



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Diseño de nanopartículas poliméricas biocompatibles para la
encapsulación de antivirales de amplio espectro**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Química Biológica

Ing. Mayra Alejandra Castañeda Cataña

Directora de Tesis: **Dra. Claudia S. Sepúlveda**

Co-director de Tesis: **Dr. Oscar E. Pérez**

Consejera de Estudios: **Dra. Viviana Castilla**

Lugar de trabajo: **Laboratorio de Estrategias Antivirales, Departamento de Química
Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.**

Buenos Aires, 1 diciembre, de 2022

DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIOCOMPATIBLES PARA LA ENCAPSULACIÓN DE ANTIVIRALES DE AMPLIO ESPECTRO

RESUMEN

Las infecciones virales son un problema de salud pública a nivel global debido a que nuevos agentes virales emergen originando diversas patologías, así como la reaparición o recrudescimiento en la virulencia de virus conocidos que, repentinamente, desencadenan brotes de fácil diseminación. Estas virosis permanecen huérfanas de quimioterapias efectivas y/o de vacunas preventivas en muchos casos, o escapan al efecto de los fármacos normalmente en uso, por ello, la búsqueda de drogas antivirales es un desafío constante. La estrategia de uso de fármacos antivirales de amplio espectro con proteínas o estructuras celulares como blanco de acción antiviral permite reducir la farmacoresistencia viral y el reposicionamiento de fármacos. El ácido micofenólico (MPA) y la ribavirina (RBV) son drogas con actividad antiviral estudiadas ampliamente contra diversos tipos virales, sin embargo, ambas presentan problemas de solubilidad, biodisponibilidad y efectos adversos no deseados.

En ese sentido, la micro y nanomedicina permite optimizar la administración y transporte de fármacos, posibilitando incrementar su concentración en el tejido blanco, disminuir su toxicidad, mejorar la solubilidad y mantener los niveles terapéuticos por un periodo prolongado gracias a su liberación controlada. Esta tesis se enfocó en la encapsulación de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos con actividad antiviral utilizando sistemas coloidales biocompatibles. Se diseñaron, obtuvieron y caracterizaron nanopartículas poliméricas de albúmina sérica bovina (NP-BSA), nanopartículas de ácido poli láctico-co-glicólico (NP-PLGA) y vesículas lipídicas niosomas (NIO). Los resultados obtenidos mostraron 90-95% de inhibición viral usando 100 veces menos principio activo (PA) en las NP-BSA cargadas con RBV y 200 veces menos cuando fueron cargadas con MPA, en modelos de infección *in vitro* con virus de genoma de RNA como Zika (ZIKV) y Junín (JUNV). En el caso de las NP-PLGA y NIO, se evidenció 70-80% de inhibición usando 400 y 300 veces menos que el PA libre en infecciones con virus de genomas de DNA y RNA como herpes *simplex* tipo 1 (HSV-1) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV), respectivamente. Ninguno de los sistemas coloidales empleados presentó toxicidad en las líneas celulares utilizadas a las concentraciones evaluadas.

En conclusión, se obtuvieron nanopartículas biocompatibles capaces de encapsular fármacos antivirales de distintas características químicas, mejorando la solubilidad de las drogas y lograron mejores niveles de inhibición viral evidenciando que la entrega efectiva de PA usando nanopartículas poliméricas mejora su biodisponibilidad logrando la reducción de la cantidad de PA necesario para producir un mismo efecto antiviral respecto al PA libre.

Palabras Claves: ácido micofenólico (MPA), ribavirina (RBV), Antivirales de amplio espectro, nanopartículas, niosomas, vesículas lipídicas, infecciones virales, biopolímeros.

DESIGN OF BIOCOMPATIBLE POLYMERIC NANOPARTICLES FOR THE ENCAPSULATION OF BROAD-SPECTRUM ANTIVIRALS

ABSTRACT

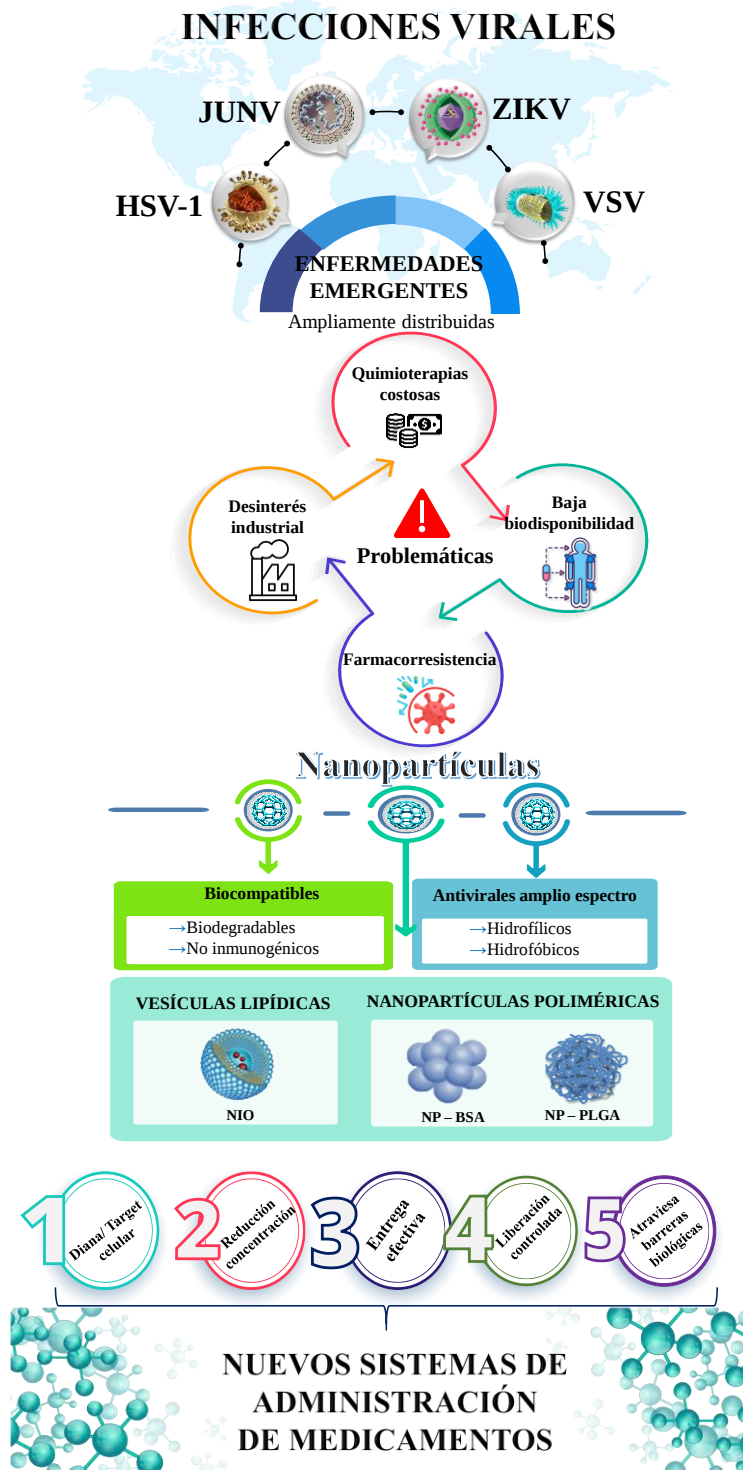
Viral infections are a global public health problem as new viral agents emerge causing various pathologies and known viruses that cause sudden outbreaks with easy dissemination reemerge or increase in virulence again. In many cases, these viruses remain the orphans of effective chemotherapies and/or preventive vaccines or evade the action of the drugs normally used, making the search for antiviral drugs a constant challenge. The strategy of using broad-spectrum antiviral drugs with proteins or cellular structures as the target of antiviral action allows reducing viral drug resistance and drug displacement. Mycophenolic acid (MPA) and ribavirin (RBV) are drugs with antiviral activity that have been studied against different types of viruses, but both have problems with solubility, bioavailability, and adverse side effects.

In this sense, micro- and nanomedicine allows optimizing the delivery and transport of drugs, increasing their concentration in the target tissue, reducing their toxicity, improving their solubility and maintaining their therapeutic level for a longer period of time thanks to their controlled release. This work deals with the encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs with antiviral activity using biocompatible colloidal systems. Polymeric nanoparticles of bovine serum albumin (NP-BSA), nanoparticles of polylactic- co-glycolic acid (NP-PLGA) and lipid vesicle niosomes (NIO) were designed, prepared and characterized. The results obtained showed 90 to 95 percent viral inhibition at 100-fold lower drug levels in NP-BSA, loaded with RBV, and 200-fold lower levels when loaded with MPA in in vitro infection models with RNA genome viruses such as Zika (ZIKV) and Junín (JUNV). In the case of NP-PLGA and niosomes, 70 to 80 percent inhibition was demonstrated in infections with viruses with DNA and RNA genomes such as herpes simplex type 1 (HSV-1) and vesicular stomatitis virus (VSV), with 400- and 300-fold reductions, respectively, compared with the free compound. None of the colloidal systems used showed toxicity in the cell lines used at the concentrations tested.

In summary, biocompatible nanoparticles capable of encapsulating antiviral drugs with different chemical properties were obtained, improving the solubility of the drugs and achieving better levels of viral inhibition, evidencing that the effective delivery of drugs using polymeric nanoparticles improves its bioavailability, reducing the amount of drug necessary to produce the same antiviral effect with respect to free compound.

Keywords: mycophenolic acid (MPA), ribavirin (RBV), broad-spectrum antivirals, nanoparticles, niosomes, lipid vesicles, viral infections, biopolymers.

RESUMEN GRÁFICO



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas o instituciones que de una u otra manera han ayudado para la realización de este trabajo, en especial:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca recibida para llevar a cabo esta tesis y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por proporcionarme el equipamiento y los profesionales para mi formación doctoral.

A mi directora, la Dra. Claudia S. Sepúlveda, por darme la oportunidad de ser su becaria doctoral, sin conocerme, por estar siempre presente, por responder todas mis dudas, por siempre tener una solución a las mil y una problemáticas que se dieron en todo este tiempo. Por no dejarme desfallecer inclusive cuando la contaminación nos obligaba a parar. Por siempre tener una frase llena de coherencia y amor, por siempre estar, por la paciencia infinita. Por compartirme sus conocimientos, por firmarme todas las cartas de recomendación y por siempre ser un faro para no perder el camino ni la energía.

A mi co-director, el Dr. Oscar E. Pérez, por siempre tener una sonrisa y la puerta de su oficina abierta.

A la Dra. Josefina Carlucci, por ser la llave mística de toda esta historia, por brindarme su cariño y sus sabios consejos. Por obligarme a bajar a tierra y siempre transmitirme paz.

A la Dra. Margarita Sánchez Domínguez, por abrirme las puertas de su casa y de su laboratorio por ser mi hada madrina científica, por toda su generosidad y por compartirme sin límites sus conocimientos, por las largas jornadas de trabajo. Por confiar en mí y ayudarme a crecer profesionalmente, sin duda alguna la experiencia del reto bacteriano fue un gran desafío. Además de mostrarme al mundo gatuno. Por ser una inspiración de lucha y perseverancia. A todo su equipo por siempre tener una sonrisa y buena disposición para la realización de los mil y un análisis: Oscar, Alejandro, Lilia, Ana, Isa y a todo el personal de CIMAV-Monterrey que siempre tuvieron una gran disposición.

Al Dr. M. Martín Dodes-Traian, por ser mi maestro, **Yoda**, en el mundo de la espectroscopía de fluorescencia. Además, por mostrarme el camino para sobrevivir en QB y en Exactas. Por todas las largas jornadas en el ADI, entre risas, gruñidos, introducción al “humor porteño” pero sobre todo por llevarme siempre un paso más allá, sin toda esa exigencia jamás hubiese descubierto el valor del trabajo duro y la satisfacción de vencer los límites.

A la Dra. Eva Carolina Arrúa perteneciente al Centro de Investigación y Desarrollo en Materiales Avanzados y Almacenamiento de Energía, CONICET-Jujuy. Por su gran colaboración en el desarrollo de este trabajo por su guía y todas las horas de discusión de resultados.

A la Dra. Keyla M. Fuentes, por su alegría a pesar de la adversidad, por llevarme al fascinante mundo de los chicharrones de catarsis y sobre todo por soportar mis preguntas de neonata en química. Por ser una maestra de paciencia infinita. Por mostrarme que siempre hay una razón para seguir de piel y luchando.

A la Dra. Lien González por creer en mí, guiarme en mis inicios y ser siempre una mano amiga.

Al Dr. Sergio I. Nemirovsky por todos los ensayos estadísticos realizados.

Al Dr. Juan Pablo Arcón, por su colaboración en los experimentos bioinformáticos.

A la Dra. Fornaguera, por recibirme en su laboratorio y compartirme su conocimiento.

A la Dra. Elsa Damonte por siempre tener una sonrisa.

A **Guille Assad Ferek** por todos sus consejos, por ser un gran compañero de oficina y hacer el mejor café del turno de la mañana. Por siempre tener una frase de aliento y cederme un pequeño espacio en nuestro laboratorio de formulación de nanosistemas.

A Martín Arias, por salvar mi doctorado más veces de las permitidas y siempre tener una solución a mis complicados delirios mecánicos y electrónicos.

A los investigadores que día a día pusieron su granito de arena para que la jornada sea más ligera y por compartir la data para mejor los experimentos: Nelly, Carlos Pujol, Cybele, Andrea, Erina, Charly, Vivi, Sandra, Diana W., Dai.

Al *Viro Team* a los que se fueron pero que sin duda forman parte de esta gran historia, por pasarme los “trucos, tip, mañas”. A los que se quedan por las tertulias y la compañía en la larga jornada, a *Ceci* por todas las fotos impublicables que tenemos llenas de risas e incoherencias, pero por transmitirme energía cómica para los días intensos. A *Bri*, por cada una de sus ocurrencias que sin duda alguna hacían los días divertidos. A *Fede*, por las botellas de C6/36 para el experimento del millón, por las frases inspiracionales, la lista *Top Seceret* para obtener becas, por introducirme en las meriendas fit y sobre todo por compartirme su amor a la ciencia. A los baby’s *Viro* por recordarme a “mi yo del pasado” por recargarme de energía y devolver la alegría del experimento que nadie ha hecho antes.

A las NANO-familia, que jamás te deja caer, que siempre esta, para la joda y para sacar adelante cualquier proyecto, para cebar mates, leerte la tesis, para catar vinos, para corregirte, para la discusión de los resultados y de la vida. Para **bancar/acolitar** lo que sea, lo que haga falta.

- **Andre**, por mantenerme cuerda, mimarme, alimentarme, cuidar de Renata. Por toda la compañía en las jornadas doctorales infinitas y las mil aventuras.
- **Tucu**, por ser la entropía de mi vida que siempre sabe que decir y como confortarme.
- **Rosario**, por ser “compañera” y ayudarme con mis millones de dudas y muestras, por llevarme al “mundo progress” y la vida bohemia.
- **Josefina**, por siempre estar, por ser la incondicional, la *Marrina* de Renú y la que tiene siempre una sonrisa y/o puteada apropiada y necesaria.
- **Agos**, por ser ese ser de luz lleno de energía e insomnio dispuesto a ayudarte en lo que sea y a beber en cantidades industriales. Por tener talentos ocultos y ser la mejor diseñadora gráfica. Si, eres la hermana paraguaya adoptada de la nanofamilia.

A mis padres, Pily y Ángel, por a su amor y paciencia infinita. Sin ellos nada de esto sería posible. Por darme alas y enseñarme a volar. Por todas las frases de aliento y por los consejos para los días grises. Por demostrarme que no existen las distancias y que todo siempre es más fácil si estamos juntos.

A mis hermanos: a Christian, por su rigidez y frontalidad que sin duda alguna forjan el carácter. A Andrés, por su apoyo y ejemplo de superación constante. A ambos por darme el mejor regalo de todos, **mis sobrinos**, mis pequeñas centrales de energía y amor. Por siempre estar a pesar de la distancia y las diferencias.

A mis primos: Nena, JuanPi, Andreita, Yayi, Diegui, Juano, Santy por siempre estar ahí siendo mi hinchada más fiel, por los mensajes que me alegran los días por las anécdotas y el cariño incondicional.

A mis tías y tíos su amor e incondicionalidad, por las llamadas y mensajes oportunos. Por todo ese amor y cariño que me dan siempre que es una fuente inagotable de energía. Especialmente a mi Teresita que siempre me manda ángeles.

A mi Margarita y Cruci por siempre estar cuidando y pendientes de todos.

A Vale, Liz, Salo, por ser mi constante en la vida, porque a pesar de todo siempre están para lo que se requiera.

A las abogadas por llenar mi vida de aventuras, de frases célebres, momentos icónicos y porque sé que con ustedes siempre me debo acoger, a mi derecho constitucional al silencio y declararme en interdicción.

Alana por enseñarme a ser una diva, porque siempre estas, porque siempre sabes que decirme en los momentos de locura y por llenarme de historias divertidas. Porque vibramos igual a pesar de los kilómetros.

A todos mis *Euro y Latam amigos* por estar conmigo siempre, por permitirme vivir aventuras indescriptibles por enseñarme lo valioso de la diversidad, por encontrarnos en cualquier lugar del mundo, Oscar, Gastón, Alex, Alazne, Víctor, Enza, Esther, María Jesuuu, Enza, Piotr, Willy, Moli, Frida, Marissa, en especial a Dario e Alessandro por enseñarme sobre la *italianidad* y el “proper Italian coffee”.

A mis estrellas fugaces que llegaron un día y se desvanecieron otro, por demostrarme de una y mil maneras que la vida es maravillosa. Por enseñarme que en el verano no existen las noches y que sola hay una cosa cierta: *somos improbables*.

A mis ángeles de la guarda, por siempre aparecer.

A la coca cola, al té negro, al chocolate y al café por las largas jornadas.

A Renata Marié por despertarme a *lamiditas* y a veces a mordidas, si es necesario. Además, por recordarme que hay que comer y dormir.

Gracias a la vida que me ha dado tanto, un ejército que nunca me deja, mil aventuras y por todo el conocimiento adquirido en este largo camino. Gracias también por las adversidades y los restos que se presentaron porque forjaron mi carácter. Gracias, a todos porque realmente sin su presencia en mi vida nada de esto sería posible todos tienen un rol esencial en el desarrollo de esta historia de vida y ciencia. Espero no olvidarme de nadie porque este camino, no sería lo mismo sin todos les personas que se cruzaron en el.

Sin duda alguna, ha sido un gran honor y una gran responsabilidad, haber tenido a mi disposición fondos provistos por todos los argentinos.

Un Agradecimiento especial al PUEBLO ARGENTINO por el asado, el vino, el helado, el dulce de leche, La Negra Sosa, La Sole, Los Cafres, Los Caligaris, por Borges, por Sábado, por Messi, por el Kun, por Armani y Maradona, pero sobre todo por la Educación Pública. #CONTUSIMPUESTOS.

¡Simplemente gracias!

$$V = (C + H) * A$$

“El conocimiento y la habilidad suman, pero la actitud multiplica”.

Víctor Küppers

Dónde:

Valor personal

Conocimientos: Para todo en la vida hacen falta conocimientos.

Habilidad: La experiencia cuenta, y mucho.

Actitud: la energía

A Teresita, porque siempre estas, incluso cuando me olvido de mí.

Besos al cielo

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

Generalidades	1
Infecciones virales	1
Antivirales	2
Antivirales de amplio espectro	3
Desarrollo de formulaciones farmacéuticas.....	8
Nanotecnología.....	10

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos.....	11
Reactivos y Solventes.....	11
Métodología	12
1.1 Análisis bioinformático: <i>docking</i>	12
1.2 Espectroscopía de fluorescencia	12
1.2.1 Cuantificación del MPA	12
1.3 Espectroscopía de absorbancia (UV/VIS)	13
1.3.1 Cuantificación de RBV	13
1.3.2 Cuantificación de CUR.....	14
1.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ¹ H) pureza de MPA	14
1.4.1 Caracterización y pureza de MPA por RMN ¹ H.....	14
1.5 Dispersión dinámica de luz (DLS)	16
1.5.1 Determinación Tamaño de la partícula, índice de polidispersidad (PDI)	16
1.5.2 Determinación del pot-ζ	17
1.6 Microscopia electrónica de barrido (MEB)	17
1.7 Microscopia electrónica de transmisión con unidad de barrido (STEM)	17
1.8 Rendimiento de la obtención de las NP	18
1.9 Eficiencia de encapsulación E _f E	18
1.10 Ensayos biológicos	18
1.10.1 Medios de cultivo y mantenimiento celular.....	18
1.11 Ensayo de citotoxicidad	19
1.11.1 Viabilidad celular usando el método de MTT	19
1.11.2 Viabilidad celular usando la tinción de cristal violeta	21
1.12 Actividad antiviral	22
1.12.1 Preparación de stocks virales.....	22

1.12.2 Método de formación de placas de lisis.....	23
1.12.3 Determinación de la actividad antiviral.....	24
1.12.4 Inhibición del efecto citopático	25
1.13 Interacción de las NP con proteínas.....	25
1.13.1 Estudio de la interacción de las NP con la proteína albumina sérica bovina (BSA).....	25
1.13.2 Estudio de la interacción de las NP con la proteína fibrinógeno de origen sanguíneo humano.....	26
1.13.3 Estudio de la interacción de las NP con la proteína isoenzima II proveniente de eritrocitos	26
1.14 Ensayo de hemólisis <i>in vitro</i>	26
1.15 Internalización celular de las NP: “ <i>uptake process</i> ”.....	27
1.15.1 Determinación de los tiempos de internalización	27
1.15.2 Análisis microscopía confocal (CLSM)	28
1.16 Análisis estadístico	29

I ASOCIACIÓN INTERMOLECULAR: BSA-MPA

I.1 Introducción	30
1.1.1 Albúmina Sérica Bovina (BSA).....	30
1.1.2 Interacciones no covalentes.....	32
I.2 Objetivos e Hipótesis	34
1.2.1 Hipótesis.....	34
1.2.2 Objetivo general.....	34
1.2.3 Objetivos específicos	34
I.3 Materiales y Métodos.....	35
1.3.1 Materiales.....	35
1.3.2 Metodología	35
I.4 Resultados	38
1.4.1 Análisis bioinformático	38
1.4.2 Caracterización físico-química.....	40
1.4.3 Actividad biológica	49
I.5 Discusión.....	57
I.6 Conclusiones	61

II NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA

II.1 Introducción.....	62
II.2 Objetivos e Hipótesis	64
II.2.1 Hipótesis	64
II.2.2 Objetivo General:.....	64
II.2.3 Objetivos Específicos:	64
II.3 Materiales y Métodos.....	65
II.3.1 Preparación de NP-BSA	65
II.3.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) de NP-BSA.....	66
II.3.3 Rendimiento del proceso de obtención de las NP-BSA.....	66
II.3.4 Análisis de estabilidad NP-BSA	67
II.3.5 Determinación de la E _j E.....	67
II.3.6 Efecto del pretratamiento de las células, previo a la infección viral, con los compuestos sobre la actividad antiviral	67
II.3.7 Reversibilidad de la acción antiviral.....	68
II.3.8 Efecto de la adición del compuesto a distintos tiempos	68
II.4 Resultados.....	69
II.4.1 Caracterización físico-química	69
II.4.2 Establecimiento de condiciones para la obtención de NP-BSA.....	70
II.4.3 Tamaño de partícula, Pdl y pot- ζ	72
II.4.4 Estabilidad en el tiempo y ante condiciones de almacenamiento.....	73
II.4.5 Microscopía Electrónica de Barrido	74
II.4.6 E _j E	75
II.4.7 Ensayos Biológicos.....	76
II.4.8 Efecto antiviral sobre virus de ciclo replicativo corto.....	97
II.4.9 Absorción proteica	101
II.4.10 Ensayo de hemólisis <i>in vitro</i>	109
II.4.11 Internalización celular NP-BSA.....	111
II.5 Discusión	114
II.6Conclusiones.....	119

III NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO: NP-PLGA

III.1 Introducción.....	121
III.1.1 Clasificación de los surfactantes.....	125
III.1.2 Surfactantes no-iónicos.....	125
III.1.3 HLB de los surfactantes.....	126
III.2 Objetivos e Hipótesis.....	128
III.2.1 Hipótesis:.....	128
III.2.2 Objetivo General:	128
III.2.3 Objetivos Específicos:	128
III.3 Materiales y Métodos	129
III.3.1 Métodos.....	129
III.4 Resultados	134
III.4.1 Formación de NE.....	134
III.4.2 Caracterización de NP-PLGA	140
III.4.3 Estabilidad durante el almacenamiento	141
III.4.4 EJE 143	
III.4.5 Cinética de liberación del PA	144
III.4.6 Ensayos biológicos	145
III.4.7 Adsorción proteica.....	153
III.4.8 Ensayo de hemólisis <i>in vitro</i>	159
III.4.9 Internalización celular de NP-PLGA.....	161
III.5 Discusión.....	165
III.6 Conclusiones.....	169

IV VESÍCULAS LÍPIDICAS: NIOSOMAS

IV.1 Introducción	172
IV.1.1 Temperatura de transición gel-líquido (T _c)	176
IV.1.2 Parámetro crítico de empaquetamiento (CPP, de “ <i>critical packing parameters</i> ”).....	176
IV.2 Objetivos E Hipótesis	178
IV.2.1 Hipótesis:	178
IV.2.2 Objetivo general:	178
IV.2.3 Objetivos específicos:.....	178
IV.3 Materiales y Métodos.....	179
IV.3.1 Método de hidratación de película delgada- TFH.....	179
IV.3.2 Caracterización de los NIO.....	180
IV.3.3 Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM)	180
IV.3.4 <i>EfE</i>	181
IV.4 Resultados.....	182
IV.4.1 Condiciones de encapsulación de PA usando NIO.....	182
IV.4.2 Caracterización de los NIO	184
IV.4.3 Microscopia electrónica de barrido	187
IV.4.4 Rendimiento y <i>EjE</i> de NIO	188
IV.4.5 Ensayos biológicos	190
IV.5 Discusión	198
IV.6 Conclusiones.....	202

ÍNDICE DE GRÁFICOS

INTRODUCCIÓN

Figura intro.1 estructura química del ácido micofenólico-MPA	5
Figura intro.2 estructura química de la ribavirina-RBV	6
Figura intro.3 estructura de la curcumina -CUR	7
Figura Intro.4 Metodologías empleadas para aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles.	9

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura MM.1 Espectro de resonancia magnética en agua básica D ₂ O/NaOD (agua básica)	15
Figura MM.2 Espectro de resonancia magnética en DMSO-d ₆	16
Figura MM.3 Esquema que ilustra la aplicación del MTT para la determinación de viabilidad celular	20
Figura MM.4 Esquema que ilustra el método de cristal violeta para la determinación de viabilidad celular ..	22
Figura MM.5 Esquema del protocolo que sintetiza la estrategia para la visualización de placas de lisis	23
Figura MyM.6 Esquema que sintetiza los pasos seguidos para la determinación de la actividad antiviral	24
Figura MM. 7 Esquema que sintetiza el protocolo seguido para lograr hemólisis in vitro	27

I ASOCIACIÓN INTERMOLECULAR: BSA-MPA

Figura I.1 Estructura cristalina de BSA mostrando y la conformación nativa de la proteína	31
Figura I.2 Representación de interacciones atractivas y repulsivas involucradas en una unión hidrógeno	33
Figura I.3 Interacción intramolecular: <i>Docking</i> entre BSA y MPA	39
Figura I.4 Análisis de espectroscopia de fluorescencia de la unión del MPA a BSA.....	41
Figura I.5 Titulación de BSA con MPA	42
Figura I.6 Eficiencia de FRET.....	43
Figura I.7 Variación en la intensidad de la señal de α hélices de BSA.....	44
Figura I.8 Análisis de agregación proteica en el tiempo.....	45
Figura I.9 Adición de MPA en concentraciones crecientes a una solución de BSA.....	46
Figura I. 10 Radio hidrodinámico interacción intramolecular BSA-MPA	47
Figura I.11 Análisis morfológico de la interacción BSA-MPA.....	48
Figura I.12 Citotoxicidad de MPA mediante la técnica de tinción de cristal violeta.....	50
Figura I. 13 Citotoxicidad de las distintas versiones de MPA mediante la técnica del MTT.	51
Figura I.14 Inhibición viral JUNV	52
Figura I. 15 Evaluación de la protección celular después de la infección con JUNV	53
Figura I.16 Viabilidad celular a distintos tiempos de tratamiento en A549.....	54
Figura I.17 Inhibición viral en función del tiempo de tratamiento	55
Figura I.18 Evaluación de la protección celular después de la infección con JUNV	56

II NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA- NP-BSA

Figura II. 1 Esquema correspondiente a la obtención de NP-BSA.....	65
Figura II.2 <i>Docking</i> BSA-RBV.....	69
Figura II.3 Determinación de la relación BSA: ETOH	70
Figura II.4 Determinación del pH de trabajo.....	71
Figura II.5 Suspensión coloidal de NP-BSA	71
Figura II.6 Radio hidrodinámico de las NP-BSA.....	72
Figura II.7 Imágenes MEB de las NP-BSA.....	75
Figura II.8 Cuantificación de la <i>Efe</i> encapsulación MPA.....	76
Figura II.9 Cuantificación de la <i>Efe</i> encapsulación RBV.....	76
Figura II.10 Citotoxicidad de las NP-BSA sin PA 48 h post-tratamiento	79
Figura II.11 Evaluación citotóxica de las NP-BSA-MPA	80
Figura II. 12 Evaluación citotóxica de las NP-BSA-RBV.....	81
Figura II.13 Evaluación de la actividad antiviral de las NP-BSA-MPA contra ZIKV en función del tiempo .	86
Figura II.14 Evaluación de la actividad antiviral de las NP-BSA-PA contra JUNV en función del tiempo	87
Figura II.15 Evaluación de las NP-BSA-RBV contra ZIKV en función del tiempo	88
Figura II. 16 Evaluación de las NP-BSA-RBV contra JUNV en función del tiempo	89
Figura II.17 Tratamiento de células A549 con NP-BSA-MPA previo a la infección con ZIKV	90
Figura II.18 Tratamiento de células A549 con NP-BSA-MPA previo a la infección con JUNV.....	91
Figura II. 19 Tratamiento de células A549 con NP-BSA-RBV previo a la infección con ZIKV	92
Figura II. 20 Tratamiento de células A549 con NP-BSA-RBV previo a la infección con JUNV	93
Figura II.21 Efecto del tiempo de adición de NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB antiviral contra ZIKV.....	94
Figura II.22 Efecto del tiempo de adición de NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB contra JUNV.....	95
Figura II.23 Reversión de la actividad antiviral de las NP-BSA-MPA contra JUNV y ZIKV	96
Figura II.24 Reversión de la actividad antiviral de las NP-BSA-RBV contra JUNV y ZIKV p	97
Figura II.25 Inhibición del ACP de HSV-1 por NP-BSA-MPA.....	98
Figura II.26 Inhibición del ACP de VSV por NP-BSA-MPA	99
Figura II.27 Inhibición del ACP de HSV-1 por NP-BSA-RBV	100
Figura II.28 Inhibición del ACP de VSV por NP-BSA-RBV	101
Figura II.29 Interacción de BSA con NP-BSA sin PA	102
Figura II.30 Interacción de BSA con NP-BSA-MPA.....	103
Figura II.31 Interacción de BSA con NP-BSA-RBV	103
Figura II.32 Influencia de la absorción de BSA sobre el pot- ζ de las.....	105
Figura II.33 Influencia de fibrinógeno sobre las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV.....	106
Figura II.34 Efecto del fibrinógeno sobre el pot- ζ de las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB.....	106
Figura II. 35 Influencia de isoenzima sobre las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV	107
Figura II. 36 Efecto de la isoenzima sobre el pot- ζ de las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB.	108
Figura II.37 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-BSA a 10 min.....	109
Figura II. 38 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-BSA a 30 min.....	110
Figura II. 39 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-BSA a 240 min.....	110
Figura II. 40 Cinética de internalización de NP-BSA-FITC	111
Figura II. 41 Cinética de internalización de las NP-BSA-FITC.	112
Figura II.42 Cinética de internalización de las NP-BSA-FITC.	113

III NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO: NP-PLGA

Figura III.1 Aspecto macroscópico de una NE O/W.	121
Figura III. 2 Esquema del ensamblaje del surfactante	122
Figura III.3 Estructura de un surfactante	124
Figura III.4 Efecto de los tensoactivos	124
Figura III.5 Clasificación de los surfactantes de acuerdo a su valor de HLB.....	126
Figura III.6 Representación de la clasificación de las NE	127
Figura III.7 Formación de NE por el método de composición inversa de fase PIC y NP-PLGA.....	130
Figura III.8 NP-PLGA en NaOH 0.5 M	132
Figura III. 9 Unidades filtrantes para separar y purificar las NP-PLGA-CUR del PA no encapsulado	132
Figura III.10 Esquema liberación de MPA.....	133
Figura III.11 Representación de los componentes de una NE O/W	135
Figura III.12 Aspecto macroscópico de las NE.	135
Figura III. 13 Distribución del h_o (tamaño de gota) de las distintas NE	136
Figura III. 14 Aspecto macroscópico de las NE	137
Figura III.15 Distribución de tamaños de gota de las NE.....	138
Figura III. 16 h_o de las gotas en la NE con PA en ETOH	139
Figura III. 17 Aspecto macroscópico de las NE-PA.....	140
Figura III. 18 distribución de tamaño de NP-PLGA.....	141
Figura III. 19 NP-PLGA en distintas condiciones de almacenamiento.	142
Figura III.20 EfE de NP-PLGA-MPA.....	143
Figura III.21 EfE de NP-PLGA-CUR	143
Figura III. 22 Liberación de MPA	144
Figura III. 23 Efecto protector de NP-PLGA-MPA sobre la acción citopática de A) HSV-1 y B) VSV.	148
Figura III.24 Efecto protector de NP-PLGA-CUR sobre la acción citopática de A) HSV-1 y B) VSV	150
Figura III.25 Efecto de NP-PLGA-MPA sobre el rendimiento viral de ZIKV.....	152
Figura III. 26 Efecto de NP-PLGA-CUR sobre el rendimiento viral de ZIKV	153
Figura III.27 Interacción de NP-PLGA con BSA.....	154
Figura III.28 Interacción de BSA con NP-PLGA-MPA.....	154
Figura III. 29 Influencia de BSA sobre el $\text{pot-}\zeta$ de las NP-PLGA.....	155
Figura III.30 Interacción del fibrinógeno con las NP-PLGA	156
Figura III. 31 Influencia del fibrinógeno sobre el $\text{pot-}\zeta$ de las NP-PLGA.....	157
Figura III.32 Interacción de las NP-PLGA con isoenzima.	158
Figura III.33 Influencia de la isoenzima sobre el $\text{pot-}\zeta$ de las NP-PLGA.	158
Figura III.34 porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-PLGA luego de 10 min.	159
Figura III.35 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-PLGA luego de 30 min	160
Figura III.36 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-PLGA luego de 240 min	160
Figura III.37 Cinética de ingreso de las NP-PLGA-MPA liofilizadas	161
Figura III.38 Cinética de ingreso de las NP-PLGA-MPA purificadas y re-suspendidas.....	162
Figura III. 39 Internalización de las NP-PLGA-MPA-FITC en función del tiempo.	163
Figura III. 40 Internalización de las NP-PLGA-MPA-FITC en función del tiempo.	164

IV VESÍCULAS LÍPIDICAS: NIOSOMAS

Figura IV. 1 Clasificación de las vesículas artificiales	173
Figura IV.2 Estructura del niosoma.....	173
Figura IV. 4 Parámetros relacionados con la CPP	177
Figura IV. 5 Obtención de NIO por el método TFH.	179
Figura IV.6 Esquema para la preparación de NIO.....	182
Figura IV. 7 Suspensiones coloidales de la obtención de NIO	184
Figura IV. 8 Distribución de tamaño de NIO sin PA.....	185
Figura IV. 9 Distribución de tamaño los de NIO ^{RBV}	185
Figura IV. 10 Distribución del tamaño de NIO ^{MPA}	186
Figura IV. 11 Distribución de Tamaño de partículas de NIO ^{CUR}	186
Figura IV. 12 Micrografías STEM con tinción negativa de NIO	187
Figura IV. 13 Efecto de la temperatura sobre la EJE de RBV	189
Figura IV. 14 Citotoxicidad de los NIO ^{MPA}	191
Figura IV. 15 Citotoxicidad de los NIO ^{CUR}	191
Figura IV. 16 Citotoxicidad NIO ^{MPA-CUR}	192
Figura IV. 17 Citotoxicidad de NIO ^{RBV}	192
Figura IV.185 Efecto Antiviral de los NIO ^{MPA}	194
Figura IV.19 Actividad Antiviral de los NIO ^{CUR}	195
Figura IV.20 Actividad Antiviral de los NIO ^{MPA-CUR}	196

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla MM.1 Tinciones utilizadas en los ensayos de internalización.....	29
--	----

I ASOCIACIÓN INTERMOLECULAR: BSA-MPA

Tabla I.1 CC ₅₀ y CI ₅₀ frente a JUNV en células Vero y A549	49
--	----

II NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA- NP-BSA

Tabla II. 1 Propiedades y dimensiones de las NP-BSA.....	72
Tabla II.2 Análisis de estabilidad de las NP-BSA	73
Tabla II.3 Citotoxicidad de los PA libres	77
Tabla II.4 Determinación de la citotoxicidad en función del tiempo de tratamiento en la línea celular A549 .	77
Tabla II.5 Actividad antiviral de MPA contra ZIKV y JUNV	82
Tabla II.6 Actividad antiviral de RVB contra ZIKV y JUNV	83
Tabla II.7 Actividad antiviral de las NP-BSA contra ZIKV	83
Tabla II.8 Actividad antiviral de las NP-BSA contra JUNV	84
Tabla II.9 Comparación de los índices de selectividad (IS) de los PA	84
Tabla II.10 Interacción NP-BSA y BSA.....	102
Tabla II.11 Interacción NP-BSA-MPA y BSA.....	104
Tabla II.12 Interacción NP-BSA-RBV y BSA	104
Tabla II.13 Interacción NP-BSA con fibrinógeno	107
Tabla II.14 Interacción de NP-BSA con isoenzima.....	108

III NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO: NP-PLGA

Tabla III.1 Relación O:S.....	138
Tabla III.2 Distribución de tamaño gota de las NE	139
Tabla III.3 Condiciones de almacenamiento NP-PLGA	142
Tabla III.4 Citotoxicidad de CUR libre	145
Tabla III.5 Citotoxicidad de las NP-PLGA a 48 h.....	146
Tabla III.6 Actividad antiviral de CUR libre contra HSV-1 y VSV	146
Tabla III.7 Actividad antiviral de MPA libre contra HSV-1 y VSV	147

IV VESÍCULAS LÍPIDICAS: NIOSOMAS

Tabla IV.1 Estandarización de condiciones para la obtención de NIO en base a Z-ave, PdI, y pot-ζ	183
Tabla IV. 2 Rendimiento en términos de masa obtenida (mg de NIO)	188
Tabla IV. 3 E _f E (% , PA en NIO).....	189

ABREVIATURAS

API: "*Active Pharmaceutical Ingrediente*" / ingrediente farmacéutico activo

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CC: control celular

CC₅₀: Concentración Citotóxica₅₀

CPP: Parámetro Crítico de Empaquetamiento "Critical Packing Parameters"

CI₅₀: Concentración Inhibitoria 50

CV: control viral

Da: Daltons

DAA: antivirales de acción directa

DLS: dispersión dinámica de luz

DMSO: dimetilsulfóxido

DC: Dicroísmo circular

ETOH: etanol

HSV: virus del herpes simple

HCMV: citomegalovirus humano HCMV

HSV-1: Virus herpes simplex tipo 1

HLB: Balance hidrofílico-lipofílico

HTA: antivirales dirigidos al huésped

***h*₀:** Radio hidrodinámico

***PdI*:** índice de polidispersidad

ICH: Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos para Uso Humano (por sus siglas en inglés)

IV: Infección viral

IMPDH: inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FITC: sonda fluorescente Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato.

f: frecuencia

JUNV: Virus de Junín

λ = longitud de onda

m.i: multiplicidad de infección

MEB: microscopía electrónica microscopía electrónica de barrido

MEM: medio mínimo esencial Eagle

MM: materiales y métodos

MP: medio de plaqueo

MPA: ácido micofenólico

MPA-BSA: interacción intramolecular MPA-BSA

MPA-E: ácido micofenólico, extraído 70% pureza

MPA-F: ácido micofenólico –BSA

MPA-S: ácido micofenólico, sigma 98% pureza

NE: nanoemulsión / nanoemulsiones

nm: nanómetro

NP: Nanopartículas

NP-BSA: Nanopartículas de albumina sérica Bovina

NP-BSA-MPA: Nanopartículas de albumina sérica Bovina con ácido micofenólico

NP-BSA-RBV: Nanopartículas de albumina sérica Bovina con ribavirina

NP-PLGA: Nanopartículas de poli (D, L-lactido-co-glycolido)

NP-PLGA-CUR: Nanopartículas de poli (D, L-lactido-co-glycolido) con curcumina.

NP-PLGA-FITC: Nanopartículas de poli (D, L-lactido-co-glycolido) con la sonda fluorescente Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato.

NP-PLGA-MPA: Nanopartículas de poli (D, L-lactido-co-glycolido) con ácido micofenólico

O/W: Aceite/agua por el término en ingles *oil/water*

(O): fase oleosa

PIC: por el término en inglés *phase inversion composition*

p.i.: post infección

p/p: peso /peso

p/v: peso/volumen

PA: Principio Activo

PBS: solución buffer fosfato

PFA: Paraformaldehído

pot- ζ : Potencial Zeta

Tc: Temperatura de transición gel-líquido

Tween80: Polysorbat0 80- Tween ®80

TFH: hidratación de película fina o “Thin film hydration”

Tpartícula: tamaño de partícula

RMN ¹H: Espectros de resonancia magnética de protones

RMN: resonancia magnética nuclear

RMSD: root-mean-square deviation/ desviación cuadrática media

(S): surfactante

SFB: suero fetal bovino

ST: suero de ternera

SN: sobrenadante

UFP/cél.: Unidades formadoras de placas/células

UFP/mL: Unidades formadoras de placas/mililitro

UFP: unidades formadoras de placa

v/v: volumen/volumen

V: volts

NIO: Niosomas

NIO^{CUR}: Niosomas con curcumina

NIO^{MPA-CUR}: Niosomas con curcumina y MPA y/o mixtos

NIO^{MPA}: Niosomas con ácido micofenólico

NIO^{RBV}: Niosomas con ribavirina

VSV: Virus de la estomatitis vesicular

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

W: Watt

(W): fase acuosa

W/O: Agua/aceite por el término en ingles *water /oil*

ZIKV: Virus Zika Puerto Rico

Z-Ave: Z-average /promedio del tamaño

GENERALIDADES

INFECCIONES VIRALES

Las infecciones microbianas son la causa principal de la alta tasa de mortalidad en todo el mundo, en particular los virus que tienen un impacto mundial en el desarrollo socioeconómico y la atención médica. Los virus son mucho más pequeños que un hongo o una bacteria, necesitan ingresar a una célula para replicarse y generar una infección, y para ello debe superar las barreras protectoras naturales del organismo y evadir el control inmunológico. La respuesta inmunitaria es la mejor herramienta para controlar la diseminación del virus; sin embargo, en ocasiones, contribuye a la patogénesis de la infección (Galán-Sánchez *et al.*, 2014; Kuiken *et al.*, 2003). Nuevos virus emergen o los ya conocidos recrudecen y se propagan en todo el mundo a un ritmo más rápido como resultado de la alta globalización, planteando una gran amenaza para la salud pública, además de tener el potencial de hacer descarrilar la economía global (Dejnirattisai *et al.*, 2021).

En 2020, síndrome respiratorio agudo por Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) se propagó velozmente a nivel mundial, acabando con la vida de millones de personas y cambiando drásticamente la del resto. La historia moderna ha sido testigo de la propagación de varios virus pandémicos, incluido el virus de la influenza A H2N2 (1956), gripe H3N3 (1968), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV 1982-2012), enfermedad respiratoria aguda grave (SARS, 2002), gripe A H1N1 (2009-2010), mientras que el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) y el virus del Ébola aún se encuentran en una fase previa a la pandemia (Zhou *et al.* 2021). Los virus que tienen en común un tropismo tisular determinado pueden causar enfermedades similares tales como hepatitis, cuadros respiratorios o encefalitis. Por otro lado, un mismo virus puede ser responsable de enfermedades diferentes e incluso infecciones asintomáticas. Muchas infecciones víricas benignas pueden llegar a ser una amenaza vital en pacientes inmunodeprimidos, niños y ancianos.

Los esfuerzos de investigación para mitigar sus efectos se han concentrado en mejorar las capacidades de vigilancia y diagnóstico, así como en el desarrollo de vacunas y agentes antivirales. Es necesario prestar más atención a la identificación de las causas subyacentes de la aparición de enfermedades infecciosas, que a menudo están relacionadas con cambios sociales y ambientales antropogénicos. Abordar estos factores podría ayudar a disminuir la tasa de aparición de

enfermedades infecciosas y permitir la transición hacia una sociedad más sostenible (Thangadurai *et al.*, 2022).

ANTIVIRALES

Por lo general, se emplean dos estrategias diferentes para el desarrollo de la quimioterapia antiviral: el enfoque basado en objetivos virales, destinado a bloquear una proteína codificada por el virus, lo que da lugar al diseño de antivirales de acción directa (**DAA**), y el enfoque dirigido al hospedador, dirigido a interferir con cualquier componente celular involucrado en el ciclo de multiplicación del virus (**HTA**) (Sepúlveda *et al.*, 2022). La mejor manera de prevenir las infecciones virales es la vacunación; sin embargo, solo existe un número limitado de vacunas, y las que existen no están igualmente disponibles en todas partes del mundo. Después de la infección, los medicamentos antivirales son la única opción de tratamiento, pero incluso en este caso sólo hay un número limitado con estatus de aprobados, y todos son específicos del virus (Cagno *et al.*, 2018).

Existe una gran necesidad de medicamentos antivirales de amplio espectro que puede actuar sobre un gran número de virus existentes y emergentes. Las terapias actuales se pueden subdividir en moléculas pequeñas como: **a)** análogos de nucleósidos y peptidomiméticos, **b)** proteínas capaces de estimular la respuesta inmune, por ejemplo el interferón, y **c)** oligonucleótidos como es el caso del, fomivirsen (De Clercq, 2002; De Clercq & Li, 2016). Las estrategias citadas están dirigidas principalmente contra el virus de la inmunodeficiencia humana (**VIH**), el virus de la hepatitis B (**VHB**), la hepatitis C (**HCV**), virus del herpes simple (**HSV**), citomegalovirus humano (**HCMV**) y virus de la gripe. Actúan intracelularmente, principalmente sobre enzimas virales que son esenciales para la replicación viral, pero difieren de cualquier otra enzima del hospedador para permitir la selectividad. Dado que los virus en gran medida dependen para su replicación de la maquinaria biosintética de las células infectadas, la especificidad de los medicamentos antivirales está lejos de ser ideal, lo que resulta en una toxicidad intrínseca general asociada con dicho tratamiento (Cagno *et al.*, 2018; De Clercq & Li, 2016).

Los virus emergentes y reemergentes han sido un desafío para la salud pública en las últimas décadas. Los HTA dirigidos a moléculas celulares o vías involucradas en la multiplicación viral representan una estrategia interesante para combatir a los que actualmente carecen de quimioterapia eficaz. Los HTA podrían proporcionar una amplia gama de agentes con actividad inhibitoria contra virus actuales y futuros que comparten requisitos similares del hospedador y reducir la posible

selección de variantes resistentes. El metabolismo de los nucleótidos es una de las vías metabólicas del hospedador más explotadas como potencial antiviral y objetivo de varios virus humanos. (De Clercq, 2002).

