



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DEL ÁCIDO GLICIRRICÍNICO
FORMULADO EN SISTEMAS SUBMICRÓNICOS CONTRA EL VIRUS DE PRRS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
MARÍA ZAIDA URBÁN MORLÁN

TUTOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR:
DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DR. HUMBERTO MENDOZA RAMÍREZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CUAUTITLÁN, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatoria

- ❖ A Bastian Adriel, porque eres mi inspiración
- ❖ A mi mamá Judith, por el amor y apoyo incondicional
- ❖ A Oscar, por estar a mi lado e impulsarme durante todo este proyecto. Por el amor, comprensión y paciencia brindados.

Agradecimientos

- ❖ Al Dr. David Quintanar Guerrero, ¡la última y nos vamos Doc! Estoy muy agradecida por darme la oportunidad de trabajar con usted ahora en este proyecto de doctorado, gracias por su confianza y por su amistad en todo este tiempo.
- ❖ A la Dra. Susana Mendoza Elvira, por la oportunidad que me dio, por su amistad, consejos y pláticas, y por ser una gran persona profesional y personalmente hablando.
- ❖ Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza, por sus recomendaciones, apoyo y disposición para realizar este trabajo.
- ❖ Al jurado por las valiosas observaciones y comentarios hechos a esta tesis, así como por el tiempo dedicado y su disposición.
- ❖ Al MVZ, MM, Cert. Jesús Horacio Lara Puente, Gerente de Investigación y Desarrollo, Línea Porcícola y al MVZ, EPA, Francisco Quezada, ambos del Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V., por el apoyo con las donaciones de material biológico y disposición para la realización de este proyecto.
- ❖ A la M. en C. Rocío Lara Romero y el Dr. Francisco Rivera Benítez por sus comentarios tan acertados y apoyo.
- ❖ A la M. en C. María del Rosario López García por su amistad, consejos y apoyo incondicional, así como por los momentos que hicieron grata la estancia en el laboratorio y fuera de él.
- ❖ Al M. en C. Ángel Jiménez García de León, por su valiosa amistad y apoyo incondicional.
- ❖ A todos los compañeros, amigos y personal de los laboratorios de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, y de Microbiología y Virología de las Enfermedades Respiratorias del cerdo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, por compartir sus experiencias, conocimientos, amistad y momentos agradables.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este estudio.
- ❖ A la Familia Vázquez Valadez, porque su apoyo sobretodo en la última etapa de esta tesis fue crucial para verla concluida; agradezco también su motivación y cariño.
- ❖ A la Familia Morlán Casas (tías, tíos, primas y primos); si menciono a cada uno sería una lista extensa ¡gracias a ustedes!, por todo el amor y apoyo incondicional, ahora y siempre. Con su cariño y palabras de aliento hacen que lo difícil parezca fácil.
- ❖ A todos mis amigos que siempre han estado al pendiente del avance de este proyecto y que con sus consejos me impulsaron a concluirlo.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| Resumen del proyecto | i |
| Summary | ii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Situación socioeconómica del consumo de carne de cerdo | 1 |
| 1.2. Enfermedad de PRRS (Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino).... | 2 |
| 1.2.1. Epidemiología..... | 2 |
| 1.2.2. Etiología..... | 3 |
| 1.2.3. Patogenia | 5 |
| 1.2.4. Signos clínicos | 6 |
| 1.2.5. Transmisión | 8 |
| 1.2.6. Diagnóstico | 10 |
| 1.2.7. Tratamiento..... | 14 |
| 1.2.8. Vacunación | 15 |
| 1.3. Ácido glicirricínico (AG)..... | 15 |
| 1.3.1. Generalidades | 15 |
| 1.3.2. Antecedentes..... | 16 |
| 1.3.3. Uso antiviral | 17 |
| 1.4. Sistemas terapéuticos aplicados a veterinaria | 19 |
| 1.5. Administración pulmonar de fármacos | 20 |
| 1.6. Acarreadores nanoparticulados..... | 22 |
| 1.6.1. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)..... | 23 |
| 1.6.2. Método de la microemulsión para obtener SLN | 25 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 28 |
| 4. OBJETIVOS..... | 28 |
| 4.1. Objetivo general | 28 |
| 4.2. Objetivos particulares | 28 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 29 |
| 5.1. Soluciones de AG | 29 |
| 5.2. Virus y células..... | 29 |
| 5.3. Titulación viral..... | 29 |
| 5.4. Prueba de citotoxicidad | 30 |
| 5.5. Prueba de actividad antiviral | 30 |
| 5.6. Preparación de SLN por el método de enfriamiento de microemulsión..... | 31 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.7. | Caracterización de las SLN..... | 32 |
| 5.7.1. | Determinación del tamaño de partícula promedio (TPP)..... | 32 |
| 5.7.2. | Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler (potencial Z, ψ_z) 33 | |
| 5.7.3. | Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)..... | 33 |
| 5.7.4. | Calorimetría Diferencial de Barrido..... | 33 |
| 5.8. | Evaluación del efecto de SLN con y sin AG sobre células infectadas..... | 34 |
| 5.9. | Tinción de exclusión de azul de tripán..... | 34 |
| 5.10. | Prueba de MTT..... | 34 |
| 5.11. | Análisis estadístico..... | 35 |
| 6. | RESULTADOS..... | 36 |
| 6.1. | Titulación viral..... | 36 |
| 6.2. | Citotoxicidad del Ácido Glicirricínico..... | 36 |
| 6.3. | Efecto inhibitorio de las soluciones de AG aplicadas a células infectadas con PRRS..... | 38 |
| 6.4. | Preparación de SLN por el método de enfriamiento de microemulsión..... | 40 |
| 6.5. | Caracterización de las SLN..... | 41 |
| 6.5.1. | Determinación del TPP por DLS..... | 41 |
| 6.5.2. | Potencial Z, ψ_z | 42 |
| 6.5.3. | Microscopia Electrónica de Barrido..... | 42 |
| 6.5.4. | Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para evaluar la estabilidad a corto plazo de las SLN..... | 43 |
| 6.5.5. | Evaluación del efecto de SLN con AG sobre células infectadas..... | 45 |
| 7. | DISCUSIÓN..... | 48 |
| 8. | CONCLUSIONES..... | 54 |
| | Perspectivas..... | 55 |
| | Artículo aceptado para publicación..... | 56 |
| 9. | REFERENCIAS..... | 82 |
| 10. | ANEXOS..... | 90 |
| | Anexo A. Propiedades del ácido glicirricínico (sal de amonio)..... | 90 |
| | Anexo B. Propiedades de Gelucire® 44/14..... | 91 |
| | Anexo C. Propiedades del estabilizante: Pluronic® 127 (Poloxamero 407)..... | 92 |
| | Anexo D. Datos y pruebas estadísticas para evaluar actividad biológica de AG..... | 93 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura del virus de PRRS; N: nucleocápside, M: proteína de membrana, E: glicoproteína mayoritaria de la envoltura, GP: otras glicoproteínas asociadas a membrana (productos de ORF2, 3 ó 4), bicapa lipídica: envoltura viral, AAA: banda poliadenilada..... | 4 |
| Figura 2. Estructura química de la molécula del Ácido glicirricínico. | 16 |
| Figura 3. Anatomía pulmonar y del árbol traqueobronquial del cerdo, vista dorsal..... | 21 |
| Figura 4. Nanopartículas convencionales: A) nanoesfera, B) nanocápsula..... | 23 |
| Figura 5. Proceso de elaboración de SLN por el método de enfriamiento de una microemulsión..... | 32 |
| Figura 6. Viabilidad celular obtenida por el ensayo de MTT después del tratamiento con soluciones de AG (0.1-0.9 mg/ml). A) absorbancia como función de la concentración de AG. B) Viabilidad celular expresada como porcentaje del control. La citotoxicidad: se evaluó después de 144 h de exposición al AG. Los resultados se presentan como media \pm error estándar; n= 5; *p <0.05 vs controles (Prueba de Tukey)..... | 37 |
| Figura 7. Tinción de exclusión de azul de tripán para evaluar citotoxicidad a las 48 y 144 h post-exposición con AG. A-C, 48 h (sin tinción como comparación representativa): A. células sin tratamiento con AG; B. células tratadas con AG 0.5 mg/ml; C. células tratadas con AG 0.9 mg/ml. D-F, 144 h (después de tinción): D. células sin tratamiento con AG, E. células tratadas con AG 0.5 mg/ml; F. células tratadas con AG 0.9 mg/ml. | 38 |
| Figura 8. Curva concentración-respuesta de la actividad de AG sobre células infectadas con virus de PRRS y tras la exposición a diferentes concentraciones de AG (0.1-0.9 mg/ml) a las 72 h. La inhibición del ECP se evaluó por la técnica de Reed y Muench..... | 39 |
| Figura 9. Inhibición del ECP por el método de Reed y Muench a las 72 h. Las células cultivadas se infectaron con concentraciones variables de PRRS y después se trataron con AG a diferentes concentraciones (0.1-0.9 mg/ml). La gráfica muestra los resultados de células sin tratamiento de AG (control) y de células con tratamiento.. | 40 |
| Figura 10. Micrografías de SLN de Gelucire®. SLN a t= 0 (A), y a t= 15 días (B). La barra representa 1 μ m o 0.5 μ m según lo especificado..... | 43 |
| Figura 11. Termogramas de la materia prima y lotes de SLN con y sin AG obtenidos mediante la técnica de DSC. Todas las muestras se analizaron en un intervalo de 0 a 280 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Es notorio que la presencia del fármaco modifica la estructura de la NP por interacciones que se generan entre los componentes..... | 44 |
| Figura 12. Viabilidad celular obtenida por el ensayo de MTT después del tratamiento con SLN que tienen AG. La citotoxicidad: se evaluó después de 72 h de exposición en células previamente infectadas. Los resultados se presentan como media \pm error estándar; n= 3.. | 46 |

Figura 13. Micrografías de células control (A); células tratadas con SLN y simultáneamente infectadas con PRRS (1×10^5 TCID₅₀/ml), se observan estructuras tipo aguja (B); células tratadas con SLN después de 72 h de exposición (C). 47

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Características físicas y químicas del virus PRRS. | 4 |
| Tabla 2. Signos clínicos asociados al PRRS en cerdos de diferentes edades y sexo. | 7 |
| Tabla 3. Tratamientos más comunes para el PRRS. | 14 |
| Tabla 4. Lotes con cantidades variables de AG para determinar la formación de SLN. ... | 40 |
| Tabla 5. Tamaño de partícula promedio y potencial Z de las SLN con y sin AG. Estas mediciones se realizaron una vez lavadas las SLN para evaluar su estabilidad.. | 42 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| AG | Ácido glicirricínico. |
| CC50 | Concentración citotóxica de fármaco que reduce la viabilidad al 50%. |
| DICC ₅₀ /ml | Dosis infecciosa 50% de cultivo celular. |
| DSC | Calorimetría diferencial de barrido. |
| EC50 | Concentración efectiva de fármaco requerida para inhibir el efecto citopático al 50% del valor control. |
| IP | Índice de polidispersidad. |
| IS | Índice de selectividad. |
| MEB | Microscopia electrónica de barrido. |
| MTT | bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio. |
| nm | Nanómetro. |
| NPs | Nanopartículas. |
| ORF | Marco de lectura abierta. |
| PRRS | Síndrome Porcino Reproductivo y Respiratorio (por las siglas en inglés de <i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome</i>). |
| PRRSv | Virus del Síndrome Porcino Reproductivo y Respiratorio. |
| SLN | Nanopartículas lipídicas sólidas. |
| TAT | Tinción de azul de tripán. |
| TCID ₅₀ | 50% de dosis infecciosa en cultivo de tejidos. |
| TPP | Tamaño de partícula promedio. |

Resumen del proyecto

El Síndrome Porcino Reproductivo y Respiratorio (PRRS) es causado por un virus y provoca enormes pérdidas económicas para los productores de carne de cerdo a nivel mundial, pues en la actualidad no existe tratamiento alguno contra este virus. El ácido glicirricínico (AG) ha sido usado por miles de años en la medicina tradicional de varias culturas por sus diversas actividades terapéuticas, pero a partir de los años 80 uno de los usos más importantes que se ha estudiado es como antiviral.

En esta investigación, se evaluó la citotoxicidad de soluciones de AG sobre células MARC-145 a diferentes concentraciones. Mediante el ensayo de MTT y la tinción de azul de tripán (TAT) se evaluó la viabilidad celular y se obtuvo la concentración que reduce la viabilidad celular al 50% (CC_{50}) de 4.2 mg/ml. Se evaluó el efecto antiviral del AG mediante el ensayo de inhibición citopática; y se determinó la concentración que inhibe el efecto citopático al 50% (EC_{50}) siendo esta de 0.48 mg/ml. Una prueba confirmatoria indicó que el AG inhibió el efecto citopático del virus sobre el cultivo celular.

Después se desarrolló una formulación farmacéutica a base de nanopartículas que incluyera el AG. Se prepararon nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) por el método de enfriamiento de una microemulsión. La caracterización y estabilidad de la formulación se evaluó mediante diferentes técnicas. La formulación óptima, fue aplicada a células MARC 145 (infectadas o no infectadas) y se encontró que no hubo un efecto contundente en la inhibición de la replicación viral, ya que mediante el ensayo de MTT se determinó un aparente aumento de la viabilidad celular; mientras que con la TAT la viabilidad celular disminuyó significativamente. De esta manera, este estudio representa una buena oportunidad de generar nuevas alternativas de tratamiento contra PRRSv; ya que es la primera vez que este activo es evaluado en solución acuosa e incluido en una formulación farmacéutica para inhibir su replicación.

Summary

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is caused by a virus and elicit enormous economic losses in hog-producing countries worldwide, because currently there is no efficient treatment against this virus.

Glycyrrhizinic acid (GA) has been used for years in traditional medicine of many cultures around the world because of its various therapeutic properties, but since late 80s its antiviral activity has been extensively studied.

In this research cytotoxicity of GA solutions at different concentrations on the MARC 145 cell line was evaluated. Cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion test and MTT; the cytotoxic concentration of GA that reduced cell viability to 50% (CC_{50}) was estimated 4.2 mg/ml. The antiviral activity of GA was assessed by inhibiting the cytopathic effect and the effective concentration of GA required to inhibit the cytopathic effect to 50% (EC_{50}) was calculated to be 0.48 mg/ml. A confirmatory test indicated that GA inhibited the cytopathic effect of PRRS virus on cell culture.

Then a pharmaceutical formulation based on nanoparticles with GA was developed. Solid lipid nanoparticles (SLN) were prepared by the microemulsion cooling method. Formulation characterization and stability were studied by different techniques. The optimal formulation was tested on MARC 145 cell line (infected or non-infected) to determine if cytotoxic effect or virus replication inhibition was developed. Results indicated that there was no clear effect of virus replication inhibition; with MTT an apparent increase of cell viability was observed; while the trypan blue dye exclusion test revealed that cell viability significantly decreased.

Thus, this research represents a good opportunity to generate new treatment alternatives against PRRSv, since it is the first time GA is evaluated in aqueous solution and included in a pharmaceutical form to inhibit its replication.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación socioeconómica del consumo de carne de cerdo

En la actualidad, la globalización ha llegado a todas las áreas productivas de la sociedad y el sector ganadero no es la excepción. En este sentido, el mercado de productos cárnicos ha experimentado cambios rápidos en respuesta a las presiones de la globalización y ha aumentado la demanda por carnes de manera rápida y permanente, sobre todo en países en vías de desarrollo. Sin embargo, la comercialización internacional de carnes se está ampliando mucho más rápidamente que la producción y esta última tiene el inconveniente constante de ser amenazada por problemas zoonosarios que puede requerir el cierre de fronteras de naciones importadoras, o la implementación de inspecciones minuciosas en las fronteras. Dado el continuo crecimiento que presenta la porcicultura, según reportes de la Confederación de Porcicultores Mexicanos hasta el primer cuatrimestre del 2015, un problema de cualquier índole de los mencionados arriba tendría gran impacto en el sector ganadero.

En el primer cuatrimestre del 2015, la producción de carne en canal ascendió a 1.31 mton; en este mismo periodo las exportaciones suman 22 mton. Con respecto al consumo per cápita, es de 16 kg/persona/año solo por debajo de la carne de res y pollo (16.3 y 32.1, respectivamente) (<http://www.porcimex.org/AvanceEstadistico1503.pdf>).

Para el 2018 se espera alcanzar 19 millones de cabezas de porcino. En el Escenario Base 2009-2018 elaborado por SAGARPA; se mencionó que para 2009 el consumo total de carne de cerdo en México ascendería a 1.61 m ton y que para el final del período de la proyección base llegará a 1.8 m ton. Para 2012, se calculó un consumo per cápita tan solo de carne de cerdo de aproximadamente 15 kg/habitante, y este consumo se prevé sea sostenido en todo el período del Escenario Base (<http://sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/EBespañol300909.pdf>)

Los cinco principales estados productores de carne de cerdo en canal son: Jalisco, Sonora, Puebla, Yucatán y Veracruz. El área porcícola nacional se concentra en pocos productores que reúnen las condiciones para disponer de explotaciones con infraestructura moderna, buen manejo reproductivo, adecuada nutrición del ganado y establecimiento de programas zoonosarios integrales que les confiere mayor productividad y competitividad.

Por lo anterior, la industria porcícola es de vital importancia económica para el país, cualquier eventualidad que ponga en riesgo la producción de carne (p. ej. el brote de una enfermedad conocida o desconocida) impactará gravemente a la población en general y la economía del país.

1.2. Enfermedad de PRRS (Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino)

1.2.1. Epidemiología

A finales de los años 80, aparecieron en distintas partes de Estados Unidos brotes de una enfermedad clínica desconocida hasta el momento.

En 1987 en Carolina del Norte, E.U., se describía una nueva enfermedad que en ese entonces se llamó “enfermedad misteriosa del cerdo”; sus signos clínicos incluían pérdidas reproductivas graves, extensa neumonía post-destete, reducción de las producciones y aumento de la mortalidad (Zimmerman, 2004).

En Europa, los brotes clínicos con signos similares a la enfermedad misteriosa del cerdo se reportaron en noviembre de 1990 cerca de Münster, Alemania. La enfermedad se extendió tan rápido que unos 3000 brotes fueron documentados en Alemania en mayo de 1991. En Holanda la enfermedad apareció en enero de 1991 y en Bélgica en marzo. En mayo de 1991 la enfermedad aparece en Gran Bretaña, y a finales de octubre de ese mismo año, un total de 58 brotes se habían confirmado (Meredith, 1995; Zimmerman, 2004; Yoo, Song, Sun; Du, Kim & Liu, 2010).

En España, los primeros focos de la enfermedad se observaron clínicamente a finales de 1990, en explotaciones de cerdas reproductoras próximas a granjas de cerdos de engorde importados de Alemania, confirmándose en una explotación de Huesca en enero de 1991 (Zimmerman, 2004).

Esta enfermedad recibió otros nombres, entre los que están: aborto epizootológico de las cerdas, aborto azul, enfermedad de la oreja azul, síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo (Meredith, 1995; Zimmerman, 2004).

Al inicio no se conocía el agente etiológico y algunos pensaban que era de origen bacteriano, otros que su origen era vírico. Fue en 1991, cuando Wensvoort aisló el virus causal en Holanda, que se denominó virus Lelystad. Muy poco tiempo después, el virus se aisló en los Estados Unidos y Canadá. Se demostró que ambos virus aislados, el europeo y americano, podían reproducir la enfermedad bajo condiciones experimentales.

Fue a principios de 1991 que investigadores europeos introdujeron la terminología “Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino” (PRRS).

Desde ese entonces la enfermedad se ha extendido rápidamente a la mayoría de los países productores europeos y asiáticos y finalmente a todos los continentes. Pocos países se consideran libres del PRRS, entre ellos Australia, Noruega, Suecia y Suiza.

En estudios epidemiológicos retrospectivos realizados en E.U., Canadá, Asia y Europa sobre bancos de sueros obtenidos en distintas explotaciones porcinas se ha demostrado que el virus está presente desde 1979 en Canadá, 1985 en E.U. y 1988 en Japón y Alemania.

En la actualidad se sabe que el virus sigue mutando, pues existen reportes de una nueva cepa americana identificada en EU y de otra de alta virulencia que apareció en China y se ha esparcido a países vecinos (Yoon, 2004).

1.2.2. Etiología

Como ya se mencionó anteriormente, el agente etiológico de la enfermedad es un virus con envoltura de tamaño pequeño, el cual se clasifica en la familia *Arteviridae*, género *Artevirus*, grupo Nidovirus (Meredith, 1995; Yoon, 2004; White, 1991).

Ejemplos de otros virus del género *Artevirus*, grupo de los nidovirus son: virus de la arteritis viral equina, virus de deshidrogenasa láctica elevada del ratón y virus de la enfermedad hemorrágica del simio.

En el campo existen variaciones en la agresividad del virus; no se sabe cuántas cepas hay, pero las variaciones antigénicas son considerables.

Características del virus

Las partículas maduras del PRRS tienen de 43-80 nm de diámetro, son esféricas y poseen una cápside icosaédrica de 20-30 nm, que engloba una molécula de ARN (White, 1991). Las características más importantes del virus y su estructura la observamos en el Tabla 1 y la Figura 1.

Tabla 1. Características físicas y químicas del virus PRRS.

| | |
|------------------------------|---|
| Tamaño de la partícula viral | 50-72 nm |
| Tamaño de la cápside | 20-30 nm |
| Densidad de flotación | 1.13-1.19 g/ml en gradiente de cloruro de cesio. 1.18-1.23 g/ml en gradiente de sacarosa. |
| Temperatura de estabilidad | -70°C y -20°C. A 4°C es estable mínimo por un mes. |
| pH de estabilidad | 6.5-7.5 |
| Inactivantes/desinfectantes | Sensible al tratamiento con cloroformo y éter. Soluciones con baja concentración de detergentes. Procedimientos de limpieza y desinfección habitual son suficientes para inactivar el virus. |

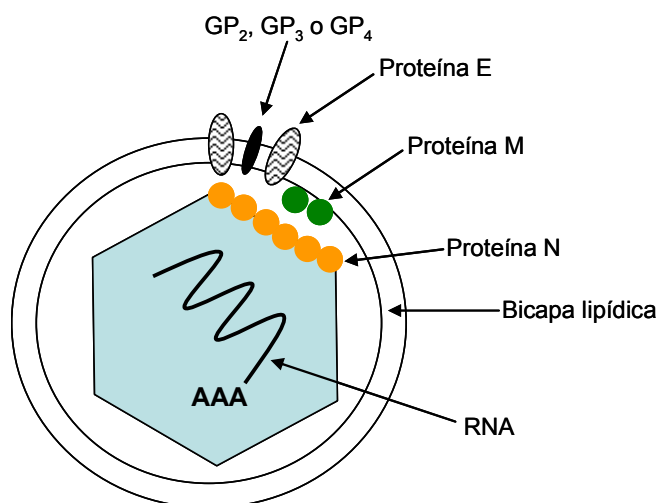


Figura 1. Estructura del virus de PRRS; N: nucleocápside, M: proteína de membrana, E: glicoproteína mayoritaria de la envoltura, GP: otras glicoproteínas asociadas a membrana (productos de ORF2, 3 ó 4), bicapa lipídica: envoltura viral, AAA:banda poliadenilada

El genoma del virus PRRS es una molécula de ARN lineal de cadena sencilla, poliadenilado y de polaridad positiva de aproximadamente 15 kb.

Contiene 9 marcos de lectura abierta (ORFs). La ORF1a y ORF1b representan aproximadamente el 75% del genoma del virus y codifican para proteínas no estructurales (Nsp 1 α , Nsp 1 β , Nsp2-Nsp12) con actividad en la replicación del RNA y en la transcripción (Yoo *et al.*, 2010).

Las ORF2a, ORF2b, y de la ORF3 a la ORF7 codifican para siete proteínas estructurales: glicoproteína 2 (GP2), de envoltura (E), GP3, GP4, GP5, membrana (M) y nucleocápside (N), respectivamente.

1.2.3. Patogenia

El mecanismo de patogénesis de la enfermedad propuesto indica que el periodo de incubación es variable ya que puede ser desde 3 días a varias semanas y se ha observado que es dependiente de la edad de los animales (Meredith, 1995; Zimmerman, 2004; White, 1991; Yoo *et al.*, 2010).

El virus infecta a cerdos de todas las edades; se replica en el citoplasma de células del sistema mononuclear fagocítico (monocitos y macrófagos alveolares porcinos, PAM) donde origina un efecto citopático en las células infectadas. El virus producido en macrófagos alveolares alcanza títulos entre 10^5 y 10^6 DICC₅₀/ml (dosis infectiva 50% de cultivo celular). Se ha demostrado la replicación del PRRS en líneas celulares como la MA-104, de riñón de mono verde africano y su clon, altamente permisivo, MARC-145, así como también en líneas patentadas como la ATCC CL2621 y CRL-11171.

El virus de PRRS se internaliza en las células blanco mediante endocitosis mediada por receptor. En la actualidad, se han propuesto o identificado algunos receptores celulares, co-receptores o mediadores para PRRS. Se ha demostrado que el sulfato de heparina, la sialoadhesina porcina (PoSn) y el receptor *scavenger* (“limpiador”) CD163 son relevantes para las funciones de unión, internalización y pérdida de envoltura del virus, respectivamente (Darwich, Díaz, & Mateu, 2010). Cabe mencionar que las células MARC expresan el CD163 pero no la sialoadhesina; por lo que se ha sugerido que la vimetina de simio podría jugar el papel de la PoSn en esta línea celular.

La replicación del virus produce un grupo anidado de siete RNAm subgenómicos en el extremo 3' coterminar. Cada RNAm subgenómico codifica para una proteína vírica, por ejemplo: N, M, E, GP₄, GP₃, GP₂ y la RNA replicasa. La RNA polimerasa es la única proteína no estructural que se ha identificado hasta la fecha y participa en la replicación del genoma vírico.

Como se mencionó anteriormente, los antígenos víricos que se forman se encuentran exclusivamente en el citoplasma de las células infectadas y pueden detectarse a las seis horas del inicio de la infección. La nucleocápside obtiene una envoltura al brotar por la membrana del retículo endoplásmico. Los viriones con envoltura se acumulan principalmente en el retículo endoplásmico causando su ensanchamiento. También a las

4 horas de iniciada la infección, las mitocondrias sufren disrupción y hay formación de vesículas de doble membrana (Yoon, 2004).

Los virus de la progenie se liberan inicialmente por lisis celular. El virus alcanza su máximo de infectividad a las 24-48 horas tras el inicio de la infección y puede mantenerse de 60 a 70 horas tras la inoculación. El típico efecto citopático del PRRS en una línea continua consiste en el redondeamiento de las células y en la formación de células que presentan picnosis y se despegan de la monocapa a los 2-4 días después de la inoculación.

