



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTOS DEL ÁCIDO FERÚLICO CONJUGADO CON LA
 β -CICLODEXTRINA EN CÉLULAS MESENQUIMALES DE
PULPA DENTAL. ESTUDIO PILOTO.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ABRIL IXCHEL GERMÁN MEDINA.

TUTORA: Dra. PATRICIA GONZÁLEZ ALVA.

ASESOR: Dr. EDUARDO VILLARREAL RAMIREZ.

VoBo
[Firma]
[Firma]



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Para Ohtokani Amacui.

Por haber abierto sin saber una puerta para mi futuro. Todos los logros y ciclos en esta profesión fueron y serán siempre tan tuyos como míos.

Agradecimientos.

A mis padres, por todo el apoyo y amor incondicional que me han dado, pues a pesar de su cansancio jamás faltaron fuerzas para impulsarme a seguir adelante. Gracias padre por el “no” rotundo cuando de desertar se trataba y todo lo que a ello concierne. Gracias madre por subir cada día más los estándares del poder femenino en nuestra familia y ser cómplice en la persecución de mi felicidad.

A mis hermanos, por permitirme ser auténtica en todo momento y al mismo tiempo cuidar de mi, gracias por soportar mis frustraciones y desvaríos, y, sobre todo, gracias por entender y fomentar mis pasiones en la vida.

A mi gran amiga Kenia, que siempre supo persuadirme a intentar cosas nuevas, no solo profesionalmente si no también en experiencias de vida, gracias por adentrarme en el camino que tú sola has recorrido y por haber recorrido muchos otros conmigo.

A mi tutora, que por su paciencia y tenacidad ha sido el más puro y gran ejemplo de lo que es tener un verdadero compromiso con la ciencia y la docencia. Gracias por haberme compartido desde el inicio su tiempo, espacio y conocimiento sin una objeción de por medio.

A la UNAM, por ser la causante principal de los vínculos mas fuertes e importantes que hoy me hacen estar aquí siendo lo que soy.

Al Dr. Eduardo Villareal quien amablemente caracterizó y proporciono las ciclodextrinas, y el ácido ferúlico que se utilizaron en el presente trabajo, y cuya producción fue posible gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN230220.

A mis compañeros caninos leales todos estos años, fueron mi aliciente, mi paz y el único lugar en donde siempre pude encontrar reciprocidad, amor y ganas de vivir el presente.

Al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología de la UNAM donde se realizó el presente trabajo, y al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN223521 cuyo financiamiento permitió la realización de la presente investigación.

Índice

1. Resumen.....	vi
2. Introducción.	1
3. Marco teórico.	2
3.1 Ciclodextrinas.....	2
3.1.1 Definición.....	2
3.1.2 Estructura química.	3
3.1.3 Mecanismos de acción.	5
3.1.4 Usos y aplicaciones de las ciclodextrinas.	7
3.2 Ácido Ferúlico	18
3.2.1 Definición y estructura química.....	18
3.2.2 Origen y obtención/síntesis	19
3.2.3 Propiedades	20
3.2.4 Aplicaciones	21
4. Justificación y planteamiento del problema	22
5. Hipótesis	23
6. Objetivos	23
6.1 Objetivo general	23
6.2 Objetivos específicos.....	24
7. Metodología	24
8. Resultados	28
9. Discusión.....	33
10. Conclusiones	36
11. Referencias bibliográficas	36

Figura 1. Estructura de CD.....	4
Figura 2. Estructura química de alfa, beta y gama ciclodextrinas.	4
Figura 3. Esquema de la formación de un complejo de inclusión.....	7
Tabla 1. Ejemplo de algunas funciones mejoradas en fármacos logradas por la complejación de CD.	8
Figura 4. Representación esquemática del proceso de disolución-disociación-absorción de un compuesto de inclusión fármaco-ciclodextrina.	9
Tabla 2. Clasificación de vitaminas de acuerdo a su solubilidad	13
Figura 5. Interacción entre antioxidantes y radicales libres.	16
Tabla 3. Clasificación de antioxidantes de acuerdo a su origen	17
Figura 6. Estructura química del ácido ferúlico, cis ferúlico y trans ferúlico.	19
Tabla 4. Grupos experimentales del presente estudio.....	266
Figura 7. Representación gráfica de los grupos experimentales.....	26
Figura 8. Representación gráfica del ensayo de resazurina.....	27
Figura 9. Ensayo de resazurina en células DT-MSCs estimuladas con ácido ferúlico a diferentes días de cultivo	29
Figura 10. Ensayo de resazurina en células DT-MSCs estimuladas con ciclodextrinas a diferentes días de cultivo	30
Figura 11. Ensayo de resazurina en células DT-MSCs estimuladas con complejo de inclusión a base de ciclodextrinas a diferentes días de cultivo.	31
Figura 12. Fotografías representativas de las DT-MSCs en cultivo.	33
Figura 13. Complejo de inclusión entre el ácido ferúlico y las ciclodextrinas utilizadas en el presente trabajo.	34

1. Resumen

A lo largo de los años la industria farmacéutica ha utilizado distintos compuestos para mejorar la entrega de fármacos y, gracias a una estructura química versátil, las ciclodextrinas han sido candidatas ideales para este fin. Si bien muchos estudios han explorado los efectos de estas nanopartículas en distintos modelos celulares, éste, aborda por primera vez un linaje celular distinto.

El objetivo del presente estudio es evaluar los efectos del complejo de inclusión ciclodextrinas/ácido ferúlico en un sistema in vitro utilizando células mesenquimales de origen dental considerando la importancia de mejorar la biodisponibilidad de aquellos compuestos altamente benéficos para la salud, pero con la desventaja de ser susceptibles a perder estabilidad ante un ambiente polar, como es el caso del ácido ferúlico.

El estudio experimental es un ensayo de citotoxicidad realizado con sal de resazurina en un medio de cultivo de DT-MSCs derivadas de tejido pulpar. A este medio de cultivo se le incorporaron diversos grupos experimentales que comprenden; ciclodextrinas, ácido ferúlico y complejos de inclusión CD-AF a diferentes concentraciones para su posterior análisis morfológico y estadístico que evidencia la viabilidad celular a 24, 48 y 72 horas después de sus respectivas combinaciones.

Los resultados revelaron que los efectos aislados del ácido ferúlico demuestran cambios relevantes en la viabilidad celular. Sin embargo, los efectos del complejo de inclusión del ácido ferúlico con las ciclodextrinas mejora la solubilidad de este, disminuyendo así su toxicidad. Debido a ello, es necesaria la aplicación de estudios específicamente en este linaje celular para verificar tanto los efectos estabilizadores del complejo de inclusión como la toxicidad del ácido ferúlico.

Palabras clave: ciclodextrinas, ácido ferúlico, DT-MSCs de origen dental, solubilidad, viabilidad.

2. Introducción

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos derivados del almidón formados por unidades de glucosa, estas pueden ser sintetizadas o producidas gracias a la ayuda de algunas cepas bacterianas específicas o ya sea de manera industrial.

Desde su descubrimiento en 1891, se les han conferido ciertas características y propiedades que las han hecho pasar de ser exclusivas de la curiosidad científica hasta ser, en la actualidad, aprobadas en diversas partes del mundo para su uso en industrias como la alimenticia, agroquímica, cosmética, y lo que capta nuestra atención, en la industria farmacéutica.

La incorporación de CDs en los sistemas farmacéuticos es una realidad consolidada teniendo en cuenta las pocas incompatibilidades que presentan y su buen perfil de seguridad (Ramos-Martínez B. 2022). Debido a esto, se han estudiado distintas asociaciones de CD con alrededor de 515 principios activos para el año 2007, de todos esos principios activos pusimos nuestro enfoque en el ácido ferúlico, que por su parte es un compuesto fenólico considerado como un potente antioxidante natural.

En el año 2008 y 2015 se realizaron estudios sobre técnicas específicas derivadas de este complejo. Sin embargo, el objetivo de este trabajo es evaluar los efectos de un complejo de inclusión ciclodextrinas/ácido ferúlico en un sistema in vitro, utilizando células de tejido dental. Se realizó un ensayo de citotoxicidad que, junto a un posterior análisis estadístico y morfológico, nos ayudara a medir la viabilidad de las células combinadas con grupos experimentales que conforman; ácido ferúlico y ciclodextrinas de manera aislada, y el ácido ferúlico y las ciclodextrinas en forma de complejo.

Aunque se han realizado estudios sobre la complejación de CD y ácido ferúlico, no se había propuesto la utilización de este linaje celular específico, lo que puede derivar en usos prometedores para la investigación científica en tejidos dentales a su vez siendo un aporte para la biotecnología y el área médica.

3. Marco teórico

3.1 Ciclodextrinas

3.1.1 Definición

Las CDs, también conocidas como cicloamilosas, ciclomaltosas o dextrinas de Schardinger, son oligosacáridos cíclicos que constan de seis, siete, ocho o más subunidades de glucopiranosas unidas por enlaces α -(1,4) que se obtienen mediante la modificación enzimática del almidón. (1,2)

En el caso de las CDs, es importante saber que existen CDs naturales y CDs modificadas o sustituidas estas, respectivamente, son oligosacáridos que se pueden formar espontáneamente en la naturaleza mediante la fermentación del almidón por algunas cepas bacterianas, o se pueden producir a escala industrial utilizando la enzima ciclodextrina-glicosiltransferasa, la cual es responsable de la fragmentación del almidón de la ciclización. (3)

Existen tres ciclodextrinas fácilmente disponibles: α -CD, compuesta por 6 unidades de glucosa (también denominada ciclohexaamilosa o ciclomaltohexaosa); β -CD, compuesta por siete unidades (cicloheptaamilosa, ciclomaltoheptaosa); y γ -CD compuesta por 8 unidades (ciclooctaamilosa, ciclomaltoheptaosa). (4)

Las CDs son conocidas por sus propiedades moleculares de encapsulación, su forma les permite encapsular sustancias de determinado tamaño y con cierta hidrofobicidad, por esto, las CDs han sido estudiadas como transportadores moleculares. Por ejemplo, su estructura molecular tiene ventajas sobre los llamados complejos de inclusión.