ANTIVIRALES DE AMPLIO ESPECTRO

Los antivirales de amplio espectro pueden proporcionar un rango extenso de agentes con efectos inhibitorios contra todos los virus circulantes que comparten un hospedador similar, así como para futuros patógenos emergentes o reemergentes. Esta estrategia también permite la reutilización de medicamentos previamente aprobados para otros tratamientos terapéuticos con un proceso menos costoso de desarrollo antiviral dada la información conocida sobre seguridad, biodisponibilidad y validación de compuestos para uso clínico (reposicionamiento de fármacos). Los factores del hospedador analizados como posibles blancos antivirales incluyen diversas moléculas y vías tales como agentes lisosomotrópicos, metabolismo de lípidos, síntesis de proteínas y plegamiento, metabolismo de nucleótidos, ribonucleoproteínas que participan en la maduración y tráfico de RNAm, quinasas que modulan vías de señalización, glucosidasas y la manipulación de factores de restricción virales involucrados en la inmunidad innata intrínseca, entre otros (Sepúlveda *et al.*, 2022).

INHIBIDORES DIRIGIDOS A BLANCOS CELULARES

Como una alternativa al enfoque tradicional para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos, en los últimos años ha comenzado a surgir con fuerza la idea de utilizar factores celulares que participan en la infección viral como potenciales blancos antivirales. Las ventajas de este abordaje se basan fundamentalmente en la factibilidad de obtener drogas de amplio espectro activas contra distintos virus patógenos, así como la posibilidad de evitar la aparición de la resistencia antiviral, uno de los problemas clave de la quimioterapia en la actualidad (Hickman *et al.*, 2022).

En contraposición, esta estrategia antiviral puede resultar en mayor citotoxicidad respecto del uso de blancos específicos virales. En distintos procesos de la infección, desde la adsorción y entrada hasta el ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales, participan numerosos componentes celulares que representan nuevos puntos posibles de ataque para bloquear la infección viral (Chianese *et al.*, 2022; Sepúlveda *et al.*, 2012).

El desarrollo de nuevos fármacos basados en la inhibición de la inosina monofosfato deshidrogenasa (**IMPDH**), una enzima clave en la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina, es una importante diana terapéutica para el control de las infecciones virales. En el mercado se tienen disponibles tres inhibidores de la IMPDH: ribavirina (Rebetol®), mizoribina (Bredinin®) y mofetilo micofenólico (CellCept®) que se han introducido como inmunosupresores, lo que generó el estudio de otros inhibidores para ser empleados como antivirales (Pankiewicz *et al.*, 2004).

ÁCIDO MICOFENÓLICO

El ácido micofenólico (**MPA**) es un inhibidor selectivo y reversible de la IMPDH cuya acción ocurre después de la formación del complejo ternario IMPDH-IMP-NAD (**Figura Intro.1**). Está prescrito como formulación de micofenolato mofetilo (MMF, CellCept® Roche Laboratories, Palo Alto, CA, EE. UU.), un profármaco que utiliza el éster etílico de morfolino de MPA diseñado para superar su baja biodisponibilidad oral. El MPA fue probado como un antiviral de amplio espectro poco después de su descubrimiento en 1968. Desde entonces, su acción antiviral ha sido evaluada contra varios virus humanos, animales y vegetales con una variedad de tipos de genomas (Siebert *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 1968).

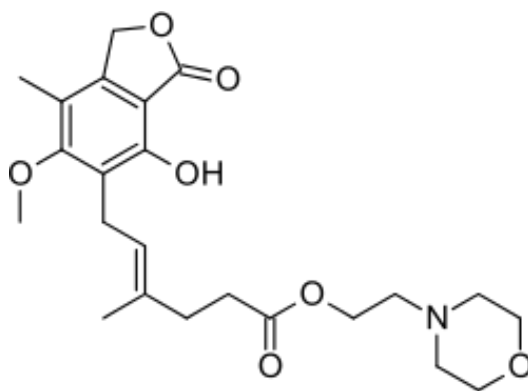


Figura Intro.1 Estructura química del ácido micofenólico-MPA

En la última década, los reportes corresponden a su evaluación *in vitro* frente a virus emergentes o contra virus que resurgen esporádicamente generando importantes brotes locales. También se publicaron ensayos en los que se evaluó al MPA utilizando vaccinia (**VACV**), norovirus (**NV**), hepatitis E (**HEV**) y MERS-CoV. En todos esos casos, el MPA mostró un potente efecto antiviral a través de la inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos. En otros casos, fue posible demostrar mecanismos accesorios de acción antiviral asociados a la depresión de purinas. Por ejemplo, MMF

induce la apoptosis en varias líneas tumorales, sin embargo, el MMF inhibió la apoptosis inducida por los flavivirus asociada a la replicación del genoma por agotamiento de GTP, dando como resultado la disminución de la producción de progenie viral y, por lo tanto, una inhibición del efecto citopático viral (Agnieszka *et al.*, 2017; Mourad *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1968).

RIBAVIRINA (RBV)

La RBV (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) tiene actividad antiviral de amplio espectro contra una amplia gama de virus. La RBV (**Figura Intro.2**) (RIB, Virazole®, Valeant Pharmaceuticals, Laval, QC, Canadá) fue el primer análogo de nucleósido sintético con actividad antiviral de amplio espectro contra virus con genoma de DNA y RNA. Hay varios mecanismos de acción antiviral propuestos que actúan en diferentes maneras en diferentes virus. Aunque RIB fue activa *in vitro* contra un amplio espectro de virus, en muchos casos correlacionó con un beneficio en ensayos *in vivo* y su uso clínico solo está aprobado formalmente para el tratamiento de infecciones por el virus sincicial respiratorio (Cooper *et al.*, 2003) y HCV combinado con INF pegilado (Pawlotsky, 2003). Aunque no está aprobado, es también el tratamiento indicado para las infecciones por virus que causan fiebre hemorrágica (Huggins, 1989). Actualmente se están realizando varios estudios donde se propone su uso clínico contra influenza (Hayden & Shindo, 2019), virus causantes de fiebres hemorrágicas o virus emergentes (Chaturaka *et al.*, 2022; Ramírez-Olivencia *et al.*, 2019), y muchos otros donde se sugiere revisar su efectividad (Salam *et al.*, 2021).

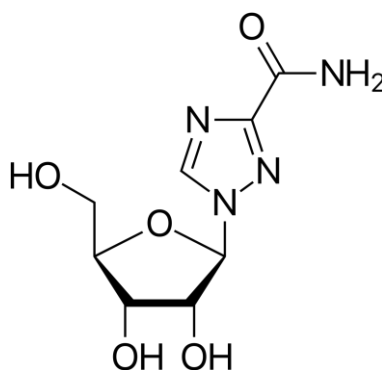


Figura Intro.2 Estructura química de la ribavirina-RBV

Se han sugerido varios mecanismos de acción para ser responsable de la actividad antiviral de la RBV (Leyssen *et al.*, 2005). El primer mecanismo propuesto es la inhibición de la IMPDH a través de la competencia con la IMP del monofosfato de RIB, disminuyendo las reservas de nucleósidos de guanosina. En segundo lugar, su actividad inmunomoduladora aumenta la actividad de los linfocitos T, especialmente Th, o afecta el perfil de citoquinas. Otros mecanismos implican la inhibición de la incorporación del cap en el ARN, la inhibición directa de la polimerasa viral y el efecto mutagénico letal debido a la incorporación de su versión trifosfato en el genoma viral como un análogo de GTP. La incorporación de este nucleótido no natural en el RNA viral catalizada por la ARN polimerasa dependiente de ARN viral se amplifica aún más por las reservas reducidas de GTP causadas por la inhibición de la IMPDH, lo que aumenta la frecuencia de incorporación del trifosfato de RIB en lugar de GTP.

CURCUMINA (CUR)

La curcumina (diferuloilmetano) es el curcuminóide primario (**Figura Intro.3**) derivado del rizoma de la planta *Curcuma longa*, y normalmente se usa como colorante alimentario o como especia. La curcumina ha tenido un amplio uso en la medicina asiática tradicional debido a sus propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes. La investigación moderna también ha demostrado que la curcumina tiene propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antimicrobianas, y ha sido reconocida como “sustancia segura” por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Jennings & Parks, 2020; Kotha & Luthria, 2019). Aproximadamente del 3 al 5 % de la cúrcuma molida y seca son curcuminoides. Los curcuminoides están compuestos por curcumina (77%), demetoxicurcumina (17%) y bisdemetoxicurcumina (6%) (**Figura Intro.3**).

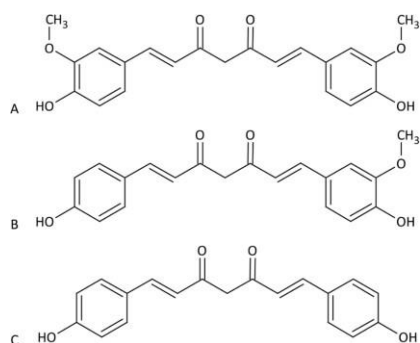


Figura Intro.3 Estructura de la curcumina -CUR
(A), Estructura química de la curcumina, (B) demetoxicurcumina y (C) bisdemetoxicurcumina

El primer reporte de que la CUR tuviera propiedades antivirales se produjo en la década de 1990 con el descubrimiento de su capacidad de inhibir *in vitro* la proteasa viral del VIH. Desde entonces, numerosos estudios han informado sobre las propiedades antivirales de la CUR contra un conjunto diverso de virus con genomas de ARN y ADN (Lestari y Indrayanto, 2014). La CUR tiene varias limitaciones: es prácticamente insoluble en agua, posee baja biodisponibilidad *in vivo* ya que tan solo el 1% es absorbida por el cuerpo y permanece prácticamente indetectable en los tejidos blanco. Además, es inestable a pH fisiológico, con una vida media de aproximadamente 8 h en medio de cultivo conteniendo suero, y se degrada rápidamente dando varios productos ineficaces. Tales limitaciones han impedido que muchos hallazgos *in vitro* se tradujeran en beneficios en su uso clínico (Jennings y Parks, 2020).

DESARROLLO DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

El mejoramiento de la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos juega un papel clave en el desarrollo de una formulación para lograr la mejor biodisponibilidad y acción terapéutica en el sitio objetivo. Alrededor del 40% de las nuevas entidades químicas identificadas por los programas de detección de la industria farmacéutica enfrentan numerosos problemas en la etapa de formulación y desarrollo debido a la escasa solubilidad en agua y la baja biodisponibilidad (Vimalson, 2016).

La investigación y el descubrimiento de nuevos medicamentos es un reto global en el que tanto la academia como la industria farmacéutica tienen un papel fundamental. El procedimiento para desarrollar una forma farmacéutica conteniendo un nuevo fármaco (o, como lo define Farmacopea Argentina en su 7° edición, ingrediente farmacéutico activo) involucra muchas etapas y tiempo, y requiere una gran inversión, sin olvidar que antes de que un medicamento llegue al mercado, ha de pasar por un largo proceso que implica el descubrimiento y la experimentación con la molécula elegida, ensayos en animales y pruebas en humanos (Roy, 2011).

De acuerdo con dicho sistema, un fármaco se considera altamente soluble cuando la mayor concentración a la cual se dosifica es soluble en un volumen de medio acuoso de 250 ml en un rango de pH de 1,0 a 7,5, este volumen surge de protocolos de estudios de bioequivalencia. En caso contrario, el fármaco se considera poco soluble. Por otra parte, la clasificación de permeabilidad se basa en el grado de absorción intestinal del fármaco en seres humanos o indirectamente en las proporciones (en peso) que atraviesan una membrana, ya sea intestinal humana o de modelos animales y se lo considera altamente permeable cuando se determina un grado de absorción

intestinal de 90% o superior basado en el balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa (Arrua Eva C., 2018).

Según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, SCB, se distinguen cuatro tipos diferentes de regímenes de absorción del fármaco como se describe en la **Figura Intro.4**



Figura Intro.4 Características del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

Para mejorar la solubilidad acuosa y la velocidad de disolución de fármacos hidrófobos en el sitio de absorción, han surgido numerosas metodologías como la alteración de la composición solvente, formación de complejos, modificación química y física, entre otros (**Figura Intro.5**).

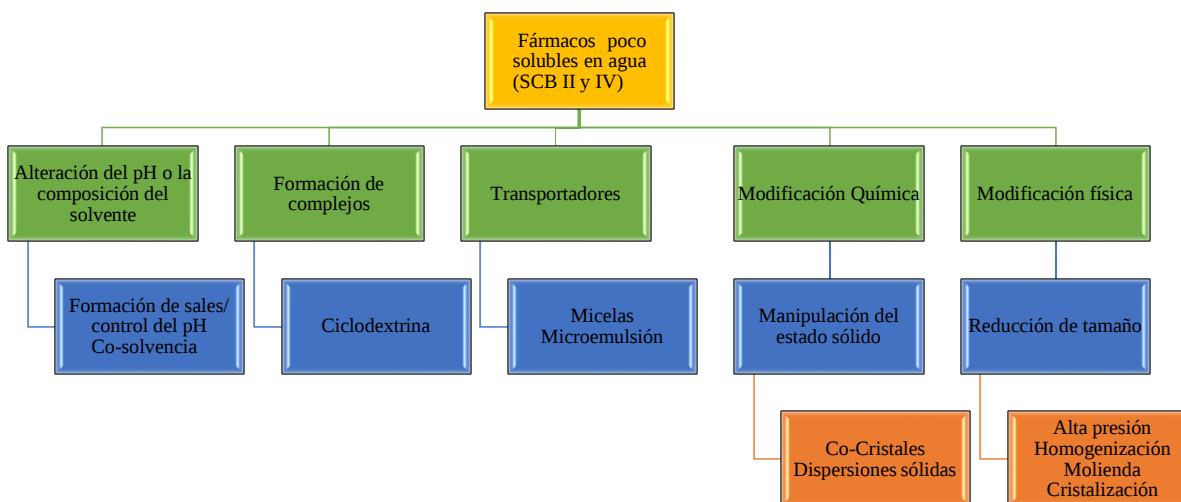


Figura Intro.5 Metodologías empleadas para aumentar la solubilidad y mejorar la disolución de fármacos poco solubles. (Adaptado de Arrua Eva C., 2018)

En este contexto, el desarrollo y empleo de los sistemas micro- y nanoparticulados de fármacos se ha incrementado notablemente durante los últimos años. Principalmente, se han utilizado para

reducir la toxicidad y los efectos secundarios de los fármacos, así como para otorgarles protección frente a diferentes condiciones externas como pH, humedad, luz, temperatura, entre otras. Además, el uso de dichos sistemas permite el bio-direccionamiento a órganos, tejidos o células blanco específicos y, en el caso de los nanovectores, su tamaño subcelular les permite una mayor captación intracelular comparada con la de partículas de mayor tamaño. Debido a su aplicación en la clínica médica, los materiales que constituyen el nanotransportador deben ser biocompatibles, estables en condiciones fisiológicas, con gran capacidad de carga de fármacos⁸ y baja toxicidad (Merisko-Liversidge y Liversidge, 2008).

NANOTECNOLOGÍA

En el siglo XXI la nanotecnología se ha convertido en una de las áreas de más rápido desarrollo en el campo de la ciencia y la tecnología (Mangematin y Walsh 2012). La nanotecnología es un campo multidisciplinario que combina la ciencia aplicada y la ingeniería para enfocarse en maneras de controlar y medir objetos a nivel molecular, comúnmente se usan materiales con al menos una dimensión dentro del rango de 1 a 100 nm (Soto y Ratna 2010), aunque en la práctica se acepta un límite superior de 500 nm ya que las propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas y mecánicas no cambian significativamente entre los 100 y los 500 nm (Di Santo *et al.*, 2021).

En el campo antiviral actual, uno de los grandes retos de la industria médica, biotecnológica y farmacéutica es el surgimiento de variantes virales y nuevos virus resistentes que se transforman en una amenaza global para la salud humana. Para reducir o evitar el riesgo de nuevas pandemias, existe la urgencia de desarrollar nuevos tratamientos y herramientas antivirales para detener de manera eficiente la propagación de los virus, impulsar la inmunización y mejorar la supervivencia de las personas infectadas (Reina *et al.* 2020).

Las propiedades únicas de las nanopartículas (NP), como la alta relación área superficial/volumen, el tamaño, la química de la superficie, etc., ofrecen un gran potencial para el control de patógenos. Las NP orgánicas son los agentes de transporte de fármacos más utilizados de acuerdo a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y fácil modificación de la superficie. Las NP orgánicas biocompatibles exhiben un amplio espectro de acción antiviral (Singh *et al.* 2017), se utilizan con eficacia para entregar fármacos a sitios blanco y detectar enfermedades virales en una etapa temprana usando imágenes sensibles. Además, interactúan con las moléculas presentes en la sangre o en los tejidos de los órganos y ayuda en la inactivación de virus o la inhibición de la unión viral

con el receptor de la célula hospedadora. Varias plataformas han sido aprobadas para propósitos clínicos, estos incluyen agentes de contraste para estudios mediante resonancia magnética nuclear y tomografía por emisión de positrones, Paclitaxel unido a albúmina (Abraxane®), administración de fármacos usando ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) formulaciones y vacunas basadas en virus (Thangadurai *et al.*, 2022).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de tesis contempla el diseño, caracterización físico-química y evaluación de la actividad biológica de diferentes nanosistemas desarrollados con el objetivo de implementar una alternativa a los tratamientos convencionales de administración de **(PA)** o medicamentos. A continuación, en este capítulo se recoge la información general de cada una de las técnicas de caracterización empleadas, entre ellas espectroscópicas, ópticas, biológicas, y otras, así como los detalles instrumentales de los equipos utilizados. La metodología llevada a cabo en este trabajo se separó en 4 etapas: **1) Formulación de los nanosistemas**, en esta etapa se diseñaron y estandarizaron los protocolos para la obtención de los distintos nanosistemas. Posteriormente, se realizó la **2) caracterización fisicoquímica de los nanosistemas** y la **3) cuantificación de los PA**, para ellos se emplearon técnicas espectrofotométricas en función de determinar la eficiencia de encapsulación (**EJE**). Por último, **4) evaluación *in vitro* de la actividad biológica**, se realizaron ensayos para determinar la citotoxicidad de los nanosistemas, la internalización en la célula y la actividad antiviral.

REACTIVOS Y SOLVENTES

Los reactivos empleados en este trabajo fueron de grado analítico. Los mismos fueron adquiridos de Merck (© 2022 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania y/o sus filiales). Para la preparación de las distintas soluciones se utilizó agua ultrapura 18 M Ω (Milli-Q system). En cuanto a los PA, el **MPA**, se recibió como donación de la farmacéutica Novartis, Argentina en su forma comercial Myfortic® 360 mg de donde se extrajo el PA como se detallará más adelante. Mientras que la **RBV** y la **CUR** fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (EE. UU) con fondos de la beca UNU-BIOLAC. En cuanto a los surfactantes se recibieron como donación del Laboratorio de Química Coloidal e Interfacial del Centro de Investigaciones en Materiales Avanzados (CIMAV), Unidad Monterrey-México dirigido por la Dra. Margarita Sánchez Domínguez.

MÉTODOLOGÍA

1.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO: DOCKING

El acoplamiento molecular (conocido como *docking*) es una técnica de mecánica molecular ampliamente utilizada como herramienta bioinformática para predecir energías y modos de enlace entre ligandos y proteínas, lo que proporciona información de gran utilidad para el estudio de compuestos nuevos y existentes con aplicaciones en medicina. Se realizó un experimento de *docking* ciego entre MPA-BSA y RBV-BSA, sobre toda la superficie de la proteína, para lo cual se empleó el programa AutoDock 4.2. La estructura de la proteína se preparó con Maestro (Schrödinger), usando la protonación adecuada. Los mapas de energía para cada tipo de átomo del ligando, se calcularon en función de la conformación de la proteína. La rejilla se centró en el centro geométrico de la proteína y se extendió hasta alcanzar un prisma rectangular que cubría toda su superficie (Morris *et al.* 2009).

El espacio entre los puntos de la cuadrícula se fijó en 0,375 Å. Se realizaron cien ejecuciones de acoplamiento y las poses resultantes se agruparon de acuerdo con el átomo pesado del ligando RMSD usando un corte de 2 Å, generando una clasificación de grupos de conformación ordenados por su puntuación de acoplamiento (estimación de energía libre de unión). La búsqueda conformacional se realizó con el algoritmo genético Lamarckiano implementado en AutoDock4, manteniendo los parámetros por defecto tanto para búsqueda global como local (Elokely y Doerksen 2013; Guedes, de Magalhães, y Dardenne 2014; Ritu *et al.* 2020).

1.2 ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

1.2.1 CUANTIFICACIÓN DEL MPA

La cuantificación del MPA se llevó a cabo mediante la técnica de espectroscopía de fluorescencia, con el objetivo de determinar concentraciones, en estos ensayos se utilizó una solución patrón de 10 mM en etanol (ETOH) absoluto (ref # C1386, Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania). Basado en el espectro de absorción y emisión de luz del MPA, se determinaron los límites de detección para su cuantificación, los cuales se encontraban en el rango micromolar (μM). La cuantificación se realizó usando un espectrofotómetro (Aminco Bowman Series 2, luminescence Spectrophotometer, ThermoSpectronic) excitando a una $\lambda = 342 \text{ nm}$ con un *band pass* de 8 nm y leyendo la emisión $\lambda =$

425 nm con un *band pass* de 8 nm, a un voltaje variable entre 700-900 V. Se realizó una curva de calibración partiendo de 10 µM (3,2 µg/mL), se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 0,5 µM (0,160 µg/mL) y cada muestra fue leída por duplicado.

Se tomaron cinco puntos de referencias más los controles y blancos. Basado en esta curva se estimaron las concentraciones de las distintas muestras usando la ecuación **MM.1**. La medida de la concentración mediante un método instrumental espectrofotométrico se basa en la existencia de una relación proporcional entre dicha concentración y la señal analítica o respuesta que genera un instrumento. Generalmente esta relación es lineal, de modo que puede expresarse como se muestra en la ecuación **MM.1** (Ma *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2021).

$$y = (a + b) * CA \quad \text{Ec. MM.1}$$

Donde CA es la concentración del analito y la señal medida, a es la ordenada en el origen y b la pendiente de la recta. La ecuación de la curva se obtiene mediante calibración con disoluciones de concentración perfectamente conocida (disoluciones patrón) a partir de la medida de la señal analítica proporcionada por éstas. Los pares de valores concentración-signal se ajustan a una recta, a partir de la cual pueden obtenerse la concentración del analito en muestras desconocidas.

1.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORBANCIA (UV/VIS)

1.3.1 CUANTIFICACIÓN DE RBV

La cuantificación de RBV, se llevó a cabo mediante la técnica de espectroscopía UV-VIS. Para estos ensayos se utilizó una solución patrón de 10 mM, que se preparó usando agua ultrapura estéril. La cuantificación se realizó usando el espectrofotómetro V-650 de doble haz (JASCO) teniendo en cuenta el espectro de absorción máxima de la molécula en agua, máx 206 nm. Realizando una curva de calibración partiendo 100 µM (240 µg/mL), se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 10 µM (2,4 µg/mL). Cada muestra fue leída por duplicado y se tomaron cinco puntos de referencia más los controles y blancos. Basado en esta curva se determinó la ecuación de la recta y se estimaron las concentraciones de las distintas muestras usando la ecuación **MM.1** (Fernández, Banks, y Smith 1986; Kienskaya *et al.* 2019).

1.3.2 CUANTIFICACIÓN DE CUR

La cuantificación de CUR se llevó a cabo mediante la técnica de espectroscopía UV-Vis basado en el espectro de absorción de la molécula a $\lambda = 425$ nm. La cuantificación se realizó con el espectrofotómetro V-650. Se preparó una solución stock de 10 mM en ETOH absoluto. La curva de calibración se realizó partiendo de una solución patrón de 100 μ M (36,84 mg/mL), y se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 10 μ M (3,68 mg/mL). Las muestras fueron medidas por duplicado y se tomaron cinco puntos de referencia más los controles y blancos. Se determinó la ecuación de la recta con los datos obtenidos y en base a esto se determinaron las concentraciones de las distintas muestras incógnita usando la ecuación **MM.1** (Rapalli *et al.*, 2020; Silva-Buzanello *et al.*, 2015).

1.4 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN ^1H) PARA DETERMINAR LA PUREZA DE MPA

1.4.1 CARACTERIZACIÓN Y PUREZA DE MPA POR RMN ^1H

La donación de la formulación comercial Myfortic® 360 mg (Novartis, Argentina) fue utilizada para la extracción del MPA en su forma de micofenolato de sodio. Se realizaron varias pruebas para estandarizar el proceso de extracción a fin de eliminar la mayor cantidad de excipientes posible para poder emplearlo en los posteriores ensayos. Este proceso se realizó con la colaboración con la Dra. Andrea Rivas perteneciente al grupo de Química Organometálica del INQUIMAE-UBA. Se realizó una extracción sólido-líquido, que inició con la pulverización de las pastillas en un mortero de cerámica (tres pastillas de MPA/1500 mg).

El polvo obtenido fue disuelto en ETOH absoluto para solubilizar el PA y separarlo de los excipientes hidrosolubles. El producto obtenido fue centrifugado a 5750 x g por 15 min para eliminar residuos y finalmente fue filtrado usando papel filtro cualitativo # 4 (Whatman® qualitative filter paper, Grade 4). Adicionalmente se realizaron tres ciclos de lavados para poder separar la fase sólida de la líquida. El compuesto solubilizado en ETOH se pasó por una columna preparativa C18 (Agilent®) y se eluyó usando ETOH. Finalmente, la solución fue secada usando una bomba de vacío (Thermo Fisher) por 4 h, los productos sólidos obtenidos se determinaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN ^1H).

Debido a las características apolares del MPA se analizaron los espectros RMN ^1H en agua básica deuterada y en DMSO deuterado para tener una visión global de la molécula (Pauli K 2014; Wawer y Diehl 2017). Los espectros obtenidos por RMN ^1H en ambas condiciones permitieron determinar el grado de pureza del MPA extraído. Los resultados obtenidos para el espectro RMN ^1H del agua básica ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$) se muestran en la

Figura MM.1 y en la

Figura MM.2 para RMN ^1H DMSO- d_6 . Mediante los análisis realizados se determinó un 70% de pureza en la masa extraída.

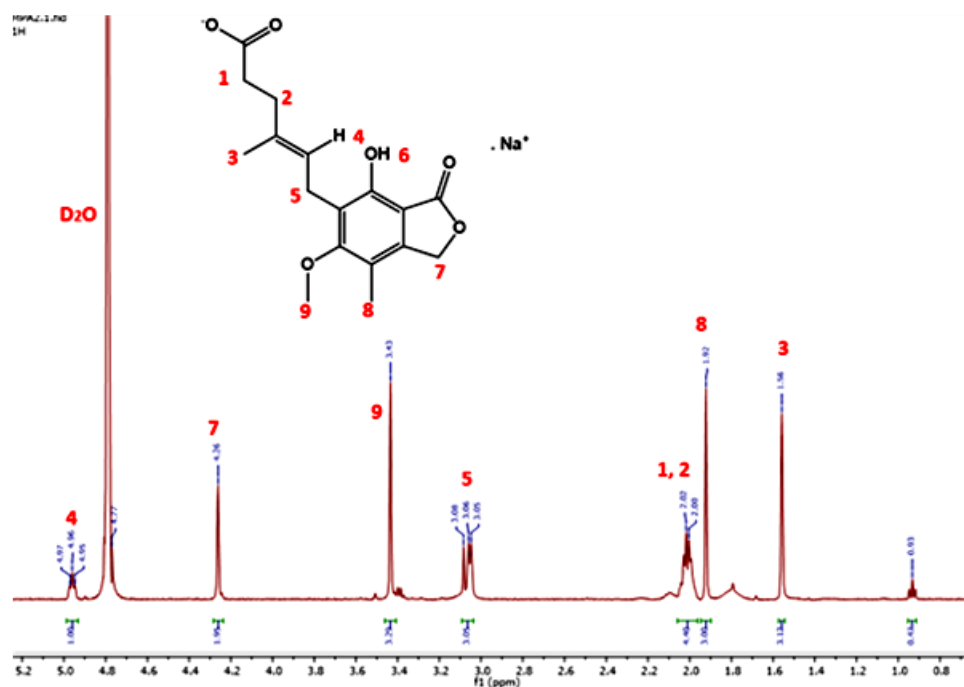
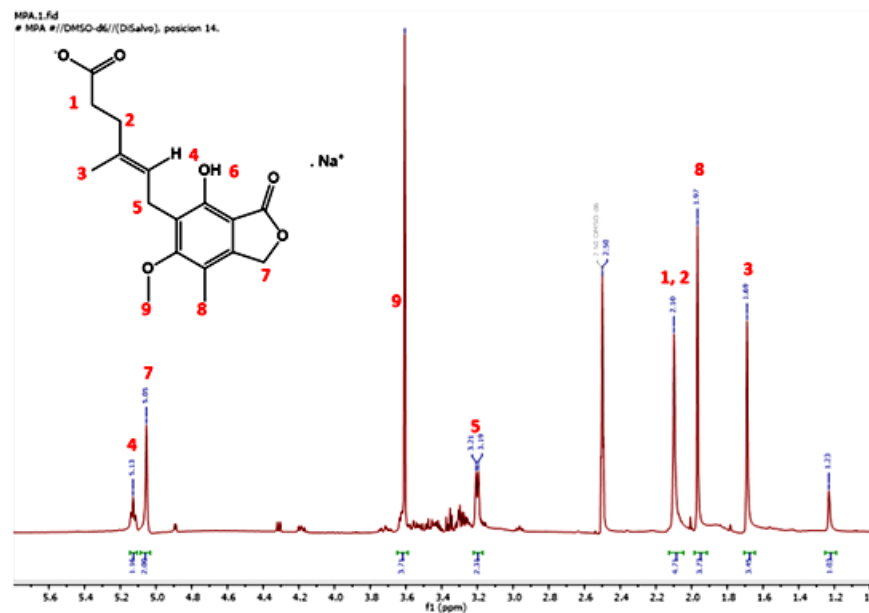


Figura MM.1 Espectro de RMN ^1H en agua básica $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$

Figura MM.2 Espectro de RMN ^1H en DMSO- d_6

1.5 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

1.5.1 DETERMINACIÓN TAMAÑO DE LA PARTÍCULA, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD (PDI)

En el caso del complejo **BSA-MPA**, NP de PLGA (**NP-PLGA**) y las vesículas lipídicas: niosomas (**NIO**) se realizó con el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra), provisto con un láser He-Ne (633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600, las mediciones se realizaron a un ángulo de dispersión fijo de 173° . Para las NP de BSA (**NP-BSA**) los ensayos fueron llevados a cabo utilizando un Nano Particle Analyzer SZ-100 (Horiba, Japón). Todas las muestras fueron analizadas a 25°C con un índice de refracción (**IR**) de 1,33 y cada medida consistió en seis lecturas. empleando una cubeta de poliestireno con las cuatro caras transparentes.

La distribución de tamaño de partícula expresada en términos de intensidad se determinó utilizando una función multi exponencial (CONTIN) para ajustar los datos de correlación. En este tipo de análisis se tiene en cuenta la presencia de más de una familia de partículas (Brar y Verma 2011). Las alícuotas separadas de los distintos lotes preparados de NP se usaron en diluciones 1:100 y 1:1000 (v/v) en agua previamente filtrada ($0,22\ \mu\text{m}$). Se determinó el radio hidrodinámico (h_o) a partir de la

distribución de tamaño de partícula que entrega el equipo. El límite superior teórico de detección de esta técnica es 3 μm (Achilli E., 2020; Arrúa Eva C., 2018; Díaz-Saldívar y Huidobro-Toro, 2019).

1.5.2 DETERMINACIÓN DEL POT-Z

El equipo aplica un campo eléctrico que pasa entre los electrodos ubicados a cada lado de una cubeta (DTS1060, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). La determinación del pot- ζ se basa en la medición de la dirección y velocidad de las partículas al aplicar el campo eléctrico. Las determinaciones de pot- ζ fueron realizadas a 25 °C, se informan como el promedio y la desviación estándar de 10 lecturas realizadas sobre 2-3 soluciones independientemente preparadas.

1.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

La morfología superficial y el tamaño de las NP-BSA y el complejo BSA-MPA conteniendo los PA fue estudiada mediante el empleo de MEB, empleando el microscopio Carl Zeiss NTS-Supra 40 en alto vacío, disponible en el Centro de Microscopías Avanzadas (DF, FCEN-UBA). Las observaciones se realizaron a 10 kV con 3 nm de resolución. En todos los casos se compararon las micrografías obtenidas con las NP sin PA. Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el programa ImageJ 1.52v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

1.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN CON UNIDAD DE BARRIDO (STEM)

La morfología y tamaño de las NP-PLGA y NIO fue determinada mediante el modo STEM que combina los principios de TEM y MEB. Se empleó el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Nova Nano SEM 200 marca FEI) disponible en Centro de Investigaciones de Materiales Avanzados-CIMAV, Unidad Monterrey, México. Las observaciones se realizaron en alto vacío, 1 nm de resolución a 30 kV. La técnica de STEM desliza un haz de electrones fino y focalizado a lo largo de la muestra. Requiere muestras muy finas y detecta principalmente los electrones transmitidos a través del espécimen (Klein, Buhr, y Georg Frase 2012). En todos los casos se compararon las micrografías obtenidas con las NP sin PA. Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el programa ImageJ 1.52v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Los diagramas de dispersión se realizaron en el programa Origin, OriginLab Corporation.

1.8 RENDIMIENTO DE LA OBTENCIÓN DE LAS NP

El rendimiento (R) fue calculado como la relación entre el peso del producto obtenido experimentalmente y la suma de los pesos de todos los componentes, como se muestra en la ecuación **MM.4** donde $mgNP$ es el peso total del producto obtenido, mge son los mg del PA empleado en mg y mgE es la suma de las masas de los excipientes empleados en cada caso (Arrúa Eva C., 2018).

$$R = \frac{mgNP}{mge+mgE} * 100 \quad \text{Ec. MM.4}$$

1.9 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN EfE

La EfE se calculó, a partir de la ecuación **MM.5**, empleando la cantidad de PA liberado de las suspensiones de NP secas, donde $mgTeórico$ es la cantidad de PA inicial (en mg) y $mgNPE$ es la cantidad de PA encapsulado (en mg) en las NP secas destruidas empleadas para realizar esta determinación. Las cantidades de PA fueron cuantificadas por espectrofotometría de absorbancia para RBV y CUR y fluorescencia para MPA.

$$EfE = \frac{mgTeórico-mgNPE}{mgTeórico} * 100 \quad \text{Ec. MM.5}$$

1.10 ENSAYOS BIOLÓGICOS

1.10.1 MEDIOS DE CULTIVO Y MANTENIMIENTO CELULAR

Las distintas líneas celulares fueron sub-cultivadas semanalmente. En el caso de la línea celular **Vero**, proveniente de riñón de mono verde africano adulto *Cercopithecus aethiops* (ATCC CCL 81), las células fueron sembradas y mantenidas en botellas cerradas en estufa a 37 °C, utilizando medio esencial mínimo (**MEM**, Gibco BRL-Life Technologies, EE.UU.) suplementado con 5% de suero de ternera (**ST**) (Gibco BRL-Life Technologies, EE.UU.) inactivado (56 °C durante 30 min) y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Para el medio de mantenimiento la concentración de suero fue reducida a 1,5% (Sepúlveda C. S., *et al.* 2012). Las células **BHK-21**, proveniente de riñón de

hámster neonato (ATCC CRL8544), **Huh-7**, derivada de hepatocitos humanos provenientes de carcinoma bien diferenciado (JCRB0403) y **A549**, proveniente de carcinoma pulmonar humano (ATCC CCL-185), se cultivaron en MEM suplementado con 10% de ST, 50 µg/ml de gentamicina y 1,5 g/l de bicarbonato de sodio. Para el medio de mantenimiento la concentración de suero fue reducida al 5%.

Las células **C6/36**, derivadas de homogenato de larvas del mosquito *Aedes albopictus*, adaptada a crecer a 33 °C (Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio Maiztegui, Pergamino, Argentina), fueron cultivadas en medio L-15-Leibovitz, (Gibco BRL-Life Technologies, EE.UU.) suplementado con 0,3% de caldo triptosa fosfato, 0,02% de glutamina, 1% de solución de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL-Life Technologies, EE.UU.), 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Gibco BRL-Life Technologies, EE.UU.), y 50 µg/ml de gentamicina, reduciendo la concentración de suero a 2% en el medio de mantenimiento (Sepúlveda C. S., et al. 2012). Los cultivos que se realizaron en microplaca, se sembraron y mantuvieron a 37 °C en estufa con 4% de CO₂ y se suplementaron con 20 µM de buffer HEPES (Sigma-Aldrich, EE.UU.). El medio de plaqueo (MP) consistió en MEM doble concentración suplementado con 4% de ST y 100 µg/ml de gentamicina, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 2% (v/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

1.11 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

1.11.1 VIABILIDAD CELULAR USANDO EL MÉTODO DE MTT

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos y las NP se utilizó el ensayo colorimétrico del MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (Mosmann, 1983). Este compuesto es procesado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa formando cristales de formazán (producto coloreado), en cantidad proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Para estudiar el efecto de las NP y de los PA. Las monocapas de células crecidas en microplacas de 96 pocillos (80% de confluencia) fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los PA y las NP por triplicado.

Transcurridos distintos períodos de tiempo se agregó MTT (5 mg/ml) en cada pocillo y se incubó a 37 °C hasta la visualización de la formación de los cristales de formazán en los pocillos controles, seguidamente, se descartaron los sobrenadantes, se disolvieron los cristales de formazán en 100 µL de ETOH absoluto y se determinó la absorbancia utilizando un lector multimodal (POLARstar®, Omega, BMG Labtech) a una $\lambda = 490$ nm de prueba y una de referencia de $\lambda = 690$ nm. La cantidad

de células vivas, proporcional a la cantidad de formazán producido, se determinó según la ecuación **MM.6**. Se consideró 100% de viabilidad a las medidas obtenidas de las células no tratadas, y 0% a las obtenidas luego de tratarlas con DMSO. Se calculó la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) como la concentración del PA/NP que reduce el 50% de la viabilidad celular, con el promedio de absorbancia.

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{absorbancia de la muestra tratada}}{\text{absorbancia de la muestra sin tratar}} * 100 \quad \text{Ec. MM.6}$$

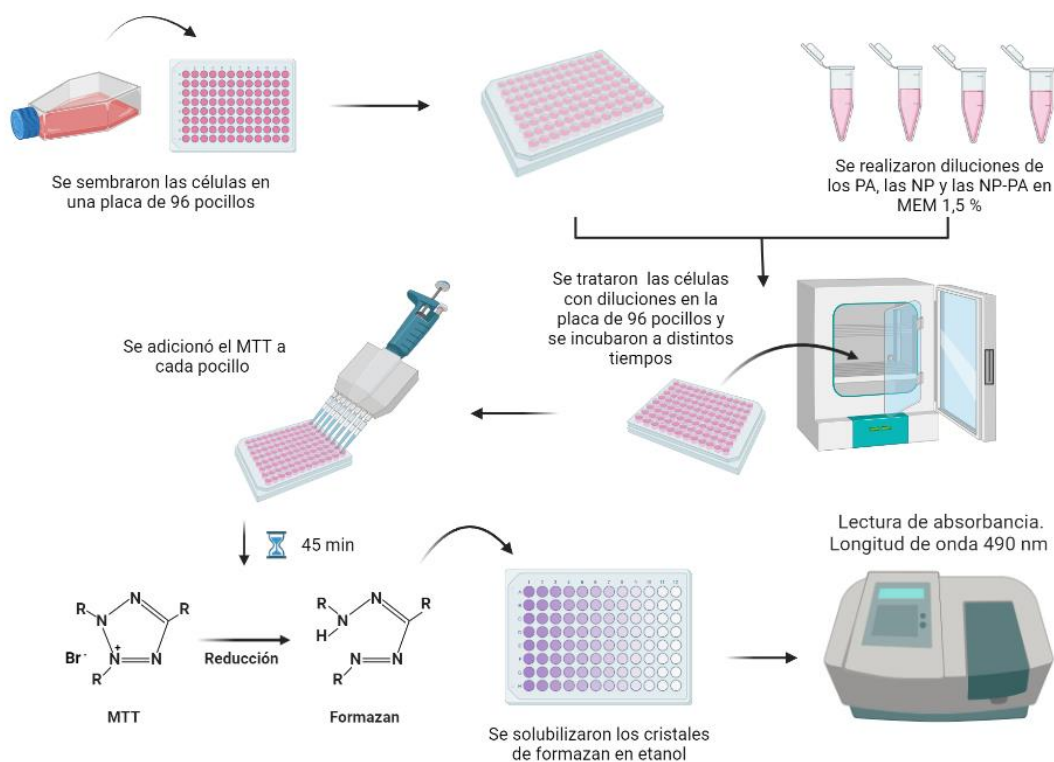


Figura MM.3 Esquema que ilustra la aplicación del método de MTT para la determinación de viabilidad celular.

1.11.2 VIABILIDAD CELULAR USANDO LA TINCIÓN DE CRISTAL VIOLETA

El método de tinción con cristal violeta se puede usar para la cuantificación de la muerte celular y para determinar las diferencias en la proliferación tras la estimulación con agentes que inducen la muerte. El colorante interactúa con las proteínas y el DNA tanto de células vivas como muertas, pero como estas últimas pierden su adherencia, se eliminan con los lavados, reduciendo la intensidad de la tinción que se cuantifica. Este protocolo describe un método de detección rápido y confiable que es adecuado para el examen del impacto de los PA y las NP empleados sobre la supervivencia y la inhibición del crecimiento celular. (Almutary y Sanderson, 2016; Feoktistova et al., 2016).

Para estudiar el efecto de las NP y de los PA sobre las células confluentes, éstas fueron sembradas en placas de 96 pocillos (90% de confluencia) y tratadas con diluciones seriadas al medio de los PA o NP con y sin PA, por triplicado durante 24, 48, 72 ó 96 h a 37 °C.

Transcurrido este tiempo, se lavaron las monocapas con PBS estéril y se fijaron con formol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) al 10% (v/v) por 25 min, finalizado este tiempo se lavaron las células con agua corriente y se dejaron secar. A las 12 h se tiñeron las células adheridas con una solución de cristal violeta 0,01% (v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se lavaron con agua corriente, se dejaron secar por 12 h y finalmente se colocaron 100 µL/pocillo de una solución decolorante compuesta por ETOH 50% (v/v) y 0,1% (v/v) ácido acético glacial para solubilizar el colorante. Se determinó la absorbancia utilizando el lector multimodal a una $\lambda = 490$ nm de prueba y una referencia $\lambda = 690$ nm. La cantidad de células vivas se determinó según la ecuación **MM.6** considerándose 100% de viabilidad a las medidas obtenidas de las células en presencia del medio de cultivo y 0% a las obtenidas luego de tratarlas con DMSO y se calculó la CC_{50} .

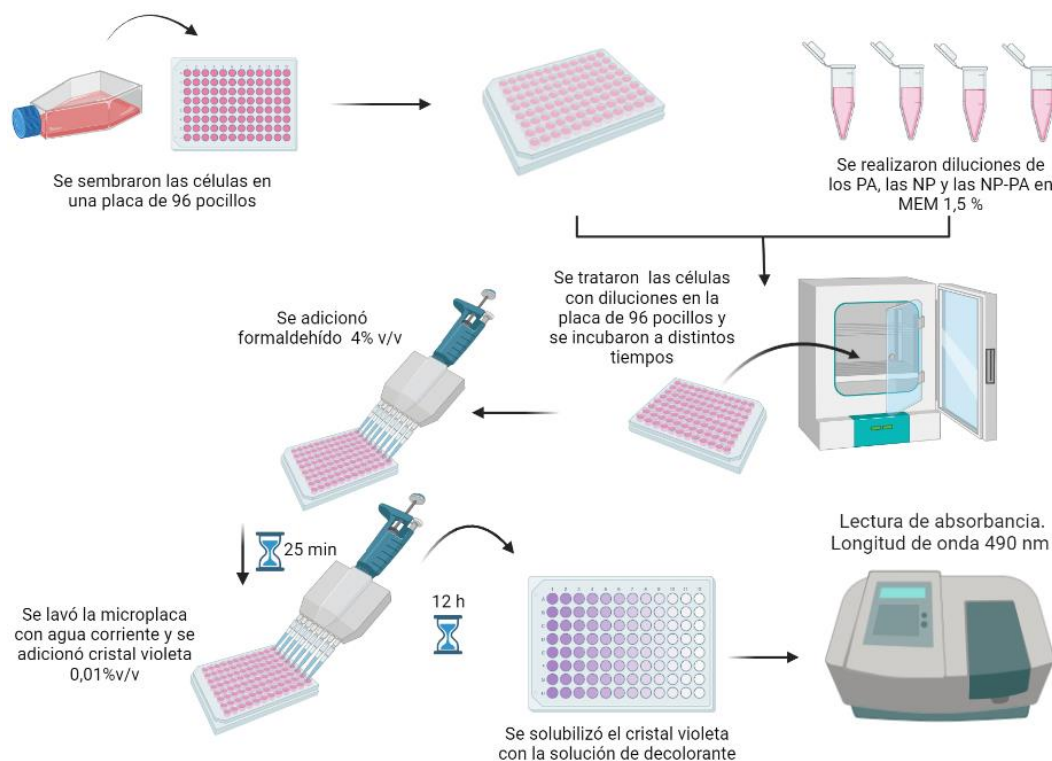


Figura MM.4 Esquema que ilustra el método de cristal violeta seguido para la determinación de viabilidad celular.

1.12 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

1.12.1 PREPARACIÓN DE STOCKS VIRALES

Se utilizaron los virus JUNV cepa IV4454, naturalmente atenuada, (Contigiani *et al.*, 1977) ZIKV cepa PRVABC59, HSV-1 cepa KOS y VSV cepa Indiana. Los stocks de trabajo de JUNV, ZIKV, HSV-1 y VSV se prepararon en células Vero infectando con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 UFP/cél. Los stocks de trabajo de ZIKV se prepararon en células C6/36, con una m.i. de 0,1 UFP/cél. Los cultivos se infectaron durante 1 h a 37 °C, luego se retiró el inóculo y se cubrieron las células con medio de mantenimiento, el virus en el sobrenadante o el asociado a células se cosechó a distintos tiempos, de acuerdo a las características de cada uno. El título de los stocks se determinó por el método de formación de placas de lisis (UFP) en células Vero y en todos los casos estuvo en el orden 10^6 - 10^7 UFP/mL (Sepúlveda C. S., *et al.* 2012, Carlucci, *et al.* 2001). Todos los stocks fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

1.12.2 MÉTODO DE FORMACIÓN DE PLACAS DE LISIS

Para realizar la cuantificación de la infectividad viral, se cultivaron células Vero en placa de 24 pocillos (90% confluencia), a las 24 h triplicados de pocillos se inocularon con 0,1 mL de diluciones seriadas al décimo de las distintas muestras, se dejó adsorber el virus durante 1 h a 37 °C y luego se cubrieron las monocapas con 1 ml de MP. Las células fueron fijadas con formol al 10% y teñidas con cristal violeta 1% en ETOH para el recuento de placas de lisis a distintos días p.i., de acuerdo a las características de cada virus. El cálculo del título viral se realizó aplicando la ecuación **MM.7**, utilizando el promedio de los triplicados de las diluciones que contuvieron entre 20 y 200 placas.

