

## Evaluación genotóxica de un novedoso nanohíbrido para la liberación de moléculas bioactivas

### Genotoxic evaluation of a novel nanohybrid for delivery of bioactive molecules

B. A. Andrade-Espinoza <sup>a</sup>, K. J. Nuño-Anguiano <sup>b</sup>, G. Iglesias-González <sup>c</sup>, A. D. Rocha-Muñoz <sup>d</sup>,  
J. E. Vázquez-Zermeño <sup>d</sup>, J. Arratia-Quijada <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Salud, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Tepatlán de Morelos, Jalisco, México.

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara, Tonalá, Jalisco, México.

<sup>c</sup> Departamento de ciencias Básicas y aplicadas e Ingenierías, Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara, Tonalá, Jalisco, México.

<sup>d</sup> Departamento de Ciencias de la Salud como Proceso Individual, Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara, Tonalá, Jalisco, México.

#### Resumen

En las últimas dos décadas, los nanomateriales híbridos orgánicos-inorgánicos han alcanzado un desarrollo intenso. Sin embargo, antes de su posible aplicación, se requiere de una evaluación completa y adecuada de sus potenciales beneficios, así como de los posibles efectos tóxicos para la salud humana. A fin de contribuir al conocimiento sobre la toxicidad de nanomateriales, en este estudio se presenta la evaluación del potencial genotóxico *in vivo* de nanohíbridos diseñados a base de hidróxidos dobles laminares/ $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil butirato/colágeno (ZnAl/HMB/Col) tras una exposición oral aguda. La evaluación se realizó mediante la técnica de micronúcleos (MN) en ratas macho Sprague-Dawley (SD) de 9 semanas de edad tras 7 días continuos de exposición oral a los nanohíbridos, a una dosis de 2,000 mg/kg. Como resultado, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en el número de micronúcleos al comparar los animales tratados con el grupo control. Por lo tanto, estos nanohíbridos no inducen genotoxicidad evaluado mediante esta técnica y representan un acarreador seguro para moléculas bioactivas.

#### Palabras clave:

Genotoxicidad, Hidróxidos dobles laminares, Micronúcleos, Nanohíbridos, Liberación controlada.

#### Abstract

In the last two decades, organic-inorganic hybrid nanomaterials have reached intense development. However, before their possible application, a complete and adequate evaluation of their potential benefits and possible toxic effects on human health is required. In order to contribute to the knowledge on the toxicity of nanomaterials, this study evaluates the *in vivo* genotoxic potential of engineered nanohybrids based on layered double hydroxides/ $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate/collagen (ZnAl/HMB/Col) after acute oral exposure. The evaluation was performed using the micronucleus (MN) technique in 9-week-old male Sprague-Dawley (SD) rats after 7 continuous days of oral exposure to the nanohybrids at a dose of 2,000 mg/kg. As a result, no statistically significant difference in the number of MN was observed when comparing the treated animals with the control group. So, these nanohybrids do not induce genotoxicity evaluated by this technique and represent a safety carrier for bioactive molecules.

#### Keywords:

Genotoxicity, Layered double hydroxides, Micronuclei, Nanohybrids, Controlled release.

#### 1. Introducción

Hoy en día, las moléculas bioactivas han llamado la atención de los investigadores debido a su capacidad de reducir el riesgo

de algunas enfermedades y de actuar como agentes activos para restablecer la salud (Oh, 2016). Las moléculas bioactivas se definen como compuestos que al interactuar en el organismo son capaces de producir efectos benéficos para la salud. Sin embargo, aún existen muchos inconvenientes para su utilización

\* Autor para la correspondencia: [jenny.arratia@academicos.udg.mx](mailto:jenny.arratia@academicos.udg.mx)