Las CDs han sido utilizadas como excipientes farmacológicos, los cuales se definen como sustancias inertes, aparte de la droga farmacológicamente activa, y que se incluyen en el proceso de manufactura, o que están presentes en la dosis final de un producto farmacéutico.

Los excipientes son ampliamente utilizados en las formulaciones farmacéuticas para proporcionar estabilidad a largo plazo, añadir volumen a las formulaciones sólidas y para facilitar la absorción de la droga terapéutica.

3.1.2 Estructura química

Las CDs no son totalmente cilíndricas, sino que presentan una conformación troncocónica. (5) Además, poseen dos aberturas en los extremos de la molécula, donde una es más amplia que la otra debido a la disposición de los grupos hidroxilos primarios y secundarios. (1)

Su geometría única incluye grupos secundarios hidroxilos en el anillo externo del cono y primarios en el anillo interno del cono (Figura 1), lo cual le confiere una naturaleza soluble en agua, mientras la cavidad interna esta alineada con protones, lo que hace a las CDs capaces de interactuar con moléculas hidrofóbicas de diámetro y geometría adecuada.

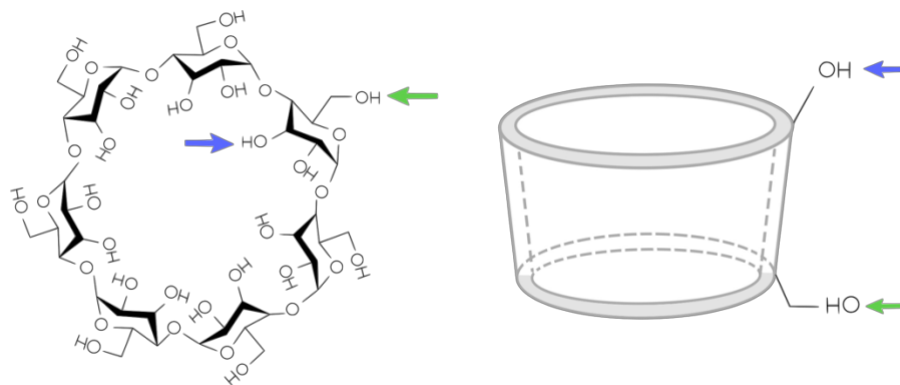


Figura 1. Estructura de CD. (Adaptado de Oliveira R, Santos D, Barata P. 2009).

La disposición que presentan los hidroxilos primarios (hidroxilos unidos al anillo de glucosa) hace que tengan una rotación libre lo que ocasiona una reducción en el diámetro efectivo de la cavidad. Por otra parte, los hidroxilos secundarios (hidroxilos unidos al carbono que no forma parte del anillo de glucosa) permiten que se forme un mayor tamaño de la cavidad porque no tienen una rotación libre (Figura 2). (1,6)

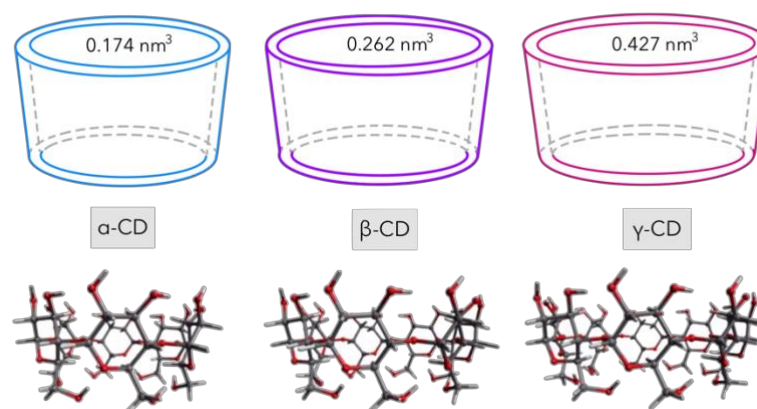


Figura 2. Estructura química de alfa, beta y gama ciclodextrinas. (Adaptado de Torralba A. 2014 y Astray G et al. 2009).

En resumen, esta disposición en su estructura proporciona al exterior un carácter hidrófilo, mientras que su parte interna tiene un carácter hidrófobo, y es gracias a esa característica que en las CDs se facilita la inclusión de compuestos orgánicos y diversos polímeros en solución acuosa. (7)

3.1.3 Mecanismos de acción

Más allá de los detalles de su estructura, la característica más importante de las CDs es su cavidad interna, pues permite formar complejos de inclusión con pequeñas moléculas huésped que tengan la forma, el tamaño y la polaridad adecuados. (4)

Por otra parte, se ha descrito que las CDs no solo interaccionan con otras moléculas por formación de complejos de inclusión sino que también son capaces de formar agregados para mejorar la solubilidad de las moléculas huésped, que generalmente son muy insolubles, actuando como micelas. (8)

3.1.3.1 Solubilidad

En lo que respecta a la solubilidad, cabe destacar que las CDs naturales (α -CD, β -CD y γ -CD) presentan menor solubilidad en agua que sus oligosacáridos homólogos de cadena abierta. (3)

Concretamente, la β -CD es la menos soluble de todas pues con su número impar de unidades de glucopiranosas, aparecen enlaces de hidrógeno intramoleculares entre grupos hidroxilos, previniendo la formación de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua circundantes y resultando en una baja solubilidad en agua, lo que permite una mejor estabilidad y rigidez de la molécula, y posiblemente una mejor inclusión de compuestos dentro de la misma. (7,1)

La cavidad interna de β -CD es la ideal para la mayoría de las moléculas lipídicas de interés, por lo que es ampliamente la más usada como excipiente. (9)

3.1.3.2 Complejos de inclusión

En farmacología, un complejo de inclusión es un complejo en que un compuesto químico (el hospedero) tiene una cavidad en la cual un compuesto "huésped" puede acomodarse; además, la interacción de estos compuestos involucra exclusivamente puentes de van der Waals.

Existe una gran variedad de compuestos que pueden formar complejos de inclusión con las CDs naturales por lo que la combinación entre ambos han sido objeto de estudios sistemáticos, incluyendo alcoholes alifáticos, aminas y ácidos, aminoácidos, cetonas surfactantes entre otros.

Cada CD tiene sus propias capacidades para formar complejos de inclusión con moléculas específicas pues la formación de estos está determinada por las características de las moléculas huésped, como polaridad, tamaño y geometría, y debe ser adecuada para las características hidrofóbicas y de tamaño de la cavidad de la CD (Figura 3). (10)

Debido al tamaño de la cavidad, α -CD se limita a complejar moléculas de pequeño tamaño o con cadenas laterales alifáticas, mientras que β -CD es adecuado para complejar anillos aromáticos. La CD con una cavidad más grande es adecuada para complejar moléculas grandes como esteroides o antibióticos macrólidos. (10)

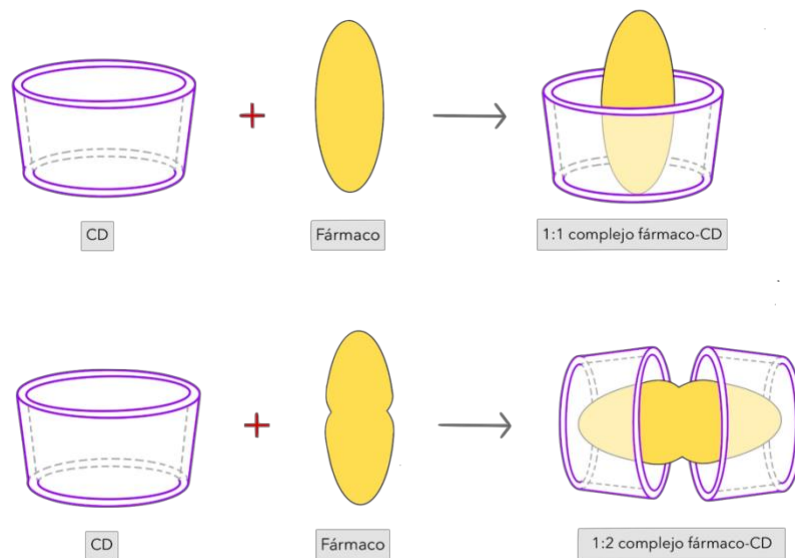


Figura 3. Esquema de la formación de un complejo de inclusión. (Adaptado de Oliveira R, Santos D, Barata P. 2009).

3.1.4 Usos y aplicaciones de las ciclodextrinas.

Retomando lo mencionado previamente, las CDs se utilizan como solubilizantes, estabilizantes, saborizantes y agentes protectores contra la oxidación, el calor y la radiación UV en una amplia gama de formulaciones farmacéuticas. Entre las aplicaciones más recientes de CD, se incluye la reducción de compuestos no deseados (como sabor, grasas trans, alérgenos, toxinas).

Gracias a estas propiedades, las CDs son empleadas en diversas áreas como lo son la industria alimentaria, agroquímica, ambiental y farmacéutica. Dentro de esta última se emplean en una amplia gama de formulaciones, tales como: formas orales de dosificación, emulsiones tópicas, y algunas formulaciones líquidas orales o tópicas.

3.1.4.1 Farmacología

Sabiendo que las ciclodextrinas se caracterizan fundamentalmente por su alta capacidad para atrapar moléculas hidrófobas en su cavidad interna, desde su descubrimiento, se han utilizado ampliamente para numerosos propósitos en aplicaciones farmacéuticas (Tabla 1), actuando como excipientes para solubilizar fármacos y reducir sus efectos adversos, entre otros. (7)

Tabla 1. Ejemplo de algunas funciones mejoradas en fármacos logradas por la complejación de CD.