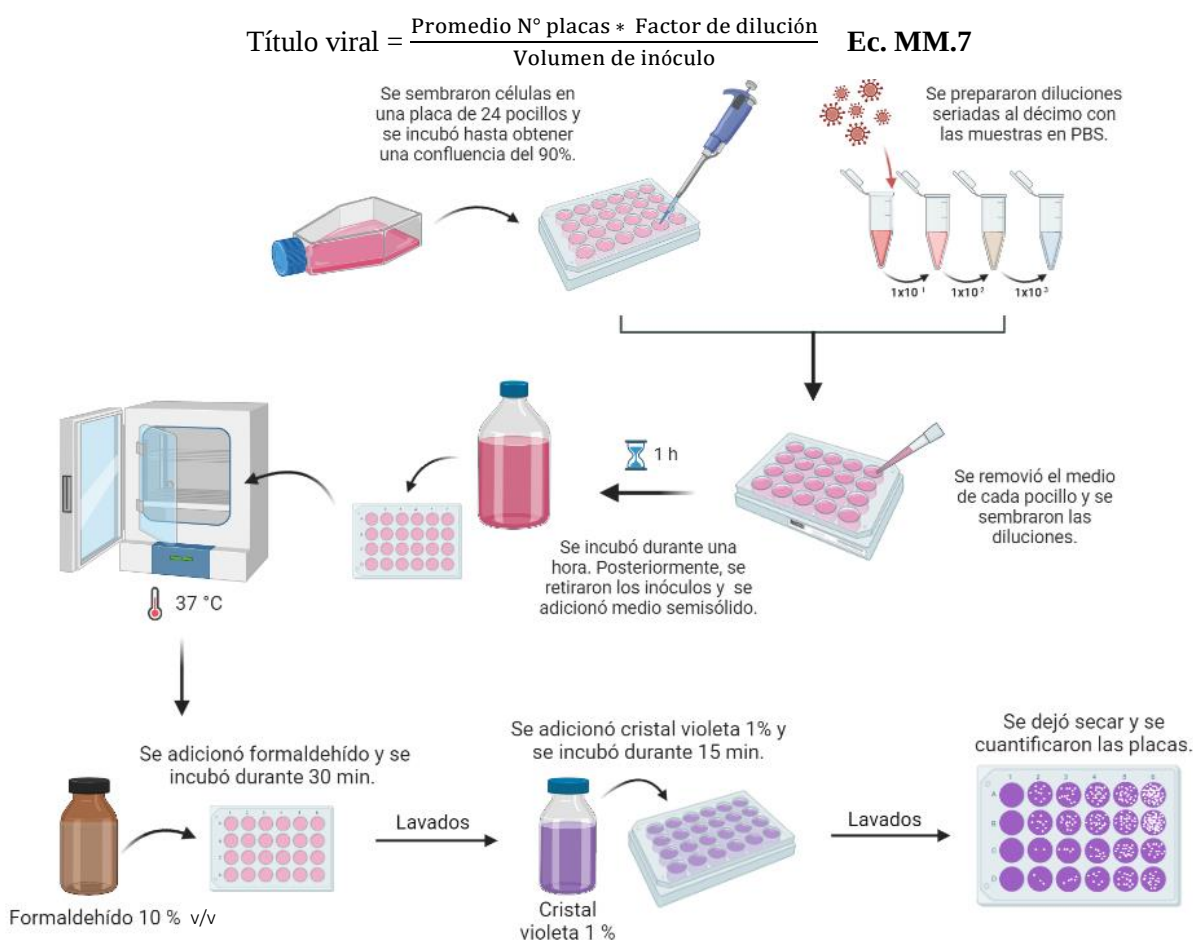


Figura MM.5 Esquema del protocolo que sintetiza la estrategia seguida para la visualización de placas de lisis

1.12.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

La actividad antiviral de las NP y de los PA libres se determinó mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral a las 48 h p.i. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (80% confluencia) 24 h previas a su uso. Los cultivos fueron infectados o no (control celular, CC) con 25 μ L de una suspensión viral a una m.i. de 0,1 UFP/cél. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se retiró el inóculo y las células fueron cubiertas con medio de mantenimiento conteniendo diluciones seriadas al medio de las NP o PA. El control viral, (CV) no contuvo PA ni NP. Se mantuvieron a 37 °C en estufa de CO₂, a las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y el rendimiento viral fue titulado por el método de UFP en células Vero, (**MM.1.12.2**). En todos los casos, el porcentaje de inhibición se calculó con respecto a los controles infectados y sin tratar (CV) mediante la ecuación **MM.8**. A partir de los porcentajes de inhibición se calcularon las CI₅₀, es decir, la concentración efectiva del compuesto que reduce la infectividad viral en un 50%.

$$\% \text{ Inhibición viral} = \frac{100 - \text{título de la muestra}}{\text{Título del control}} * 100 \quad \text{Ec. MM.8}$$

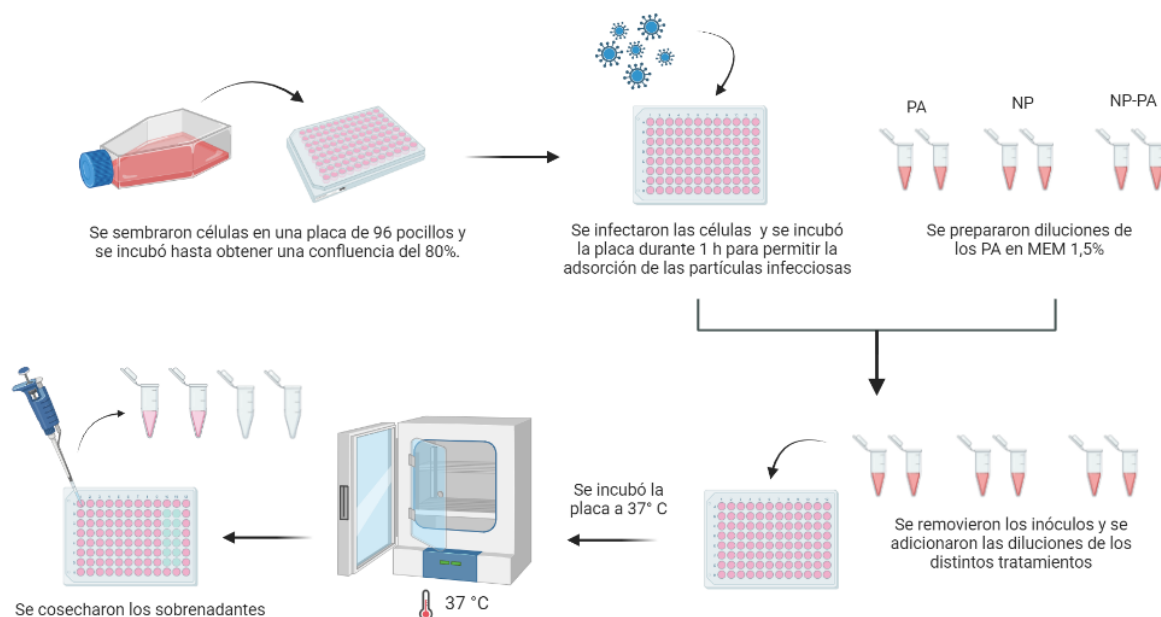


Figura MM.6 Esquema que sintetiza los pasos seguidos para la determinación de la actividad antiviral

1.12.4 INHIBICIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO

Para este ensayo se sembraron células Vero o A549 en placas de 96 pocillos. Las células fueron infectadas a una m.i. de 0,1 con VSV o HSV-1. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, el inóculo viral fue retirado y se cubrió con medio de mantenimiento con diluciones seriadas al medio del PA o NP. Se cuantificó el efecto citopático a las 6, 24 y 48 h mediante la técnica de tinción con cristal violeta (**MM.9.2**) La cantidad de células vivas fue proporcional a la cantidad de cristal violeta solubilizado. Se consideró 100% de viabilidad a las medidas obtenidas de las células no infectadas en ausencia de PA o NP (CC), como se muestra en la fórmula ecuación **MM.6**.

1.13 INTERACCIÓN DE LAS NP CON PROTEÍNAS

Las NP han sido ampliamente estudiadas y confirmadas como nanomedicinas con fines diagnósticos y propósitos terapéuticos. Dado que la vía de administración intravenosa permite el suministro sistémico de medicamentos, la norma ISO-10993 recomienda y señala la importancia de analizar al menos tres factores cuando se pretende administrar NP por inyección intravenosa: **(a)** el patrón de adsorción de proteínas; **(b)** la influencia en la cascada de la coagulación; y **(c)** su carácter hemolítico. Es relevante estudiar diferentes tipos de proteínas en términos de tamaño y forma, por ejemplo, el fibrinógeno es mucho más grande y alargado que la BSA, que a su vez es globular, ya que ambos parámetros influyen en la adsorción de la proteína en la superficie de las NP (Vauthier *et al.* 2011).

1.13.1 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP CON LA PROTEÍNA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Se mezclaron 100 µL de NP-BSA y NP-PLGA con y sin PA en una concentración 100 µg/mL con concentraciones crecientes de 0-40 mg/mL de BSA en la muestra final. Las mezclas se incubaron durante 15 min a 37 °C y se determinó el pot-ζ de cada una. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar de al menos dos lotes de NP independientemente preparados.

1.13.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP CON LA PROTEÍNA FIBRINÓGENO DE ORIGEN SANGUÍNEO HUMANO

Se mezclaron 100 μ L de NP-BSA y NP-PLGA, con y sin PA, en una concentración 100 μ g/mL con concentraciones crecientes de 0-2 mg/mL de fibrinógeno de origen sanguíneo humano (ref #F3879 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en la muestra final, disueltas en tampón fosfato 100 mM (pH 7,40). Los resultados se estudiaron mediante observación directa de las muestras para determinar agregación/precipitación, y análisis de DLS para probar la presencia de agregados no macroscópicos. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de al menos dos lotes de NP independientemente preparados.

1.13.3 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP CON LA PROTEÍNA ISOENZIMA II PROVENIENTE DE ERITROCITOS BOVINOS.

Se mezclaron 100 μ L de NP-BSA y NP-PLGA con y sin PA en una concentración 100 μ g/mL con concentraciones crecientes de 0-2 mg/mL de isoenzima en la muestra final, disueltas en agua ultrapura (ref #C3666 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los resultados se estudiaron mediante observación directa de las muestras, se recurrió al análisis de DLS para comprobar la presencia de agregados submicrónicos. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de al menos dos lotes de NP independientemente preparados.

1.14 ENSAYO DE HEMÓLISIS *IN VITRO*

La sangre humana fue proporcionada amablemente por donantes sanos (Banco De Sangre, Hospital, Clínica i Provincial de Barcelona, España). La sangre se lavó tres veces mediante centrifugación durante 10 min a 5420 x g, a 4 °C. El sedimento formado por eritrocitos se recogió y se re-suspendió en PBS. La densidad final de los glóbulos rojos fue de 8×10^9 cél/mL. Para realizar el ensayo, se colocaron en una placa de 96 pocillos de fondo cónico, 90 μ L de cada muestra de NP-BSA y NP-PLGA, con y sin PA, por triplicado, donde se agregaron 10 μ L de eritrocitos. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 10, 30 y 240 min y luego se centrifugaron 4500 x g durante 15 min a 4 °C, en la **Figura MM. 7**, se muestra un esquema representativo del protocolo empleado.

El porcentaje de hemólisis se calculó espectroscópicamente comparando la absorbancia ($\lambda = 540 \text{ nm}$) de las muestras con el control positivo de hemólisis (agua destilada), y control negativo de hemólisis (PBS) como se muestra en la ecuación **MM.9**. Los datos se ajustan en algunos casos como una curva dosis-respuesta, de donde se obtiene el % hemólisis. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de al menos tres lotes de NP independientemente preparados.

$$\% \text{ Hemólisis} = \left(\frac{(Abs \text{ muestra}) - (Abs \text{ PBS})}{(Abs \text{ agua}) - (Abs \text{ PBS})} \right) * 100 \quad \text{MM.9}$$

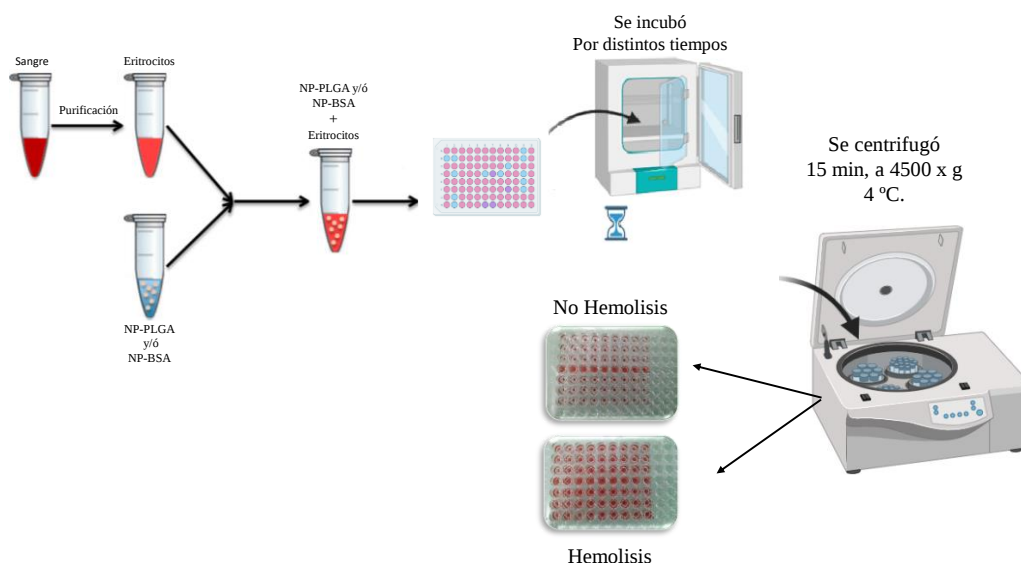


Figura MM. 7 Esquema que sintetiza el protocolo seguido para lograr hemólisis *in vitro*

1.15 INTERNALIZACIÓN CELULAR DE LAS NP: “UPTAKE PROCESS”

1.15.1 DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE INTERNALIZACIÓN

Para este ensayo se sembraron células A549 en placas de 96 pocillos en una concentración 2×10^5 cél/mL. Se trataron con NP-BSA teñidas con FITC y NP-PLGA-FITC, previamente liofilizadas y re-suspendidas en MEM 5%, obteniéndose una concentración final de 0,10 mg/mL. Se colocaron 100 μL de cada tratamiento por triplicado. Los tiempos evaluados fueron: 15 min, 2, 4, 6, 24 y 48 h, luego se realizaron 3 lavados con PBS estéril, se adicionaron 25 μL de tripsina y se incubó a 37 °C por 5 min, finalizado este tiempo se añadieron 50 μL de MEM 5%, y 25 μL de μL al PFA 4% (p/v).

Se homogenizó vigorosamente con micropipeta y se almacenó a 4 °C. Transcurridas las 24 h se realizó la lectura de la fluorescencia por citometría de flujo (ACEA, NovoCyte, Santa Clara, Estados Unidos) durante la estancia en el laboratorio de la Dra, Cristina Fornaguera, del Grupo de Ingeniería de Materiales, Instituto Química de Sarrià (IQS), Universidad Ramon Llull, Barcelona, España. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo™ v10 Software (BD Biosciences). Los resultados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de dos experimentos independientes.

1.15.2 ANÁLISIS MICROSCOPIA CONFOCAL (CLSM)

Se sembraron células A549 sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos a una concentración de $1,5 \times 10^5$. Se trataron con 0,1 mg/mL de NP-PLGA-FICT y/o NP-BSA-FICT, durante 2, 6 y 24 h, en base a los resultados obtenidos en la sección anterior de este capítulo. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con 4% de PFA en agitación durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se retiró el PFA, se lavó con PBS y se permeabilizaron las células con una solución de 0,1% de tritón X-100 en PBS. Se lavó con agua destilada por 5 min a temperatura ambiente con agitación. Se descartó el agua y se cubrió la superficie del vidrio con las soluciones de los distintos colorantes.

En **Tabla MM.1** se muestran las características de los colorantes empleados. Como tinción de contraste se usó una mezcla 1:1 (v/v) DAPI (1/1000) y CellMask™ Deep Red (1/1000). Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje fluoromont® (ref #F4680, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), los preparados se observaron por CLSM, (microscopio confocal Lezica DMi8 S). El análisis de las imágenes se realizó con el software Fiji /ImageJ 1.52v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Tabla MM.1 Tinciones utilizadas en los ensayos de internalización

Colorante	Marca	Nro. Catálogo	Dilución
DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2 fenilindol)	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)	D9542	1:1000
CellMask™ Deep Red	Thermo Fisher Scientific	C10046	1:1000

1.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software GraphPad Prism.8. Se aplicaron estadísticas descriptivas para determinar la media y la desviación estándar y para evaluar las diferencias entre los grupos analizados. Los experimentos fueron repetidos al menos en tres oportunidades diferentes (réplicas biológicas). Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student y en los análisis de prueba de varianza fueron ensayadas las variables para determinar distribución normal y varianza homogénea. Cuando estas presentaron distribución normal, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Holm-Sidak o el test de Bonferroni dependiendo de la distribución de los datos. Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad asociada (p) fue menor * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación al CV o al CC.

I ASOCIACIÓN INTERMOLECULAR: BSA-MPA

I.1 INTRODUCCIÓN

La nanotecnología se ha convertido en una atracción central de los recientes avances en aplicaciones biológicas para la salud humana. La exploración de varios tipos de materiales en la nanoescala con potencial actividad preventiva, diagnóstica y terapéutica contra varios virus, ha sido rápida en comparación con los materiales a gran escala, lo que otorga a las **NP** una ventaja prometedora en aplicaciones biomédicas. Los materiales de tamaño nanométrico poseen propiedades fisicoquímicas excepcionales e intrigantes, esto se deben principalmente a su tamaño, alta relación área de superficie/volumen y a una carga superficial que puede cambiar para optimizar la encapsulación (Milovanovic *et al.* 2017; Mirza y Siddiqui 2014). Además, los PA asociados a NP pueden mejorar su biodisponibilidad, solubilidad y tiempo de circulación en comparación a las partículas a escala macro, por lo tanto, proporciona beneficios de administración convirtiendo a estas entidades en una herramienta ideal para el tratamiento antiviral.

Las enfermedades virales se han convertido en un grave problema de salud mundial debido a su alta tasa de mortalidad y el gran impacto en la vida socioeconómica. La resistencia a los medicamentos y la replicación anómala de los virus hizo que el uso de la nanotecnología fuera importante en terapias antivirales (Thangadurai, Islam, y Adetunji 2022; Milovanovic *et al.* 2017; Sahu *et al.* 2021; Shukla *et al.* 2021; MaHam *et al.* 2009).

I.1.1 ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

BSA es una proteína globular no glicosilada, cuya concentración en plasma en organismos vertebrados es de hasta 40 mg/mL, una de las más abundantes (aproximadamente el 60% del contenido total), y fue una de las primeras proteínas descubiertas por lo que ha sido intensamente estudiada. Existen distintos tipos de albumina, que están compuestas de alrededor de 600 aminoácidos, su peso molecular (PM) es de 66.500 Da y su punto isoeléctrico (pI) en agua a 25 °C de 4,7. BSA desempeña un papel importante en la regulación de la presión osmótica, el pH, la capacidad antioxidante y el transporte de numerosos compuestos endógenos y exógenos como ácidos grasos, hormonas, metabolitos tóxicos (por ejemplo, bilirrubina), ácidos biliares, aminoácidos y metales del plasma sanguíneo. (Li *et al.*, 2013; Siddiqui *et al.*, 2021; Wani *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2014).

Figura I.1, se muestra la estructura cristalina de la proteína, su conformación nativa se vuelve reactiva y flexible al calentarla brindándole una variedad de beneficios que incluyen protección contra el daño oxidativo y estabilización de otros componentes del medio, como ácidos grasos y piridoxal. Una de las características estructurales de BSA es su bajo contenido de metionina, glicina, triptófano e isoleucina y la abundante presencia de aminoácidos iónicos como glutamina y lisina. Los residuos ionizados confieren a pH neutro una alta carga total de 185 iones aproximadamente, lo cual mejora su solubilidad (Achilli E., 2020; Siddiqui *et al.*, 2021; Topalâ *et al.*, 2014).

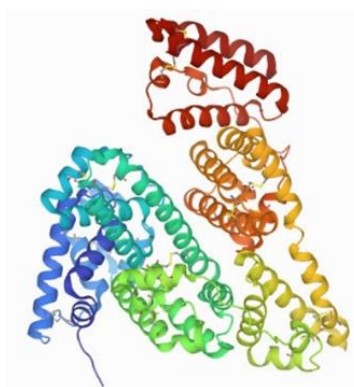


Figura I.1 Estructura cristalina de BSA mostrando y la conformación nativa de la proteína
(Adaptada de Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/3d-view/4F5S/1>)

La afinidad que presentan los distintos PA por las proteínas plasmáticas influye directamente en su concentración en el torrente sanguíneo y en su efecto biológico. La BSA es una proteína capaz de formar diversos complejos, unos pueden ser reversibles debido a las uniones débiles que se forman con el PA, incrementado su solubilidad, lo que se ve reflejado en una circulación eficiente en sangre, especialmente para PA hidrofóbicos, mejorando así su acción. Por ello, el estudio de sus mecanismos de unión e interacción con moléculas pequeñas es crucial para comprender la farmacodinámica y la farmacocinética de los PA (Wani, Bakheit, *et al.* 2021) y suele seleccionarse como un modelo relevante para la administración de medicamentos en la industria farmacéutica debido a su similitud estructural (76% de homología) con la albúmina de suero humano (HSA). Otras características que la hacen adecuada para estos propósitos es su abundancia, facilidad de purificación, propiedades inusuales de unión al ligando y bajo costo de obtención. (Elzoghby, Samy, y Elgindy 2012; Hawkins, Soon-Shiong, y Desai 2008; Wani, Alsaif, *et al.* 2021).

La **HSA** se sintetiza en el hígado y se secreta al torrente sanguíneo, varios receptores están fuertemente involucrados en su distribución y metabolismo. Las interacciones receptor-albúmina pueden ser modificadas por mutaciones específicas, lo que es un hallazgo de interés farmacéutico y

médico. La reserva más grande de albúmina se encuentra en los espacios extravasculares, aunque en una menor concentración que en el torrente sanguíneo. La BSA parece ser el antioxidante circulante cuantitativamente más importante, y tiene propiedades enzimáticas tan pronunciadas que muy probablemente sean de importancia biológica. La capacidad de la proteína para unirse a ligandos y, por lo tanto, para servir como un importante depósito y proteína de transporte para numerosos compuestos endógenos y exógenos está bien caracterizada (Kragh-Hansen 2016; Otagiri y Chuang 2016).

La albúmina es un vehículo macromolecular atractivo y se usa ampliamente en la preparación de NP debido a su biodegradabilidad, no toxicidad y no inmunogenicidad. Las nanopartículas de albúmina (**NP-BSA**) son biodegradables y se pueden preparar fácilmente en tamaños definidos. Se han desarrollado varios protocolos para preparar NP-BSA como: emulsificación, desolvatación, tecnología NAB, gelificación térmica, nano secado por aspersión y técnicas de autoensamblaje. Después de preparar las NP-BSA, las propiedades fisicoquímicas como el tamaño de partícula, la distribución del tamaño de partícula, el $\text{pot-}\zeta$ y la morfología, deben verificarse cuidadosamente si están destinadas a usarse en un sistema de administración específico (Iwao 2016; Otagiri y Chuang 2016).

I.1.2 INTERACCIONES NO COVALENTES

Las uniones puentes de hidrógeno pueden describirse como interacciones atractivas entre un átomo de hidrógeno de una molécula o un fragmento de una molécula $Z-H$, siendo Z más electronegativo que H , y un átomo o grupo de átomos que pertenecen a la misma molécula o a una diferente, en donde existe evidencia de la formación de un enlace supramolecular (**Figura I.2**). Esta definición moderna difiere de la tradicional de Pauling al no referirse a la fuerza de la interacción sino más bien a la evidencia de formación de enlace, sin especificar qué evidencia es satisfactoria y sin limitar que se considere un enlace efectivo (Atwood y Steed 2004; Desiraju 2011, 2013; Pan *et al.* 2022a).

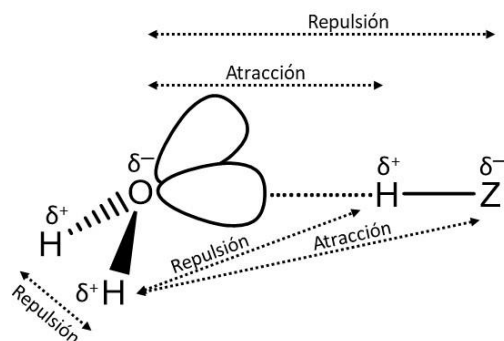


Figura I.2 Representación de interacciones atractivas y repulsivas involucradas en una unión hidrógeno

Adicionalmente, el efecto de polarizabilidad y transferencia de carga provoca que la energía total de todas las uniones de hidrógeno sea la suma de las energías individuales de cada unión de hidrógeno. A esta propiedad se le conoce como cooperatividad, e implica que este tipo de interacciones son más estables cuando forman parte de dímeros, trímeros o cadenas infinitas que forman estructuras de dos o tres dimensiones. Las interacciones no covalentes son las responsables de las estructuras de biomacromoléculas tales como el DNA, RNA, péptidos y proteínas (Atwood y Steed 2004).

Este capítulo se centra en entender las características físico químicas de las interacciones entre BSA con distintos PA para el desarrollo de plataformas novedosas para su administración. La idea de fabricar materiales usando procedimientos de autoensamblaje proviene de la biología molecular, donde máquinas moleculares muy complejas se autoensamblan. El autoensamblaje molecular es el proceso de asociación espontánea de moléculas para crear mayores estructuras mediante la acción cooperativa de interacciones no covalentes, es decir, en las que no se comparten electrones. Esta estrategia, utilizada ampliamente por los sistemas biológicos, es de gran interés ya que permite acceder a complejas supramoléculas funcionales, o edificios moleculares, a partir de sencillos bloques orgánicos, que actúan como ladrillos en esta estructura (Atwood y Steed, 2004; Boal *et al.*, 2000; Grzelczak *et al.*, 2010).

I.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I.2.1 HIPÓTESIS

La interacción supramolecular entre la BSA-MPA presenta funcionalidad de transportador biológico y potencia el efecto del PA.

I.2.1.1 OBJETIVO GENERAL

- Obtener nanosistemas usando la proteína BSA para transportar PA, basados en interacciones no covalentes.

I.2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las interacciones BSA-MPA
- Verificar la eventual agregación proteica en el tiempo e inducida por el PA.
- Determinar el efecto biológico del nanosistema en un modelo *in vitro* de infección viral.

I.3 MATERIALES Y MÉTODOS

I.3.1 MATERIALES

Los reactivos empleados en este trabajo fueron de grado analítico, tanto la BSA (#cat. A2153) como el MPA (#cat. M5255), aptos para cultivo celular (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania). Se recibió una donación de comprimidos orales de micofenolato mofetil (Myfortic®, 360 mg) de parte del laboratorio farmacéutico Novartis, Argentina, a partir del cual se realizó la extracción del PA (**MM.1.4**). Los solventes fueron adquiridos a Merck, Alemania. Para la preparación de las distintas soluciones se utilizó agua ultrapura usando el sistema MilliQ (Millipore, Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania).

I.3.2 METODOLOGÍA

I.3.2.1 INTERACCIÓN MOLECULAR: TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA DE FÖRSTER (FRET)

El ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) se realizó titulando una solución de BSA 1 μM en PBS con una solución 100 μM de MPA en PBS a 25 °C y registrándose los espectros de emisión de fluorescencia entre $\lambda = 305$ y 500 nm con excitación a $\lambda = 295$ nm. La finalidad de esto fue excitar específicamente a los triptófanos de BSA y disminuir la fluorescencia de las tirosinas. Los cambios en la emisión de fluorescencia se detectaron en un espectrofotómetro (Aminco Bowman Series 2, luminescence Spectrophotometer, ThermoSpectronic).

En segunda instancia, se varió la relación de volúmenes de las soluciones de BSA y de MPA. Los espectros de los sistemas combinados se utilizaron para corregir la señal por dilución y conocer los valores de BSA y MPA total en cada punto de la curva (Loura y Prieto 2011; Periasamy y Day 2011; Zhang, Fu, y Lakowicz 2007). Se llevó a cabo un ensayo de titulación de fluorescencia entre los residuos de triptófano de la BSA y el PA y se calculó el radio de Förster teórico (R_0). Usando Microsoft Excel Solver, se realizó un ajuste no lineal (Kang, Piszczek, y Lakowicz 2002) de la intensidad de FRET en función del MPA total usando un modelo de unión de un sitio y se estimó la constante de disociación, $K_d = 12,0 \pm 0,7 \mu\text{M}$.

I.3.2.2 DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

El ensayo de DC, se realizó titulando a 25 °C una solución de BSA 1 μ M en PBS con una solución 100 μ M de MPA en PBS. Se registraron espectros de dicroísmo circular de BSA a 25 °C en la región de λ = 200–250 nm utilizando un espectropolarímetro (Jasco J-810). Los datos se recogieron en una cubeta de 1 mm de paso óptico utilizando una velocidad de exploración de 20 nm/min con una constante de tiempo de 1 s. Los volúmenes de titulación se usaron para corregir la dilución de BSA. Se usó un promedio de tres mediciones independientes para calcular la elipticidad media del residuo.

I.3.2.3 INTERACCIÓN BSA-MPA

Se prepararon nanosistemas usando distintas cantidades de BSA en polvo (0,1 μ g a 1 μ g), que se disolvieron en PBS para dar las soluciones acuosas con una concentración final de 1 μ M. Las soluciones se agitaron suavemente (500 rpm en agitador magnético) durante toda la noche a temperatura ambiente hasta lograr la hidratación completa de la proteína, luego se añadieron 2 μ M de solución de MPA y la mezcla se agitó continuamente a 150 rpm a 30 °C por 12 h. Los nanosistemas de BSA fueron purificados por centrifugación a 1000 x g a 4 °C (5810R Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 20 min usando una unidad filtrante con membrana de 10.000 Da (Amicon® Ultra-15 Merck-Millipore, USA) y se recogieron la fracción superior y las fracciones inferiores. Los nanosistemas de BSA purificados (fracción superior) se almacenaron a 4 °C para su posterior uso.

I.3.2.4 CINÉTICA DE AGREGACIÓN

Se registró la absorbancia en función del tiempo, empleando un lector multimodal (POLARstar® Omega, BMG Labtech). Los datos se adquirieron sobre un volumen de 200 μ L por pocillo, a 25 °C y a λ =500 nm, debido a que esta longitud de onda se encuentra alejada de los picos de intensidad de MPA y de la BSA (Tang *et al.* 2013). El modelo con el que se ajustaron los datos experimentales y que sirvió para obtener los parámetros cinéticos es el propuesto por Stirpe *et al.*, (2011). Dicho modelo, obtenido por regresión múltiple no lineal, considera que la absorbancia sigue una cinética de tipo sigmoidea y los resultados experimentales pueden ajustarse siguiendo una función del tipo:

$$y = y_0 + Ce^{(-\alpha t)^B} \quad \text{Ec. I.1}$$

Donde y_0 e y son la absorbancia para un tiempo inicial t_0 y un tiempo final t , mientras que el parámetro α es la velocidad de formación espontánea de agregados y β es el orden de dicha agregación (Silva *et al.*, 2018).

I.3.2.5 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POT- ζ , DLS

Las alícuotas separadas de los distintos lotes de nanosistemas preparados, se usaron en dilución 1:100 y 1:1000 (v/v) en agua previamente filtrada (0,22 μm). Se determinó el h_0 a partir de la distribución de tamaño de partícula que entrega el equipo, como se describe en **MM.1.5.1**.

I.3.2.6 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MEB

Se sembraron 10 μL de la suspensión de los nanosistemas sobre un soporte de silicio y se dejaron secar en una cámara de flujo laminar vertical. Una vez seca la muestra se llevó al centro de microscopía de la FCEN-UBA dónde se realizó un recubrimiento de oro de 10 nm para ser observados posteriormente. La morfología superficial y el tamaño de las NP conteniendo los diversos PA fue estudiada mediante el empleo de MEB cómo se describe en **MM.1.6**

I.4 RESULTADOS

Los resultados que se muestran en este capítulo se realizaron en la fase inicial de este trabajo de investigación. La información obtenida en esta fase exploratoria, permitió conocer y determinar las principales características físico-químicas del sistema BSA-MPA. Estos resultados fueron los cimientos para poder optimizar los distintos nanosistemas y conocer sus ventajas y debilidades para la encapsulación de PA en NP de base proteica en comparación con distintas matrices biodegradables que se emplearán más adelante.

I.4.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La caracterización del nanosistema proteína-PA, se inició con un análisis de *docking* ciego, este es un método relativamente moderno, usualmente empleado para predecir la orientación del enlace de una molécula pequeña. La exploración de la amplitud de unión y el mecanismo de interacción de las moléculas pequeñas con BSA es crucial para la comprensión de la farmacodinámica y la farmacocinética de los PA, ya que la naturaleza y la fuerza de esa interacción tiene una gran influencia en la absorción, distribución, metabolismo y excreción del PA (Topalâ *et al.*, 2014). En base a estas características analizamos la interacción entre la BSA y el MPA, para lo cual se realizó un experimento de *docking* automático con naproxeno.

Se usó el naproxeno debido a que se encuentra cristalizado con la BSA y es un modelo de estudio que permite tener un grado de afinidad cercano sobre los modelos bioinformáticos (Banerjee, Singh, y Kishore 2006; Ossowicz *et al.* 2020; Rahman *et al* 2005). Mediante este método se pudo predecir los posibles sitios de unión del ligando en los bolsillos hidrofóbicos de la proteína. En la **Figura I.3** se muestran los datos obtenidos luego del ensayo de simulación, la posición y las torsiones del ligando cristalizado se alteraron al azar y la molécula así obtenida se acopló contra su propio receptor de cristal (PDBID: 4OR0). Aunque la caja de acoplamiento permitió que el ligando interactuara con toda la superficie de la BSA, las primeras seis poses predichas de la clasificación se encontraron dentro de los sitios de unión conocidos de naproxeno.

Para la conformación mostrada en la Figura I.3A, el puente de sal entre el grupo Arg (Arg194, Arg198 y Arg217), el extremo carboxilato y el apilamiento del resto aromático con Trp213 y Leu197 se mantienen sin más interacciones añadidas. Por el contrario, la conformación que se muestra en la Figura I.3B mantiene la interacción iónica entre el carboxilato y Lys350 junto con los enlaces de hidrógeno con el esqueleto NH de Leu480 y Val481NH, mientras establece un nuevo enlace de hidrógeno entre el grupo fenólico (donante) y el esqueleto Arg208 CO. La interacción hidrofóbica con Leu346 también se conserva. Finalmente, la Figura I.3C conserva la interacción con Lys413 y Arg409 y con Leu452 y Phe402.

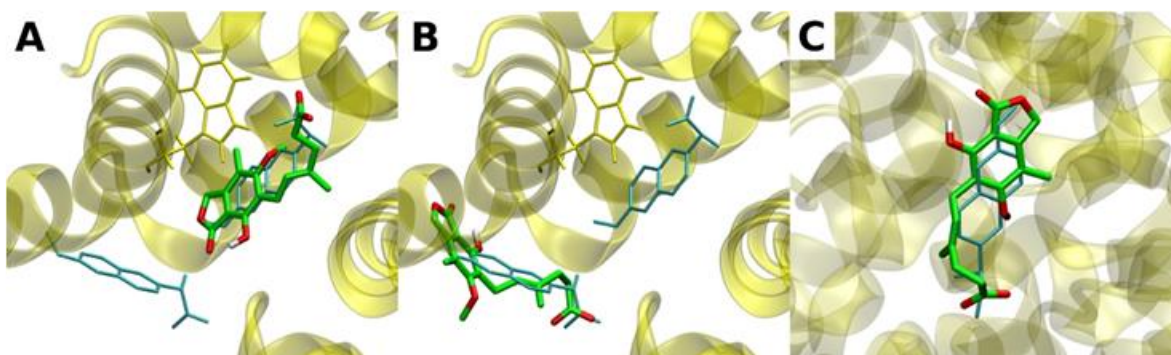


Figura I.3 Interacción intramolecular: *Docking* entre BSA y MPA
Esquemización del: **A)** fármaco modelo naproxeno (cian); **B)** nuestro fármaco de interés micofenolato (verde para los átomos de carbono, roja para el oxígeno y blanca para el hidrógeno); **C)** el residuo: Trp213 (amarillo).

Adicionalmente, se evaluó la equivalencia entre la estructura cristalina del ligando y la postura del ligando predicha en el *docking* calculando el *root-mean-square deviation* o desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos pesados del ligando (Sargsyan, Grauffel, y Lim 2017). La RMSD es una medida de similitud ampliamente utilizada en el análisis de estructuras y dinámicas macromoleculares. A medida que se estudian sistemas macromoleculares cada vez más grandes, pueden existir efectos de dimensionalidad como la "maldición de la dimensionalidad", una capacidad decreciente para discriminar diferencias por pares entre conformaciones con un tamaño de sistema creciente, y un impacto significativo en los análisis basados en este enfoque (Sargsyan *et al.*, 2017). La primera, tercera y cuarta poses clasificadas tienen un RMSD por debajo de 2,00 Å, umbral generalmente considerado para la equivalencia de pose. Con esta validación se procedió a acoplar el micofenolato para predecir su modo de enlace.

En la **Figura I.3**, se muestra la comparación entre las moléculas de naproxeno cristalinas (barras de cian delgadas) en ambos sitios de unión a la BSA (ID de PDB: 4OR0) y las poses de micofenolato predichas representadas como barras anchas (verde para los átomos de carbono, roja para el oxígeno y blanca para el hidrógeno). Por otra parte, el Trp213 se resalta como segmento amarillo fino. Las primeras cuatro conformaciones están dentro de los sitios de unión de naproxeno y con mayor afinidad para tres de las seis conformaciones, como se muestra en la **Figura I.3**. Al tener similitudes moleculares, el micofenolato muy probablemente interactuó con BSA de la misma manera que el naproxeno. En particular, para los tres diferentes modos de unión, las interacciones principales del extremo carboxilato y los anillos aromáticos fusionados están completamente conservadas.

I.4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

I.4.2.1 INTERACCIÓN INTERMOLECULAR

La interacción intermolecular entre la BSA y el MPA se estudió mediante espectroscopía de fluorescencia a partir de la superposición de los espectros de emisión de triptófanos de la BSA y el espectro de absorción del MPA. La hipótesis reside en que, de producirse efectivamente la interacción entre estas especies, se podría detectar el fenómeno de transferencia de energía de resonancia denominado FRET. En la **Figura I.4** se muestran los espectros de fluorescencia resultante de la unión del MPA y la BSA, la superposición entre el espectro de emisión de fluorescencia de BSA y el espectro de absorción de MPA

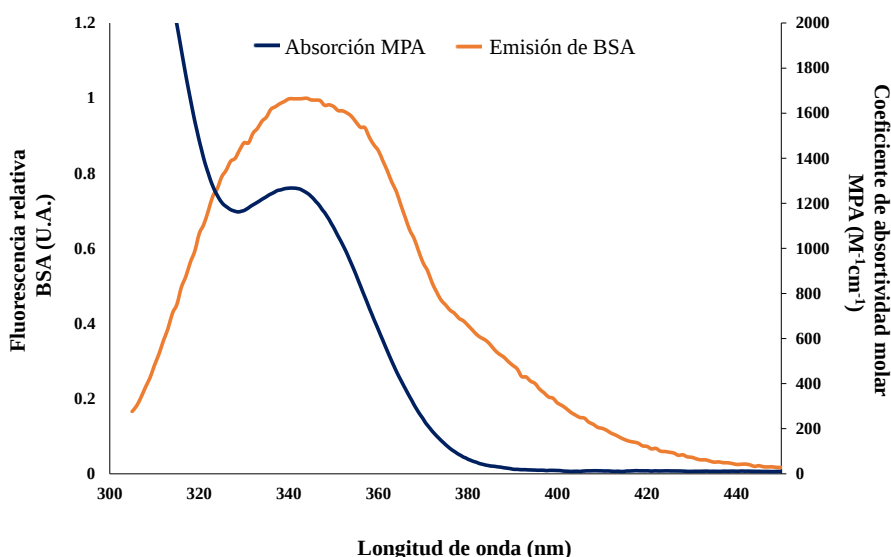


Figura I.4 Análisis de espectroscopia de fluorescencia de la unión del MPA a BSA. Espectro de emisión de fluorescencia para BSA superpuesto al espectro de absorción de MPA para la determinación del coeficiente de absorptividad molar. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes $\pm$ DE.

La eficiencia de FRET (E) se calculó usando la ecuación **I.2**, siendo F_{da} la intensidad de fluorescencia de triptófanos en presencia del donador (BSA) y aceptor (MPA) y F_d la intensidad de fluorescencia inicial de BSA en ausencia de MPA.

$$E = 1 - \frac{F_{da}}{F_d} \quad \text{Ec. I.2}$$

La intensidad es el área bajo la curva entre $\lambda = 340$ y $\lambda = 350$ nm, correspondiente principalmente a la emisión de triptófanos de BSA. En la **Figura I.5**, se presenta la titulación de BSA con MPA que muestra el apagamiento de fluorescencia de la emisión del triptófano nativo dependiente de la concentración de MPA. La afinidad de unión se mide típicamente mediante la constante de equilibrio de disociación (K_d), que se usa para evaluar y clasificar las intensidades de orden de las interacciones moleculares. Cuanto menor es el valor de K_d , mayor es la afinidad de unión del ligando por su receptor (Helms, Volkhard; 2008).

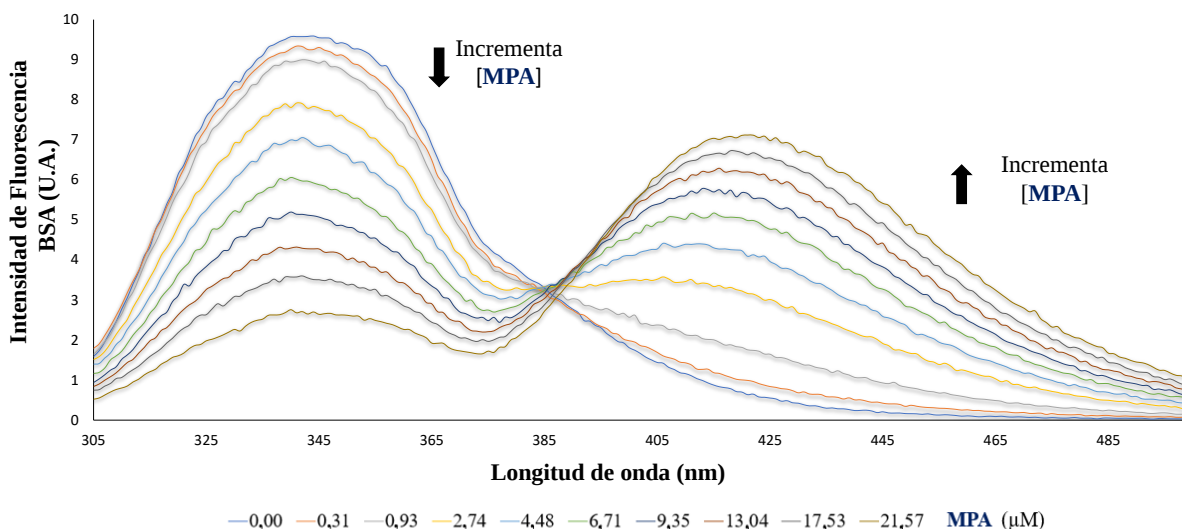


Figura I.5 Titulación de BSA con MPA

Se evidencia el apagamiento de fluorescencia de la emisión del triptófano nativo de BSA dependiente de la concentración de MPA que es creciente en un rango de 0,0-21,5 μM. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes ± DE.

Los datos experimentales obtenidos presentaron un comportamiento de interacción conocido como FRET. El valor de K_d se estimó empleando la ecuación I.3, por regresión no lineal, utilizando los datos de la siguiente isoterma de *binding* asumiendo un sitio único de unión:

$$[BSA - MPA] = \frac{([MPA]_t + [BSA]_t + K_d) - \sqrt{([MPA]_t + [BSA]_t + K_d)^2 - 4 \times [MPA]_t \times [BSA]_t}}{2} \quad \text{Ec. I.3}$$

A su vez, la señal de FRET obtenida se puede interpretar como una contribución fraccionaria de dos señales: una señal dada por la BSA libre y una señal de menor intensidad dada por el complejo BSA-MPA. Integrando esta información en una tabla de Excel, y utilizando el complemento de regresión no lineal SOLVER, se puede obtener el valor de la constante de disociación K_d que mejor ajusta a los datos.

La Figura I.6 es un ajuste del modelo de unión del sitio a la señal de datos de eficiencia de FRET que permite la estimación de una K_d . Por otro lado, se obtuvo la distancia de Förster (R_0) definida como la distancia que existe entre el par constituido por donante y aceptor, es decir, la distancia a la que la eficiencia de transferencia de energía es del 50% (Helms, Volkhard; 2008), $R_0 = 1,6$.

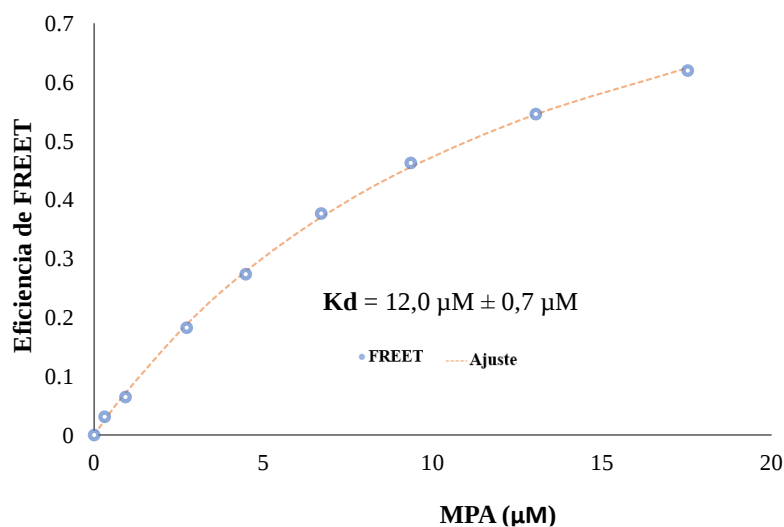


Figura I.6 Eficiencia de FRET
Ajuste del modelo de unión del sitio a la señal de datos de eficiencia de FRET que permite la estimación de una K_d
Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes $\pm$ DE.

La distancia de Förster depende de la integral de solapamiento del espectro de emisión del donante con el espectro de absorción del aceptor y su orientación molecular mutua expresada mediante la ecuación I.4:

$$R_0^6 = \frac{2.07}{128 \pi^5 N_A} \frac{\kappa^2 Q_D}{n^4} \int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad \text{Ec.I.4}$$

Dónde: Q_D , es el rendimiento cuántico de fluorescencia del donante en ausencia del aceptor, κ , es el factor de orientación del dipolo. n , es el índice de refracción del medio a temperatura ambiente y N , es el número de Avogadro.

I.4.2.2 DICROÍSMO CIRCULAR

El DC es la propiedad que poseen algunos materiales de absorber la luz a diferentes grados dependiendo de la forma de polarización del haz incidente. Se dice que un material presenta DC cuando la absorción de la luz circularmente polarizada en una dirección (derecha) es diferente de la absorción de la luz circularmente polarizada en la dirección opuesta (izquierda) (Hammes 2005; Berova *et al.* 2007). Es una técnica que permite obtener información característica sobre la interacción proteína-ligando o sobre cambios en la estructura secundaria de la proteína inducida por razones

extrínsecas. Este estudio se realizó a fin de determinar si existe un cambio en la estructura nativa de la BSA debido a la presencia del MPA, es decir, saber si la presencia de este ligando podría generar un cambio en la estructura secundaria nativa de la BSA.

En la **Figura I.7**, se muestran los espectros de DC manteniendo una concentración de BSA (0,01 mg/mL) y variando las concentraciones de MPA en solución fisiológica. El espectro muestra el pliegue alfa-hélice predominante característico de BSA. Se registra una disminución en la señal con concentraciones crecientes de MPA, lo que se refleja una disminución en la estructura secundaria de BSA después de la unión. Los resultados muestran que no existió un cambio notable en la estructura nativa de la BSA debido al incremento del ligando. Sólo se hizo evidente un cambio en el espectro a las mayores concentraciones de MPA ($\geq 14,9 \mu\text{M}$).

