

## Efecto Citotóxico de una Formulación a base de Zeína, Cannabidiol y Cannabigerol en un Modelo *In Vitro* de Células Caco-2

### Cytotoxic Effect of a Zein, Cannabidiol, and Cannabigerol-Based Formulation in an *In Vitro* Cell Model of Caco-2 Cells

Kevin Antonio Cárdenas-Noriega <sup>1</sup>, Joel Horacio Elizondo-Luévano <sup>2,\*</sup>, Adolfo Soto-Domínguez <sup>3</sup>, Abelardo Chávez-Montes <sup>2</sup>, Luis Édgar Rodríguez-Tovar <sup>1</sup>, Moisés Armides Franco-Molina <sup>2</sup>, Diana Ginette Zárate-Triviño <sup>2</sup>, Juanita Guadalupe Gutiérrez-Soto <sup>4</sup>, Ameyalli Jocelyn Martínez-Delgado <sup>5</sup>, Raymundo Alejandro Pérez-Hernández <sup>2</sup>, Uziel Castillo-Velázquez <sup>1,\*</sup>

1. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, C. Francisco Villa 20, Ex Hacienda del Canadá, 66054, Cd. Gral. Escobedo, Nuevo León, México; kevin.cardenasno@uanl.edu.mx (K.A.C.-N.); luis.rodriquezvtv@uanl.edu.mx (L.E.R.-T.); uziel.castillovl@uanl.edu.mx (U.C.-V.)
2. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba, Niños Héroe, 66455, San Nicolás de los Garza. Nuevo León, México; joel.elizondolv@uanl.edu.mx (J.H.E.-L.); abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx (A.C.-M.); moises.francoml@uanl.edu.mx (M.A.F.-M.); diana.zaratetr@uanl.edu.mx (D.G.Z.-T.); raymundo.perezhrz@uanl.edu.mx (R.A.P.-H.)
3. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, 64460, Mitras Centro, Nuevo León, México; adolfo.sotodmn@uanl.edu.mx (A.S.-D.)
4. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, C. Francisco Villa 20, Ex Hacienda del Canadá, 66054, Cd. Gral. Escobedo, Nuevo León, México; juanita.gutierrezst@uanl.edu.mx (J.G.G.-S.)
5. Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, 64460, Mitras Centro, Nuevo León, México; ameyalli.martinezd@uanl.edu.mx (A.J.M.-D.)

\* **Correspondencia:** joel.elizondolv@uanl.edu.mx (J.H.E.-L.); uziel.castillovl@uanl.edu.mx (U.C.-V.)

#### RESUMEN

El presente artículo de investigación se centra en la evaluación del efecto citotóxico de los fitocannabinoides cannabidiol (CBD) y cannabigerol (CBG), de manera individual y en combinación (CBD:CBG), así como en una formulación a base de zeína (Ze) con CBD y CBG en conjunto (ZeCBD:CBG). Para ello, el efecto de CBD, CBG, CBD:CBG y ZeCBD:CBG en la viabilidad celular se evaluó en la línea celular intestinal Caco-2 y se evaluó la actividad metabólica dependiente de mitocondria mediante análisis de reducción de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio o ensayo de MTT. Además, para determinar el tratamiento más efectivo, se estimó la concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) de cada tratamiento evaluado mediante la prueba de Probit. Todos los tratamientos evaluados mostraron disminuir la viabilidad celular de células Caco-2 en diferente medida, siendo ZeCBD:CBG y CBD:CBG los que mostraron los valores más bajos de IC<sub>50</sub> (12.8 μM y 9.2 μM, respectivamente). Por lo anterior, estos resultados indican que la formulación de CBD y CBG en una matriz basada en zeína muestra un menor efecto citotóxico metabólica comparado con los cannabinoides libres en las condiciones *in vitro* evaluadas.