A pesar de los importantes avances con respecto al estudio de la replicación de este virus, no está del todo claro cómo el PRRS entra en el cerdo y dónde tiene lugar la replicación inicial. De acuerdo a Yoon (2004), el modelo propuesto indica que el virus entra a través de la mucosa nasal y/o el epitelio del tracto respiratorio superior. Se cree que la replicación primaria tiene lugar en la mucosa nasal, en los macrófagos del aparato respiratorio y/o en los tejidos linfoides. Tras esta primera replicación, el virus se disemina a través de la sangre (viremia) hasta los lugares secundarios de replicación (pulmón, corazón, timo, vasos sanguíneos, bazo).

Finalmente la infección y diseminación del virus producen los síntomas y lesiones características: neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis, linfadenopatías, entre otros; en mayor o menor grado, dependiendo de la virulencia del virus (Meredith, 1995; Yoo *et al.*, 2010; White, 1991).

La viremia en los animales jóvenes puede durar más de un mes y es entonces que el virus puede llegar a distintos órganos como corazón, hígado, riñones, cerebro, pulmón, nódulos linfáticos peribronquiales, timo, amígdalas, médula ósea y especialmente bazo. En hembras gestantes el virus puede atravesar la placenta y producir la muerte de los fetos especialmente cuando la infección sucede en el último tercio de la gestación. El virus también se multiplica en los fetos sin producir la muerte de estos.

1.2.4. Signos clínicos

En la Tabla 2 se muestran los principales efectos que tiene el virus PRRS sobre animales de diferentes edades y sexo.

Tabla 2. Signos clínicos asociados al PRRS en cerdos de diferentes edades y sexo.

| Hembras | Machos | Lechones lactantes | Lechones destetados y de engorde |
|--|----------------------------------|------------------------------------|---|
| Anorexia | Postración | Crecimiento retrasado | Disnea, taquipnea |
| Postración | Depresión | Estornudos | Infecciones víricas o bacterianas secundarias |
| Fiebre (1-7 días) | Reducción en el volumen de semen | Conjuntivitis | Cambios en la piel: orejas azules |
| Dificultad para respirar | | Alta mortalidad | Tasa de crecimiento reducida |
| Retraso del estro | | Quemosis grave (edema en párpados) | Incoordinación (patas abiertas) |
| Abortos | | Disnea | |
| Partos adelantados | | | |
| Nacidos momificados, muertos o débiles | | | |

Los signos clínicos se han clasificado en dos grupos principales: los asociados al sistema reproductivo y los asociados al respiratorio (Prieto & Castro, 1998). En el primero se incluye: nacimientos prematuros, abortos de periodos retrasados, cerdos que nacen débiles y aumenta el número de lechones muertos en los nacimientos y momificados. Mientras que en el segundo diversas afecciones respiratorias (disnea, taquipnea, tos, estornudo) tienen gran relevancia sobretodo en cerdos neonatales aunque también se observan en cerdos de todas las edades. En el segundo, las afecciones respiratorias, tienen gran importancia; sobre todo en cerdos neonatales, en los que existe disnea como mayor característica, es usualmente que ocurra en cerdos de 3 semanas de edad pero también puede ocurrir en cualquier edad.

Una vez que el virus se introduce en las granjas comerciales, estas permanecen infectadas de forma endémica y presentan pérdidas crónicas o brotes periódicos de forma indefinida. El principal problema con este virus es su capacidad de impedir la respuesta inmune y de establecer una infección persistente.

Los signos clínicos de PRRS varían considerablemente debido a varias causas; incluyendo diferencias en la susceptibilidad del hato, los factores ambientales, el estado

inmune, la cepa del virus; así como su combinación con otros virus que afecten a los cerdos (Le Potier, Blanquefort, Morvan & Albina, 1997).

Se han observado diferencias en cuanto a la virulencia de diferentes aislados de PRRS, incluso en un mismo grupo; sin embargo, es muy similar el tropismo hacia los distintos tejidos así como su distribución de antígenos y del ácido nucléico viral. También existen ciertas infecciones secundarias asociadas que aparecen durante los episodios de PRRS, entre ellas están las producidas por: *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella choleraesuis*, *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*; además otras producidas por virus como: el de la encefalomiocarditis, Aujeszky, coronavirus respiratorio, paramixovirus, entre otros.

1.2.5. Transmisión

El virus de PRRS se ha caracterizado por ser un virus altamente infeccioso pero no altamente transmisible, es decir, la dosis mínima infectiva es baja, pero el contacto con animales infecciosos o fomites contaminados con virus a menudo no resulta en transmisión.

La exposición por vía intranasal o intramuscular a unas 10 partículas víricas o menos de PRRS es eficiente para producir la infección (White, 1991).

Este virus se transmite frecuentemente por alguna de las siguientes vías:

- a) contacto directo entre cerdos enfermos y sanos
- b) movimiento de cerdos entre granjas
- c) vía transplacentaria de la madre al feto
- d) por semen contaminado
- e) fomites

Se ha estimado que se requiere una dosis de 10 a 100 TCID₅₀/ml de semen para conseguir la infección por inseminación artificial. No se conoce la dosis infectiva necesaria para producir la infección por exposición oral.

El virus se puede eliminar principalmente por saliva, orina, semen y secreciones mamarias; en las heces no es siempre posible aislar el virus. Se ha demostrado que el virus está presente en la saliva durante unos 42 días post-inoculación (PI), en secreciones nasales más de 21 días PI, en orina por encima de 28 días PI, en el semen más de 92 días PI y en orofaringe por encima de los 157 días PI (Le Potier *et al.*, 1997). Existen

evidencias controvertidas sobre la diseminación fecal, pero el virus es altamente lábil y si el virus de PRRS estuviera en las heces, se inactivaría rápidamente.

Generalmente no persiste en el medio ambiente o no se encuentra en los materiales habituales de la granja. Estudios al respecto han indicado que se inactiva en plástico, acero, caucho, alfalfa, madera, paja, maíz, pienso de iniciación para cerdos y tela de algodón (White, 1991).

Además el virus tiene un estrecho margen de tolerancia en los fluidos y se inactiva en soluciones (orines y estiércol líquido). Sin embargo, el PRRSv suspendido en soluciones acuosas de pH neutro en condiciones de refrigeración o congelación puede permanecer infectivo durante períodos prolongados. El virus infectivo puede permanecer en el agua limpia estancada, por ejemplo cubos de bebida, bebederos, charcos o lagunas. El PRRSv es fácilmente inactivado por los desinfectantes habituales, por lo que la limpieza y la desinfección son suficientes para inactivar el PRRSv en las instalaciones y en los equipamientos.

Dentro de un rebaño, el virus se perpetúa por el ciclo de transmisión a partir de las madres a los cerdos, ya sea desde el útero o post-parto, o por animales susceptibles introducidos al rebaño junto con animales infectados en los últimos estadios de producción. En cerdos neonatos, los anticuerpos maternos podrían ofrecer algún tipo de resistencia inmunológica frente a la infección. No obstante, el grado de protección no está bien caracterizado y parece ser insuficiente para impedir la infección.

La principal forma de transmisión entre rebaños es la introducción de animales infectados. Pero frecuentemente la transmisión se observa demasiado tarde y esto imposibilita la determinación de la fuente del virus de forma exacta. La diseminación aerógena es un mecanismo de transmisión del virus entre rebaños en ausencia de movimientos de cerdos u otras fuentes de introducción del virus. Tiene gran relevancia debido a que muchos rebaños negativos a PRRS se han infectado por esta vía, inclusive en casos donde los rebaños estaban relativamente bien aislados.

La diseminación aerógena ocurre generalmente a distancias más cortas de las que se creyó al principio. En un estudio se reportó que el 45% de los rebaños que se sospechaba se habían infectado a través de la diseminación aerógena lo había hecho de explotaciones que se encontraban en un radio de 500 metros y sólo el 2% estaban a 1 km del brote inicial (Yoon & Stevenson, 2004).

Se han realizado estudios para verificar la existencia de PRRS en carnes comercializadas, pero los resultados indican que no hay cantidades detectables por lo que es poco probable la transmisión del virus a través de la carne.

1.2.6. Diagnóstico

Debido a que las manifestaciones clínicas del PRRSv son variables por la existencia de muchos factores, es difícil hacer un correcto diagnóstico de la enfermedad. La amplia diversidad antigénica del PRRSv es uno de los principales obstáculos para el desarrollo de técnicas efectivas de diagnóstico, de vacunas y de estrategias de vacunación. Sin embargo, pueden establecerse algunas generalidades, la más importante es que se debe sospechar de la enfermedad cuando existen signos clínicos de enfermedad respiratoria y/o insuficiencia reproductiva y/o bajo rendimiento productivo.

Además los registros que se tienen sobre los efectos de esta enfermedad resultan muy útiles para el diagnóstico, pues se ha observado que existe:

- a) incremento de abortos: >20%
- b) incremento de partos prematuros: >5%
- c) disminución de nacidos vivos: >5-10%
- d) aumento de mortalidad pre-destete: >30%
- e) disminución de fertilidad: >10%

(datos de aumento o descenso en relación a los valores normales de cada explotación).

El PRRSv se encuentra muy difundido entre la población porcina mundial y son muchas las explotaciones que actualmente son serológicamente positivas, por infecciones anteriores con aislados de campo o programas de vacunación.

Para el caso de explotaciones que poseen un historial previo de serología positiva el diagnóstico de la enfermedad debe hacerse tomando en cuenta distintos parámetros como los índices de producción, la presencia de sintomatología, cuadro clínico de lesiones y la detección del virus. La ausencia de síntomas clínicos no significa que la explotación esté libre del virus (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*, 2010).

a) *Detección de antígenos víricos*

La inmunofluorescencia en secciones de tejido congelado (FA) y la inmunohistoquímica (IHC), son las pruebas de diagnóstico que normalmente se usan para detectar los antígenos de PRRSv en tejidos. Se han desarrollado dos tipos de pruebas inmunohistoquímicas: la prueba de inmunoperoxidasa y la inmunotinción de plata. La IHC es más sensible que la fluorescencia directa (FA) de tejidos congelados, pero es cara y más tardada (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*, 2010).

b) *Detección de material genómico vírico*

Se han desarrollado reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar ARN del PRRSv en muestras clínicas. Como principio general, las pruebas basadas en PCR se considera que tienen una alta sensibilidad y especificidad. Con el uso de *primers* específicos del marco de lectura abierta 7 (ORF7), se han desarrollado diferentes ensayos de transcripción inversa/reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que permite detectar el RNA vírico en suero, células infectadas y tejidos homogenizados de cerdos infectados.

La RT-PCR es útil para la detección del RNA vírico en muestras como semen o heces, que son citotóxicas en los cultivos celulares o que no pueden ser evaluadas por otros métodos. De hecho, la principal aplicación de la RT-PCR con el PRRS es la detección del virus en el semen de verraco.

La RT-PCR es muy cara con relación a otras técnicas de diagnóstico, por eso no se usa como técnica de elección en el diagnóstico de rutina. Adicionalmente, un resultado positivo de la RT-PCR evidencia la presencia de RNA vírico y no indica necesariamente la presencia de PRRSv infeccioso (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*, 2010).

c) *Detección de anticuerpos séricos*

Para la detección de anticuerpos específicos del PRRSv se ha utilizado la inmunofluorescencia indirecta (IFA), la seroneutralización vírica (SNV), la inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) y ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). La IFA, SNV y ELISA son pruebas comunes en los laboratorios de Estados Unidos, mientras que la IPMA se emplea más en Europa. Se considera que la IFA tiene

una especificidad alta (99.5%) pero se desconoce su sensibilidad individual. La IFA detecta de forma fiable anticuerpos específicos del PRRSV de dos a tres meses después de la infección. Mediante la IPMA los anticuerpos se detectan entre los 7 y 15 días después del inicio de la infección; y al igual que IFA detecta anticuerpos específicos del PRRSV de manera confiable de dos o tres meses tras la infección.

La prueba de ELISA ha resultado ser específica y sensible, pero tiene la desventaja de que en su fase de desarrollo presenta un color de fondo inaceptable en algunos cerdos negativos. Entre las ventajas de la ELISA comercial se encuentran: detección de anticuerpos contra cepas del PRRSV norteamericanas y europeas, rapidez en la obtención de resultados y autorización del gobierno de Canadá y Estados Unidos.

La SNV también es específica pero es menos sensible que la IFA y el ELISA. La falta de sensibilidad de la SNV se debe principalmente a que los anticuerpos neutralizantes del PRRSV se desarrollan 1 ó 2 meses después de la infección.

d) Otras pruebas de importancia virológica

- *Cultivo celular*

La evaluación de la citotoxicidad de cualquier molécula candidata a emplearse como fármaco se realiza en cultivos celulares, para que de una forma relativamente sencilla quede demostrado que este no causa ni toxicidad aguda o crónica al huésped. En el caso de productos antivirales, estos deben ser específicos hacia los procesos del virus con pocos o ningún efecto sobre el metabolismo celular.

La citotoxicidad de compuestos en cultivo celular se estudia mediante métodos *in vitro* tales como aceptación de un colorante por células muertas después de la ruptura de la barrera celular de permeabilidad o función mitocondrial, ambos evalúan la viabilidad celular.

Otro aspecto importante a revisar en ensayos de citotoxicidad, son los cambios morfológicos de las células observados con microscopio.

- *MTT*

Una de las pruebas de rutina para medir la toxicidad y proliferación celular de un compuesto en todos los laboratorios del mundo es el ensayo colorimétrico de MTT. El MTT (también conocido como azul de tiazol) es una sal de tetrazolio soluble en agua que presenta color amarillo (Mosmann, 1983).

El ensayo de MTT se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células vivas para transformar la sal de MTT tetrazolio (de color amarillo) en un producto de color púrpura (MTT formazán). La intensidad del color púrpura es proporcional al número de células vivas presentes por lo que esta prueba es cuantitativa. La absorbancia del colorante se mide a una longitud de onda de 570 nm o a la longitud más cercana (Gerlier & Thomasset, 1986).

- *Tinción de exclusión con Azul de tripán*

Esta prueba evalúa la viabilidad celular ya que células muertas, cuya membrana celular es permeable, dejan pasar al colorante que es fácilmente detectable bajo el microscopio; las células vivas con la membrana celular intacta no permiten ingresar al compuesto colorido, de ahí el nombre de método de tinción por exclusión. El conteo de células viables se hace con ayuda de una cámara de Neubauer.

- *Titulación viral*

Esta técnica sirve para determinar la cantidad más pequeña (unidad infecciosa) de suspensión viral que produce una enfermedad, lesión u otro efecto reconocible en el hospedero; o sea, considera la actividad biológica de las partículas virales. La respuesta se mide como porcentaje de efecto, mientras que la dosis se expresa como dilución de la muestra viral. La dilución puede ser de factores de 10, 5 ó 2, entre más pequeño el factor el título será más preciso.

Al evaluar la actividad biológica de un virus se observan efectos en el hospedero, tal como el efecto citopático que se presenta en cultivos celulares. Se deben realizar más de una réplica en el hospedero elegido (cultivos celulares, huevos embrionados, animales); cada réplica recibe el nombre de unidad de prueba.

La titulación es normalmente expresada como el recíproco de la dilución más alta del virus el cual causa una reacción específica en 50% del material inoculado con, o expuesta a, la dilución de material infeccioso. Cuando el sistema indicador del efecto viral son cultivos celulares, la titulación se expresa como el 50% de dosis infecciosa en cultivo de tejidos (TCID₅₀). Si se utilizan animales o embriones para experimentos con la muerte como criterio, la dosis letal al 50% de los inoculados se expresa como LD₅₀.

El método de Reed y Muench es ampliamente utilizado para calcular el punto de actividad viral (título); se necesita hacer una interpolación matemática para definir la dilución exacta

correspondiente al 50% del efecto buscado, ya que generalmente este porcentaje no coincide con las diluciones de trabajo, para ello el método más empleado es el de Reed y Muench. Este método se basa en la suposición de que el número de unidades de prueba afectadas varía proporcionalmente al log10 de la dilución, es decir, a diluciones menores (mayor concentración de virus) el porcentaje de efecto será mayor que a diluciones mayores (menor concentración de virus). En el cálculo del título por este método, se acumulan los reactores y no reactores (en el rango total de dilución); todos los inoculados y los titulados son considerados en lugar de solo aquellos en las diluciones cercanas al punto final, de ahí su importancia y utilidad (Mendoza-Elvira, Alvarado-Nava, Hernández-Baumgarten & Ciprián-Carrasco, 2008).

1.2.7. Tratamiento

No hay un tratamiento específico para esta enfermedad. Sin embargo, productores y veterinarios han establecido una serie de estrategias para tratar de controlar la aparición del síndrome, o inclusive cuando ya se presenta.

La Tabla 3 presenta los tratamientos que han sido utilizados (Meredith, 1995).

Tabla 3. Tratamientos más comunes para el PRRS.

| Tratamiento | |
|----------------------------|---|
| Soporte | |
| Cerdos jóvenes | Electrolitos Calostro (natural o artificial) Antibióticos (orales y sistémicos) Elevación de la temperatura de las instalaciones |
| Adultos | Vitaminas Dieta de contenido energético elevado |
| Anti-abortivos* | Ácido acetilsalicílico Salicilato de sodio Dipirona |
| Inmunoestimulantes* | Altrenogest "Baypamun" |
| Vacunas | Levamisol Vacuna PRRS Vacunas para infecciones secundarias |

* No se reporta una buena evidencia científica de su eficiencia y existen posibilidades de efectos secundarios.

1.2.8. Vacunación

En la actualidad hay dos tipos de vacunas comerciales contra PRRS, vacunas vivas atenuadas modificadas y vacunas inactivadas. La primera vacuna atenuada modificada fue RespPRRS[®] (más tarde RespPRRS[®] Repro y ahora Ingelvac[®] PRRS MLV) se lanzó al mercado en noviembre de 1994 por Boehringer Ingelheim Animal Health (Corzo, Mondaca, Wayne, Torremorell, Dee, Davies & Morrison, 2010). Esta vacuna ha mostrado eficacia para reducir la mortalidad y el bajo crecimiento cuando cerdos vacunados son expuestos a una cepa semejante a la que se preparó la vacuna. Las vacunas inactivadas de PRRSv han reportado mejorar el número de partos, el regreso al estro y el número de lechones amamantados por cerda en poblaciones infectadas endémicamente. Sin embargo, hay reportes de que las vacunas inactivadas comerciales no confieren protección cuando se administran a cerdos que han sido desafiados en experimentos subsecuentemente (Huang & Meng, 2010).

Sin embargo, las actuales vacunas vivas modificadas se han asociado con un gran número de problemas como excreción del virus de la vacuna, infección persistente, protección incompleta y reversión a virulencia (Stomer, Reistad & Alexander, 1993).

De ahí que sea importante generar un tratamiento contra el PRRS pues los resultados de la vacunación, por el contrario la gran variabilidad de su efecto deja en duda la eficacia de las vacunas.

1.3. Ácido glicirricínico (AG)

1.3.1. Generalidades

Regaliz u orozus (*Glycyrrhiza glabra*) es una leguminosa arbustiva que tiene una altura de 70 – 200 cm, se encuentra principalmente en regiones sub-tropicales donde crece de manera silvestre y también bajo condiciones de cultivo. La composición aproximada de la raíz de regaliz tiene un 20% de humedad, 5 – 24% de glicirricina (considerado el mayor principio activo), 3 – 16% de azúcares, 30% de almidón y 6% de cenizas.

La extracción de la glicirricina a partir de la raíz de regaliz, es mediante preparados de raíces maceradas, extrayendo con agua caliente y concentrando a una humedad final de 20%. En 1907, Tschirch y Cederberg aislaron glicirricina cristalina y describieron sus propiedades físicas y sensoriales. El compuesto libre se caracteriza por presentar un sabor dulce intenso, además la sal de potasio y amonio del AG también es dulce, por lo que se les emplea en confitería. La forma ácida no es soluble en agua, pero su sal de

amonio es soluble en agua a un pH mayor a 4.5 (Fenwick, Lutomski & Nieman, 1990; Finney & Sommers, 1958).

Químicamente el AG es un glicosano triterpenoide activado a nivel de los grupos carboxilos en las posiciones 5, 10 y 20. Una molécula de ácido glicirretínico y dos moléculas de ácido glucorónico forman la glicirricina, saponina que también se encuentra en el extracto acuoso de *G. glabra* (Segal, Pisanty, Wormser, Azaz & Sela, 1985). Como extracto acuoso ha sido usado en medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias (Vick, Hidalgo, Zenón & Martínez, 2000) y otras de importante relevancia terapéutica. La estructura de este fármaco se observa en la Figura 2.

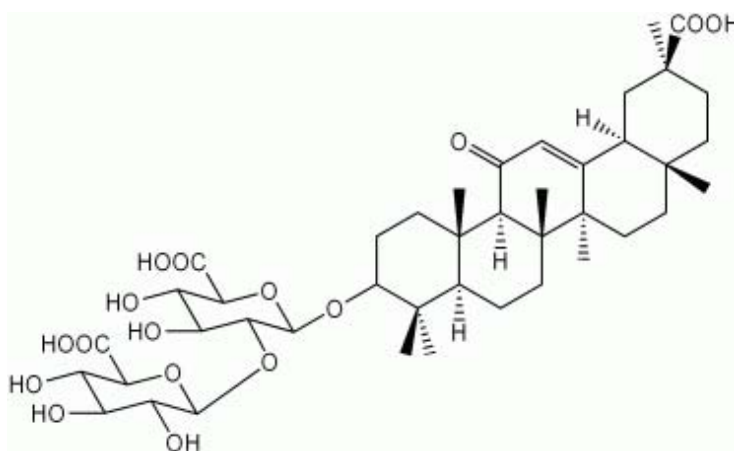


Figura 2. Estructura química de la molécula del Ácido glicirricínico.

Al ser una saponina, tiene facultades emolientes, expectorantes y laxantes (Fujita, Sakurai, Yoshida & Toyoshima, 1980); sin embargo, no produce hemólisis en células rojas. Forma geles estables en soluciones acuosas y posee excelentes cualidades de dispersión, por lo que se ha sugerido que la glicirricina podría servir como un vehículo eficiente de fármacos (Segal *et al.*, 1985).

1.3.2. Antecedentes

El uso de la planta regaliz, de donde proviene el AG, es muy antiguo. Se tienen registros de esta en el Código Hamurabi del año 2100 a. C. Los asirios la ocupaban para el alivio de dolores reumáticos y de otro tipo. La cultura china también conocía los beneficios de esta planta, pues en un escrito llamado “Shen nung Pen t’sao King” el primero de sus tratados sobre herbolaria se incluye al regaliz en la lista de drogas de primera clase que

se recomendaban por sus propiedades para prolongar el tiempo y calidad de vida del humano.

Posteriormente cuando se extendió la fama de esta planta desde Mesopotamia, los griegos como Hipócrates, Teofrasto y después Cayo Plinio Segundo reportaron su efecto curativo en las úlceras. De manera relevante, generaciones sucesivas de médicos o herbolarios se vieron influenciados por los escritos de Dioscórides, por mencionar algunos el farmacognoscista árabe Ibn Baithar (siglo XIII), Conrad von Megenberg (siglo XIV) y Paracelso, Gerard, Mattiolo y Culpepper (siglos XVI y XVII). Así que esta planta y los compuestos que se obtienen de ella son ampliamente empleados aún en nuestros días en la medicina tradicional de diversas culturas (Fenwick *et al.*, 1990).

Los diversos usos que se le da, ya sea a las raíces de esta planta sola o en combinación con otros componentes, es como expectorante, analgésico, colagógico, diaforético, antiséptico, antídoto, antialérgico y tónico para tratar afecciones en los pulmones, tracto respiratorio, estómago, riñones y otros órganos (Obolentseva, Litvinenko, Ammosov, Popova & Sapiev, 1999).

1.3.3. Uso antiviral

Al inicio de la década de los 80 se incrementaron las investigaciones sobre las propiedades antivirales (incluyendo actividad contra retrovirus, virus de la influenza, la hepatitis y el virus de Marburg) del ácido glicirricínico y sus derivados (Obolentseva *et al.*, 1999).

En diferentes estudios, el AG se ha propuesto como antiviral, actuando sobre virus *in vitro* e *in vivo*, ya que impide la replicación de virus ADN y ARN, entre ellos el virus varicela zoster, virus de inmunodeficiencia humana (Harada, 2005), influenza A (Wolkerstorfer, Kurz, Bachhofer & Szolar, 2009), Herpes Simple 1 y 2 (Vick *et al.*, 2000; Curreli, Friedman-Kien & Flore, 2005), SARS (Cinatl, Morgenstern, Chandra, Rabenau & Doerr, 2003; Hoever, Baltina, Michaelis, Kondratenko, Baltina L., Tolstikov, Doerr & Cinatl, 2005), dengue (Crance, Scaramozzina, Jouan & Garin, 2003), encefalitis japonesa (Crance *et al.*, 2003), fiebre amarilla (Crance *et al.*, 2003), Epstein-Barr (Lin, Cherng, Hung, Baltina, Baltina L., & Kondratenko, 2008; Lin, 2003).

Con respecto al mecanismo de acción, se han planteado varias hipótesis. Una de ellas establece que es posible que el AG actúe impidiendo la replicación de los virus en un estadio temprano, evitando la salida del virión de su cápside y con esto la penetración en las células (Lin, 2003).

En un experimento con pacientes diagnosticados con herpes genital en periodo activo se administró AG en solución spray en la zona afectada, 2 pulverizaciones 3 veces al día durante 5 días. Los resultados indicaron que la eficacia total del tratamiento fue mayor al 95%, con niveles de excelente 65%, buena 25% y regular 9%. Las lesiones evolucionaron de manera similar; los síntomas de dolor y prurito evolucionaron en forma menos satisfactoria (pero mayor al 80%) (Vick *et al.*, 2000).

En otro estudio, el AG mostró capacidad inhibitoria de la replicación *in vitro* del coronavirus del SARS (Síndrome Respiratorio Agudo Severo). Este compuesto y su aglicona, 18 β -ácido glicirretínico, son probados contra el SARS pues los autores indican que tienen reportada actividad antitumoral, antiinflamatoria y antiviral. Asimismo, el AG es activo contra un amplio espectro de virus (herpes virus, flavovirus, virus de inmunodeficiencia humana). También se ha probado el AG para tratar pacientes con hepatitis C e infecciones de vías respiratorias altas. Además fue uno de los primeros compuestos que se encontró tenían actividad *in vitro* contra el coronavirus del SARS. En células Vero el AG presenta una concentración efectiva para inhibir el 50% (EC_{50}) del crecimiento del virus del SARS de 365 μ M (Hoever *et al.*, 2005).

Cinatl *et al.*, (2003) evaluaron los antivirales ribavirina, 6-azauridina, pirazofurina, ácido micofenólico y glicirricina contra dos aislados del coronavirus SARS; y de todos los compuestos la glicirricina mostró la mayor actividad inhibitoria de la replicación de este virus.

En 2003, la actividad *in vitro* antiviral del AG fue evaluada en 11 flavovirus patógenos pertenecientes a los principales complejos antigénicos o serogrupos individuales de importancia médica: dengue, encefalitis japonesa y virus de la fiebre amarilla. La actividad antiviral fue determinada por la reducción del efecto citopático de cada flavovirus en células Vero y por la reducción del título vírico. El AG inhibió la replicación de los flavovirus a concentraciones altas no citotóxicas (Crance *et al.*, 2003).