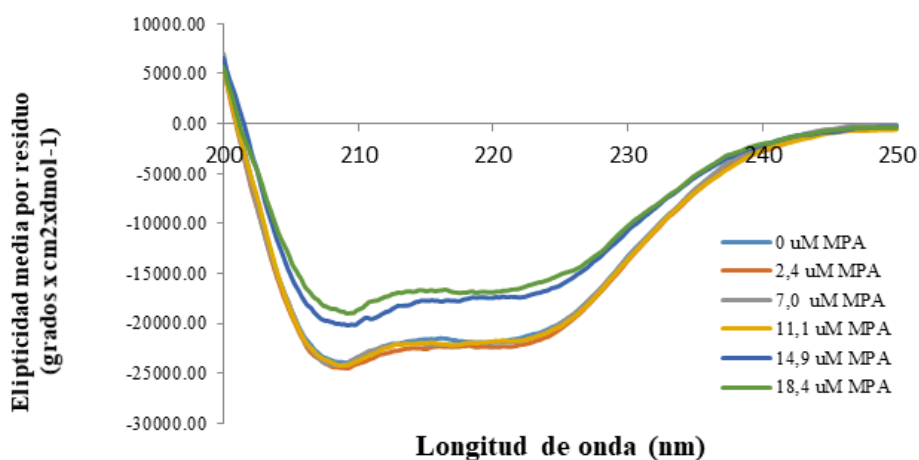


Figura I.7 Variación en la intensidad de la señal de α hélices de BSA
Titulación de BSA 1 μM con MPA seguida de espectroscopia de DC UV lejano. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes $\pm$ DE.

I.4.2.3 AGREGACIÓN PROTEICA

En base a los resultados anteriores, se decidió avanzar con el análisis de la interacción proteína-PA: BSA-MPA estudiando la agregación proteica que pudo ser inducida por el solvente a lo largo del tiempo. Dado que en algunos casos el fenómeno de agregación se desencadena al superarse la concentración crítica de proteína en solución, se utilizaron soluciones de BSA de 0,01 y 0,1 mg/mL. Para la determinación de *scattering* (turbidez) a $\lambda = 500 \text{ nm}$ se usó DMSO, DMSO:H₂O, PBS y H₂O de acuerdo a lo detallado en este capítulo en la sección Materiales y Métodos **I.1.1.4**. Se observó que no existió agregación dependiente del tiempo en estas condiciones, al menos dentro del lapso

evaluado de 8 h. No se observó un efecto de agregación causada por la concentración o la naturaleza del solvente a las 24 h ni a las 48 h. Estas determinaciones se deben realizar para descartar o evidenciar el fenómeno de agregación en función del tiempo, independiente del tipo de solvente presente, sólo promovido por la concentración proteica y no por el complejamiento del PA.

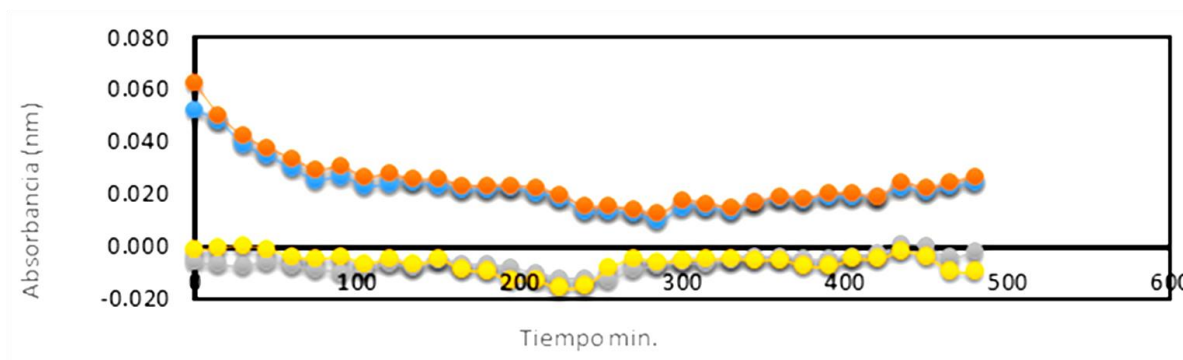


Figura I.8 Análisis de agregación proteica en el tiempo

Se consideraron distintas concentraciones de BSA para evaluar la agregación proteica en el tiempo 0,1 mg/ml (azul) y BSA 0,01 mg/mL (naranja). BSA 0,1 mg/ml en DMSO (gris) y BSA 0,01 mg/mL en DMSO:H₂O (amarillo) a pH 5. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes $\pm$ DE.

También se evaluó si diferentes concentraciones de MPA podrían inducir la agregación de la BSA en forma dependiente del tiempo. Como se puede observar en la **Figura I.9** en estas condiciones tampoco se evidenció agregación. En base a los resultados mostrados en las

Figura I.8 y **Figura I.9**, se puede concluir que no existe agregación dependiente del tiempo, por lo tanto, la asociación intermolecular de BSA con el MPA no implica agregación extensiva en el rango visible. No obstante, este resultado no excluye la posibilidad de la formación de complejos, agregados y/o autoensablajes en la nanoescala y que por su tamaño y/o concentración no fueran capaces de provocar cambios en la absorbancia de la muestra.

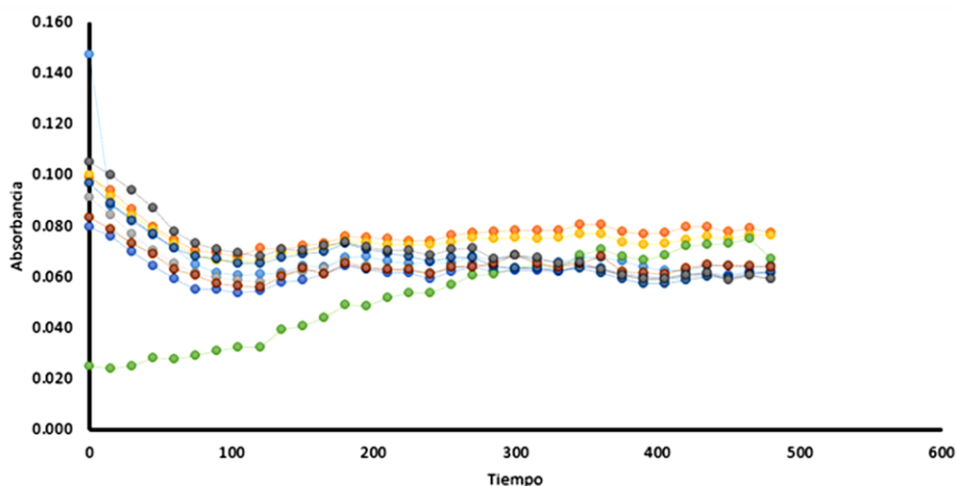


Figura I.9 Adición de MPA en concentraciones crecientes a una solución de BSA

BSA 0,1 mg/mL + 0 μ M MPA en DMSO:H₂O (verde), BSA 0,1 mg/mL + 3 μ M MPA en DMSO:H₂O (azul), BSA 0,1 mg/mL + 5 μ M MPA en DMSO:H₂O (marrón), BSA 0,1 mg/mL + 10 μ M MPA en DMSO:H₂O (gris claro). BSA 0,1 mg/mL + 0 μ M MPA en H₂O (celeste), BSA 0,1 mg/mL + 3 μ M MPA en H₂O (amarillo), BSA 0,1 mg/mL + 5 μ M MPA en H₂O (naranja), BSA 0,1 mg/mL + 10 μ M MPA en H₂O (gris oscuro). Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes $\pm$ DE.

I.4.2.4 ESTUDIO DE AGREGACIÓN MEDIANTE DLS

Se realizó un análisis de distribución de tamaño de partícula a fin de evidenciar cambios en el *h_o* de la BSA en función del incremento de la concentración del PA debido a la interacción intermolecular: BSA-MPA, generando agregación *vía* autoensamblaje. En la **Figura I. 10**, se evidencia que a la concentración de 1 μ M de MPA, el *h_o* se mantiene en los 5 nm y que a medida que la concentración incrementa a 10 y 50 μ M se produce un desplazamiento de 5 a 8 nm aproximadamente, hasta llegar a un *h_o* de 10 nm con 100 μ M de MPA, la mayor concentración empleada para este experimento.

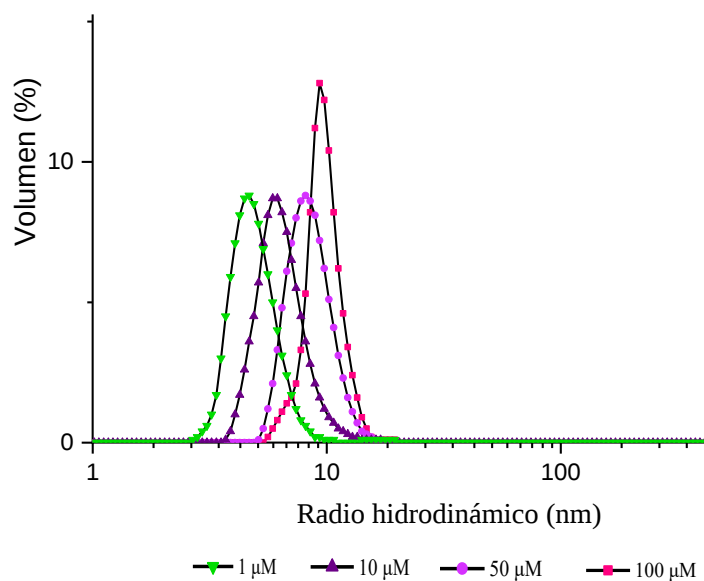


Figura I. 10 Radio hidrodinámico interacción intramolecular BSA-MPA

Desplazamiento de los picos BSA-MPA corresponde a: 1 μM BSA-MPA, 10 μM BSA-MPA, 50 μM BSA-MPA, 100 μM BSA-MPA. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes $\pm$ DE.

I.4.2.5 ULTRAESTRUCTURA

Demostrada la interacción entre la BSA y el MPA con agregación no extensiva y de carácter incipiente que fuera determinada por cambios en el radio hidrodinámico, se evaluó la morfología de la ultra estructura mediante microscopía electrónica de barrido MEB (**Figura I.11**). En las imágenes se observó un aspecto rugoso característico de la BSA y estructuras poco definidas como es característico de las proteínas en su forma no cristalizada.

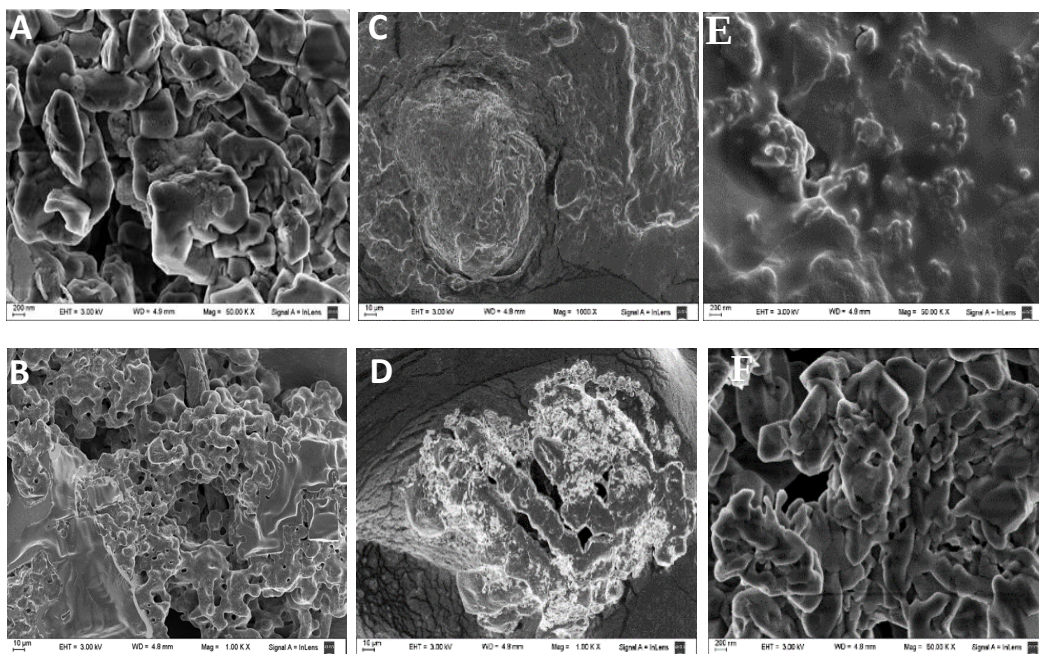


Figura I.11 Análisis morfológico de la interacción BSA-MPA

Microscopías electrónicas de nanosistemas de BSA-MPA. **A** y **B** corresponde a BSA sin MPA. **C** y **E** corresponde a BSA con 5 μM de MPA. **D** y **F** corresponde a BSA con 4,5 μM de MPA.

I.4.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

I.4.3.1 CITOTOXICIDAD

Inicialmente, se analizó la citotoxicidad y la actividad inhibitoria contra JUNV del PA MPA en su forma libre, tanto Sigma (**MPA-S**) como MPA extraído (**MPA-E**) en las líneas celulares Vero y A549, a fin de establecer el rango de concentraciones de partida contra los cuales realizar las comparaciones del nanosistema BSA-MPA desarrollado. Los cultivos celulares se incubaron con distintas concentraciones de los compuestos y a las 48 h de tratamiento se determinaron las CC_{50} como la concentración de MPA libre que produce la muerte del 50% de las células, utilizando la técnica del MTT. De acuerdo a estos resultados, se determinó la concentración inhibitoria que reduce un 50% la infectividad viral (CI_{50}) luego del tratamiento de los cultivos infectados con JUNV con concentraciones no citotóxicas. Los resultados para cada línea celular se presentan en la **Tabla I.1**.

Tabla I.1 CC_{50} y CI_{50} frente a JUNV en células Vero y A549

MPA	*CC ₅₀			*CI ₅₀		IS
	μM	ng/mL		μM	ng/mL	
MPA-S	Vero	> 500	160.170,00	0,50 ± 0,02	160,17 ± 2,25	1001
	A549	> 500	160.170,00	0,37 ± 0,04	118,52 ± 4,03	1357
MPA-E	Vero	> 500	159.120,00	0,49 ± 0,21	156,97 ± 4,14	1020
	A549	> 500	159.120,00	0,39 ± 0,05	124,93 ± 3,17	1283

CC_{50} : concentración citotóxica 50% a las 48 h de incubación con MPA, determinada mediante el método del MTT. CI_{50} : concentración inhibitoria 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUN, a las 48 h p.i.

* media $\pm$ DE, valores obtenidos de n = 3.

Determinadas la CC_{50} y la CI_{50} de MPA-S y MPAE, se realizaron pruebas de citotoxicidad usando concentraciones cercanas a la CC_{50} de los PA libres MPA-S y MPA-E. Se incubaron cultivos de células Vero con distintas concentraciones de MPA-S, MPA-E y el nanosistema que tiene BSA y MPA-E al que se denominó MPA-F, y a las 48 h de tratamiento se determinó la toxicidad mediante la técnica del cristal violeta. Según se muestra en la **Figura I.12**, no se observaron diferencias significativas entre el control sin tratar y las distintas concentraciones de MPA.

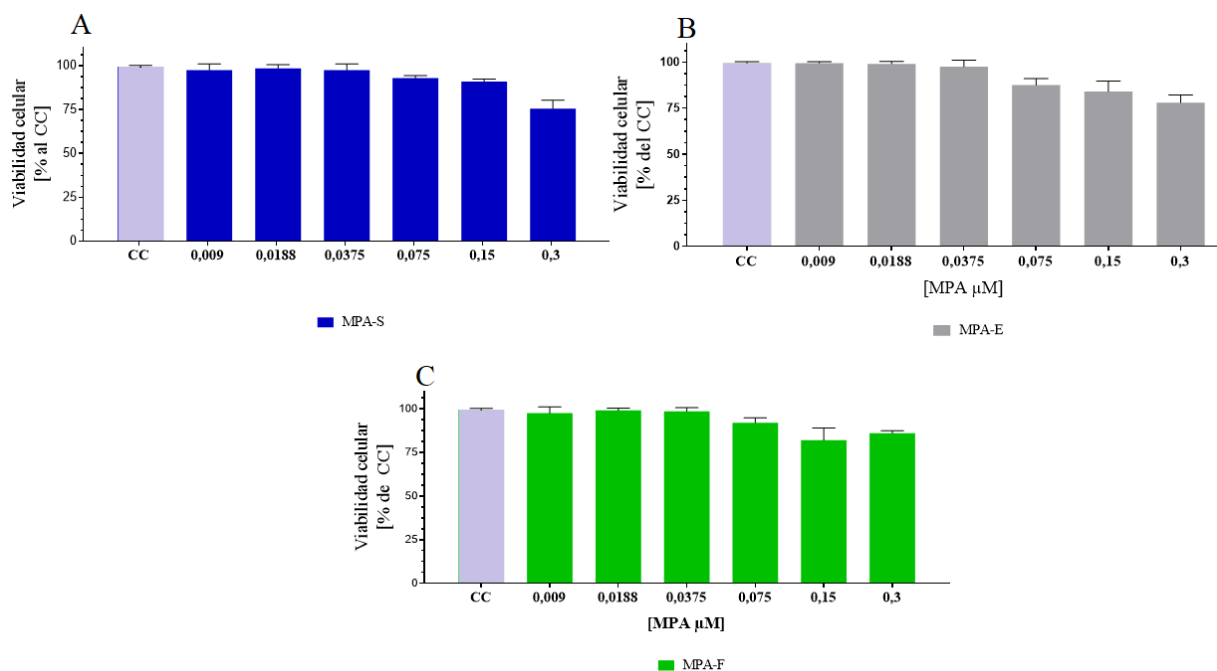


Figura I.12 Citotoxicidad de MPA mediante la técnica de tinción de cristal violeta MPA Sigma, 95% pureza **MPA-S** (A), MPA extraído de la presentación farmacéutica comercial (Myfortic® Novartis), 70% de pureza, **MPA-E** (B), y formulación o nanosistema de BSA con MPA extraído, **MPA-F** (C). Los valores corresponden al promedio de tres ensayos independientes $\pm$ DE.

Por otro lado, se analizó también la citotoxicidad de las distintas versiones de MPA y BSA-MPA¹ sobre cultivos de células Vero mediante el ensayo del MTT. Al igual que en el ensayo anterior, no se observaron diferencias significativas, entre los cultivos tratados con distintas concentraciones de MPA y los controles sin tratar, pudiéndose concluir que no existe un efecto tóxico sobre las células en este rango de concentraciones evaluadas (**Figura I. 13**).

¹ Para facilitar la lectura se creó un Código de colores: **MPA-E**, **MPA-S** y **MPA-F**

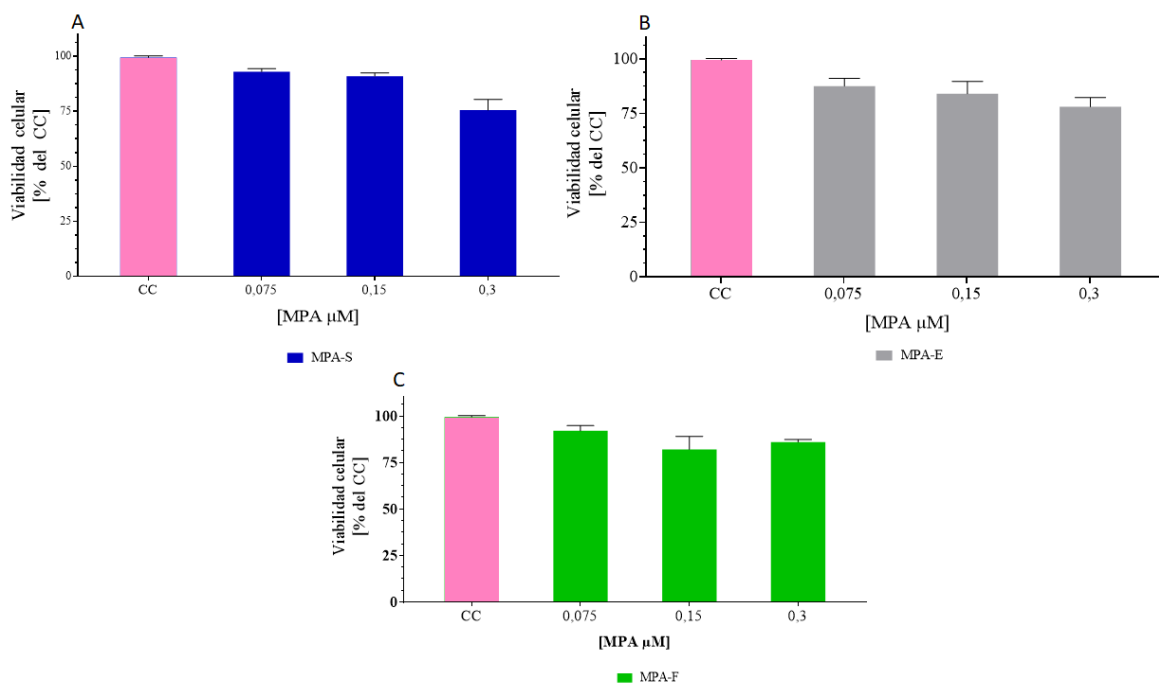


Figura I. 13 Citotoxicidad de las distintas versiones de MPA mediante la técnica del MTT. A) MPA-S, B) MPA-E y C) MPA-F. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos independientes $\pm$ DE.

Los resultados mostrados en las **Figura I.12** y **Figura I. 13** demostraron que MPA-S y MPA-E y el nanosistema MPA-F no son tóxicos en las condiciones evaluadas y a su vez que no existen diferencias significativas entre las tres condiciones evaluadas.

I.4.3.2 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

La actividad antiviral de MPA-S, MPA-E y MPA-F frente a JUNV se determinó en células Vero infectando con una m.i. = 0,7. En estos estudios se colocan controles como: CV corresponde a células infectadas no tratadas, CC corresponde a células no infectadas ni tratadas y los distintos tratamientos en concentraciones de 0,3, 0,15 y 0,075 μ M. Se determinaron diferencias significativas en la dosis más baja de MPA-F y en las más alta de MPA-S y MPA-E como se muestra en la **Figura I.14**. Se evidencia un comportamiento dosis/respuesta en los tratamientos con **MPA-S** y **MPA-E**, a medida que la concentración decayó, también lo hizo la inhibición. Esa tendencia no se observó en el caso de **MPA-F** donde apareció un efecto inhibitorio mayor en la dosis más baja. Los ensayos fueron evaluados a las 48 h por triplicado.

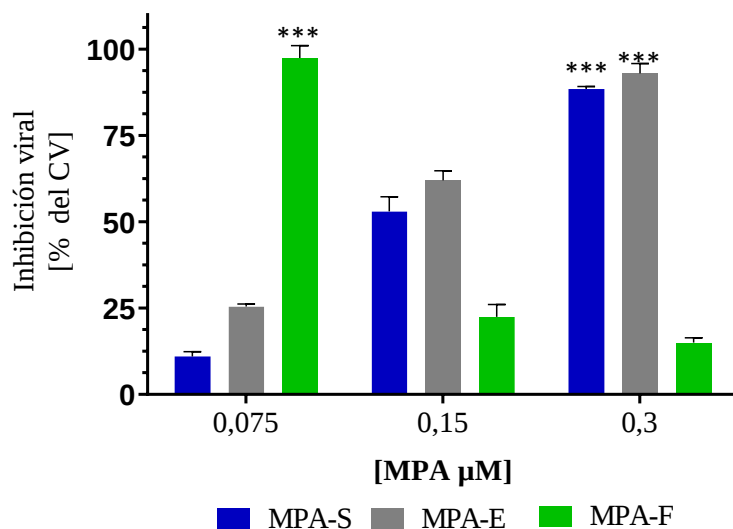


Figura I.14 Inhibición viral JUNV

Se muestran los porcentajes de inhibición viral obtenidos por rendimiento viral de las tres condiciones, MPA-S, MPA-E y MPA-F. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos independientes $\pm$ DE.

Los resultados de protección de los cultivos celulares después de la infección viral evidenciaron que existen diferencias significativas en los porcentajes de sobrevivencia de los tratamientos contra el CC (**Figura I. 15**), la viabilidad de los cultivos infectados y tratados fue menor a la viabilidad del CC en todos los casos salvo en la concentración más alta del MPA-F. No se observaron diferencias significativas entre la viabilidad en el CV y las de los tratamientos, salvo en la concentración más alta del MPA-F, donde sí se observó protección del cultivo con valores de viabilidad celular semejantes al CC. Como se puede observar, en general no existió un efecto de protección de los tratamientos sobre las células Vero infectadas.

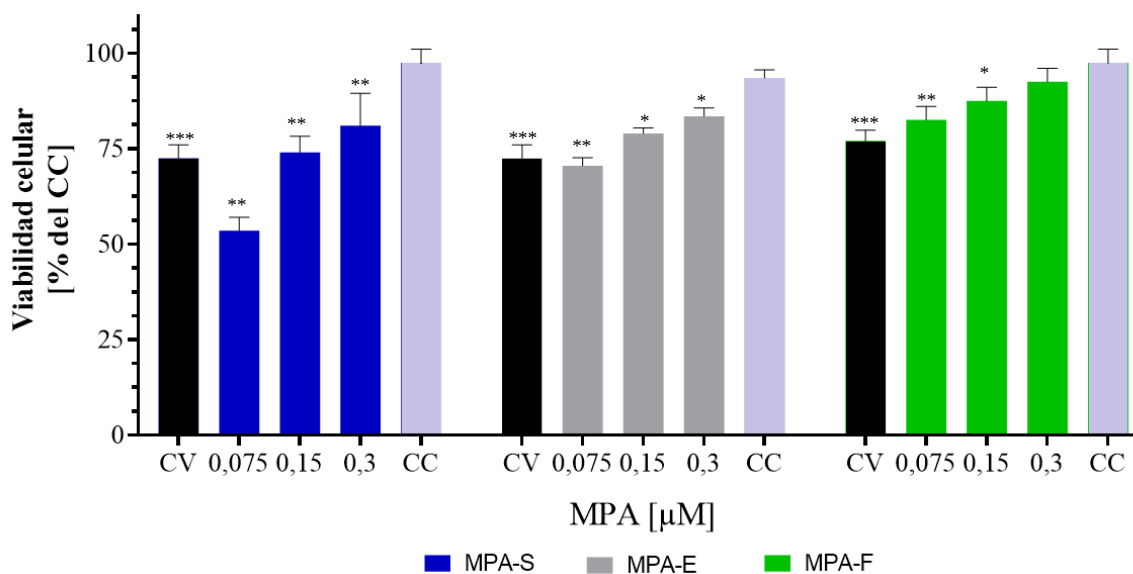


Figura I. 15 Evaluación de la protección celular después de la infección con JUNV
Citotoxicidad de las distintas concentraciones de MPA en células A549 mediante la técnica de MTT para evaluar las células metabólicamente activa después de la infección con JUNV con una moi 0,7 48 h p.i.

En base a los resultados, de la **Figura I.14** se evaluó si existía alguna relación entre el tiempo de tratamiento de las tres condiciones en los niveles de inhibición viral y con ello sobre la protección de los cultivos celulares. Primeramente, se estudió el efecto citotóxico de distintas concentraciones de MPA-S, MPA-E y MPA-F sobre células A549 tratándolas por 48, 72 y 96 h reponiendo los tratamientos con medio y compuesto fresco cada 24 h. El cambio del tipo celular se debió a poder evaluar si el tratamiento producía además algún efecto sobre la respuesta inmune intrínseca, ya que las células Vero son incapaces de sintetizar interferón y otras citoquinas relacionadas.

De acuerdo a los resultados mostrados en la **Figura I.16**, se obtuvieron altos porcentajes de viabilidad celular en las concentraciones menores a 0,25 μM en todas las condiciones y períodos de tiempo ensayados. A partir de 0,5 μM se observó una reducción de la viabilidad que se intensificó en función del tiempo de tratamiento, en todos los casos, el tratamiento con MPA-F mostró niveles mayores de sobrevida respecto a las versiones libres. Cabe aclarar que las reducciones en la viabilidad no se corresponden con muerte celular sino con un claro efecto antiproliferativo.

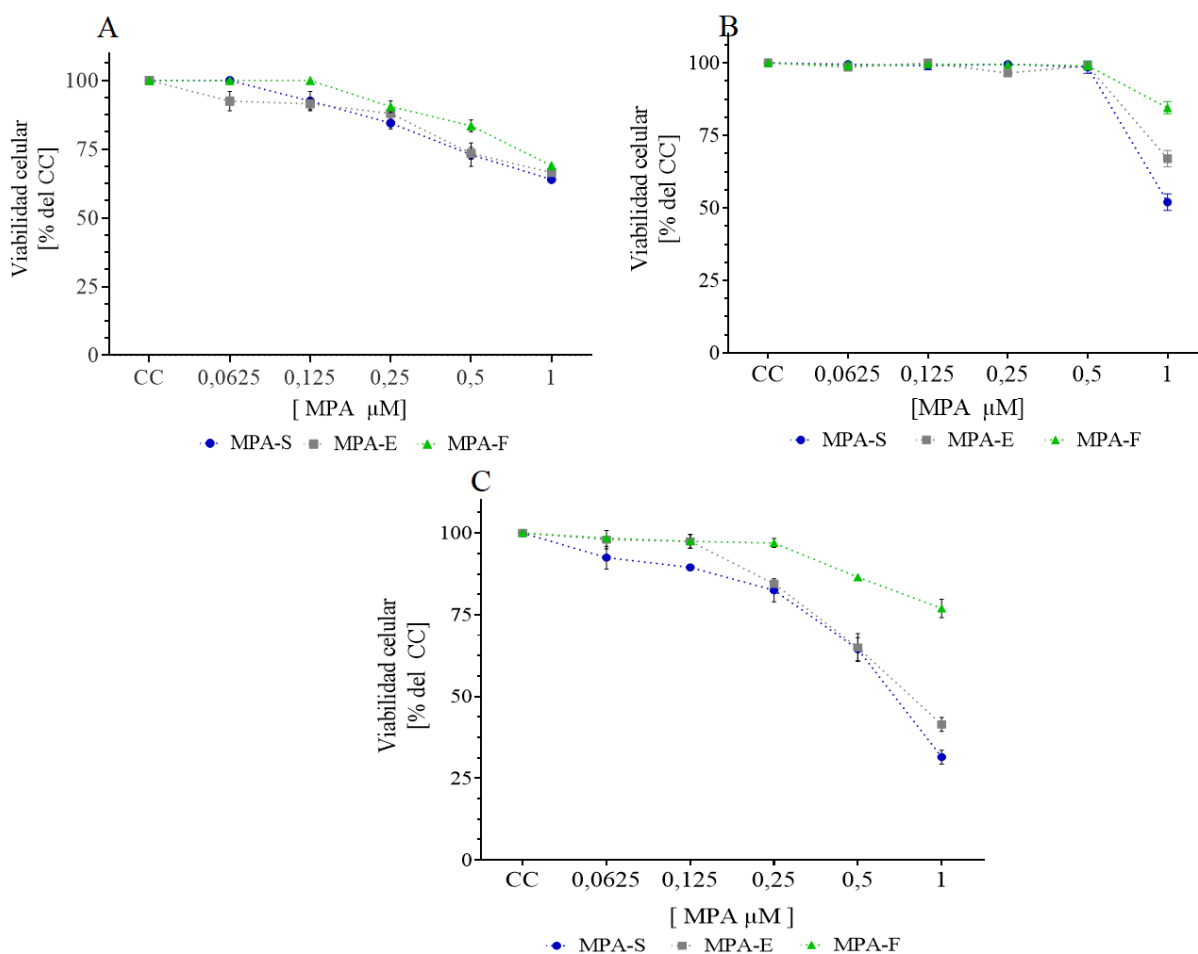


Figura I.16 Viabilidad celular a distintos tiempos de tratamiento en A549
Viabilidad celular de los tres sistemas a 48 h **A**), 72 h **B**) y 96 h **C**) de tratamiento, evaluados por el método MTT en células A549 y normalizados con respecto al CC. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos independientes $\pm$ DE

Luego se estudió el efecto del tiempo de tratamiento sobre la inhibición viral y la protección de los cultivos. Para ello se infectaron células A549 con JUNV (m.i. = 0,1), luego de 1 h de adsorción se agregaron distintas concentraciones de MPA-S, MPA-E y MPA-F y se incubaron durante 48, 72 y 96 h colocando medio fresco con compuesto cada 24 h. Luego del período de tratamiento, se determinó la viabilidad celular por el método del MTT y la inhibición del rendimiento viral por el método de plaqueo. Se observaron diferentes niveles de inhibición viral en los distintos períodos de tiempo evaluados, los cuales no siguieron una relación dosis-respuesta y se correspondieron con la cinética de producción viral, mostrando una menor inhibición a las 72 h p.i. que es cuando la producción viral es la más alta. A las 96 h p.i. MPA-F logró niveles de inhibición viral significativamente mayores que el resto (**Figura I.17**).

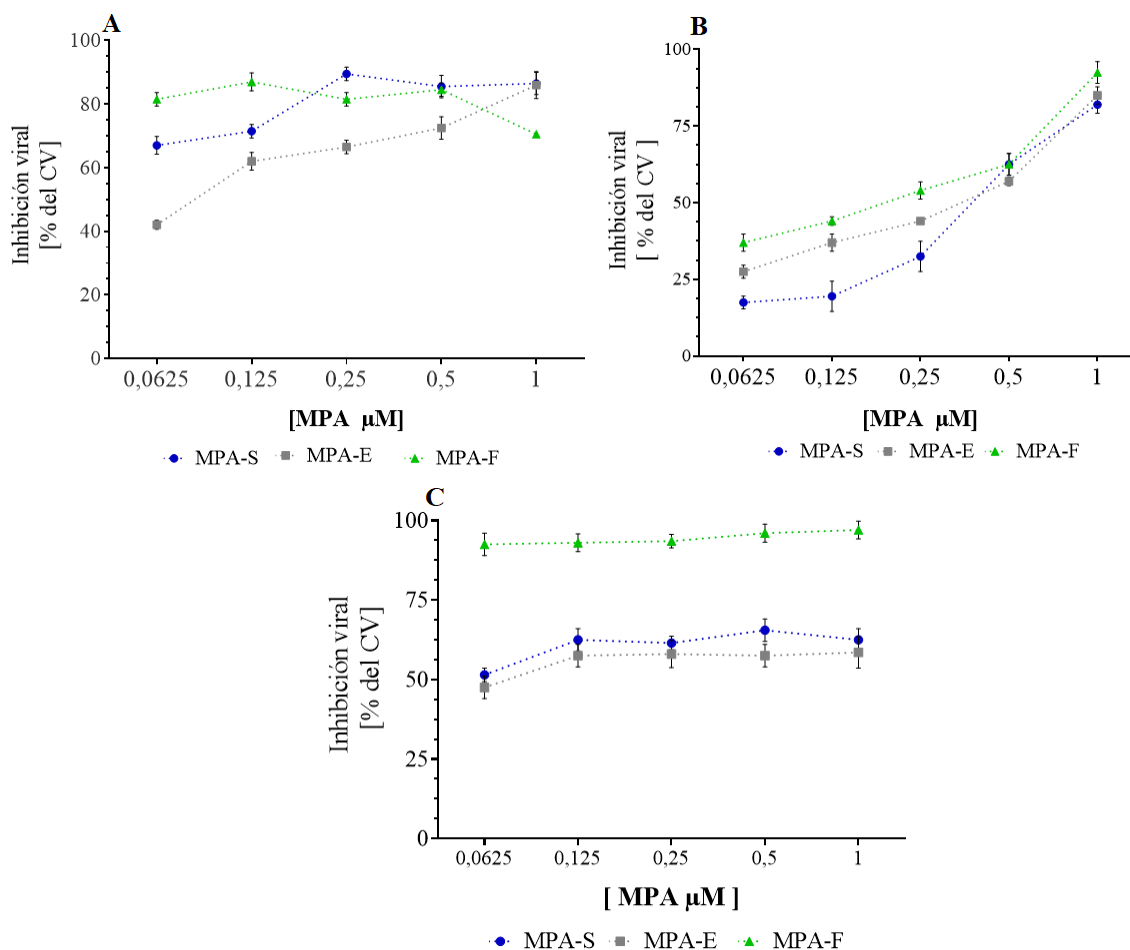
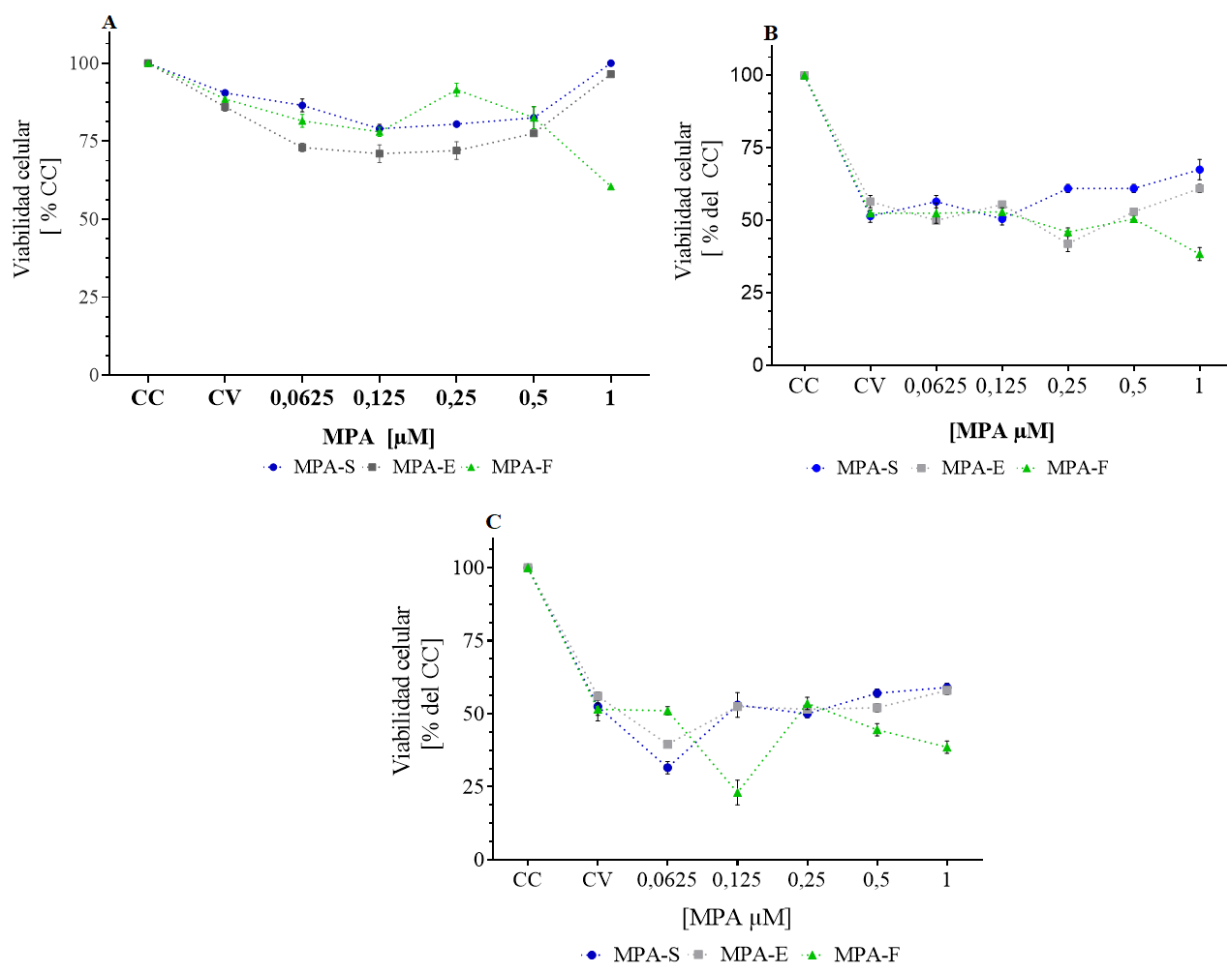


Figura I.17 Inhibición viral en función del tiempo de tratamiento
Inhibición del rendimiento viral en células A549 luego de **A)** 48 h, **B)** 72 h o **C)** 96 h de tratamiento p.i. con distintas concentraciones de MPA-S, MPA-E y MPA-F. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos independientes $\pm$ DE.

En cuanto a la viabilidad de los cultivos infectados tratados también se obtuvieron resultados oscilantes respecto a las concentraciones de los tratamientos, los resultados a las 48 h p.i. mostraron niveles similares viabilidad a los hallados en las células Vero. No se evidenció protección en ninguna de las versiones de MPA ya que los porcentajes de supervivencia fueron similares a los del CV sin tratar. Se evidenció una dependencia del tiempo de tratamiento p.i., ya que la viabilidad celular disminuyó del 75-90% a las 48 h, 50-60% a las 72 h y al 25-50% a las 96 h (**Figura I.18**).



Figural.18 Evaluación de la protección celular después de la infección con JUNV
Citotoxicidad de las distintas concentraciones de MPA en células A549 mediante la técnica de MTT para evaluar las células metabólicamente activa después de la infección con JUNV con una moi 1 a 48, 72 y 96 h p.i.

I.5 DISCUSIÓN

En virtud de explorar la formación de una interacción efectiva entre BSA y MPA que alienten la posibilidad de generar nanosistemas BSA-MPA vía complejamiento, se realizaron estudios *in silico* de *docking* molecular. Esta técnica computacional constituye un enfoque moderno que permite predecir la conformación estable entre dos moléculas al estar unidas, con el fin de formar un sistema autoensamblado Ossowicz *et al.*, (2020) estudiaron las interacciones de BSA con naproxeno, mediante el uso de modelos moleculares basados en las estructuras cristalinas, a partir de ello probaron siete bolsillos de unión de BSA para determinar su potencial de unión con este ligando en correlación con los parámetros termodinámicos.

Estudios anteriores realizados por Rahman *et al.*, (2005) enfatizan la importancia de realizar este tipo de análisis para entender las interacciones entre proteína y ligando. Demostraron la existencia de la interacción BSA-naproxeno empleando una metodología distinta, basada en el desplazamiento por competencia de un ligando sobre el sitio de unión de otro. Basados en estos antecedentes, se empleó el método de *docking* ciego para predecir la interacción BSA-MPA, sobre toda la superficie de la proteína, la búsqueda conformacional se realizó con el algoritmo genético lamarckiano implementado en el programa AutoDock 4.2.

Nuestro análisis mostró que las primeras 4 cuatro conformaciones están dentro de los sitios de unión de naproxeno y, como se muestra en la **Figura I.3**, con mayor afinidad que la prevista para tres de las seis conformaciones. El micofenolato muy probablemente interactúa con la BSA de la misma manera que el naproxeno, en particular, para los tres diferentes modos de unión, las interacciones principales del extremo carboxilato y los anillos aromáticos fusionados están completamente conservadas.

Los experimentos de DC son de baja resolución; por tanto, para relacionar los fenómenos espectrales con alteraciones en la estructura de la proteína se aplican métodos computacionales. La implementación combinada de experimentos de DC y la teoría es, con frecuencia, la única posibilidad para determinar la configuración absoluta de moléculas pequeñas cómo lo describen los trabajos de Berova N, (2007) y Woody R., (1996). La investigación teórica de DC de proteínas y de sus complejos puede ser bastante complicada debido al gran tamaño de las moléculas proteicas, la importancia de los cambios conformacionales, las propiedades electrostáticas y los efectos del solvente.

El autoensamblaje de una macromolécula como la BSA, basado en la asociación de un ligando usando interacciones no covalentes proporciona una poderosa herramienta para la creación de sistemas estructurados a nivel molecular, y la aplicación de esta metodología como estrategia para el diseño de nanosistemas capaces transportar distintos PA que normalmente no son solubles o no se encuentran biodisponibles, como lo reporta Atwood y Steed, (2004) y Grzelczak *et al.*, (2010).

El MPA es un fármaco ampliamente usado como agente inmunosupresor para inhibir el rechazo de órganos trasplantados. Posee además comprobado efecto anticancerígeno, actividad antiparasitaria y actividad antiviral (Ferreira *et al.* 2020; Feturi *et al.* 2018; Kitchin *et al.* 1997; Williams *et al.* 1968). No obstante, los reportes de su encapsulación son escasos mientras que las metodologías y las matrices empleadas para son distintas a las planteadas en este trabajo de tesis. En los trabajos de Agnieszka *et al.* (2017), Ferreira *et al.* (2020) se emplean polímeros sintéticos para encapsular este PA, por lo cual, el hallazgo de la homología estructural entre naproxeno y MPA usando la herramienta *docking* constituyó un paso sustancial para explorar este sistema y establecer las condiciones apropiadas para desarrollar esta investigación.

En bibliografía también se encuentra reportada la presencia del fenómeno de FRET en sistemas similares a los aquí estudiados. En base a esa información, se realizaron las medidas experimentales que confirmaron la presencia de este fenómeno y esto a su vez correlacionó con el estudio computacional. El aporte constituye una herramienta para el seguimiento y cuantificación del PA empleando técnicas de espectroscopía de fluorescencia, permitiendo aprovechar sus bajos límites de detección y alta sensibilidad, fácil acceso, y la versatilidad para la obtención y preparación de muestras (Banerjee *et al.* 2006; Ma *et al.* 2015; Periasamy y Day 2011; Zhang *et al.* 2007).

En otra instancia, a medida que se iba desarrollando la investigación, surgieron limitaciones como la cantidad de PA necesaria para el desarrollo de las distintas estrategias de vehiculización. Debido a que el MPA es un fármaco licenciado que no presenta genéricos y su costo en el mercado es elevado, recurrimos a una donación de una presentación comercial de uso clínico y estandarizamos un método de extracción del PA que permitió obtenerlo con la menor cantidad de excipientes y manteniendo el mayor efecto biológico. Muchos de los excipientes que se usan en las formulaciones comerciales comparten características físico-químicas con el PA, por ese motivo se debieron realizar varias modificaciones al protocolo de extracción hasta conseguir un máximo de pureza del 70%. La presencia de residuos de excipientes podría interferir con la actividad biológica o bien presentar concentraciones efectivas distintas al PA comercial, razón por la cual, se evaluaron los efectos

biológicos del MPA-E tanto en su forma libre como en su forma asociada a BSA en ensayos paralelos con el PA adquirido a Sigma (MPA-S).

Además de presentar efectos secundarios no deseados (Kitchin *et al.* 1997; Mourad *et al.* 2001), el MPA es poco soluble en agua y posee muy baja asimilación en el organismo, se estima que solo el 1% de la totalidad del PA es metabolizado por lo que las dosis terapéuticas empleadas son elevadas y administradas por periodos prolongados. Poder reducir las concentraciones efectivas del MPA fue uno de los desafíos planteados para este trabajo a fin de optimizar el tratamiento, reduciendo los efectos adversos y economizando la cantidad de PA. Existen diversos valores de CI_{50} reportados en la bibliografía antiviral, que van en el rango de 0,5-0,2 μ M (Cline *et al.* 1969; Ferreira *et al.* 2020; Leyssen *et al.* 2005; Siebert *et al.* 2017; Smeets, Bray, y Huggins 2001) lo que equivale aproximadamente a 285 ± 2 μ g/mL dependiendo del tipo celular y del virus ensayado.

Los resultados de los tratamientos con BSA-MPA no presentaron un comportamiento dosis-respuesta, pero si mostraron mayores niveles de inhibición viral respecto al PA libre cuando se utilizaron bajas concentraciones, por lo que se podría pensar que existe una entrega efectiva del PA a las células con este tipo de nanosistema, debido a las características intrínsecas propias de los nanomateriales; los cuales poseen dimensiones similares o menores en comparación con el virus objetivo, permitiendo una interacción íntima como lo describen los estudios con NP metálicas reportados por Sharmin *et al.* (2021).