**Palabras Clave:** Cannabinoides, Cannabidiol, Cannabigerol, Caco-2, Zeína

## Cytotoxic Effect of a Zein-based formulation Containing Cannabidiol and Cannabigerol in an In Vitro Caco-2 Cell Model

### ABSTRACT

This research article focuses on evaluating the cytotoxic effects of the phytocannabinoids cannabidiol (CBD) and cannabigerol (CBG), both individually and in combination (CBD:CBG), as well as in a zein-based formulation containing both cannabinoids (ZeCBD:CBG). The effects of CBD, CBG, CBD:CBG, and ZeCBD:CBG on cell viability were assessed in the intestinal epithelial Caco-2 cell line by measuring mitochondrial-dependent metabolic activity using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. In addition, the half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of each treatment was estimated using Probit analysis. All evaluated treatments induced a reduction in Caco-2 cell viability to different extents, with ZeCBD:CBG and CBD:CBG showing the lowest  $IC_{50}$  values (12.8  $\mu$ M and 9.2  $\mu$ M, respectively). Overall, these results indicate that the formulation of CBD and CBG in a zein-based matrix exhibits a lower cytotoxic metabolic effect compared with the free cannabinoids under the in vitro conditions evaluated.

**Keywords:** Cannabinoids, Cannabidiol, Cannabigerol, Caco-2, Zein

### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son un grupo de enteropatías inflamatorias, crónicas y de presentación clínica heterogénea que, aunque su etiología permanece incierta, se ha evidenciado que es una manifestación multifactorial de la desregulación de la respuesta inmune a la microbiota intestinal en individuos con predisposición genética (Saez et al., 2023; Lu et al., 2022). Debido a las consecuencias de sus manifestaciones en la salud, las cuales pueden involucrar diferentes grados de dolor, daño local en tracto gastrointestinal y en otros órganos y sistemas, dependiendo de la severidad, y de la ineficacia de las terapias convencionales, surge la necesidad de buscar estrategias terapéuticas complementarias (Cai et al., 2021; Seyedian et al., 2019). En este contexto, el uso de modelos *in vitro* basados en epitelio intestinal humano son ampliamente utilizados para estudios farmacológicos, de funcionalidad, fisiología y mecanismos patológicos del epitelio intestinal (Lopez-Escalera & Wellejus, 2022; Ding et al., 2021).

Por su parte, los componentes del sistema endocannabinoide contenidos en el tracto gastrointestinal tienen importantes roles en la regulación de respuesta inmune y procesos inflamatorios (Lian et al., 2022). Mientras que cannabinoides derivados de la planta de cannabis sativa L., como el cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG), son estudiados por su capacidad de modular al sistema endocannabinoide presentando actividad terapéutica en diversos estudios, además de amplios rangos de seguridad y baja toxicidad en animales (Iffland & Grotenhermen, 2017; Brierley et al., 2016). Sin embargo, debido a que son compuestos altamente lipofílicos, una de las principales limitantes en su aplicación farmacológica es su baja solubilidad acuosa, inestabilidad química y baja biodisponibilidad al ser administrados por la vía oral debido a un alto metabolismo de primer paso (Kok et al., 2022). Para superar esta limitante se han desarrollado sistemas de entrega basados en nanotecnología, capaces de mejorar las cualidades fisicoquímicas y terapéuticas de compuestos altamente hidrofóbicos, como los cannabinoides. Un estudio publicado por nuestro equipo de trabajo desarrolló un sistema de nanoentrega basado en el polímero Eudragit-L100 y cargado con CBD y CBG. Al ser evaluados en células Caco-2

sanas, los cannabinoides solubles y en nanoformulación mostraron un efecto más marcado en la viabilidad celular en conjunto, a comparación de sus componentes individuales (Cárdenas-Noriega et al., 2026). Por su parte se ha propuesto a la zeína, un polímero proteico extraído del maíz, se ha propuesto como un material adecuado para el desarrollo de sistemas de nanoentrega de cannabinoides (Wang et al., 2022; Abdelsalam et al., 2021). La búsqueda de complementos terapéuticos para las EII, así como de nanoformulaciones adecuadas para la entrega efectiva de cannabinoides, representan importantes perspectivas de estudio a explorar.

Por lo anterior, el objetivo principal de la presente investigación estuvo enfocado en evaluar el efecto citotóxico del cannabidiol (CBD), del cannabigerol (CBG), así como de los complejos CBD:CBG y la formulación basada en zeína ZeCBD:CBG in vitro en la línea celular intestinal Caco-2.