Función mejorada	Mecanismo	Tipo	Fármacos
Aumento de biodisponibilidad	Aumento de solubilidad y estabilidad	β , γ , natural	Talidomida, nimesulida, prednisolona, loteprednol, tacrolimus, sulfametoxazol.
Aumento de disponibilidad	Aumento en la estabilidad sólida	β	Quinapril
Aumento de solubilidad	Formación de complejos de inclusión con sus moléculas no polares o grupos funcionales	β	Bromazepam, ibuprofeno, naproxeno, o floración, meteoro laco, nimesulida, omeprazol, tenoxicam

Debido a sus peculiares características, las CDs cumplen diferentes roles dentro del uso farmacológico a nivel molecular (Figura 4). Por un lado, enfocándonos en sus características externas, funcionan como transportadores, transportan moléculas hidrofóbicas de fármacos en solución a membranas celulares lipofílicas para su absorción y permanecen en fluidos acuosos. (11)

Por otro lado, enfocándonos en sus características internas, también funcionan como modificadores. Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas huésped pueden verse alteradas al ser rodeadas por el entorno hidrofóbico de la cavidad de la ciclodextrina.

De esta forma, un fármaco puede aumentar su solubilidad y su velocidad de disolución, presentar una mayor biodisponibilidad, reducir posibles efectos secundarios, además de mejorar su estabilidad (5). Por lo tanto el compuesto tendrá una mayor eficacia terapéutica y serán necesarias dosis más bajas.

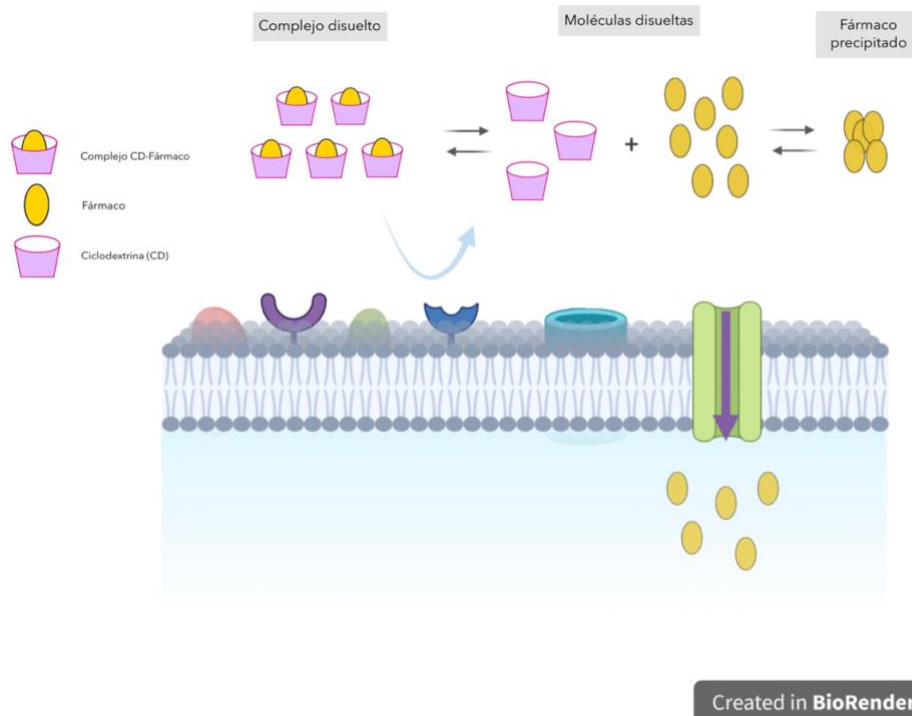


Figura 4. Representación esquemática del proceso de disolución-disociación-absorción de un compuesto de inclusión fármaco-ciclodextrina. Fuente: Fuente: elaboración propia con la aplicación BioRender. (Adaptación de Pineda AM. 2017).

La toxicidad de las CDs está directamente relacionada con la absorción sistémica y, en consecuencia, depende de la vía de administración. En la administración oral de CD, los estudios demuestran su inocuidad a dosis altas. (11)

Las CDs nativas están aprobadas para uso en humanos por agencias regulatorias importantes, como la Agencia Europea de Medicamentos

(EMA) y la Agencia Federal para las Drogas y los Alimentos de Estados Unidos (FDA), de donde han obtenido el estatus de Generalmente Reconocido como Seguro para ingestión oral, o GRAS por sus siglas en inglés.

En el caso de las α -CD y las γ -CD pueden ser ingeridas con restricciones, y la ingesta de las β CD esta limitado a un máximo de 5mg por kilogramo de peso al día.

La seguridad de la ingestión de las CDs por vía oral se asocia con su baja tasa de absorción que va del 1% para las α CD, 0.5% para las β CD, y 0.02% para las γ -CD. Por otro lado, la administración parenteral es altamente restringida, con la EMA prohibiendo el uso de las α -CDs y la β -CDs directamente en el torrente sanguíneo por la toxicidad renal que representan.

3.1.4.2 Nutrición

La aplicación de las ciclodextrinas en tecnología de alimentos es extensa debido a su capacidad única para formar complejos con muchas sustancias bioactivas. (12). Se han utilizado principalmente como portadores de lipófilos relacionados con los alimentos como sabores, aromas, colorantes, grasas, etc. La encapsulación molecular de estos con CD mejora su estabilidad tanto en el sentido físico como químico, lo que conduce a una mayor vida útil del producto. (13,14)

A la par se han realizado diversas investigaciones las cuales buscan determinar la afinidad de compuestos que promueven un beneficio a la salud (antioxidantes, vitaminas y aceites esenciales) con las CDs, esto con la finalidad de que al ser incorporados los complejos en los alimentos, puedan soportar las condiciones de humedad, temperatura y oxidación. De esta manera al momento de ser ingeridos los complejos, dichos

compuestos que aportan un beneficio a la salud se encuentren disponibles y viables para cumplir su función. (1)

3.1.4.2.1 Ciclodextrinas y aceites esenciales

Los aceites esenciales y los polifenoles son algunos de los compuestos de origen vegetal que presentan actividades antimicrobianas y antioxidantes, entre otras, permitiendo prolongar la vida útil de los alimentos evitando su oxidación y protegiéndolos contra el deterioro causado por microorganismos (bacterias y hongos).

Su composición química les confiere distintas propiedades que los hacen compuestos insolubles en sistemas acuosos, solubles en disolventes orgánicos y aceites fijos, altamente volátiles y susceptibles a la oxidación, además de que su uso a menudo es reducido debido a su sabor intenso o desagradable. Todos estos inconvenientes limitan sus aplicaciones. (15,16)

La encapsulación de aceites esenciales en diferentes sistemas puede resolver estos problemas. Dichos sistemas involucran emulsiones, perlas, películas bioactivas, cápsulas, liposomas, nanoportadores y complejos de inclusión.

Gracias a diversos estudios se ha comprobado que la encapsulación en ciclodextrinas puede aumentar la solubilidad acuosa de los aceites esenciales hasta 16 veces y reducir sus tasas de fotodegradación hasta 44 veces, al tiempo que garantiza una liberación gradual. (16)

Es importante mencionar que uno de los principales sitios de acción de los aceites esenciales es la membrana biológica. Los complejos de inclusión con ciclodextrina mejoran el acceso de compuestos activos a esta región. (16)

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales consiste principalmente en la alteración de la membrana y la pared celular, al penetrar fácilmente la membrana pueden interferir con las propiedades funcionales de las células, lo que conduce a la inactivación y muerte microbiana. (15)

Su actividad como antioxidante se basa en prevenir o ralentizar el proceso de oxidación de lípidos u otros componentes orgánicos por diferentes vías como la prevención del inicio de la cadena de oxidación y la actividad de eliminación de radicales libres. (15)

Locci et al. en el 2004 reportaron que el carvacrol, el timol y el eugenol (componentes de los aceites esenciales de origen vegetal) se oxidan, descomponen o evaporan cuando se exponen al aire, la luz o el calor. Si se preparan como complejos de inclusión β -CD, se estabilizan y reducen en gran medida la volatilidad, la oxidación y la descomposición por calor. (17)

Varios estudios de liberación también revelaron que las ciclodextrinas reducen la volatilidad, controlan y retrasan la liberación de aceites esenciales y sus componentes. La encapsulación en β -CD mejoró la retención de citral (mejora de 26 veces) y mentol (mejora de 86 veces) en pieles de frutas y caramelos duros, respectivamente. (16)

La encapsulación en hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mejoró significativamente la estabilidad de los aceites esenciales de albahaca y estragón frente a las radiaciones UV. (16)

A pesar de que existe un amplio registro de estudios que avalan lo mencionado anteriormente, podemos resumir los principales beneficios de la encapsulación de aceites esenciales en mejoras sobre las propiedades fisicoquímicas (solubilidad, retención de propiedades, estabilidad) y

mejoras sobre las propiedades biológicas (actividad antimicrobiana, actividad antioxidante).

3.1.4.2.2 Ciclodextrinas y vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos heterogéneos que no pueden ser sintetizados por el organismo, necesarias sólo en cantidades muy pequeñas (miligramos o microgramos), pero indispensables para la vida y el crecimiento.

Se encuentran en los alimentos y no proporcionan energía. A pesar de tener una naturaleza química y funciones diferentes, las vitaminas se clasifican de acuerdo a su solubilidad. (18,19)

Tabla 2. Clasificación de vitaminas de acuerdo a su solubilidad

Solubilidad	Vitaminas
Liposolubles	Vitamina A (retinoides), Vitamina D (Ergosteroides), Vitamina E (Tocoferoles), Vitaminas K (Quinonas)
Hidrosolubles	Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Niacina (B3), Ácido pantoténico (B5), Piridoxina (B6), Biotina (B8), Ácido fólico, Cobalamina (B12), Ácido ascórbico (Vitamina C)

Una de las grandes desventajas de las vitaminas es que son muy susceptibles (en particular las hidrosolubles) a ser inactivadas o destruidas por factores externos como el calor, la luz, el oxígeno del aire, el mismo proceso de cocción y la alcalinidad. Por lo tanto, entre más pronto se consuma un alimento, menor es la probabilidad de perder estos nutrimentos. (18)

Aunque, farmacológicamente, brindan oportunidades emocionantes para avances médicos alternativos y complementarios cuando se usan en dosis específicas, muchas son altamente susceptibles a la degradación, tienen poca biodisponibilidad y carecen de la robustez necesaria cuando se consumen en sus formas de vitaminas puras. (20)

Se han reportado en diversos estudios la mejora significativa de la biodisponibilidad, solubilidad, penetración y estabilidad de ciertas vitaminas gracias a su encapsulación molecular con CD, así como su comercialización en productos farmacéuticos.