A fin de determinar la influencia del hospedador sobre los efectos biológicos logrados por el nanosistema BSA-MPA, los ensayos biológicos se realizaron en líneas celulares que presentan distintas características y orígenes. En todos los casos, se incluyeron tratamientos con MPA-S y MPA-E como controles y puntos de comparación. Se utilizó la línea celular Vero, la cual está ampliamente aceptada por las autoridades regulatorias y es susceptible a la mayoría de las infecciones virales debido a la particularidad de no presentar expresión de citoquinas en respuesta a procesos infecciosos (Barrett *et al.* 2009; Kaliwantoro *et al.* 2016; Linero *et al.* 2009; Swanson *et al.* 1988). El objetivo de usar esta línea celular fue constatar si el efecto antiviral que existe es exclusivo del PA o de la formulación como en este caso BSA-MPA y no una respuesta inflamatoria de la célula.

La línea A549, de carcinoma pulmonar humano, es también susceptible a las infecciones virales y, a diferencia de las Vero, expresan citoquinas que intervienen en la señalización de los procesos

Capítulo I: Asociación Intermolecular: BSA-MPA

inflamatorios y pre inflamatorios asociados a la respuesta inmunológica intrínseca (Kaliwantoro *et al.* 2016). Lo que se quiso demostrar fue si la interacción del sistema BSA-MPA podría generar un mejor estado de protección de la célula a la infección viral. Por otro lado, también es útil estudiar las contribuciones metabólicas y del procesamiento de macromoléculas de las células alveolares de tipo II en relación a los mecanismos de administración de PA en el epitelio pulmonar (Foster *et al.* 1998).

Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que, si bien existe un efecto mejorado de la actividad antiviral cuando el PA estuvo asociado a BSA, fue complejo saber cuál/es mecanismo o vías de internalización se vieron involucradas en la entrega efectiva del PA que permitieron observar un efecto antiviral de BSA-MPA en las concentraciones en las que el PA libre no tiene efecto. Por lo que aún quedan muchos más experimentos por realizar para poder explicar este fenómeno.

I.6 CONCLUSIONES

En este capítulo se caracterizó la asociación intermolecular de BSA, una proteína ampliamente utilizada en el desarrollo de nanomateriales con fines biomédicos y el MPA, un PA, usado como medicamento inmunosupresor con un interesante potencial como antiviral de amplio espectro.

Asociación intermolecular: BSA-MPA y caracterización

- Los estudios de *docking* mostraron la posible forma de interacción entre BSA y MPA. Se logró predecir que se comparte la energía de resonancia entre BSA y MPA produciéndose el fenómeno de FRET, el cual fue comprobado experimentalmente pudiéndose determinar la constante de disociación $K_d = 12,0 \pm 0,7 \mu\text{M}$ y la distancia de Förster $R_0 = 1,6 \text{ \AA}$.
- El análisis de dicroísmo circular demostró que no se produjo cambio conformacional en la estructura nativa de la BSA inducido por el PA.
- Ni el solvente ni la mezcla de solventes ni la concentración de proteína empleada indujo la agregación extensiva de BSA.
- La adición de concentraciones crecientes de MPA sobre la BSA produjo el desplazamiento del h_0 de 5-10 nm.
- Las micrografías de SEM mostraron que los nanosistemas obtenidos presentan una estructura porosa que permitiría el almacenamiento de los PA.

MPA y su actividad biológica

- Se logró estandarizar un protocolo para extraer el MPA a partir de la presentación comercial con un 70% de pureza.
- Se constató que la actividad biológica del MPA extraído es igual a la del PA comercial.
- Los tratamientos con MPA-S, MPA-E y MPA-F en células Vero y A549 no mostraron citotoxicidad en los rangos de concentraciones empleadas.
- La actividad metabólica de las células y viabilidad tampoco se vio afectada por ninguno de los tratamientos empleados en las concentraciones evaluadas.
- El efecto antiviral de MPA-S y MPA-E fue dependiente de la dosis.
- La formulación MPA-F mostró mayores niveles de inhibición viral en bajas concentraciones, respecto a las versiones del PA libre.

II NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA

II.1 INTRODUCCIÓN

La amplia variedad de biomateriales a disposición y el reciente auge de la nanotecnología, ha hecho que los científicos desarrollen nuevas estrategias para distribuir y liberar PA terapéuticos de diversas formas. La comprensión de los procesos biológicos a nivel de la nanoescala es una gran fuerza impulsora detrás del desarrollo de la nanotecnología, la cual se refiere a la investigación y los desarrollos tecnológicos a escala atómica, molecular y macromolecular, que conducen a la manipulación y el estudio controlado de estructuras y dispositivos con al menos una dimensión en el rango de 1 a 100 nm. (Sundar *et al.*, 2010).

Los organismos vivos están formados por células que suelen tener 10 μm , sin embargo, las partes de la célula son mucho más pequeñas y algunas están en el dominio de tamaño submicrónico. Incluso, las más pequeñas son las proteínas con un tamaño típico de solo 5 nm, que es comparable con las dimensiones de las NP artificiales más pequeñas. Esta simple comparación de tamaño da una idea del uso de NP como sondas muy pequeñas que nos permitirían espiar la maquinaria celular sin introducir demasiada interferencia (Salata, 2004).

De acuerdo a su tamaño, las NP pueden penetrar fácilmente a través de los capilares y ser absorbidas por las células, lo que da como resultado la liberación adecuada de agentes terapéuticos y, por lo tanto, la acumulación en el sitio objetivo permitiendo reducir los efectos adversos no deseados (Sahu *et al.*, 2021). Las NP poliméricas por otro lado exhiben características adicionales de buena estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad mejoradas, perfil mejorado de liberación controlada del PA, liberación de múltiples PA, posibilidad de cargar tanto PA hidrófilos como hidrófobos, modificaciones superficiales y propiedades de funcionalización constituyendo transportadores, los cuales son una de las vías destacadas para una revolución significativa en el campo de la nanomedicina (Chaudhary *et al.*, 2022).

La investigación sobre antivirales es esencial para prevenir la propagación de infecciones y reducir las muertes. Recientemente, se ha demostrado que muchas NP funcionales poseen una notable capacidad antiviral, como *quantus dots*, NP de oro y plata, *nanoclusters*, óxido de grafeno, materiales de silicio, polímeros y dendrímeros. A pesar de su diferencia en el mecanismo antiviral y la eficacia

de inhibición, estas estructuras funcionales basadas en NP tienen características únicas como posibles candidatos antivirales (Chen y Liang, 2020).

Los sistemas de “nano entrega” modifican las propiedades fisicoquímicas, parámetros de solubilidad y farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de los materiales encapsulados mediante liberación controlada del PA. También se pueden adaptar para el direccionamiento pasivo (ej., control del tamaño de partícula) o activo (decoración de la superficie con ligandos) de los agentes terapéuticos. En consecuencia, el uso de un sistema de nano entrega para la terapia antiviral podría resultar en una dosis más baja de agentes antivirales y un perfil reducido de efectos secundarios (Abo-zeid *et al.*, 2018).

El primer material natural utilizado para la preparación de NP biodegradables constaba de dos proteínas, albúmina y gelatina (Sundar *et al.*, 2010). Entre los sistemas coloidales, los basados en proteínas son muy prometedores porque son menos inmunogénicos y no tóxicos, tienen mayor estabilidad *in vivo* y durante el almacenamiento, son relativamente fáciles de preparar y de monitorear, la distribución del tamaño y su fabricación puede escalarse. Al mismo tiempo, debido a la estructura primaria definida de las proteínas, las NP basadas en éstas ofrecen varias posibilidades para la modificación de la superficie y la unión covalente o no de PA (Sundar *et al.*, 2010). Debido a la estructura primaria, la BSA permite a su vez, la interacción electrostática o hidrofóbica con la sustancia sin la mediación de otro ligando. Además, pueden incorporar una cantidad significativa de PA en su matriz debido a los diferentes sitios de unión presentes en las moléculas de BSA.

Las NP diseñadas a partir de BSA como *carrier* (**NP-BSA**) constituyen un sistema atractivo de transporte molecular, debido a su biodegradabilidad, a que no son tóxicas y no presentan a priori inmunogenicidad. Otras ventajas de su uso son la protección contra la degradación inespecífica del PA que transportan y la absorción mejorada, así como la mejora de la distribución farmacocinética y tisular, entre otras (Iwao, 2016; Patil, 2003; Siri, 2017; Yamasaki y Anraku, 2016).

La primera formulación exitosa de NP basada en albúmina lograda por la industria farmacéutica fue la conjugación de esta proteína con la droga Paclitaxel (PX/Alb-NP, Abraxane®), aprobada en el 2005 por la FDA (Desai, 2016). El Paclitaxel es un potente agente antitumoral hidrofóbico con muy baja solubilidad en soluciones acuosas. Es la droga terapéutica de la formulación Taxol®, que contiene en una mezcla de ETOH y Cremophor®, sin embargo, la elevada toxicidad del Taxol® llevó al desarrollo de la formulación Abraxane®, donde el PA se unió de forma no covalente a la NP-BSA

(Achilli E., 2020; Desai, 2016; Iwao, 2016). Actualmente hay diferentes métodos para preparar las NP-BSA, los más comunes son aquellos de fácil preparación: coacervación o desolvatación controlada y formación de emulsiones (emulsificación) (Elzoghby *et al.*, 2012; Siri, 2017).

- **Coacervación o desolvatación:** las NP se obtienen a partir de un goteo continuo de ETOH a una dispersión coloidal acuosa de BSA. Esto ocurre en agitación continua hasta que se alcanza una dispersión coloidal azulada, lo cual indica la pérdida de solubilidad de la BSA. Este método no proporciona la estabilidad necesaria para asegurar que una vez cambiado el solvente a agua no se resuelvan las NP. Es por esto que luego se mejoró el método al usar el glutaraldehído como agente entrecruzante entre las moléculas de albúmina (Siri, 2017).
- **Emulsificación:** se usan dos métodos para obtener NP por emulsificación; uno acompañado de tratamiento térmico y otro de tratamiento químico. Las NP se generan cuando se homogeniza una solución oleosa de albúmina mientras se estabiliza térmicamente a temperaturas entre 175 y 180 °C durante 10 min. Luego se enfría la muestra y se diluye con etil-éter para reducir la viscosidad y facilitar la separación por medio de centrifugación. En el método químico, se emulsifica la dispersión oleosa de albúmina a 25 °C con algún agente entrecruzante como el formaldehído (Yamasaki y Anraku, 2016).

II.2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

II.2.1 HIPÓTESIS

- Es posible realizar la encapsulación del MPA y RBV en NP-BSA.

II.2.2 OBJETIVO GENERAL:

- Obtener NP poliméricas mediante el método de desolvatación, como sistemas de administración de PA hidrofóbicos e hidrofílicos.

II.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Establecer las condiciones para la obtención de NP-BSA con PA.
- Caracterizar la NP-BSA, principalmente tamaño de partícula, $\text{pot-}\zeta$ y estabilidad.
- Encapsular en las NP-BSA-PA como sistemas avanzados de administración de medicamentos hidrofóbicos e hidrofílicos.
- Evaluar su efecto biológico, toxicidad, interacción con componentes sanguíneos y su actividad antiviral en un modelo de infección *in vitro*.

II.3 MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1 PREPARACIÓN DE NP-BSA

Para la obtención de NP-BSA, se empleó el método de desolvatación descrito por Díaz-Saldívar y Huidobro-Toro (2019) con modificaciones. Se empleó una solución acuosa de BSA al 1% (p/p) y se dejó en agitación a 500 rpm a 25 °C por 12 h. Se ajustó el pH de la solución en un rango 5-5,5 usando una solución de NaOH, 0,1 N. Esta solución se filtró al vacío con un filtro de 0,2 μm dentro de un flujo vertical (J.F. Pregliasco S.R.I), manteniendo condiciones de esterilidad. Para el caso de las NP cargadas con los distintos PA MPA y RBV, (ref #R9644 Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania), se emplearon 9,9 mL de la solución de BSA 1% (p/p) esterilizada y se adicionó 0,1 mL de una solución 10 mM de los distintos PA.

Para lograr una concentración de 100 μM (320,34 μg) de MPA para un caso y 100 μM (244,2 μg) RBV del PA, se dejó en agitación a 30 °C por 24 h. En la Figura II.1 se esquematiza el proceso de diseño de las NP-BSA. Se tomaron 2 mL de la solución de BSA 1%, con y sin PA (**Figura II.1A**) y se realizó la adición controlada de ETOH absoluto (ref # C1386, Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania) por goteo continuo controlado usando una bomba de infusión de jeringa KDS100 Legacy (Fisherbrand™) (**Figura II.1B**), con un caudal de 1 mL/min y se agitó hasta que la solución pasó de transparente a un tono azul translúcido, lo que indicó la formación de las NP. Este proceso se repitió hasta completar el volumen final de 10 mL y luego se colectaron todas las suspensiones coloidales (**Figura II.1C**).

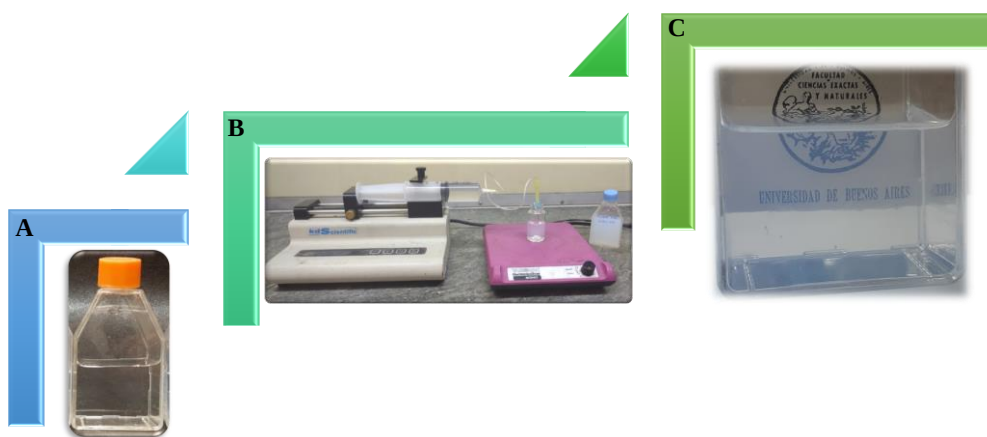


Figura II.1 Esquema correspondiente a la obtención de NP-BSA
A) solución BSA 1% (p/p) **B)** goteo controlado de ETOH sobre solución de BSA **C)** suspensión coloidal de NP-BSA

Para el aislamiento y purificación de las NP-BSA, la suspensión coloidal se centrifugó a 4 °C a 22.000 x g (Class S XL-90 Beckman) y se repitió el proceso dos veces más. Las NP aisladas en el pellet se re-suspendieron en 5 mL de agua ultra pura estéril y se realizaron tres ciclos de sonicación de 15 s a una frecuencia de 20 kHz, con una potencia de 125 W (Qsonica). Esta metodología se empleó al menos ocho veces, para probar la reproducibilidad del sistema. Las NP obtenidas fueron almacenadas a -80 °C tomándose alícuotas de 1 mL para realizar las distintas técnicas de caracterización.

II.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) DE NP-BSA

Las suspensiones de NP conteniendo los diversos PA se lavaron mediante tres ciclos de centrifugación a 4 °C a 21380 x g, por 30 min, fueron re-suspendidas en agua ultra pura filtrada (0,2 µm) y se secaron en un concentrador de vacío Savant™ SPD131DDA (Thermo Scientific™). Las NP-BSA deshidratadas fueron dispuestas en un soporte metálico con cinta de carbón, recubiertas por una película de oro de 10 nm de espesor y observadas en microscopio electrónico de barrido en alto vacío a 10 kV con 3 nm de resolución (Carl Zeiss NTS-Supra 40, Centro de Microscopías Avanzadas, DF, FCEN-UBA).

II.3.3 RENDIMIENTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LAS NP-BSA

Las muestras re-suspendidas en agua ultra pura fueron pesadas en microtubos de 1 mL, luego se las deshidrató como se describió en la sección anterior y una vez finalizado el proceso se volvieron a pesar para determinar la masa obtenida por diferencia. El rendimiento (R) fue calculado como la relación entre el peso del producto obtenido experimentalmente y la suma de los pesos de todos los componentes, como se muestra en la ecuación **II.1** donde $mg\ NP$ es el peso total del producto obtenido, mge es la masa de PA empleado en mg y mgE es la suma de las masas de los excipientes empleados en cada caso (Arrúa Eva C., 2018).

$$R = \frac{mg\ NP}{mge + mgE} * 100 \quad \text{Ec.II.1}$$

II.3.4 ANÁLISIS DE ESTABILIDAD NP-BSA

Con el objetivo de estudiar procesos de migración y desestabilización, se determinaron cambios en los tamaños midiendo el h_o de las suspensiones coloidales sin agitación previa y el tamaño de NP en función del tiempo a 25 °C y después de un proceso de congelación a -80 °C. Las determinaciones se realizaron como se describió en el capítulo **MM.1.5.1** y se compararon con la distribución de tamaño de partículas obtenida previamente por DLS.

II.3.5 DETERMINACIÓN DE LA EfE

En el caso de las EfE , se calcularon a partir de la ecuación **II.2**, empleando la cantidad de PA liberado de las NP secas, donde $mgTeórico$ es la masa de PA inicial (mg) y $mgNP_E$ es la masa de PA encapsulado (mg). Las masas de PA fueron cuantificadas por espectrofotometría de fluorescencia y absorbancia según el caso, mediante la metodología descrita en el capítulo de **MM.1.9**. En el caso de las NP-BSA, se tomaron las alícuotas de 1 mL de las distintas muestras.

$$EfE = \frac{mg\ Teórico - mgNP_E}{mgTeórico} * 100 \quad \text{Ec.II.2.}$$

Se tomaron 6 mg de cada una de las NP y se disolvieron en 3 mL de tripsina 2X (180 µg/mL) incubando por 24 h a 37 °C en agitación constante para liberar el PA del interior. Una vez que se observó la disolución completa de las NP-BSA, se centrifugó por 30 min a 25 °C a 21380 x g. Las muestras fueron filtradas (0,2 µm) y cuantificadas por espectrofotometría, los resultados se expresan como EfE (en porcentaje).

II.3.6 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS, PREVIO A LA INFECCIÓN VIRAL, CON LOS COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Cultivos de células Vero fueron pre-incubadas durante 24 y 48 h a 37 °C con medio de mantenimiento solo o con la concentración de PA o NP que produjo un 80% de inhibición del rendimiento viral de acuerdo al ensayo correspondiente (**MM.1.12.3**), luego se removieron los tratamientos, se lavaron las células dos veces con PBS y se infectaron a una m.i. de 0,1 UFP/cél. en ausencia de tratamiento. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló la producción viral mediante UFP.

II.3.7 REVERSIBILIDAD DE LA ACCIÓN ANTIVIRAL

Cultivos de células Vero fueron infectados a una m.i. de 0,1, luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se removieron los inóculos y se agregó medio de mantenimiento con o sin (CV) distintas diluciones de NP-BSA con PA, NP-BSA sin PA o PA y a las 24 h p.i. se siguieron distintos tratamientos:

- T1: Agregado de medio fresco con las mismas diluciones.
- T2: Agregado de medio fresco solo.
- CV no tratados: a uno de ellos se le realizó cambio de medio y el otro permaneció con el mismo medio.

A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral por el método de plaqueo.

II.3.8 EFECTO DE LA ADICIÓN DEL COMPUESTO A DISTINTOS TIEMPOS

Para el ensayo de adición, se infectaron células Vero a una m.i de 0,1 UFP/cél. a 4 °C, considerada hora 0 p.i., luego de 1 h de adsorción se cubrieron con medio de mantenimiento. A distintos tiempos y hasta completar 8 h p.i., se agregó una concentración del PA o de NP que inhibiera el rendimiento en un 90% de acuerdo al ensayo de actividad antiviral (**MM.1.12.3**). El ensayo se realizó por duplicado (dos pocillos por tiempo evaluado), los controles virales y celulares no fueron tratados con los PA libres ni NP-BSA. Los sobrenadantes de células infectadas se cosecharon en todos los casos a las 24 h p.i. para su posterior titulación por el método de UFP.

II.4 RESULTADOS

II.4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

El objetivo principal de este capítulo fue evaluar si BSA sería capaz de encapsular compuestos, hidrofílicos como RBV o hidrofóbicos como el MPA, vía complejamiento. Se caracterizó a las NP-BSA obtenidas por el método de desolvatación y se evaluó su actividad biológica en modelos de infección viral *in vitro*. Los resultados presentados en el capítulo anterior sirvieron para establecer las bases en el desarrollo de este capítulo. El análisis bioinformático que se presentó anteriormente mostró la interacción entre MPA y BSA. Así que para iniciar este capítulo se realizó un análisis bioinformático de RBV con BSA.

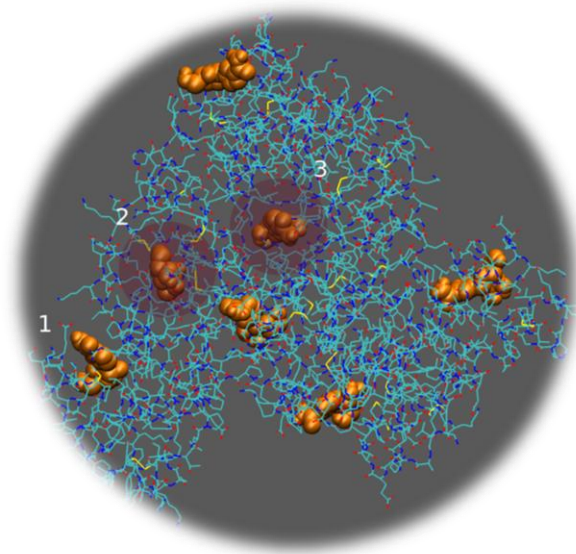


Figura II.2 Docking BSA-RBV.
Los sitios de unión que presentaron mayor score se denominaron 1, 2 y 3.

En la **Figura II.2** se muestra el *docking* de BSA-RBV. Se tomó en cuenta el 25% de los resultados con mejor puntaje. Se descubrieron siete sitios posibles de unión, de los cuales se realizó un top-tres en base a los scores. Dentro de éstos, dos sitios correspondieron al naproxeno marcados con círculos en la **Figura II.2** (los números representan posición en el ranking de afinidad). En general los *scores* de afinidad no fueron altos, por lo que es posible que la unión sea débil o que esté muy facilitada por la matriz y no en la molécula de BSA aislada.

II.4.2 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES PARA LA OBTENCIÓN DE NP-BSA

Se inició el trabajo estableciendo la relación óptima de BSA:ETOH para obtener una suspensión coloidal azul/translúcida. En la **Figura II.3**, se muestra el aspecto macroscópico de la solución de partida de BSA (**A**) 1% (p/p) a pH 5,5; la relación 2 mL de BSA con 1 mL de ETOH (**B**), si bien se observa un tono perlado no fue estable en el tiempo y después de 24 h se observó separación de fases. La relación 2 mL BSA y 2 mL ETOH (**C**), donde se observó un tono opaco turbio. La relación 1 mL de BSA y 3 mL ETOH (**D**) presentó inestabilidad y se visualizaron precipitados; y finalmente, se evaluó la relación 1 mL BSA y 2 mL ETOH (**E**) que fue la que dio origen a una suspensión coloidal translúcida y estable en un período prolongado de tiempo (96 h hasta 3 meses).



Figura II.3 Determinación de la relación BSA: ETOH

Se evaluaron distintas relaciones de BSA y ETOH que permitieran la obtención de una suspensión translúcida azulada. Las relaciones empleadas fueron: **A**) Solución de BSA 1% (p/p) **B**) relación 1:1 **C**) relación 2:2 **D**) relación 1:3 **E**) relación 1:2.

Otro factor determinante para la elaboración de las NP-BSA fue establecer el pH adecuado de trabajo que permitiera obtener sistemas estables en períodos prolongados de tiempo. En la **Figura II.4**, se muestran las suspensiones obtenidas con los distintos pH evaluados. En todos los viales se mantuvo la relación BSA: ETOH de 1:2. En el caso del vial (**A**), se muestra una suspensión translúcida estable en el tiempo (96 h a 3 meses) a pH = 5,5. Para el caso del vial (**B**), se muestra una solución opaca turbia a pH = 7 en una solución de BSA en agua ultra pura. En el caso del vial (**C**), se observó una solución turbia a pH = 9. En el caso del vial (**D**), se usó una solución acuosa de BSA en PBS pH = 7, observándose la precipitación del sistema. Finalmente, en el caso del vial (**E**), corresponde a la solución de BSA 1%, pH = 5,5.

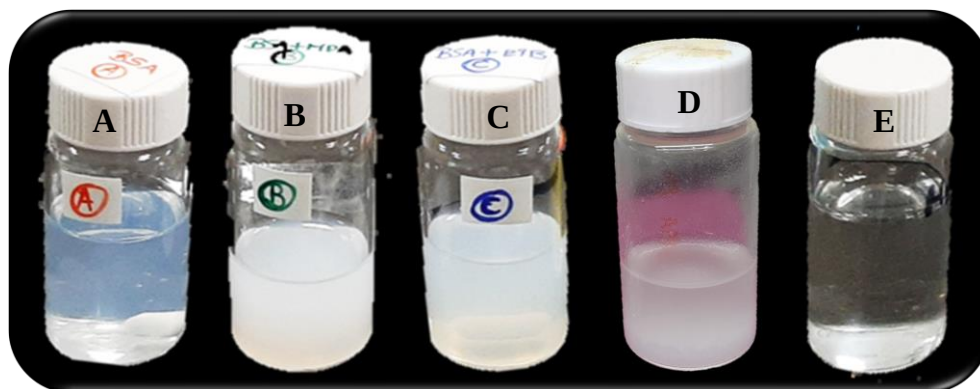


Figura II.4 Determinación del pH de trabajo

Se evaluaron tres condiciones de pH para la obtención de NP-BSA, **A)** relación 1:2 a pH 5,5, **B)** relación 1:2 a pH 7 en agua ultra pura. **C)** relación 1:2 a pH 9, alcalinizada con NaOH 0,1 M. **D)** relación 1:2 a pH 7, usando PBS como disolvente de la BSA. **E)** solución de BSA 1% (p/p).

Finalmente, establecidas las condiciones de trabajo, el siguiente paso consistió en adicionar los PA a las NP-BSA. Las suspensiones coloidales obtenidas se muestran en la **Figura II.5**. Todas las suspensiones coloidales fueron almacenadas a 25 °C por 48 h para evaluar la estabilidad de los nanosistemas en términos de pot- ζ . Transcurrido este tiempo, las NP-BSA fueron purificadas como se describió en la metodología.

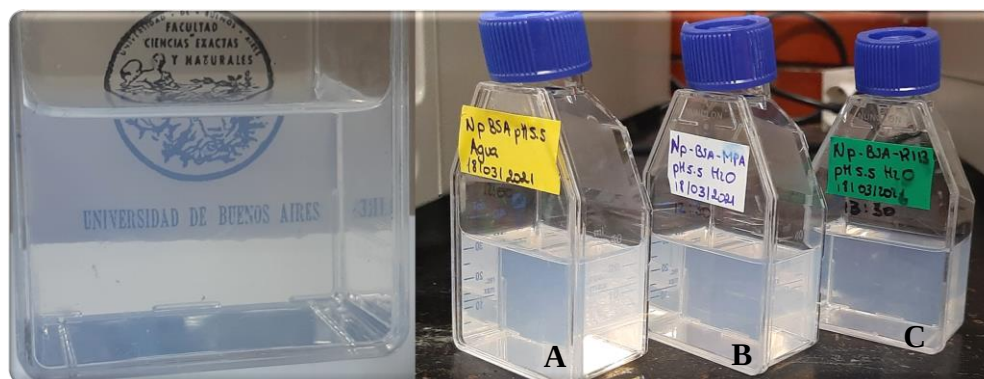


Figura II.5 Suspensión coloidal de NP-BSA

Se muestra el aspecto macroscópico de la suspensión con NP-BSA habiendo determinado las condiciones de trabajo. **A)** NP-BSA, **B)** NP-BSA-MPA y **C)** NP-BSA-RBV.

II.4.3 TAMAÑO DE PARTÍCULA, PDI Y POT- ζ

Los datos de la distribución de tamaño de partícula para las distintas suspensiones se encuentran representados en la **Figura II.6**. En la **Tabla II.1** se muestran los resultados detallados de las NP-BSA con y sin PA aisladas y purificadas. Las NP-BSA sin PA presentaron un $Z\text{-Ave} = 139,1 \pm 0,95$ nm y las NP con PA de $Z\text{-Ave} = 78,75 \pm 0,73$ nm en promedio.

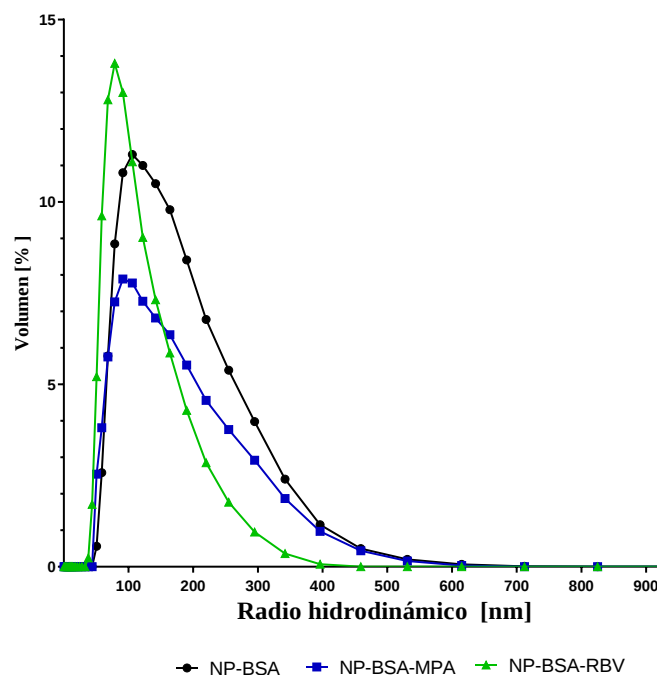


Figura II.6 Radio hidrodinámico de las NP-BSA. Distribución de tamaño de partícula NP-BSA. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de tres lotes independientes de NP.

Tabla II.1 Propiedades y dimensiones de las NP-BSA

Muestras	Z-ave* (nm)	PdI	Pot- ζ^* (mV)
NP-BSA	139,1 $\pm$ 0,95	0,243	-17,54 $\pm$ 0,60
NP-BSA-MPA	86,7 $\pm$ 0,59 ^a	0,270	-16,97 $\pm$ 0,45
NP-BSA-RBV	70,81 $\pm$ 0,86 ^a	0,289	-17,17 $\pm$ 0,65

* valores corresponden la media $\pm$ DE, distintos lotes de NP, n=3, a= *p<0,05

¹ Para facilitar la lectura se creó un Código de colores: NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV

II.4.4 ESTABILIDAD EN EL TIEMPO Y ANTE CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Se determinaron los parámetros Z-ave y pot- ζ de las NP-BSA con o sin PA luego de distintas condiciones de almacenamiento (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Se realizó el análisis de la suspensión coloidal, observándose una distribución monomodal con valores de Z-ave = $142,33 \pm 1,54$ nm, y pot- ζ = $-7,27 \pm 0,80$ mV en promedio. Las siguientes mediciones se realizaron sobre las NP luego del paso de aislamiento y purificación. Estas suspensiones presentaron una distribución monomodal con valores de Z-ave = $98,67 \pm 0,80$ nm y un pot- ζ = $-17,27 \pm 0,75$ mV en promedio. Por otro lado, debido a la presencia del PA en las NP-BSA, se analizó la influencia sobre el tamaño de partícula luego de someterlas a un proceso de congelación y descongelación, obteniéndose valores de Z-ave = $108,70 \pm 1,28$ nm y un pot- ζ = $-19,88$ mV en promedio. Estos resultados permiten demostrar que tanto el proceso de centrifugación y los ciclos de congelación y descongelación no alteran de manera deletérea el tamaño de las NP-BSA.

Tabla II. Análisis de estabilidad de las NP-BSA

TRATAMIENTO	Muestra	Z-ave* (nm)	PdI	Pot- ζ * (mV)
<i>Suspensión coloidal</i>	NP-BSA	$155,5 \pm 1,30^a$	0,171	$-6,25 \pm 1,05$
	NP-BSA-MPA	$152,4 \pm 1,59^a$	0,215	$-7,56 \pm 0,47$
	NP-BSA-RBV	$120,4 \pm 1,74^b$	0,156	$-8,00 \pm 0,89$
<i>NP-BSA</i>	NP-BSA	$139,1 \pm 0,95^a$	0,230	$-17,54 \pm 0,60$
	NP-BSA-MPA	$86,7 \pm 0,59^b$	0,270	$-16,97 \pm 0,45$
	NP-BSA-RBV	$70,81 \pm 0,86^b$	0,289	$-17,17 \pm 0,65$
<i>NP-BSA (congeladas/descongeladas)</i>	NP-BSA	$131,3 \pm 1,95^a$	0,366	$-20,78 \pm 0,16$
	NP-BSA-MPA	$101,9 \pm 0,72^b$	0,182	$-17,83 \pm 0,32$
	NP-BSA-RBV	$92,91 \pm 1,16^b$	0,219	$-21,03 \pm 0,40$
<i>NP-BSA Polvo (liofilizado)</i>	NP-BSA	$90,65 \pm 5,28^a$	0,402	$-6,51 \pm 0,25$
	NP-BSA-MPA	$72,45 \pm 0,78^b$	0,493	$-12,6 \pm 0,36$
	NP-BSA-RBV	$71,29 \pm 2,69^b$	0,608	$-6,62 \pm 2,05$
<i>NP-BSA almacenadas -80 °C (3 meses)</i>	NP-BSA	$142,2 \pm 9,17^a$	0,586	$-5,99 \pm 0,45$
	NP-BSA-MPA	$104,9 \pm 3,56^b$	0,612	$-6,8 \pm 0,93$
	NP-BSA-RBV	$96,72 \pm 2,69^b$	0,442	$-6,8 \pm 0,53$
<i>Suspensión coloidal Almacenado 25 °C (3 meses)</i>	NP-BSA	$255,4 \pm 2,2^a$	0,408	$-14,88 \pm 6,10$
	NP-BSA-MPA	$207,5 \pm 4,4^b$	0,243	$-9,05 \pm 0,71$
	NP-BSA-RBV	$238,7 \pm 5,6^b$	0,395	$-9,21 \pm 0,18$
<i>NP-BSA Almacenadas 25°C (3 meses)</i>	NP-BSA	$154,8 \pm 3,2^a$	0,374	$-15,8 \pm 1,83$
	NP-BSA-MPA	$124,7 \pm 8,2^b$	0,245	$-21,43 \pm 0,68$
	NP-BSA-RBV	$139,4 \pm 0,9^b$	0,277	$-17,53 \pm 1,59$

* Valores del promedio $\pm$ DE distintos lotes de NP, n=6. Letras diferentes indican diferencias significativas p<0,05

Se evaluó también la influencia del secado al vacío las NP-BSA, obteniéndose $Z\text{-ave} = 78,1 \pm 2,9$ nm, sin embargo, se evidenció un incremento en el Pdl y un decrecimiento en el valor del $\text{pot-}\zeta = -8,57$. Las muestras almacenadas por tres meses a 25°C fueron analizadas en función de los mismos parámetros a fin de evaluar la estabilidad en función del tiempo y la temperatura de almacenaje. En los casos de la suspensión coloidal y las NP-BSA aisladas y purificadas, se observó un crecimiento del tamaño de partícula y pérdida de la monodispersión. Por otro lado, las NP-BSA congeladas a -80°C , mostraron un crecimiento mínimo comparadas con las iniciales, sin embargo, el Pdl incrementó y el $\text{pot-}\zeta$ decreció.

II.4.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La MEB es una herramienta muy útil para observar cambios morfológicos de los sistemas preparados, así como de las superficies luego del aislamiento y purificación. Las NP-BSA que se muestran en la **Figura II.7**, muestran una forma esférica definida con porosidades, con límites claros y sin fracturas. La imagen **(A)** corresponde a las NP-BSA sin PA con $Z\text{-ave} = 74,00 \pm 2,00$ nm, y como se ve representado en su histograma de color negro, la distribución es monomodal. La imagen **(B)** corresponde a las NP-BSA-MPA, con un $Z\text{-ave} = 59,00 \pm 8$ nm y el histograma de color azul confirmó la monodispersión de la muestra. La microscopía **(C)** muestra las NP-BSA-RBV, con un $Z\text{-ave} = 56,00 \pm 10$ nm, su correspondiente histograma en color verde evidenció una población tendiente a la bimodalidad.

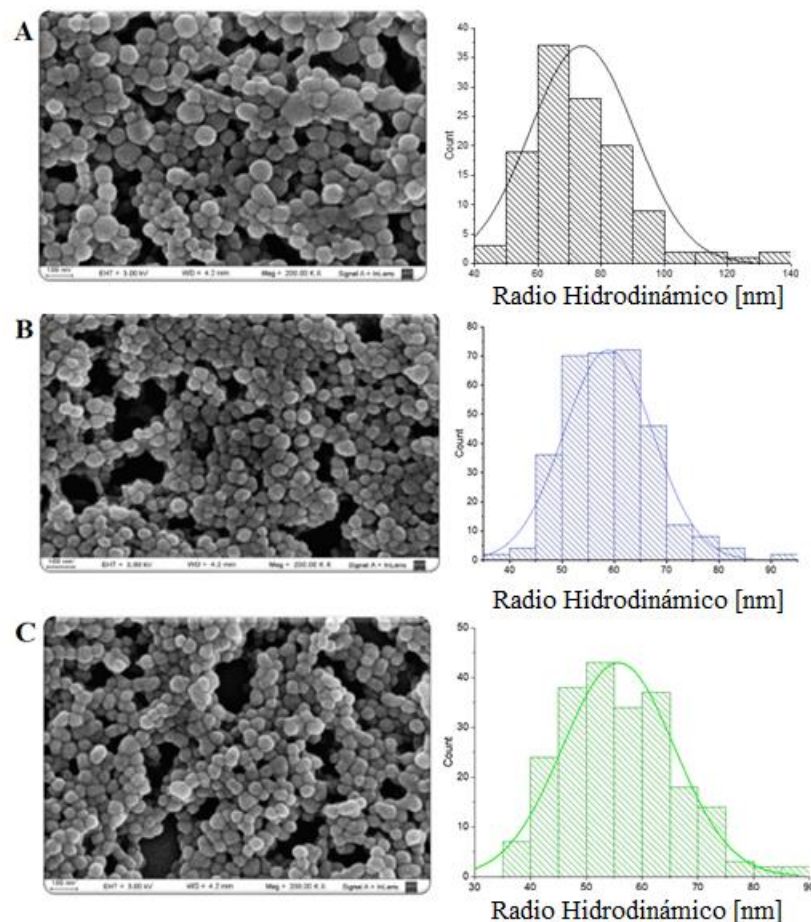


Figura II.7 Imágenes MEB de las NP-BSA

A), NP-BSA sin PA, B), NP-BSA-MPA, C) NP-BSA-RBV. Los histogramas mostrados corresponden a cada una las distribuciones de tamaño de las micrografías respectivas. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de tres lotes independientes de NP-BSA.

Estos resultados concuerdan con los previamente obtenidos por DLS (**Figura II.6** y **Tabla II.1**) demostrando que los distintos procesos empleados para el aislamiento y purificación no provocaron fracturas ni alteraron las estructuras de las NP-BSA.

II.4.6 E_fE

Luego de la degradación de las NP-BSA con tripsina, la masa de PA encapsulado se determinó por espectroscopía de fluorescencia en el sobrenadante de la reacción de degradación. Los valores de carga de MPA obtenidos resultaron $E_{fE} = 10,45 \pm 1,24$ % (**Figura II.8**) y para RBV la E_{fE} promedio fue de $20,08 \pm 0,53$ % (**Figura II.9**).

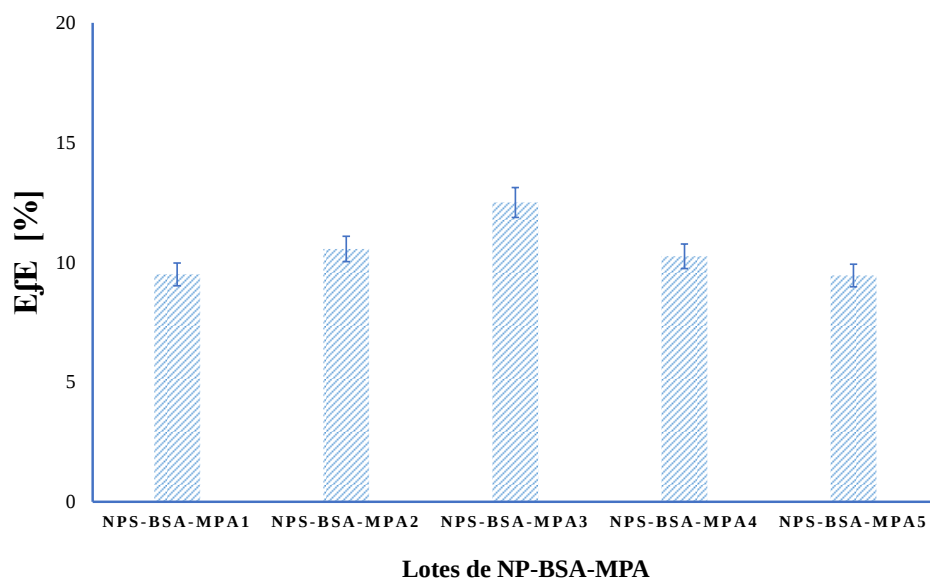


Figura II.8 Cuantificación de la E_{fE} encapsulación MPA.

Los números representa a los distintos lotes de NP usadas para determinar la E_{fE} . Los resultados mostrados corresponden al promedio $\pm$ DE de cinco lotes de NP-BSA-MPA independientes.

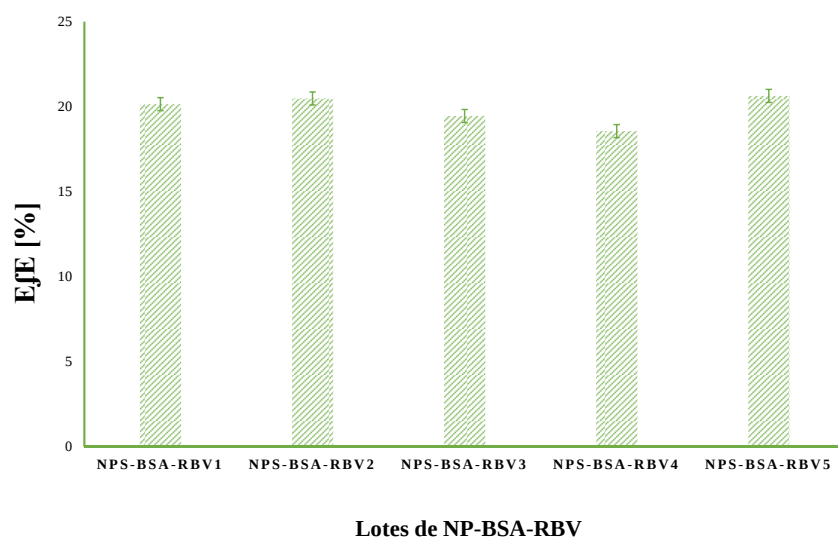


Figura II.9 Cuantificación de la E_{fE} encapsulación RBV.

Los números representa a los distintos lotes de NP usadas para determinar la E_{fE} . Los resultados mostrados corresponden al promedio $\pm$ DE de cinco lotes de NP-BSA-MPA independientes.

II.4.7 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Basados en la experiencia del capítulo I, se inició la evaluación de los PA en su forma libre y posteriormente con las NP-BSA con los distintos PA. Se evaluó el efecto del MPA y la RBV como antivirales de amplio espectro, utilizando cultivos infectados con los virus ZIKV, JUNV, HSV-1 y VSV. Cabe mencionar que se volvió a evaluar el efecto de MPA debido a que se realizó una nueva extracción del compuesto (**MM.1.4**).

II.4.7.1 VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar el efecto tóxico de los PA y de las NP-BSA sobre las células, se realizó el ensayo de viabilidad celular (MMT) luego de 48 h de tratamiento. Los resultados de la viabilidad celular se encuentran resumidos en la **Tabla II.3** para los PA libres y en la **Tabla II.4** para las NP-BSA con y sin PA.

Tabla II.3 Citotoxicidad de los PA libres

LÍNEA CELULAR	CC ₅₀ * MPA		CC ₅₀ * RVB	
	μM	mg/mL	μM	mg/mL
VERO	> 500	0,16 ± 0,46	>400	0,09 ± 0,32
A549	> 500	0,16 ± 0,46	>400	0,09 ± 0,32
HUH-7	> 500	0,16 ± 0,46	>400	0,09 ± 0,32

*Concentración citotóxica 50 (CC₅₀). Valores del promedio ± DE, n=3

Tabla II.4 Determinación de la citotoxicidad en función del tiempo de tratamiento en la línea celular A549

Tiempo (h)	NP	CC ₅₀ * (mg/mL)
24	NP-BSA	801,05 ± 10,52
	NP-BSA-MPA	564,63 ± 12,56
	NP-BSA-RBV	313,89 ± 10,32
48	NP-BSA	812,10 ± 10,25
	NP-BSA-MPA	582,64 ± 11,65
	NP-BSA-RBV	305,28 ± 10,84
72	NP-BSA	866,45 ± 12,76
	NP-BSA-MPA	531,20 ± 10,69
	NP-BSA-RBV	372,13 ± 11,24
96	NP-BSA	846,02 ± 10,46
	NP-BSA-MPA	577,10 ± 11,56
	NP-BSA-RBV	393,03 ± 10,69

* Valores del promedio ± DE, n=2

A modo ilustrativo, se muestran las monocapas de células A549 luego de 48 h de tratamiento con distintas concentraciones de NP-BSA con y sin PA, permitiéndose visualizar el comportamiento en suspensión de las NP-BSA y los efectos inducidos sobre la morfología de las células. Como se observa en la **Figura II.10** el tratamiento con NP-BSA sin PA no mostró citotoxicidad en ninguna de las concentraciones evaluadas. La monocapa permaneció confluyente e íntegra, sin orificios o cambios en la morfología de las células. En la concentración mayor de NP-BSA evaluada se observó la presencia de estructuras aglomeradas que reflejan la luz como cristales que no generaron un efecto tóxico sobre la monocapa tanto a nivel de viabilidad celular como morfológico.

La presencia de cristales en los sobrenadantes, fue un efecto del exceso de masa de NP-BSA. El mismo comportamiento se observó en la máxima concentración de las NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB. En el caso de las monocapas tratadas con las NP-BSA-MPA, se observó una disminución del número de células viables en función de la concentración, demostrando el efecto citostático del MPA. Sin embargo, la viabilidad celular fue superior al 50% aún en la máxima concentración evaluada. Además, la monocapa mantuvo su confluencia y no se observó desprendimiento celular (**Figura II.11**).

El efecto dosis respuesta fue directamente proporcional, a mayor concentración de NP-BSA-MPA menor número de células metabólicamente activas. En el caso de las NP-BSA-RBV, la reducción de la señal de viabilidad sí estuvo asociada a muerte celular en los cultivos tratados, el nivel de citotoxicidad observado estuvo en función de la concentración del PA en el cultivo, como se muestra en la **Figura II.12**. En base a los resultados obtenidos luego de 48 h de tratamiento, se extendió el estudio por distintos períodos de tiempo. Con estos resultados fue posible determinar la CC_{50} para las distintas NP-BSA (**Tabla II.4**). Los resultados demostraron que las NP-BSA con y sin PA no fueron tóxicas para los cultivos en las concentraciones y tiempos evaluada (2 mg/mL a 0,02 mg/mL). Los valores de CC_{50} se ubicaron en rangos superiores a los de los PA en su forma libre.