Correo electrónico: [jenny.arratia@academicos.udg.mx](mailto:jenny.arratia@academicos.udg.mx) (Jenny Arratia-Quijada); [bt.andra@gmail.com](mailto:bt.andra@gmail.com) (Beatriz A. Andrade-Espinoza); [karla.nuno@academicos.udg.mx](mailto:karla.nuno@academicos.udg.mx) (Karla Nuño-Anguiano); [guaberto2008@gmail.com](mailto:guaberto2008@gmail.com) (Gualberto Iglesias-González); [alberto.rocha@academicos.udg.mx](mailto:alberto.rocha@academicos.udg.mx) (Alberto Daniel Rocha-Muñoz); [jesus.vazquez2156@alumnos.udg.mx](mailto:jesus.vazquez2156@alumnos.udg.mx) (Jesús E. Vázquez-Zermeño)

relacionados con sus propiedades fisicoquímicas, principalmente su sensibilidad a las condiciones ambientales (exposición a la luz y al oxígeno, fácil degradación enzimática, sensibilidad a valores extremos de pH y a elevadas temperaturas) y su baja solubilidad, lo que da lugar a una baja biodisponibilidad y, por lo tanto, escasa eficacia terapéutica (Casanova et al., 2021).

Los recientes avances en ciencia y tecnología han propiciado el surgimiento de ciencias como la Nanotecnología. Ésta se ha convertido en una herramienta útil en áreas como la nutrición, la farmacéutica y la medicina (Ojha et al., 2021). Su aplicación en dichas áreas ofrece varias posibilidades, entre ellas, el desarrollo de nanosistemas para la administración y liberación de sustancias (Shi et al., 2010). A lo largo del tiempo, diversos sistemas se han aplicado como nanovehículos para la entrega de sustancias, entre los que destacan: liposomas, micelas, dendrímeros, nanotubos de carbono y nanoestructuras poliméricas y metálicas (Majumder y Minko, 2021; Sultana et al., 2019).

En las últimas dos décadas, nanomateriales híbridos orgánicos/inorgánicos han alcanzado un desarrollo intensivo para establecer modalidades de entrega de sustancias eficaces (da Silva et al., 2020). El desarrollo de estos sistemas es posible gracias a la interacción entre la matriz inorgánica con la molécula orgánica, la cual genera efectos sinérgicos en las nuevas estructuras y da lugar a materiales con propiedades únicas que podrían resultar en una mejora de las características de los constituyentes originales (Fernandes y Baradari, 2014). Soportes inorgánicos como los hidróxidos dobles laminares (HDL) son particularmente útiles para el desarrollo de nanosistemas híbridos para liberación controlada de sustancias, debido principalmente a dos características importantes: la capacidad de carga superficial del material y la posibilidad de modificación del espacio interlaminar (del Arco et al., 2010). Otras características para elegir los HDL como matrices para el desarrollo de sistemas de liberación de sustancias son su baja toxicidad, su capacidad de intercambio iónico, su sensibilidad al pH y su bajo costo de producción (Gu et al., 2017).

Los HDL son materiales inorgánicos, bidimensionales (2D), cristalinos, de forma laminar y carga positiva, cuya composición química se representa con la fórmula general:  $[M_1 \cdot x^{2+} M_x^{3+} (OH)_2]^{x+} [A_{x/n}]^{n-} \cdot mH_2O$ , donde  $M^{2+}$  representa a un catión divalente,  $M^{3+}$  a un catión trivalente y  $A^{n-}$  es el anión intercambiable en la zona interlaminar (Daud et al., 2019). Los HDL albergan las sustancias entre dos capas o las adsorben en su superficie, y su liberación sigue el principio de intercambio iónico: los aniones circundantes como el  $Cl^-$  y el  $PO_4^{3-}$  se intercambian por la sustancia intercalada o adsorbida (Kura et al., 2015). Con la finalidad de proteger moléculas bioactivas de la degradación por condiciones ambientales, autores como Silion y Daud han utilizado los HDL como hospederos para estas moléculas y demostrado que pueden actuar como matrices estables para el alojamiento, protección y posterior liberación de las mismas (Daud et al., 2019; Silion et al., 2012).

Si bien los sistemas de liberación controlada son diseñados y desarrollados con la finalidad de superar las limitaciones de las moléculas bioactivas y así contribuir a mejorar la salud, es necesario conocer la potencial toxicidad que estos nanosistemas de liberación pudieran representar, considerando el tamaño de partícula, los precursores para sintetizarlos, el método de síntesis, el patrón de distribución del sistema en el organismo o los productos finales de degradación (Kura et al., 2015). Por lo tanto, resulta inevitable una evaluación toxicológica exhaustiva de cualquier nanomaterial recién diseñado. En este estudio se evaluó el potencial genotóxico *in vivo* de nanohíbridos a base de hidróxidos dobles laminares/ $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato/colágeno

(ZnAl/HMB/Col) tras una exposición oral aguda a través del ensayo de micronúcleos (MN).

