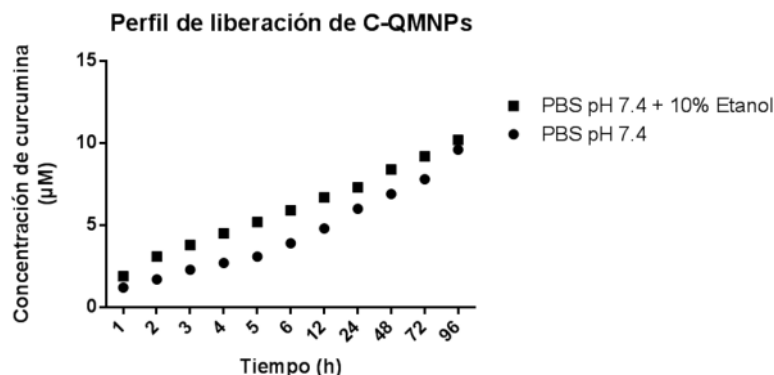
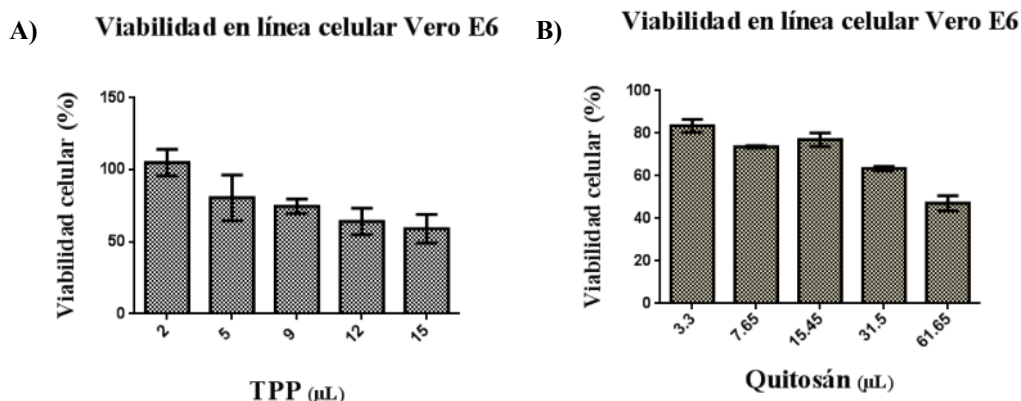


Figura 40. Perfil de liberación de curcumina de las C-QMNP's. Señalizado con cuadros se observa el perfil de liberación de curcumina en PBS a pH 7.4 adicionada con un 10% de etanol y con círculos se observa la liberación de curcumina en PBS a pH 7.4.

7.6. Evaluación de citotoxicidad

7.6.1. Evaluación de citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6

La evaluación de la citotoxicidad de los componentes de los nanoacarreadores se llevó a cabo mediante MTT, en donde presentaron una concentración citotóxica media (CC_{50}) de 16.77 μL en caso del TPP, el cual de una concentración de 0.86 mg/mL, equivalente a 14.4 μg (figura 28, A); mientras que el quitosán obtuvo una CC_{50} de 56.27 μL a una concentración de 2 mg/mL, equivalente a 112.54 μg (figura 28, B). Quercetina presentó su CC_{50} a 156.96 μM (figura 28, C) y curcumina lo mostró a 16.08 μM (figura 28, D).



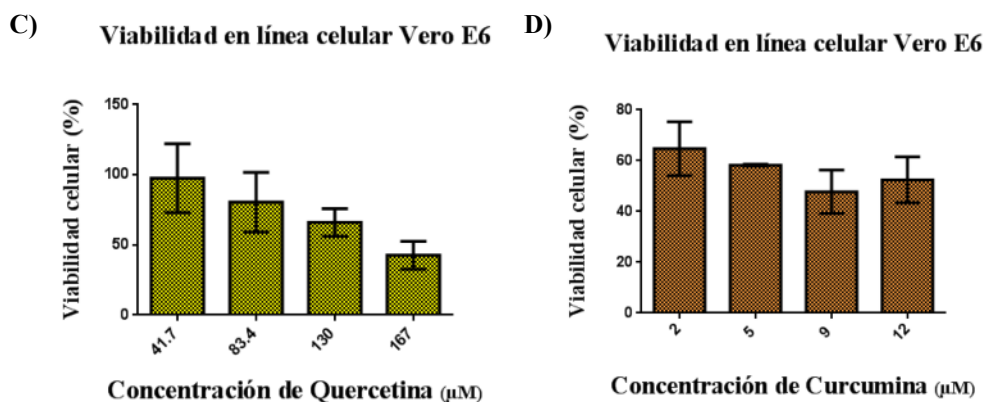


Figura 41. Citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6 determinada por MTT a 48 horas. A) TPP, B) Quitosán, C) Quercetina y D) Curcumina.

Tabla 5. Concentración citotóxica media (CC_{50}) de los componentes de las nanopartículas.

Compuesto	TPP	Quitosán	Quercetina	Curcumina
CC_{50}	16.77 μ L	56.27 μ L	156.96 μ M	16.08 μ M

7.6.2. Evaluación de citotoxicidad de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6

La evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas se llevó a cabo por MTT bajo condiciones previamente descritas en el apartado de metodología, con la administración de los tratamientos en base a las concentraciones de quercetina y curcumina encapsuladas. Los resultados obtenidos de la citotoxicidad media presentada por las nanopartículas Q-QNPs fue de 250.33 μ M (figura 29, A), mientras que las Q-QMNP presentaron una CC_{50} de 195.07 μ M (figura 29, B). Por otro lado, las C-QNPs obtuvieron una CC_{50} de 74.96 μ M (figura 29, C) y las C-QMNP de 20.46 μ M (figura 29, D), demostrando que los fármacos encapsulados tienen menor efecto citotóxico que cuando están en su forma libre.