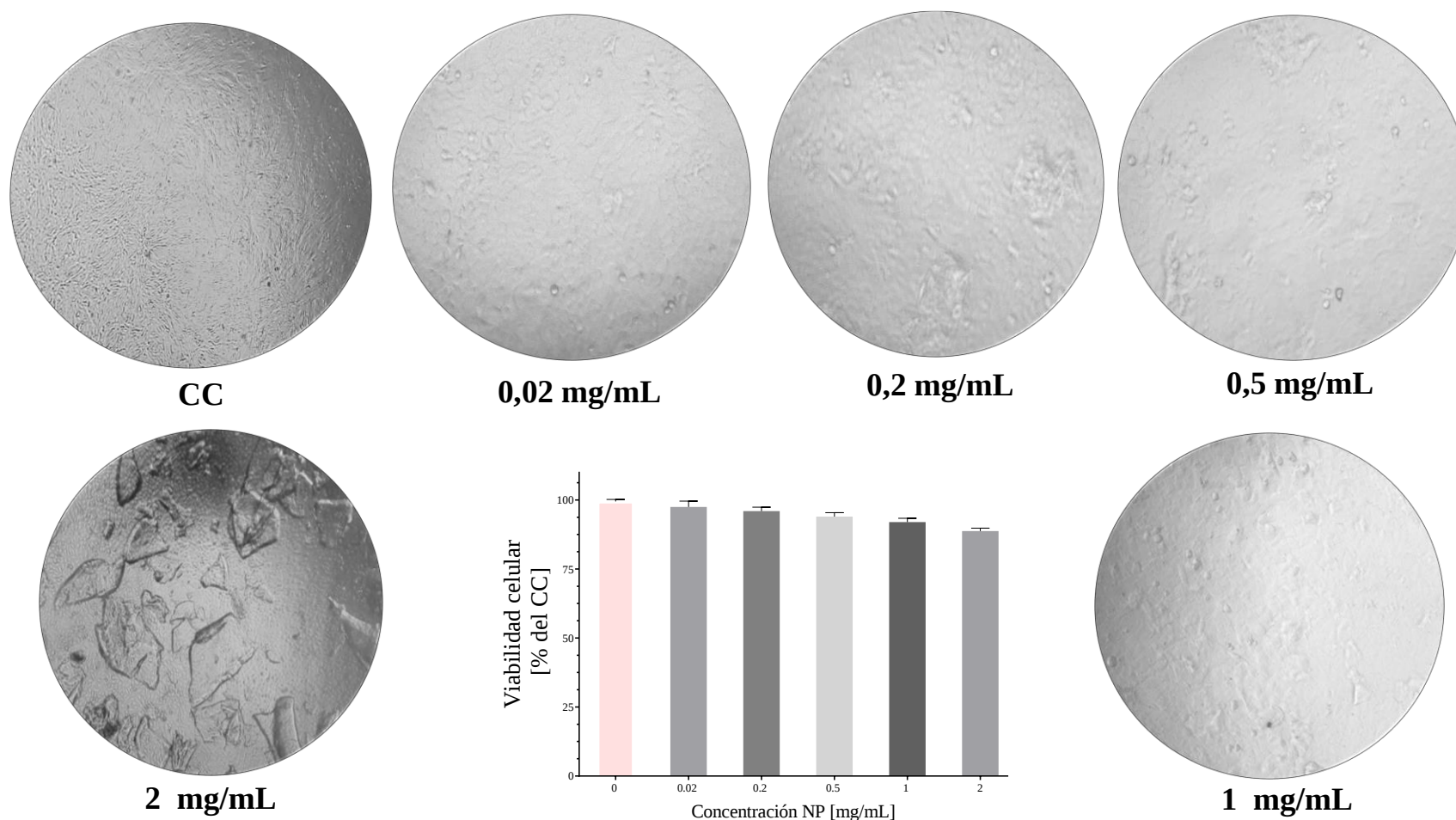


Figura II.10 Citotoxicidad de las NP-BSA sin PA 48 h post-tratamiento

Imágenes de microscopía óptica de los cultivos celulares y resultados de la cuantificación de la viabilidad celular de A549, 48 h post-tratamiento distintas concentraciones de NP-BSA sin PA. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes.

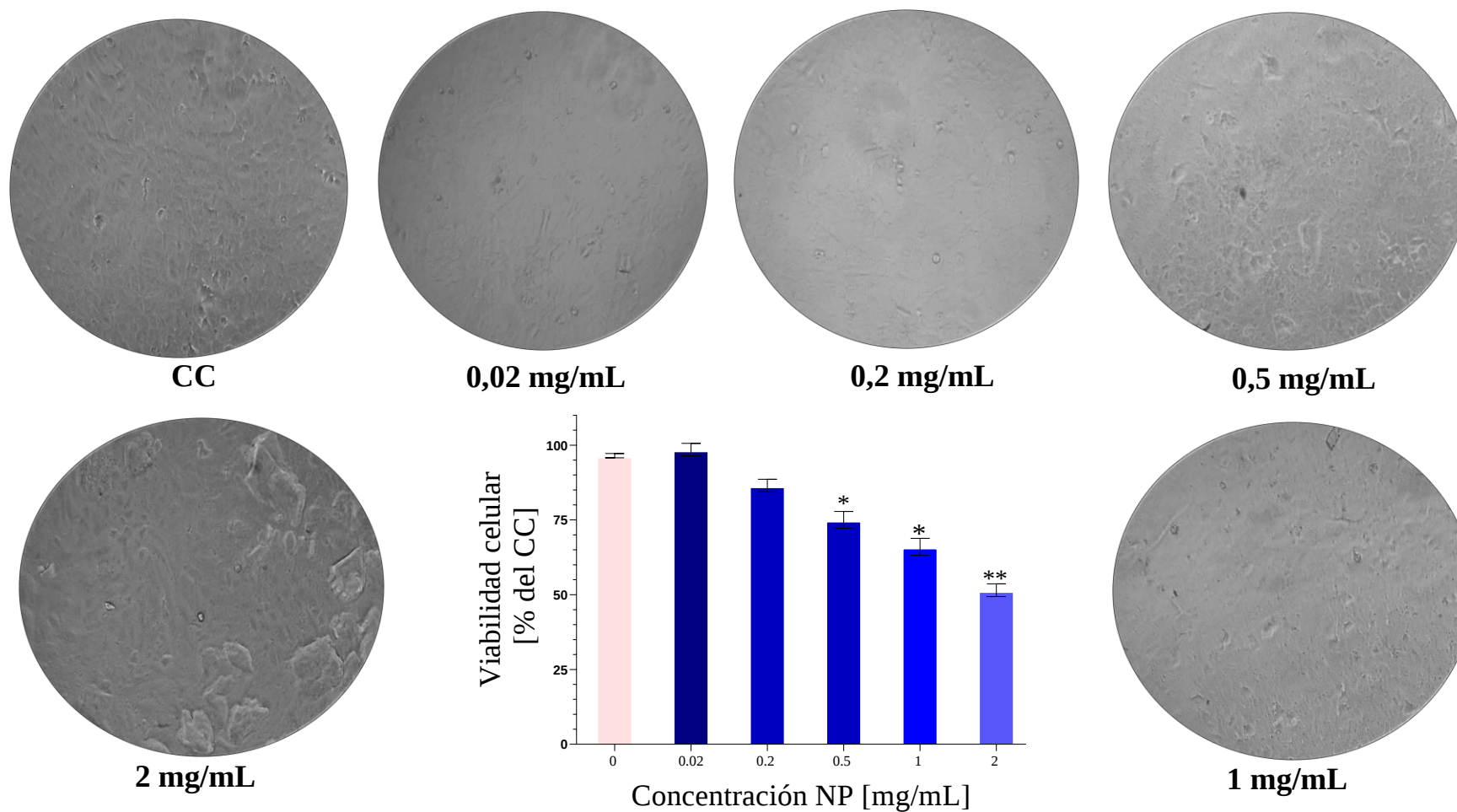


Figura II.11 Evaluación citotóxica de las NP-BSA-MPA

Imágenes de microscopía óptica de los cultivos y resultados de la cuantificación de viabilidad celular de A549, 48 h post-tratamiento con distintas concentraciones de NP-BSA-MPA. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes.

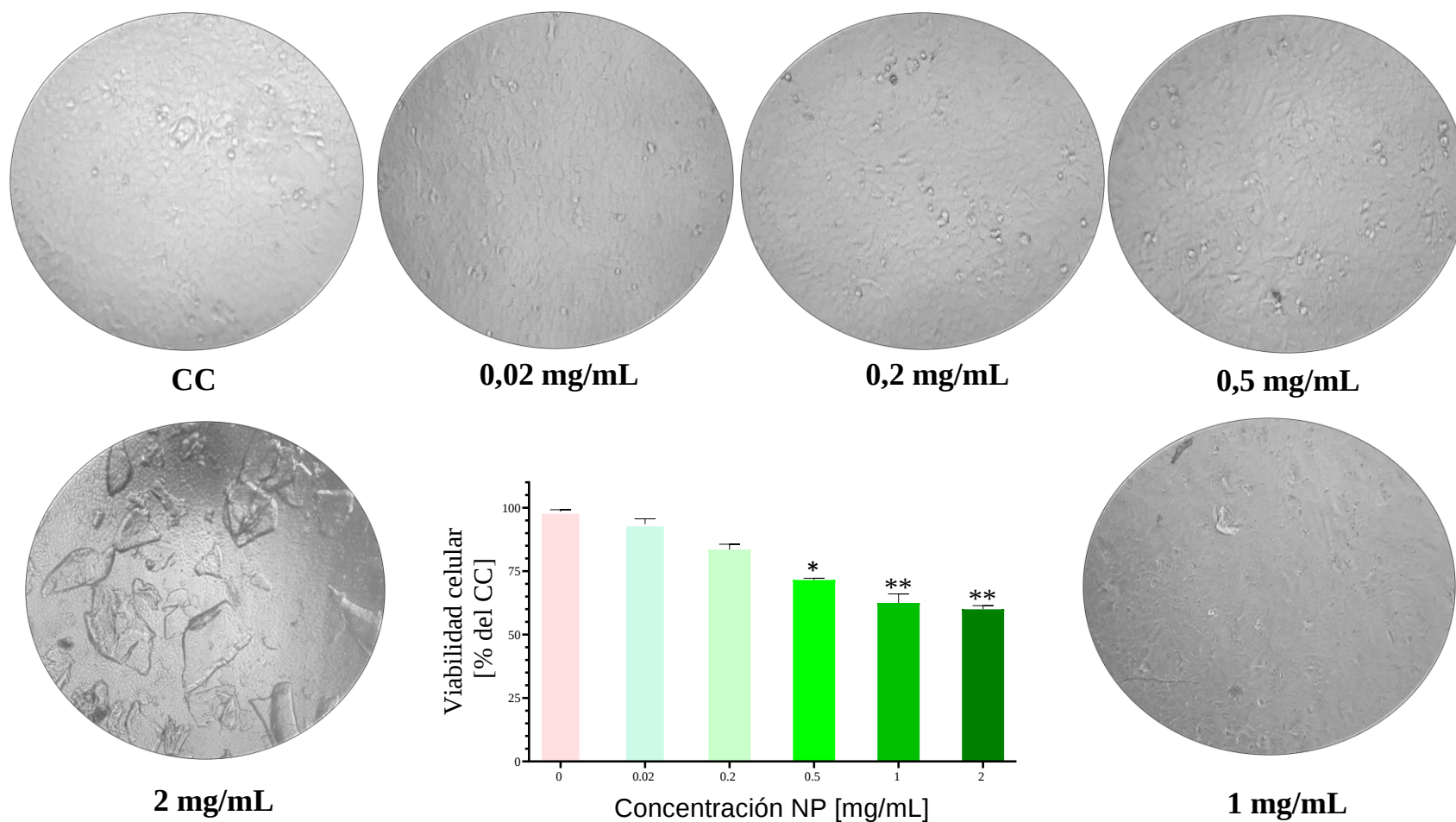


Figura II.12 Evaluación citotóxica de las NP-BSA-RBV

Imágenes de microscopía óptica de los cultivos y resultados de la cuantificación de viabilidad celular de A549, 48 h post-tratamiento con distintas concentraciones de NP-BSA-RVB. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes.

II.4.7.2 EFECTO ANTIVIRAL

A continuación, se evaluó la actividad antiviral de las distintas NP-BSA en ensayos de inhibición del rendimiento viral contra los virus ZIKV cepa Puerto Rico y JUNV cepa IV4454, utilizando concentraciones menores a las correspondientes CC_{50} por períodos de 48 h. Como controles se incluyeron cultivos infectados y tratados con los PA libres, cultivos infectados no tratados (CV) y cultivos no infectados ni tratados (CC). Se analizó también si existe influencia del tipo de célula hospedadora sobre la acción inhibitoria de las NP-BSA. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

II.4.7.2.1 EFECTO INHIBITORIO DE MPA Y RBV EN DISTINTOS TIPOS CELULARES

Inicialmente se evaluó la actividad antiviral de los PA libres contra ZIKV y JUNV a las 48 h p.i. en distintas líneas celulares. Como se muestra en la **Tabla II.5** el MPA mostró efecto antiviral contra ambos virus en las tres líneas celulares evaluadas a bajas concentraciones, resultando en altos índices de selectividad. Las CI_{50} fueron similares para ambos virus en cada línea celular, mostrando el mayor efecto en la línea hepática Huh-7. En el caso de RBV (**Tabla II.6**), si bien resultó activa contra ambos virus, se observó un efecto antiviral mayor contra ZIKV dado que se obtuvieron CI_{50} menores en todos los tipos celulares, los cuales se tradujeron en mayores IS. Se obtuvieron resultados de inhibición similares con ambos PA en el caso de ZIKV, pero en el caso de JUNV, el MPA resultó mucho más activo que la RVB.

Tabla II.5 Actividad antiviral de MPA contra ZIKV y JUNV

Línea celular	ZIKV			JUNV		
	CI_{50}^*		IS	CI_{50}^*		IS
	μM	mg/mL		μM	mg/mL	
Vero	$0,92 \pm 0,26$	$294,71 \pm 1,25$	545	$0,65 \pm 0,12$	$208,22 \pm 2,12$	770
A549	$0,89 \pm 0,03$	$285,10 \pm 5,63$	562	$0,5 \pm 0,02$	$160,17 \pm 40,21$	1000
Huh-7	$0,50 \pm 1,64$	$160,17 \pm 5,26$	1001	$0,39 \pm 0,01$	$124,93 \pm 2,01$	1291

*Valores del promedio $\pm$ DE, n=3

Tabla II.6 Actividad antiviral de RVB contra ZIKV y JUNV

Línea celular	ZIKV			JUNV		
	CI ₅₀ *		IS	CI ₅₀ *		IS
	μM	mg/mL		μM	mg/mL	
Vero	1,25 ± 0,23	306,25 ± 2,68	320	31,93±9,52	7822,85 ± 951,52	12,53
A549	0,48 ± 0,03	117,62 ± 1,56	838	26,01 ± 1,95	6372,45 ± 955,05	15,38
Huh-7	0,38 ± 0,61	93,13 ± 2,56	1054	18,87 ± 5,07	4623,15 ± 572,26	21,2

*Valores del promedio ± DE, n=3

II.4.7.2.2 EFECTO INHIBITORIO DE LAS NP-BSA CON PA EN DISTINTOS TIPOS CELULARES

En base a los resultados de actividad antiviral obtenidos para los PA libres, se determinó la concentración inhibitoria de las distintas NP-BSA en ensayos de inhibición del rendimiento viral a las 48 h, utilizando distintas líneas celulares. Las NP-BSA sin PA no ejercieron efecto antiviral contra ninguno de los dos virus ensayados. La **Tabla II.7** resume los resultados obtenidos contra ZIKV en las tres líneas celulares ensayadas. Se observó un efecto antiviral dependiente del tipo celular ya que las NP-BSA resultaron más activas en los cultivos de Huh-7 que en Vero y A549, con CI₅₀ dos y tres órdenes de magnitud menor.

Tabla II.7 Actividad antiviral de las NP-BSA contra ZIKV

Línea celular	NP	CI ₅₀ *	
		mg/mL PA	ng/mL PA
Vero	NP-BSA	-	-
	NP-BSA-MPA	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,10
	NP-BSA-RBV	0,002 ± 0,001	0,83 ± 0,51
A549	NP-BSA	-	-
	NP-BSA-MPA	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,002
	NP-BSA-RBV	0,039 ± 0,013	8,44 ± 10,25
Huh-7	NP-BSA	-	-
	NP-BSA-MPA	0,00089 ± 0,0012	0,000003 ± 0,000001
	NP-BSA-RBV	0,000038 ± 0,00005	0,11 ± 0,15

* Valores del promedio ± DE, n=3

En el caso de las infecciones con JUNV (**Tabla II.8**), los mejores resultados de actividad antiviral se determinaron en los cultivos de A549 para las NP-BSA-MPA, obteniéndose valores de CI₅₀ siete órdenes de magnitud menor que en las células Huh-7. Sorprendentemente, para las NP-BSA-MPA se obtuvo una CI₅₀ cercana a la del MPA libre. En cuanto a las NP-BSA-RVB, el mayor efecto antiviral

se determinó en las células Huh-7, pero un orden de magnitud mayor que en el caso de ZIKV. Para todos los casos, el efecto antiviral de los PA fue superior cuando se encontraron en las NP-BSA que en su versión libre. Cabe aclarar que las concentraciones expresadas en las tablas 7 y 8 corresponden al PA contenido en la masa de NP-BSA.

Tabla II.8 Actividad antiviral de las NP-BSA contra JUNV

Línea celular	NP	CI ₅₀ *	
		mg/mL PA	ng/mL PA
A549	NP-BSA	-	-
	NP-BSA-MPA	0,000000078 ± 0,031	0,078 ± 0,031
	NP-BSA-RBV	0,033 ± 0,02	4,80 ± 2,23
Huh-7	NP-BSA	-	-
	NP-BSA-MPA	10,73 ± 7,09	644,163 ± 425,36
	NP-BSA-RBV	0,00017 ± 0,0002	0,036 ± 0,04

* Valores del promedio ± DE, n=3

Los resultados de la **Tabla II.9**, muestran el IS de las NP-BSA y PA y corresponden a evaluaciones realizadas en células A549. El IS de las NP fue mayor al de los PA libres en todos los casos. Para el caso de ZIKV el IS de MPA es 20 veces mayor y 740 veces para RBV. En el caso de JUNV 10 veces mayor para MPA y 577 veces para RBV.

Tabla II.9 Comparación de los índices de selectividad (IS) de los PA

IS				
Virus	MPA		RBV	
	NP	PA	NP	PA
ZIKV	11653	562	7,46E+09	1000
JUNV	7828	838	9242	16

* Valores del promedio ± DE, n=3

II.4.7.3 CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

II.4.7.3.1 ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO: NP-BSA-MPA

Para evaluar la acción antiviral en función del tiempo de tratamiento se infectaron cultivos de células A549 con los virus ZIKA o JUNV y se trataron con distintas concentraciones de las NP-BSA con y sin PA, luego de 24, 48, 72 o 96 h se cuantificó el rendimiento viral por el método de placas. Como control se incluyó el tratamiento con una única concentración del PA libre. En el caso de las NP-BSA-MPA, los tratamientos empleados fueron de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de NP-BSA-MPA correspondiéndose con 60, 7,56 y 0,756 ng/mL de MPA, y 160,17 ng/mL en el caso del control de MPA libre.

Es muy importante tener en cuenta a la hora de analizar los resultados, que la concentración del MPA libre es casi tres veces mayor que la que se encuentra en la máxima concentración de NP-BSA-MPA y 200 veces mayor que la que se encuentra en la mínima concentración de NP-BSA-MPA. En el caso de los cultivos infectados con ZIKV (**Figura II.13**), el tratamiento con NP-BSA-MPA resultó significativamente más efectivo que el PA libre a las 24 h y en los tiempos sucesivos los niveles de inhibición viral entre PA libre y encapsulado se igualaron. Se observó que los niveles de inhibición aumentaron en función del tiempo de tratamiento alcanzándose valores similares al 99,9% a las 96 h p.i. Las diferencias observadas entre el tipo y el tiempo de tratamiento no resultaron significativas.

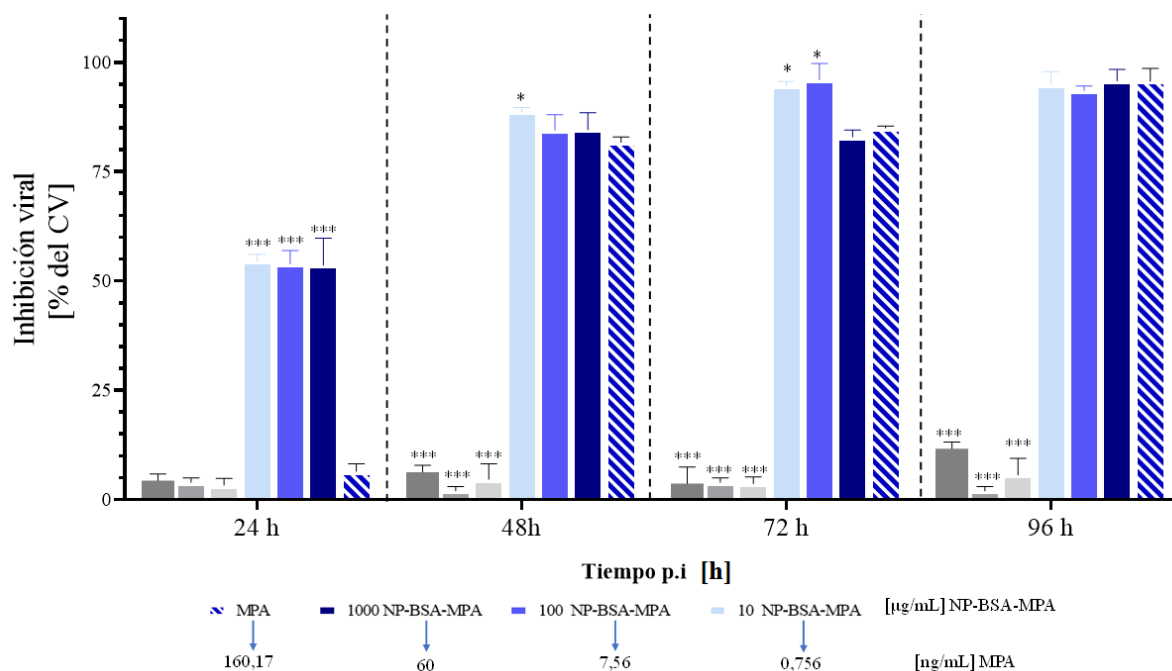


Figura II.13 Evaluación de la actividad antiviral de las NP-BSA-MPA contra ZIKV en función del tiempo. La cantidad de MPA contenida en las NP-BSA se expresa en ng/mL para su mejor comparación con el MPA libre. Las barras de color gris corresponden a las NP-BSA sin PA en las mismas concentraciones que se evaluaron las NP-BSA-MPA. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de cuatro experimentos independientes.

En cuanto a los cultivos infectados con JUNV (**Figura II.14**) se observó un comportamiento diferente. A tiempos cortos de tratamiento (24 y 48 h) el MPA libre produjo mayor inhibición que las NP-BSA-MPA, pero esas diferencias fueron significativas solo a las 24 h. A tiempos posteriores, (72 y 96 h) las NP-BSA-MPA produjeron mayor inhibición del rendimiento viral en todas las concentraciones evaluadas, aún en aquellas 200 veces menores a las del PA libre.

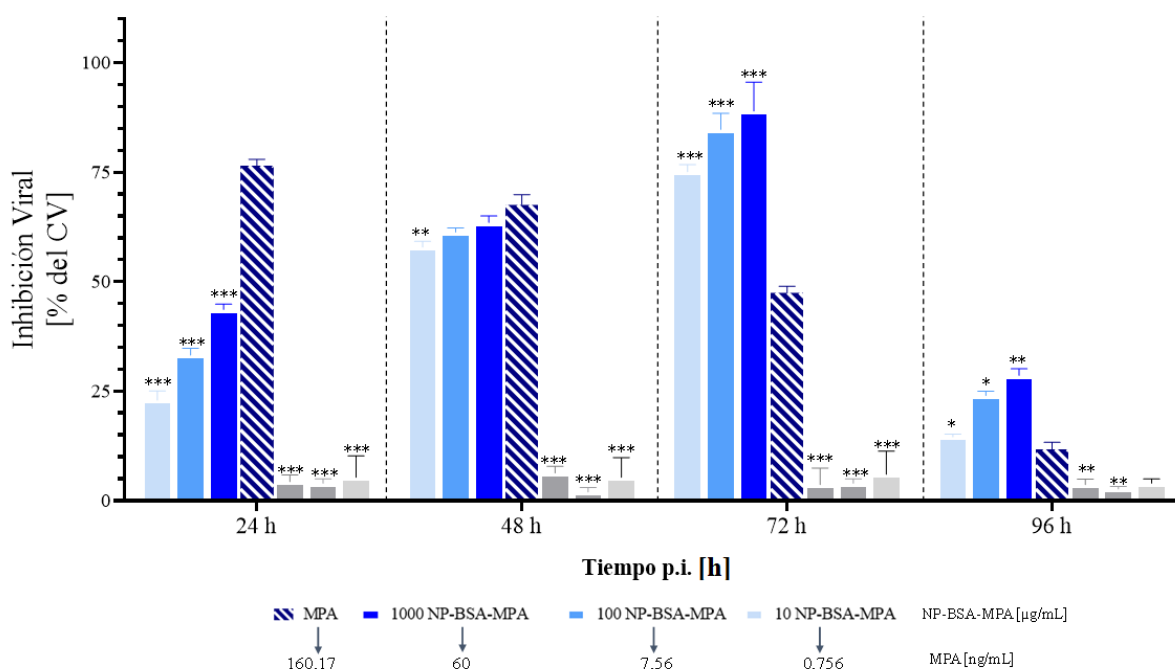


Figura II.14 Evaluación de la actividad antiviral de las NP-BSA-PA contra JUNV en función del tiempo

La cantidad de MPA contenida en las NP-BSA se expresa en ng/mL para su mejor comparación con el MPA libre. Las barras de color gris corresponden a las NP-BSA sin PA en las mismas concentraciones que se evaluaron las NP-BSA-MPA. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de cuatro experimentos independientes.

II.4.7.3.2 ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO: NP-BSA-RBV

De la misma manera, las células infectadas con ZIKV o JUNV fueron tratadas con 1000, 100 o 10 μ g/mL de masa de NP-BSA-RBV conteniendo 204, 51, y 5,1 ng/mL de RBV, respectivamente. En este caso, el control correspondiente a la droga libre correspondió a 490 ng/mL de RVB. También se incluyeron como control, distintas diluciones de las NP-BSA sin PA. En este caso, la concentración control de RVB libre es 100 veces mayor a la contenida en la menor concentración de NP-BSA-RBV y el doble de la más concentrada. En el caso de ZIKV (**Figura II.15**), el tratamiento con RVB libre mostró mayor nivel de inhibición que las NP-BSA-RVB, siendo significativamente diferentes en los tratamientos a las 24 y 48 h p.i. A tiempos más prolongados, el nivel de inhibición viral fue similar en todos los casos.

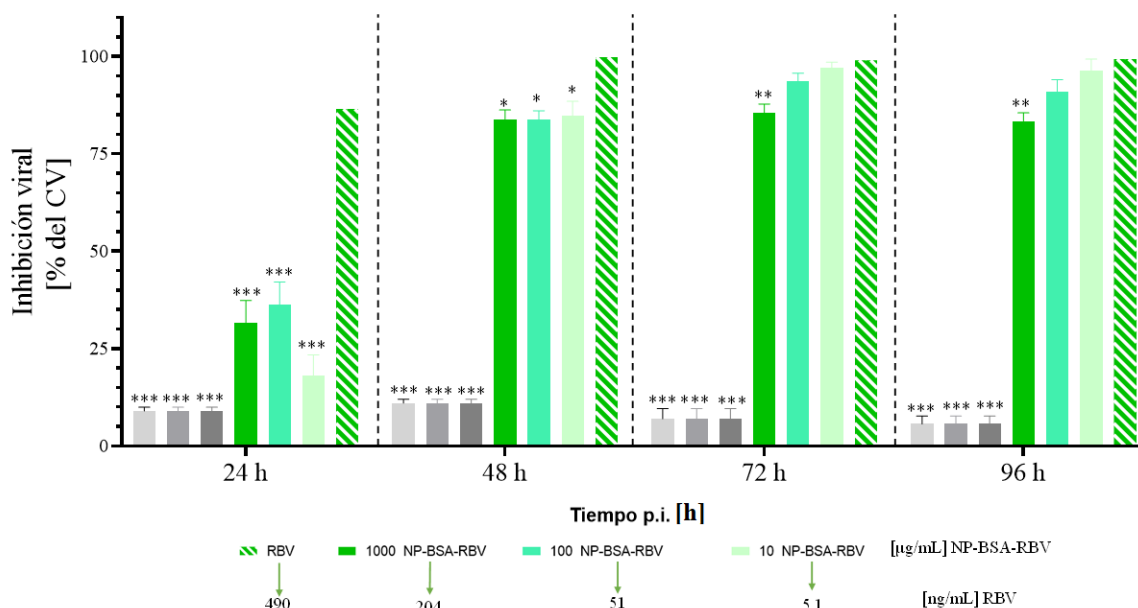


Figura II.15 Evaluación de las NP-BSA-RVB contra ZIKV en función del tiempo

Se evaluaron 3 concentraciones de NP-BSA con RVB. La cantidad de RVB contenida en las NP-BSA se expresa en ng/mL para su mejor comparación con la RVB libre. Las barras de color gris corresponden a las NP-BSA sin PA en las mismas concentraciones que se evaluaron las NP-BSA-RVB. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de cuatro experimentos independientes.

Por otro lado, al igual que con las NP-BSA-MPA, los cultivos infectados con JUNV (**Figura II.16**) mostraron otro comportamiento. Si bien a las 24 h de tratamiento no se observaron diferencias entre la RVB libre y la máxima concentración de NP-BSA-RVB, a partir de las 48 h los tratamientos con las NP-BSA-RVB mostraron niveles de inhibición significativamente mayores que el PA libre. Para todos los tratamientos, se observó un descenso del efecto inhibitorio en función del tiempo, de un 75% de inhibición viral determinado a las 24 h a un 25% luego de 96 h p.i. (**Figura II.16**). Como en los casos anteriores, el tratamiento con distintas concentraciones de NP-BSA sin PA no produjo la inhibición del rendimiento viral en ninguno de los tiempos evaluados.

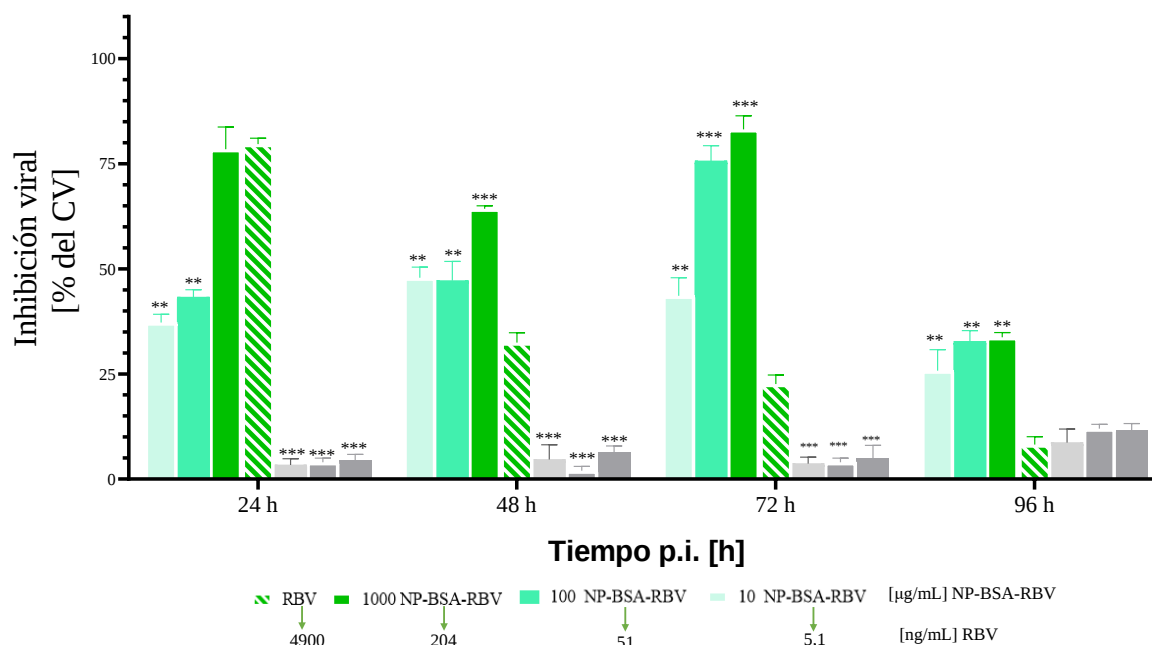


Figura II.16 Evaluación de las NP-BSA-RBV contra JUNV en función del tiempo

Se evaluaron tres concentraciones de NP-BSA con RBV. La cantidad de RBV contenida en las NP-BSA se expresa en ng/mL para su mejor comparación con la RBV libre. Las barras de color gris corresponden a las NP-BSA sin PA en las mismas concentraciones que se evaluaron las NP-BSA-RBV. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de cuatro experimentos independientes.

II.4.7.4 ACTIVIDAD VIRUCIDA DE LAS NP-BSA

A fin de descartar un efecto inactivante de las NP-BSA sobre los viriones, se evaluó la actividad virucida de las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV (1000 y 10 μ g/mL) sobre suspensiones de JUNV y ZIKV. Tanto para el caso de ZIKV como para JUNV no se detectó pérdida de infectividad viral luego de 2 h de incubación con las distintas NP-BSA.

II.4.7.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE CÉLULAS CON NP-BSA PREVIO A LA INFECCIÓN VIRAL

Como inicio del estudio del mecanismo de acción antiviral se evaluó, la inducción de un estado antiviral en las células, previo a la infección viral. Para ello se trataron células A549 con 2, 1 y 0,02 mg/mL de NP-BSA-MPA conteniendo 120, 60 y 1,2 ng/mL de MPA, respectivamente. Como control se incluyeron tratamientos con 160,17 ng/mL de MPA libre y 1 mg/mL de NP-BSA sin PA. En el caso de los cultivos pre-tratados e infectados con ZIKV (**Figura II.17**), el MPA en su forma libre no indujo efecto antiviral en ninguno de los tiempos de pretratamiento. En cambio, el tratamiento previo

a la infección con la máxima concentración de NP-BSA-MPA produjo un efecto inhibitorio del 50% a partir de las 8 h alcanzando el 95% de inhibición cuando los cultivos se trataron por 24 h.

II.4.7.5.1 NP-BSA-MPA

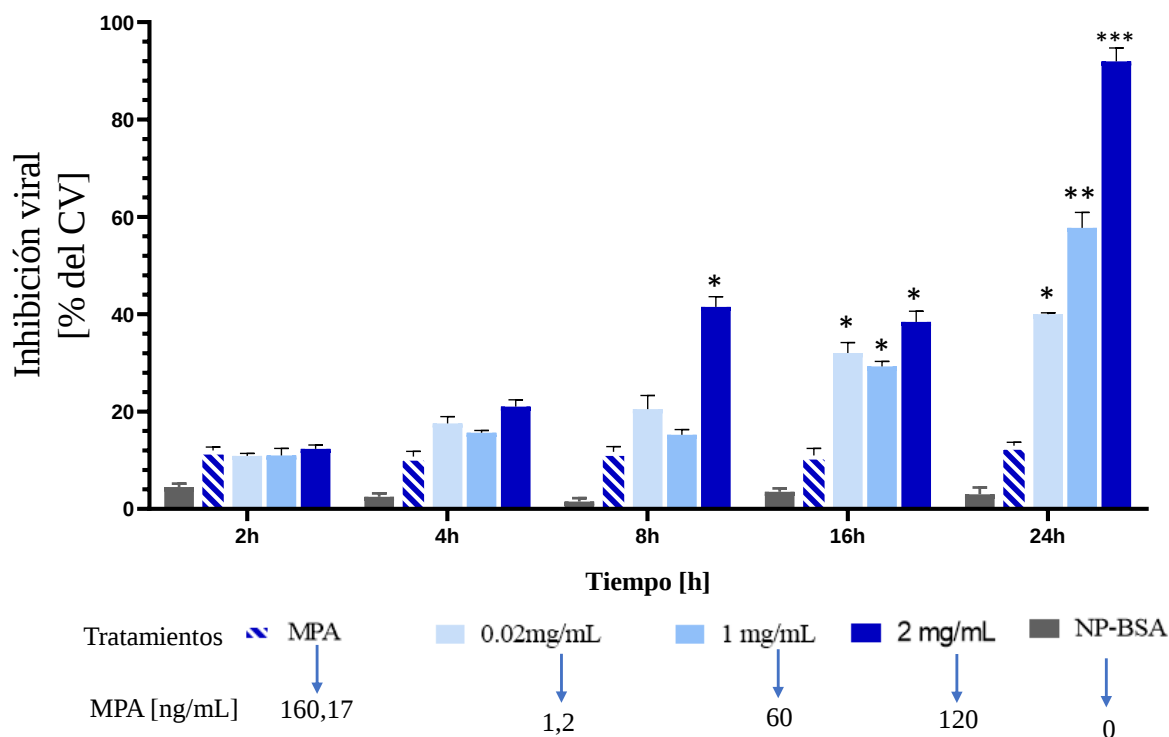


Figura II.17 Tratamiento de células A549 con NP-BSA-MPA previo a la infección con ZIKV. Las monocapas de células A549 fueron tratadas con distintas concentraciones de NP-BSA-MPA o MPA durante distintos tiempos a 37 °C, luego se removieron los sobrenadantes y se infectaron las células. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de cuatro experimentos independientes.

En el caso de JUNV (**Figura II.18**), el mejor efecto de inhibición con MPA se observó a las 2 h, cuando se trataron con 1 y 0,2 mg/mL NP-BSA-MPA produciendo un 15% de inhibición. A las 4 h esa inhibición se redujo al 50% hasta desaparecer en los tiempos más prolongados. En el caso del MPA, no se evidenció efecto antiviral en ninguno de los tiempos evaluados, así como tampoco para el tratamiento con 2 mg/mL de NP-BSA-MPA. Las NP-BSA sin PA no mostraron ningún efecto sobre el rendimiento viral de JUNV y ZIKV.

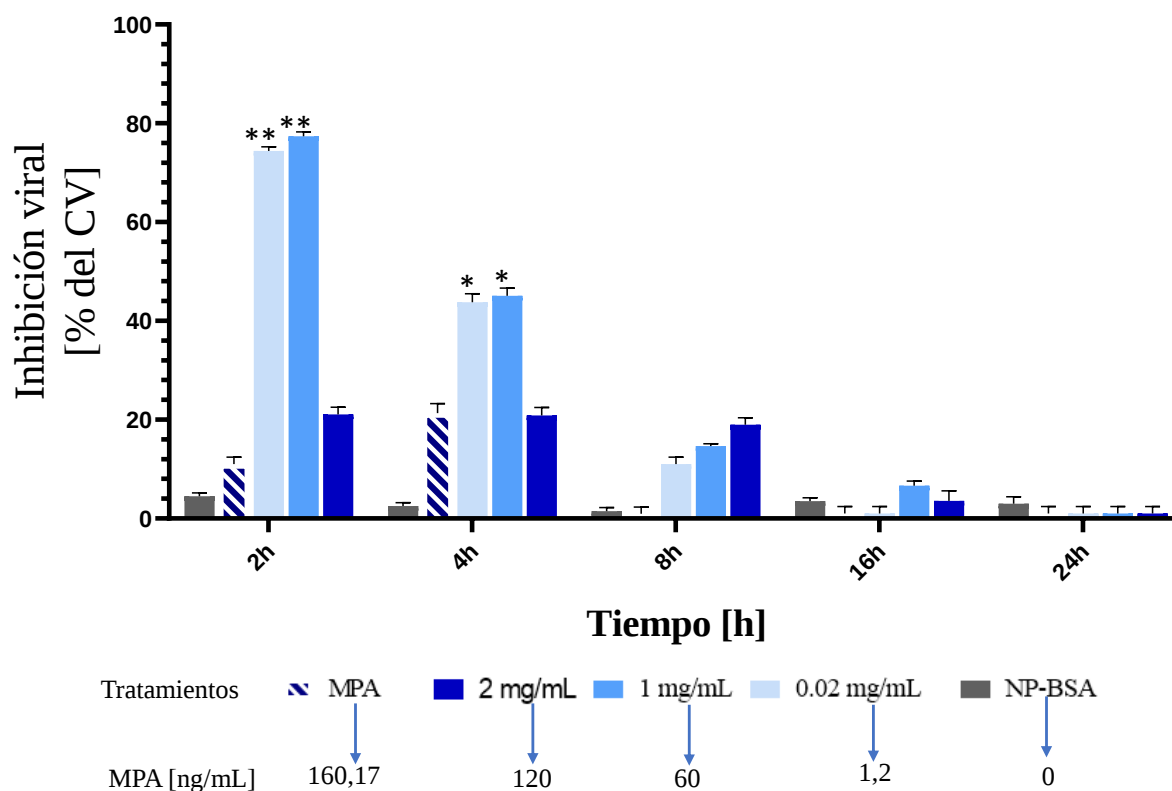


Figura II.18 Tratamiento de células A549 con NP-BSA-MPA previo a la infección con JUNV

Las monocapas de células A549 fueron incubadas con distintas concentraciones de NP-BSA-MPA o MPA durante distintos tiempos a 37 °C, se removió la droga y se infectó con JUNV. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de cuatro experimentos independientes.

Para el caso ZIKV con RBV libre, no se observó inhibición en ningunos de los tiempos evaluados (**Figura II.19**). Por el contrario, el tratamiento con distintas concentraciones de NP-BSA-RBV, mostró distintos niveles de inhibición de acuerdo a la concentración: 98% con 2 mg/mL y 50% para 1 mg/mL luego de 24 h de tratamiento previo a la infección. Finalmente, para las NP-BSA-RBV más diluidas de 0,02 mg/mL no se vio ningún efecto inhibitorio en los tiempos evaluados.

II.4.7.5.2 NP-BSA-RBV

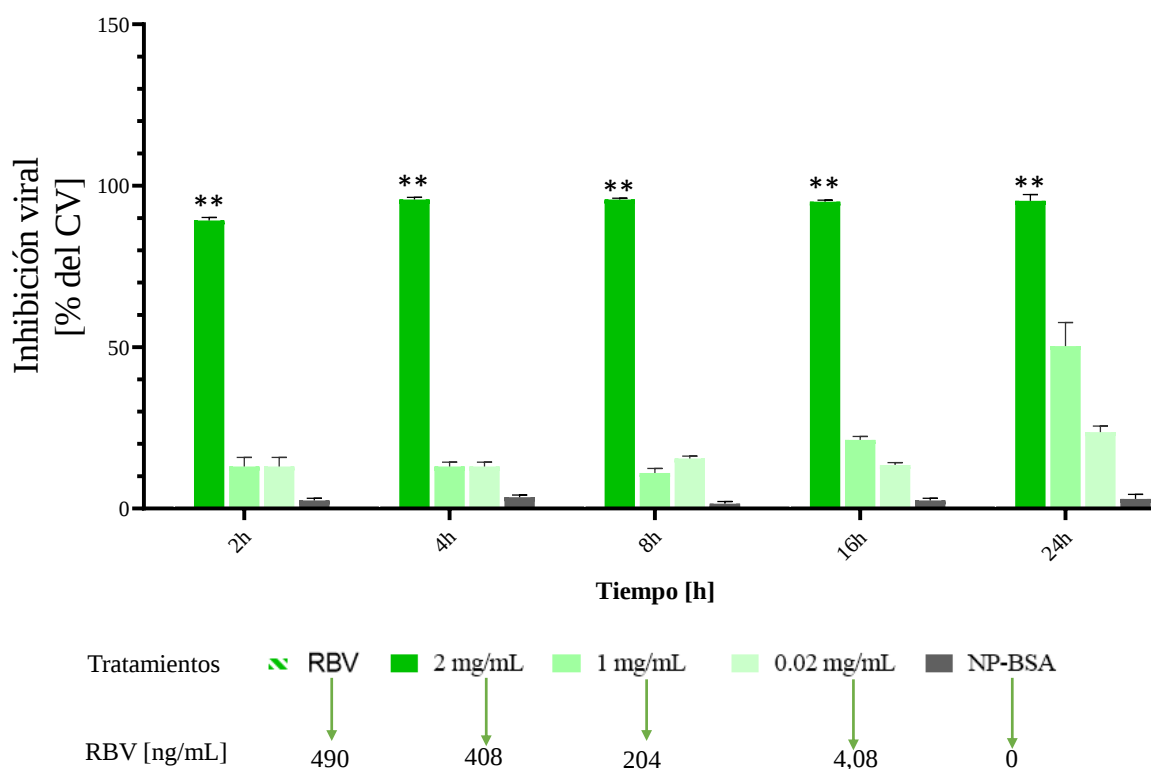


Figura II.19 Tratamiento de células A549 con NP-BSA-RBV previo a la infección con ZIKV
Las monocapas de células A549 fueron pre-incubadas con distintas concentraciones de NP-BSA-RBV o RBV durante distintos tiempos a 37 °C y luego se removieron los sobrenadantes y se infectó con ZIKV. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de cuatro experimentos independientes.

La **Figura II.20** muestra los resultados obtenidos con el tratamiento con las NP-BSA-RBV y la RBV libre previo a la infección viral. El tratamiento previo con la RBV libre produjo un 50% de inhibición viral en todos los tiempos evaluados. Para el caso de las NP-BSA-RBV, los niveles de inhibición fueron del 25% y fue inactivo con las NP-BSA sin PA.

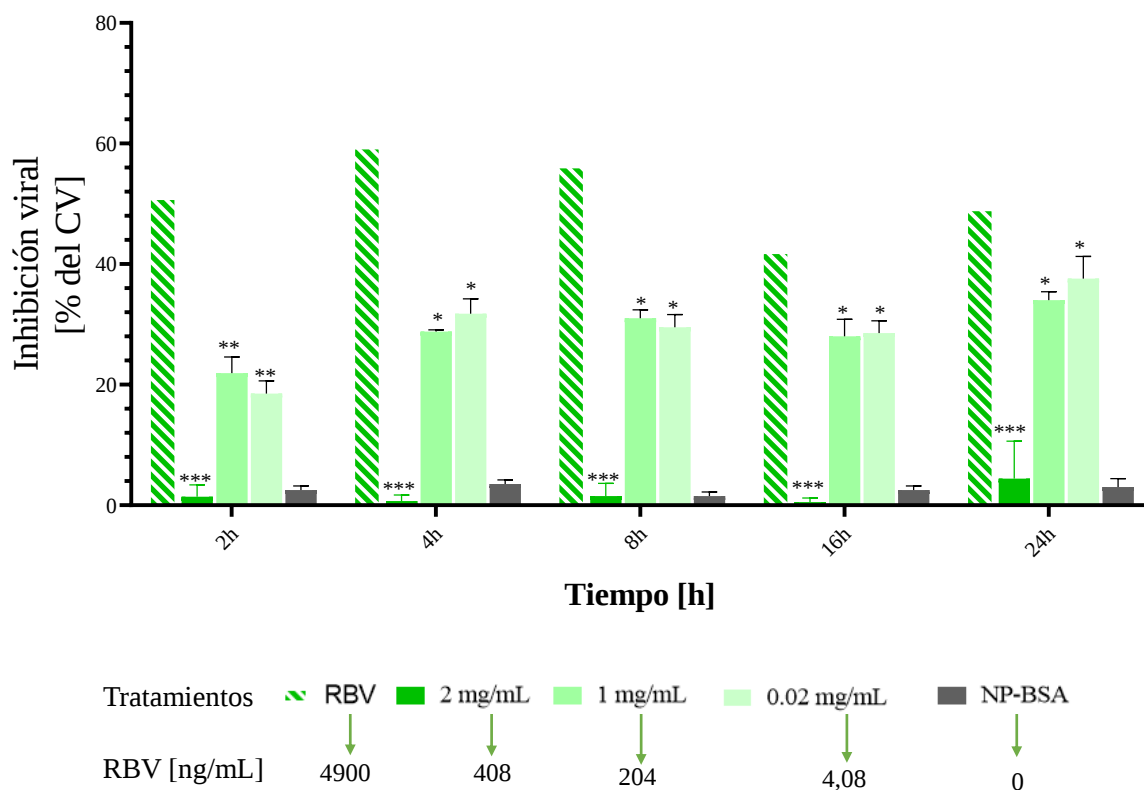


Figura II.20 Tratamiento de células A549 con NP-BSA-RBV previo a la infección con JUNV
Las monocapas de células A549 fueron tratadas con distintas concentraciones de NP-BSA-RBV durante distintos tiempos a 37 °C, se removieron los sobrenadantes y se infectó con JUNV. Los datos representados corresponden a la media $\pm$ DE de cuatro experimentos independientes.