## MÉTODOS

### Reactivos

El cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG) de *Cannabis sativa* fueron adquiridos en Botican (ICAN Connect to Cannabis, CDMX, México) en forma de polvo con sus respectivos análisis de garantía (100% CBD y 99.08% CBG) en forma de polvo. Los solventes y reactivos utilizados en los tratamientos se adquirieron en CTR Scientific® (Monterrey, NL, México). Para el cultivo celular se utilizaron el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suero fetal bovino (SFB), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y solución antibiótica/antimicótica (1% v/v de una mezcla comercial que contiene 100 U/mL de penicilina y estreptomycin), adquiridos de Gibco™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Para los ensayos de viabilidad, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el dimetilsulfóxido (DMSO) e hidróxido de sodio (NaOH), así como el polvo de zeína para la formulación se adquirieron de Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

### Formulaciones

Los cannabinoides se evaluaron a concentraciones de 0.8 µM, 4.7 µM, 9.5 µM, 14.2 µM, 19 µM y 23.7 µM, individuales o en combinación (CBD:CBG, 1:1). Por su parte, la formulación con cannabinoides a base de zeína (ZeCBD:CBG) se evaluó a concentraciones de 0.1 µg, 0.2 µg, 0.4 µg, 0.6 µg, 0.8 µg y 1.0 µg de zeína conteniendo las mismas concentraciones de cannabinoides anteriormente mencionadas.

La formulación del complejo ZeCBD:CBG se desarrolló de la siguiente manera. Se utilizó una solución de etanol al 80% con 0.01 g de zeína (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) y 0.06 g de cannabinoides (CBD:CBG, 1:1) y se realizó un tratamiento térmico en placa térmica a 95 °C durante 30 minutos en un recipiente cerrado. Finalizado el tratamiento térmico, se preparó un vaso precipitado con 6 mL de agua desionizada (agua MiliQ) y se colocó bajo un homogeneizador (T18 Digital Ultra Turrax, IKA® Works GmbH & Co. KG, Alemania) a 5,000 rpm. Rápidamente, se administró la solución de zeína tratada por goteo hasta obtener una solución transparente (hialino) color azul turquesa.

La formulación fue caracterizada basándonos en su tamaño promedio en nanómetros (nm) e índice de polidispersidad (PDI) mediante dispersión dinámica de luz mediante un Zetasizer Nano ZS system (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) y la eficiencia de encapsulación (EE%) mediante un método indirecto a través de espectrofotometría del sobrenadante y precipitado de muestras centrifugadas, así como lectura de absorbancia (Abs) relacionada a una curva de calibración de diluciones de los cannabinoides utilizando un

espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Scientific™ GENESYS™ 10S, Thermo Fisher Scientific Inc. Madison, Wisconsin, Estados Unidos) a una longitud de onda de 215 nm para el CBD y 216 nm para el CBG. La eficiencia de encapsulación en porcentaje (%) fue determinada con la siguiente fórmula (1):

$$EE\% = \frac{(\mu\text{g Activo libre} \times 100)}{\mu\text{g Activo total}} - 100 \quad (1)$$

### Efecto en la viabilidad celular *In vitro*

La viabilidad *in vitro* se evaluó en células epiteliales de adenocarcinoma de colon (Caco-2, [Caco2] HTB-37™) obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC®). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), el cual se basa en la capacidad mitocondrial de reducción del MTT a formazán insoluble por células metabólicamente activas. Por lo tanto, los valores obtenidos reflejan la actividad metabólica dependiente de mitocondria, como un indicador de la viabilidad celular. Los cristales de formazán resultantes se disolvieron con 100 µL de DMSO por 30 minutos. Se realizó una lectura de absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm utilizando un espectrofotómetro Agilent Biotek Epoch Microplate Spectrophotometer espectrofotómetro (Agilent Biotek Epoch Microplate Spectrophotometer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La evaluación del metabolismo celular dependiente de mitocondria se evaluó utilizando la siguiente fórmula (2):

(2)

Las células se sembraron en placas plásticas transparentes de 96 pozos a una concentración de 10,000 células por pozo y se incubaron en medio de cultivo DMEM con SFB) al 10% y antibiótico/antifúngico al 1% en una atmósfera húmeda estéril a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 4% durante 24 h previas al tratamiento. Los tratamientos se administraron por triplicado a diferentes concentraciones en relación con el medio, y se utilizaron células tratadas con vehículo a los mismos volúmenes, así como células sin tratamiento como controles.