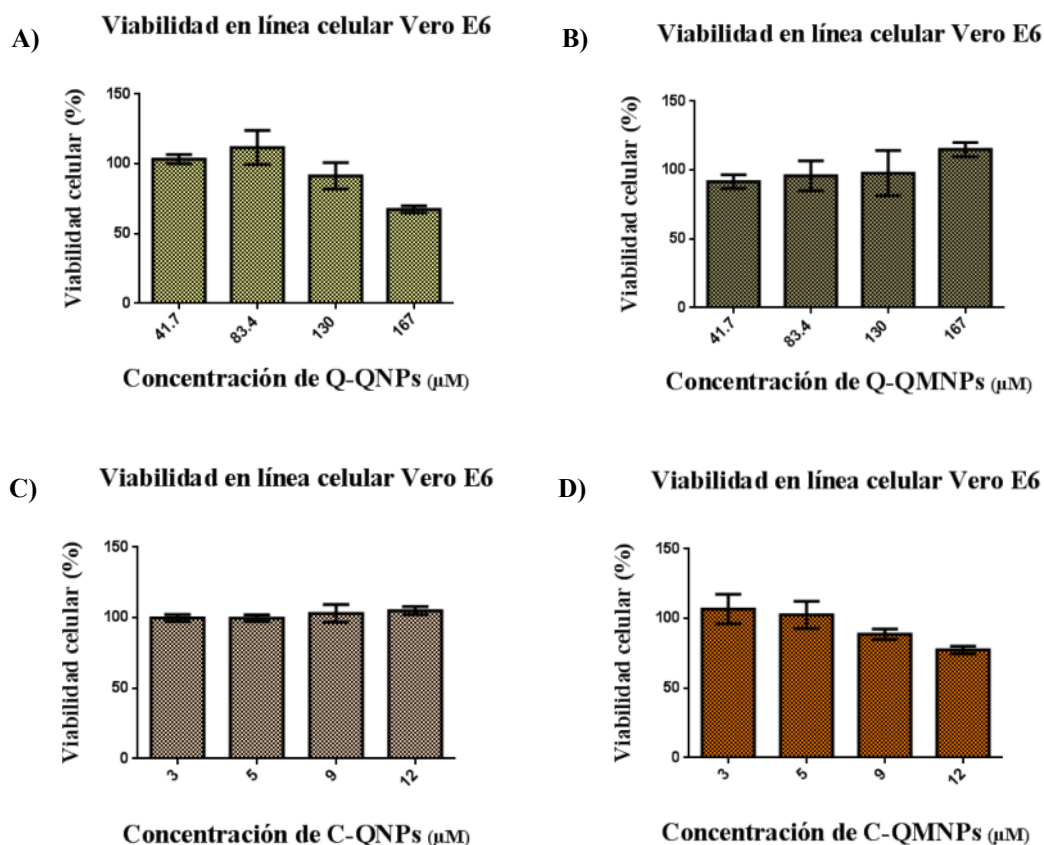


Figura 42. Citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6 determinada por MTT a 48 horas. A) Q-QNPs, B) Q-QMNPs, C) C-QNPs y D) C-QMNPs.

Tabla 6. Concentración citotóxica media (CC₅₀) de las nanopartículas

Nanopartículas	Q-QNPs	Q-QMNPs	C-QNPs	C-QMNPs
CC ₅₀	250.33 μM	195.07 μM	74.96 μM	20.46 μM

7.7. Ensayo de neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 *in vitro*

7.7.1. Caracterización de la proteína de superficie del pseudovirus

Se empleó la técnica de Western Blot para determinar la presencia de la proteína S en la superficie. En el primer carril, se visualiza la proteína S liofilizada, utilizada como control positivo. En el segundo carril, se observa la presencia de la proteína S en la muestra híbrida de SARS-CoV-2 y H1N1, seguida de tres carriles con distintos lotes de producción de pseudovirus, evidenciando la presencia de la proteína S en la superficie en todos los lotes.

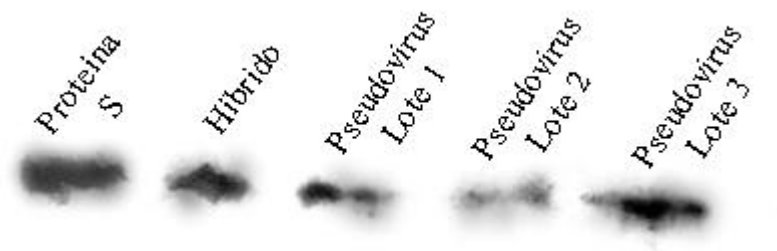


Figura 43. Caracterización de la proteína S en el pseudovirus.

7.7.2. Neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 *in vitro* de las nanopartículas con Quercetina

La neutralización de la infección por pseudovirus utilizando como referencia el IC₅₀ de la quercetina previamente reportado para la inhibición de SARS-CoV, se mostró ligeramente superior con un 57.21% de neutralización, la cual sorprendentemente disminuyó a 56.82% al incrementar al doble la concentración de quercetina administrada. Esta tendencia también se observó con las Q-QNPs, si bien no es significativamente diferente pues a 83.4 μ M la neutralización fue de 80.86%, mientras que el doble presentó una neutralización de 80.32%. Las Q-QMNPs presentaron resultados similares, pues a 83.4 μ M presentaron una neutralización de 78.94%, mientras que al doble se presentó una neutralización de 79.03% (tabla 7), mostrando que la neutralización con quercetina no es dosis dependiente. Además, mediante un ANOVA (figura 30) se puede observar que la diferencia significativa entre los controles y las nanopartículas Q-QNPs y Q-QMNPs solo se presenta en la concentración de 83.4 μ M, pues a 167 μ M solamente se ve una diferencia significativa entre el efecto neutralizante de la quercetina contra las Q-QNPs.

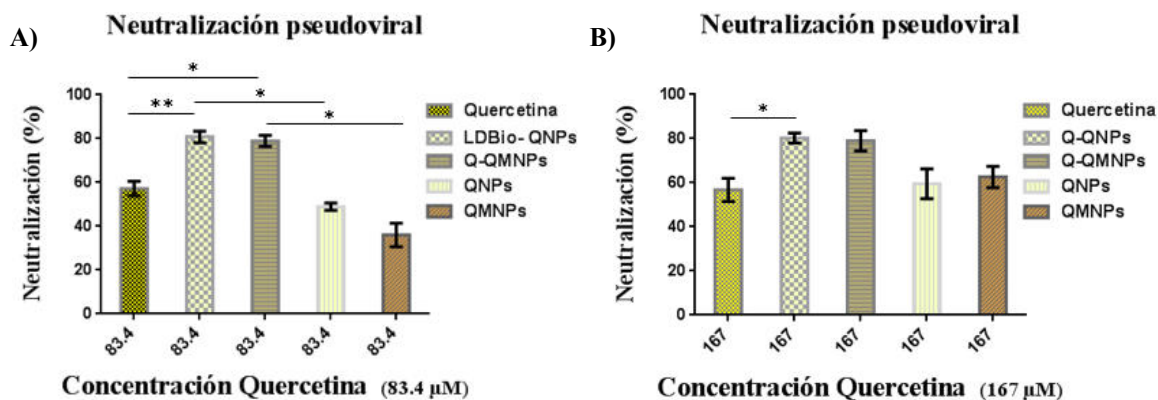


Figura 44. Neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 por quercetina y nanopartículas con quercetina encapsulada en base al A) IC_{50} previamente reportado para SARS-CoV-1 y B) el doble de esa concentración.

Tabla 7. Porcentaje de neutralización promedio de los nanocomplejos con quercetina encapsulada, así como los controles de las nanopartículas solas y quercetina libre.

Concentración de los nanopartículas	Quercetina	Q-QNPs	Q-QMNP	QNPs	QMNP
83.4 μ M	57.21 %	80.86 %	78.94 %	48.94 %	36.05 %
167 μ M	56.82 %	80.32 %	79.03 %	59.54 %	62.6 %

7.7.3. Neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 *in vitro* de las nanopartículas con Curcumina

Debido a que reportes previos comentan diversas IC_{50} para la curcumina, se decidió tomar como base a 5 μ M y el doble de esa concentración. Lo que se encontró es que a 5 μ M la curcumina libre tiene una neutralización del 27.3% y con 10 μ M tiene una neutralización del 92.58%, lo que indica un efecto dosis dependiente. Esto se observó de igual forma en los resultados obtenidos por las nanopartículas C-QNPs, que en la primera concentración se obtuvo una neutralización del 71.24%, mientras que con la segunda se obtuvo una del 79.22%, así como los C-QMNP que con la primera concentración se obtuvo una neutralización de 79.15% y con la segunda una de 87.17% (tabla 8). Adicionalmente se realizó un ANOVA (figura 31) para corroborar la significancia del efecto neutralizante de las nanopartículas con curcumina en contraste con las nanopartículas solas, así como con la curcumina libre y se encontró que a 5 μ M hay diferencia altamente significativa entre la curcumina libre y encapsulada en ambas nanopartículas, así como entre el tratamiento de C-QMNP y su control QMNP, tendencia que se siguió observando al duplicar la concentración de curcumina únicamente en esta última.