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Animales de experimentación

El posible efecto genotóxico de los nanohíbridos diseñados fue evaluado en ratas macho Sprague Dawley de 9 semanas de edad ( $n=6$ ) con un peso aproximado de  $226 \pm 4.55$  g. Las ratas fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM (Juriquilla, Querétaro, México). Previo al ensayo, los animales fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio durante una semana. Las ratas se mantuvieron con un ciclo de luz oscuridad de 12 h/12 h con una temperatura de  $25^\circ C \pm 2$  con libre acceso a comida y agua. Se realizaron 7 administraciones consecutivas con la dosis y tipo de material correspondiente acorde a su grupo de tratamiento (ver en tabla 1), con intervalos de 24 h, vía intragástrica; el grupo control recibió sólo alimento y agua. Los animales fueron éticamente sacrificados por punción cardíaca, previa sedación, con pentobarbital sódico (55 mg/kg) a las 24 h de la última administración. Todos los procedimientos experimentales fueron acorde a la Norma Federal para la Experimentación y el Cuidado de los Animales (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA) y aprobados por el Comité de Bioética del Centro Universitario de los Altos con folio: CUA/CEI/DOBI002/2021.

Tabla 1. Distribución de los animales en los grupos de tratamiento

Grupo		Dosis (mg/kg)
CTR	Control	-
HMB	Tratamiento con $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato	320
ZnAl	Tratamiento con hidróxidos dobles laminares	2,000
Col	Tratamiento con péptidos de colágeno tipo I	1,000
ZnAl/HMB	Tratamiento con híbrido a base de hidróxidos dobles laminares/ $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato	2,000
ZnAl/Col	Tratamiento con híbrido a base de hidróxidos dobles laminares/colágeno	2,000
ZnAl/HMB/Col	Tratamiento con híbrido a base de hidróxidos dobles laminares/ $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato/colágeno	2,000

### 2.2 Selección de la dosis

La dosis de los materiales sintetizados se determinó a partir de un experimento previo de  $DL_{50}$ , mientras que para el ácido- $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutírico (HMB) y el colágeno se usaron dosis terapéuticas reportadas (Kim et al., 2018; Yonamine et al., 2017).

### 2.3 Ensayo de micronúcleos

El ensayo se ejecutó siguiendo las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

(OECD), protocolo 474 para la prueba de MN en eritrocitos de mamíferos (OECD, 2016). Para ello, se recogieron muestras de sangre periférica al momento del sacrificio (1 día después de la última dosis de materiales administrada). Los frotis de sangre periférica se prepararon colocando 1 gota de sangre en un portaobjetos limpio; luego, con un cubreobjetos en un ángulo de 45°, se dispersó la muestra para preparar frotis finos. El conjunto de frotis (cuatro portaobjetos por muestra) se dejó secar completamente al aire y se fijó en etanol al 70% durante tres minutos. Los portaobjetos se codificaron combinando el código del grupo de exposición y número de animal. Tras la fijación en etanol, se tiñó un portaobjetos con la tinción Wright-Giemsa (10% v/v en tampón Sorenson pH 6.8). Al final, el portaobjetos se lavó con una solución de ácido cítrico al 0.1% y, por último, con agua bidestilada. Se secaron y observaron con un microscopio (Carl Zeiss, LAB 1) equipado con una cámara de video (Axio Cam 208 color, Carl Zeiss) a 100x.

Se contaron 2,000 eritrocitos policromáticos (PCE) y eritrocitos normocromáticos (NCE) por muestra para determinar la proporción de MN. Los portaobjetos codificados fueron analizados de forma combinada por un calificador independiente.

Se valoró la significancia estadística en la disminución de la proporción de eritrocitos PCE/NCE respecto al control, así como en el incremento de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MNP) respecto al control, como indicadores de toxicidad.

#### 2.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía. Se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey para evaluar las diferencias entre los grupos. El nivel de significancia se fijó en  $p < 0.5$  y  $p < 0.01$ . El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS para Windows (versión 24.0).