Xiaohu Xu et al (2021) reportaron que, el complejo de inclusión mejoró en gran medida las propiedades fisicoquímicas de la vitamina A/ésteres de vitamina A. (21)

Las CD, α y β -CD se utilizan para la formación de complejos de varias vitaminas del grupo B (Zielenkiewicz et al., 2008) y alcoholes grasos (policonasol) (Madhavi y Kagan, 2008). Las vitaminas Q10 y E así como el aceite de pescado rico en ácidos grasos omega-3 estabilizados por γ -CD son comercializados por Wacker Chemie. (13)

Otras patentes describen productos con fitoesteroles, ésteres de fitoesteroles, g-orizanol, isoflavonas, vitamina D, vitamina E y vitamina K estabilizados por γ -CD (Hashimoto y Han, 2010), esteroles vegetales, PUFA, carotenoides y otros antioxidantes encapsulados por CD. (13)

3.1.4.2.3 Ciclodextrinas y antioxidantes

Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos que desencadenan en diversas enfermedades. (22)

Se utilizan en la industria alimentaria adicionados a las grasas u otros productos para impedir o retrasar los procesos de oxidación de diversas sustancias, así mismo en la industria farmacéutica aprovechando sus efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y antivirales.

Asociado a la función antioxidante se considera el proceso de óxido-reducción, y para poder comprender este proceso con mayor facilidad, debemos valorar las especies involucradas en él tales como los radicales libres.

Un radical libre es aquella figura química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados en su último orbital. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena. Los radicales libres se liberan durante el metabolismo humano, y también se producen por contaminantes ambientales, radiaciones, entre otros.

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres de oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente-membrana plasmática, citoplasma, núcleo o líquido extracelular. (Figura 5). (23)

Existen dos vías o sistemas fundamentales para proteger al organismo de los radicales libres; endógenos y exógenos (enzimático y no enzimático respectivamente), y su interacción puede ser intracelular o extracelular.

La vía endógena requiere apoyo externo y por ello se recomiendan los antioxidantes exógenos. Estos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen y que deberían formar parte de la dieta diaria.

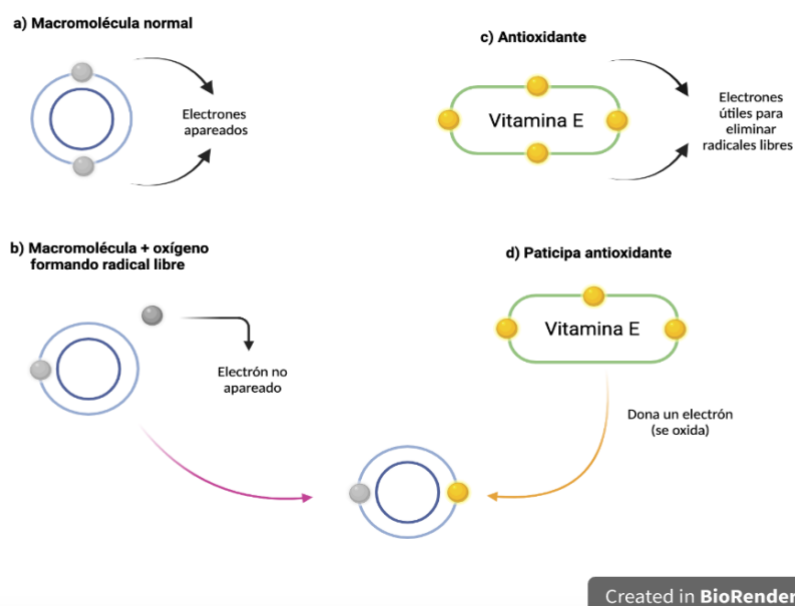


Figura 5. Interacción entre antioxidantes y radicales libres. Fuente: elaboración propia con la aplicación BioRender. (Adaptación de Coronado H et al. 2015)

Su papel es relevante ya que juegan un rol preponderante en la prevención de afecciones y/o enfermedades relacionadas con el daño celular provocado por la formación de estos radicales libres. (22,24,23)

Su clasificación puede ser de acuerdo al sitio donde ejercen su acción (23), de acuerdo a su naturaleza enzimática o no enzimática (25), y de acuerdo a su origen. (Tabla 3)

Gracias a diversos estudios se ha concluido que la formación de complejos con CD aumenta la actividad antioxidante de algunos flavonoides utilizados, debido al aumento de su solubilidad en el ambiente biológico. La formación de complejos además de aumentar la solubilidad y estabilizar a este tipo de compuestos, aumentan significativamente su capacidad antioxidante.

Tabla 3. Clasificación de antioxidantes de acuerdo a su origen

Origen	Antioxidantes
Exógenos	Vitamina E, Vitamina C, Betacarotenos Flavonoides, Licopenos
Endógenos enzimáticos	Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutación peroxidasa (GPx)
No enzimáticos	Glutación, Coenzima Q, Ácido Tiotíco

Anwer y col. (2014) estudiaron el Diosmina (DIOS), un flavonoide con una fuerte actividad antioxidante, e indicaron una mayor actividad antioxidante cuando DIOS se acomplejó con β -CD en comparación con DIOS puro.

Ho y col. (2017) realizaron estudios con catequina. El complejo de inclusión resultó con una actividad antioxidante de 24 mg, mientras que la de la catequina sola era de 4.7 mg, lo que representa un aumento de aproximadamente tres veces mayor que la actividad del compuesto puro.

Por otra parte, en un estudio más reciente Wang y col. (2021) se analizaron las características de unión de cuatro tipos de CDs (α -CD, β -CD, γ -CD y M- β -CD) con ocho tipos de flavonoides (DMY, hesperitina, naringenina, quercetina, luteolina, Morin, Kaempferol y Daidzein).

Una vez formado el complejo de inclusión y con base en las pruebas realizadas, pudieron observar que los flavonoides con β -CD y M- β -CD mejoraron su solubilidad en agua y formaron complejos más estables debido a la inclusión de los flavonoides en la cavidad hidrofóbica de las CD.
(26)

3.2 Ácido Ferúlico

3.2.1 Definición y estructura química

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Según Harbone, los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases o grupos dependiendo de su estructura siendo los más importantes los ácidos fenólicos y los flavonoides. (27)

El ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico), es un compuesto que pertenece al grupo de los ácidos fenólicos, derivado del ácido cinámico y considerado como un potente antioxidante natural. (28)

El ácido ferúlico es un ácido orgánico débil, que contiene dos grupos ionizables, el carboxilo y el fenólico. (28) La estructura base de la molécula corresponde al ácido cinámico, donde el anillo bencénico está hidroxilado en la posición para- y oxigenado en la posición meta-, con respecto al enlace vinílico unido a un grupo carboxílico.

Se presenta en dos formas isoméricas, cis (de color amarillo, líquido aceitoso) y trans (cristalino), siendo la última la más común. La isomerización ocurre durante la extracción ya que es muy sensible a la luz. (29) (Figura 6)

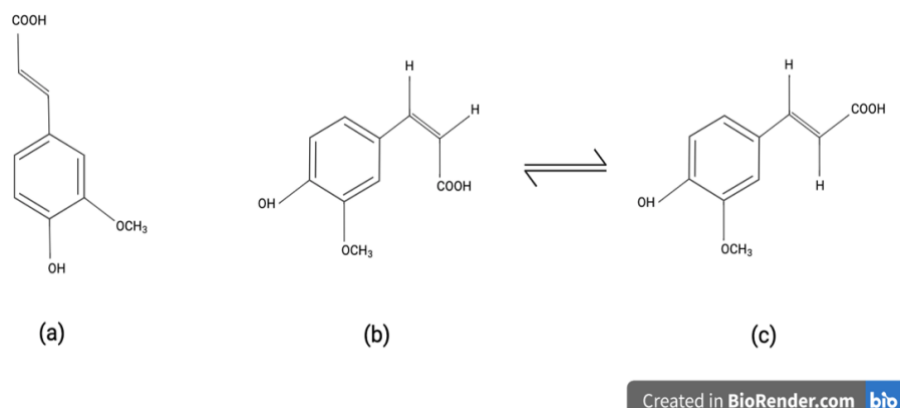


Figura 6. Estructura química del ácido ferúlico (a), cis ferúlico (b) y trans ferúlico (c).
Fuente: elaboración propia con la aplicación BioRender.

3.2.2 Origen y obtención/síntesis

El ácido ferúlico fue identificado por primera vez en 1886 por Hlasiwetz y Barth a partir de extractos de la planta *Ferula assafoetida*. (29) El ácido ferúlico es un polifenol dietético que abunda en las paredes celulares de algunas plantas como las manzanas, naranjas, piñas, y principalmente en los cereales integrales como el maíz, el trigo, la avena, entre otros. (30) Su contenido varía de acuerdo con la especie. (29)

Es un compuesto que no es común encontrarlo en su forma libre, ya que generalmente se encuentra esterificado con polisacáridos de la pared celular y con proteínas para proporcionar rigidez estructural y fuerza a los granos. (31)

Para liberar al AF de la pared celular se utilizan métodos químicos o enzimáticos, en los primeros se lleva a cabo una hidrólisis con ácidos o bases concentrados; y en el segundo caso se utiliza a la feruloil esterasa producida principalmente por hongos, siendo este último método el más eficiente. (1)

3.2.3 Propiedades

El ácido ferúlico exhibe una amplia gama de actividades biológicas, pero es mejor conocido por su actividad antioxidante.