Curreli *et al.*, (2005) demostró que el ácido glicirrónico inhibe la persistencia del virus en su estado latente para el caso específico de sarcoma de Kaposi asociado a herpesvirus. En esta misma investigación se indica que el ácido glicirrónico y sus derivados mostraron efectividad tanto *in vivo* como *in vitro* contra el virus del herpes simple 2, varicela zoster, citomegalovirus humano y virus Epstein-Barr.

Al respecto, en una investigación específicamente sobre la actividad de AG contra la infección del virus Epstein-Barr, fue reportado que este inhibe el ciclo de replicación del

virus en una etapa temprana (posiblemente por un mecanismo de unión-penetración) (Lin, 2003).

Sin embargo, al modificar la estructura química de siete derivados del compuesto Lin *et al.*, (2008) encontraron que al introducir residuos de aminoácidos en la parte carbohidrato de la molécula, la actividad inhibitoria fue favorecida en tres de los siete derivados.

1.4. Sistemas terapéuticos aplicados a veterinaria

Desde hace algunos años, ha habido un interés evidente en crear un puente entre los investigadores dedicados al desarrollo de medicamentos dirigidos a humanos y los que trabajan en el área de medicina veterinaria. La tecnología farmacéutica ha aportado un amplio rango de formas de dosificación, que si son adaptadas adecuadamente a alguna especie animal en específico, tienen un buen pronóstico para ser aplicadas en la práctica de la medicina veterinaria pues los mismos principios científicos para el desarrollo de formulaciones son aplicados en ambos casos (Rathbone & Martínez, 2004).

Los principales aspectos a considerar cuando se trata de diseñar una formulación farmacéutica veterinaria, son los siguientes:

- a) la seguridad en los alimentos para humanos que provienen de animales como cerdos, vacas y pollos, ya que los fármacos con los que son tratados pueden representar un riesgo a la salud humana.
- b) la diferencia interespecies en el tiempo de tránsito gastrointestinal.
- c) la dificultad de administrar ciertos medicamentos a determinados grupos de animales (por ejemplo: el rango amplio en cuanto al tamaño de estos, las diferencias en el metabolismo y biología, entre otros).
- d) las diferencias regionales.
- e) las variaciones estacionales.

A pesar de estas importantes diferencias se han desarrollado formulaciones para animales, por citar algunas: parenterales, transdérmicos y orales; de estas las más comunes han sido las inyecciones, aditivos para los alimentos, bolos ruminales y ungüentos tópicos (Ahmed & Kasraian, 2002).

En lo que se refiere a formulaciones dirigidas para ganado, se ha preferido el administrar los fármacos por medio de inyecciones (Rathboen & Martínez, 2004), y comparado con los medicamentos para mascotas de compañía, el costo de los destinados al ganado en general son más costosos. Ciertamente se ha puesto poca atención en crear nuevas

formas de dosificación para enfermedades propias de los cerdos, y una buena alternativa para éste y otro tipo de ganado, es la administración pulmonar.

1.5. Administración pulmonar de fármacos

En años recientes se han hecho investigaciones para la administración pulmonar de diferentes agentes terapéuticos, desde hormonas (insulina, calcitonina, hormona del crecimiento, somatostatina, TSH, FSH), factores de crecimiento (factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de monocitos), interleucinas y heparina.

Actualmente se comercializan medicamentos que se administran por vía pulmonar y que ya tienen una trayectoria exitosa en el mercado, sobretodo los corticosteroides, broncodilatadores y AINES inhalados para el tratamiento del asma (Scheuch, Kohlhaeufl, Brand & Siekmeier, 2006).

El interés de la industria farmacéutica por desarrollar medicamentos que se administren por vía pulmonar radica en las importantes ventajas que tienen estos órganos con respecto a otros sitios anatómicos de administración, éstas son: área superficial extensa, vascularización adecuada, epitelio alveolar delgado, capacidad elevada para el intercambio de solutos. Sin embargo, algunos problemas se han presentado en la administración pulmonar de agentes bioterapéuticos (especialmente para péptidos y proteínas) como por ejemplo su estabilidad en el proceso de generación del aerosol, tamaño de partícula del aerosol, deposición suficiente y reproducible en los alvéolos y degradación proteolítica, entre otros; mismos que afortunadamente se han resuelto con el desarrollo de nebulizadores y aerosoles específicos a través de la optimización del inhalador, y con la adición de inhibidores de la proteinasa y de promotores de la absorción (Scheuch *et al.*, 2006).

Los pulmones del cerdo son externamente distintos a los del hombre; macroscópicamente, en el pulmón izquierdo se pueden apreciar dos lóbulos, craneal (dividido en una parte craneal y otra caudal) y caudal; en el pulmón derecho se reconocen 4 lóbulos: craneal, medio, caudal y accesorio. El árbol traqueobronquial del cerdo se muestra en la Figura 3. De manera muy general, la tráquea primero proporciona el bronquio apical (lado derecho); a partir de su lado derecho y a nivel de la III costilla se bifurca en bronquios principales derecho e izquierdo. Y es a partir de estos dos bronquios principales que surgen las diferentes ramificaciones que ventilan los lóbulos pulmonares (Getty, 1982).

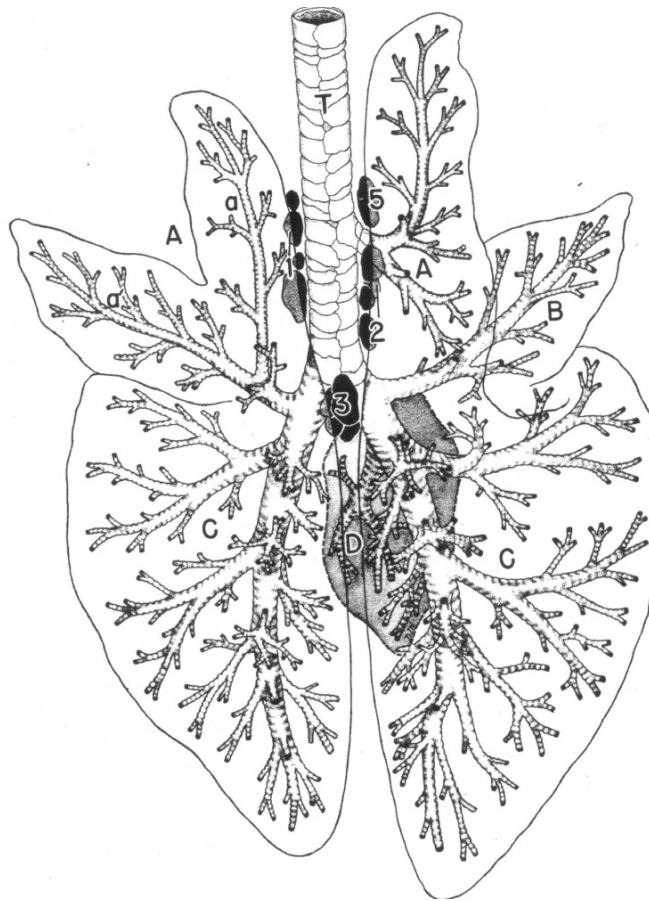


Figura 3. Anatomía pulmonar y del árbol traqueobronquial del cerdo, vista dorsal. A. lóbulo apical; a. lóbulo apical, segmento craneal; a', lóbulo apical, segmento caudal; B. lóbulo medio; C. lóbulo diafragmático; D. lóbulo accesorio; T. tráquea; 1. nódulo linfático traqueobronquial izquierdo; 2. nódulo linfático traqueobronquial derecho; 3. nódulo linfático traqueobronquial medio; 5. nódulo linfático traqueobronquial craneal. (Tomada de Getty, 1982)

De manera general, la forma de los pulmones humanos es más esférica que los pulmones de otras especies (Cryan, Sivadas y García-Contreras, 2007). Específicamente en lo que respecta a la enorme área superficial de los pulmones humanos, ésta tiene entre 80 y 140 m²; el grosor del epitelio alveolar es de entre 0.1 y 0.2 µm. La distancia total entre la superficie epitelial y la sangre en el área alveolar es entre 0.5-1 µm. De esta manera, parece que los medicamentos diseñados para esta vía, después de su inhalación profunda y su deposición en la región periférica (en los alvéolos) de los pulmones, son

rápidamente absorbidos. Otra ventaja es que por esta vía se evita el efecto de primer paso hepático.

Por otro lado, el pulmón humano posee mecanismos de defensa para prevenir que partículas extrañas lleguen a las vías respiratorias bajas. Los primeros filtros se encuentran en la región orofaríngea y el árbol bronquial, los cuales eliminan partículas de aerosol provenientes del aire inhalado. Las partículas que se depositan en el epitelio ciliar son sujetas a transporte mucociliar hacia el tracto gastrointestinal. Además de esas, otras barreras para la absorción en los pulmones son la capa mucosa, capa alveolar basal fluida, macrófagos y otras células (Scheuch *et al.*, 2006).

Una buena alternativa para vencer estas barreras fisiológicas y que la absorción del fármaco sea adecuada para ofrecer el efecto terapéutico deseado, es mediante la administración de acarreadores nanoparticulados de fármacos.

1.6. Acarreadores nanoparticulados

La Tecnología Farmacéutica se ha apoyado en la Nanotecnología (cuya rama de nuestro interés es la Nanomedicina), definida como la habilidad de trabajar a un nivel submicrónico, o molecular; con la finalidad de entender, crear y usar materiales estructurados, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades y funciones resultantes de su menor tamaño (Rocco, 2003).

Bajo el concepto de la Nanotecnología han sido creados diversos acarreadores como las nanoemulsiones, liposomas, micelas, niosomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas y acarreadores lipídicos nanoestructurados (Torchilin, 2006; Brewer, Zhang, Dong, Rutherford & Tian, 2007). Inclusive en años recientes, lo que los investigadores han buscado es crear acarreadores multifuncionales que tengan alguna o algunas de las siguientes características: circulación prolongada en la sangre, habilidad de acumularse en la zona patológica deseada, respuesta a estímulos locales (como cambios de pH y temperatura) y liberación del fármaco intracelularmente de manera efectiva (Torchilin, 2006; Jabr-Milane, van Vlerken, Devalapally, Shenoy, Komareddy, Bhavsar & Amiji, 2008).

Entre todos los acarreadores antes mencionados, las nanopartículas (nanoesferas y nanocápsulas), cuyo tamaño de partícula (menor a 1 μm) y la facilidad que se tiene para modificar su superficie representan una buena alternativa para mejorar el índice terapéutico de fármacos, ya sea incrementando su eficacia o reduciendo sus efectos

adversos. Para la fabricación de éstas, se han empleado polímeros naturales, sintéticos y materiales de naturaleza lipídica.

Las nanopartículas (NPs) pueden viajar dentro del organismo a sitios específicos sin sedimentar u ocluir la microvasculatura, pueden penetrar tumores y otros tejidos con extravasación y pueden ingresar a nivel celular por endocitosis. También ya son usadas para transportar agentes de contraste o terapéuticos en el tratamiento del cáncer. En general los componentes de estos sistemas de liberación de fármacos son, del centro hacia afuera: fármaco, capa de material que sirve de cubierta al fármaco (polímeros, liposomas, entre otros) y a veces, sobre esta capa otras estructuras de compuestos que sirven para facilitar la solubilidad y la dirección a los organismos o tejidos blancos (Figura 4).

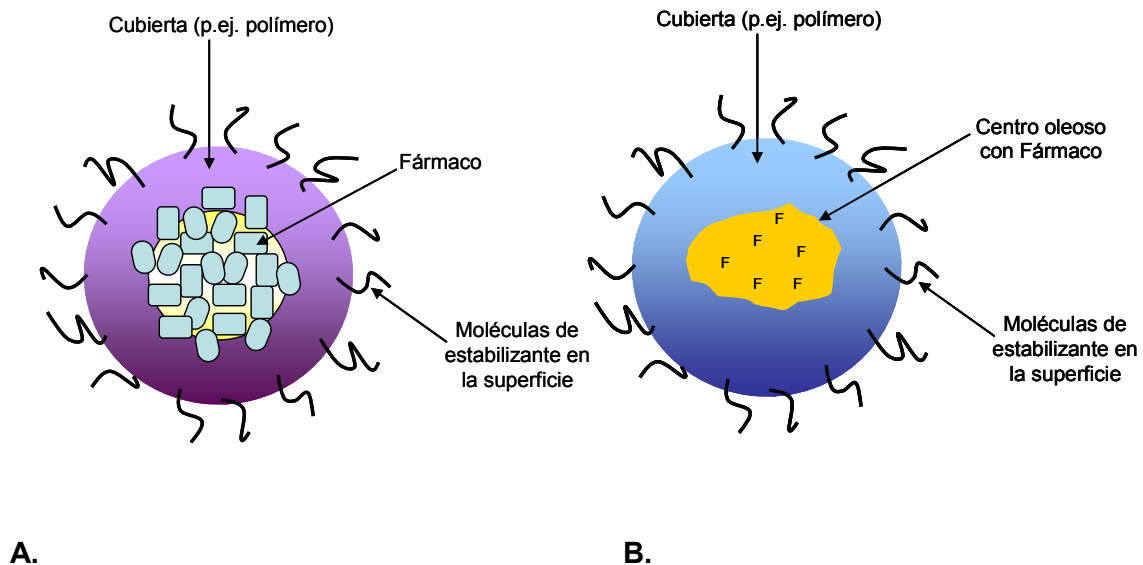


Figura 4. Nanopartículas convencionales: A) nanoesfera, B) nanocápsula.

1.6.1. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

A principios de los años 90, distintos grupos de investigación centraron su atención en una alternativa de preparar las NPs, esta vez hechas de lípidos sólidos, surgiendo así las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN por sus siglas en inglés, *Solid Lipid Nanoparticles*). Las ventajas que presentan las SLN, con respecto a otros sistemas coloidales, son: alta estabilidad física, capacidad para proteger fármacos lábiles a la degradación, alta

tolerancia por parte del organismo, transporte de fármacos altamente liposolubles, fácil escalamiento, entre otras.

Aunado a lo anterior, las SLN tienen la ventaja de que si son cuidadosamente diseñadas con respecto al sitio específico de acción al que van dirigidas y a la ruta de administración, ayudarán a resolver problemas relacionados a la liberación de nuevas clases de moléculas (p. ej. péptidos, proteínas, genes y oligonucleótidos) o a mejorar el potencial terapéutico de otros principios activos existentes (Nastruzzi, 2005).

Desde que fueron desarrolladas en la década de los 90, se constituyeron como un sistema acarreador de fármacos muy prometedor, dadas las ventajas que se mencionaron arriba, aunado a que comparadas con formulaciones que contienen un lípido líquido (como las nanoemulsiones) mantienen por más tiempo al fármaco en su interior ya que la movilidad de éste es menor; y comparadas con las NPs poliméricas, tienen mejor biocompatibilidad ya que los lípidos de los que están hechas son similares a los que tenemos en el organismo, lo cual reduce su toxicidad.

Para prepararlas, se han usado mezclas complejas de glicéridos como las grasas sólidas, las cuales tienen una buena capacidad de carga (Westesen, Bunjes & Koch, 1997); además, la presencia de mono- y diglicéridos favorece la solubilización de los fármacos (Müller, Mäder & Gohla, 2000). También ha sido posible fabricar SLN con otra clase de lípidos como ácidos grasos (ácido estéarico), esteroides (colesterol) y ceras (palmitato de cetilo).

Con respecto a los estabilizantes, se han utilizado diversas clases en lo que se refiere a su carga eléctrica y peso molecular; y de forma general se ha encontrado que mezclas de ellos pueden prevenir de manera más efectiva la aglomeración de las partículas y favorecer así la estabilidad de la dispersión.

Una vez que las NPs llegan al sitio de acción, la cubierta o el compuesto que sirve para encapsular al fármaco, se degrada conforme pasa el tiempo, debido a cambios de pH, calor, luz o simple erosión de la cápsula. El fármaco también se puede liberar a través de la cubierta por difusión.

Hasta el momento se han preparado formulaciones basadas en SLN para distintas vías de administración, como por ejemplo: parenteral, oral, tópica, ocular, pulmonar y rectal (Wissing, Kayser & Müller, 2004), en las que se han empleado distintos métodos de

preparación. En esta investigación se propone el método de enfriamiento de una microemulsión para obtener las SLN.

1.6.2. Método de la microemulsión para obtener SLN

Una microemulsión es un sistema disperso termodinámicamente estable, transparente e isotrópico, de baja viscosidad formado por una mezcla de agua, aceite y tensoactivo(s), que frecuentemente está combinado con un cosurfactante (Florence & Attwood, 2006).

Este sistema se forma cuando la tensión interfacial disminuye drásticamente siempre y cuando la combinación y las proporciones de los excipientes en la formulación sean los adecuados. La disminución de la tensión interfacial a niveles tan bajos se da ya sea por la presencia de un cosurfactante o bien por combinación de tensoactivos. Esto permite obtener un sistema termodinámicamente estable que se forma solamente por mezclado de los componentes, y a diferencia de otros sistemas dispersos, no requiere someter a la formulación a altos niveles de energía (como en el caso de las emulsiones ordinarias).

La transparencia de las microemulsiones se debe al tamaño de glóbulo, el cual es más pequeño que la longitud de onda de la luz y como consecuencia su estructura no puede ser estudiada con microscopía óptica.

En 1993, Gasco reportó la obtención de SLN a partir de una microemulsión (U.S. Patent No. 5250236, 1993). Actualmente existen dos modos de prepararlas: por dilución o por enfriamiento.

La segunda modalidad, la desarrollaron Mumper y Jay (2001); y fue la que se utilizó en esta investigación.

De manera general, para obtener las SLN a partir de la microemulsión, el lípido se funde y se adiciona una cierta cantidad del fármaco para obtener una solución clara. Los estabilizantes se solubilizan en agua que se encuentra a la misma temperatura que el lípido. La fase lipídica caliente se vacía a la solución acuosa a la misma temperatura y se dispersa con homogeneizadores de tipo rotor-estator (o incluso bajo agitación mecánica) a velocidades mayores a 3000 rpm. Esta mezcla se enfría para obtener la nanosuspensión lipídica sólida debido a la cristalización del lípido (U.S. Patent No. 7153525, 2001).

Este método presenta algunas ventajas notables con respecto a otros; como bajo costo, reproducibilidad, fácil escalamiento, y ausencia de solventes orgánicos. (Mojahedian, Daneshamouz, Samani & Zargaran, 2013) Asimismo, es posible lograr altas eficiencias de encapsulamiento, especialmente para fármacos insolubles en agua, y sobre su superficie

pueden adsorberse diferentes estructuras químicas que actúen como ligandos de células (Battaglia, Gallarate, Panciani, Ugazio, Sapino, Peira & Chirio, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de PRRS, desde su aparición en México, en 1992, ha tenido la capacidad de diseminarse en casi el 100% de las granjas comerciales, ocasionando grandes pérdidas económicas en la producción porcina nacional. En la actualidad, existen campañas estatales en solo algunos estados del territorio mexicano.

Desde hace algunos años, ha habido un interés evidente en crear un puente entre los investigadores dedicados al desarrollo farmacéutico de medicamentos dirigidos a humanos y los que trabajan en el área de medicina veterinaria. La tecnología farmacéutica ha aportado un amplio rango de formas de dosificación, que si son adecuadamente adaptadas a alguna especie animal en específico, tienen un buen pronóstico para ser aplicadas en la práctica de la medicina veterinaria pues los mismos principios científicos para el desarrollo de formulaciones son aplicados en ambos casos. Por tal motivo, en este trabajo se buscó evaluar a un fármaco en un sistema *in vitro* (células cultivadas), que principalmente ha sido dirigido a humanos y que por sus propiedades antivirales, resulta de interés para elaborar un producto que ayude a controlar enfermedades virales de los cerdos como PRRS.

El AG ha sido usado por miles de años en la medicina tradicional de varias culturas y a partir de los años 80 se ha estudiado como antiviral principalmente contra virus que afectan a los humanos. Por lo anterior, resulta interesante probar su actividad contra el virus de PRRS. Algunas de las ventajas más importantes del empleo de este principio activo es que se trata de un producto natural que por su relativamente baja toxicidad ha sido incluido por la FDA en la lista de productos *GRAS (Generally Recognized As Safe)*, y es relativamente económico comparado con otros activos extraídos de plantas.

Al tratar de incluir AG en acarreadores de tamaño submicrónico, existe la posibilidad de administrarlos mediante aspersion y su subsecuente inhalación en una explotación, lo cual facilitaría su administración (por la sencillez que este proceso representa); permitirá alcanzar los pulmones, cuya área superficial es muy extensa (para favorecer la absorción del fármaco) y con esto, llegar a circulación sistémica sin pasar por el tracto gastrointestinal.

Es por ello que se pretende desarrollar y optimizar una formulación de nanopartículas que contengan AG y probar su actividad antiviral, tanto en solución acuosa como en estos acarreadores.

3. HIPÓTESIS

El tratamiento de células MARC con una formulación farmacéutica de ácido glicirricínico basada en acarreadores nanoparticulados potenciará su efecto antiviral contra el virus de PRRS.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiviral del ácido glicirricínico incluido en soluciones acuosas y en formulaciones submicrónicas en células no infectadas e infectadas con el virus de PRRS para establecer una alternativa de tratamiento contra esta enfermedad.

4.2. Objetivos particulares

- a) Evaluar la actividad biológica *in vitro* de soluciones acuosas del ácido glicirricínico en células MARC no infectadas e infectadas con PRRS para determinar la CC_{50} , la EC_{50} y el índice de selectividad (IS).
- b) Determinar si las soluciones acuosas de AG tienen efecto inhibitorio de la replicación viral de PRRS en cultivo celular mediante la técnica de Reed y Muench.
- c) Realizar los estudios de preformulación para incluir al ácido glicirricínico en SLN.
- d) Diseñar y desarrollar una formulación farmacéutica basada en SLN para probarla en cultivo celular infectado con PRRS.
- e) Caracterizar la formulación óptima con respecto a morfología, tamaño de partícula, potencial Z e interacciones entre componentes.
- f) Aplicar la formulación de SLN óptima sobre células MARC infectadas por PRRSv y evaluar el efecto que estas producen sobre la viabilidad celular y sobre la replicación de dicho virus.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Soluciones de AG

Se prepararon soluciones de AG a diferentes concentraciones desde 1-10 y 30 mg/ml, disolviendo el fármaco en medio RPMI. Para concentraciones desde 0.1 a 0.9 mg/ml se prepararon partiendo de una solución stock de 10 mg/ml y diluyendo con el volumen adecuado de RPMI. Todas las soluciones fueron filtradas con una membrana de 0.22 μ m bajo condiciones de esterilidad.

5.2. Virus y células

Se utilizaron células MARC 145 las cuales fueron colocadas con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y con una solución al 1% de penicilina y estreptomina. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂. La cepa de PRRS VR2332 fue donada por los laboratorios Avimex, S.A. de C.V. El virus se propagó en dichas células usando el mismo medio. Los títulos virales se calcularon por el método de Reed y Muench y se expresaron como 50% de dosis infectiva de tejido celular por ml (TCID₅₀/ml).

5.3. Titulación viral

El virus de PRRS fue titulado mediante el método de Reed y Muench. Las diluciones de virus se prepararon a partir de un cultivo de células infectadas, mismas que se congelaron cuando se observó el efecto citopático; el virus se liberó por 2 ciclos de congelación-descongelación del cultivo celular y una vez descongelado, se sometió a centrifugación 1 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se recuperó y de este se prepararon las diluciones desde 10¹-10⁸ TCID₅₀/ml.

Previamente a la preparación de las diluciones, la placa se sembró de la siguiente manera. Se prepararon 10 ml de medio RPMI suplementado con 10% de SFB. De un frasco de cultivo con monoestrato confluyente en un 80-100 % se separaron las células utilizando tripsina verseno. Se agregaron los 10 ml de medio RPMI previamente preparado y se homogeneizó completamente.

A cada pocillo se le adicionaron 100 μ l de esta suspensión de células (3x10³ células por pozo). Una vez hecho esto, se incubó por 24 h a 37 °C en ambiente de CO₂ para obtener un monoestrato confluyente. Se colocaron 100 μ l de cada dilución de virus por sextuplicado en la placa de 96 pozos. Se observó la placa durante 7 días. El título se considera como

el logaritmo inverso de la dilución más alta del lisado viral que no presenta efecto citopático.

5.4. Prueba de citotoxicidad

Se colocaron 3500 células por pocillo en una placa de 96 pozos y se permitió que alcanzaran confluencia en medio RPMI al 10% de SFB. Después se decantó el medio y se adicionó a cada pocillo 100 μ l de AG a las diferentes concentraciones (1-30 mg/ml en la primera etapa de la prueba y 0.1-0.9 mg/ml para la segunda; 8 pocillos por concentración) además de 100 μ l de medio de mantenimiento (SFB 2%). Las células se mantuvieron 6-7 días a 37 °C y 5% de CO₂. Como control se utilizaron células en medio de mantenimiento (8 pocillos). Diariamente se revisó la morfología celular hasta el tiempo especificado con ayuda de un microscopio invertido en búsqueda de pérdida de confluencia, redondeo o arrugamiento de células, presencia de vacuolas, principalmente. Terminada la prueba se evaluó la citotoxicidad también con la tinción de azul de tripán (TAT) y con la prueba de MTT. El porcentaje de viabilidad se calculó como $(AT/AC) \times 100$, donde AT y AC son las absorbancias de las células tratadas y del control, respectivamente. La concentración citotóxica de AG que reduce la viabilidad al 50% (CC₅₀) se estimó a partir de la curva concentración-efecto después del análisis de regresión lineal.

5.5. Prueba de actividad antiviral

Como se mencionó arriba, las células fueron mantenidas e incubadas de la misma forma y cuando estuvieron confluentes se desechó el medio de crecimiento y se adicionaron 100 μ l a cada pocillo de la suspensión viral 10⁶ TCID₅₀/ml en RPMI que corresponde al título viral inicial determinado. La placa se incubó por 1 h a 37°C y en seguida las células se trataron con 100 μ l de las soluciones de AG (0.1-0.9 mg/ml) más 100 μ l de medio de mantenimiento. La placa se observó durante 7 días y se mantuvo a 37 °C y 5% de CO₂. Los controles utilizados fueron (8 pocillos): células tratadas con AG 0.9 mg/ml y células infectadas con el virus como controles positivos. Un control negativo consistió de células en medio de mantenimiento. Al finalizar se realizaron la TAT y la prueba de MTT. La actividad antiviral se calculó como sigue: $((\text{absorbancia media de ocho pocillos de células tratadas con AG} - \text{absorbancia media de ocho controles de virus}) / (\text{absorbancia media de células control} - \text{absorbancia media de ocho controles de virus})) \times 100$.