### Análisis de datos

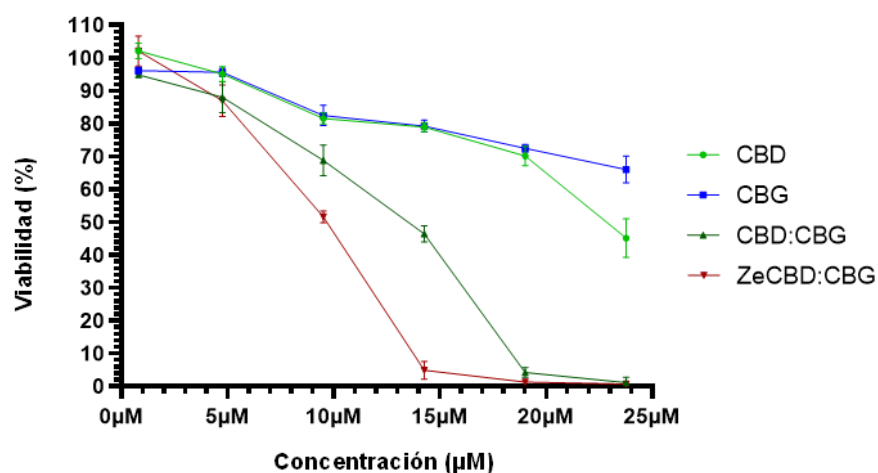
Se utilizó estadística descriptiva, análisis de varianza (ANOVA) y la prueba post hoc de Tukey para determinar la diferencia entre los tratamientos y la prueba de Probit para la determinación de la concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>). Se utilizó el paquete estadístico Graphpad Prism, versión 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) para los análisis estadísticos.

## RESULTADOS

La formulación ZeCBD:CBG mostró tamaños promedio de partículas de 144.8 nm ± 41.6 nm y un PDI de 0.148, valores dentro de los rangos reportados para este tipo de nanopartículas (Danaei et al., 2018), así como un %EE, definido como la proporción de agente activo añadido durante la formulación que permanece dentro del sistema de entrega después de procesado (Wallace et al., 2012) de 69.99 ± 2.68.

El efecto de los presentes tratamientos CBD, CBG, CBD:CBG (1:1) y ZeCBD:CBG frente a la viabilidad celular *in vitro* en cultivos de células Caco-2 mostro un efecto dosis-respuesta ya que a medida que aumenta la concentración del tratamiento disminuye la viabilidad

celular de estas. Siendo los más efectivos los tratamientos combinados CBD:CBG (1:1) y ZeCBD:CBG tal como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Efecto de los formulados sobre la viabilidad en la línea celular Caco-2 *in vitro*.

La determinación de las  $IC_{50}$  de los tratamientos con CBD, CBG, CBD:CBG y ZeCBD:CBG fue de  $24.53 \pm 1.95$ ,  $42.63 \pm 7.25$ ,  $12.76 \pm 0.43$  y  $9.22 \pm 2.31$   $\mu M$ , respectivamente.