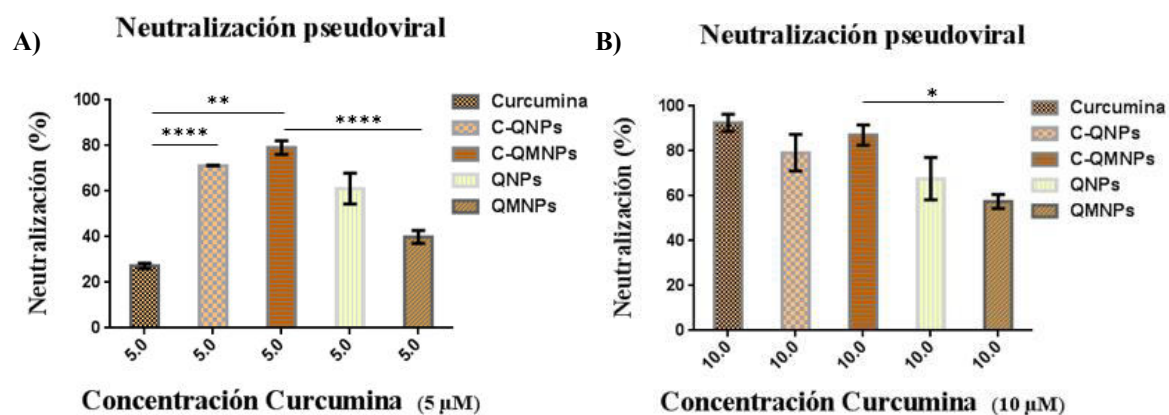


Figura 45. Neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 por curcumina y nanopartículas con curcumina encapsulada en base al A) IC_{50} previamente reportado para SARS-CoV-1 y B) el doble de esa concentración.

Tabla 8. Porcentaje de neutralización promedio de las nanopartículas con curcumina encapsulada, así como los controles de las nanopartículas solas y curcumina libre.

Concentración de los nanocomplejos	Curcumina	C-QNPs	C-QMNPs	QNPs	QMNPs
5 μM	27.30 %	71.24 %	79.15 %	61.20 %	40.0 %
10 μM	92.58 %	79.22 %	87.17 %	67.75 %	57.58 %

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la síntesis de nanopartículas de quitosán capaces de encapsular dos polifenoles, quercetina y curcumina, mediante el método de gelación iónica. La gelación iónica o ionotrópica es un fenómeno que ocurre debido a la unión de los grupos amino cargados positivamente con los grupos tetrapolifosfóricos cargados negativamente del TPP, ya sea mediante deprotonación o por interacción iónica que depende del pH de TPP, pues a un pH más bajo se trata de un entrecruzamiento iónico, mientras que a un pH más alto se trata de un mecanismo de deprotonación (Bhumkar y Pokharkar, 2006). De acuerdo con la literatura, la síntesis de las nanopartículas de quitosán genera una solución con mayor opacidad y de una tonalidad más clara a la del quitosán por sí solo (El-Naggar et al. 2022) y cuando estas almacenan compuestos como quercetina o curcumina, quienes tienen una coloración intensa, su apariencia tiende a mostrar la encapsulación del compuesto reduciendo la saturación del color que presenta y aumenta la turbidez de la síntesis (Sun et al. 2023) como se aprecia en las figuras 23 y 24.

Dentro de los principales factores a considerar para la elección de un método de síntesis de nanopartículas en el área biomédica es conocer el tamaño promedio de las nanopartículas que se generan, pues se sabe que si estos se encuentran en un rango de 10 nm las nanopartículas pueden pasar fácilmente a través de los vasos sanguíneos y ser eliminadas por los riñones; mientras que si son muy grandes pueden ser capturadas por las células del sistema fagocítico mononuclear (MPS). Es por eso se recomiendan síntesis que favorezcan nanopartículas de tamaños cercanos a 100 nm, lo que mejora su vida media en circulación, reduce su filtración hepática y le dan mayor superficie de área para liberar los fármacos (Adamo et al. 2017).

Una manera de estimar el tamaño promedio de las nanopartículas en solución es a través de una técnica denominada “dispersión de luz dinámica” (DLS) o espectroscopia de correlación de fotones (PCS), un método basado en como la luz se dispersa desde las partículas en suspensión, produciendo variaciones de intensidad que dan lugar a una estimación de tamaño y dispersión de la muestra a través de modelos matemáticos (Hoo et al. 2018). Mediante este método se estimó que las QNPs presentan un tamaño medio de 137.1 nm y un índice de polidispersión (pdi) de 0.138 así como una carga superficial de 32.3 nM (figura 25), esto valores corresponden a las nanopartículas de 160 nm reportadas previamente con el uso de las mismas

proporciones de los compuestos (Alcaraz, 2011), pues hay factores que afectan el tamaño de las nanopartículas de quitosán, dentro de los que se encuentran el grado de desacetilación del quitosán, la proporción de acuerdo a su agente entrecruzante y el pH a cual se encuentran ambas soluciones (Aranda et al. 2022).

Comparado a los valores de la QNPs, la encapsulación de los polifenoles tiene efectos en las propiedades previamente discutidas, pues las Q-QNPs presentaron un tamaño de 185 nm, un pdi a 0.123 (figura 28) y una carga superficial de 27.3 mV (figura 30), mientras que las C-QNPs obtuvieron un tamaño 188.9 nm, con un pdi de 0.157 (figura 29) y una carga superficial de 26.9 mV (figura 31). Por otro lado, las QMNPs mostraron un tamaño de 200.4 nm con un pdi de 0.146 (figura 26), mientras que sus contrapartes con polifenol, Q-QMNPs presentaron un tamaño de 222.5 nm con un pdi de 0.188 (figura 28) y las C-QMNPs un tamaño de 233.6 nm con un pdi de 0.188 (figura 29). La tendencia de incremento de tamaño cuando se añaden nanopartículas magnéticas y/o polifenoles a la solución es indicadora de la encapsulación de los compuestos (Ziaee et al. 2023), así como el cambio en su carga de superficie, que en las QNPs se encuentra en 32.3 mV (figura 25), mientras que cuando se le adicionan MNPs con una carga de -8.63 mV (figura 13), se reduce a 28.6 mV en las QMNPs (figura 26), tendencia que se mantiene al adicionar los polifenoles, sin embargo, es necesario recalcar la presencia de una carga superficial positiva en todas las nanoformulaciones, lo cual es importante debido a que las nanopartículas con esta cualidad tienen una mayor atracción a las membranas celulares puesto que se encuentran cargadas negativamente (Németh et al. 2022), además de que las nanopartículas cargadas positivamente inducen una mayor activación del complemento en comparación con las negativas o con carga neutra, haciéndolas más inmunoactivadoras (Adamo et al. 2017).

Por lo previamente mencionado también se puede destacar que las nanopartículas se encuentran en un rango de población monodispersas, pues de acuerdo con las organizaciones internacionales de normalización (ISO), los valores de pdi inferiores a 0.05 son más comunes para las muestras monodispersas, mientras que los valores superiores a 0.7 son comunes para una distribución de partículas de tamaño amplio (Mudalige et al. 2019).

La polidispersión y homogeneidad de las muestras se pueden apreciar en las microscopías de barrido, pues todas presentaron tamaños similares dentro del rango esperado

de acuerdo con lo observado por DLS, así como una morfología esférica (figuras 32 y 33), una cualidad beneficiosa para la administración de fármacos debido a su alta probabilidad de internalización con mayor rapidez en comparación con otras nanopartículas, como las de forma de varilla (Chithrani et al. 2006).