Otro modo de la prueba de actividad antiviral se realizó como sigue. En una placa de 96 pocillos con células confluentes estas se infectaron con 100 μ l de las diluciones virales, 10^1 - 10^8 TCID₅₀/ml. La placa se incubó 1 h a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de las concentraciones de AG (0.1-0.9 mg/ml) más 100 μ l de RPMI al 2% de SFB. La placa se mantuvo 6 días bajo las mismas condiciones antes descritas y los controles empleados fueron los mismos que se mencionaron arriba. Se calculó diariamente el título viral por el método de Reed y Muench. La concentración efectiva de AG requerida para inhibir el efecto citopático al 50% del valor control (EC₅₀) se calculó mediante el análisis de regresión de la curva concentración-efecto de la prueba. El índice de selectividad (IS) se obtuvo por la relación CC₅₀/EC₅₀ (Rockville, MD. Food and Drug Administration, 2006).

5.6. Preparación de SLN por el método de enfriamiento de microemulsión

La figura 5 muestra el procedimiento para la obtención de SLN por el método de enfriamiento de la microemulsión (Mumper & Jay, 2002). Primero se calentaron 85.5 g de agua hasta 70 °C y se solubilizaron 3 g de AG bajo agitación moderada (800 rpm por 2 min). Una vez solubilizado el fármaco, se agregó 1.5 g del estabilizante (Pluronic® F127, Anexo C) hasta su dispersión total. Esta fase se mantuvo durante todo el proceso a esta temperatura. Por otro lado, se fundieron 10 g de Gelucire® 44/14 (Anexo B) a 70 °C y se vertieron sobre la fase acuosa que se encontraba a la misma temperatura y bajo agitación constante mediante un agitador mecánico a 1600 rpm durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la dispersión se transfirió a un baño de agua helada (5°C) y se continuó agitando por 3 minutos a 1200 rpm.

Una vez obtenidas las SLN, se procedió a separarlas por ultracentrifugación con dos ciclos a 50,000 rpm durante 1 h y se caracterizaron en cuanto a tamaño, morfología, carga de la partícula (potencial Z) e interacciones entre componentes; así como pruebas *in vitro* de efectividad de las SLN sobre cultivo celular.

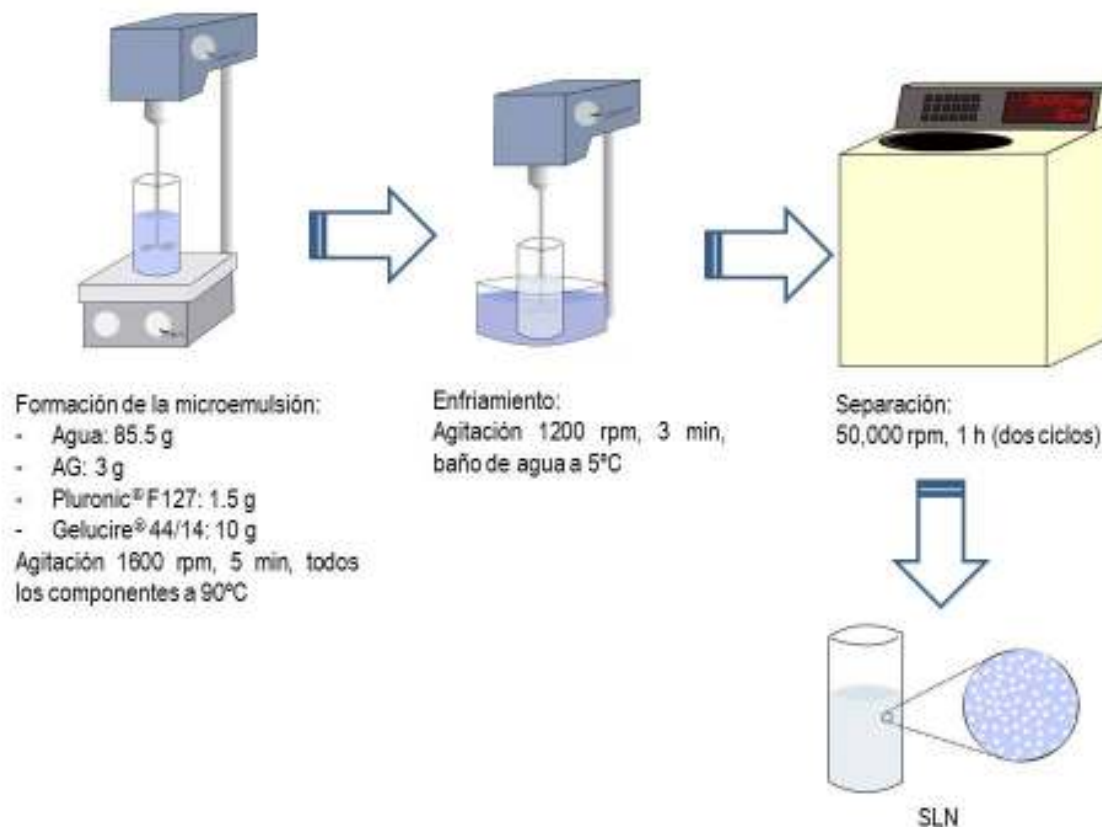


Figura 5. Proceso de elaboración de SLN por el método de enfriamiento de una microemulsión.

Una vez encontradas las proporciones correctas de los componentes, se prepararon varios lotes con el mismo procedimiento descrito arriba pero variando la cantidad de AG y manteniendo constantes las de Gelucire® y Pluronic®, esto con la finalidad de saber aquella concentración en la que el AG favorece la formación de las SLN.

5.7. Caracterización de las SLN

5.7.1. Determinación del tamaño de partícula promedio (TPP)

En todos los lotes preparados se determinó el tamaño promedio de las SLN mediante el uso de un contador submicrónico de partículas con dispersión de rayos láser a un ángulo de 90 °C que emplea la técnica de DLS (también llamada *Photon Correlation Spectroscopy*). La longitud de onda de la lámpara láser He/Ne 10 mW utilizada fue 680 nm. Las mediciones se hicieron fijando el ángulo de incidencia a 90 °C durante 180 s a 25 °C. Los datos de la luz dispersada se analizaron mediante un correlacionador digital en el

modo de análisis unimodal. Las muestras se diluyeron con agua destilada hasta que la señal de la luz dispersada (obtenida como cuentas por segundo) por las partículas estaba dentro del intervalo de sensibilidad del instrumento. Cada muestra se leyó por triplicado ($n=3$) para calcular el TPP y la desviación estándar.

5.7.2. Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler (potencial Z , ψ_z)

De cada uno de los lotes, se hizo una dilución 1:10 con agua filtrada en membrana de 0.22 μm . La movilidad electroforética se transformó a ψ_z aplicando la aproximación de Smoluchowski. Las mediciones se hicieron por triplicado a 25 °C en celdas desechables de capilar doblado.

5.7.3. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Una vez separadas las nanopartículas por ultracentrifugación se eliminó el exceso de fármaco y estabilizante no adsorbido a las partículas. Para ello, se colocó una porción de la formulación en membranas de diálisis de aproximadamente 5 cm de longitud. Se cerró perfectamente dicha membrana y se colocó en un vaso de precipitados con 150 ml de agua desionizada bajo agitación vigorosa constante por 24 h. Concluido este tiempo, se sacaron las nanopartículas de la membrana y se transfirieron a frascos de vidrio. De estos, se tomó una pequeña muestra que se colocó diluida en un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se recubrió con una película fina de oro (~20 nm de grosor) y se examinó físicamente la superficie con un microscopio electrónico de barrido de vacío ligero LV-SEM JSM 5600 (resolución 5 nm), voltaje de 20 kV y presión de la cámara 12-20 Pa.

5.7.4. Calorimetría Diferencial de Barrido

Las muestras evaluadas fueron: AG, Gelucire[®] 44/14, Pluronic[®] F127, como materias primas; mezcla física de AG, Gelucire y PF-127 (3, 10 y 1.5% respectivamente); lote de SLN sin fármaco y SLN cargadas de AG. De cada una de las muestras se pesaron de 2-3 mg y se colocaron en charolas no herméticas de aluminio. Una vez secas, se sometieron a una rampa de calentamiento de 0 a 280 °C, con una velocidad de 10 °C/min y con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min. La calibración se realizó con un estándar de Indio.

5.8. Evaluación del efecto de SLN con y sin AG sobre células infectadas

Se colocaron 3500 células por pocillo en una placa de 96 pozos y se permitió que alcanzaran confluencia en medio RPMI al 10% de SFB. Posteriormente se desechó el medio y la infección se efectuó con 100 μ l de las diluciones virales 10^1 - 10^8 TCID₅₀/ml. La placa se incubó 1 h a 37 °C y 5% de CO₂. En seguida, se aplicaron 100 μ l de la dispersión de SLN con AG a cada pocillo además de 100 μ l de medio de mantenimiento. La dispersión de SLN fue previamente diluida en RPMI para dar una concentración de 0.5 mg/ml del fármaco. Los controles de células, virus y SLN sin AG se evaluaron simultáneamente. La placa se incubó y observó por 72 h a las condiciones mencionadas arriba, y a ese tiempo la viabilidad celular se determinó mediante la TAT y la prueba de MTT. La viabilidad celular de los pocillos tratados se evaluó mediante la relación de la absorbancia media respecto a la absorbancia que resultó de ocho controles celulares tratados con SLN sin AG, multiplicada por 100.

5.9. Tinción de exclusión de azul de tripán

El azul de tripán es un colorante que se utiliza para diferenciar células vivas de las muertas, gracias a que el colorante es excluido por las células vivas cuya membrana celular está íntegra y no permite pasar ciertas sustancias del exterior; mientras que las células muertas si se tiñen pues el colorante pasa al interior.

Se desechó el medio de la placa de 96 pocillos y se adicionaron 20 μ l de azul de tripán (0.5% p/v en PBS) a cada pocillo. Luego la placa se incubó por 5 min a temperatura ambiente y el colorante se desechó para observar y contar directamente las células.

5.10. Prueba de MTT

La tinción con MTT se fundamenta en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables para transformar la sal de MTT tetrazolio (color amarillo) a un compuesto cuya coloración se torna azul (MTT formazán), misma que es proporcional al número de células vivas presentes. Brevemente, se decantó el medio de placa y las células se lavaron con RPMI seguido de PBS. Después se adicionaron 50 μ l del reactivo de MTT (5 mg /ml en PBS). La placa se protege de la luz y se mantiene 3 h a 37 °C. En seguida se retiró el reactivo y se adicionó a cada pocillo 100 μ l de DMSO con la finalidad de disolver los cristales de formazán formados, agitando ocasionalmente la placa de forma moderada. La absorbancia de los pocillos se determinó usando un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm.

5.11. Análisis estadístico

Los experimentos se hicieron al menos por triplicado y en donde fue posible se aplicaron las pruebas de ANOVA y de Tukey, y se consideró como estadísticamente significativa la diferencia si $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Titulación viral

Cuando el sistema indicador en una titulación viral es el efecto citopático que se produce en células cultivadas, las titulaciones son expresadas como el 50% de dosis infecciosas de material cultivado.

El título viral de PRRS se determinó haciendo diluciones logarítmicas a punto final de efecto citopático con el método de Reed y Muench dando un valor promedio de $10^{6.1}$ TCID₅₀/ml.

6.2. Citotoxicidad del Ácido Glicirricínico

Los monoestratos de células MARC sometidos a la acción del AG se observaron al microscopio, encontrándose que por debajo de una concentración de 0.9 mg/ml no presentaban efecto citotóxico, pero a concentraciones mayores se observó una notoria pérdida de confluencia, redondeamiento de células y presencia de vacuolas. Aparentemente existió una respuesta dependiente de la concentración empleada.

La viabilidad celular se verificó a las 144 h post-exposición con diferentes concentraciones de AG (0.1-0.9 mg/ml) con el ensayo de MTT. Con dicho ensayo se encontraron diferencias estadísticas (ANOVA $P < 0.05$) en la viabilidad celular de las concentraciones probadas (0.1-0.9 mg/ml). Las concentraciones de 0.7, 0.8 y 0.9 mg/ml fueron diferentes estadísticamente comparadas con el control (Tukey $P < 0.05$). También se observó una relativamente alta viabilidad en todos los tratamientos ($>80\%$, Figuras 6a y 6b) y no hubo una clara evidencia de un efecto dependiente de la concentración.

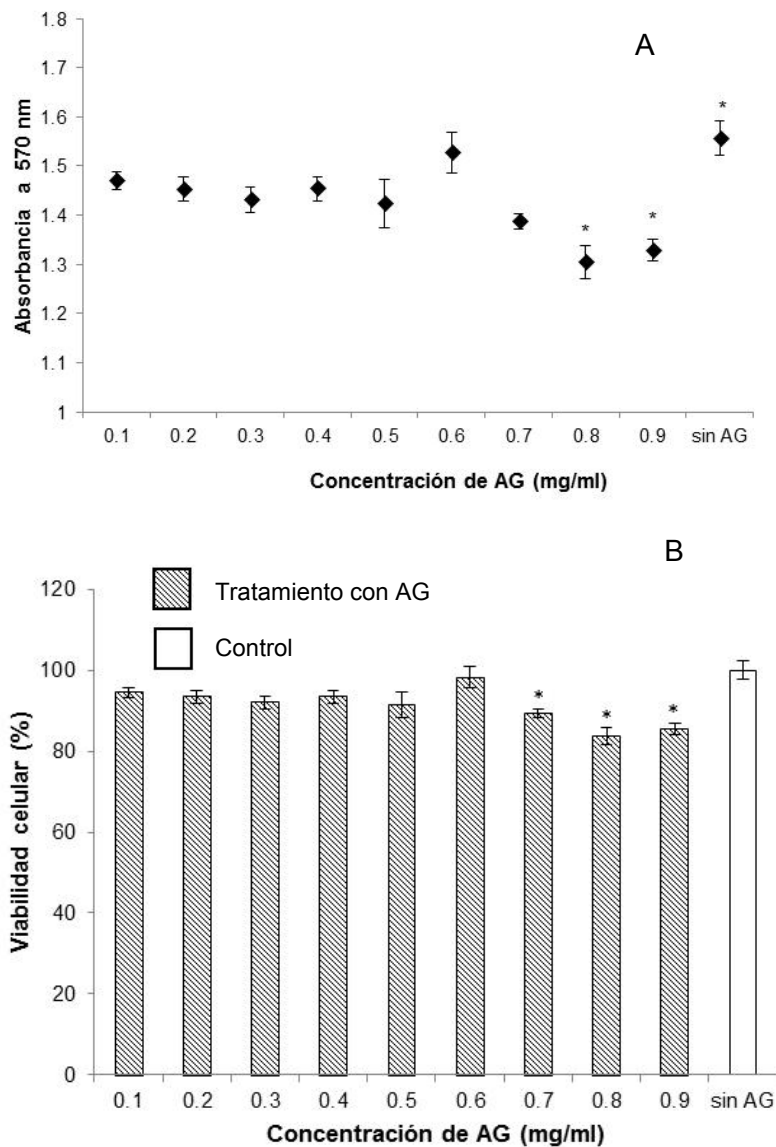


Figura 6. Viabilidad celular obtenida por el ensayo de MTT después del tratamiento con soluciones de AG (0.1-0.9 mg/ml). A) absorbancia como función de la concentración de AG. B) Viabilidad celular expresada como porcentaje del control. La citotoxicidad: se evaluó después de 144 h de exposición al AG. Los resultados se presentan como media \pm error estándar; $n = 5$; * $p < 0.05$ vs controles (Prueba de Tukey).

La CC_{50} se estimó a partir del análisis de regresión lineal de la curva concentración-respuesta y el valor fue de 4.2 mg/ml.

La TAT (Figura 7) mostró que la viabilidad celular disminuyó significativamente de un modo dependiente de la concentración; esta fue de 60-75% para las concentraciones probadas vs los controles. Las concentraciones por arriba de 10 mg/ml gelificaron, por lo que esas soluciones no se aplicaron a los monoestratos.

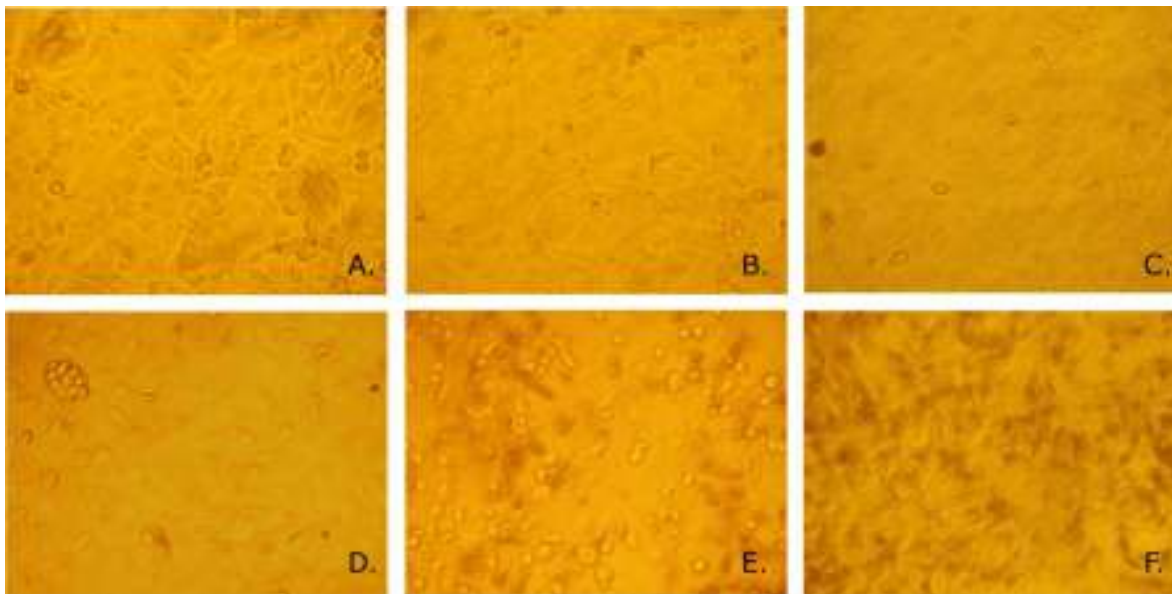


Figura 7. Tinción de exclusión de azul de tripán para evaluar citotoxicidad a las 48 y 144 h post-exposición con AG. A-C, 48 h (sin tinción como comparación representativa): A. células sin tratamiento con AG; B. células tratadas con AG 0.5 mg/ml; C. células tratadas con AG 0.9 mg/ml. D-F, 144 h (después de tinción): D. células sin tratamiento con AG, E. células tratadas con AG 0.5 mg/ml; F. células tratadas con AG 0.9 mg/ml.

6.3. Efecto inhibitorio de las soluciones de AG aplicadas a células infectadas con PRRS

El potencial efecto antiviral de las soluciones acuosas de AG fue evaluado sobre células MARC infectadas (3500 células por pozo) con PRRS mediante el ensayo de inhibición citopática, el ensayo MTT y la TAT. Los resultados de MTT mostraron que no hay diferencias estadísticas con ninguna de las concentraciones probadas (ANOVA $P > 0.05$); pero todos los grupos tuvieron diferencia estadística al compararlos con el control negativo y con el control positivo células infectadas con virus (Tukey $P < 0.05$).

Los porcentajes de inhibición viral obtenidos mediante la prueba de MTT estuvieron por arriba de 50% y la EC_{50} calculada a partir del análisis de regresión de la curva concentración-respuesta (Figura 8) fue de 0.48 mg/ml. Un resultado relevante es que el

fármaco mostró buena actividad antiviral contra el virus, así lo indica el índice de selectividad (SI) calculado, que fue 8.7.

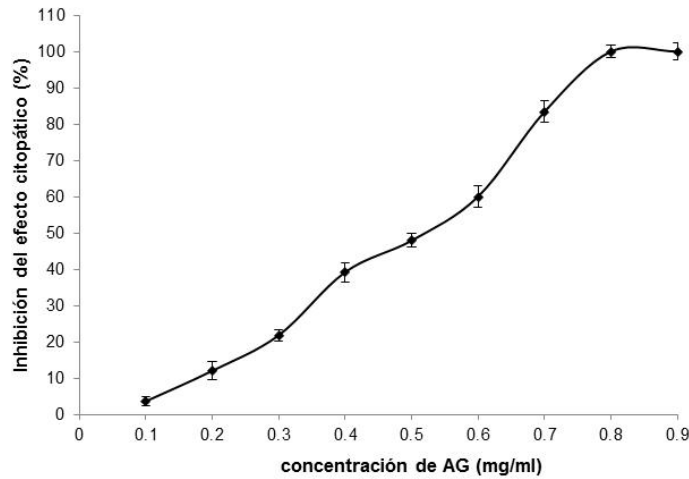


Figura 8. Curva concentración-respuesta de la actividad de AG sobre células infectadas con virus de PRRS y tras la exposición a diferentes concentraciones de AG (0.1-0.9 mg/ml) a las 72 h. La inhibición del ECP se evaluó por la técnica de Reed y Muench.

El conteo directo de células viables reveló una disminución significativa de la viabilidad ($P < 0.05$) comparada a los controles (60% vs controles) solamente a una concentración de 0.9 mg/ml.

Después de infectar las células por 1 h con PRRS a diferentes títulos virales y sometiendo a tratamiento a esas células con soluciones de AG, se observaron diariamente los monoestratos hasta las 168 h. En ese punto, la TAT mostró que el número de células viables disminuyó significativamente a concentraciones por arriba de 0.7 mg/ml. La actividad antiviral de AG estimada por el método de dilución límite demostró que el título viral disminuyó dos logaritmos comparado con la condición sin tratamiento con AG ($1 \times 10^{3.7}$ TCID₅₀/ml vs 1×10^6 TCID₅₀/ml).

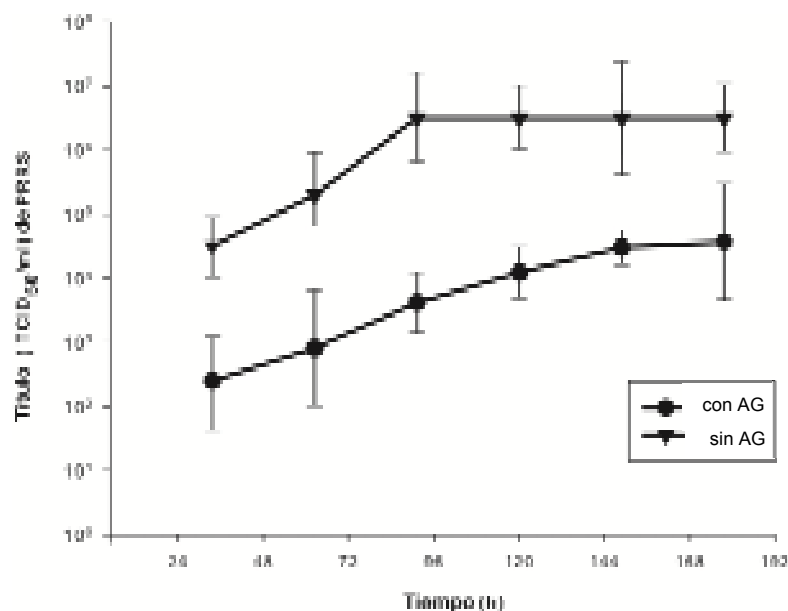


Figura 9. Inhibición del ECP por el método de Reed y Muench a las 72 h. Las células cultivadas se infectaron con concentraciones variables de PRRS y después se trataron con AG a diferentes concentraciones (0.1-0.9 mg/ml). La gráfica muestra los resultados de células sin tratamiento de AG (control) y de células con tratamiento.

6.4. Preparación de SLN por el método de enfriamiento de microemulsión

En el proceso de obtención de las SLN, la sal de amonio del ácido glicirricínico, glicirricinato de amonio, se solubilizó en agua calentada a la misma temperatura que el lípido fundido (90°C). En seguida se adicionó el estabilizante; el lípido se fundió y se vertió a la fase acuosa bajo agitación mecánica. De manera espontánea se observó la formación de una dispersión clara y transparente, la cual fue enfriada en un baño de agua a 5°C bajo agitación constante para formar las SLN.

Los resultados de diferentes lotes preparados variando la cantidad de AG se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Lotes con cantidades variables de AG para determinar la formación de SLN.

| Lote | Porcentajes de componentes en la formulación (% p/p) | | | Formación de SLN |
|------|--|-------------------|-----|------------------|
| | Gelucire® 44/14 | Pluronic® F127 | AG | |
| A | 10 | 1.5 | 0.2 | No |
| B | 10 | 1.5 | 0.4 | No |
| C | 10 | 1.5 | 0.6 | No |
| D | 10 | 1.5 | 1.6 | No |
| E | 10 | 1.5 | 2.0 | No |
| F | 10 | 1.5 | 2.4 | No |
| G | 10 | 1.5 | 2.6 | No |
| H | 10 | 1.5 | 2.8 | Si |
| I | 10 | 1.5 | 3.0 | Si |
| J | 10 | 1.5 | 3.2 | Si |
| K | 10 | 1.5 | 3.4 | Si |

Como se observó en los lotes elaborados de acuerdo a la Tabla 4, donde el lípido se mantuvo constante y siendo el compuesto que forma la matriz lipídica, la presencia de AG fue determinante en la formación de las SLN. Esto se logró a partir de una concentración de 2.8% p/p del fármaco. Después de 3.4% p/p de fármaco en la formulación la estabilidad se ve comprometida pues al día siguiente se apreciaron aglomerados.

6.5. Caracterización de las SLN

6.5.1. Determinación del TPP por DLS

En la tabla 5, se muestran los resultados del tamaño de partícula de lotes blanco y lotes con fármaco (formulación óptima: 10.0 g de Gelucire® 44/14, 3.0 g de AG, 1.5 g del estabilizante y 85.5 g de agua), el cual fue menor para los lotes blanco que para los que llevan AG; esto es debido a que la presencia del fármaco ocasiona que la matriz lipídica, al incorporarlo en su interior o adsorberlo, ocupe un mayor volumen que cuando este no se encuentra presente.

Durante la evaluación del TPP se observó un aumento en este parámetro, a pesar de que el índice de polidispersión mantuvo su valor menor a 1. Sin embargo, en algunos lotes la

presencia de agregados macroscópicos fue evidente al final de la evaluación. Cuando se incluyó AG en la formulación el tamaño aumentó, indicando la adsorción del fármaco o interacción química con la superficie del nanoacarreador.