## DISCUSION

En el presente estudio se determinó el efecto del CBD y CBG de manera individual, en conjunto (CBD:CBG) y su formulación en un sistema de entrega basado en zeína (ZeCBD:CBG) sobre la viabilidad celular *in vitro* en un modelo epitelial intestinal humano en células Caco-2 mediante el ensayo de reducción de MTT. Los resultados indican que los tratamientos evaluados indujeron una disminución dosis-dependiente en la actividad metabólica celular, siendo el CBD:CBG y ZeCBD:CBG los tratamientos cuyos valores de  $IC_{50}$  mostraron ser los más bajos a comparación de los cannabinoides administrados de manera individual. Es importante señalar que el ensayo MTT evalúa la capacidad metabólica mitocondrial de las células para reducir el reactivo a cristales de formazán, por lo que los valores obtenidos reflejan cambios en la actividad metabólica celular como un indicador indirecto de viabilidad. En este sentido, los cambios observados no permiten distinguir entre mecanismos específicos de muerte celular ni evaluar procesos asociados como arresto del ciclo celular o estrés oxidativo. Debido a esto los efectos observados se interpretaron como efectos en la viabilidad celular, concepto ampliamente utilizado en la literatura (Ghasemi et al., 2021), en concordancia con las limitaciones inherentes a este tipo de ensayo.

El comportamiento dosis-respuesta de los cannabinoides concuerda con otros estudios que reportan efectos dependientes de la concentración de los cannabinoides sobre la viabilidad celular (Cárdenas-Noriega et al., 2026). La combinación de ambos cannabinoides mostró un efecto más remarcable en la viabilidad celular a comparación de sus congéneres individuales. No obstante, es importante aclarar que en este estudio no se realizaron análisis específicos de sinergia, antagonismo o aditividad. Por lo tanto, bajo las presentes condiciones experimentales los efectos observados para las combinaciones de cannabinoides (solubles o formulados con zeína) no deben interpretarse como evidencia de un efecto sinérgico entre ellos. Las diferencias

en los resultados de  $IC_{50}$  para ZeCBD:CBG y CBD:CBG indican una modificación del formulado sobre el efecto de los cannabinoides en la viabilidad celular.

La zeína ha sido ampliamente estudiada como sistema de entrega para compuestos hidrofóbicos debido a su capacidad para mejorar la estabilidad y dispersión de moléculas lipofílicas, así como su compatibilidad biológica (Abdelsalam et al., 2021; Wang et al., 2022). En este contexto, los resultados sugieren que la formulación ZeCBD:CBG puede modular la disponibilidad celular de los cannabinoides, reflejado en un perfil de citotoxicidad distinto al de su contraparte no formulada. Estos resultados son consistentes con lo publicado por nuestro equipo de trabajo para otro sistema de nanoentrega diferente, en donde se comparó el efecto de un sistema formulado con el polímero Eudragit-L100 cargado de cannabinoides con los cannabinoides libres (Cárdenas-Noriega et al., 2026). En conjunto, ambos estudios refuerzan la utilidad de modelos epiteliales intestinales in vitro para evaluar la citotoxicidad metabólica y la respuesta a cannabinoides libres y formulado en sistemas de entrega.

Finalmente, aunque las células Caco-2 derivan de adenocarcinoma colorrectal, su capacidad para diferenciarse a células epiteliales funcionales de manera normal las hace objeto de estudio para evaluar los efectos de agentes terapéuticos in vitro. Por lo tanto, los resultados obtenidos no deben interpretarse en términos de actividad antitumoral o extrapolarse a contextos terapéuticos oncológicos. Estudios futuros que incorporen análisis mecanísticos específicos y modelos experimentales adicionales serán necesarios para profundizar en los efectos celulares de CBD, CBG y sus formulaciones.

### CONCLUSIONES

El cannabidiol (CBD), el cannabigerol (CBG), su combinación (CBD:CBG) en forma libre y en una formulación a base de zeína (ZeCBD:CBG) produjeron una disminución dosis-dependiente de la actividad metabólica celular en un modelo epitelial intestinal humano in vitro (Caco-2), evaluada mediante el ensayo de MTT. Los tratamientos combinados presentaron valores menores de  $IC_{50}$  a comparación de los cannabinoides individuales; sin embargo, al no haber realizado análisis de sinergia, estos efectos deben interpretarse únicamente como el resultado de la coexposición a ambos compuestos. Asimismo, la formulación con zeína modificó el perfil de citotoxicidad metabólica con respecto a los cannabinoides libres en combinación. Estos resultados contribuyen a la caracterización de los efectos de estos compuestos en el metabolismo de células epiteliales intestinales in vitro.

**Declaración de ética:** Los autores respaldan el presente trabajo y contribuyen de manera significativa a su autoría. Asimismo, se han seguido todos los procedimientos éticos necesarios.