Si bien mediante a comparación de los valores de tamaño y carga superficial se puede observar la posible encapsulación de los compuestos, una manera más certera de corroborar que se encuentran presentes en la síntesis es a través de una espectrometría de infrarrojos (FTIR). Los espectros de FTIR de las nanopartículas con quercetina encapsulada presentaron diversos picos que indican la presencia de nanopartículas de quitosán y de quercetina. Se observaron picos cerca de 1600, 3408 y 3292 cm^{-1} , los cuales se atribuyen a la vibración de estiramiento $\text{C}=\text{C}$ del anillo aromático, un pico a 1375 cm^{-1} que se asocia a las vibraciones de flexión de enlaces $\text{C}-\text{H}$ y $\text{O}-\text{H}$ en la quercetina, así como al estiramiento fenólico- OH atribuido a la presencia de quitosán nanoparticulado (Anwer et al, 2016; Kurt et al. 2023). Adicionalmente, en el gráfico de Q-QMNP se puede encontrar un último pico de importancia en 582 cm^{-1} el cual se relaciona a vibraciones de flexión de $\text{Fe}-\text{O}$ (figura 34), indicando la presencia de MNPs en la síntesis (Zare et al. 2021).

Por otro lado el análisis de FTIR de las nanopartículas de curcumina presentaron un desplazamiento de bandas de la posición 2924 a 2875 cm^{-1} referente al enlace CH_2 , al igual que el desplazamiento de 1412 cm^{-1} a 1681 cm^{-1} , cambio que describe la unión de los grupos amonio del quitosano a los grupos hidróxido de curcumina en nanopartículas (figura 35) por lo cual se puede observar la presencia de nanopartículas de quitosán con curcumina encapsulada (Osuna et al. 2012). A 582 cm^{-1} hay vibraciones de flexión de $\text{Fe}-\text{O}$ y el estiramiento $\text{O}-\text{H}$ en 3400 cm^{-1} que indica la presencia de nanopartículas magnéticas (Pham et al. 2016).

Una de las características más codiciadas de la encapsulación de fármacos en nanopartículas es tener una liberación controlada de este, por lo que conocer la encapsulación y posterior liberación de los polifenoles es de alta importancia. Para conocer las concentraciones encapsuladas y liberadas se realizó una curva de calibración para la quercetina y una para la curcumina, ambas teniendo un R^2 de arriba de 0.99 (figura 36), lo que indica la confiabilidad de la curva para usarla en la extrapolación de valores (Rashedi et al. 2019). Mediante una regla de tres simple se obtuvo que la encapsulación de la quercetina en ambas nanopartículas ronda el

80 a 85% (tablas 1 y 2), lo cual corresponde a reportes previos con una eficiencia de encapsulación de $83.8 \pm 0.33\%$ (Jardim et al. 2022). Por otro lado, la encapsulación de curcumina se encontró arriba del 92% en ambas nanopartículas (tablas 3 y 4), que de igual forma correspondiente a reportes previos con eficiencias de encapsulación de $91.4 \pm 2.7\%$ (Ebrahimi et al. 2023).

La liberación se realizó a un pH de 7.4 puesto que el pH pulmonar se encuentra entre 7.38 y 7.42, con la adición de lisozima lo cual ayuda a simular de forma más cercana la liberación en un ambiente pulmonar (Islam et al. 2019) y se encontró que las Q-QNPs liberaron $87.05 \mu\text{M}$ de quercetina en 72 h (figura 37), mientras que las Q-QMNPs liberaban $103.89 \mu\text{M}$ en 96 h (figura 38). Por otro lado, la liberación de C-QNPs fue de $10.20 \mu\text{M}$ (figura 39) a las 96 horas y de $9.6 \mu\text{M}$ en el caso de las C-QMNPs en el mismo tiempo (figura 40). Si bien estos valores demuestran que los polifenoles encapsulados son capaces de liberarse, el factor de la alta hidrofobicidad de ambos podría no permitir observar con claridad la liberación realmente efectuada, por lo que la adición de 10% de etanol les brinda una fracción soluble para poder detectarlos con mayor facilidad en solución, por lo que se puede observar una liberación superior en todas las nanopartículas, con $146.82 \mu\text{M}$ liberadas para las Q-QNPs, $227.33 \mu\text{M}$ para las Q-QMNPs, $11 \mu\text{M}$ por parte de las C-QNPs y $10.4 \mu\text{M}$ por C-QMNPs, aunque cabe destacar de la posibilidad de que este efecto de ver mayor liberación no solo se debe a la fase soluble que se les brinda a los polifenoles, sino que el quitosano tiende a hincharse en presencia del etanol, permitiendo una mejor liberación (Nathiya et al. 2014; Rashedi et al. 2019). Otro de los aspectos que se pueden explorar para mejorar la liberación de los fármacos es controlar el grado de reticulación entre las cadenas de polímeros, ajustando las proporciones y los pH de los componentes (Davis y McLister, 2016).

El siguiente paso de la caracterización fue evaluar la citotoxicidad de los componentes de las nanopartículas sobre la línea celular Vero E6, en donde se encontró que el TTP tiene un CC_{50} de $14.4 \mu\text{g/mL}$, el quitosán de $112.54 \mu\text{g/mL}$, la quercetina de $156.96 \mu\text{M}$ y la curcumina de $16.08 \mu\text{M}$ (figura 41, tabla 5), demostrando que las concentraciones en base a los IC_{50} de SARS-CoV-2 previamente reportados se consideran no citotóxicos (Ferreira, 2015). Sin embargo, es importante destacar que reportes previos mencionan que la quercetina tiene CC_{50} $301.5 \mu\text{M}$, mientras que la curcumina tiene uno de $268.7 \mu\text{M}$ (Kandeil et al. 2021), aunque

podría deberse al solvente utilizado, puesto que no se menciona si los compuestos se colocaron en solución o liofilizados, mientras que para este trabajo se administraron disueltos en etanol, el cual tiene una alta citotoxicidad sobre esta línea celular (Leslie et al. 2021).

En comparación a lo anterior, las nanopartículas demostraron tener un efecto citotóxico menor, encontrando que las Q-QNPs tienen un CC_{50} de 250.33 μ M, las Q-QMNPs 195.07 μ M, las C-QNPs 74.96 μ M y las C-QMNPs un 20.46 μ M (tabla 6, figura 42), esta es una tendencia que ha sido reportada en artículos previos (Loutfy et al. 2022), pero que todavía más importante, demuestra la inocuidad de los tratamientos en nanopartículas sobre esta línea celular.

Una vez que se corroboró que los tratamientos no se utilizarían por encima de las dosis citotóxicas medias, se procedió a la evaluación de su efecto neutralizante sobre un pseudovirus de SARS-CoV-2, el cual pudo utilizarse en un laboratorio con nivel de bioseguridad 2 debido a que si bien cuenta con la proteína S en membrana, el genoma pertenece al virus de la estomatitis vesicular (VSV) y presenta una delección en el gen codificante de la proteína G, su proteína reconocedora del receptor, en el cual se ha insertado el gen codificante de la luciferasa dando lugar al VSV* Δ G (Fluc), un virus capaz de infectar a células con receptor ACE2 sin la patología o el grado de riesgo biológico. Además, debido a la presencia de la luciferasa de luciérnaga, es posible detectar infección rápidamente al medir en un lector de placa la cantidad de luminiscencia que emite en contacto con su sustrato (Nie et al. 2020).

Para determinar que se trata de un pseudovirus de SARS-CoV-2 y no partículas virales remanentes del pseudovirus VSV* Δ G (Fluc), se llevó a cabo un ensayo de Western Blot con el objetivo de determinar la presencia de la proteína S en los lotes de producción del pseudovirus. Para esto se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer al RBD de la proteína S y

mediante el cual se determinó la presencia de la proteína Spike en las muestras y que esta presenta un tamaño aproximado de 200 KDa, similar en lo reportado en reportes previos donde se describe un tamaño aproximado entre 180 y 200 KDa de la proteína Spike en ensayos sobre virus nativos y pseudovirus (Ou et al. 2020, Boson et al. 2021).