Tabla 5. Tamaño de partícula promedio y potencial Z de las SLN con y sin AG. Estas mediciones se realizaron una vez lavadas las SLN para evaluar su estabilidad.

| Número de lote | TPP (nm), [IP] | | | | | Potencial-Z (mV) ^a | | |
|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------------|---------------|---------------|
| | Día 1 | Día 2 | Día 5 | Día 8 | Día 15 | Día 1 | Día 15 | |
| SLN con GA | 1 | 96.3 [0.489] | 95.8 [0.645] | 98.2 [0.548] | 102.6 [0.422] | 135.4 [0.604] | 10.83 ± 0.349 | 13.11 ± 0.461 |
| | 2 | 100.5 [0.325] | 115.7 [0.342] | 125.1 [0.657] | 142.8 [0.564] | 176.3 [0.821] | 10.34 ± 0.027 | 13.98 ± 0.283 |
| | 3 | 101.5 [0.215] | 113.5 [0.257] | 128.4 [0.319] | 155.9 [0.786] | 181.7 [0.921] | 10.97 ± 0.064 | 14.32 ± 0.139 |
| | 4 | 106.2 [0.561] | 106.8 [0.543] | 110.1 [0.684] | 118.6 [0.624] | 142.4 [0.776] | 11.72 ± 0.192 | 14.67 ± 0.139 |
| | 5 | 119.4 [0.314] | 120.2 [0.363] | 147.5 [0.455] | 166.4 [0.759] | 180.3 [0.913] | 11.93 ± 0.896 | 15.45 ± 0.391 |
| | 6 | 108.2 [0.385] | 110.5 [0.472] | 121.4 [0.483] | 129.7 [0.698] | 138.2 [0.991] | 11.59 ± 0.735 | 15.84 ± 0.892 |
| SLN sin AG | 7 | 90.4 [0.122] | 93.2 [0.425] | 94.1 [0.356] | 95.7 [0.779] | 96.7 [0.732] | 22.16 ± 0.330 | 24.49 ± 0.675 |
| | 8 | 89.4 [0.231] | 85.2 [0.564] | 91.7 [0.678] | 92.3 [0.345] | 93.9 [0.689] | 22.89 ± 0.682 | 24.60 ± 0.753 |
| | 9 | 90.2 [0.764] | 90.5 [0.598] | 92.4 [0.728] | 93.8 [0.643] | 95.3 [0.892] | 22.32 ± 0.740 | 23.61 ± 0.831 |

^a reportado como promedio ± desviación estándar; n= 3.

6.5.2. Potencial Z, ψ_z

Los resultados de la carga de la partícula se muestran en la tabla 5. Para todos los lotes el valor absoluto de potencial Z es menor a 30 mV. Este valor implica inestabilidad de las partículas dispersas cuando están estabilizadas por surfactantes iónicos o por carga eléctrica.

6.5.3. Microscopia Electrónica de Barrido

Como se mencionó anteriormente, esta técnica permite evidenciar la morfología y confirmar el tamaño de las partículas. Además, si existen cristales o aglomerados es posible observarlos en las micrografías.

En la figura 10 se muestran las micrografías de los lotes preparados de SLN de la formulación optimizada.

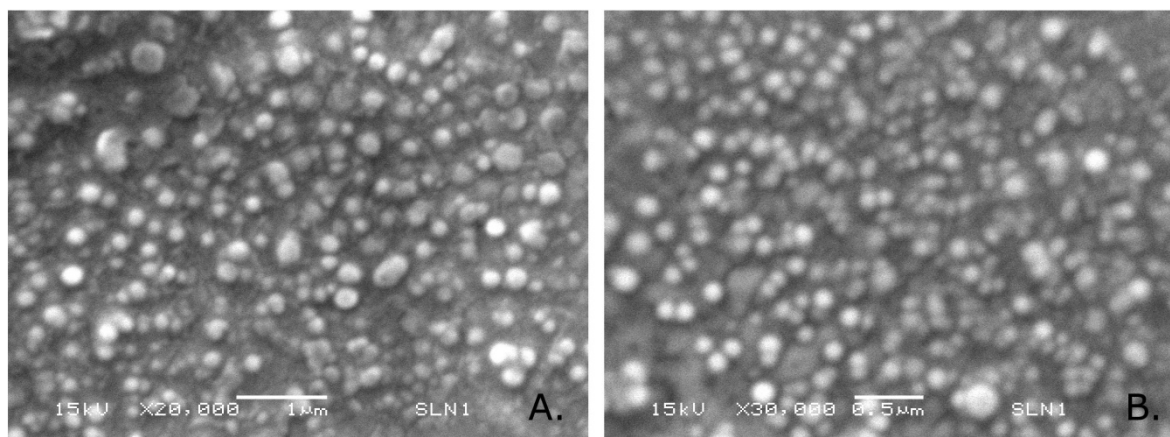


Figura 10. Micrografías de SLN de Gelucire[®]. SLN a t= 0 (A), y a t= 15 días (B). La barra representa 1 µm o 0.5 µm según lo especificado.

De acuerdo a las micrografías, las partículas presentan forma esférica, sin cristales en la superficie de las mismas o formación de aglomerados; tanto a tiempo cero como a los 15 días de haberlas preparado. El tamaño es homogéneo, encontrándose entre los 100-200 nm aproximadamente. Estos datos concuerdan con los obtenidos por DLS.

6.5.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para evaluar la estabilidad a corto plazo de las SLN

Esta técnica es de gran utilidad ya que permite evaluar cambios en las estructuras químicas de los componentes de la formulación y la existencia de posibles interacciones que en cierto momento puedan indicar inestabilidad, formación de dispersiones moleculares. En la Figura 11 se observan los termogramas de las materias primas y de dos lotes representativos de SLN.

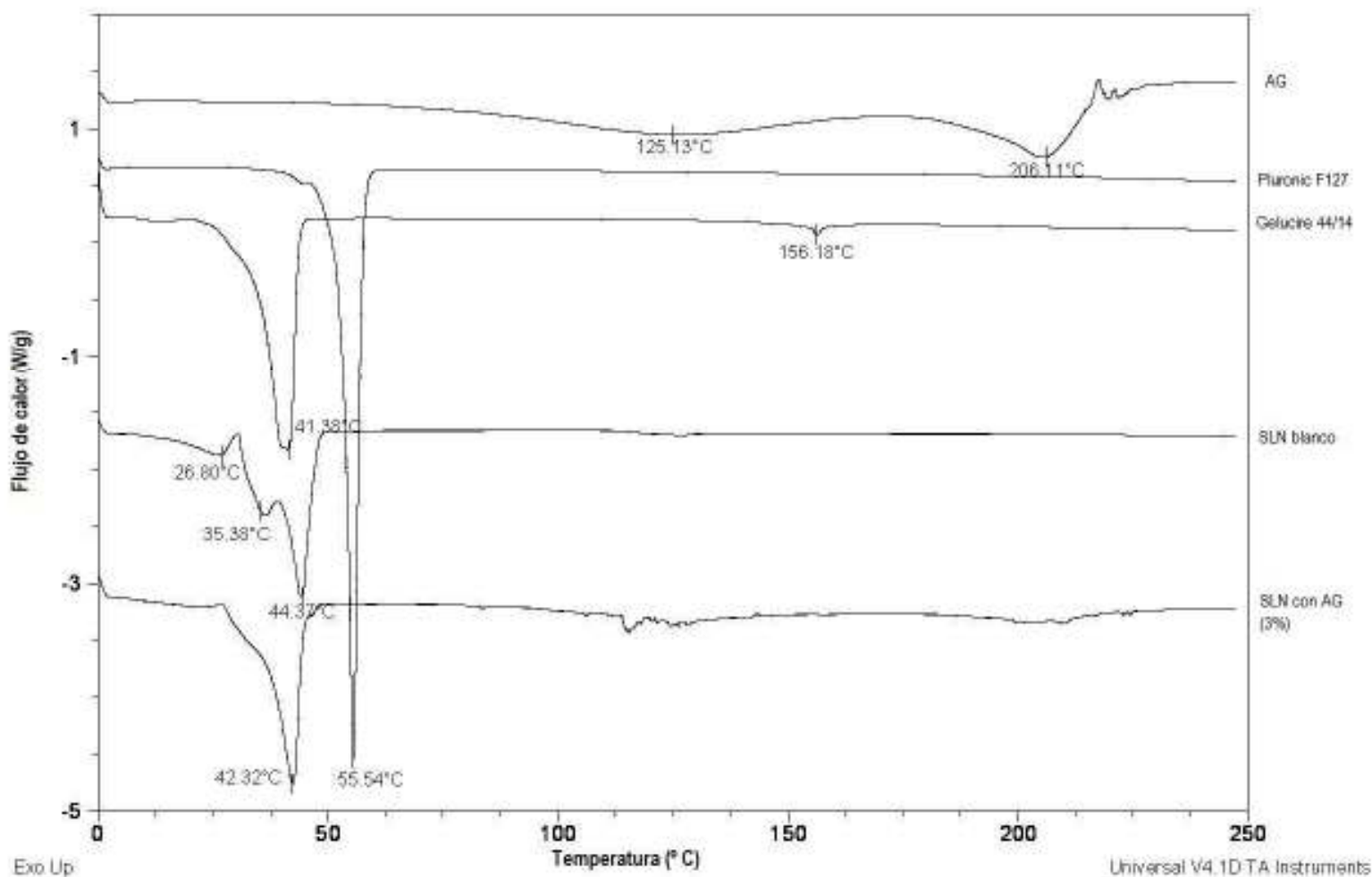


Figura 11. Termogramas de la materia prima y lotes de SLN con y sin AG obtenidos mediante la técnica de DSC. Todas las muestras se analizaron en un intervalo de 0 a 280 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Es notorio que la presencia del fármaco modifica la estructura de la NP por interacciones que se generan entre los componentes.

La entalpía de fusión del fármaco se ubica de los 180 °C a los 215 °C (con un máximo en 206.11°C), que coincide con datos teóricos (<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924177>), seguida de unas señales cercanas a los 220°C correspondientes a la descomposición de la fracción de ácido glucurónico por el tratamiento térmico convirtiéndolo a ácido glicirretínico (Kondo, Minamino, Okuyama, Honda, Nagasawa y Otani, 1986). La endoterma en 125°C podría

corresponder a la evaporación de agua. El lípido de la formulación, Gelucire® 44/14, presenta un primer pico a los 41.3°C, que se atribuye a la fusión de los glicéridos que son los componentes mayoritarios; el segundo pico a 156.1°C, podría deberse a la recristalización de algún polimorfo del lípido o bien un proceso de cristalización del material, ya que es bien sabido que materiales que están compuestos por una mezcla de componentes lípidos (como en este caso) quizás no solo exhibirán polimorfismo sino además la formación de un amplio arreglo de cristales mezclados, haciendo que la caracterización sea difícil (Otun, Meehan, Qi & Craig, 2015). Para el Pluronic® F127 se muestra su punto de fusión característico a 55.5°C. Los eventos térmicos de los lotes representativos de SLN blanco (sin AG) y con AG al 3% indican que la presencia del fármaco modifica la estructura de la NP por interacciones que se generan entre los componentes ya que desaparecen los picos a 26.8 y 35°C. Además para el caso de las SLN con AG, alrededor de 112°C existe un evento térmico no definido atribuible a evaporación de agua. Adicionalmente, en las SLN blanco existen interacciones entre el tensoactivo y el lípido, pues se observan tres endotermas de fusión (26.8 °C, 35.3 °C y 44.3 °C) que no se presentan en los termogramas de las materias primas.

6.5.5. Evaluación del efecto de SLN con AG sobre células infectadas

El efecto que tienen las SLN con AG sobre la morfología de las células infectadas y no infectadas fue evaluado a las 24, 48 y 72 h, se aplicaron 100 µl de la dispersión a una concentración de 0.5 mg/ml del fármaco. Las concentraciones de virus utilizadas para infectar las células fueron de 10^1 - 10^8 TCID₅₀/ml. Las fotografías de esta prueba indican que la presencia de los nanoacarreadores con el fármaco modifica la estructura del monoestrato celular, ya que desde las 24 h las células perdieron confluencia, se observaron redondas y con formación de vacuolas al compararlas con los controles positivo y negativo (células en medio de mantenimiento y células infectadas con virus), los cuales conservaron su morfología característica. El conteo directo por la TAT reveló una disminución en células viables (60-70% vs controles) también a las 24 h. La viabilidad celular a las 72 h de acuerdo al ensayo de MTT en las células tratadas con SLN mostró que no hay diferencia significativa entre todas las concentraciones de virus comparadas con la del control positivo (Tukey P>0.05) con altos porcentajes de células viables (> 90%) para todos los tratamientos, a pesar de que un ligero aumento en la viabilidad se observó conforme el título viral disminuyó (alcanzando 100% para 1×10^8 TCID₅₀/ml). Los resultados de la TAT a ese mismo tiempo indican una disminución significativa en la

cantidad de células viables ($P < 0.05$). Además, después de 48 h todas las células tratadas con SLN que contenían GA evidenciaron la formación de estructuras tipo aguja que aumentaron en cantidad al término del tratamiento. Después de adicionar MTT, algunos pozos se llenaron por completo de estos cristales, aparentemente atribuidos al formazán. La formación de estos cristales de formazán fue menos evidente en los pozos control. La figura 12 muestra la viabilidad celular obtenida de esta prueba comparada con una muestra control.

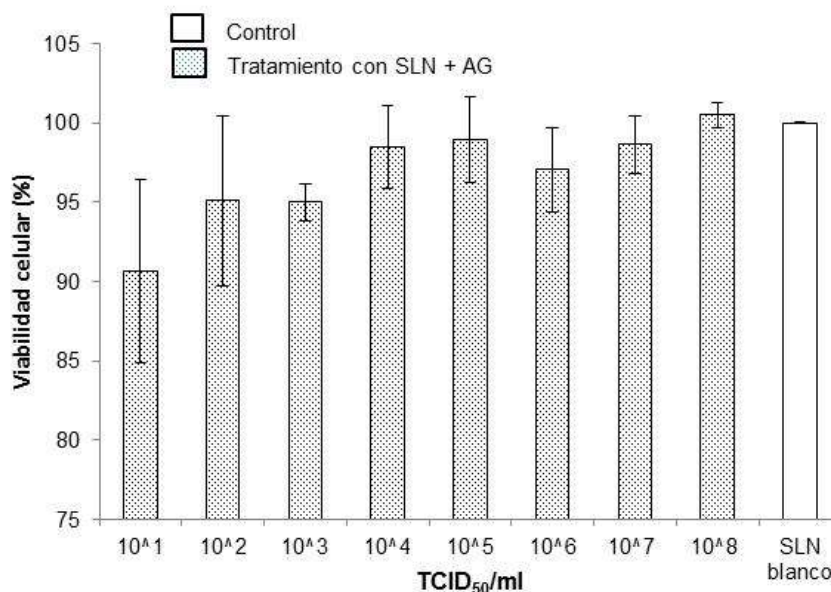


Figura 12. Viabilidad celular obtenida por el ensayo de MTT después del tratamiento con SLN que tienen AG. La citotoxicidad: se evaluó después de 72 h de exposición en células previamente infectadas. Los resultados se presentan como media \pm error estándar; $n = 3$.

La figura 13 muestra ejemplos representativos de los cambios en el monoestrato arriba descritos.



Figura 13. Micrografías de células control (A); células tratadas con SLN y simultáneamente infectadas con PRRS (1×10^5 TCID₅₀/ml), se observan estructuras tipo aguja (B); células tratadas con SLN después de 72 h de exposición (C).

7. DISCUSIÓN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino es una de las enfermedades que causa importantes pérdidas económicas en países productores de cerdo, por lo que existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de la infección producida por este virus. La vacunación contra este virus es un problema primordial porque la protección es solo parcial; las vacunas vivas modificadas han demostrado ser efectivas contra cepas homólogas pero variables contra cepas heterólogas. Más grave es el hecho de que pueden revertir hacia la virulencia. Las vacunas muertas son menos efectivas en prevenir la enfermedad e infección. Otras alternativas disponibles para el tratamiento de infecciones por PRRS incluyen la administración de quinolonas como PlasmocinTM, ácido nalidíxico, ciprofloxacino (Cafruny, Duman, Raymond, Nelson & Wong, 2008); probióticos (Kritas & Morrison, 2007); vacunas quiméricas (Ellingson, Wang, Layton; Ciacci-Zanella, Roof & Faaberg, 2010); péptido conjugado al oligómero morfolino (Opriessnig, Patel, Wang, Halbur, Meng, Stein, & Zhang, 2011) y montmorillonita-vinagre de bambú (Lin, Chueh, Lee & Ho, 2011). Sin embargo, algunos de ellos resultan muy caros para llevarlos a producción a gran escala.

El AG se ha usado por muchos años en la medicina tradicional de varias culturas alrededor del mundo y su actividad antiviral ha sido probada contra muchos virus de manera *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, como sal de amonio, el GA ha sido poco estudiado en relación a su citotoxicidad y actividad antiviral contra PRRS.

En la presente investigación, se estudió por primera vez el efecto de AG sobre cultivo celular no infectado e infectado con el virus de PRRS. La evaluación de los efectos tóxicos que puede producir un compuesto con potencial actividad antiviral es una parte muy importante en su caracterización, ya que ninguna molécula candidata debe mostrar toxicidad aguda o crónica contra el huésped.

De acuerdo a Andrighetti-Fröhner, Antonio, Creczynski-Pasa, Barardi y Simões (2003), un compuesto antiviral puede selectivamente actuar sobre procesos específicos del virus con poca o ninguna interferencia en el metabolismo celular. Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se basan en medir cambios en la función celular o daños estructurales como resultado de los efectos tóxicos producidos por un químico o compuesto. Tales cambios pueden evaluarse usando ensayos de viabilidad celular (p. ej. entrada de un colorante como el azul de Tripán en células muertas) o ensayos de función mitocondrial (p.ej. MTT). Adicionalmente, la observación microscópica de los cambios morfológicos en células ha sido empleada como indicador de la toxicidad de un compuesto. En esta investigación, la

toxicidad de AG en células MARC 145 se estudió por observación microscópica directa y por las pruebas de viabilidad celular (TAT y MTT).

La concentración citotóxica de AG (CC₅₀) fue mayor a 4.2 mg/ml, como se muestra en la curva concentración-respuesta. La CC₅₀ reportada por otros autores son > 20 mg/ml, > 3 mg/ml y 3.78 mg/ml para células Vero y Raji (Cinatl *et al.*, 2003, Crance *et al.*, 2003, Lin *et al.*, 2008), mientras que Wang, Sun, Wu, Jiang, Bai y Li (2013) reportaron una CC₅₀ mayor a 4 mg/ml para glicirretato de dipotasio sobre células MARC 145, un resultado que es muy similar al encontrado en esta investigación.

Aunque el porcentaje de células viables encontrado por el ensayo de MTT excedió el 80% en todas las concentraciones probadas; la TAT mostró que la viabilidad celular disminuyó de un modo dependiente de la concentración. En el examen visual del cultivo celular se observó daño a la morfología celular a partir de 0.9 mg/ml. La reducción en viabilidad obtenida con la TAT se debe probablemente a un efecto citostático y no a muerte celular. Esta diferencia entre los resultados de MTT y TAT enfatiza la necesidad de usar métodos diferentes para la evaluación de citotoxicidad, para tener conclusiones más sólidas respecto al desempeño de los compuestos, porque en algunos casos en los que las células presentan cambios morfológicos, la captación del colorante puede indicar valores equivalentes a aquéllos de células no tratadas.

Los cambios morfológicos en monoestratos celulares pueden explicarse por el hecho de que GA es una saponina, por lo que posee actividad de superficie y es capaz de solubilizar compuestos hidrofóbicos. Como la estructura de la membrana celular incluye tales moléculas, es susceptible de sufrir daño por el fármaco. Asimismo, se ha encontrado que el glicirricinato de dipotasio altera y fluidiza la membrana lipídica de liposomas. Debido a que la estructura química del AG es similar a aquella del glicirricinato de potasio, tal vez pueda actuar de una forma similar sobre las membranas celulares (Trotta, Peira, Debernardi & Gallarate, 2002; Trotta, Peira, Carlotti & Gallarate, 2004).

Otro resultado fue que la concentración efectiva de AG requerido para inhibir el efecto citopático al 50% fue relativamente baja comparada con los valores reportados en estudios previos para el efecto antiviral sobre otros virus (Cinatl *et al.*, 2003; Lin, 2003; Hoever *et al.*, 2005). Ya que la EC₅₀ fue de 0.48 mg/ml, se puede suponer que aún a bajas concentraciones de AG se logran respuestas efectivas.

Un resultado relevante obtenido con la TAT mostró un alto porcentaje de células viables (entre 85-95%) en todas las concentraciones aplicadas, mientras que el ensayo de MTT no mostró diferencia estadística en la viabilidad celular entre grupos. Es probable que la

TAT solo haya mostrado cambios en la morfología celular más que muerte celular evidente.

El índice de selectividad calculado fue de 8.7, lo que lleva a la conclusión que AG es activo contra PRRS. Crance *et al.*, 2003, reportaron valores de índice de selectividad mayores a 4 para virus de la familia *Flaviviridae* (19). Probaron cuatro antivirales y a pesar de que el AG mostró un índice de selectividad bajo comparado con los otros, fue un inhibidor potente de todos los flavivirus. Para el caso de SARS asociado a coronavirus, el índice de selectividad fue >8.33 (17). Es importante mencionar que el índice de selectividad de un compuesto puede ser influenciado moderadamente por el tipo de cepa y virus probados.

Por otro lado, el AG logró disminuir el título viral dos logaritmos, lo que indica una buena actividad antiviral contra PRRS. Previamente, Wolkerstorfer *et al.*, (2009) reportaron una reducción del título CCID₅₀ de 90% para células pulmonares de humano infectadas con el virus de influenza A.

Los resultados anteriormente descritos confirman que el AG tiene un alto potencial para tratar infecciones por PRRS. El mecanismo por el cual dicho fármaco ejerce su actividad antiviral no está del todo dilucidado y está fuera del objetivo de este trabajo. Sin embargo, Harada (2005) demostró que la adición de AG a un virus envuelto (como el caso de PRRSv), modificó la membrana plasmática y la envoltura de VIH; inhibiendo así la infección viral por disminución de la fluidez de las membranas lipídicas y, consecuentemente, previniendo la formación de poros de fusión requeridos para penetrar los virus envueltos.

Un aspecto importante para tomar en cuenta en futuros estudios es la capacidad del AG de formar una estructura de gel a ciertas concentraciones y temperatura. La molécula de AG tiene una porción hidrofóbica y una hidrofílica que interactúan entre sí para formar micelas, las cuales dan inicio a la formación del gel (Kondo *et al.*, 1986). Durante la preparación de las soluciones de AG se observó que en concentraciones por arriba de 10 mg/ml la solución gelificaba haciendo difícil su aplicación sobre el monoestrato. Esa fue la razón de probar sólo concentraciones menores a 1 mg/ml; sin embargo, ya se está estudiando al AG como un posible acarreador o soporte en su forma de gel, solo o combinado con otros fármacos como una nueva formulación farmacéutica para tratar otras enfermedades de interés veterinario. Es la primera vez que en una evaluación *in*

in vitro de la actividad antiviral del AG se menciona la capacidad de las soluciones en concentraciones arriba de 10 mg/ml de formar un gel.

Los resultados son trascendentes al ser la primera vez que el AG es probado contra PRRS, sobretodo porque se observó reducción de la replicación viral, tal como se demostró por reducción del título viral en dos logaritmos.

Para la obtención de las SLN, se empleó el método de enfriamiento de una microemulsión. Como se mencionó anteriormente, para formarla se requiere de uno o más tensoactivos y, en la mayoría de los casos, un cosurfactante. En la formulación el Pluronic® F127 y el mismo fármaco, AG, funcionaron como tensoactivos; la razón de ello es que el AG al poseer porciones hidrofílicas e hidrofóbicas en su estructura química, y al ser una saponina, se comporta como un agente activo de superficie (Segal *et al*, 1985).

Durante el proceso de desarrollo de la formulación se probaron distintas concentraciones de fármaco y tensoactivo y se mantuvo constante la concentración del lípido (10% p/p en la formulación). Con estos experimentos se encontró que la mejor proporción que formaba la microemulsión fue: 10% de Gelucire®, 1.5% Pluronic® F127, 3% AG y 85.5% de agua; tratándose de una microemulsión aceite en agua (o/w). Es importante mencionar que cuando se colocaron en la formulación solo AG con Gelucire® o AG con Pluronic®, no se formaba ninguna dispersión blanca azulada al enfriar, característica de la presencia de las SLN (y NPs en general). Lo que indica que es necesaria la presencia de los tres compuestos para la formación de las SLN.

Con respecto al TPP de las SLN, este se mantuvo en un rango de 90-180 nm por 12 días. Después de este tiempo, se observó un cambio físico en la dispersión al mostrarse cada vez más blanca, lo que indica que el lípido cristalizó y formó aglomerados. El Gelucire® es una mezcla de mono-, di- y triglicéridos, con diferentes longitudes de cadena, y es bien sabido que los glicéridos presentan polimorfismo por lo que sufrirán cambios en su acomodo espacial teniendo como consecuencia la salida o desorción del fármaco cuyo efecto final es la inestabilidad de la formulación (Heurtault, Saulnier, Pech, Proust & Benoit, 2003; Müller *et al.*, 2000; Westesen *et al.*, 1997). Este defecto puede resolverse al liofilizar la dispersión de nanopartículas al término del proceso de obtención de las mismas.

En cuanto al índice de polidispersión, los valores menores a 1 indican que la distribución de tamaño es homogénea. El valor de potencial Z (menor a 30 mV en todos los lotes)

puede indicar una estabilidad baja en la dispersión, pero en este caso la estabilización de las partículas fue debido a la repulsión estérica ejercida por el estabilizante de tipo tribloque copolímero (Pluronic® F127). El potencial Z inicial fue de casi 11 mV para las SLN de la formulación optimizada y de 22 mV para SLN blanco, estos valores indican inestabilidad (en el caso de dispersiones que se estabilizan por cargas eléctricas); sin embargo, la formulación contiene Pluronic® F127, un tensoactivo no iónico que ejerce su efecto por repulsión estérica de las cadenas hidrofílicas que lo conforman (polioxietileno), y por lo tanto, las partículas se mantienen separadas (Heurtault *et al.*, 2003).

El empleo de MEB permitió observar estructuras esféricas, lisas, sin cristales en la superficie ni tampoco presencia de NPs aglomeradas. Las micrografías corroboran la ausencia del punto de fusión del AG en el termograma de las SLN con fármaco. También es notorio que el tamaño es homogéneo, encontrándose entre los 100-200 nm aproximadamente. Estos datos concuerdan con los obtenidos por DLS.

Con la técnica DSC es posible estudiar las posibles interacciones entre el fármaco y los diversos componentes de la formulación que puedan dar información de posible inestabilidad en el sistema, o la presencia de cristales, entre otros aspectos.

Tanto el fármaco, como el lípido y el tensoactivo muestran entalpías de fusión características.

En las SLN blanco (sin AG) se aprecian dos picos de fusión en 26.8°C y 35°C; mismos que desaparecen en SLN con AG al 3%, estas entalpías de fusión se atribuyen a posibles estructuras de asociación formadas entre el Gelucire® y el Pluronic® ya que el lípido tiene la propiedad de autoemulsificarse y las propiedades de los tensoactivos de asociarse favorecerían la formación de estas estructuras. El hecho de que estos picos de fusión desaparezcan en presencia del fármaco (SLN con AG), se explica porque el AG puede actuar como un “defecto” que modifica la estructura de la NP por disrupción de las interacciones lípido-lípido o lípido-tensoactivo, al insertarse entre las cadenas del glicérido (Müller, Runge, Ravelli, Thunemann, Mehnert & Souto 2008; Panicker, 2006). En las SLN con fármaco, alrededor de 112°C existe un evento térmico atribuible a evaporación de agua.