### 3. Resultados y discusión

La enorme oportunidad que ofrecen los nanosistemas para transportar una variedad de moléculas bioactivas que favorezcan la terapia de algunas enfermedades ha impulsado su aplicación en áreas biológicas. Sin embargo, antes de ser aplicados como herramienta para la entrega de sustancias, requieren una intensa evaluación toxicológica/genotóxica debido a que interactúan de manera íntima con los componentes celulares y, por ello, pueden presentar efectos nocivos indeseables e interferir incluso con las funciones celulares vitales (Malaviya et al., 2020). Algunos agentes son reconocidos por su capacidad de provocar daños en el material genético que no son reparados, y se transmiten a la descendencia, ya que no producen la muerte de las células. Una medida para determinar la exposición a un agente genotóxico y su nivel de riesgo es el biomonitorio *in vivo* mediante diversas pruebas. Dentro de los ensayos más utilizados como medida de daño cromosómico tras la exposición a agentes con potencial tóxico se encuentra el método citogenético de eritrocitos micronucleados (EMN). Los MN corresponden a cuerpos de cromatina, redondos y pequeños, que resultan de la condensación de fragmentos de cromosomas acéntricos o cromosomas completos rezagados durante la división celular (García-Rodríguez et al., 2019).

El efecto genotóxico de los nanosistemas híbridos basados en el uso de arcillas ha sido ampliamente evaluado por diversos grupos de investigación (Chang et al., 2021; Maisanaba et al., 2015). En este trabajo se investigó el potencial efecto genotóxico del híbrido laminar ZnAl/HMB/Col diseñado como sistema para la liberación de moléculas bioactivas, aplicando el protocolo 474

de la OECD para la prueba de MN en eritrocitos de sangre periférica tras la administración de elevadas dosis, siguiendo un periodo de exposición aguda. Los resultados obtenidos fueron comparados con cada una de las sustancias que integran el sistema híbrido, así como con las posibles combinaciones binarias de sus componentes. El número de micronúcleos en eritrocitos normocromáticos (MNN) y MNP, así como el coeficiente de eritrocitos PCE/NCE en las ratas tratadas, se muestra en la tabla 2. Nuestros resultados indican que el híbrido ZnAl/HMB/Col no mostró ningún aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de MN. El mismo comportamiento fue observado para los compuestos ZnAl/HMB, ZnAl/Col, los HDL, el HMB y el Col. Además, la proporción PCE/NCE no mostró disminución estadísticamente significativa respecto a la media del control. La figura 1 muestra una imagen representativa de MNN en una rata tratada con ZnAl/HMB, donde es posible observar el MN como un pequeño cuerpo redondo de cromatina, visible en el citoplasma del eritrocito teñido mediante la tinción Wright-Giemsa. En general, nuestros hallazgos señalan que no hubo genotoxicidad en sangre periférica bajo estas condiciones de tratamiento.

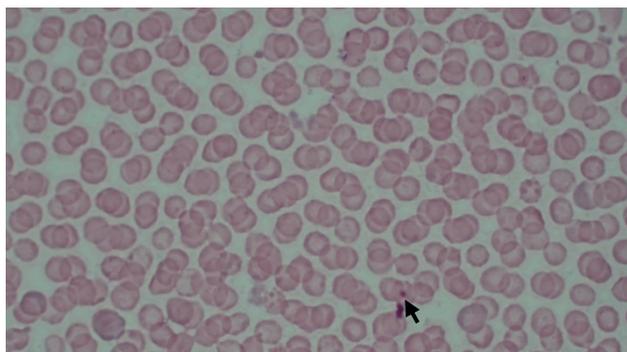
La toxicidad que en general los nanomateriales pueden llegar a presentar está relacionada con factores como el método de síntesis, los precursores utilizados para su elaboración, el patrón de distribución de estos nanosistemas en el organismo, los productos finales de degradación, así como con algunas propiedades fisicoquímicas como el tamaño, la morfología, el área superficial, la estructura cristalina, el estado de aglomeración/agregación, la carga superficial y la composición química, entre otras (García-Rodríguez et al., 2019; Kura et al., 2015). Del análisis de la literatura científica se derivan diferentes conclusiones. Particularmente, respecto a la composición metálica para nanopartículas a base de zinc y aluminio, se han observado resultados contradictorios sobre sus efectos genotóxicos evidenciados por la prueba de MN en ensayos *in vitro*, los cuales dependen principalmente de la dosis utilizada (García-Rodríguez et al., 2019; Giray Bugra y Türkez, 2018).