Esta actividad radica en la capacidad para inhibir los efectos oxidativos de las células humanas cediendo el hidrógeno de su grupo hidroxilo para neutralizar a los radicales libres, produciéndose así el radical fenoxilo que tiene la capacidad de deslocalizar al electrón por resonancia confiriéndole de este modo estabilidad a la molécula. (31,1)

Estudios recientes han demostrado que el ácido ferúlico tiene diversos efectos farmacológicos, como efectos antidiabéticos y antibacterianos contra *E. coli*, *Helicobacter pylori* y *Shigella sannei*, efectos neuroprotectores, especialmente en el contexto de toxicidad de la proteína β amiloide, un efecto iluminador en la piel y efectos anticancerígenos. (30). De igual modo, se le ha conferido al ácido ferúlico actividad antiinflamatoria, antitrombótica y anticancerígena (1)

El ácido ferúlico también tiene la capacidad de absorber agua por lo que contribuye a la estabilidad mecánica de algunos compuestos. Además, forma complejos con polisacáridos que dan paso a una mejor estabilización con la proteína otorgando una mayor afinidad entre los enlaces de hidrogeno en conjunto con las interacciones hidrofóbicas. (31)

También se reportó que no es un compuesto mutagénico y que además mostró actividad antimutagénica del 50% contra 5NFAA [ácido-3-(5-nitro-2-furil)-acrílico] y azida de sodio. (1). Así también, posee actividad despigmentante debido a su poder de inhibición de tirosinas, una enzima que es la encargada de catalizar el paso de tirosina a melanina. (31)

3.2.4 Aplicaciones

Gracias a sus distintas propiedades, el ácido ferúlico se puede utilizar en distintas áreas, como lo son el área de la salud, cosmética y alimenticia.

Área de la salud

Se ha demostrado que el ácido ferúlico tiene propiedades biológicas importantes para su uso en la prevención o tratamiento de diversas enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, así como en tratamientos protectores del hígado, antimicrobianos y antiinflamatorios. (32)

Área de la cosmética

Se aplica como componente activo en lociones y bloqueadores solares gracias a su fuerte capacidad de absorción UV, por lo que es un importante agente de protección de la piel. También se ha sugerido que el ácido ferúlico, al tener una estructura química parecida a la tirosina, inhibe la formación de melanina a través de un mecanismo de inhibición competitiva con la tirosina, por lo que se observa un efecto aclarante en la piel.

Área alimenticia

El ácido ferúlico se ha utilizado como aditivo alimenticio y como conservador de alimentos, aliviando el estrés oxidativo y mejorando la capacidad antioxidante de los rumiantes. (33)

El ácido ferúlico en su forma de éster, es también utilizado como suplemento alimenticio en atletas y fisicoculturistas, ya que permite aumentar la masa muscular magra y disminuir el porcentaje de grasa corporal.

Sin embargo, una de sus aplicaciones comerciales más importantes es como precursor de la vainillina, el saborizante de mayor consumo mundial y principal constituyente del extracto natural de vainilla.

Área de la alimentación animal

Se ha reportado que el AF tiene un efecto promotor del crecimiento animal, ya que posee una estructura química análoga a los compuestos β -agonistas adrenérgicos, en específico a la norepinefrina que tienen como función de incrementar la acreción de músculo y disminuir la síntesis de grasa. (29)

4. Justificación y planteamiento del problema

Las CDs son una clase de oligosacáridos que tienen un importante papel en la investigación farmacéutica y en los mercados globales. La interacción huésped-hospedero no-covalente que se da entre las CDs y las moléculas de ciertos fármacos les proporciona una estabilidad mejorada, mejora su solubilidad y biodisponibilidad. Más aun, los complejos de inclusión que forman las CDs pueden enmascarar el sabor desagradable de ciertas drogas terapéuticas, inhiben la irritación y aseguren un amplio rango de administración que va desde un perfil controlado/sostenido hasta uno rápido.

El efecto de solubilización de los complejos de inclusión formados por las CDs constituye una ventaja en el caso de drogas insolubles o con baja solubilidad en agua, ya que esto también lleva a una mejora en la biodisponibilidad.

Se ha reportado que la incorporación de complejos de inclusión CDs/fármacos pueden ayudar a una disolución y liberación rápida de moléculas terapéuticas incluyendo el meloxicam, la metaclopramida y el ciprofloxacino.

Por otro lado, el ácido ferúlico, es un tipo de ácido fenólico natural, es abundante en los vegetales, las frutas y los cereales. Estudios recientes demuestran que el ácido ferúlico tiene muchas propiedades fisiológicas como las antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas y neuroprotectoras. Por lo que, el ácido ferúlico tiene potencial de aplicación en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia.

Sin embargo, la baja solubilidad y estabilidad del ácido ferúlico resulta en una baja biodistribución y actividad, lo que limita su aplicación. Diversos estudios reportan que la solubilidad, biodistribución, y la estabilidad del ácido ferúlico puede incrementar mediante los complejos de inclusión de las CDs.

El presente trabajo se diseñó para probar un sistema de liberación rápida mediante complejos de inclusión CDs/ácido ferúlico, para su prueba mediante ensayos de citotoxicidad y análisis morfológico mediante microscopia.

5. Hipótesis

La solubilidad del ácido ferúlico en un medio de cultivo in vitro mejora al combinarlo con ciclodextrinas, y este complejo tiene un efecto biológico sobre las células mesenquimales de pulpa distinto a los efectos separados de cada compuesto.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar los efectos del complejo de inclusión ciclodextrinas/ácido ferúlico en un sistema in vitro.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la citotoxicidad de las ciclodextrinas en células mesenquimales mediante el ensayo de rezasurina.
2. Evaluar la citotoxicidad del ácido ferúlico en células mesenquimales mediante el ensayo de rezasurina.
3. Evaluar la citotoxicidad de las ciclodextrinas/ácido ferúlico en células mesenquimales mediante el ensayo de rezasurina.
4. Analizar la morfología de células mesenquimales estimuladas con ciclodextrinas/ácido ferúlico en células mesenquimales mediante microscopía óptica.

7. Metodología

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas y el ácido ferúlico fueron producidos y caracterizados por el Dr. E. Villarreal, para su producción se contó con el apoyo del proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN230220.

Cultivo celular

Para el presente estudio se utilizaron las células DT-MSCs derivadas de tejido pulpar, estas fueron donadas por el Dr. J. Montesinos del Laboratorio de Células Troncales, Unidad de Investigación en Oncología del Hospital Nacional Centro Médico Siglo XXI del Instituto del Seguro Social.

La línea ha sido previamente aislada y caracterizada (número de aprobación de comité de ética CIE/1110/2017). Las células expresan altos

niveles de los marcadores de superficie CD105, CD90 y CD73, –tal y como lo establece la Sociedad Internacional de Terapia Celular–.

Adicionalmente, las DT-MSCs expresan altos niveles del marcador CD13. Finalmente, las DT-MSCs expresan moderadamente el marcador HLA-ABC, y son negativas para el HLA-DR; y no expresan marcadores hematopoyéticos como son el CD34, CD45, ni marcadores endoteliales como el CD31.

Las células muestran morfología fibroblástica, la cual se caracteriza por un citoplasma ahusado, un núcleo central, y prolongaciones de membrana delgadas, la proporción núcleo citoplasma es aproximadamente 1:2.

Las DT-MSCs fueron cultivadas en medio Dulbecco´s de baja glucosa, con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (penicilina, y estreptomina), y se utilizaron una vez que alcanzaron el 80% de confluencia, y entre el 3 y 5 pase.

Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, UNAM, y para su elaboración se contó con apoyo del proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN223521.

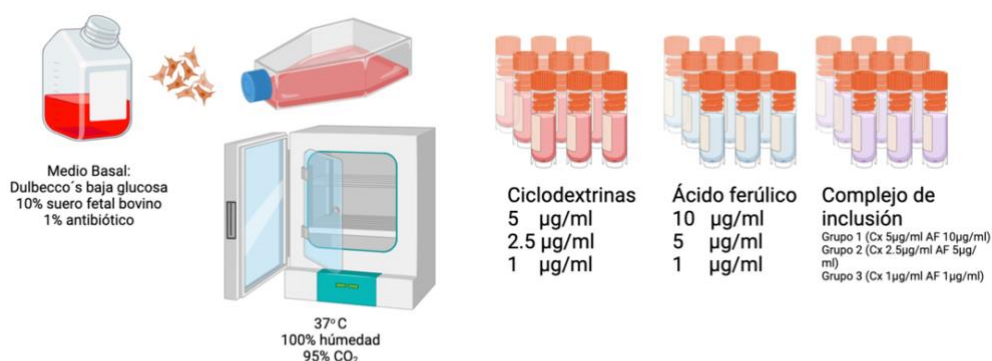
Brevemente, diferentes concentraciones de ciclodextrinas (5, 2.5 y 1 µg/ml), de ácido felúrico (10, 5, 1 µg/ml), y su combinación se incorporaron al medio de cultivo de las DT-MSCs. Los diferentes grupos se enlistan en la tabla 4, y se ilustran en la Figura 7.

Tabla 4. Grupos experimentales del presente estudio

Compuesto	Concentración
Ciclodextrinas⁺	5 µg/ml
	2.5 µg/ml
	1 µg/ml
Ácido Ferúlico⁺	10 µg/ml
	5 µg/ml
	1 µg/ml
Complejo⁺⁺	Grupo 1 (CDs 5µg/ml AF 10µg/ml)
	Grupo 2 (CDs 2.5µg/ml AF 5µg/ml)
	Grupo 3 (CDs 1µg/ml AF 1µg/ml)
Control	Medio de cultivo basal

$P \leq 0.005$. +; La ciclodextrina y el ácido ferúlico se agregaron al medio de cultivo para alcanzar la concentración deseada. ++; Se hizo un stock combinando la ciclodextrina y ácido ferúlico, y se dejó en agitación durante 24 horas para permitir que ambos compuestos formen el complejo de inclusión. CDs, ciclodextrinas; AF, ácido ferúlico.

Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/ml. Para su conteo se utilizó la tinción de azul de tripano, y con ayuda de una cámara de Neubauer (Figura 8). Una vez cumplidos los tiempos de incubación, se añadió sal de rezasurina (0, 24, y 72 h).



Created in BioRender.com

Figura 7. Representación gráfica de los grupos experimentales. Fuente: elaboración propia con la aplicación BioRender.

Las células fueron colocadas nuevamente en la incubadora durante 4 horas, una vez terminada la incubación se recolecto el medio y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA. La viabilidad celular se obtuvo con la fórmula $\text{Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia experimental}}{\text{promedio de absorbancia del control}} \times 100$. Los resultados se presentan en absorbancia y porcentaje de viabilidad (Figura 8).

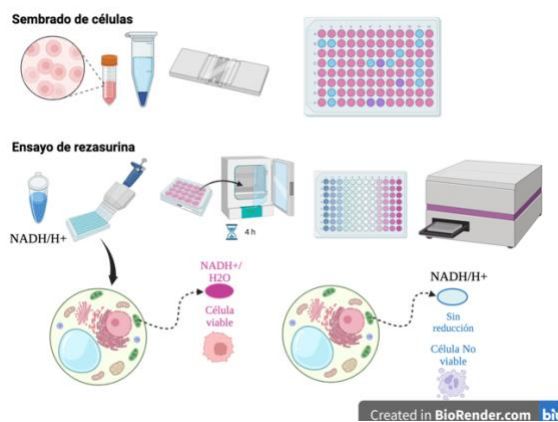


Figura 8. Representación gráfica del ensayo de resazurina. Fuente: elaboración propia con la aplicación BioRender.

La resazurina es una sal azul que se metaboliza en la mitocondria por oxidación, entre más oxidación existe la sal cambia de color a rosa, y se puede leer en un espectrofotómetro, entre más cantidad de sal se oxide, se interpreta como una mayor cantidad de células en el plato de cultivo.

Análisis morfológico

Las células que se incubaron durante 72 horas con el complejo ciclodextrina-ácido ferúlico se tiñeron con cristal violeta y se analizaron con un microscopio óptico, su morfología, tamaño y relación núcleo citoplasma fue observada y descrita.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software PrimaGraph, y se corrieron pruebas de ANOVA, seguido de una prueba T o Bonferroni para comparación entre grupos ($p \leq 0.005$, y 0.05)

8. Resultados

Efectos del ácido ferúlico en las células troncales mesenquimales derivadas de tejidos dentales

Se observó que las 24h de cultivo había una diferencia significativa entre el control (100% de viabilidad) y las células estimuladas con 10 ul/ml de ácido ferúlico, donde la viabilidad de las DT-MSCs disminuye hasta un 74.42% ($p \leq 0.05$), comparado con las concentraciones de 1 y 5 ul/ml, donde se mostró una viabilidad de 95.38 y 100% respectivamente, pero sin diferencias significativas con respecto al control.

Lo anterior revela una toxicidad inicial del compuesto en las concentraciones más altas. Mientras que a las 48h, las tres concentraciones mostraron una disminución en la viabilidad. Solamente la concentración de 1ul/ml no presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p \leq 0.05$).

La concentración de 5ul/ml tuvo una disminución de 24.09% de la viabilidad, mientras que la de 10ul/ml presentó una disminución al 78.57% con respecto al control, teniendo una diferencia estadísticamente significativa Figura 9.

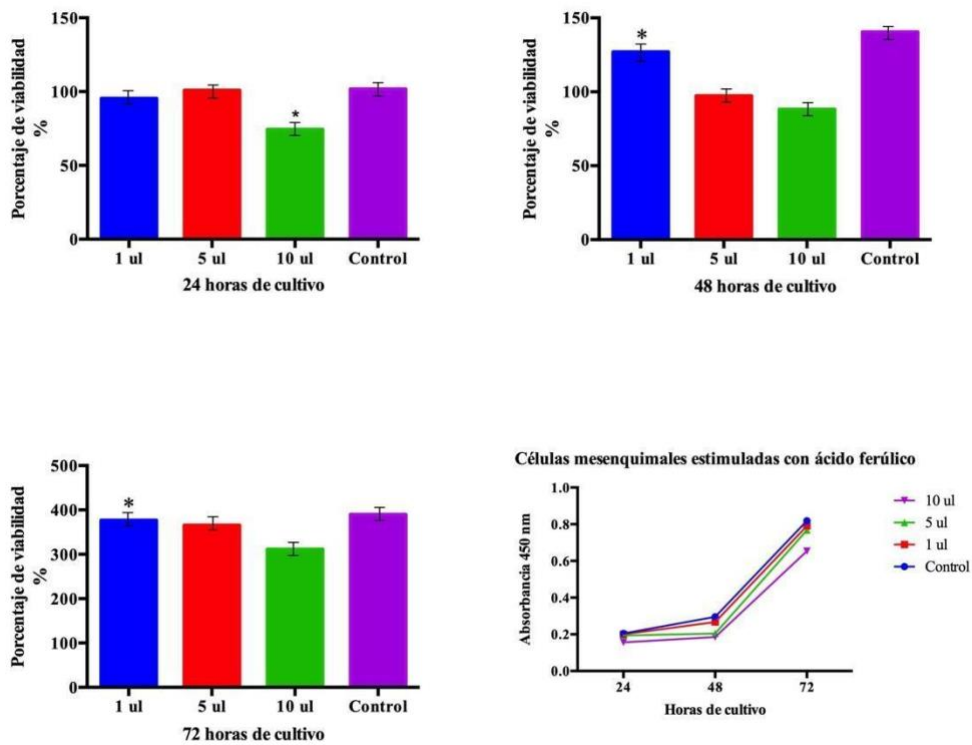


Figura 9. Ensayo de rezasurina en células DT-MSCs estimuladas con ácido ferúlico a diferentes días de cultivo. * $p > 0.05$. Las concentraciones se utilizaron como microgramos por mililitro en medio de cultivo. Fuente: elaboración propia.

Efecto de las ciclodextrinas en las células troncales mesenquimales derivadas de tejidos dentales

Las células DT-MSCs estimuladas con CDs mostraron una disminución en la viabilidad con todas las concentraciones utilizadas a las 24 horas de cultivo, y el resultado fue dependiente de la concentración, donde la concentración de 5 µl/ml presentó una viabilidad del 82.94%, seguida de la viabilidad de 87.50% ($p > 0.05$) para la concentración de 2.5 µl/ml, y de 88.33% para la concentración de 1 µl/ml.

A las 48 horas, las células DT-MSCs estimuladas con CDs presentaron una leve diferencia de viabilidad con respecto al control, de 10.41% para 1 µl/ml,

3.4% para la concentración de 2.5ul/ml, y de 12.11% para 5ul/ml, sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

A las 72 horas se observó un incremento de la viabilidad en todas las concentraciones utilizadas, y este fue dependiente de la concentración un incremento del 51.6% por encima del control para la concentración de 5ul/ml, de 32.67% para la de 2.5ul/ml, y de 36.24% para la concentración de 1ul/ml, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de los efectos de las ciclodextrinas sobre la viabilidad de las células troncales mesenquimales derivadas de tejidos dentales se ilustran en la figura 10.

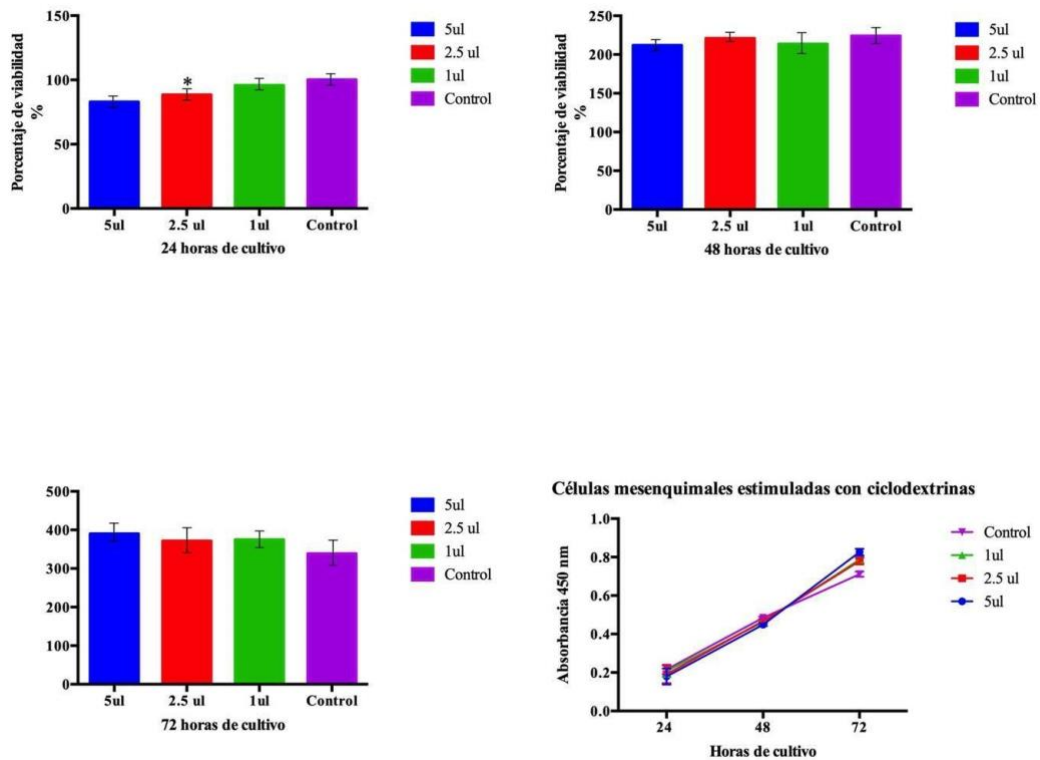


Figura 10. Ensayo de rezasurina en células DT-MSCs estimuladas con ciclodextrinas a diferentes días de cultivo. *p>0.05. Las concentraciones se utilizaron como microgramos por mililitro en medio de cultivo. Fuente: elaboración propia.