Una vez determinada la presencia de proteína S en la membrana del pseudovirus, se procedió a realizar los ensayos de neutralización. Los resultados de neutralización de las nanopartículas sin polifenoles encapsulados presuntamente se deben a que las nanopartículas de quitosano tienen el potencial de unirse a partículas de virus por interacciones físicas, inhibiendo la replicación viral (El-Ganainy et al. 2023), sin embargo, es posible observar un aumento significativo en su actividad neutralizante cuando se encapsulan los polifenoles. La quercetina mostró una neutralización superior al 80% cuando está encapsulada en nanopartículas de quitosán y de un 79% cuando está encapsulada en las nanopartículas magnéticas con red de quitosán, mientras que cuando está libre no sobrepasa el 57.21%, probando que la encapsulación de la quercetina mejora su actividad neutralizante de manera significativa (figura 44, tabla 7). Es necesario resaltar que la quercetina y las nanopartículas con quercetina encapsulada no inhibieron al virus de manera dosis dependiente puesto que no se vio una neutralización superior al duplicar la dosis seleccionada. Esto contrasta con lo descrito en reportes previos, en donde se habla de que la quercetina tiene una actividad inhibitoria dosis dependiente con un IC_{50} de 18.2 μM un ensayo de reducción de placa de SARS-CoV-2, sin embargo, en dicho artículo también detectaron que la inhibición por quercetina actúa en varios puntos del ciclo de replicación puesto que actúa como virucida y afecta en la replicación (Lica et al. 2021) mediante la inhibición de la actividad 3CLpro, la inhibición de la actividad de PLpro y la actividad helicasa (Prasansuklab et al. 2020) lo cual aunado a la diferencia entre los ensayos, podría explicar la diferencia entre los resultados y por lo que se sugiere que se empleen en un modelo viral nativo (Kandeil et al. 2021).

Por otro lado, el efecto neutralizante de la curcumina nos muestra un panorama diferente, se aprecia que a una concentración de 5 μM aumenta significativamente su efecto neutralizante cuando es encapsulada, pues pasa de neutralizar en un 27.3% cuando está libre a 71.22% y

79.15%, para C-QNPs y C-QMNP (respectivamente), manteniendo una diferencia significativa con los controles de nanopartículas solas (tabla 8, figura 45). La curcumina si presentó una actividad dosis dependiente, pues al incrementar a 10 μ M la curcumina libre inhibió en un 92.58% lo cual corresponde con reportes previos que mencionan que el SARS-CoV-2 puede ser inhibido con esta concentración de curcumina (Septisetyani et al. 2023), y si bien la tendencia de dosis dependiente si continuó, aumentando a 79.22% con las C-QNPs y a 87.17% (figura 44, tabla 8), posiblemente esto se deba al alto grado de especificidad de la curcumina libre, pues tiene arriba del 99% de efecto viricida, lo que indica que posiblemente actúa directamente sobre el virión provocando su inactivación (Lica et al. 2021), pues si está libre es probable que efectúe con mayor rapidez su efecto neutralizante, mientras que la que está encapsulada tardará más de tiempo en actuar por el tiempo que tarda encontrarse en solución, factor que podría solucionarse realizando una reformulación que disminuya el grado de reticulación entre las cadenas de polímeros (Davis y McLister, 2016) y repitiendo el ensayo de neutralización.

9. CONCLUSIONES

- 1.- Se establecieron las condiciones para la producción de nanopartículas usando quitosan y magnéticas cubiertas con quitosan para el encapsulamiento de varios polifenoles mediante la técnica de gelación iónica con formas y tamaños uniformes entre 200 nm y 235 nm con un índice de polidispersión que indica una nanoformulación monodispersa.
- 2.- Se estandarizaron las condiciones para establecer un método espectrofotométrico para medir el encapsulamiento de la Quercetina y la Curcumina en nanoformulaciones usando pequeños volúmenes con sensibilidad en rangos micromolares de estos polifenoles.
- 3.- Se obtuvo una eficiencia de encapsulamiento en ambos tipos de nanopartículas utilizadas de más del 80 % para la Quercetina y la Curcumina, bastante alta para la naturaleza hidrofóbica de estos polifenoles. La Curcumina nanoencapsulada en nanopartículas de quitosan mostró la más alta eficiencia de atrapamiento para estos polifenoles evaluados (más del 90 %).
- 4.- El análisis mediante FTIR determinó con alta precisión la presencia de ambos polifenoles en las nanoformulaciones producidas.

- 5.- Ambos polifenoles encapsulados en los 2 tipos de nanopartículas evaluadas presentan cinéticas de liberación casi total en las primeras 72 hrs., comportándose como un sistema de liberación lenta de los polifenoles.
- 6.- Los rangos de concentración citotóxica media (CC50) de los componentes usados para la fabricación de las nanoformulaciones de polifenoles son amplios que permiten adecuadamente la evaluación de su actividad antiviral sin efectos significativos sobre la viabilidad celular.
- 7.- Las nanoformulaciones de Quercetina en ambos tipos de nanopartículas evaluadas no presentan actividad citotóxica significativa en los rangos de concentraciones estudiadas (41.7 μ M – 167 μ M).
- 8.- Las nanoformulaciones de Curcumina en ambos tipos de nanopartículas evaluadas no presentan actividad citotóxica significativa en los rangos de concentraciones estudiadas (3.0 μ M – 12.0 μ M).
- 9.- La Quercetina en nanoformulaciones de quitosan presento una alta actividad neutralizante (80%) en el bioensayo con el pseudovirus SARS CoV-2 y esta capacidad no cambia cuando se duplica la concentración de Quercetina en la nanoformulacion. Una actividad neutralizante muy semejante presento la Quercetina encapsulada en las nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosan (78.9%).
- 10.- La Curcumina en nanoformulaciones magnéticas cubiertas con quitosan presento la más alta actividad neutralizante (79.1%) en el bioensayo con el pseudovirus SARS CoV-2 y esta actividad se modifica significativamente cuando se duplica la concentración de este polifenol (87.2%).
- 11.- La Quercetina fue mas efectiva en el bioensayo de neutralización del pseudovirus SARS CoV-2 cuando esta nanoformulada en nanopartículas de quitosan, mientras que la Curcumina fue mas efectiva en el mismo bioensayo cuando esta nanoformulada en nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosan.
- 12.- Los dos polifenoles evaluados en este estudio muestran superior actividad de neutralización del pseudovirus SARS CoV-2 cuando son encapsulados en ambos tipos de nanopartículas con respecto a la forma libre de ambos polifenoles.

10. PERSPECTIVAS

Las nanopartículas de quitosán son un modelo de envío dirigido de fármacos con diversas propiedades que las hacen candidatas óptimas para su administración en modelos *in vivo*, tales como brindar protección a las moléculas hidrofóbicas como los polifenoles, incrementando su biodisponibilidad, combinados con sus propiedades mucoadhesivas, beneficiosas para la administración de una terapia antiviral contra el virus SARS-CoV-2 cuya replicación ocurre principalmente en vías aéreas, por lo que se desea evaluar la neutralización del pseudovirus en un modelo murino humanizado o un modelo de hámster sirio.