El ensayo con las SLN con y sin AG, no mostró resultados claros. Hubo cambios morfológicos en monocapas después de 24 h de tratamiento con SLN. Aparentemente, un efecto citotóxico pudiera ser el responsable de este resultado, tal como lo muestran los

resultados de la TAT, que muestra una disminución significativa de células viables ($P < 0.05$) (78-82 % vs control) al término (72 h).

Sin embargo, la viabilidad celular a las 72 h por el ensayo de MTT en células tratadas con SLN no mostró diferencias significativas para todas las diluciones virales vs el control positivo (Tukey $P > 0.05$). Además, a las 48 h todas las células tratadas con SLN que contenían AG mostraron la formación de estructuras tipo aguja, mismas que aumentaron en número hasta que el tratamiento terminó. Este fenómeno se observó en hepatocitos de rata incubados con ácido palmítico, el cual después de una rápida conversión a triglicéridos, y debido a la combinación de factores, resultó en saturación de la superficie citosólica del retículo endoplásmico con moléculas de triglicéridos iniciando la formación de estructuras tipo aguja o espina (Ontko, David & William, 1998). Gelucire[®] es una mezcla de mono-, di- y triglicéridos; por lo que una saturación de estas moléculas puede favorecer la formación de los cristales tipo aguja que se observaron en esta investigación. Después de la adición de MTT, algunos pocillos se llenaron por completo de estos cristales con forma de aguja, aparentemente atribuidos al formazán. En los pozos control, la formación de los cristales fue menos evidente. Este comportamiento también se ha observado en liposomas vacíos sobre células tipo macrófago P388D1. En esta investigación, Angius y Floris (2015) observaron tales estructuras después de 120 min de tratamiento con MTT, indicativo de la saturación de formazán/lípido y concluyeron que los liposomas causaban un aumento en el almacenamiento de formazán en las células. Es bien sabido que el formazán tiene alta afinidad por los lípidos porque al ser lipofílico por naturaleza tiende a acumularse en membranas celulares y gotas de lípido. De esta manera el formazán formado puede acumularse en las SLN, resultando en un aparente aumento de la viabilidad celular. En contraste con este resultado, el número reducido de células viables encontrado con la TAT después de 24 h de tratamiento con SLN, probablemente se debe al resultado de un efecto citostático más que muerte celular. Considerando estos resultados, se puede concluir que las células tratadas con SLN interfieren con el ensayo de MTT; por lo que es recomendable combinar diferentes métodos de evaluación de la viabilidad, incluyendo el conteo directo o pruebas de exclusión de colorante, o incluso métodos aún más sofisticados pero confiables.

8. CONCLUSIONES

Las soluciones acuosas de ácido glicirricínico mostraron cierta actividad antiviral *in vitro* sobre células MARC infectadas con PRRSv, mientras que con las nanopartículas no fue posible determinar de manera contundente este mismo efecto.

El título viral disminuyó dos unidades logarítmicas tras el tratamiento de las células infectadas con soluciones acuosas de ácido glicirricínico, lo cual representa un resultado alentador para un posible tratamiento contra esta enfermedad.

De acuerdo a los estudios *in vitro*, con la CC_{50} y EC_{50} , se calculó el índice de selectividad el cual indica que el AG es activo contra el virus de PRRS.

El método elegido para la preparación de la formulación submicrónica fue el de enfriamiento de una microemulsión, ya que este nos permitió obtener SLN con características adecuadas con respecto a tamaño, carga y estabilidad.

Al aplicar la formulación de nanopartículas sobre cultivo celular no infectado e infectado no se observó un efecto claro sobre la viabilidad celular, por lo que se considera necesario realizar pruebas adicionales que en conjunto proporcionen información sobre Es posible que las SLN interfieran en el ensayo de MTT, promoviendo la acumulación del formazán en las nanopartículas con lo que habría un aumento aparente de la viabilidad celular.

Un aspecto importante para tomar en cuenta en futuros estudios es la capacidad del AG de formar una estructura de gel a ciertas concentraciones y temperatura, ya sea como sistema acarreador de otros fármacos o como una forma de administración de AG.

Perspectivas

- Probar el ácido glicirricínico en solución acuosa contra otros virus de interés veterinario.
- Realizar pruebas complementarias *in vitro* para evaluar si existe efecto antiviral de las SLN sobre cultivo celular infectado por PRRS.
- Evaluar tanto las soluciones acuosas como las SLN en campo, para estudiar su efectividad *in vivo* y hacer una comparación del desempeño de ambas; para ello, se aplicarán las formulaciones a lechones (grupo control y grupos de prueba) dentro de una cámara de nebulización para administrar directamente el fármaco, posteriormente se realizarán las siguientes pruebas para comparar los resultados: observación de signos clínicos (temperatura, peso, respiración), producción de anticuerpos (ELISA), PCR, necropsia y microscopia electrónica de barrido.

Artículo aceptado para publicación

Preparation of ethyl cellulose nanoparticles by solvent-displacement using the conventional method and a recirculation system

Zaida Urbán-Morlán^{1*}, Susana E. Mendoza-Elvira², Ricardo S. Hernández-Cerón¹, Sergio Alcalá-Alcalá¹, Humberto Ramírez-Mendoza³, Abel Ciprián-Carrasco², Elizabeth Piñón-Segundo⁴, David Quintanar-Guerrero¹

¹Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. 1° de Mayo s/n, Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, CP 54740.

²Laboratorio de Microbiología y Virología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. 1° de Mayo s/n, Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, CP 54740.

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, México, DF.

⁴Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada, L13, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, CP 54714.

*Corresponding author: Av. 1º de Mayo s/n, Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, CP 54766. Tel +52 55 5623 20 65; Fax + 52 55 5623 20 43; mzum_1212@hotmail.com

Abstract

Ethyl cellulose polymeric nanoparticles (NPs) were prepared using the solvent-displacement technique with ethanol as the solvent. Optimization of the method included evaluating stirring rate and stabilizer type. NPs of 142.1 to 226.5 nm were obtained in a reproducible and efficient way (95% process efficiency) and with good stability (at room temperature). Moreover, a recirculation device was used in order to obtain concentrated NPs dispersions by a continuous process with potential scale-up. This method was challenged to encapsulate a hydrophilic antiviral model molecule (glycyrrhizinic acid) resulting in low entrapment efficiencies (approximately 1%).

The results indicate that NPs are obtained using this simple, economical process that offers the possibility to transport different agents for applications in food-processing, cosmetics production or pharmaceutical products.

Resumen

Se prepararon nanopartículas poliméricas (NPs) de etilcelulosa por la técnica de desplazamiento de disolvente usando etanol como disolvente. La optimización del método incluyó evaluación de la velocidad de agitación y el tipo de estabilizante. Se obtuvieron NPs de 142.1 a 226.5 nm en un modo reproducible y eficiente (95% eficiencia del proceso) y con buena estabilidad (a temperatura ambiente). Además, se utilizó un dispositivo de recirculación con la finalidad de obtener dispersiones concentradas por un proceso continuo con potencial de escalamiento. Este método se retó para encapsular una molécula hidrofílica antiviral modelo (ácido glicirricínico) teniendo como resultado bajas eficiencias de encapsulamiento (aproximadamente 1 %).

Los resultados indican que se obtienen NPs de etilcelulosa por este método simple y económico que ofrece la posibilidad de transportar diferentes agentes para su aplicación en alimentos, cosméticos o productos farmacéuticos.

Keywords: ethyl cellulose, polymeric nanoparticles, solvent-displacement method, optimization, recirculation device.

Palabras clave: Etilcelulosa, nanopartículas poliméricas, método de desplazamiento de solvente, optimización, dispositivo de recirculación.

Introduction

For at least the past three decades, polymeric NPs have been extensively studied as carriers for drugs and other substances. The preferred polymers are biodegradable, but some non-biodegradable ones also have important pharmaceutical characteristics that can be exploited according to the route of administration.

In 1987, Fessi et al., developed and patented a method to prepare nanoparticles called solvent-displacement, or nanoprecipitation [1]; which has the advantages of being simple, economical, reproducible and fast [2, 3]. Moreover, the amounts of organic solvent and surface-active agents needed are small, and the resulting particles are also small, generally with narrow polydispersity indexes. Furthermore, mechanical or thermal stress is minimal because prolonged shearing/stirring times, sonication, or very high temperatures are not required, which lowers energy consumption. Additionally, solvents with low toxic potential could be used [1, 2, 3].

In general, this method requires two miscible phases: one solvent, the other non-solvent. The polymer and the drug selected are dissolved in the solvent phase (eg. acetone, ethanol, methylene chloride, etc.), while a stabilizer is incorporated into the non-solvent phase (usually water). The injection of the organic phase into the aqueous phase under magnetic stirring leads to immediate formation of NPs due to displacement of the solvent. The pre-formed polymers most commonly used in this technique are biodegradable polyesters (eg. poly (ϵ -caprolactone), poly (D-lactic-*co*-D-glycolic) acid) and, to a lesser extent, cellulose derivatives; however, the first are quite expensive. Another option to form polymeric nanoparticles is ethyl cellulose, a water-insoluble, non-biodegradable, ether cellulose polymer that forms strong, tough films with good adhesion at low concentrations [4].

Different studies have proposed using ethyl cellulose as the matrix polymer to formulate drug NPs. Tachaprutinun et al. (2009) [5] attempted to encapsulate astaxanthin in ethyl cellulose NPs using the solvent-displacement method through a dialysis bag, but their results were disappointing, since using this modality to obtain NPs makes process scale-up very difficult. A high-loading encapsulation of six fragrances was achieved with a polymer

blend (ethyl cellulose, hydroxypropyl methyl cellulose and polyvinyl alcohol) using the solvent-displacement method. Because all the fragrances were lipophilic, high encapsulation efficiency was achieved; but, once again, the dialysis bag system was an important drawback in terms of obtaining and encapsulating the oils efficiently [6]. Arias et al. [7] developed a magnetic colloid with iron in the core of the particle, surrounded by a polymeric shell of ethyl cellulose. The process followed to prepare the magnetic NPs was emulsion solvent evaporation. In addition, two methods of drug-loading were studied: addition and adsorption. High drug-loading was obtained with both methods, but the main drawback of this research was the use of benzene and decane in the process, since both substances are toxic (ICH Class 1).

On the other hand, Piñón-Segundo et al., [8] proposed a novel recirculation system (Figure 1b) to prepare poly(ϵ -caprolactone) NPs by solvent-displacement to obtain dispersions with high polymer concentrations. This device represents a considerable industrial advantage and offers the possibility of scaling-up the solvent-displacement method, while also helping to improve efficiency and avoid polymer-aggregation as the ethanol diffuses. The device they designed permits constant changes of water after first contact with the organic solution.

In the literature, there are two mechanisms to explain NP formation by this technique. The first one proposed that the interfacial turbulence at the interface of the solvent and non-solvent phases (which are governed by the Marangoni effect) [3] together with diffusion and flow phenomena, lead to polymer aggregation from stabilized emulsion droplets. As the two solvents are mutually miscible, when they are mixed a violent spreading occurs because of the difference in surface tension between them. Thus, a constant formation of

eddies of solvent at the interface of the two phases causes the polymer present in the solvent droplets to aggregate and form NPs as a consequence of the lack of a non-solvent medium and continuous solvent diffusion which are rapidly stabilized by the surfactant [2, 9, 10, 11]. Figure 1a shows the process of nanoparticle formation using this mechanism.

Fig. 1

More recently, some publications have explained nanoparticle formation based on the “ouzo effect” [12, 13], which occurs in a ternary system composed of a hydrophobic solute, a solvent, and a non-solvent; specifically in the so-called ouzo region between the bimodal (miscibility-limit) and spinodal (stability-limit) curves, called the metastable region where the hydrophobic solute is introduced rapidly to cause super-saturation and then nucleation and growth process. In this process, polymer molecules act as the hydrophobic solute molecule with the ability to grow and generate polymeric NPs (Figure 2). This is why droplet or particle size will depend on the polymer concentration in the organic solution [15]. On the right side of the ouzo boundary (spinodal curve) the polymer precipitates spontaneously because of solution instability and large fluctuations in the solute concentration, yielding macroscopic aggregates [16].

Fig. 2

One issue with the solvent-displacement technique is that it is limited to water-miscible solvents and, as a result, only drugs that are soluble in these solvents can be incorporated. Then, one of the goals of this research was to encapsulate a model drug (specifically, glycyrrhizinic acid, GA, in its non-ionized form) by the solvent-displacement method to challenge this system which is usually used to carry lipophilic drugs, but holds the appealing potential of being able to transport water-soluble drugs as well.

GA is a water-soluble molecule comprised of a hydrophilic part (two moieties of glucuronic acid) and a hydrophobic fragment (a moiety of glycyrrhetic acid, known as the aglycone moiety) (Figure 3) [17]. The acid form is easily soluble in alcohol (methanol and ethanol). This drug is a weak acid with five hydroxyl and three carboxyl groups and presents three pK_a values ($pK_{a1}= 2.76$; $pK_{a2}= 2.81$; $pK_{a3}= 4.71$) [18]. FDA has included this molecule in the list of GRAS (*Generally Recognized as Safe*) substances [19]. For many years, glycyrrhizinic acid (GA) has been used as anti-ulcer, anti-inflammatory, anti-tumor, and anti-viral [17, 20] and is the most important saponin of licorice root.

Figure 3

Finally, the main objective of this research was to produce NPs of ethyl cellulose in a reproducible way by the solvent-displacement technique using ethanol as solvent, and following the conventional method or the recirculation system, in order to determine if NPs can be formed efficiently and with the desired characteristics of size and electrical charge. The selection of this particular polymer (EthocelTM Std 4 Premium or Std 10 FP) was based on its lower cost compared to biodegradable polymers; also, since it is pharmaceutical grade, it is already approved and accepted worldwide; furthermore they present different viscosity ranges (3-5.5 and 9-11 cP), which is a feature that impacts nanoparticle formation. The use of ethanol as a solvent has additional advantages, since it is classified as ICH Class 3, has low toxic potential, and is relatively inexpensive and polar, which could allow it to encapsulate polar drugs. Therefore, the solvent-displacement technique proposed in this research is a simple, economical, one-step process for producing nanoparticles. Stirring rates and stabilizer type were examined as the main preparative variables. The recirculation system was evaluated in order to obtain a continuous process which helps produce

concentrated nanoparticle dispersions. No homogenization process was required in either case, which means additional savings in energy and other costs for industrial applications.

Results and Discussion

As expected, mean particle size was inversely- proportional to stirring rate: *i.e.*, the higher the stirring rate, the smaller the particle size (Figure 4).

Fig. 4

The reduction in particle size at higher velocities is explained due to the increase in kinetic energy on the solvent front that caused a higher degree of polymer/solvent-droplet dispersion in the aqueous phase, thus reducing local saturation of the polymer/solvent droplets in the aqueous phase [3].

With all stirring rates it was possible to obtain sub-micron sizes for both polymers; ranging from 180-226 nm, 160-209 nm, and 142-185 nm at 11,000, 13,000 and 16,000 rpm, respectively (Table 1); with no need for a homogenization process (a factor of economic interest for industry as it allows energy and money savings).

Table 1

According to the mechanism of particle formation due to interfacial turbulences (Marangoni effect), when globules of the emulsion are finer and homogeneous, the polymer-saturated region becomes thinner; thus facilitating the stabilization and formation of smaller particles [21, 22, 23]. The process of mixing the organic phase that contains the polymer with the aqueous phase is an important factor that strongly impacts final particle size.

We found that the particle size obtained with EthocelTM Std 4 was smaller than that produced with EthocelTM Std 10 at the same stirring rates This can be explained by the

higher viscosity achieved with the latter due to the higher number of ethoxy groups in its structure. The higher the viscosity of the polymer solution, the lower the solvent diffusion rate, but the NPs formed from the turbulent flow of the solvent will be larger [3, 23, 24]. Upon analyzing the “ouzo effect”, we found that Ostwald ripening has a great impact on final particle size, mainly due to the diffusive transport of dissolved matter through the dispersion medium. Thus, it is to be expected that in more viscous solutions the rate of diffusion will be lower and will exert an effect on final nanoparticle size. In addition to the viscosity of the phase containing the polymer, that of the solvent *per se* also plays an important role in nanoparticle formation.

According to some experiments, increasing the rate of diffusion allow obtaining smaller particles. In this regard, upon studying three different solvents (acetone, acetonitrile and tetrahydrofuran, with diffusion coefficients in water of 1.28, 1.26 and 1.08 $\times 10^{-5}$ cm²/s, respectively) size decreased in the following order: acetone < acetonitrile < tetrahydrofuran [3] for PLGA nanoparticles. Ethanol has a diffusion coefficient of 1.21 $\times 10^{-5}$ cm²/s but, as can be seen in Table 1, some batches would fix in size between the sizes reported using acetonitrile and tetrahydrofuran. However, size depends not only on diffusion velocity but also, as explained above, on the polymer concentration and stirring rate [3, 22].

Two types of stabilizers were tested, PVAL and SLS with both it was possible to obtain stable dispersions with EthocelTM Std 4 and PVAL at 5% w/v and EthocelTM Std 10 and SLS at 2% w/v. Two different concentrations of SLS were tested (1.5% and 2% w/v), and the best results were obtained with 2% of SLS, because an absence of agglomerates or sediment characterized these systems during at least 15 days. Also, particle size was under 300 nm. According to the mechanism of NP-formation under the method used, when

solvent-displacement occurs because of the miscibility between ethanol and water, droplets of the solvent are rapidly stabilized by the surfactant when they are torn from the solvent's interface. Hence, if there are more molecules of the stabilizing agent at the interface, the resulting particle will be protected against aggregation more efficiently than in a system that contains a lower concentration of stabilizer [22, 23]. SLS is an ionic surfactant, while PVAL is non-ionic. In this respect, SLS exerts its function through charge repulsion, while PVAL acts as a barrier among NPs [9, 23]. Quintanar-Guerrero et al. concluded that PVAL chains are strongly-attached to the NP surface, forming a stable layer which exerts sufficient steric stabilization-producing dispersions that remain stable for long periods of time [25].

For practical purposes, the following batches were prepared at a constant stirring rate of 11,000 rpm because while particles of nanometric size were obtained at all stirring rates tested (Table 1), the separation procedure proved to be quite difficult with smaller sizes as they required longer ultracentrifugation times.

Table 1 shows the results of mean particle size and Z-potential for EthocelTM Std 4 and 10 NPs. Z-potential suggests that stable dispersions were obtained with SLS at 2% w/v (Table 1) because the value of those batches was above $|30 \text{ mV}|$ [26]. Colloids in aqueous media present an electrical charge, and their stability was determined by adding the contribution of van der Waals attractive forces and electrical double-layer repulsive forces. SLS is an anionic surfactant that provides a negative charge to the nanoparticle which acts as an energy barrier that prevents two particles from adhering or coalescing. Batches with PVAL had a Z-potential close to 30 mV. Although these values are not as high as those obtained for NPs with SLS, they are also considered stable due to the steric repulsion that PVAL exerts, as discussed above.

With respect to mean particle size, findings indicate that the particles obtained were of the desired size, and these results were corroborated by micrographs (Figure 5). Microscopic observation revealed spherical particles with a diameter of 250 nm that corresponded to the results obtained by dynamic light-scattering. SEM also revealed spherical particles with a solid matrix structure, but no crystal formation on the surface.

Fig. 5

In the conventional solvent-displacement method and in the recirculation system the same polymer and stabilizer concentrations in the organic phase were used. However, in the recirculation system, consecutive injections of 20 mL of organic solution were carried out. The mean sizes obtained with the recirculation system were very similar to those produced by the conventional method (ranged from 160 to 197 nm for both polymers) (Table 2). It is important to point out that after the third injection of the organic phase into the aqueous phase of the device; particle size did not change; suggesting that polymer aggregation take place in the aqueous phase with no deposition on the dispersed particles. This behavior changed with the ensuing injections, when size increased quickly to micrometer range. The recirculation of the aqueous phase into the device allows to continually changing the water having first contact with the organic solution during the process of nanoparticles preparation. For that reason, recirculation system would avoid a possible saturation of the medium as ethanol diffuses, so the process of nanoparticle formation would be more efficient than the traditional process, and a higher quantity of polymer would be transformed into nanoparticles. In this case, the maximum concentration of nanoparticles dispersion was 70 mg/ml.

Table 2

The batches prepared with the drug increased their particle size (227 nm and 262 nm for Ethocel™ Std4 and 10, respectively), while Z-potential remained virtually identical (no statistically-significant difference, $p < 0.05$). Additionally, the freeze dried NPs were easily re-suspended and showed a physical stability for 15 days at room temperature.

However, our attempt to encapsulate GA in its non-ionized form resulted in low entrapment efficiency for both polymers (approximately 1%), as determined by HPTLC, *High Performance Thin Layer Chromatography* (data not shown). The reason of modifying the ammonium salt of GA to obtain the molecular form (neutral and more hydrophobic) of it obeys to the fact that as having any electrical charge on the molecule, it will be more easily entrapped. The non-ionized form of GA was obtained under strong acidic conditions, this means at pH values lower than the first pKa of the molecule ($pK_{a1} = 2.76$) [18] and has the same therapeutic properties as the ionized form. In contrast, our group encapsulated 4.3% of the same drug using the double-emulsion technique [21]. This was due to the high solubility of the drug in the aqueous phase, which led to diffusion from the water-miscible organic phase into the external aqueous phase. We are currently attempting to enhance drug entrapment by decreasing water-drug solubility through the formation of an ion-pair between GA and a salt which acts as a counter-ion under certain conditions, such as pH and the concentration of this salt. Preliminary results show an improvement in this characteristic.

Ethyl cellulose NPs were obtained using the solvent-displacement method that has the advantages of being a fast and economical technique that employs an affordable, non-toxic polymer. The conventional method and the recirculation system produced NPs successfully; the latter with the attractive potential for scale-up. Additionally, the recirculation system permits the continue production of NPs, the polymer is completely

transformed into NPs with no apparent aggregation, the efficiency would be higher than the conventional method, the polydispersity indexes are lower resulting in more homogeneous particle sizes and the scaling-up for an industrial application is simple. Results showed that it is possible to obtain submicronic dispersions up to a maximum concentration of 70 mg/ml without aggregation (size less than 200 nm and Z-potential indicating good stability) for both polymers used. To the best of our knowledge, this is the first time that ethyl cellulose (EthocelTM) NPs have been obtained with good physical and chemical characteristics by this method. The attempt to encapsulate a hydrophilic model drug resulted in very low encapsulation; however, these carriers may have a wide variety of applications in such areas as food-processing, cosmetics production and pharmaceuticals. Also, they can be used as a coating or film-forming material.

Experimental

Materials

Ethyl cellulose polymers (EthocelTM Std 4 Premium and EthocelTM Std 10 FP Premium) (Figure 5) were donated by Colorcon de México, S. de R.L. de C.V. Poly(vinyl alcohol) (PVAL) with a molecular mass of 31,000 (Mowiol[®] 4-88) was obtained from Hoechst (Frankfurt-am-Main, Germany). Sodium lauryl sulphate (SLS) was provided by Hycel de México, S.A. de C.V. Glycyrrhizinic acid (GA, ammonium salt, ≥95% purity) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Absolut Ethanol ACS was supplied by Fermont (Monterrey, Mexico), and the distilled water was obtained from a Milli-Q station (Milli-Q, USA). All other reagents were at least of analytical grade and used without further purification.

Fig. 5

Glycyrrhizinic acid in its non-ionized form

Briefly, 5 g of ammonium salt of GA was dissolved in distilled water under magnetic stirring. Then a solution 0.1 N of HCl was added until the formation of a rigid gel. After removing the water from this gel in an oven at 50°C, the precipitate was filtered and washed with distilled water. Finally, a fine white powder was obtained after drying in a desiccator.

Nanoparticle preparation using the solvent-displacement method

The conventional solvent-displacement method was used [5, 6] to prepare the NPs. An initial screening of the main parameters that commonly have impact on NP formation was performed as the first step of the study. The studied parameters were stirring rate, time of stirring, type and concentration of stabilizer. Briefly, 400 mg of EthocelTM Std 4 Premium or Std 10 FP Premium were dissolved in 20 ml of ethanol. When the model drug was included, 30 mg were dissolved in this phase. This solution was placed in a syringe and injected into 40 ml of a solution of the stabilizing agent during 4 min under high-speed stirring at room temperature (Ultraturrax[®] T25, IKA; NC, USA). Finally, the residual ethanol was eliminated by vacuum distillation at 25°C and 70 mmHg. The remaining stabilizer and un-encapsulated drug was then removed by ultracentrifugation at 35,000 rpm for 40 min (Beckman[®] Optimal LE-80K, CA, USA).

To determine the effect of the process conditions, NPs were prepared at different stirring rates: 11,000, 13,000, and 16,000 rpm, with a high-speed stirrer (Ultraturrax[®], T25, IKA, NC, USA) and two types of stabilizers, PVAL (5% w/v) and SLS (1.5% and 2% w/v). Batches were prepared in triplicate.

Freeze-drying of some batches was performed after removing the excess of stabilizer in a Freezezone 6 (Labconco®, United Kingdom) lyophilizer for 24 h at -40 °C and 100×10^{-3} mbar.

Recirculation system

The device used was the one proposed by Piñón-Segundo [16] (Fig. 1b). The organic/aqueous phase ratio and polymer and stabilizer concentrations were kept at the same proportions used in the conventional solvent-displacement method. The organic phase was injected directly into the circulating distilled water at a fixed injection rate of 25 ml/min, using a Masterflex® L/S 7518 pump (Cole Parmer, USA), and the recirculation rate at 55 ml/min was controlled by a Watson Marlow 502 S pump (New Brunswick Scientific, USA). Successive injections of the organic solution were poured into the circulating aqueous phase (three times in total), allowing solvent evaporation between each injection at room temperature. NPs and polymer aggregates were recovered in the recirculated water and were then separated using a mesh (US Std No. 100) and dried in a desiccator until reaching a constant weight.

Particle size analysis

Measurements were performed in triplicate using the dynamic light-scattering technique (Coulter N4, CA, USA) at a 90° fixed-angle for 180 s at 25°C. The laser light wavelength (He/Ne, 10 mW) was set at 678 nm. A digital correlator was used to analyze the scattering intensity data under a unimodal analysis mode.

Z-potential

The electrophoretic mobility of the dispersions was measured and then transformed into Z-potential in triplicate by applying the Smoluchowski approximation (Malvern Instruments NS ZEN 3600, Worcestershire, UK) at 25°C in a capillary cell. Samples were analyzed in triplicate.

Scanning electron microscopy

After removing the excess stabilizer from the sample by two centrifugations (30,000 rpm/50 min) and following re-suspension in distilled water, a few drops of the dispersion were placed on a glass coverslip and dried at room temperature. The dried samples were then coated with gold (~20 nm thickness) using a Sputter Coater JFC-1100 (JEOL, Tokyo, Japan).