Efecto de las ciclodextrinas/ácido féulico en las células troncales mesenquimales derivadas de tejidos dentales

Por último, el complejo de inclusión CDs/ácido féulico mostró que a las 24 horas el complejo incrementa la viabilidad de las DT-MSCs, y el resultado fue dependiente de la concentración del complejo, con un incremento del 13.74% para el grupo 1, 16.16% para el grupo 2 y 4.22% para el grupo 3 (grupos enlistados en la tabla 2). Con diferencias estadísticamente significativas para el grupo 1 ($p \geq 0.05$) y dos ($p \geq 0.005$) (Figura 11).

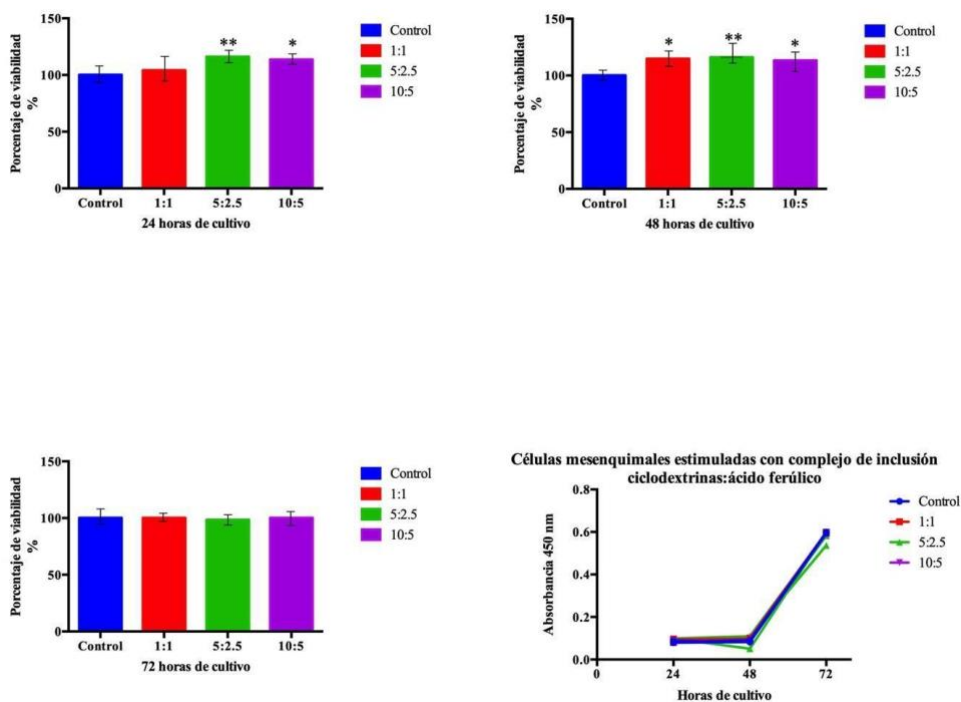


Figura 11. Ensayo de rezasurina en células DT-MSCs estimuladas con complejo de inclusión a base de ciclodextrinas a diferentes días de cultivo. * $p > 0.05$, ** $p > 0.005$. Las concentraciones se utilizaron como microgramos por mililitro en medio de cultivo. Fuente: elaboración propia.

Un incremento similar fue observado a las 48 horas, con diferencias significativas para los todos los grupos estudiados. Los valores de viabilidad encontrados fueron de 100% (control), un incremento del 13.30% para el grupo 1 ($p \geq 0.05$), 16.10% para el grupo 2 ($p \geq 0.005$), y 14.77% para el grupo 3 ($p \geq 0.05$). A las 72 horas, se observó una viabilidad similar y sin diferencias estadísticamente entre los grupos experimentales y el control (Figura 11).

Efecto de las ciclodextrinas, el ácido ferúlico y el complejo de inclusión sobre la morfología de las DT-MSCs en las células troncales mesenquimales derivadas de tejidos dentales

Las DT-MSCs tienen en morfología fibroblástica, con una proporción núcleo citoplasma dos a uno, de forma alargada, ahusada, con largas prolongaciones citoplasmáticas, misma que conservan después de 72 h de cultivo. (Figura 11)

La adición de ciclodextrinas en el medio muestra células con morfología ahusada similar al control después de 72h de cultivo, con contactos célula-célula cercanos. En el caso del ácido ferúlico, las DT-MSCs despliegan morfología ahusada, con un citoplasma escaso, y contactos célula-célula espaciados.

En el caso del complejo de inclusión, las DT-MSCs mostraron una morfología pequeña, casi cuboidal, con un crecimiento en forma de aglomerados celulares, en pequeñas islas con contactos estrechos y de forma redonda (Figura 12)

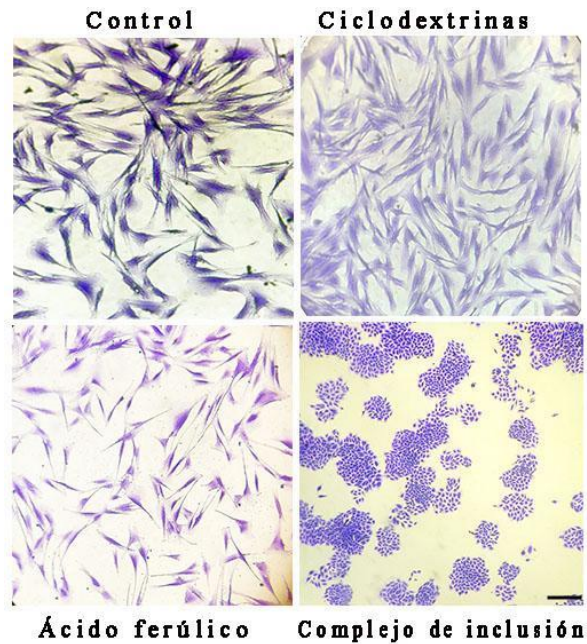


Figura 12. Fotografías representativas de las DT-MSCs en cultivo. Las concentraciones ciclodextrinas (5µg/ml), ácido ferúlico (2.5 µg/ml) y el complejo de inclusión (5:2.5 µg/ml) muestran que el complejo de inclusión afecta la morfología de las células mesenquimales de origen dental. Barra de escala 100 µm, magnificación 20X. Tinción de azul violeta al 0.01%. Fuente: elaboración propia.

9. Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo explorar los efectos del complejo de inclusión de CDs/ácido ferúlico, en comparación con los efectos separados de ambos compuestos. Estos compuestos fueron probados con un modelo de células troncales mesenquimales de origen dental (DT-MSCs) basándose en los datos de viabilidad.

La figura 13 ilustra el complejo de inclusión entre el ácido ferúlico y la CDs que se trabajó en el presente estudio.

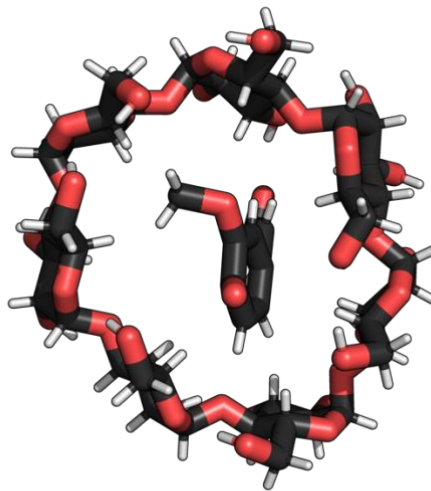


Figura 13. Complejo de inclusión entre el ácido ferúlico y las ciclodextrinas utilizadas en el presente trabajo.

Los resultados demuestran que el ácido ferúlico causa daño citotóxico a las células DT-MSCs, siendo este daño más evidente a las 72 horas de cultivo a una concentración de 10ul/ml, con una disminución del 78%.

En general se considera que la disminución de la viabilidad por debajo del 80% debe considerarse como un compuesto citotóxico.

Se ha propuesto que el ácido ferúlico causa estrés oxidativo en diferentes tipos celulares, tales como células los hepatocitos y los cardiomiocitos, y en consecuencia incrementa la apoptosis en las células.

Sin embargo, en el presente trabajo, la baja solubilidad del ácido ferúlico también ocasionó una acidificación en el medio de cultivo, la cual se reveló por el cambio de color en el rojo fenol contenido en el mismo (datos no mostrados), lo que pudo influir en la citotoxicidad del compuesto.

El ácido ferúlico se considera un antioxidante natural, y en los últimos años ha existido un creciente interés para desarrollar una aplicación efectiva de dichos compuestos, para ello se han buscado diferentes modelos que permitan estudiar este compuesto, incluyendo modelos con hepatocitos, cardiocitos, células endoteliales, y células de cáncer.

Dentro de nuestro conocimiento, este es el primer estudio en analizar el compuesto en un modelo de células troncales de origen dental.

Por otro lado, los resultados del presente estudio demostraron que las ciclodextrinas tienen un efecto benéfico sobre la viabilidad de las DT-MSCs. Profundizando en lo anterior, la revisión de la literatura que se realizó para el presente estudio reveló que los sistemas de liberación de fármacos desarrollados mediante complejos de inclusión de ciclodextrinas representan una plataforma para controlar las propiedades fisicoquímicas de diferentes tipos de fármacos.

Otro aspecto importante en el uso de estos complejos es que permiten modular la liberación de fármacos, ya que contribuyen a una liberación sostenida de los mismos.