II.4.7.6 TIEMPO DE ADICIÓN

Para tratar de localizar la etapa del ciclo de multiplicación viral sobre la que las NP-BSA ejercen la acción inhibitoria sobre los virus de genoma de RNA estudiados, se realizaron ensayos de tiempo de adición del tratamiento, evaluándose el rendimiento viral a las 24 h p.i. La infección de los cultivos fue sincronizada realizando la adsorción a 4 °C, luego de 1 h los cultivos se pasaron a 37 °C para permitir el inicio del ciclo viral dentro de la célula y se agregó 1 mg/mL del tratamiento a diferentes tiempos post-adsorción. El rendimiento de virus extracelular de todos los cultivos infectados se tituló a las 24 h p.i.

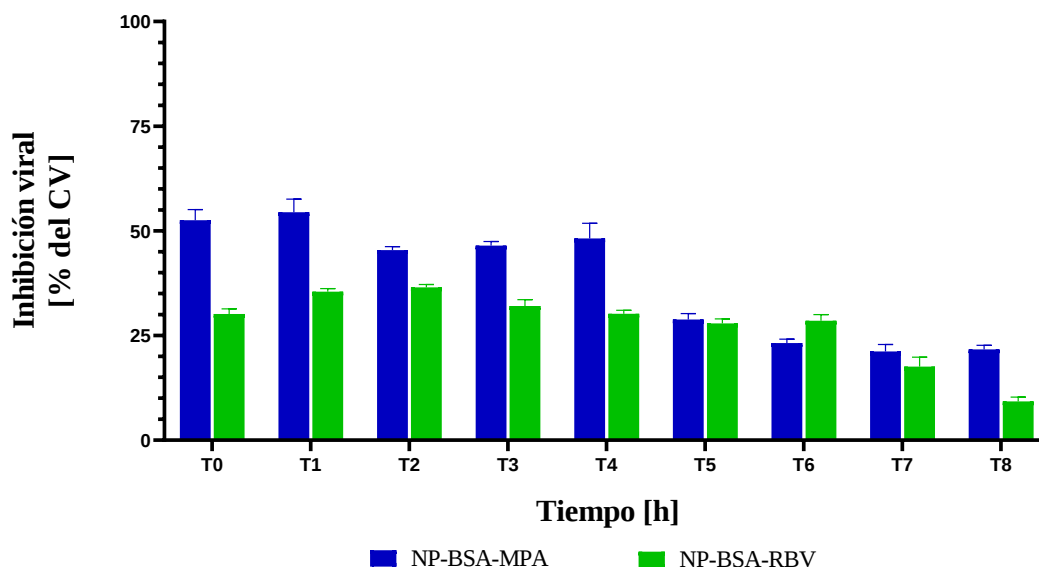


Figura II.21 Efecto del tiempo de adición de NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB sobre la acción antiviral contra ZIKV. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes $\pm$ DE.

Como muestra la (**Figura II.21**), se logró un 50% de inhibición del rendimiento de ambos virus cuando las NP-BSA-MPA fueron agregadas inmediatamente después de la adsorción viral (tiempo 0) o hasta las 4 h p.i. Cuando el tratamiento se agregó de 5-8 h p.i., la inhibición del rendimiento viral se redujo al 30%. De acuerdo a estos resultados, el principal blanco para la inhibición de NP-BSA-MPA se encontraría localizado durante las primeras 4 h de infección afectando eventos tempranos del ciclo de multiplicación viral. Después de las 5 h p.i. se observa un efecto menor que va decayendo con el tiempo.

Para el caso de las NP-BSA-RVB, el nivel de inhibición que se logró fue del 30-40% a partir de t_0 y hasta las 4 h p.i. cuando comienza a reducirse, correspondiéndose con eventos tempranos del ciclo de multiplicación viral. En el caso de los cultivos infectados con JUNV y tratados con NP-BSA-MPA, también se observó una mayor inhibición que involucra etapas tempranas de la multiplicación que van desde la entrada hasta las 4 h p.i. y un efecto inhibitorio menor que se mantiene hasta las 8 h p.i. En los cultivos tratados con NP-BSA-RVB, el efecto antiviral fue sostenido desde el t_0 hasta las 6 h p.i. (**Figura II.22**).

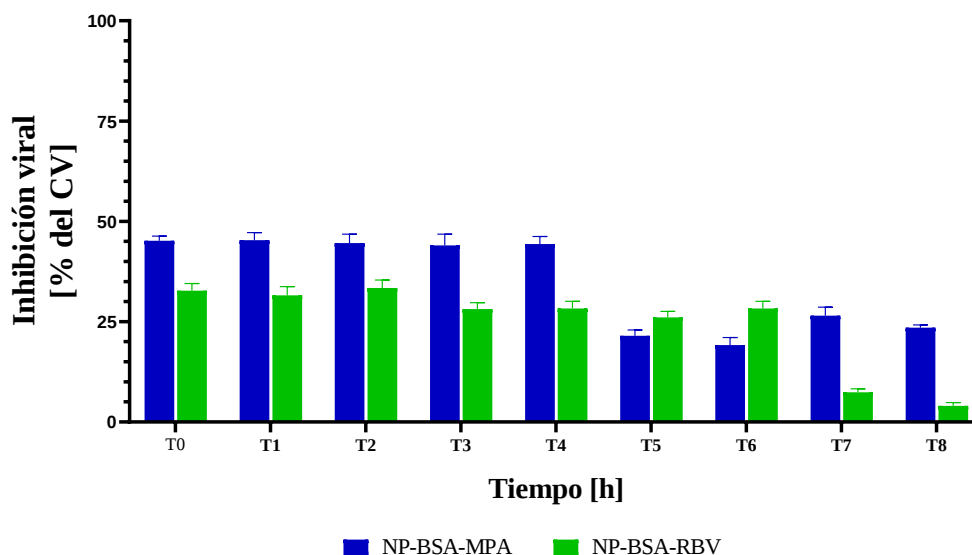


Figura II.22 Efecto del tiempo de adición de NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB sobre la acción antiviral contra JUNV. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes $\pm$ DE.

II.4.7.7 REVERSIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LAS NP-BSA CON PA POR EL AGREGADO DE GUANOSINA EXÓGENA

La biosíntesis de nucleótidos de guanosina es uno de los blancos de acción descritos tanto para MPA como RVB, dado que ambos inhiben la enzima IMPDH. Para explorar si la actividad antiviral de las NP-BSA con PA sobre ZIKV y JUNV está vinculada solo a la afección de esta vía enzimática o si existe además otro factor involucrado, se evaluó la actividad antiviral de las NP-BSA con PA en presencia o ausencia de guanosina exógena. Luego de la infección viral se trataron los cultivos con las NP-BSA-MPA, NP-BSA-RVB o con los PA libres en presencia o ausencia de 20 ó 200 μ M (21 ó 209 μ g/mL) de guanosina y se determinó el rendimiento viral a las 48 h p.i.

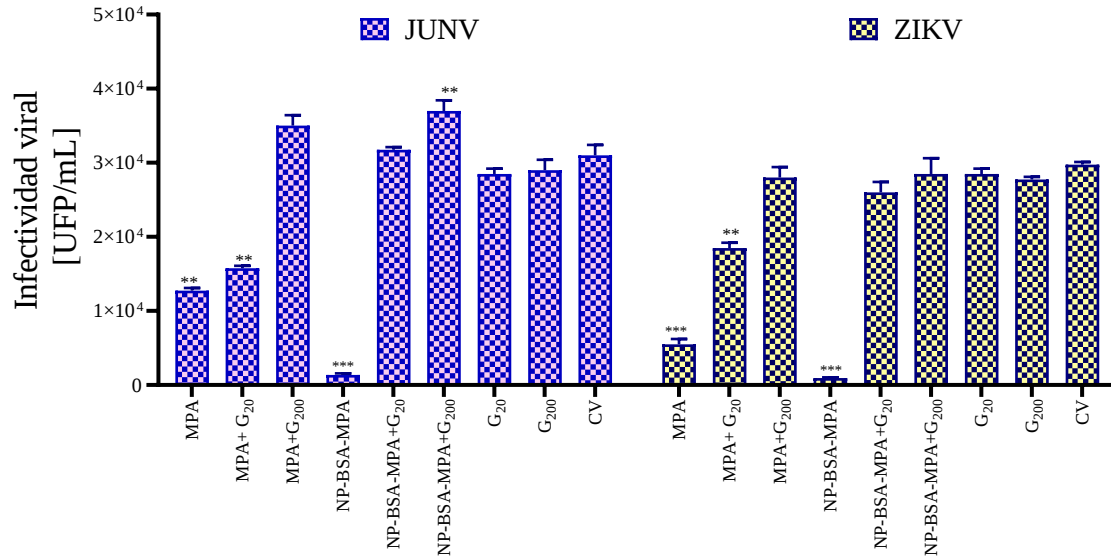


Figura II.23 Reversión de la actividad antiviral de las NP-BSA-MPA contra JUNV y ZIKV por el agregado de guanosina. Monocapas de células A549 infectadas con JUNV o ZIKV se trataron con 1 mg/mL de NP-BSA-MPA, o 0,5 μ M de MPA en presencia o ausencia de 20 o 200 μ M de guanosina. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral por el método de plaqueo. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes $\pm$ DE.

La presencia de guanosina exógena revirtió la inhibición viral de las NP-BSA-MPA (**Figura II.23**). Con 20 μ M de guanosina, la reversión fue mayor en los casos tratados con NP-BSA-MPA que con el del PA, para ambos virus. Cuando la concentración de guanosina fue de 200 μ M, la reversión fue total en todos los tratamientos contra ambos virus. Cuando se trató con RBV, el agregado de 20 μ M de guanosina produjo la reversión total del efecto inhibitorio de NP-BSA-RBV y de RBV libre, al igual que cuando la concentración de guanosina fue de 200 μ M, contra ambos virus (**Figura II.24**).

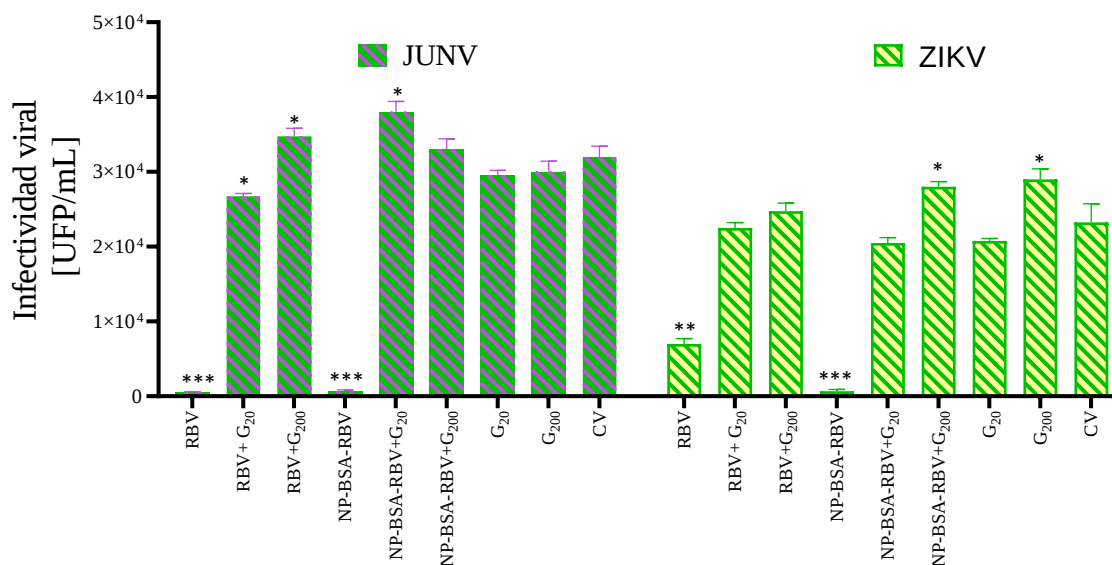


Figura II.24 Reversión de la actividad antiviral de las NP-BSA-RBV contra JUNV y ZIKV por el agregado de guanosina. Monocapas de células A549 infectadas con JUNV o ZIKV se trataron con 1 mg/mL de NP-BSA-RBV o 0,5 μ M de RBV en presencia o ausencia de 20 o 200 μ M de guanosina. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral por el método de plaqueo. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes $\pm$ DE.

II.4.8 EFECTO ANTIVIRAL SOBRE VIRUS DE CICLO REPLICATIVO CORTO

De acuerdo a los resultados de inhibición contra virus con ciclos de multiplicación largos como JUNV y ZIKV, se decidió extender el estudio utilizando virus de replicación rápida tanto con genoma de RNA como de DNA. Se evaluó el efecto inhibitorio de las distintas NP-BSA sobre cultivos infectados con VSV (genoma de RNA) y HSV-1 (genoma de DNA) los cuales exhiben un fuerte efecto citopático de redondeamiento y lisis celular en tan solo 24 h. Esta característica se aprovechó para utilizar el ensayo de inhibición de la acción citopática viral (inhibición del ACP viral) empleando el método de tinción con cristal violeta. Se infectaron cultivos de células Vero con uno u otro virus, y se trataron o no con distintas diluciones no citotóxicas de las formulaciones en medio de mantenimiento durante 48 h. Finalizado ese tiempo, se descartaron los sobrenadantes, se fijaron las células, se realizó la tinción con cristal violeta y se midió la absorbancia a 570 nm. De esta manera, los mínimos valores de absorbancia se esperan en los controles virales no tratados, donde el efecto citopático es máximo.

II.4.8.1 NP-BSA-MPA FRENTE A VIRUS DE CICLO REPLICATIVO CORTO

En el tratamiento de las células Vero infectadas con HSV-1 (**Figura II.25**) se demostró que en todas las concentraciones evaluadas existe un efecto protector de las NP-BSA-MPA igual o superior al del PA en su forma libre. Un resultado a destacar, fue que la menor concentración de NP-BSA-MPA de 10 µg/mL conteniendo la menor cantidad de MPA, fue aquella con mejor efecto protector es decir 0,756 ng/mL de MPA vs 160,17 ng/mL de MPA en su forma libre. Ninguna de las NP-BSA sin PA evidenciaron un efecto protector sobre la monocapa de Vero.

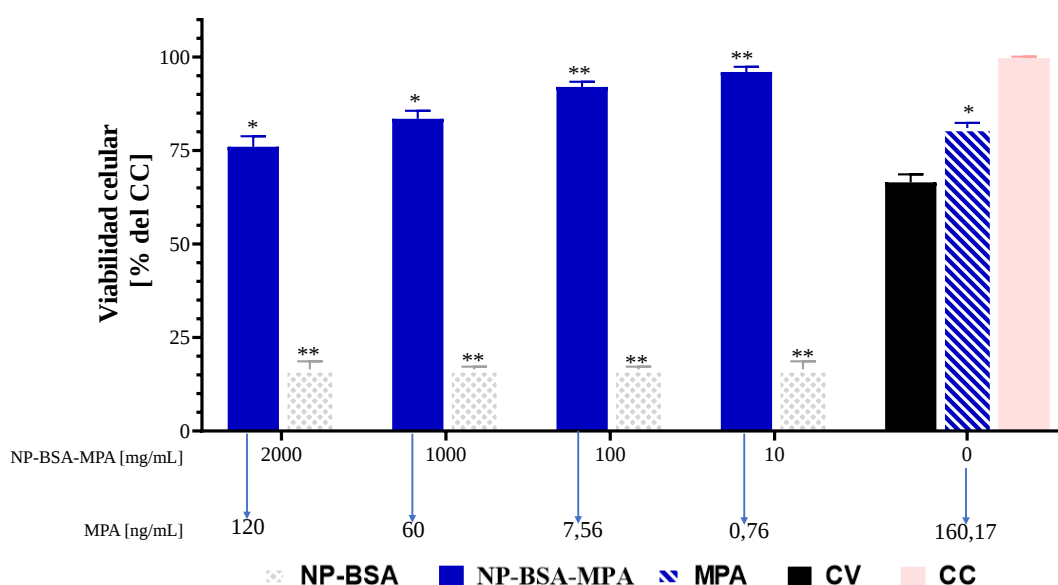


Figura II.25 Inhibición del ACP de HSV-1 por NP-BSA-MPA

Porcentaje de viabilidad celular de los cultivos infectados y tratados respecto al CC no infectado ni tratado. Los valores corresponden a la media del triplicado de ensayos independientes $\pm$ DE.

En el caso de VSV, los resultados se presentan en la **Figura II.26**, en dónde se evidenció un comportamiento opuesto al de HSV-1. En todas las concentraciones evaluadas se observó una protección de la monocapa igual o superior a la de PA sin encapsular. En este caso la menor concentración de NP-BSA con PA presentaron el mismo efecto que el PA en su forma libre. Para las otras concentraciones evaluadas, el efecto fue superior al del MPA libre.

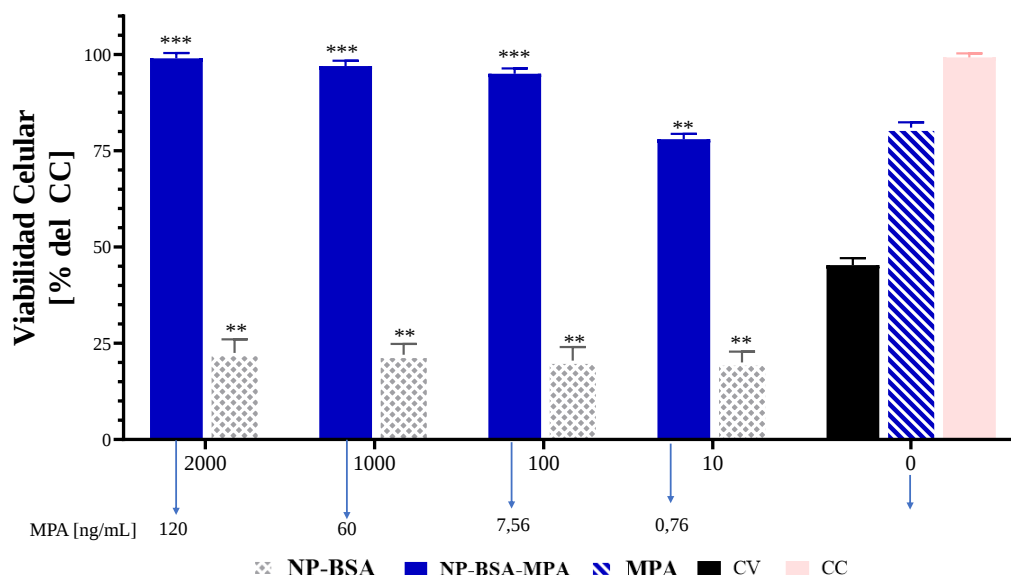


Figura II.26 Inhibición del ACP de VSV por NP-BSA-MPA

Porcentaje de viabilidad celular de los cultivos infectados y tratados respecto al CC no infectado ni tratado. Los valores corresponden a la media del triplicado de ensayos independientes $\pm$ DE.

II.4.8.2 NP-BSA-RBV FRENTE A VIRUS DE CICLO REPLICATIVO CORTO

Cultivos de células Vero infectadas con HSV-1 y VSV se trataron con 2000 $\mu\text{g/mL}$ de masa de NP-BSA-RBV conteniendo 408 ng/mL de RBV, siendo esta la concentración máxima. El siguiente tratamiento fue de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de masa de NP-BSA-RBV con 204 ng/mL de RBV, la siguiente concentración fue de 100 $\mu\text{g/mL}$ con 51 ng/mL de RBV y la menor concentración fue de 10 $\mu\text{g/mL}$ conteniendo 5,1 ng/mL de RBV. Y una concentración de 4900 ng/mL del PA libre, las barras en gris representan el efecto de las NP-BSA sin PA. En la **Figura II.27**, se muestran los resultados frente a HSV-1 y en la **Figura II.28**, se muestra el efecto frente a VSV.

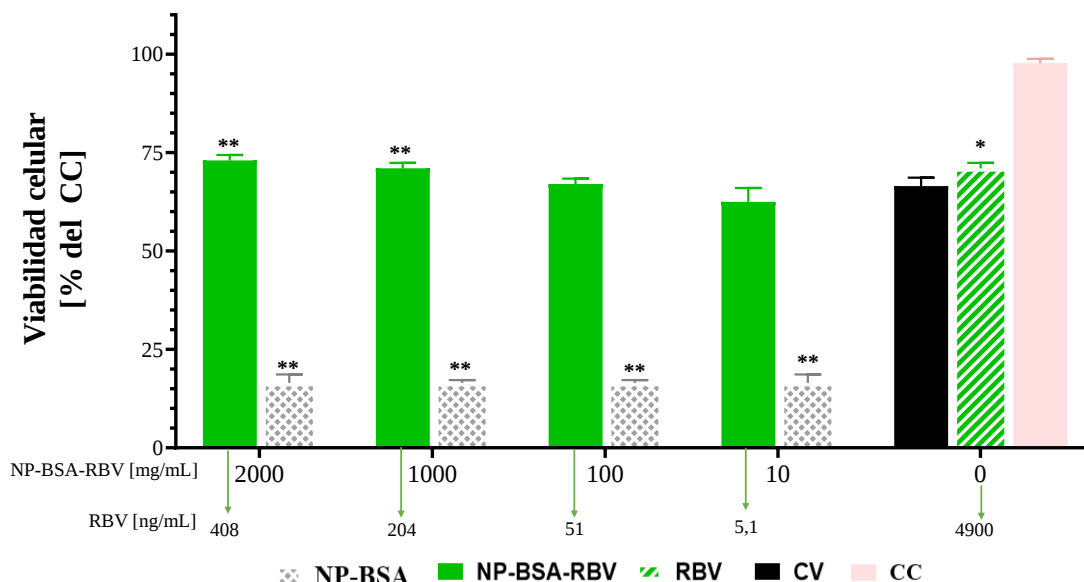


Figura II.27 Inhibición del ACP de HSV-1 por NP-BSA-RBV

Porcentaje de viabilidad celular de los cultivos infectados y tratados respecto al CC no infectado ni tratado. Los valores corresponden a la media del triplicado de ensayos independientes $\pm$ DE.

En el caso de la infección de HSV-1 (**Figura II.27**), se observó que existe una protección celular igual al de la RBV libre en todas las concentraciones evaluadas. Lo cual es distinto respecto a los resultados obtenidos con VSV (**Figura II.28**) donde se vio que en la menor concentración no produjo protección de la monocapa. Para el caso de la concentración de 100 μ g/mL con 51 ng/mL de RBV, el efecto fue menor al del PA libre. Las concentraciones de 2000 y 1000 μ g/mL, fueron las que mostraron un efecto mayor al del RBV libre.

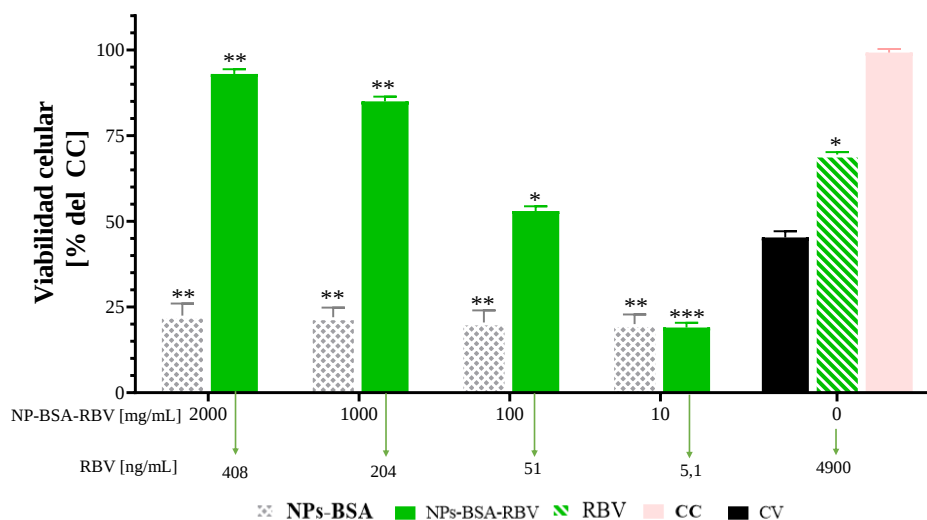


Figura II.28 Inhibición del ACP de VSV por NP-BSA-RBV

Porcentaje de viabilidad celular de los cultivos infectados y tratados respecto al CC no infectado ni tratado. Los valores corresponden a la media del triplicado de ensayos independientes $\pm$ DE.

II.4.9 ABSORCIÓN PROTEICA

La interacción de las NP-BSA con distintas proteínas séricas es clave para determinar la seguridad de las NP para ser usadas en aplicaciones médicas. Es también fundamental entender cómo las NP interactúan con las células y cuál podría ser su destino. Para tener una aproximación a estos fenómenos, se realizó el estudio de interacción de las NP-BSA con BSA, fibrinógeno e isoenzima.

II.4.9.1 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP-BSA CON BSA

El objetivo de este experimento fue estudiar si se produce la adsorción la BSA sobre las NP-BSA con y sin PA. En la **Figura II.29** se muestra que a medida que se incrementó la concentración de BSA, el Z-ave, de las partículas NP-BSA sin PA incrementó conjuntamente con el PDI (**Tabla II.10**) demostrando una interacción entre las NP-BSA y BSA. En el caso del pot- ζ , se observó que a medida que se incrementó la concentración de BSA se alejó de la neutralidad.

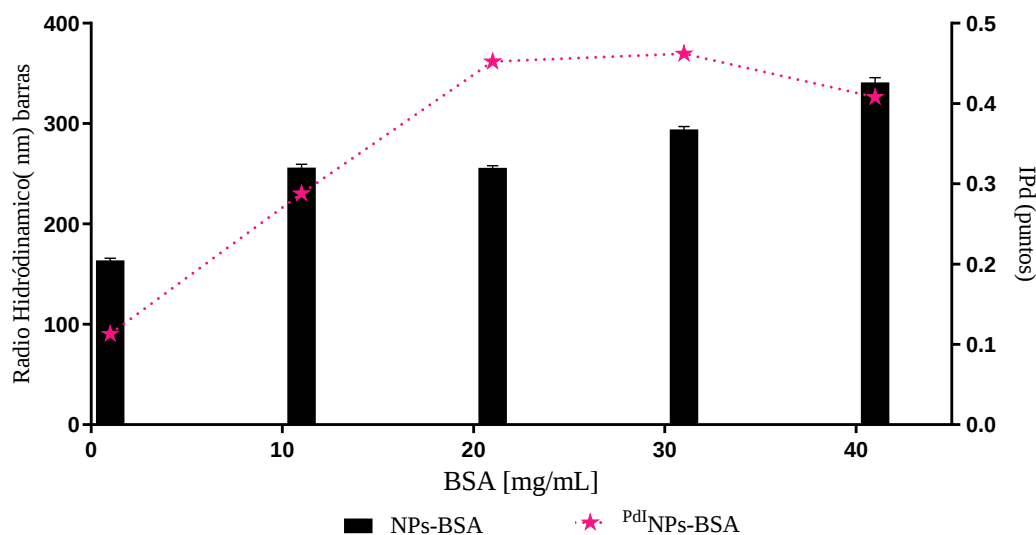


Figura II.29 Interacción de BSA con NP-BSA sin PA
Influencia de BSA sobre el radio hidrodinámico de las NP-BSA y del PDI. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

Tabla II.10 Interacción NP-BSA y BSA

NP-BSA			
BSA (mg/mL)	Z-ave* (nm)	PdI	Pot- ζ * (mV)
0	163,76 $\pm$ 3,66	0,113 $\pm$ 0,001	-7,77 $\pm$ 1,00
10	251,10 $\pm$ 1,15 ^a	0,288 $\pm$ 0,05	-13,41 $\pm$ 1,15
20	257,80 $\pm$ 5,53 ^a	0,452 $\pm$ 0,02	-22,05 $\pm$ 1,73
30	295,96 $\pm$ 5,27 ^a	0,462 $\pm$ 0,02	-27,72 $\pm$ 1,02
40	341,00 $\pm$ 8,35 ^a	0,408 $\pm$ 0,02	-28,11 $\pm$ 2,02

* Valores del promedio $\pm$ DE distintos lotes de NP, n=3, a= *p<0,05

En el caso de las NP-BSA-MPA se observó un incremento de Z-ave y PdI en todas las concentraciones de BSA ensayadas (**Figura II.30**). Por otra parte, en el caso de las NP-BSA-RBV (**Figura II.31**), se observó que el Z-ave, se mantuvo constante hasta la concentración de 30 mg/mL de BSA, pero el PdI incrementó de manera notoria a partir de 10 mg/mL. A medida que la concentración de BSA crece el tamaño de la partícula también, mostrando diferencias significativas entre cada concentración evaluada.

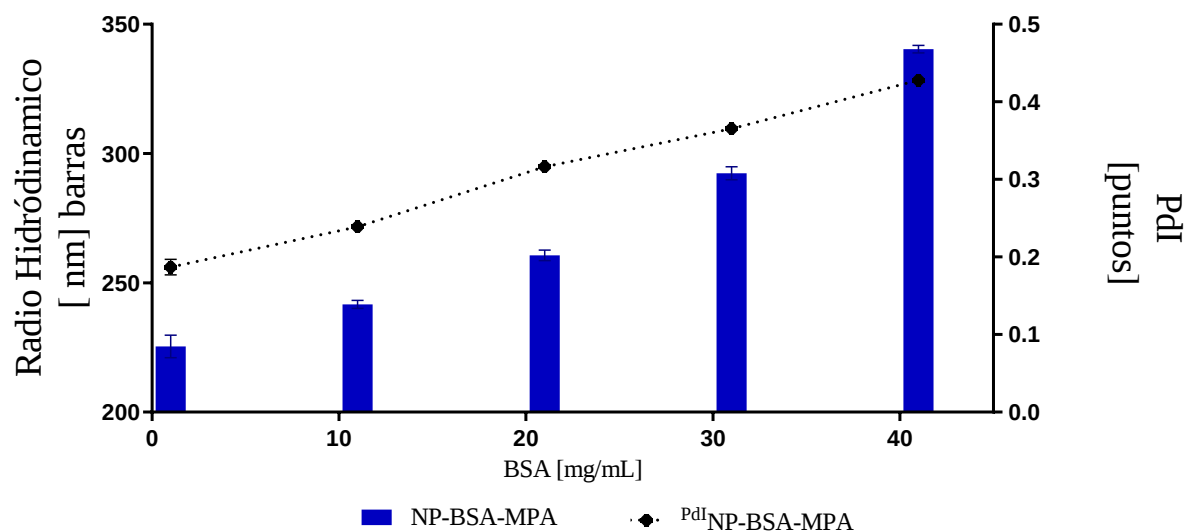


Figura II.30 Interacción de BSA con NP-BSA-MPA

Influencia de BSA sobre el radio hidrodinámico de las NP-BSA-MPA y del PdI. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

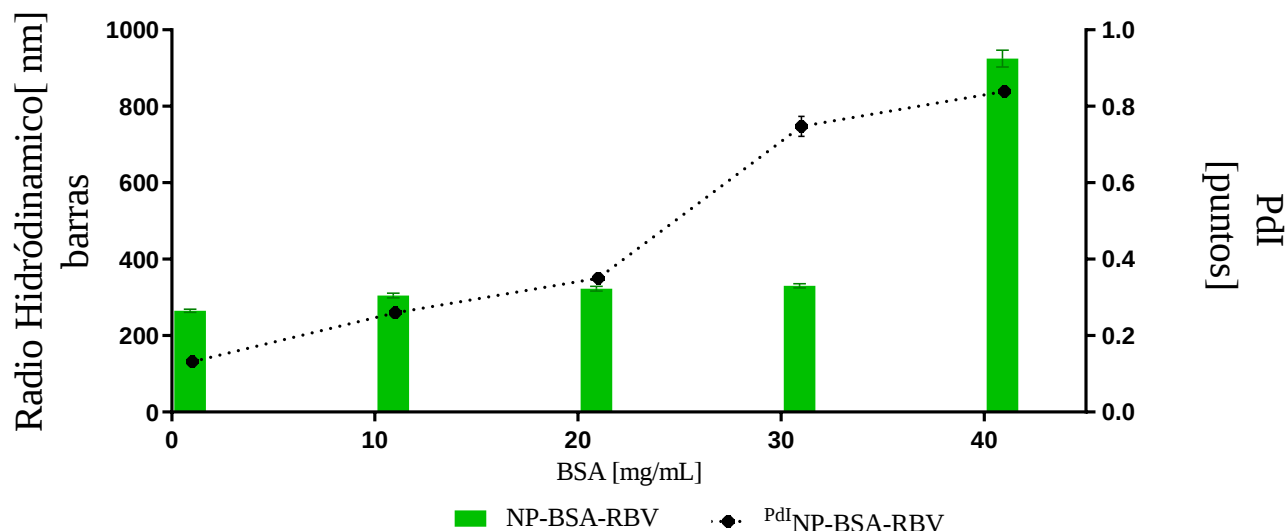


Figura II.31 Interacción de BSA con NP-BSA-RBV
Influencia de BSA sobre el radio hidrodinámico de las NP-BSA-RBV y del PdI. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes que provienen de 3 lotes distintos de NP-BSA.

Tabla II.11 Interacción NP-BSA-MPA y BSA

NP-BSA-MPA			
BSA (mg/mL)	Z-ave* (nm)	PdI	Pot- ζ *
0	241,70 $\pm$ 1,57	0,239 $\pm$ 0,04	-9,75 $\pm$ 1,00
10	260,63 $\pm$ 2,03 ^a	0,316 $\pm$ 0,01	-9,87 $\pm$ 1,00
20	255,43 $\pm$ 4,36	0,387 $\pm$ 0,01	-12,57 $\pm$ 1,00
30	292,33 $\pm$ 2,51 ^a	0,365 $\pm$ 0,05	0
40	340,34 $\pm$ 1,52 ^a	0,428 $\pm$ 0,002	0

* Valores del promedio $\pm$ DE distintos lotes de NP, n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$

Para el caso de las NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB, el pot- ζ se mantuvo casi constante usando concentraciones de BSA de 10 y 20 mg/mL, sin embargo, a concentraciones mayores de BSA (30 y 40 mg/mL) los valores se incrementaron tendiendo a la neutralidad, (**Tabla II.11** y **Tabla II.12**). Como se detalla en las **Tablas II.11** y **II.12** se evidenciaron diferencias significativas a mayor concentración de BSA.

Tabla II.12 Interacción NP-BSA-RBV y BSA

NP-BSA-RBV			
BSA (mg/mL)	Z-ave* (nm)	PdI	Pot- ζ^* (mV)
0	264,70 $\pm$ 4,56	0,131 $\pm$ 0,01	-12,43 $\pm$ 1,39
10	305,00 $\pm$ 6,24 ^a	0,259 $\pm$ 0,03	-11,01 $\pm$ 1,02
20	319,20 $\pm$ 1,05 ^a	0,350 $\pm$ 0,05	-13,19 $\pm$ 1,29
30	330,57 $\pm$ 5,87 ^a	0,747 $\pm$ 0,026	0
40	924,97 $\pm$ 22,29 ^{aa}	0,838 $\pm$ 0,01	0

* Valores del promedio $\pm$ DE distintos lotes de NP, n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas p<0,05

Todos estos resultados demostraron que existe una interacción entre BSA y las NP-BSA con y sin PA, evidenciado por el incremento en el Z-ave y la pérdida de la monodispersión, y reflejado también en el aumento escalonado del PdI. La interacción superficial de las NP-BSA con distintas concentraciones de BSA en PBS generó cambios en el pot- ζ como se muestra en la **Figura II.32**. Las NP-BSA sin PA, presentaron valores negativos cada vez mayores en valor absoluto, en función del aumento de BSA, los cuales corresponden a un acercamiento hacia la neutralidad del pot- ζ (**Tabla II.10**)

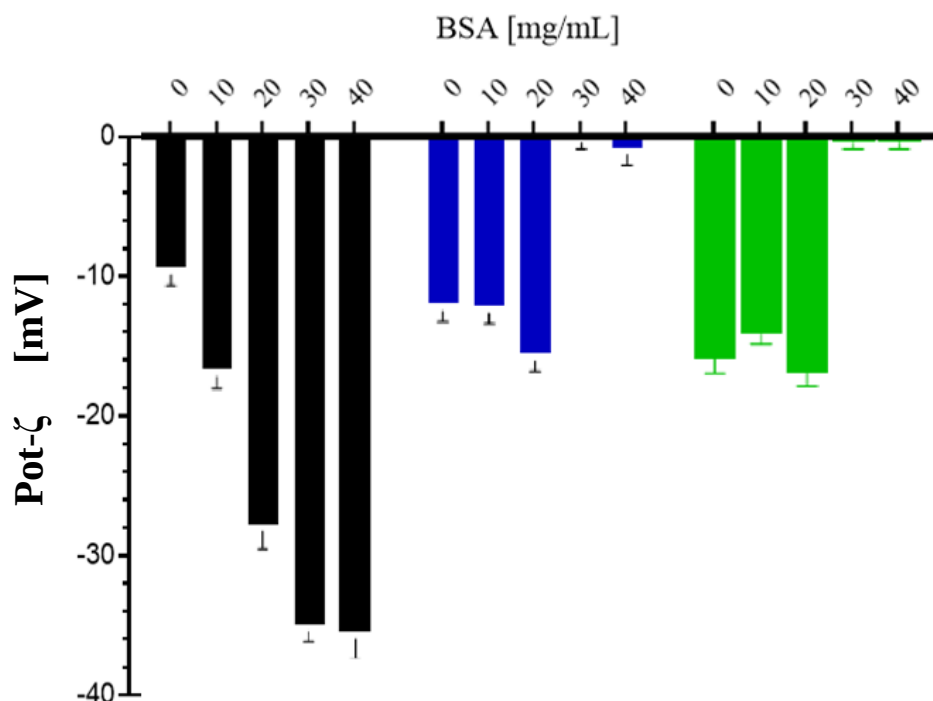


Figura II.32 Influencia de la absorción de BSA sobre el pot- ζ de las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes que provienen de 3 lotes distintos de NP-BSA con y sin PA.

II.4.9.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP-BSA CON FIBRINÓGENO

En la siguiente etapa, se estudió el efecto del fibrinógeno sobre el tamaño de partícula para las distintas NP-BSA. La influencia de esta interacción sobre la superficie de las NP-BSA se determinó en base a los cambios en el $\text{pot-}\zeta$ y al tamaño de partícula. En la **Figura II.33**, se observó que la presencia de fibrinógeno incrementó de manera significativa el tamaño de las NP-BSA en todos los casos, estos datos se encuentran resumidos en la **Tabla II.13**. Para el caso de las NP-BSA, el incremento fue drástico mientras que para las NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV el incremento fue moderado.

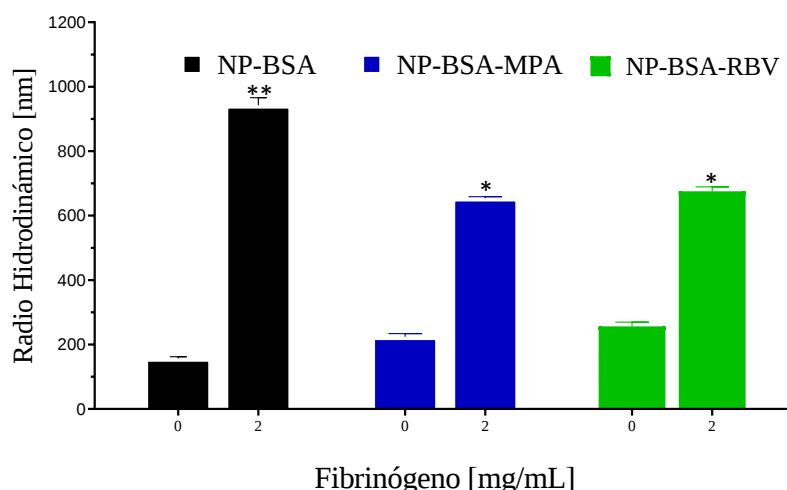


Figura II.33 Influencia de fibrinógeno sobre las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

La medición del $\text{pot-}\zeta$ en presencia y ausencia de fibrinógeno se utilizó para el análisis de interacción con la superficie de las distintas NP-BSA. Tal como se muestra en la **Figura II.34**, el $\text{pot-}\zeta$ se mantuvo sin cambios con las NP-BSA, pero mostró un decrecimiento con las NP-BSA con PA, siendo mucho más pronunciada y significativa la disminución con las NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB. Los datos se encuentran resumidos en la **Tabla II.17**. En ambos casos la presencia de fibrinógeno en la superficie de las NP-BSA conllevó a un decrecimiento en valor absoluto del $\text{pot-}\zeta$, acercándose a la neutralidad.

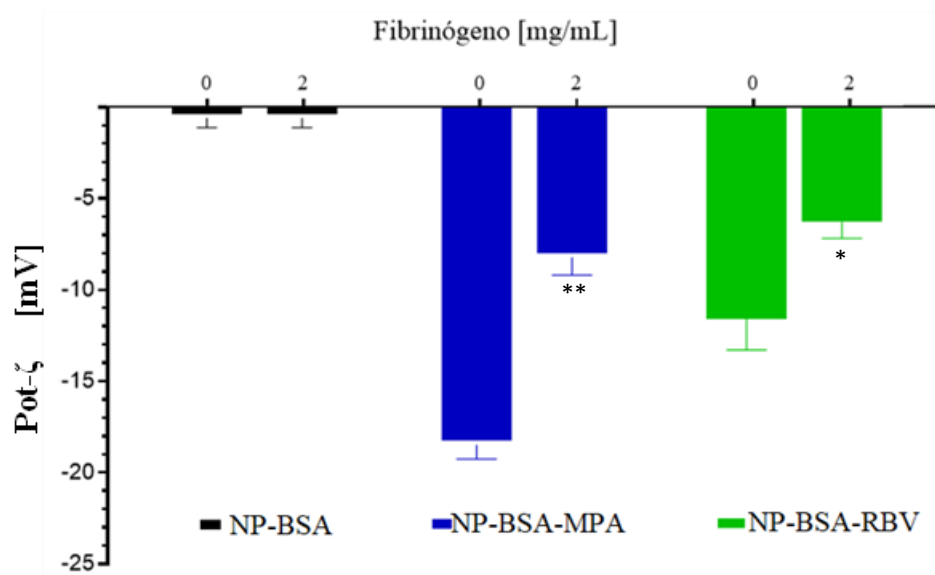


Figura II.34 Efecto del fibrinógeno sobre el pot-ζ de las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV. Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes.

Tabla II.13 Interacción NP-BSA con fibrinógeno

Fibrinógeno						
	Z-ave* (nm)		PdI		Pot- ζ * (mV)	
NP-BSA	157,10 ± 9,05	942,56 ± 40,24	0,114 ± 0,02	0,614 ± 0,07	0	0
NP-BSA-MPA	224,36 ± 19,98 ^a	654,03 ± 7,96 ^a	0,234 ± 0,01	0,651 ± 0,11	-18,00 ± 1,32	-8,24 ± 1,64
NP-BSA-RBV	256,36 ± 22,83 ^a	675,73 ± 23,89 ^a	0,124 ± 0,08	0,623 ± 0,06	-11,6 ± 2,94	-6,31 ± 1,53
	0 mg/mL	2 mg/mL	0 mg/mL	2 mg/mL	0 mg/mL	2 mg/mL

* Valores del promedio ± DE distintos lotes de NP. Letras diferentes indican diferencias significativas p<0,05

II.4.9.3 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP-BSA CON ISOENZIMA

Finalmente, se estudió la interacción de las distintas NP-BSA con la isoenzima, una proteína sérica de pequeño peso molecular. Esta interacción fue evaluada de acuerdo al efecto sobre el tamaño de partícula. La variación del h_0 fue moderada para las NP-BSA, mínima para las NP-BSA-MPA, mientras que para el caso de las NP-BSA-RBV el cambio fue pronunciado y significativo (**Figura II.35** y **Tabla II.14**).

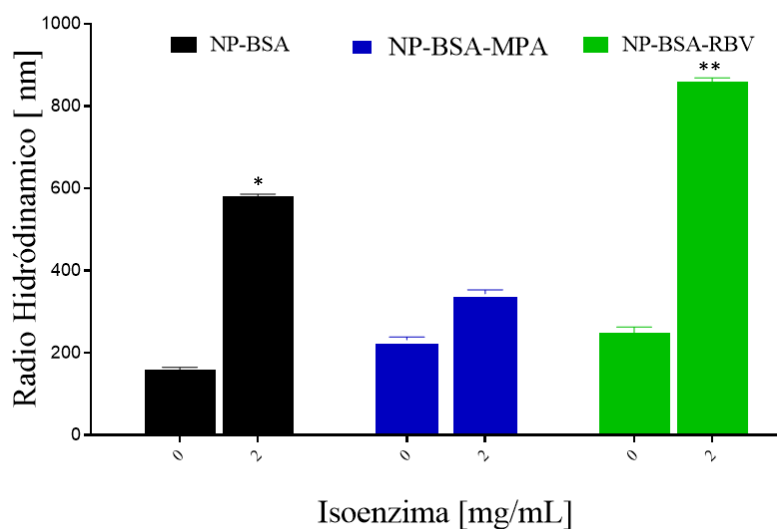


Figura II.35 Influencia de isoenzima sobre las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV de las NP-BSA en presencia o ausencia de 2 mg/mL mg/mL de isoenzima. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

Tabla II.14 Interacción de NP-BSA con isoenzima

	Isoenzima					
	Z-ave* (nm)		PdI		Pot- ζ * (mV)	
NP-BSA	159, 77 $\pm$ 8,86	581,73 $\pm$ 7,75	0,130 $\pm$ 0,02	0,560 $\pm$ 0,02	0	-10,07 $\pm$ 0,89
NP-BSA-MPA	232,03 $\pm$ 11,58 ^a	343,90 $\pm$ 16, 21 ^a	0,230 $\pm$ 0,02	0,403 $\pm$ 0,05	-18,48 $\pm$ 0,97	0
NP-BSA-RBV	248,37 $\pm$ 25,42 ^a	858,63 $\pm$ 17,99 ^a	0,14 $\pm$ 0,20	0,650 $\pm$ 0,08	-10,60 $\pm$ 1,21	3,21 $\pm$ 0,71
	0 mg/mL	2 mg/mL	0 mg/mL	2 mg/mL	0 mg/mL	2 mg/mL

* Valores del promedio $\pm$ DE distintos lotes de NP, n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas p<0,05

Por otro lado, la interacción con la superficie mostró un decrecimiento en el valor del pot- ζ con las NP-BSA mientras que en el caso de NP-BSA-MPA se llegó a la neutralidad total y para las NP-BSA-RBV se observó un decrecimiento pronunciado y significativo hacia la neutralidad. (**Figura II.36** y **Tabla II.14**).