La información sobre los efectos genotóxicos de los compuestos híbridos a base de HDL *in vivo* es limitada. Además, los ensayos genotóxicos *in vitro* muestran resultados contradictorios. En este trabajo se mostró que el nanohíbrido a base de ZnAl/HMB/Col no indujo efectos genotóxicos *in vivo* en ratas tras una exposición oral de 7 días a dosis de 2,000 mg/kg.

Tabla 2. Inducción de eritrocitos micronucleados en eritrocitos de sangre periférica de ratas expuestas a 7 días a los diferentes tratamientos

Grupo	MNN	MNP	PCE/NCE proporción
CTR	1±0.5	0	0.014±0.005
HMB	0.5±1	0	0.02±0.008
ZnAl	0.66±1	0	0.021±0.008
Col	2±2.8	0	0.008±0.003
ZnAl/HMB	1.25±0.5	0	0.01±0.002
ZnAl/Col	1.8±0.4	0	0.005±0.003
ZnAl/HMB/Col	1±1	0	0.013±0.007

Nota: MNP: micronúcleos en eritrocitos policromáticos; MNN: micronúcleos en eritrocitos normocromáticos; PCE eritrocitos policromáticos; NCE: eritrocitos normocromáticos. El promedio de micronúcleos se expresa como media ± DE.



**Figura 1. Eritrocitos de sangre periférica, teñidos con Wright-Giemsa, de rata tratada con el híbrido ZnAl/HMB (2,000 mg/kg)**

Nota: La flecha indica el micronúcleo en eritrocito maduro (normocromático).

#### 4. Conclusiones

Nuestros hallazgos indican que el nanohíbrido ZnAl/HMB/Col no induce daño cromosómico mediante el ensayo de MN en sangre periférica de ratas expuestas por vía oral a los materiales cuya matriz inorgánica son los HDL en dosis de 2,000 mg/kg. Por ello, se considera que el nanohíbrido diseñado representa una forma segura de transporte para la molécula bioactiva y su efecto benéfico puede ser evaluado en futuros experimentos.

#### Agradecimientos

Esta investigación fue parcialmente financiada por PROSNI-Universidad de Guadalajara. Beatriz A. Andrade-Espinoza fue apoyada por una beca CONACyT. Los autores desean agradecer a María de los Ángeles Palomera Santos, Fidel Emmanuel Sánchez Loza y Gloria Noemí del Castillo Galván por su apoyo técnico durante el sacrificio de los animales de experimentación.