Se propone evaluar la actividad neutralizante de las nanopartículas sobre el virus nativo, para evaluar si los polifenoles encapsulados mantienen sus propiedades antiinflamatorias a través de análisis de citocinas y evaluaciones físicas para determinar si mejoran la calidad de vida de los modelos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abo Y, Ismail NS, McLean GR, & Hamdy NM. 2020. A molecular docking study repurposes FDA approved iron oxide nanoparticles to treat and control COVID-19 infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 153, 105465.
- Adamo G, Campora S, & Gherzi G. 2017. Functionalization of nanoparticles in specific targeting and mechanism release. *Nanostructures for Novel Therapy*, 57–80.
- Alcaraz GL. 2011. Obtención de sistemas nanoparticulados de quitosana acoplados a nobiletina (tesis doctoral). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Alimohamadi Y, Sepandi M, Taghdir M, & Hosamirudsari H. 2020. Determine the most common clinical symptoms in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 61(3), E304.
- Annunziata G, Sanduzzi M, Santoro C, Ciampaglia R, Stornaiuolo M, Tenore GC, ... & Novellino E. 2020. May polyphenols have a role against coronavirus infection? An overview of in vitro evidence. *Frontiers in medicine*, 7, 240.
- Anwer MK, Al-Mansoor MA, Jamil S, Al-Shdefat R, Ansari MN & Shakeel F. 2016. Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. *International journal of biological macromolecules*, 92, 213-219.
- Aranda ME, Trejo SE, Del Real A, Álvarez S, Méndez A, García CG, ... & Miranda SP. 2022. Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4, 100228.
- Bachmetov L, Gal M, Shapira A, Vorobeychik M, Giterman T, Sathiyamoorthy P, & Zemel R. 2012. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *Journal of Viral Hepatitis*, 19, 81–88.
- Balasubramanian A, Pilankatta R, Teramoto T, Sajith AM, Nwulia E, Kulkarni A, & Padmanabhan R. 2019. Inhibition of dengue virus by curcuminoids. *Antiviral Research*, 162, 71–78.

- Bao L, Gao H, Deng W, Lv Q, Yu H, Liu M, ... & Qin C. 2020. Transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 via close contact and respiratory droplets among human angiotensin-converting enzyme 2 mice. *The Journal of infectious diseases*, 222, 551-555.
- Blanco D, Nilsson BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, ... & Albrecht RA. 2020. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036-1045.
- Beltrán E, López A, Higuera I, Velázquez JB & Vallejo AA. 2019. Nanomedicine review: Clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnology*, 10, 1-40.
- Boson B, Legros V, Zhou B, Siret E, Mathieu C, Cosset F, ... & Denolly, S. 2021. The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *Journal of Biological Chemistry*, 296.
- Boroumand H, Badie F, Mazaheri S, Seyedi ZS, Nahand JS, Nejati M, ... & Mirzaei H. 2021. Chitosan-based nanoparticles against viral infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 643953.
- Brigger I, Dubernet C, & Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 631-651.
- Brito JCM, Lima WG, & Cruz WS. 2021. Quercetin as a potential nutraceutic against coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Ars Pharmaceutica*, 62(1), 95-89.
- Bhumkar DR, & Pokharkar VB. 2006. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *Aaps Pharmscitech*, 7, E138-E143.
- Calvo P, Remuñan C, Vila JL, & Alonso M. 1997. Novel hydrophilic chitosanpolyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132.
- Carmona ER, Plaza T, Recio G, & Parodi, J. 2018. Generación de un protocolo para la síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con florfenicol a través del método de gelación iónica. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1195-1202.

- Caron J, Reddy LH, Lepê S, Wack S, Clayette P, Rogez C. 2010. Squalenoyl nucleoside monophosphate nanoassemblies: new prodrug strategy for the delivery of nucleotide analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20, 2761–2764.
- Carullo G, Cappello AR, Frattaruolo L, Badolato M, Armentano B, & Aiello F. 2017. Quercetin and derivatives: Useful tools in inflammation and pain management. *Future Medicinal Chemistry*, 9, 79–93.
- Chen M, & Zhang XE. 2021. Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review. *International Journal of Biological Sciences*, 17(6), 1574.
- Chithrani BD, Ghazani AA & Chan WC. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*, 6(4), 662-668.
- Deng SQ, & Peng H. 2020. Characteristics of and public health responses to the coronavirus disease 2019 outbreak in China. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 575.
- Cui Z, Qiu F, & Sloat, B. 2006. Lecithin-based cationic nanoparticles as a potential DNA delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 313(1-2), 206–213.
- Davis J & McLister A. 2016. Passive and interactive dressing materials. *Smart Bandage Technologies: Design and Application*, 93-144.
- De Leo V, Milano F, Mancini E, Comparelli R, Giotta L, Nacci A, ... & Catucci L. 2018. Encapsulation of curcumin-loaded liposomes for colonic drug delivery in a pH-responsive polymer cluster using a pH-driven and organic solvent-free process. *Molecules*, 23(4), 739.
- Ebrahimi HA, Esmaeli S, Khezri S & Salimi A. 2023. Curcumin-Loaded Chitosan Nanoparticle Preparation and Its Protective Effect on Celecoxib-induced Toxicity in Rat isolated Cardiomyocytes and Mitochondria. *Drug Research*, 73(03), 125-136.
- El-Ganainy SM, Soliman AM, Ismail AM, Sattar MN, Farroh KY, & Shafie RM. 2023. Antiviral Activity of Chitosan Nanoparticles and Chitosan Silver Nanocomposites against Alfalfa Mosaic Virus. *Polymers*, 15(13), 2961.

El-Naggar NEA, Saber WI, Zweil AM, & Bashir SI. 2022. An innovative green synthesis approach of chitosan nanoparticles and their inhibitory activity against phytopathogenic *Botrytis cinerea* on strawberry leaves. *Scientific Reports*, 12(1), 3515.

Ferreira FR. 2015. Chitosan Nanoparticles as Drug Delivery Systems (Tesis doctoral). NOVA School of Science and Technology.

Ferreira VH, Nazli A, Dizzell SE, Mueller K, Kaushic C. 2015. The anti-inflammatory activity of curcumin protects the genital mucosal epithelial barrier from disruption and blocks replication of HIV-1 and HSV-2. *PLoS ONE*. 10, 124903.

Figueroa A, Antunes M, & Guajardo D. 2021. Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry. *International Journal of Pharmaceutics*, 593, 120125.

Frenzel M, & Steffen A. 2015. Impact of quercetin and fish oil encapsulation on bilayer membrane and oxidation stability of liposomes. *Food Chemistry*, 185, 48–57.

Food and Drug Administration. 23 de junio de 2022. Coronavirus Treatment Acceleration Program (CTAP). [Online]. Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/coronavirus-covid-19-drugs/coronavirus-treatment-acceleration-program-ctap>

Food and Drug Administration. 30 de octubre de 2023. Coronavirus (COVID-19) | Drugs. [Online]. Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs>

Garg U, Chauhan S, Nagaich U, & Jain N. 2019. Current advances in chitosan nanoparticles based drug delivery and targeting. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2), 195.

Gobierno de México. 07 de enero de 2022. Cofepris autoriza tratamiento oral para COVID-19 en uso de emergencia controlada. Comunicado a la población No. 01/2022. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios [Online]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cofepris/articulos/cofepris-autoriza-tratamiento-oral-para-covid-19-en-uso-de-emergencia-controlada#:~:text=%2D%20La%20Comisi%C3%B3n%20Federal%20para%20la,con%20alt o%20riesgo%20de%20complicaciones>.

Gobierno de México. 30 de octubre de 2023. Tratamiento COVID. [Online]. Disponible en: <https://coronavirus.gob.mx/tratamiento-covid/#:~:text=En%20M%C3%A9xico%2C%20ya%20se%20tiene,19%20en%20personas%20adultas%20vulnerables>.

Gómez C. 2014. Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Rev. Farmacol. Chile*, 7(2), 7-16.

González J, Claramunt RM, Sanz D, Lavandera JL, Alkorta I, & Elguero, J. 2015. Curcumina y curcuminoides: química, estudios estructurales y propiedades biológicas. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 278-310.

Gordon CJ, Tchesnokov EP, Feng JY, Porter DP, Götte M. 2020. The anti-viral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Biological Chemistry*, 295(15), 4773-4779.