**Conflictos de interés:** No existe conflicto de intereses.

**Agradecimientos:** Agradecimiento a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, la Facultad de Medicina y la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por brindarnos la infraestructura, los recursos y el acceso a bases de datos para llevar a cabo la presente investigación. Los autores también agradecen al Sistema Nacional de Investigadoras e Investigadores (SNII) por el apoyo económico otorgado a J.H.E.-L.; A.S.-D.; A.C.-M.; M.A.F.-M.; L.E.R.-T.; J.G.G.-S.; A.J.M.-D.; D.G.Z.-T.; R.A.P.-H. y U.C.-V.

### REFERENCIAS

- Abdelsalam, A. M., Somaida, A., Ayoub, A. M., Alsharif, F. M., Preis, E., Wojcik, M., & Bakowsky, U. (2021). Surface-tailored zein nanoparticles: Strategies and applications. *Pharmaceutics*, 13(9), 1–25. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091354>
- Brierley, D. I., Samuels, J., Duncan, M., Whalley, B. J., & Williams, C. M. (2016). Cannabigerol is a novel, well-tolerated appetite stimulant in pre-satiated rats. *Psychopharmacology*, 233(19–20), 3603–3613. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4397-4>
- Cai, Z., Wang, S., & Li, J. (2021). Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Frontiers in Medicine*, 8(December), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.765474>
- Cárdenas-Noriega, K. A., Elizondo-Luévano, J. H., Chávez-Montes, A., Rodríguez-Tovar, L. E., Franco-Molina, M. A., Zárate-Triviño, D. G., Pérez-Hernández, R. A., Soto-Domínguez, A., & Castillo-Velázquez, U. (2026). Nanoencapsulated Cannabidiol–Cannabigerol Using Eudragit L100: In Vitro and In Vivo Evidence in Murine Colitis Model. *Drugs and Drug Candidates*, 5(1), 10. <https://doi.org/10.3390/ddc5010010>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. In *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Ding, X., Hu, X., Chen, Y., Xie, J., Ying, M., Wang, Y., & Yu, Q. (2021). Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 107(November), 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.015>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 139–154. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0034>
- Kok, L. Y., Bannigan, P., Sanaee, F., Evans, J. C., Dunne, M., Regenold, M., Ahmed, L., Dubins, D., & Allen, C. (2022). Development and pharmacokinetic evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system for the oral delivery of cannabidiol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168(November 2021), 106058. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106058>
- Lian, J., Casari, I., & Falasca, M. (2022). Modulatory role of the endocannabinoidome in the pathophysiology of the gastrointestinal tract. *Pharmacological Research*, 175(December 2021), 106025. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106025>
- Lopez-Escalera, S., & Wellejus, A. (2022). Evaluation of Caco-2 and human intestinal epithelial cells as in vitro models of colonic and small intestinal integrity. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 31(July), 101314. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101314>
- Lu, Q., Yang, M. F., Liang, Y. J., Xu, J., Xu, H. M., Nie, Y. Q., Wang, L. S., Yao, J., & Li, D. F.

- (2022). Immunology of Inflammatory Bowel Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutics. *Journal of Inflammation Research*, 15(March), 1825–1844. <https://doi.org/10.2147/JIR.S353038>
- Saez, A., Herrero-Fernandez, B., Gomez-Bris, R., Sánchez-Martinez, H., & Gonzalez-Granado, J. M. (2023). Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021526>
- Seyedian, S. S., Nokhostin, F., & Malamir, M. D. (2019). A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *Journal of Medicine and Life*, 12(2), 113–122. <https://doi.org/10.25122/jml-2018-0075>
- Wallace, S. J., Li, J., Nation, R. L., & Boyd, B. J. (2012). Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug Delivery and Translational Research*, 2(4), 284–292. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0064-4>
- Wang, C., Cui, B., Sun, Y., Wang, C., & Guo, M. (2022). Preparation, stability, antioxidative property and in vitro release of cannabidiol (CBD) in zein-whey protein composite nanoparticles. *Lwt*, 162(April), 113466. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113466>