Sobre esta misma idea, los resultados del presente estudio muestran que el complejo de inclusión tiene un efecto moderado sobre la viabilidad de las DT-MSCs, el cual se estabiliza a las 72 horas, con un impacto en la morfología, disminuyendo su tamaño y ocasionando que se aglomeren en forma de pequeñas islas.

Lo anterior sugiere que el complejo de inclusión mejora la biocompatibilidad del ácido ferúlico, y disminuye la toxicidad de este; incluso a bajas concentraciones.

10. Conclusiones

El presente trabajo proporciona bases teóricas para el uso de células troncales de origen dental como un modelo para estudiar la entrega de fármacos. El complejo de inclusión del ácido ferúlico con las ciclodextrinas mejora la solubilidad de este, disminuyendo su toxicidad. Sin embargo, los efectos del complejo de la inclusión se observan en el cambio de morfología de las DT-MSCs. Lo anterior sugiere que este complejo pudiera estar afectado la diferenciación en esta línea, a un linaje más especializado. Sin embargo, es necesario más estudios para verificar la toxicidad del ácido ferúlico en estas células, y los efectos estabilizadores del complejo de inclusión en las mismas.

11. Referencias bibliográficas

1. Torralba A. Obtención y análisis termodinámico de los complejos de inclusión ácido ferúlico-ciclodextrinas [Tesis de maestría]. Oaxaca, México: Universidad Tecnológica de la Mixteca; 2014. Recuperado a partir de: <http://repositorio.utm.mx:800/jspui/handle/123456789/64>.
2. Zavareze E, Kringel D, Dias A. Nano-scale polysaccharide materials in food and agricultural applications, *Adv Food Nutr Res* [internet] 2019 [consultado 12 Septiembre 2022]; 88:85-128. Recuperado a partir de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31151729/>.
3. Connors K. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem Rev.* [internet] 1997 [consultado 30 Septiembre 2022]; 97(5):1325-58. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11851454/>.
4. Ramos-Martínez B, Dávila-Pousa C, Merino-Bohórquez V, García-Palomo M, Flox-Benítez M. Aplicación de las ciclodextrinas como

excipientes en productos farmacéuticos: ¿por qué no en formulación magistral?. Farm Hosp [Internet] 2022 [consultado 30 Septiembre 2022]; 46(1):31-9. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-63432022000100031&lng=es.

5. Pineda AM. Utilidad de las ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico [Trabajo de fin de grado]. Sevilla, España. Universidad de Sevilla; 2017. Recuperado de: <https://idus.us.es/handle/11441/65325>.

6. Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto J, Rial-Otero R, Simal-Gandara J. A review on the use of cyclodextrins in foods. Food Hydrocolloids [internet] 2009 [consultado 11 Octubre 2022]; 23(7):1631-40. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X09000022>.

7. Arroyo J. Estudio computacional de la asociación de Ácido Ferúlico con Ciclodextrinas [Tesis de maestría]. Ciudad de México, México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2018. Recuperado de: <https://doi.org/10.24275/uami.8049g5061>.

8. Gastón A. Empleo de Ciclodextrina Glucosiltransferasa en la obtención de diversos productos derivados del almidón [Tesis doctoral]. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de Luján; 2012. Disponible en: <https://ri.unlu.edu.ar/xmlui/handle/rediunlu/359>.

9. Romero J. Ciclodextrinas: Estructura y aplicaciones principales. MoleQla [internet] 2022 [consultado 11 Octubre 2022]; (45):26-30. Disponible en: <https://www.upo.es/cms1/export/sites/upo/moleqla/documentos/Numero45/Moleqla-45.pdf>.

10. Oliveira R, Santos D, Barata P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde [internet] 2009 [consultado 12 Septiembre 2022]; 6:70-83. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10284/1271>.
11. Cunha-Filho MSS, Sá-Barreto LC. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. Rev Ciênc Farm Básica Apl [internet] 2007 [consultado 12 Septiembre 2022]; 28(1):1-9. Disponible en: <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/530>.
12. Kolarič L, Kántorová P, Šimko P. β -Cyclodextrin as the Key Issue in Production of Acceptable Low-Cholesterol Dairy Products. Molecules [internet] 2022 [consultado 17 Octubre 2022]; 27(9):1-13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35566269/>.
13. Fenyvesi É, Vikmon M, Szenté L. Cyclodextrins in Food Technology and Human Nutrition: Benefits and Limitations. Crit Rev Food Sci Nutr [internet] 2016 [consultado 19 Septiembre 2022]; 56(12):1981-2004. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.809513>.
14. Gonzalez A, Carpena M, García Oliveira P, Mejuto JC, Prieto MA, Simal Gandara J. Main Applications of Cyclodextrins in the Food Industry as the Compounds of Choice to Form Host-Guest Complexes. Int J Mol Sci [internet] 2021 [consultado 21 Octubre 2022]; 22(3): 1-23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33572788/>.
15. Cofre DM, Arancibia MY. Aplicación de aceites esenciales como aditivos naturales en los sistemas alimentarios [Trabajo de fin de grado]: Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato; 2022. Recuperado de: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/34988>.

16. Kfoury M, Auezova L, Greige-Gerges H, Fourmentin S. Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. *Environmental Chemistry Letters* [internet] 2019 [consultado 01 Noviembre 2022];17(1):129-43. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/326579474_Encapsulation_in_cyclodextrins_to_widen_the_applications_of_essential_oils.
17. Marques HM. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Fragr* [internet] 2010 [consultado 03 Noviembre 2022]; 25(5):313-26. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ffj.2019>.
18. Servín MdC. *Nutrición básica y aplicada* [internet]. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México; [reimpresión 2013; consultado 2022]. Disponible en: https://www.academia.edu/41615665/MAR%8DA_DEL_CARMEN_SERV%8DN_RODAS_MAR%8DA_DEL_CARMEN_SERV%8DN_RODAS_NUTRICI%93N_B%81SICA_Y_APLICADA_NUTRICI%93N_B%81SICA_Y_APLICADA_Y_APLICADA_NUTRICI%93N_B%81SICA_Y_APLICADA_NUTRICI%93N_B%81SICA.
19. Lešková E, Kubíková J, Kováčiková E, Košická M, Porubská J, Holčíková K. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and analysis* [internet] 2006 [consultado 21 Octubre 2022];19(4):252-76. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.014>.
20. Braithwaite MC, Kumar P, Choonara YE, du Toit LC, Tomar LK, Tyagi C, et al. A novel multi-tiered experimental approach unfolding the mechanisms behind cyclodextrin-vitamin inclusion complexes for enhanced vitamin solubility and stability. *Int J Pharm* [internet] 2017 [consultado 23

Octubre 2022]; 532(1):90-104. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28859938/>.

21. Xu X, Peng S, Bao G, Zhang H, Yin C. β -cyclodextrin inclusion complexes with vitamin A and its esters: A comparative experimental and molecular modeling study. *Journal of Molecular Structure* [internet] 2021 [consultado 23 Octubre 2022];1223:129001. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129001>.

22. Coronado H, Vega y León S, Gutiérrez T, Vázquez F, Radilla V. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev. chil. nutr* [Internet] 2015 [consultado 07 Noviembre 2022]; 42(2):206-212. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200014&lng=es.

23. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* [internet] 2002 [consultado 09 Noviembre 2022];31(2):126-33. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es.

24. Carolina J. Estudio de compuestos de inclusión de ciclodextrinas con flavonoides. Efecto sobre su actividad antioxidante [Tesis doctoral]. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 2007. Recuperado de:
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105245>

25. Zamora J. ANTIOXIDANTES: MICRONUTRIENTES EN LA LUCHA POR LA SALUD. *Rev. chil. Nutr* [internet] 2007 [consultado 09 Noviembre 2022]; 34(1):17-26. Disponible en:-
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100002&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002>.

26. Cuevas M. Valorización de los residuos agroindustriales del orégano mexicano y limón mexicano mediante la generación de productos enriquecidos con flavonoides (pinocebrina y hesperidina) de potencial interés biológico [Tesis de maestría]. Jalisco, México: Instituto Tecnológico de Tlajomulco; 2022. Recuperado a partir de: <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/4643>

27. Zavaleta J, Muñoz A, Blanco T, Alvarado-Ortiz C, Loja B. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. Horizonte médico [internet] 2005 [consultado 14 Noviembre 2022]; 5(2). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637113004>

28. Valladares A. Recuperación de ácido ferúlico de subproductos y desechos de la industria de la tortilla [Tesis de maestría]. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2006. Recuperado a partir de: <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/21245>

29. Pacheco M. Obtención de ácido ferúlico a partir de un concentrado de la hidrólisis alcalina del maíz [Tesis Doctoral]. Sonora, México: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C; 2015. Recuperado a partir de: <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/91>

30. Hwang H, Lee S, Yoon J, Moon H, Zhang J, Park E, et al. Ferulic Acid as a Protective Antioxidant of Human Intestinal Epithelial Cells. Antioxidants [internet] 2022 [consultado 13 Noviembre 2022];11(8): 1-18. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35892649/>

31. Cevallos V. Extracción y microencapsulación de ácido ferúlico a partir de los residuos agroindustriales de bagazo de malta de cebada como potencial antioxidante [Tesis de fin de grado]. Ambato, Ecuador:

Universidad Técnica de Ambato; 2022. Recuperado a partir:
<https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/36536>

32. Li X, Wu J, Xu F, Chu C, Shi X, Zheng W, et al. Use of Ferulic Acid in the Management of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Molecules* [internet] 2022 [consultado 13 Noviembre 2022]; 27(18): 1-13. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/18/6010>

33. Li F, Zhang B, Zhang Y, Zhang X, Usman S, Ding Z, et al. Probiotic effect of ferulic acid esterase-producing. *Anim Nutr* [internet] 2022 [consultado 13 Noviembre 2022];11:38-47. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36091259/>