Gul S, Khan SB, Rehman IU, Khan MA, & Khan MI. 201). A comprehensive review of magnetic nanomaterials modern day theranostics. *Frontiers in Materials*, 6, 179.

Hao J, Guo B, Yu S, Zhang W, Zhang D, Wang J, Wang Y. 2017. Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science Technology*, 85, 37-44.

Harcourt J, Tamin A, Lu X. 2020. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with 2019 novel coronavirus disease, United States. *Emerging Infectious Diseases* 26, 1–8.

Hernández A, Mena M, León E, Rayas A, Díaz M, Jiménez J, ... & Cruz RG. 2019. Bioaccesibilidad de antioxidantes de origen vegetal micro y nanoencapsulados: perspectivas para su determinación in vitro. *Agro Productividad*, 12(11).

Hewlings SJ, & Kalman DS. 2017. Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*, 6(10), 92.

Hoang NH, Thanh T, Sangpueak R, Treekoon J, Saengchan C, Thepbandit W, ... & Buensanteai, N. 2022. Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. *Polymers*, 14(4), 662.

- Hoo CM, Starostin N, West P, & Mecartney ML. 2008. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 89-96.
- Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, & Liu SW. 2020. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141-1149.
- Islam N, Dmour I & Taha MO. 2019. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. *Heliyon*, 5(5).
- Israelow B, Song E, Mao T, Lu P, Meir A, Liu F, ... & Iwasaki A. 2020. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 217(12).
- Jat SK, Gandhi HA, Bhattacharya J, & Sharma MK. 2021. Magnetic nanoparticles: an emerging nano-based tool to fight against viral infections. *Materials Advances*, 2(14), 4479-4496.
- Jardim KV, Siqueira JL, Báo SN & Parize AL. 2022. In vitro cytotoxic and antioxidant evaluation of quercetin loaded in ionic cross-linked chitosan nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103561.
- Jia W, Wang J, Sun B, Zhou J, Shi Y & Zhou Z. 2021. The mechanisms and animal models of SARS-CoV-2 infection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1129.
- Jennings M & Parks R. 2020. Curcumin as an antiviral agent. *Viruses*, 12(11), 1242.
- Kandeil A, Mostafa A, Kutkat O, Moatasim Y, Al-Karmalawy AA, Rashad AA, ... & Ali MA. 2021. Bioactive polyphenolic compounds showing strong antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Pathogens*, 10(6), 758.
- Ko M, Jeon S, Ryu WS, & Kim S. 2021. Comparative analysis of antiviral efficacy of FDA-approved drugs against SARS-CoV-2 in human lung cells. *Journal of medical virology*, 93(3), 1403-1408.
- Kreuter J. 2007. Nanoparticles: a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331, 1-10.

- Kumar SR, Paulpandi M, Manivel M, Mangalaraj D, Viswanathan C, Kannan S, & Ponpandian N. 2014. An in vitro analysis of H1N1 viral inhibition using polymer coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *RSC Advances*, 4(26), 13409-13418.
- Kurt AH, Olutas EB, Avcioglu F, Karakuş H, Sungur MA, Oztabag CK & Yıldırım M. 2023. Quercetin-and caffeic acid-functionalized chitosan-capped colloidal silver nanoparticles: one-pot synthesis, characterization, and anticancer and antibacterial activities. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 14(1), 362-376.
- Lamb Y. 2020. Remdesivir: first approval. *Drugs*, 80(13), 1355-1363.
- Lara HH, Ayala NV, Ixtapan L, & Rodriguez C. 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotechnology*. 8, 1
- Leslie RA, Zhou SS & Macinga DR. 2021. Inactivation of SARS-CoV-2 by commercially available alcohol-based hand sanitizers. *American Journal of Infection Control*, 49(3), 401-402.
- Lica JJ, Wieczór M, Grabe GJ, Heldt M, Jancz M, Misiak M, ... & Składanowski A. 2021. Effective drug concentration and selectivity depends on fraction of primitive cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4931.
- Li J, Zhang K, Wu D, Ren L, Chu X, Qin C, ... & Yin, L. 2021. Liposomal remdesivir inhalation solution for targeted lung delivery as a novel therapeutic approach for COVID-19. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 16(6), 772-783.
- Li Q, Liu Q, Huang W, Li X, & Wang Y. 2018. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Reviews in medical virology*, 28(1), 1963.
- Lin B, Dietrich ML, Senior RA, & Wilcove DS. 2021. A better classification of wet markets is key to safeguarding human health and biodiversity. *The Lancet Planetary Health*, 5(6), 386-394.
- Liu Z, Zhao J, Li W, Shen L, Huang S, Tang J, ... Zhang R. 2016. Computational screen and experimental validation of anti-influenza effects of quercetin and chlorogenic acid from traditional Chinese medicine. *Scientific Reports*, 6, 1–9.

- Loutfy SA, Abdel AI, Moatasim Y, Gomaa MR, Fattah NFA, Emam MH, ... & Kasry, A. 2022. Antiviral activity of chitosan nanoparticles encapsulating silymarin (Sil-CNPs) against SARS-CoV-2 (in silico and in vitro study). *RSC advances*, 12(25), 15775-15786.
- Macea RB, De Hoyos CF, Montes YG, Fuentes EM, & Ruiz, JIR. 2015. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polímeros*, 25, 58-69.
- Maron, DF. 2020. Wet markets' likely launched the coronavirus. Here's what you need to know. *National Geographic*, 15(4), 2020.
- Marín D, Tabares JH, Zapata MI, Flórez L, Yepes LM, Rugeles MT, ... & Taborda NA. 2021. Curcumin inhibits in vitro SARS-CoV-2 infection in vero E6 cells through multiple antiviral mechanisms. *Molecules*, 26(22), 6900.
- Mudalige T, Qu H, Van Haute D, Ansar SM, Paredes A & Ingle T. 2019. Characterization of nanomaterials: Tools and challenges. *Nanomaterials for food applications*, 313-353.
- Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C, Chandler C, & Gutiérrez, E. 2011. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 1, 53-58.
- Maurya VK, Kumar S, Prasad AK, Bhatt MLB, & Saxena SK. 2020. Structure-based Drug Designing for Potential Antiviral Activity of Selected Natural Products from Ayurveda against SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein and its Cellular Receptor. *VirusDisease*, 31, 179–193.
- Mohammed L, Gomaa HG, Ragab D, & Zhu, J. 2017. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 30, 1–14.
- Moneriz C & Castro C. 2020. Fármacos prometedores y potenciales para el tratamiento de COVID-19. *Revista chilena de infectología*, 37(3), 205-215.
- Moretti E, Mazzi L, Bonechi C, Salvatici MC, Iaconi F, Rossi C, & Collodel G. 2016. Effect of Quercetin-loaded liposomes on induced oxidative stress in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology*, 60, 140-147.
- Nathiya S, Durga M & Thiyagarajan D. 2014. Quercetin, encapsulated quercetin and its application-a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 20-26.

NCBI: Weibel S. 1995. Metadata: the foundations of resource description. D-lib Magazine, [Online]. Disponible en: <http://www.dlib.org/dlib/July95/07weibel.html>

Németh Z, Csóka I, Semnani Jazani R, Sipos B, Haspel H, Kozma G, ... & Dobó DG. 2022. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. *Pharmaceutics*, 14(9), 1798.

Nikzamir M, Akbarzadeh A, & Panahi Y. 2021. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102316.

Nishimuro H, Ohnishi H, Sato M, Ohnishi M, Matsunaga I, Naito S, ... & Kobori M. 2015. Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*, 7(4), 2345-2358.

Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, ...& Qian Z. 2020. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications*, 11(1), 1620.

Prasansuklab A, Theerasri A, Rangsinth P, Sillapachaiyaporn C, Chuchawankul S, & Tencomnao T. 2020. Anti-COVID-19 drug candidates: a review on potential biological activities of natural products in the management of new coronavirus infection. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 11(2): 144-157.