#### Referencias

- Casanova, F., Nascimento, L. G. L., Silva, N. F. N., de Carvalho, A. F. y Gaucheron, F. (2021). Interactions between caseins and food-derived bioactive molecules: A review. *Food Chemistry*, 359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129820>
- Chang, C.-H. I., Lee, Y.-H., Liao, Z.-H., Hung-Chih Chen, M., Peng, F.-C. y Lin, J.-J. (2021). Composition of nanoclay supported silver nanoparticles in furtherance of mitigating cytotoxicity and genotoxicity. *PLoS ONE*, 16(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247531>
- da Silva, A. F., de Pádua, G. S., de Araújo, D. T., Vieira, C. A. y de Faria, E. H. (2020). Immobilization of L-alanine into natural kaolinite via amidation catalyzed by boric acid for the development of biohybrid materials. *Journal of Solid State Chemistry*, 287. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2020.121332>
- Daud, M., Hai, A., Banat, F., Wazir, M. B., Habib, M., Bharath, G. y Al-harhi, M. A. (2019). A review on the recent advances, challenges and future aspect of layered double hydroxides (LDH) – Containing hybrids as promising adsorbents for dyes removal. *Journal of Molecular Liquids*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.110989>
- del Arco, A. M., Fernández, C. Martín, V. R. (2010). Solubility and release of fenbufen intercalated in Mg, Al and Mg, Al, Fe layered double hydroxides (LDH): The effect of Eudragit S 100 covering. *Journal of Solid State Chemistry*, 183, 3002–3009. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2010.10.017>
- Fernandes, F.M., Baradari, C. S. (2014). Integrative strategies to hybrid lamellar compounds: an integration challenge. *Applied Clay Science*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.05.013>
- García-Rodríguez, A., Kazantseva, L., Vila, L., Rubio, L., Velázquez, A., Ramírez, M. J., Marcos, R. y Hernández, A. (2019). Micronuclei Detection by Flow Cytometry as a High-Throughput Approach for the Genotoxicity Testing of Nanomaterials. *Nanomaterials*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/nano9121677>
- Giray Bugra, A. y Türkez, H. (2018). Investigation of the Genotoxicity of Aluminum Oxide, 3-Tricalcium Phosphate, and Zinc Oxide Nanoparticles In Vitro. *International Journal of Toxicology*, 37(3), 216–222. <https://doi.org/10.1177/1091581818775709>
- Gu, Z., Yan, S., Cheong, S., Cao, Z., Zuo, H., Anita, C., Rolfè, B. E. y Xu, Z. P. (2017). Layered double hydroxide nanoparticles: Impact on vascular cells, blood cells and the complement system. *Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.069>
- Kim, D. U., Chung, H. C., Choi, J., Sakai, Y. y Lee, B. Y. (2018). Oral intake of low-molecular-weight collagen peptide improves hydration, elasticity, and wrinkling in human skin: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/nu10070826>
- Kura, A. U., Hussein, M. Z., Fakurazi, S. y Arulselvan, P. (2014). Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. *Chemistry Central Journal*, 8(47). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13065-014-0047-2>
- Kura, A. U., Saifullah, B., Cheah, P. S., Hussein, M. Z., Azmi, N. y Fakurazi, S. (2015). Acute oral toxicity and biodistribution study of zinc-aluminium-levodopa nanocomposite. *Nanoscale Research Letters*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0742-5>
- Maisanaba, S., Pichardo, S., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, D., Cameán, A. M. y Jos, A. (2015). Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: A review. *Environmental Research*, 138, 233–254. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.024>
- Majumder, J. y Minko, T. (2021). Multifunctional and stimuli-responsive nanocarriers for targeted therapeutic delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 18(2), 205–227. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1828339>
- Malaviya, P., Shukal, D. y Vasavada, A. R. (2020). Nanotechnology-based Drug Delivery, Metabolism and Toxicity. *Current Drug Metabolism*, 20(14). <https://doi.org/10.2174/1389200221666200103091753>
- OECD. (2016). OECD TG474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. In *Organisation for Economic Co-operation and Development publishing*.
- Oh, Y. S. (2016). Bioactive compounds and their neuroprotective effects in diabetic complications. *Nutrients*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/nu8080472>
- Ojha, B., Jain, V. K., Mehra, N. K. y Jain, K. (2021). Nanotechnology: Introduction and Basic Concepts. *Dendrimers in Nanomedicine*. <https://doi.org/10.1201/9781003029915-1>
- Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C. y Langer, R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nano Letters*, 10(9). <https://doi.org/10.1021/nl102184c>
- Silion, M., Hritcu, D., Lisa, G. y Popa, M. I. (2012). New hybrid materials based on layered double hydroxides and antioxidant compounds. Preparation, characterization and release kinetic studies. *Journal of Porous Materials*, 19(3), 267–276. <https://doi.org/10.1007/s10934-011-9473-x>

Sultana, N., Bora, P. y Sarma, B. (2019). Nanocarriers in drug delivery system: Eminence and confront. *Smart Nanocontainers: Micro and Nano Technologies*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816770-0.00010-1>

Yonamine, C. Y., Gerlinger-Romero, F., Guimara, L., Barrera, R., Maria, S.,

Nunes, T., Guimarães-Ferreira, L., Yonamine, C. Y., Salgueiro, R. B. y Nunes, M. T. (2017). Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on the expression of ubiquitin ligases, protein synthesis pathways and contractile function in extensor digitorum longus (EDL) of fed and fasting rats. *Journal of Physiological Sciences*, 68(2), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0520-x>