Entrapment efficiency

In order to evaluate the performance of the proposed method, a highly hydrophilic drug (glycyrrhizinic acid, solubility in water = 1 mg/ml) was encapsulated in NPs by both processes. Once lyophilized, 20 mg of the nanoparticles were added to 5 ml of ethanol and stirred for 24 h. This sample was filtered (Millipore® 0.22 µm), and the filtrate was assayed by HPTLC [11]. Fifty microliters of the filtrate were applied on a normal phase plate by means of an Automated TLC Sampler III (ATS3, CAMAG, Muttenz, Switzerland) and developed with a mobile phase composition of ethyl acetate-methanol-acetic acid-water (67:8:8:17). The chamber was equilibrated with 10 ml of mobile phase for 15 min prior to inserting the plate. Then the plate was scanned and measured in the absorbance-reflection mode at $\lambda = 254$ nm with a densitometer (CAMAG TLC-Scanner 3, Muttenz, Switzerland). Results were interpolated in a calibration curve which was linear within a range of 56-280

ng, $R^2= 0.998$. Entrapment efficiency expressed as a percentage was calculated from the percent of drug-loading [amount of drug in NPs x 100/amount of NPs] x 100, divided by the percent of initial drug content in the formulation.

Acknowledgements

Zaida Urbán Morlán thanks CONACyT for funding through grant number 168259. The authors acknowledge the financial support from PAPIIT/UNAM IT201914-3, CONACYT CB221629, INFRA251940 y PIAPI001.

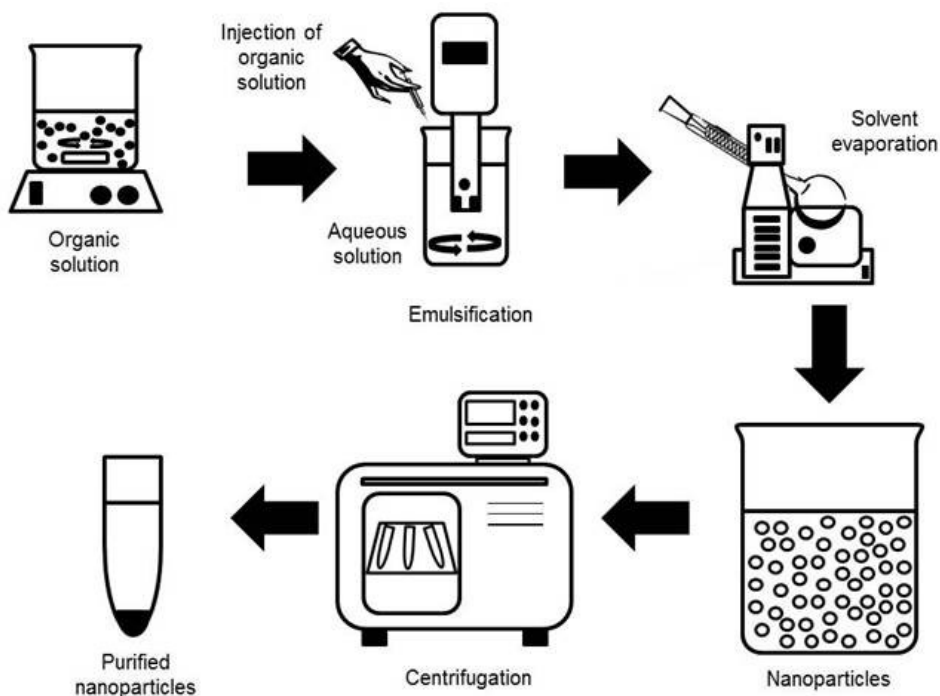
References

1. Minost, A.; Delaveau, J.; Bolzinger, M.A.; Fessi, H.; Elaissari, A. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6*, 250-258.
2. Kulterer, M. R.; Reischl, M.; Reichel, V. E.; Hribernik, S.; Wu, M.; Köstler, S.; Kargl, R.; Ribitsch, V. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* **2011**, *375*, 23-29.
3. Beck-Broichsitter, M.; Rytting, E.; Lehardt, T.; Wang, X.; Kissel, T. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41*, 244-253.
4. www.dow.com/dowwolff/en/pdf/192-00818.pdf Ethocel, Ethylcellulose polymers, Technical Handbook, accessed in July, 2014.
5. Tachaprutinun, A.; Udomsup, T.; Luadthong, Ch.; Wanichwecharungruang, S. *Int. J. Pharm.* **2009**, *374*, 119-124.
6. Sansukcharearnpon, A.; Wanichwecharungruang, S.; Leepipatpaiboon, N.; Kerdcharoen, T.; Arayachukeat, S. *Int. J. Pharm.* **2010**, *391*, 267-273.
7. Arias, J.L.; López-Viota, M.; López-Viota, J.; Delgado, A.V. *Int. J. Pharm.* **2009**, *382*, 270-276.

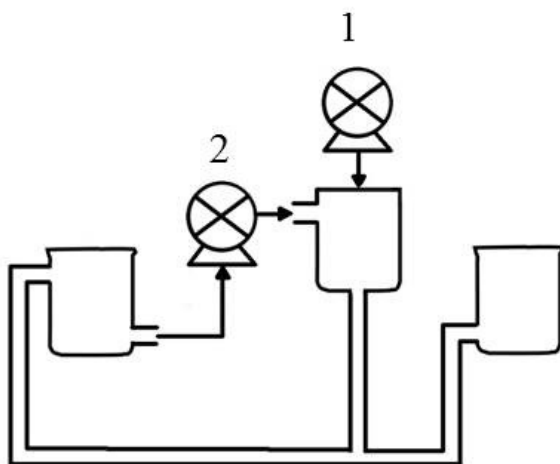
8. Piñón-Segundo, E.; Ganem-Quintanar, A.; Garibay-Bermúdez, J.R.; Escobar-Chávez, J.J.; López-Cervantes, M.; Quintanar-Guerrero, D. *Pharm. Dev. Technology*. **2006**, *11*, 493-501.
9. Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113-1128.
10. Mendoza-Muñoz, N.; Quintanar-Guerrero, D.; Alléman, E. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6*, 236-249.
11. Bilati, U.; Allémann, E.; Doelker, E. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *24*, 67-75.
12. Vitale, S.A.; Katz, J.L. *Langmuir*. **2003**, *19*, 4105-4110.
13. Ganachaud, F.; Katz, J.L. *Chem. Phys. Chem.* **2005**, *6*, 209-216.
14. Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *163*, 90-122.
15. Aschenbrenner, E.; Bley, K.; Koynov, K.; Makowski, M.; Kappl, M.; Landfester, K.; Weiss, C.K. *Langmuir*. **2013**, *29*, 8845-8855.
16. Aubry, J.; Ganachaud, F.; Cohen Addad, J-P.; Cabane, B. *Langmuir*. **2009**, *25*, 1970-1979.
17. Obolentseva, G.V.; Litvinenko, V.I.; Ammosov, A.S.; Popova, T.P.; Sampiev, A.M. *Pharmaceut. Chem. J.* **1999**, *33*, 24-31.
18. Sun, Ch.; Xie, Y.; Tian, Q.; Liu, H. *Colloids Surf. A.* **2007**, *305*, 42-47.
19. Kvasnička, F.; Voldřich, M.; Vyhnálek, J. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1169*, 239-242.
20. Fenwick, G.R. *Food Chem.* **1990**, *38*, 119-143.
21. Hernández Cerón, R. S. Bachelor's Thesis, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México; 2013.
22. Quintanar-Guerrero, D.; Tamayo-Esquivel, D.; Ganem-Quintanar, A.; Allémann, E.; Doelker, E. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *26*, 211-218.
23. Noriega-Peláez, E.K.; Mendoza-Muñoz, N.; Ganem-Quintanar, A.; Quintanar-Guerrero, D. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2011**, *37*, 160-166.
24. Galindo-Rodríguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1428-1439.

25. Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. *J Microencapsulation*. **1998**, *15*, 107-119.
26. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J-E.; Benoit, J-P. *Biomaterials*. **2003**, *24*, 4283-4300.

FIGURES



a)



b)

Figure 1. Solvent-displacement method to obtain EthocelTM nanoparticles. a) conventional method; b) recirculation system; pump 1 controls the organic solution injection rate (ethyl cellulose/ethanol), and pump 2 controls the recirculation rate.

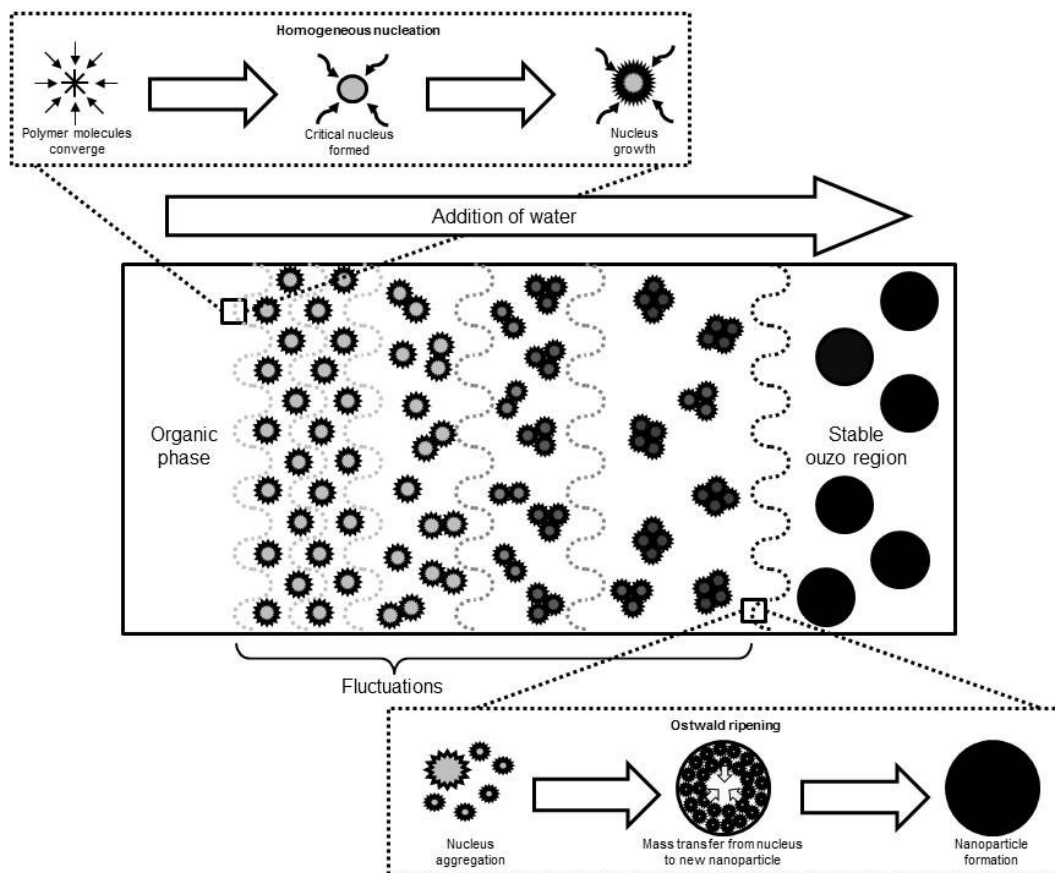


Figure 2. Mechanism of the formation of nanoparticles explained by the ouzo effect.

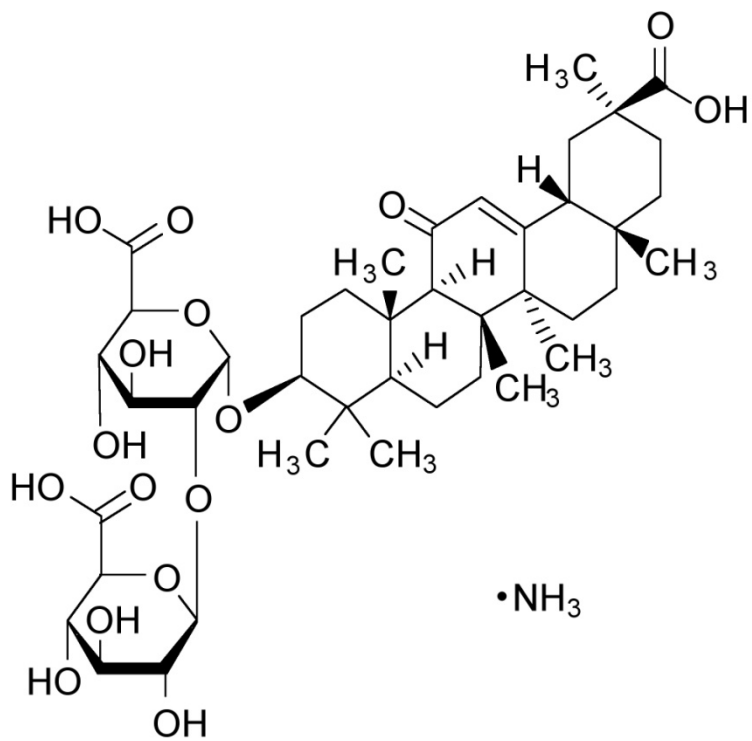


Figure 3. Molecular structure of glycyrrhizic acid (GA) (ammonium salt).

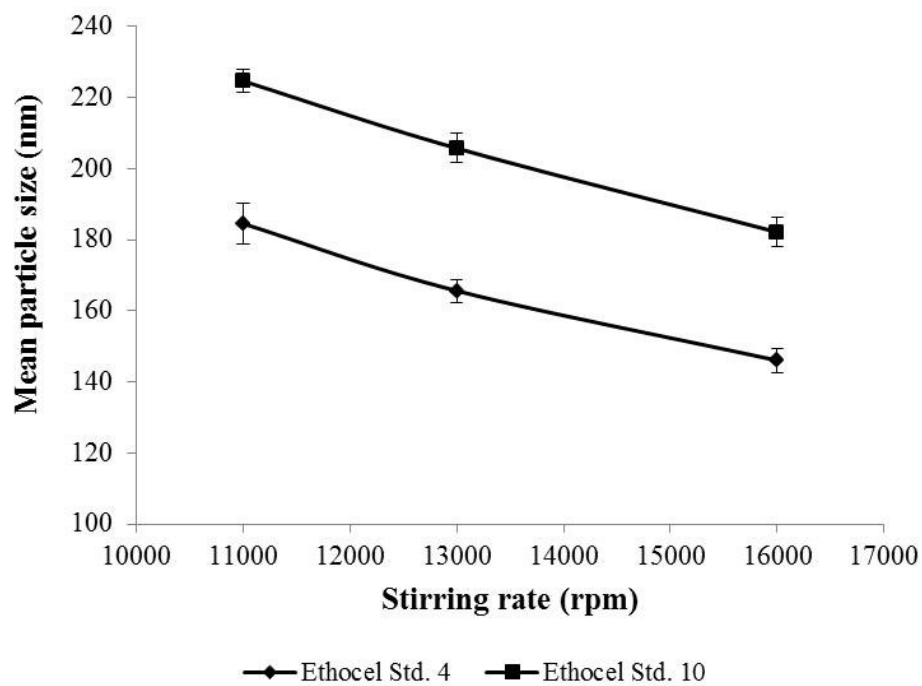


Figure 4. Mean particle size of batches prepared with EthocelTM Std 4- PVAL at 5% w/v and EthocelTM Std 10- SLS at 2% w/v as a function of stirring rate. The bars show the standard deviation, n= 3.

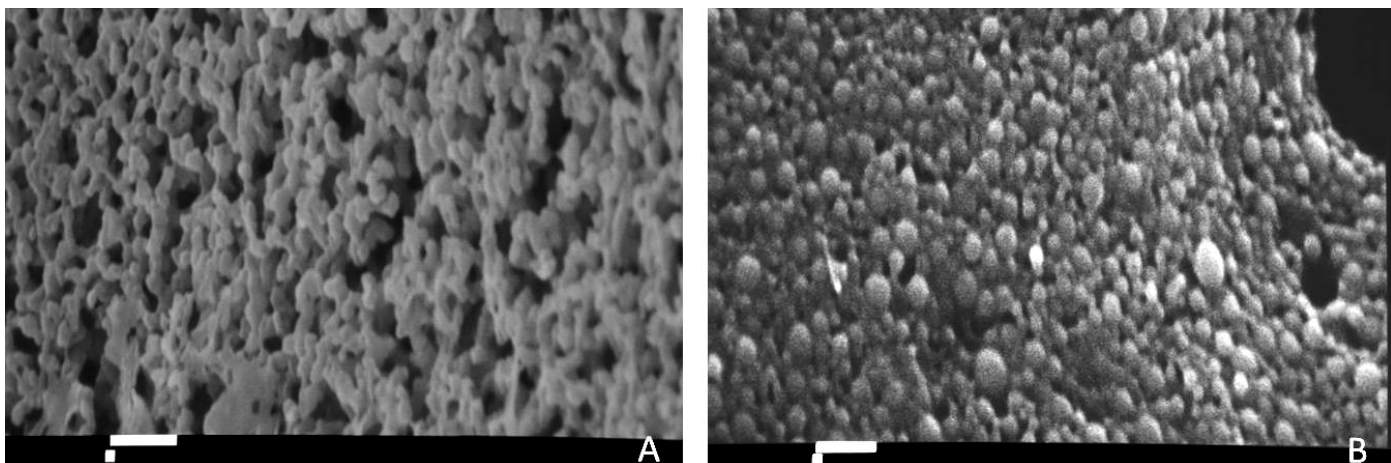


Figure 5. Scanning electron micrographs of: A) Ethocel™ Std. 4 Premium FP-PVAL at 5%; and, B) Ethocel™ Std. 10 Premium FP-SLS at 2% (bar = 1 μ m).

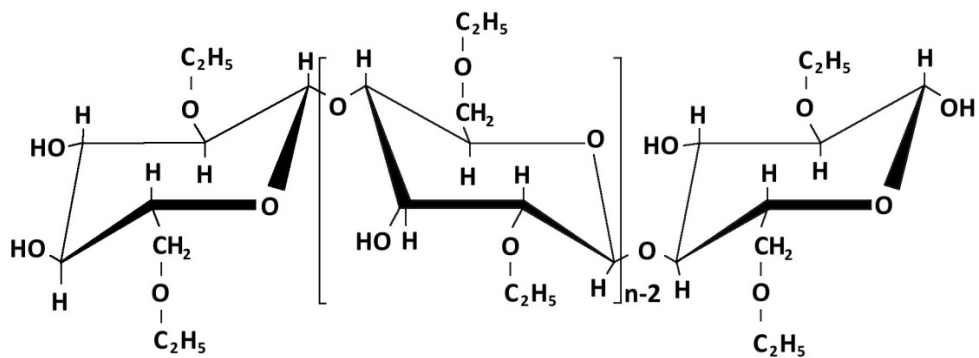


Figure 6. Chemical structure of ethyl cellulose.

Table 1. Mean particle size and Z-potential of Ethocel™ Std 4 and Ethocel™ Std 10 NPs obtained by the conventional method.

| Batch | Ethocel™ Std 4, PVAL at 5% | | | | | | Ethocel™ Std 10, LSS at 2% | | | | | |
|-------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 11,000 rpm | | 13,000 rpm | | 16,000 rpm | | 11,000 rpm | | 13,000 rpm | | 16,000 rpm | |
| | MPS | Z-Pot | MPS | Z-Pot | MPS | Z-Pot | MPS | Z-Pot | MPS | Z-Pot | MPS | Z-Pot |
| | (nm) ^a | (mV) ^a | (nm) ^a | (mV) ^a | (nm) ^a | (mV) ^a | (nm) ^a | (mV) ^a | (nm) ^a | (mV) ^a | (nm) ^a | (mV) ^a |
| 1 | 191.3 ± | -27.9 ± | 168.6 ± | -28.1 ± | 149.4 ± | -29.7 ± | 226.5 ± | -48.1 ± | 209.8 ± | -48.0 ± | 183.9 ± | -50.3 ± |
| | 3.9 | 0.5 | 1.2 | 1.7 | 1.2 | 0.1 | 2.4 | 1.0 | 2.0 | 0.8 | 1.7 | 0.7 |
| | [0.254] | | [0.201] | | [0.214] | | [0.168] | | [0.235] | | [0.326] | |
| 2 | 180.1 ± | -27.9 ± | 166.8 ± | -28.2 ± | 142.7 ± | -29.8 ± | 226.3 ± | -48.2 ± | 202.1 ± | -48.2 ± | 177.7 ± | -50.1 ± |
| | 1.1 | 0.6 | 1.1 | 1.4 | 2.7 | 0.2 | 1.8 | 1.0 | 1.5 | 0.6 | 4.2 | 0.7 |
| | [0.183] | | [0.213] | | [0.230] | | [0.177] | | [0.208] | | [0.196] | |
| 3 | 182.3 ± | -28.0 ± | 161.7 ± | -28.3 ± | 146.1 ± | -29.6 ± | 221.2 ± | -48.1 ± | 205.5 ± | -48.0 ± | 185.0 ± | -50.3 ± |
| | 2.3 | 0.6 | 0.5 | 2.0 | 2.2 | 0.2 | 2.4 | 1.3 | 4.5 | 0.6 | 1.2 | 0.5 |
| | [0.249] | | [0.156] | | [0.175] | | [0.123] | | [0.312] | | [0.269] | |

^a Reported as mean ± standard deviation; n = 3. Numbers in square brackets indicate polydispersity indexes.

Table 2. Mean particle size and Z-potential of NPs prepared with Ethocel™ Std 4 and Ethocel™ Std 10 using the recirculation system.

| Batch | Ethocel™ Std 4-PVAL at 5% | Z-potential (mV)^a | Ethocel™ Std 10- LSS at 2% | Z-potential (mV)^a |
|--------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | Mean particle size (nm) ^a | Z-potential (mV) ^a | Mean particle size (nm) ^a | Z-potential (mV) ^a |
| 1 | 159.8 ± 2.4; [0.892] | -27.3 ± 0.649 | 197.2 ± 1.5; [1.894] | -49.8 ± 0.736 |
| 2 | 160.3 ± 1.4; [0.267] | -29.6 ± 0.910 | 195.2 ± 0.7; [0.734] | -48.6 ± 0.866 |
| 3 | 160.8 ± 1.4; [1.329] | -26.8 ± 0.472 | 194.9 ± 1.8; [1.211] | -49.3 ± 0.614 |

^a Reported as mean ± standard deviation, n=3. Numbers in parentheses indicate polydispersity indexes.

9. REFERENCIAS

- Ahmed, I., & Kasraian, K. (2002). Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 871-882.
- Andrighetti-Fröhner, C.R., Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M., & Simões, C.M.O. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 843-848.
- Angius, F., & Floris, A. (2015). Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. *Toxicology in Vitro*, 29, 314-319.
- Battaglia, L., Gallarate, M., Panciani, P.P., Ugazio, E., Sapino, S., Peira, E., & Chirio, D. (2014). Techniques for the preparation of solid lipid nano and microparticles, en Application of Nanotechnology in Drug Delivery. <http://dx.doi.org/10.5772/58405>
- Cafruny, W.A., Duman, R.G., Raymond, R.R., Nelson, E.A., & Wong, G.H. (2008). Antibiotic mediated inhibition of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection: A novel quinolone function which potentiates the antiviral cytokine response in MARC-145 cells and pig macrophages. *Virology: Research and Treatment*, 1, 17-28.
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Chandra, P., Rabenau, H., & Doerr, H.W. (2003). Glycyrrhizin, an active compound of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *The Lancet*, 361(14), 2045-2046.
- Corzo, C.A., Mondaca, E., Wayne, S., Torremorell, M., Dee, S., Davies, P., & Morrison, R.B. (2010). Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research*, 154, 185-192.
- Crance, J.M., Scaramozzina, N., Jouan, A., & Garin, D. (2003). Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Research*, 58, 73-79.

- Cryan, S., Sivadas, N., & García-Contreras, L. (2007). *In vivo* animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1133-1151.
- Curreli, F., Friedman-Kien, A.E., & Flore, O. (2005). Glycyrrhizic acid alters Kaposi sarcoma-associated herpes virus latency, triggering p53-mediated apoptosis in transformed B lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 642-652.
- Darwich, L., Díaz, I., & Mateu, E. (2010). Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Research*, 154, 123-132.
- Ellingson, J.S., Wang, Y., Layton, S., Ciacci-Zanella, J., Roof, M.B., & Faaberg, K.S. (2010). Vaccine efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome virus chimeras. *Vaccine*, 28, 2679-2686.
- Fenwick, G.R., Lutomski, J., & Nieman, C. (1990). Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.—Composition, Uses and Analysis. *Food Chemistry*, 38, 119-143.
- Finney, R.S.H., & Sommers, G.F. (1958). The anti-inflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 110, 613 – 620.
- Florence, A.T., & Attwood, D. (2006). *Physicochemical principles of Pharmacy* (4a edición). Londres: Pharmaceutical Press.
- Fujita, H., Sakurai, T., Yoshida, M., & Toyoshima, S. (1980). Anti-inflammatory effects of glycyrrhetic acid. *Oyo Yakuri*, 19, 481.
- Gasco, M.R. (1993) U.S. Patent No. 5250236, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.
- Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 94, 57–63.

- Getty, R. (1982). Anatomía de los Animales Domésticos. 5ª edición. México, D.F.: JGH Editores.
- Harada, S. (2005). The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochemical Journal*, 392, 191-199.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., & Benoit, J.P. (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24, 4283-4300.
- Hoever, G., Baltina, L., Michaelis, M., Kondratenko, R., Baltina, L., Tolstikov, G.A., Doerr, H.W., & Cinatl, J. (2005). Antiviral Activity of Glycyrrhizic Acid Derivatives against SARS-Coronavirus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(4), 1256-1259.
- Kondo, M., Minamino, H., Okuyama, G., Honda, K., Nagasawa, H., & Otani, Y. (1986). Physicochemical properties and applications of alfa- and beta-glycyrrhizins natural surface active agents in licorice root extract. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 37, 177-189.
- Kritas, S.K., & Morrison, R.B. (2007). Effect of orally administered *Lactobacillus casei* on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus vaccination in pigs. *Veterinary Microbiology*, 119, 248-255.
- Huang, Y.W., & Meng, X.J. (2010) Novel strategies and approaches to develop the next generation of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Research*, 154, 141-149.
- Le Potier, M.F., Blanquefort, P., Morvan, E., & Albina, E. (1997). Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French ihPays de la Loirelm region. *Veterinary Microbiology*, 55, 355-360.
- Lin, F-H., Chueh, L-L., Lee, Y-H., & Ho, I-S. (2011). The effects of montmorillonite and bamboo vinegar on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus. *Current Nanoscience*, 6, 839-844.

- Lin, J. (2003). Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. *Antiviral Research*, 59, 41-47.
- Lin, J., Cherng, J., Hung, M., Baltina, L.A., Baltina, L., & Kondratenko, R. (2008). Inhibitory effects of some derivatives of glycyrrhizic acid against Epstein-Barr virus infection: Structure-activity relationships. *Antiviral Research*, 79, 6-11.
- Mendoza-Elvira, S.E., Alvarado-Nava, J.L., Hernández-Baumgarten, E., & Ciprián-Carrasco, A. (2008). Manual de Diagnóstico Viroológico. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Meredith, M.J. (1995). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). Boehringer Ingelheim Vetmedica, Cambridge.
- Mojahedian, M.M., Daneshamouz, S., Samani, S.M., & Zargaran, A. (2013). A novel method to produce solid lipid nanoparticles using *n*-butanol as an additional co-surfactant according to the o/w microemulsion quenching technique. *Chemistry and Physics of Lipids*, 174, 2013, 32-38.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Müller, R.H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 161-177.
- Müller, R.H., Runge, S.A., Ravelli, V., Thunemann, A.F., Mehnert, W., & Souto, E.B. (2008). Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 535-544.