Pastrian G. 2020. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International journal of odontostomatology*, 14(3), 331-337.

Pérez RH, Hernández IA, Núñez AH, Sánchez YH, & Lima EL. 2020. COVID-19: apuntes desde una revisión integradora. *Medimay*, 27(3), 396-410.

Peña A. 2019. Nanoacarreadores magnéticos con quitosano para potenciar el efecto antitumoral de la curcumina y el gen TRAIL (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Pham XN, Nguyen TP, Pham TN, Tran TT & Tran TV. 2016. Synthesis and characterization of chitosan-coated magnetite nanoparticles and their application in curcumin drug delivery. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(4), 045010.

- Prasansuklab A, Theerasri A, Rangsinth P, Sillapachaiyaporn C, Chuchawankul S, & Tencomnao T. 2021. Anti-COVID-19 drug candidates: A review on potential biological activities of natural products in the management of new coronavirus infection. *Journal of traditional and complementary medicine*, 11(2), 144-157.
- Preusse M, Tantawy MA, Klawonn F, Schughart K, & Pessler F. 2013. Infection-and procedure-dependent effects on pulmonary gene expression in the early phase of influenza A virus infection in mice. *BMC microbiology*, 13(1), 1-9.
- Quiñones M, Miguel M, & Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Raliya R, Singh T, Haddad K, & Biswas P. 2016. Perspective on nanoparticle technology for biomedical use. *Current pharmaceutical design*, 22(17), 2481-2490.
- Ramana LN, Sharma S, Sethuraman S, Ranga U, Krishnan UM. 2014. Evaluación de nanoformulaciones de quitosano como potentes sistemas terapéuticos contra el VIH. *bioquímica Biografía. Acta* 1840, 476–484.
- Rashedi J, Haghjo AG, Abbasi MM, Tabrizi AD, Yaqoubi S, Sanajou D, ... & Baradaran B. 2019. Anti-tumor effect of quercetin loaded chitosan nanoparticles on induced colon cancer in wistar rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(3), 409.
- Rawle DJ, Le TT, Dumenil T, Yan K, Tang B, Nguyen W, ... & Suhrbier A. 2021. ACE2-lentiviral transduction enables mouse SARS-CoV-2 infection and mapping of receptor interactions. *PLoS pathogens*, 17(7), 1009723.
- Richart SM, Li YL, Mizushima Y, Chang YY, Chung TY, Chen GH, ... & Hsu WL. 2018. Synergic effect of curcumin and its structural analogue (Monoacetylcurcumin) on anti-influenza virus infection. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 1015-1023.
- Rodriguez EB, Almeda RA, Vidallon MLP, Reyes CT. 2019. Enhanced bioactivity and efficient delivery of quercetin through nanoliposomal encapsulation using rice bran phospholipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1980-9,

Rocha FAC, & de Assis MR. 2020. Curcumin as a potential treatment for COVID-19. *Phytotherapy Research*. Obtenido de: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.675287/full>

Romero W, Batista Z, De Lucca M, Ruano A, García M, Rivera M, ... & Sánchez S. 2016. El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33, 288-299.

Rosa RB, Dantas WM, do Nascimento JC, da Silva MV, de Oliveira RN, & Pena LJ. 2021. In vitro and in vivo models for studying SARS-CoV-2, the etiological agent responsible for COVID-19 pandemic. *Viruses*, 13(3), 379.

Septisetyani EP, Lestari D, Paramitasari KA, Prasetyaningrum PW, Kastian RF, Santoso A, & Eriani K. 2023. Curcumin and turmeric extract inhibited SARS-CoV-2 pseudovirus cell entry and Spike mediated cell fusion. *bioRxiv*, 2023-09.

Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W. 2018. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci Technol*, 78, 34- 60.

Sia SF, Yan LM, Chin AW, Fung K, Choy KT, Wong AY, ... & Yen HL. 2020. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, 583(7818), 834-838.

Sowers LC, Blanton LS, Weaver SC, Urban RJ, & Mouton CP. 2020. Pharmacological approaches to the treatment of COVID-19 patients. *Journal of translational science*, 6(6).

Sun N, Jiang X, Meng Q, Jiang H, Yuan Z & Zhang J. 2023. Preparation of Nanoparticles Loaded with Quercetin and Effects on Bacterial Biofilm and LPS-Induced Oxidative Stress in *Dugesia japonica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-18.

Tahmasebi S, Esawi MA, Mahmoud ZH, Timoshin A, Valizadeh H, Roshangar L. 2020. Immunomodulatory Effects of Nanocurcumin on Th17 Cell Responses in Mild and Severe COVID-19 Patients. *Journal of Cellular Physiology*, 236, 5325–5338.

Tseng SH, Lam B, Kung YJ, Lin J, Liu L, Tsai YC, ... & Hung CF. 2021. A novel pseudovirus-based mouse model of SARS-CoV-2 infection to test COVID-19 interventions. *Journal of biomedical science*, 28(1), 1-8.

Valizadeh H, Abdolmohammadi S, Danshina S, Ziya M, Ammari A, Sadeghi A. 2020. Terapia con nanocurcumina, un método prometedor para modular las citoquinas inflamatorias en pacientes con COVID-19. *En t. Inmunofarmacología* 89, 107088.

Welch SR, Guerrero LW, Chakrabarti AK, McMullan LK, Flint M, Bluemling GR, ... & Albariño CG. 2016. Lassa and Ebola virus inhibitors identified using minigenome and recombinant virus reporter systems. *Antiviral Research*, 136, 9-18.

Wen CC, Kuo YH, Jan JT, Liang PH, Wang SY, Liu HG. 2007. Specific Plant Terpenoids and Lignoids Possess Potent Antiviral Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 4087–4095.

Wright L, Frye J, Gorti B, Timmermann B, & L Funk, J. 2013. Bioactivity of turmeric-derived curcuminoids and related metabolites in breast cancer. *Current pharmaceutical design*, 19(34), 6218-6225.

Widjaja, I., de Vries, E., Rottier, P. J., & de Haan, C. A. (2012). Competition between influenza A virus genome segments, *PLoS ONE*, 25 (1), 47529.

Xu D, Hu M, Wang Y & Cui, Y. 2019. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6), 1123.

Yang P, Yang Y, Wu Y, Huang C, Ding Y, Wang X, & Wang S. 2021. An optimized and robust SARS-CoV-2 pseudovirus system for viral entry research. *Journal of Virological Methods*, 295, 114221.

Yoshimura K, Rosenfeld MA, Nakamura H, Scherer EM, Pavirani A, Lecocq JP, & Crystal, RG. 1992. Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. *Nucleic acids research*, 20(12), 3233-3240.

Yousefi M, Shadnoush M, Sohrabvandi S, Khorshidian N, & Mortazavian AM. 2021. Encapsulation systems for delivery of flavonoids: A review. *Biointerface Research in Applied Chemistry* ,11, 13934-13951.

Yuan L, Tang Q, Cheng T, & Xia N. 2020. Animal models for emerging coronavirus: progress and new insights. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 949-961.

Zare M, Sarkati MN, Tashakkorian H & Rahaiee S. 2021. Quercetin Immobilization onto Chitosan-Functionalized Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles: Biocompatible Nanomedicine for Overcoming Cancer Cells. *Journal of Cluster Science*.

Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B & Song J. 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382:727-733.

Ziaee M, Takabi AS & Ebadollahi A. 2023. Fabrication of Carum copticum essential oil-loaded chitosan nanoparticles and evaluation its insecticidal activity for controlling *Rhyzopertha dominica* and *Tribolium confusum*. *Frontiers in Plant Science*, 14.