- Mumper, R.J., & Jay M. (2001). U.S. Patent No. 7153525, Microemulsion as precursor to solid nanoparticles.
- Nastruzzi, C. (2005). *Lipospheres in Drug Targets and Delivery*. Florida: CRC Press.
- Obolentseva, G.V., Litvinenko, V.I., Ammosov, A.S., Popova, T.P., & Sapiev, A.M. (1999) Pharmacological and Therapeutic Properties of Licorice Preparations (A review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33, 24-31.
- Ontko, J.A., David, L.S., & William, F.W. (1989). Formation of crystalline triplamitin-rich spicules in isolated hepatocytes. *Journal of Lipid Research*, 30, 1375-1384.
- Opriessnig, T., Patel, D., Wang, R., Halbur, P., Meng, X-J., Stein, D.A., & Zhang, Y-J. (2011). Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in piglets by a peptide-conjugated morpholino oligomer. *Antiviral Research*, 91, 36-42.
- Otun, S., Meehan, E., Qi, S., & Craig, D.Q.M. (2015). The use of quasi-isothermal modulated temperature differential scanning calorimetry for the characterization of slow crystallization processes in lipid-based solid self-emulsifying systems. *Pharmaceutical Research*, 32, 1316-1324.
- Panicker, L. (2006). Influence of the leprosy drug, dapsone, on the model membrane dipalmitoyl phosphatidylethanolamine. *Thermochimica Acta*, 447(2), 123-130.
- Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on emerging and re-emerging viral disease of swine, Editorial. (2010). *Virus Research*, 154, 1-6.
- Prieto, C., & Castro, J.M. (1998). Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: aspectos más importantes de la enfermedad, Parte1. *Anaporc*, 175, 1-15.
- Rathbone, M.J., & Martínez, M. (2004). Preface Veterinary drug delivery: Part VI. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1339-1344.

- Rocco, M.C. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 337-346.
- Rockville, MD, USA. Food and Drug Administration. (2006). Guidance for industry, Antiviral product development – Conducting and submitting virology studies to the Agency. Tomada de: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- Scheuch, G., Kohlhaeufel, M., Brand, P., & Siekmeier, R. (2006). Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 996-1008.
- Segal, R., Pisanty, S., Wormser, R., Azaz, E., & Sela, M.N. (1985). Anticariogenic activity of licorice and glycyrrhizine: Inhibition of in vitro plaque formation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74, 79 – 81.
- Stomer, F.C., Reistad, R., & Alexander, J. (1993). Glycyrrhizic acid in liquorice - evaluation of health hazard. *Food and Chemical Toxicology*, 31 (4), 303–12.
- Trotta, M., Peira, E., Carlotti, M.E., & Gallarate, M. (2004). Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *International Journal of Pharmaceutics*, 270(1-2), 119-125.
- Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F., & Gallarate, M. (2002). Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*, 241(2), 319-327.
- Vick, R., Hidalgo, H., Zenón, C., & Martínez, S. (2000). Uso tópico del ácido glicirricínico en el herpes genital. *Revista del Hospital General Dr. M. Gea González*, 3(4), 141-144.
- Wang, Z.-W., Sun, N., Wu, C.-H., Jiang, J.-B., Bai, Y.-S., & Li, H.-Q. (2013). *In vitro* antiviral activity and underlying molecular mechanisms of dipotassium glycyrrhetate against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Therapy*, 18, 997-1004.

- Westesen, K., Bunjes, H., & Koch, M.H.J. (1997). Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *Journal of Controlled Release*, 48, 223-236.
- White, M. (1991). Blue ear disease of pig. *Veterinary Record*, 128, 574-576.
- Wissing, S.A., Kayser, O., & Müller, R.H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1257-1272.
- Wolkerstorfer, A., Kurz, H., Bachhofer, N., & Szolar, O. (2009). Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into cell. *Antiviral Research*, 83, 171-178.
- Yoo, D., Song, Ch., Sun, Y., Du, Y., Kim, O., & Liu, H. (2010). Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research*, 154, 48-60.
- Yoon, K.J. (2004). Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: Virología. En: Enfermedades víricas emergentes del cerdo (pp. 391-399). Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Yoon, K.J., & Stevenson, G. (2004). Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: Diagnóstico. En: Enfermedades víricas emergentes del cerdo (pp. 401-409). Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Zimmerman, J.J. (2004). El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino: Epidemiología. En: Enfermedades víricas emergentes del cerdo (pp. 381-389). Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Avance cuatrimestral del sector porcícola 1503, (2015). Consultado el 26 de Julio, 2015, de <http://www.porcimex.org/AvanceEstadistico1503.pdf>

Referencias

Escenario Base 09-18. Proyecciones para el sector agropecuario de México, Gobierno Federal, SAGARPA. Consultado el 12 de Enero, 2015, de <http://sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/EBespañol300909.pdf>

Material Safety Data Sheet. Consultado el 12 de Octubre de 2013 de <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924177>.

10. ANEXOS

Anexo A. Propiedades del ácido glicirricínico (sal de amonio)

Estructura química:

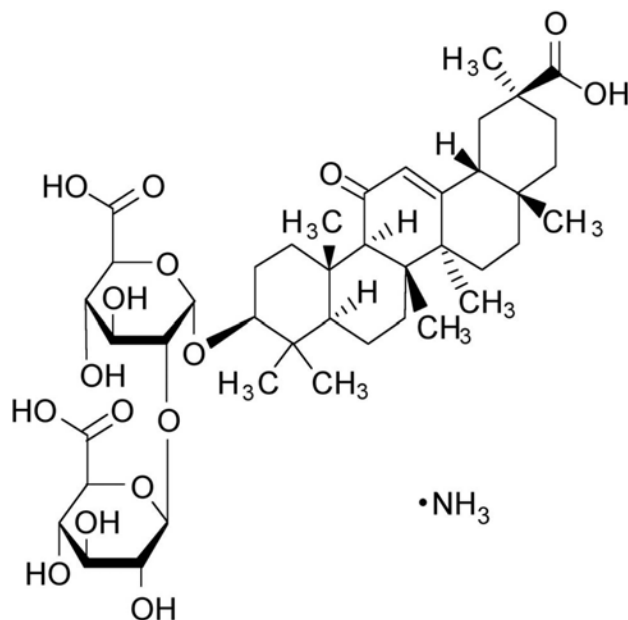


Figura 1. Estructura química del ácido glicirricínico (sal de amonio)

| | |
|----------------------|--|
| Fórmula condensada: | $C_{42}H_{62}O_{16}$ |
| Peso molecular: | 822.93 g/mol |
| pK _a : | 2.76, 2.81 y 4.71 |
| Apariencia física: | Polvo fino blanco hasta amarillo claro |
| Solubilidad a 25 °C: | DMSO 117mg/ml, agua 1 mg/ml y alcohol etílico 8.25 mg/ml |
| Naturaleza química: | Saponina triterpenoide de origen natural, semipolar |
| Uso terapéutico: | Posee actividad antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, anticancerígena, antitrombótica, antidiabética, hepatoprotectora, neuroprotectora, antiviral, entre otras haciéndolo un componente activo versátil |

Anexo B. Propiedades de Gelucire® 44/14

También se llama macroglicéridos de lauroilo (EP) y es una mezcla bien definida de mono-, di- y triglicéridos, y de mono- y diésteres de ácidos grasos del polietilenglicol. El ácido graso predominante es el ácido láurico (C12). Es de origen vegetal y petroquímico. Tiene apariencia cerosa y ligero olor característico.

Usos

Incrementa la solubilidad y BD de fármacos poco solubles, protege a fármacos contra la oxidación y la hidrólisis, permite el manejo de productos de baja densidad o tóxicos, permite la formulación de formas de dosificación sólidas con activos líquidos.

Toxicidad

Toxicidad aguda por vía oral en ratas: DL₅₀ > 2004 mg/kg

Toxicidad subcrónica (90 días) en perros: NOAEL > 2500 mg/kg/j

Prueba en simios: Negativa

Prueba en micronúcleos: Negativa

Ensayo en linfoma de ratón: Negativo

Solubilidad

Soluble en etanol (96°), cloroformo y cloruro de metileno; dispersable en agua y en aceites minerales es insoluble. Tiene un valor de HLB de 14.

Tabla 1. Composición y algunas propiedades fisicoquímicas.

| Especificación | Descripción |
|-----------------------------|-----------------|
| Punto de goteo | 42.5-47.5 °C |
| Valor de acidez | < 2.00 mg KOH/g |
| Valor de saponificación | 79 a 93 mg/kg |
| Contenido de agua | < 0.5% |
| Contenido de glicerol libre | < 3% |
| Ácido caprílico (C8) | < 15% |
| Ácido cáprico (C10) | < 12% |
| Ácido láurico (C12) | 30 a 50% |
| Ácido mirístico (C14) | 5 a 25% |
| Ácido palmítico (C16) | 4 a 25% |
| Ácido esteárico (C18) | 5 a 35% |

Anexo C. Propiedades del estabilizante: Pluronic® 127 (Poloxamero 407)

Naturaleza química: polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno en bloques con la siguiente fórmula:

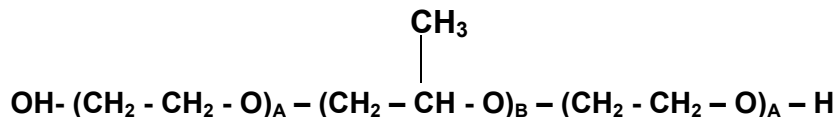


Figura 2. Estructura química de Pluronic® 127

Donde A= 98 y B= 57

La fracción masa de polioxietileno es 73%.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas.

| Propiedades generales | |
|--|--|
| Peso molecular (calculada a partir del valor hidroxilo) | 9,840-14,600 Da |
| Características | Polvo grueso, blanco, casi inodoro e insípido, con consistencia cerosa. |
| Solubilidad | Soluble en agua y mezclas de alcohol y agua, insoluble en dietil éter. |
| Punto de fusión | 53-57 °C |
| Usos | Engrosador, agente gelificante, coemulsificante, solubilizante de ciertas sustancias activas y aceites esenciales. |

Anexo D. Datos y pruebas estadísticas para evaluar actividad biológica de AG.

- Citotoxicidad

Tabla 3. Varianza para cada tratamiento (concentración).

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| 0.1 | 6 | 8.8176 | 1.4696 | 0.0014 |
| 0.2 | 6 | 8.7180 | 1.4530 | 0.0026 |
| 0.3 | 6 | 8.5932 | 1.4322 | 0.0026 |
| 0.4 | 6 | 8.7264 | 1.4544 | 0.0024 |
| 0.5 | 6 | 8.5452 | 1.4242 | 0.0096 |
| 0.6 | 6 | 9.1656 | 1.5276 | 0.0069 |
| 0.7 | 6 | 8.0892 | 1.3482 | 0.0009 |
| 0.8 | 6 | 7.8240 | 1.3040 | 0.0044 |
| 0.9 | 6 | 7.9728 | 1.3288 | 0.0021 |
| Control | 6 | 9.4560 | 1.5760 | 0.0015 |

Tabla 4. ANOVA de un factor

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 0.39809424 | 9 | 0.044232693 | 12.863516 | 2.65162E-10 | 2.0733512 |
| Dentro de los grupos | 0.1719308 | 50 | 0.003438616 | | | |
| Total | 0.57002504 | 59 | | | | |

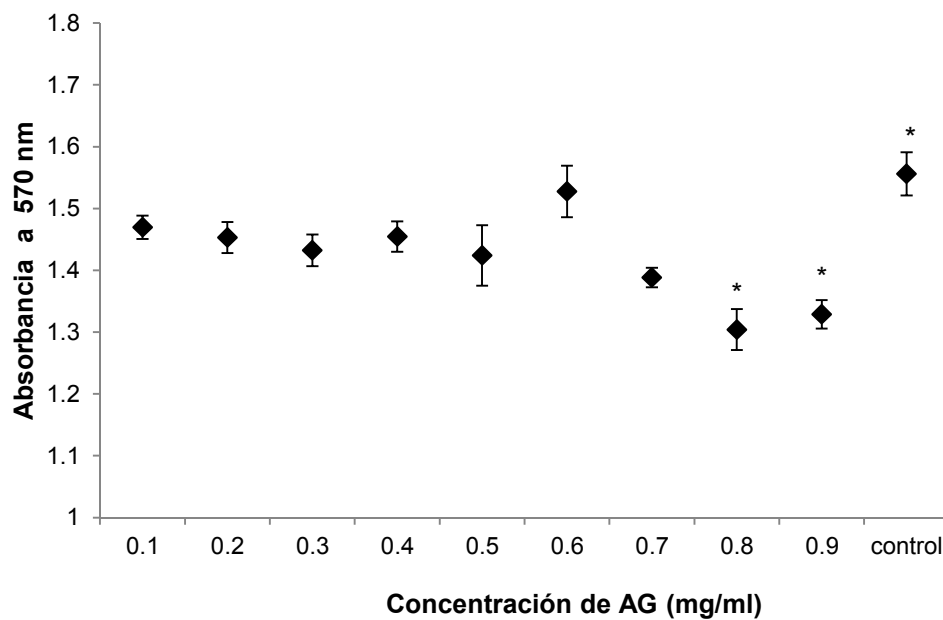


Figura 3. Absorbancia contra concentración de AG obtenida del ensayo de MTT.

Tabla 5. Datos de viabilidad celular para cada concentración de AG.

| Concentración de AG (mg/ml) | Viabilidad celular (%) |
|-----------------------------|------------------------|
| 0.1 | 94.4473 |
| 0.2 | 93.3805 |
| 0.3 | 92.0437 |
| 0.4 | 93.4704 |
| 0.5 | 91.5296 |
| 0.6 | 98.1748 |
| 0.7 | 89.2159 |
| 0.8 | 83.8046 |
| 0.9 | 85.3985 |

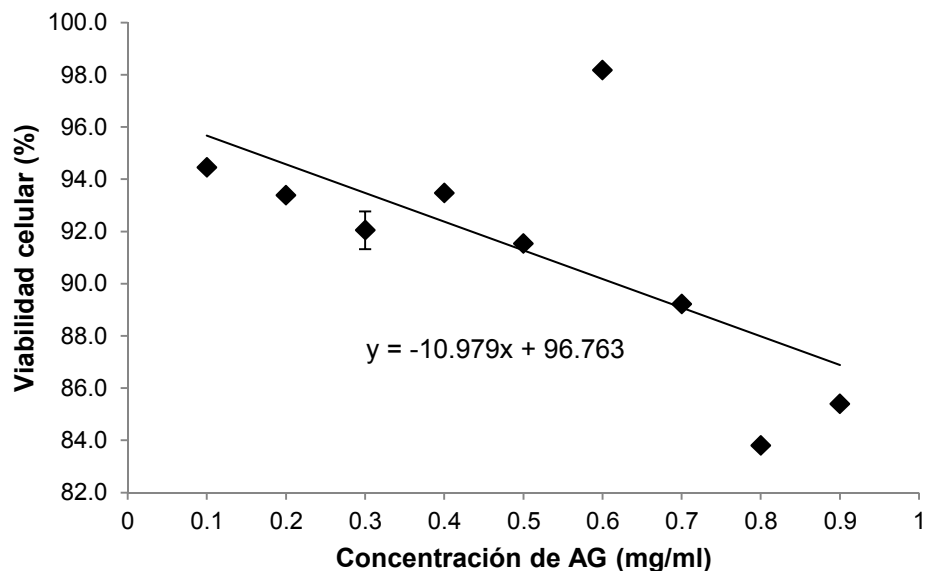


Figura 4. Gráfico de viabilidad celular contra concentración de AG.

De la ecuación de la recta, despejo x, y sustituyo 50 (que corresponde a CC_{50}), y se obtiene:

$$CC_{50} = 4.26 \text{ mg/ml}$$

- Datos para evaluar la actividad antiviral (inhibición de ECP)

Tabla 6. Inhibición de ECP a diferentes tiempos después de tratar las células con AG a diferentes concentraciones.

| Concentración de AG (mg/ml) | Inhibición de ECP (%) | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|------|------|------|------|
| | 48h | 72h | 96h | 120h | 144h |
| 0.1 | 96.1 | 96.4 | 97.5 | 97.5 | 97.6 |
| 0.2 | 86.9 | 88 | 97.2 | 97.2 | 97.2 |
| 0.3 | 76.2 | 78.2 | 93.5 | 93.5 | 93.7 |
| 0.4 | 60 | 60.8 | 88.8 | 88.8 | 92.6 |
| 0.5 | 45 | 52.1 | 86.4 | 86.4 | 90.5 |
| 0.6 | 31.5 | 40 | 76.4 | 76.4 | 81.2 |
| 0.7 | 10.5 | 16.6 | 66.7 | 66.7 | 72.2 |
| 0.8 | 0 | 0 | 18.2 | 18.2 | 20 |
| 0.9 | 0 | 0 | 6.7 | 6.7 | 7.1 |

Continuación

Diferencia

| Concentración de AG (mg/ml) | 48h | 72h* | 96h | 120h | 144h |
|-----------------------------|------|------|-----|------|------|
| 0.1 | 3.9 | 3.6 | 2.5 | 2.5 | 2.4 |
| 0.2 | 13.1 | 12 | 2.8 | 2.8 | 2.8 |
| 0.3 | 23.8 | 21.8 | 6.5 | 6.5 | 6.3 |

| | | | | | |
|-----|------|------|------|------|------|
| 0.4 | 40 | 39.2 | 11.2 | 11.2 | 7.4 |
| 0.5 | 55 | 47.9 | 13.6 | 13.6 | 9.5 |
| 0.6 | 68.5 | 60 | 23.6 | 23.6 | 18.8 |
| 0.7 | 89.5 | 83.4 | 33.3 | 33.3 | 27.8 |
| 0.8 | 100 | 100 | 81.8 | 81.8 | 80 |
| 0.9 | 100 | 100 | 93.3 | 93.3 | 92.9 |

*EC₅₀ determinada a las 72h

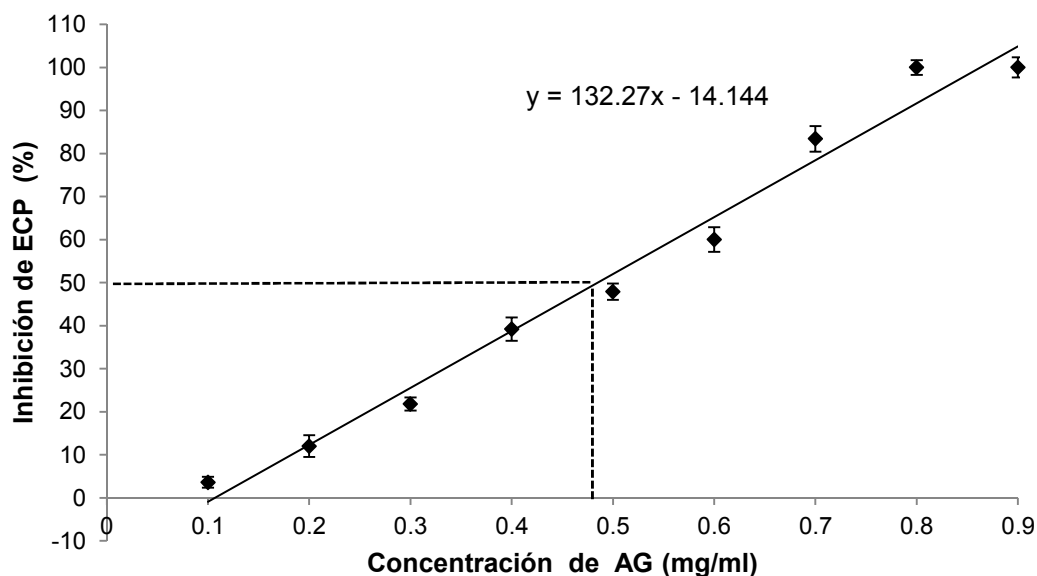


Figura 5. Gráfico de inhibición de ECP contra concentración de AG.

Del gráfico anterior se obtiene la EC₅₀ = 0.48 mg/ml

Con este valor se calculó el índice de selectividad (IS) que es el cociente de CC₅₀/EC₅₀, (4.26/0.48) obteniéndose 8.74.

- *Pruebas estadísticas para evaluar el efecto de las SLN (con y sin AG) sobre la viabilidad celular*

Tabla 7. ANOVA para absorbancia por cada tratamiento.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 0.263967 | 8 | 0.0329 | 0.99 | 0.4776 |
| Intra grupos | 0.601863 | 18 | 0.0334 | | |
| Total (Corr.) | 0.865831 | 26 | | | |

Tabla 8. Prueba de Rangos Múltiples para absorbancia por cada tratamiento (Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD).

| Tratamiento | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|------------------|-------|---------|-------------------|
| 10 ¹ | 3 | 3.05467 | X |
| positive control | 3 | 3.15367 | X |
| 10 ³ | 3 | 3.201 | X |
| 10 ² | 3 | 3.20433 | X |
| 10 ⁶ | 3 | 3.26967 | X |
| 10 ⁴ | 3 | 3.31833 | X |
| 10 ⁷ | 3 | 3.32367 | X |
| 10 ⁵ | 3 | 3.33367 | X |
| 10 ⁸ | 3 | 3.38633 | X |

Tabla 9. Comparación de las medias de cada uno de los tratamientos para determinar diferencias estadísticas.

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|------------------------------------|------|-------------|-------------|
| 10 ¹ - 10 ² | | -0.149667 | 0.524414 |
| 10 ¹ - 10 ³ | | -0.146333 | 0.524414 |
| 10 ¹ - 10 ⁴ | | -0.263667 | 0.524414 |
| 10 ¹ - 10 ⁵ | | -0.279 | 0.524414 |
| 10 ¹ - 10 ⁶ | | -0.215 | 0.524414 |
| 10 ¹ - 10 ⁷ | | -0.269 | 0.524414 |
| 10 ¹ - 10 ⁸ | | -0.331667 | 0.524414 |
| 10 ¹ - positive control | | -0.099 | 0.524414 |
| 10 ² - 10 ³ | | 0.00333333 | 0.524414 |
| 10 ² - 10 ⁴ | | -0.114 | 0.524414 |
| 10 ² - 10 ⁵ | | -0.129333 | 0.524414 |
| 10 ² - 10 ⁶ | | -0.0653333 | 0.524414 |
| 10 ² - 10 ⁷ | | -0.119333 | 0.524414 |
| 10 ² - 10 ⁸ | | -0.182 | 0.524414 |
| 10 ² - positive control | | 0.0506667 | 0.524414 |
| 10 ³ - 10 ⁴ | | -0.117333 | 0.524414 |
| 10 ³ - 10 ⁵ | | -0.132667 | 0.524414 |
| 10 ³ - 10 ⁶ | | -0.0686667 | 0.524414 |
| 10 ³ - 10 ⁷ | | -0.122667 | 0.524414 |
| 10 ³ - 10 ⁸ | | -0.185333 | 0.524414 |
| 10 ³ - positive control | | 0.0473333 | 0.524414 |
| 10 ⁴ - 10 ⁵ | | -0.0153333 | 0.524414 |
| 10 ⁴ - 10 ⁶ | | 0.0486667 | 0.524414 |
| 10 ⁴ - 10 ⁷ | | -0.00533333 | 0.524414 |
| 10 ⁴ - 10 ⁸ | | -0.068 | 0.524414 |
| 10 ⁴ - positive control | | 0.164667 | 0.524414 |
| 10 ⁵ - 10 ⁶ | | 0.064 | 0.524414 |
| 10 ⁵ - 10 ⁷ | | 0.01 | 0.524414 |
| 10 ⁵ - 10 ⁸ | | -0.0526667 | 0.524414 |
| 10 ⁵ - positive control | | 0.18 | 0.524414 |
| 10 ⁶ - 10 ⁷ | | -0.054 | 0.524414 |
| 10 ⁶ - 10 ⁸ | | -0.116667 | 0.524414 |

| | | | |
|------------------------------------|--|------------|----------|
| 10 ⁶ - positive control | | 0.116 | 0.524414 |
| 10 ⁷ - 10 ⁸ | | -0.0626667 | 0.524414 |
| 10 ⁷ - positive control | | 0.17 | 0.524414 |
| 10 ⁸ - positive control | | 0.232667 | 0.524414 |

*Indica una diferencia significativa

Después de hacer una comparación múltiple de las medias para determinar si hay diferencias significativas, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. Además, en la primera parte de la prueba se identificaron grupos homogéneos (según la alineación de las X's en columna).

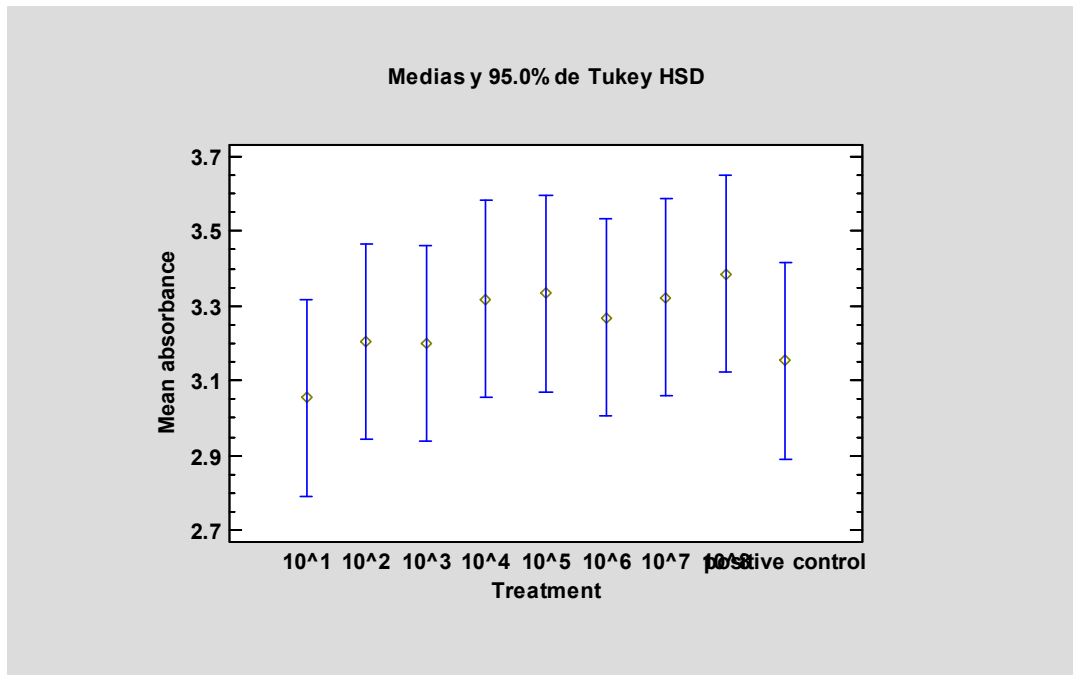


Figura 4. Medias de cada uno de los tratamientos.