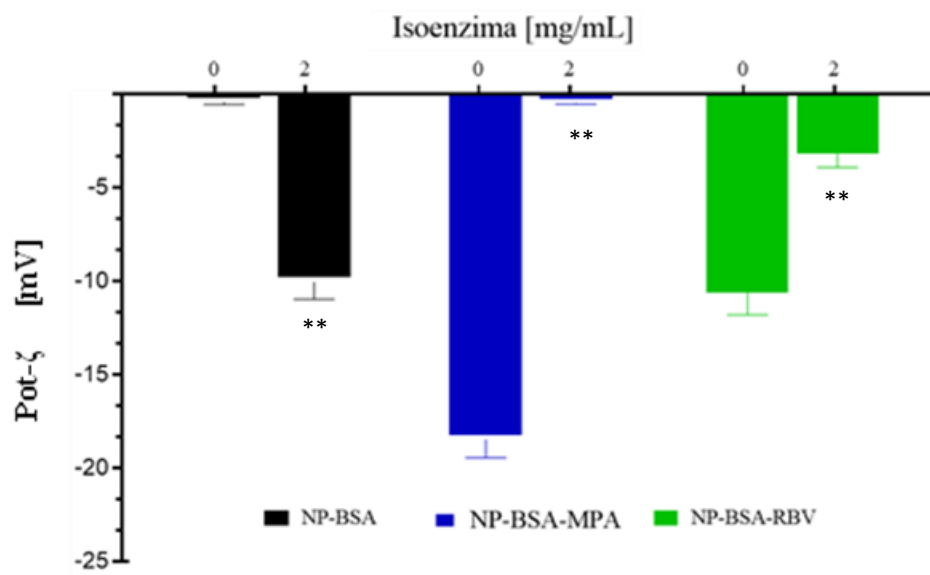


Figura II.36 Efecto de la isoenzima sobre el pot- ζ de las NP-BSA, NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

II.4.10 ENSAYO DE HEMÓLISIS *IN VITRO*

En vista que las NP-BSA son ampliamente empleadas en el área biomédica, es relevante analizar el efecto que pueden ejercer sobre las células plasmáticas, en particular la interacción con los eritrocitos. Para el ensayo de hemólisis sanguínea *in vitro* se incubó sangre humana de donantes sanos con diferentes concentraciones de las distintas NP-BSA por 10, 30 y 240 min. Como control positivo de hemólisis se incluyó la incubación con agua destilada ultra pura, A los 10 min se determinó un porcentaje cercano o menor al 1% de hemólisis en todos los casos. La norma ISO-10993 acepta 1 al 5% de hemólisis como límite superior (**Figura II.37**).

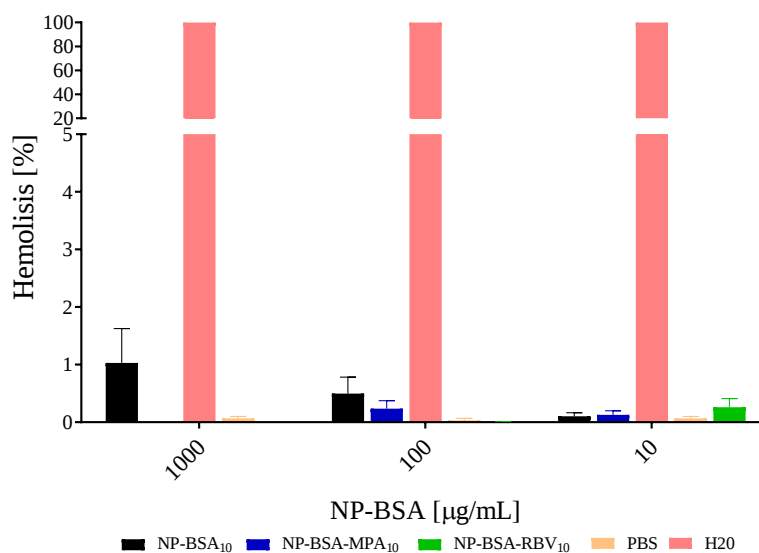


Figura II.37 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-BSA a 10 min. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes que provienen de 3 lotes distintos de NP-BSA.

La incubación por 30 min (Figura II.38) mostró un porcentaje de hemólisis del 2% solo para las NP-BSA mientras que con las NP-BSA-MPA y NP-BSA-RVB permaneció cercano al 1%. Cuando la incubación se desarrolló durante 240 min. (4 h), se observó hemólisis en las concentraciones más altas de NP-BSA y NP-BSA-MPA, no así con las NP-BSA-RVB (Figura II.39).

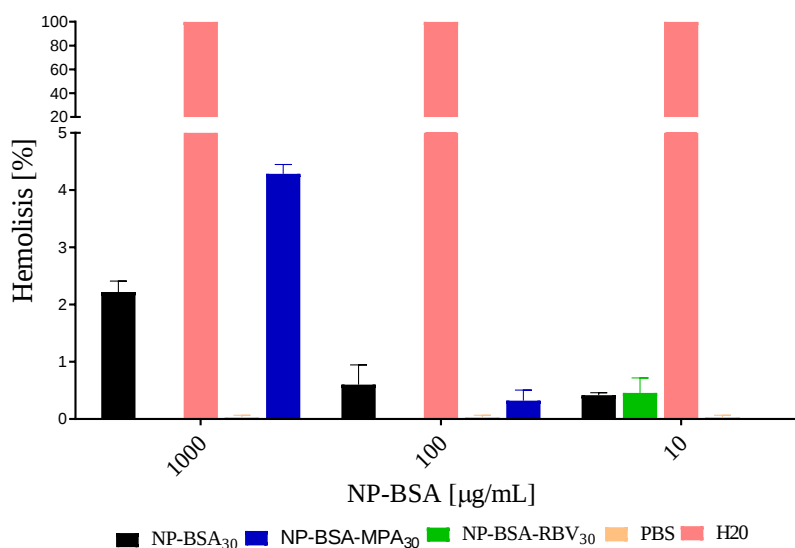


Figura II.38 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-BSA a 30 min. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes que provienen de tres lotes distintos de NP-BSA.

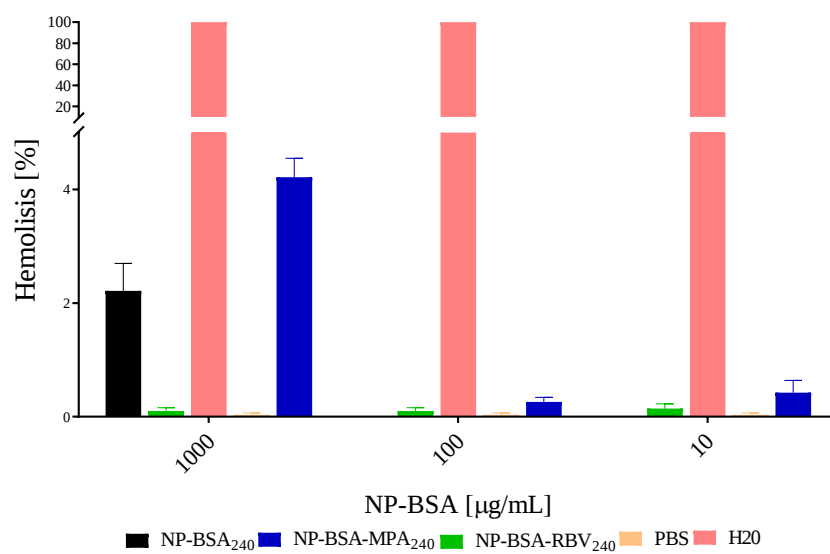


Figura II.39 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-BSA a 240 min. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes que provienen de tres lotes distintos de NP-BSA.

II.4.11 INTERNALIZACIÓN CELULAR NP-BSA

Células de la línea celular A549 se incubaron con NP-BSA marcadas con una sonda fluorescente de FIT-C y la captación celular fue determinada mediante la técnica de citometría de flujo. Los parámetros se establecieron excluyendo los NP-BSA-FITC no captadas y el fondo de fluorescencia intrínseca de las células A549 tratadas con NP-BSA no marcadas. Las mediciones se realizaron a distintos tiempos post-incubación para determinar la cinética de ingreso de las NP-BSA a las células.

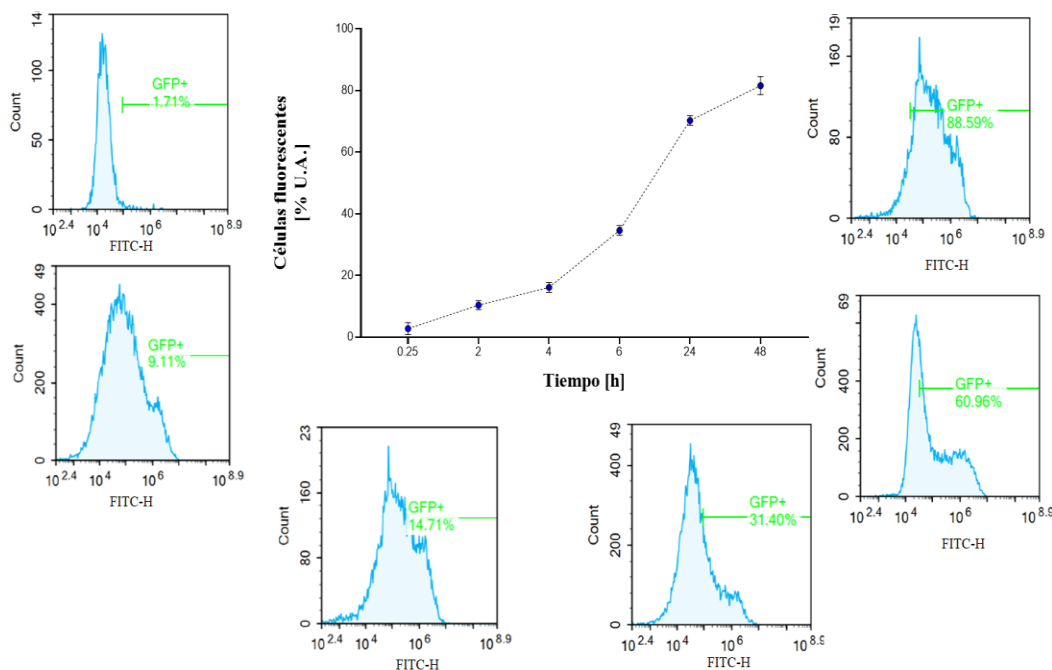


Figura II.40 Cinética de internalización de NP-BSA-FITC

En la parte superior e inferior se encuentra el desplazamiento de la fluorescencia en los distintos tiempos de acuerdo al ingreso de las NP. Los resultados representan la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes.

El ingreso de las NP-BSA-FITC purificadas (**Figura II.40**) se detectó en 1-2% de las células a los 15 min de incubación. Luego, a las 2 h el porcentaje de células positivas para FIT-C fue de 9-10% evidenciándose el desplazamiento del pico de fluorescencia. A las 4 h el porcentaje de células positivas determinado fue del 14-15%, del 31-32% a las 6 h de iniciada la incubación, a las 24 h se mantuvo en un 60-75% y finalmente a las 48 h el porcentaje de eventos positivos resultó del 80-85%. Las imágenes adquiridas por microscopía confocal mostradas en las **Figura II.41** y **Figura II.42** demostraron que las NP-BSA-FITC atraviesan la membrana celular y colocan con la tinción específica del citoplasma confirmando los datos obtenidos por citometría de flujo en cuanto al ingreso a las células y a los tiempos de internalización.

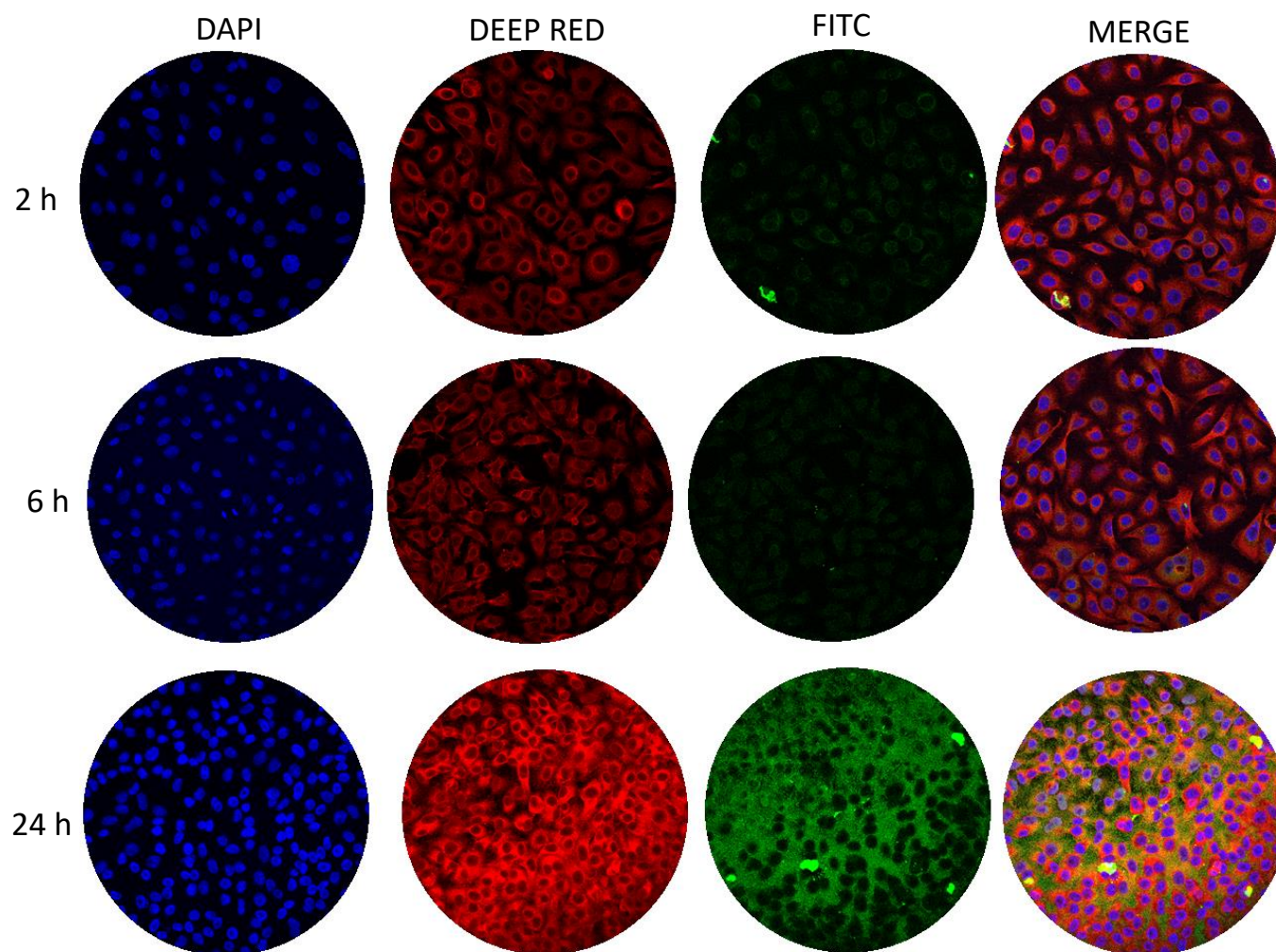


Figura II.41 Cinética de internalización de las NP-BSA-FITC.

Microscopía confocal A:100X de células A549 incubadas con NP-BSA-FITC por distintos tiempos. La columna 1 corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI, en la columna 2 se observan los citoplasmas teñidos con Deep-red, en la columna 3 se muestran las NP-BSA-FITC internalizadas por las células y la columna 4 la superposición de canales. A: 100X

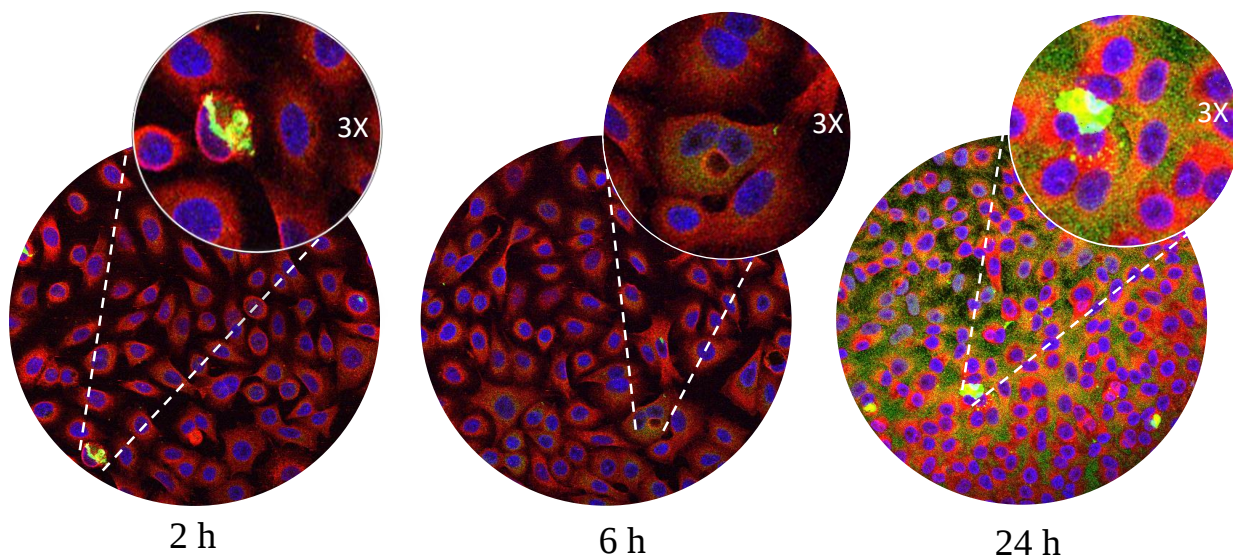


Figura II.42 Cinética de internalización de las NP-BSA-FITC.
Microscopía confocal. A: 300X.

II.5 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos y mostrados en este capítulo pueden discutirse en el marco ofrecido por el trabajo de Díaz-Saldívar y Huidobro-Toro (2019) quienes enfocaron parte de su estudio en el entendimiento de los parámetros que determinan el tamaño y la estabilidad de las NP-BSA. Es uno de los pocos trabajos que destaca la ausencia de un agente intercalante o “*crosslinker*” pero sus resultados, al igual que los de este trabajo, muestran que no es necesario el empleo de este tipo de agentes. Los resultados obtenidos refuerzan que la elección adecuada del pH de trabajo y la relación ETOH: BSA permitieron obtener sistemas estables en períodos prolongados de tiempo.

Otro tema importante a mencionar es la variación en la respuesta a los distintos experimentos en el que vemos que la presencia de los PA marca una diferencia, por ejemplo, para el caso del tamaño de partícula produciendo una disminución en el tamaño cuando los PA estaban presentes en las NP-BSA. Esta disminución de tamaño fue observada también por Arrúa *et al.* (2018). La disminución del tamaño de partícula por la presencia de un PA da lugar a un aumento de la superficie de contacto entre el PA. En general, la formación de NP a partir de una solución con un PA se produce en tres pasos: nucleación, crecimiento y agregación. La correcta separación entre la nucleación y el crecimiento es el factor clave para la formación de partículas uniformes. Se debe lograr una alta tasa de nucleación, la cual generará la saturación necesaria para evitar la agregación de las nuevas NP como lo describe Arrua Eva C., (2018).

Otro factor clave a considerar en la utilidad práctica de las NP-BSA es el mantenimiento de sus características en el tiempo, para lo cual se requiere contar con condiciones de almacenamiento que permitan mantener las NP-BSA estables por períodos prolongados de tiempo sin que el PA se libere. Para este estudio se recurrió a la congelación a -80 °C, los datos que se muestran en la Tabla II.2 revelaron que no se pierde la monodispersidad cuando las NP son sometidas a un ciclo de congelación/descongelación.

Sin embargo, el trabajo constante con este sistema evidenció que sólo resistieron tres ciclos antes de colapsar y precipitar. La ventaja que presenta la congelación sobre las otras técnicas es que no degrada los PA. Dado que no existen reportes sobre este método de almacenamiento, estos datos permiten abrir una nueva línea de exploración. Además, los datos obtenidos demostraron que el secado de las NP-BSA incrementó el tamaño de partícula y su monodispersión decreció. La liofilización es una técnica, que genera crecimiento en el tamaño de partícula, sin embargo, es una de las técnicas más

empleadas para el almacenamiento de NP. Los resultados de este capítulo demostraron que la congelación inmediata de las NP después de su purificación es una alternativa de almacenamiento que no altera sus dimensiones.

El proceso de obtención de NP-BSA es relativamente fácil, resultando en un nanosistema capaz de encapsular PA de características hidrofílicas e hidrofóbicas, lo que los convierte en una plataforma adaptable y versátil para los distintos requerimientos.

Los NP-BSA-PA generados en este trabajo presentaron E_fE de 10% para MPA y del 20% para RBV esto puede estar asociado a que las soluciones empleadas para obtener las NP-BSA fueron mínimas en el rango de los µg, debido a que los PA empleados son costosos y no son fáciles de extraer. Si se comparan con los reportes bibliográficos (Jithan *et al.*, 2011; Maus *et al.*, 2021; Shirali *et al.*, 2011; Solanki *et al.*, 2021), habitualmente se usan masas de PA en el orden de los mg, mientras que en este trabajo fueron en el orden de los µg, por lo que se debería explorar la factibilidad de incrementar las concentraciones de los PA para obtener NP-BSA con E_fE superior a los que aquí se reportaron. Es importante destacar que la investigación sobre NP-BSA con PA con actividad antiviral como el MPA o RBV, es escasa por lo que esta tesis aportaría los primeros reportes que demuestran que este sistema fue capaz de encapsular estos PA y permitiría considerarla como una plataforma adecuada para la reducción de la toxicidad y las concentraciones de los PA en los sistemas de administración (Milovanovic *et al.*, 2017).

Analizar la citotoxicidad de las NP es de sumo interés para evaluar su aplicación en el campo biomédico. En la bibliografía actual, faltan estudios sistemáticos de citotoxicidad a gran escala de NP poliméricas, por lo que aún no se permite su uso para aplicaciones a escalas industriales (Bahadar *et al.* 2016 y Shukla *et al.* 2021). Entre las diferentes pruebas para evaluar la citotoxicidad, el más utilizado, no solo para los ensayos con nanomateriales, es el ensayo colorimétrico del MTT, que mide la viabilidad celular mediante la determinación de su actividad mitocondrial, por esta razón se utilizó en este estudio. Los ensayos de citotoxicidad miden diferentes funciones metabólicas que podrían verse afectadas por las NP de diferente manera o por la interacción de estas con la célula, como por ejemplo detectar la producción de radicales libres de oxígeno, o la ruptura de la membrana con el ensayo de lactato deshidrogenasa como lo describe Bahadar *et al.*, (2016) y Buzea *et al.*, (2007).

Por otro lado, la albúmina constituye aproximadamente el 50% de las proteínas presentes en el plasma de individuos sanos. Es una proteína multifuncional que puede unirse y transportar numerosos compuestos endógenos y exógenos. El desarrollo de sistemas portadores de PA en base a albúmina adquieren cada vez más relevancia en la terapia contra diversas enfermedades, particularmente como resultado de la aprobación en el mercado de las NP de albúmina cargadas con Paclitaxel (Abraxane®) (Merlot, *et al.*, 2014). Actualmente, hay un gran interés en el estudio de los receptores celulares de albúmina para comprender los mecanismos y las vías responsables en su captación, distribución y catabolismo en múltiples tejidos (Siri, 2017).

A la hora de realizar el diseño de las NP para su uso en nanomedicina, es fundamental tener en cuenta las barreras biológicas a las que se expondrán las nanoestructuras *in vivo*. Al ser la albúmina una proteína tan abundante en el torrente sanguíneo, es importante conocer la interacción con las NP. En el caso de estas NP-BSA, la interacción se evidenció por el cambio en el tamaño de partícula, PDI y en el cambio en el $\text{pot-}\zeta$. Todas estas variables demostraron un posible recubrimiento superficial de las NP-BSA con albúmina sérica en la sangre. Sin embargo, los últimos estudios sobre esta interacción reportados para otras NP, demuestran que este fenómeno puede ser beneficioso para el direccionamiento de las NP hacia distintos blancos de acción (Vu *et al.*, 2019a, 2019b).

Es decir, el dispositivo funcionaría como un sistema de opsonización. Este mismo fenómeno ocurría en el caso del fibrinógeno que tiene una carga positiva mayoritariamente y que su interacción con las NP-BSA desarrolladas en este trabajo, demostró que depende del PA. Esta observación se corroboró a su vez con los resultados con isoenzima. En ambos experimentos se vio un cambio en el tamaño de partícula y en el PDI, además de los decrecimientos del $\text{pot-}\zeta$ y su desplazamiento hacia la neutralidad. Es decir que existen interacciones físico químicas de las NP-BSA, los PA y las distintas proteínas del torrente sanguíneo como ya lo habían reportado Fornaguera *et al.* (2015), para otros sistemas coloidales poliméricos.

Una vez demostrado que las NP-BSA no son tóxicas y presentaron actividad antiviral para los distintos virus ensayados fue fundamental realizar un análisis de los efectos sobre la hemólisis *in vitro*. Toda esta información servirá para determinar y establecer una posible manera de administración que sea compatible y no altere al sistema BSA-NP. La hemólisis detectada en este caso, si bien fue mínima y se presentó en las concentraciones más altas, no se atribuyeron a las características físico-químicas de las NP, sino al desequilibrio osmótico ocasionado por un extenso período de exposición. Por lo tanto, se requiere de un equilibrio osmótico para evitar la hemólisis.

Adicionalmente cabe mencionar que estos valores de hemólisis están permitidos y considerados como de “no hemólisis” por la norma ISO-10993.

La entrada de NP a las células, la acumulación en órganos o el cruce de barreras biológicas, puede controlarse mediante el diseño correcto. Tanto el tamaño, la carga, los distintos tipos de recubrimientos o ligandos expuestos en la superficie, así como también la interacción de las nanoestructuras con las proteínas séricas, son características importantes a tener en cuenta durante el diseño de las mismas como lo mencionan (Polo, *et al.*, 2017 y Verma y Stellacci, 2010). Al entrar las NP en contacto con el medio biológico, se forma una corona de proteínas séricas sobre su superficie. La composición de esta corona proteica está fuertemente correlacionada con el tamaño, la composición y forma de las NP. Los científicos encontraron la manera de modular esta interacción mediante la química de superficie de las NP. Una vez más, el diseño de las nanoestructuras adquiere importante relevancia como lo describen (Achilli E., (2020) y Boiero, (2017).

La interacción entre las células y las NP es fundamental para comprender los mecanismos de administración dirigida de PA. Diversos estudios demostraron que la captación endocítica es una ruta efectiva para la internalización de varios tipos de NP donde el tamaño, las características de la superficie y la forma se han determinado como factores críticos (Oh & Park, 2014; Sahin *et al.*, 2017). Una función importante de la membrana celular es proteger a las células, lo que implica un estricto control del intercambio de materia con su entorno. Un factor clave para considerar en las potenciales aplicaciones biológicas de las NP, tiene que ver con su capacidad de internalizarse en las células como se describió en el trabajo de Mosquera, García, and Liz-Marzán (2018), los resultados de este trabajo demostraron que las NP-BSA son capaces de atravesar la membrana celular.

Los virus son el mejor ejemplo de organización de la materia y estructuras biológicas a nanoescala que han motivado a los investigadores a desarrollar nuevos métodos para producir nuevos nanomateriales. La gama de virus estudiados y evaluados ha sido muy estrecha; por lo tanto, es importante estudiar los diversos virus para desarrollar nanomateriales de alto potencial con propiedad antiviral de amplio espectro cómo se describe en el trabajo de Abo-zeid *et al.*, (2018).

En 2012, Baram-Pinto desarrolló nanoesferas de BSA de superficie modificada utilizando un proceso sonoquímico simple de un solo paso, con potencial acción antiviral contra HSV-1. La superficie de la proteína fue conjugada covalentemente con sulfonato de mercaptoetano que funciona de manera similar al sulfato de heparán celular (Baram-Pinto *et al.* 2012). Los resultados obtenidos en este

capítulo, muestran que las NP-BSA son eficaces y eficientes sin tener modificaciones superficiales y que presentaron actividad antiviral frente a JUNV, ZIKV, HSV-1 y VSV.

Se evaluaron distintas líneas celulares y distintos virus para tratar de encontrar alguna pista que permita comprender cuál podría ser el mecanismo operando con las NP-BSA para interactuar con la célula. Si bien no se encontraron evidencias categóricas, lo que sí quedó demostrado en este capítulo fue que el empleo de NP reduce la dosis del PA y a su vez produce una entrega efectiva de los PA. El mecanismo por el cual este PA está siendo reconocido por la célula es aún una caja negra que debe ser explorada y estudiada en mayor profundidad.

Una característica importante de los nanomateriales y las NP es que podrían impedir la entrada del virus a la célula hospedadora al inhibir la unión del virión al receptor de superficie, ya sea por competencia o por los recubrimientos que se pueden adicionar a las NP. La nanotecnología podría utilizarse para la producción de máscaras, ropa, filtros nasales, guantes y gomas de mascar para prevenir la propagación de los virus entre los humanos. También podrían funcionar como sondas de biodetección, actuando como intermediario en sistemas de entrega intranasal que tiene los beneficios de persistencia a largo plazo, exacta orientación hacia las células por la interacción con el receptor y el ligando, potenciando el sistema inmunológico y la ausencia de degradación enzimática, convirtiéndolas en un método eficaz y benigno para entregar vacunas, anticuerpos, medicamentos, etc. Estas aplicaciones son descritas por Gurunathan *et al.* (2020).

II.6 CONCLUSIONES

En este capítulo se mantuvo como matriz para la generación de NP, a la proteína BSA. En base al análisis bioinformático realizado en el capítulo I, se prosiguió con el enfoque de la interacción entre MPA y BSA, y basados en esta experiencia se decidió adicionar otro PA de interés antiviral como es la RBV habiendo previamente hecho el análisis de su interacción *in silico*.

Obtención y caracterización de NP-BSA

- La caracterización de la suspensión coloidal y las NP-BSA aisladas y purificadas mostraron estar en el rango de 60 a 100 nm.
- La BSA, demostró ser una matriz capaz de encapsular compuestos hidrofílicos como el MPA y compuestos hidrosolubles como la RBV.
- La EfE de ambos PA, se vio limitada por la concentración de PA adicionado para la encapsulación obteniéndose: 10 % para MPA y 20 % para RBV.
- La adición de los PA redujo el tamaño de las NP-BSA lo que demostró que existe un efecto de nucleación homogéneo.
- Los estudios de estabilidad demostraron que se pueden congelar las NP-BSA ya que no presentaron alteraciones significativas en el tamaño de la NP-BSA sometidas solo a un ciclo de congelación y descongelación. No se alteró la monodispersidad de las NP-BSA siempre y cuando estas estuvieran cargadas con cualquiera de los dos PA aquí estudiados.
- Los experimentos de congelación y descongelación demostraron que las NP-BSA soportaron 2 ciclos antes de perder su estabilidad y precipitar.
- Los distintos análisis del $\text{pot-}\zeta$, mostraron que las NP-BSA son estables en el tiempo inclusive cuando decrece el $\text{pot-}\zeta$ en función del tiempo de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Las interacciones fisicoquímicas generadas en la obtención de las NP-BSA no tuvieron influencia sobre el efecto biológico del PA.

Los experimentos de citotoxicidad y actividad Antiviral

- Los PA, MPA y RBV, mantuvieron su efecto biológico cuando se encontraron encapsulados en las NP-BSA.
- Las NP-BSA evaluadas no resultaron tóxicas en los rangos de concentración en los que el PA sí produjo citotoxicidad.
- Las NP-BSA con PA presentaron efecto antiviral, en concentraciones tan diluidas en las que no lo hicieron los PA, por lo que el empleo de estas formulaciones sería seguro y reduciría las concentraciones efectivas de los PA.
- La encapsulación de PA en NP-BSA, se tradujo en la reducción de la dosis hasta 100 veces para el caso del NP-BSA-MPA y 200 veces para las NP-BSA-RIB, y en altísimos índices de selectividad.
- El efecto de las NP-BSA conteniendo PA depende del tiempo de liberación del PA. Sin embargo, a las 24 h p.i. se vio efecto de las NP-BSA con PA en los modelos de infección empleados.
- Todos los resultados mostrados indicaron que la encapsulación de RBV y MPA mejoró la entrega efectiva del PA en la célula.
- Las NP-BSA sin PA no mostraron inducir ninguna respuesta innata celular o un estado de alerta para controlar la infección viral.
- Las NP-BSA con PA mostraron tener actividad antiviral sobre virus de genoma de RNA y DNA.
- El efecto antiviral de las NP-BSA-MPA y NP-BSA-RBV fue revertido por el agregado de guanosina.
- Se demostró que las NP-BSA fueron capaces de atravesar las membranas celulares y llegar al citosol.
- Los experimentos con componentes sanguíneos permitieron concluir que, independientemente de la carga de las NP-BSA, no se produjo hemólisis en los sistemas evaluados.
- Las NP-BSA cumplen con los requerimientos mínimos de seguridad requeridos para ser administradas de manera intravenosa.

III NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO: NP-PLGA

III.1 INTRODUCCIÓN

Los avances científicos y tecnológicos han llevado a una evolución en la manera de administrar los PA desde sistemas relativamente simples hasta altamente sofisticados, denominados nuevos sistemas de administración de PA. En los últimos años se ha investigado la entrega basada en el uso de nanoemulsiones (NE), útiles por su versatilidad en distintas áreas como alimentos, cosmética, productos de limpieza e higiene, síntesis de materiales, entre otras. Además, constituyen sistemas modelo para el estudio y comprensión de las dispersiones coloidales en la nanoescala (Wilson *et al.*, 2022a). Las NE están descritas en la literatura también como miniemulsiones, emulsiones ultra finas y emulsiones submicrométricas. Son sistemas cinéticamente estables y ópticamente translúcidas/azuladas. Debido a que son termodinámicamente inestables, no se forman de manera espontánea y sus características dependerán del método de preparación utilizado (Fornaguera Puigvert C. 2015; García-Celma *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2016).

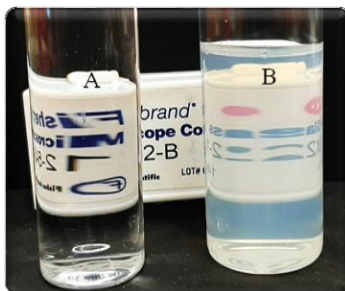


Figura III.1 Aspecto macroscópico de una NE O/W.
A) agua ultra pura y, B) NE.

Las NE tienen un gran potencial debido a que pueden solubilizar fácilmente PA hidrofóbicos, reducir los efectos adversos graves y modificarse fácilmente en nanomateriales inteligentes de próxima generación. La capacidad para disolver grandes cantidades de sustancias poco solubles, como para proteger las drogas y/o PA de la degradación química o enzimática, ejercer la liberación controlada del PA, convierte a las NE en sistemas de administración particularmente eficaces. Las NE son sistemas bifásicos termodinámicamente estables, con un rango de tamaño de gota de 20 a 200 nm, están constituidas por agua, aceite y emulsionante o tensioactivos, el agregado de los tensoactivos es crucial para la formación de pequeñas gotas al disminuir la tensión interfacial (Thangadurai, Islam and Adetunji 2022; Helgeson 2016).

El líquido disperso en forma de gotitas es la fase interna, discontinua o dispersa, mientras que la otra es la fase externa, continua o dispersante. Su pequeño tamaño conduce a propiedades útiles, como una gran área de superficie por unidad de volumen, estabilidad robusta y apariencia ópticamente transparente. Según la naturaleza de la fase dispersa y la fase dispersante, existen dos tipos de emulsiones simples: emulsiones agua-en-aceite y emulsiones aceite-en-agua (Fornaguera Puigvert C. 2015; Gupta 2020; Sarker 2005). En las emulsiones agua-en-aceite (denominada **W/O** por sus iniciales en inglés) la fase dispersa es agua y la fase dispersante es aceite, el contenido de agua es típicamente menor al 25%. En las emulsiones aceite-en-agua (denominada **O/W**) el contenido del componente acuoso es generalmente mayor al 31% pudiendo tener hasta un 80%, en este tipo de emulsión la fase dispersa es un aceite y la fase dispersante es agua. En general, se cumple la ley de Bancroft que dice que la fase dispersante es aquella en la que es soluble el emulsificante o tensoactivo. En la **Figura III.2**, se muestra la formación de los distintos tipos de NE y el empaquetamiento del surfactante según su afinidad por la fase dispersante (García-Celma *et al.*, 2016; Halima *et al.*, 2022; Thangadurai *et al.*, 2022).

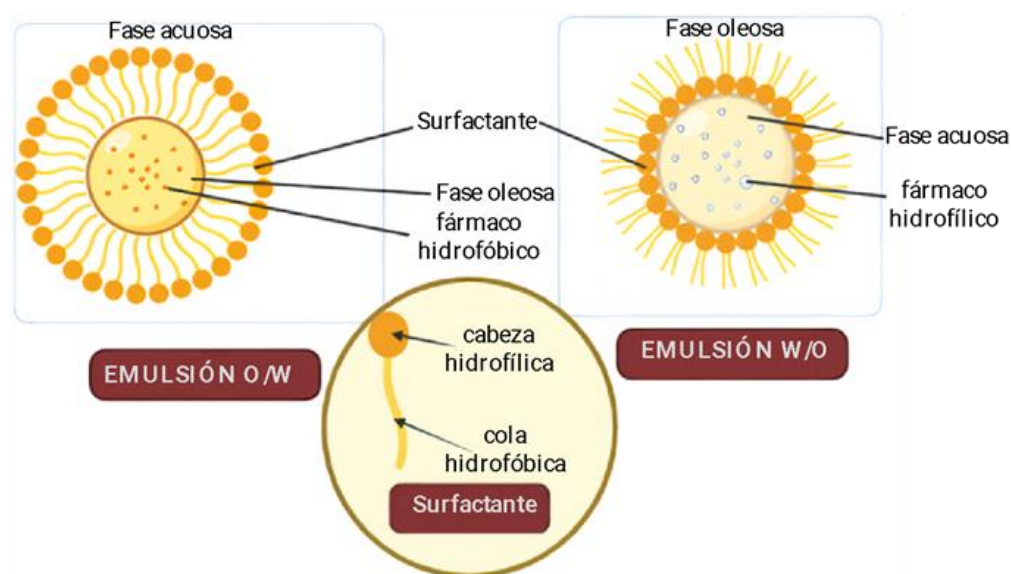


Figura III.2 Esquema del ensamblaje del surfactante (**O/W**) organización de las cabezas hidrofílicas hacia el exterior, formación de un núcleo hidrofóbico (**W/O**) organización de las cabezas hidrofílicas hacia el interior con las colas hidrofóbicas hacia el exterior, formación de un núcleo hidrofílico. (Adaptado de Alshahrani 2022)

La formulación de la NE determina el comportamiento de fase del sistema, las propiedades dependen de ella. El tipo de emulsión, el tamaño de gota y su estabilidad cinética dependerán finalmente de la

formulación. Al formular una emulsión es importante considerar que el surfactante que se ha de seleccionar favorezca el tipo de emulsión que se pretende preparar (O/W y/o W/O). Hay que tener en cuenta la concentración de la fase dispersa en el volumen total de la emulsión ya que la fase mayoritaria es la fase continua. Además, establecer la temperatura en la que se trabajará la emulsión considerando que a mayor temperatura disminuye la tensión superficial pero considerando la sensibilidad térmica de los componentes (Forgiarini *et al.*, 2001; Tian, Chen, y Zhang 2016).

La formulación implica la selección de valores de dos tipos de variables: las **de composición** y las **de formulación fisicoquímica**. Las variables de composición son las proporciones relativas de los constituyentes del sistema: aceite, surfactante, agua. Las variables de formulación fisicoquímica incluyen: temperatura, presión y naturaleza de los constituyentes. Se requiere más de una variable para definir cada uno de los constituyentes de la terna; por ejemplo, el surfactante está definido por la naturaleza de su zona hidrofílica y el largo de la cadena lipofílica; en lo que respecta al agua, depende de los tipos y concentración de electrolitos que tenga disueltos. En cuanto al aceite, se ve influenciado por el largo de la cadena hidrocarbonada, presencia de grupos funcionales e isomería de posición. Debido a la existencia de tantas variables se suele seleccionar la variable que se considere más importante manteniendo constante a las demás (Gupta *et al.*, 2016; Ozogul *et al.*, 2022; Helgeson 2016).

La palabra surfactante se origina del acrónimo *surfactant*, de su nombre en inglés, “*Surface Active Agent*”; también se les conoce como tensoactivos y como emulsificantes. Un surfactante es una sustancia anfifílica, es decir, posee una doble afinidad ya que tiene una **parte polar** y una parte **no polar**. La parte polar contiene átomos como O, S, P, y N que se encuentran en grupos alcohol, ácido, fosfato, sulfato, amina, amida, cetona, éter, etc. El grupo apolar está conformado por lo general por cadenas hidrocarbonadas, aunque también puede ser por cadenas siliconadas o de perfluorocarburo. La parte polar presenta afinidad por sustancias polares como el agua por lo que se le denomina parte hidrofílica. La parte apolar presenta afinidad a sustancias no-polares como los lípidos, por lo que también se le conoce como parte lipofílica (Koh y Wong 2019) .



Figura III.3 Estructura de un surfactante

Se considera que la molécula de surfactante posee una “cabeza”, que es la parte hidrofílica, y una “cola” que es la parte lipofílica (**Figura III.3**). Los surfactantes, al ser sustancias anfifílicas, tienden a migrar a la interfase debido a que, por su doble polaridad, una parte de su molécula siempre presentará “fobicidad” si se encuentra en el seno de una fase. Si sólo hay presente una fase migrarán a la superficie, si hay dos fases migrarán a la interfase orientando la parte polar hacia la fase acuosa y la parte apolar hacia la fase oleosa. Precisamente por esta actividad es que se les denomina surfactantes; cabe mencionar que no todos los compuestos anfifílicos presentan tal actividad, ya que para que esto suceda se requiere que la molécula no sea ni demasiado hidrófila ni demasiado hidrófoba. Un tensoactivo disminuye la tensión superficial o interfacial (**Figura III.4**) y la energía libre de Gibbs (ΔG) del sistema (Salager, 2002).



Figura III.4 Efecto de los tensoactivos
Efecto de un tensoactivo en la forma de una gota de agua en contacto con una superficie hidrófoba

La ΔG interfacial es la cantidad mínima de trabajo requerido para crear esa interfase. Esta energía libre interfacial por área es la tensión interfacial y es la cantidad mínima de trabajo para crear una unidad de área de interfase o para expandirla una unidad de área. También indica una medida de la naturaleza de dos fases en contacto en la interfase, ya que al ser menos similares estas dos sustancias, se incrementa la tensión interfacial. El surfactante promueve cambios significativos en la cantidad de trabajo requerido para expandir la interfase, aunque generalmente se le utiliza para reducir la ΔG interfacial (Helgeson 2016; Wilson *et al.*, 2022).

III.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS SURFACTANTES

Los surfactantes se clasifican de acuerdo a su disociación al ser disueltos en agua, de esta manera se evitan confusiones en una categorización según su función. Los **surfactantes aniónicos** se disocian en un anión anfifílico y en un catión que generalmente es un metal alcalino o un amonio cuaternario. Los **surfactantes catiónicos** se disocian en un catión orgánico anfifílico, generalmente una sal de amonio cuaternario, y un anión que generalmente es del tipo halogenuro. Los **surfactantes anfóteros** son aquellos que combinan en su molécula los dos caracteres: aniónico y catiónico. Los surfactantes catiónicos y los anfóteros son caros por lo que se utilizan para aplicaciones muy particulares. Los **surfactantes no-iónicos** no se ionizan en solución acuosa ya que poseen grupos hidrófilos del tipo alcohol, fenol, éter o amida. (Salager *et. al.*, 2002). A continuación, se detallan brevemente las características de los surfactantes no-iónicos ya que fueron empleados en esta tesis.

III.1.2 SURFACTANTES NO-IÓNICOS

Son aquellos tensoactivos que no se ionizan en solución acuosa lo que los hace compatibles con otros surfactantes para formar mezclas complejas, así mismo son menos sensibles a la presencia de electrolitos por lo que pueden utilizarse en presencia de salinidad alta. Existen diferentes tipos de surfactantes no-iónicos predominando aquellos que contienen una cadena poli-(óxido de etileno) enlazada con un grupo hidroxilo o una amina (Fernández, 2004). Los surfactantes comerciales indican la distribución de número de grupos de óxido de etileno, en forma abreviada NOE (número de óxido de etileno). Se requieren por lo menos 5 a 7 grupos OE para obtener buena solubilidad en agua (Gupta *et al.*, 2016).

La parte hidrofílica es la cadena poli-OE y es mucho más voluminosa que la parte lipofílica, debido a que los oxígenos del grupo etoxilo poseen dos pares de electrones libres, los cuales forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, formando una grande y voluminosa vaina de hidratación. Los OE poseen dos grupos metileno por cada oxígeno, el metileno es de carácter lipofílico y el oxígeno de carácter hidrofílico. Una propiedad de los surfactantes no-iónicos es que se vuelven menos hidrofílicos conforme la temperatura aumenta, debido a que los puentes de hidrógeno antes mencionados, se van rompiendo a medida que ésta se incrementa (García-Celma *et al.*, 2016).

III.1.3 HLB DE LOS SURFACTANTES

Con el fin de medir la lipofilicidad e hidrofiliicidad de los surfactantes, Griffin (Becher y Griffin, 1970) ideó un sistema denominado balance hidrofílico-lipofílico conocido como HLB, mediante un sistema numérico de índices de manera que en cuanto más grande sea ese valor, mayor es su carácter hidrofílico. Así, los surfactantes Span® tienen valores de HLB bajos (de 1,8 a 8,6). Los surfactantes Tween® presentan valores de HLB altos (9,6 a 16,7). La clasificación y aplicación de los surfactantes de acuerdo con su HLB se detalla en la Figura III.5 (Hait, *et al.*, 2001).

Comportamiento en agua		Aplicaciones	
Hidrófilos	Disolución	19	Solubilizantes
		18	
		17	
		16	
		15	
	Translúcida /clara	14	Detergentes
		13	
		12	
		11	
		10	
Hidrófobos	lechosa estable	9	Emulsificante O/W
	Lechosa con agitación energética	8	
		7	
		6	
	Poca	5	
	Ninguna	4	Emulsificante W/O
		3	
		2	
		1	Antiespumantes
		0	

Figura III.5 Clasificación de los surfactantes de acuerdo a su valor de HLB
Adaptado de (Gómez Vega Aurea Guadalupe 2014)

Para la formación de NE, se requiere el suministro de energía como se resume en la **Figura III.3**. Las NE denominadas de **alta energía**, por medios mecánicos, empleando homogeneizadores de alta presión, agitación a altas velocidades o aplicación de ultrasonido de alta intensidad. Las NE de **baja energía** se forman debido a la energía provista por el potencial químico de los componentes y/o los cambios de fase experimentados durante la preparación de las mismas (Ozogul *et al.*, 2022). Los métodos de baja energía permiten obtener NE de tamaño de gota pequeño con baja polidispersidad. Cuando se cambian las variables en un sistema que se encuentra en equilibrio termodinámico, éste pasa a un estado de desequilibrio bajo tales condiciones, se traduce en transiciones de fases, formándose emulsiones con pequeño tamaño de gota o nanoemulsiones (Fornaguera y Solans 2016a; García-Celma *et al.*, 2016). Entre los métodos físico-químicos utilizados para la formación de NE de baja energía se encuentra el método de inversión de fase o PIC (*Phase Inversion Composition*). Este

método, consiste en la inversión de fases, pasando de una emulsión W/O a una O/W por adición de agua en sistemas constituidos por agua/surfactante/aceite, a temperatura constante y sin necesidad de aplicar alta energía. Es importante realizar previamente detallados estudios de comportamiento de fases con la finalidad de identificar zonas de cristal líquido laminar y micro-emulsiones bicontinuas, dado que tienen un papel muy importante en la formación de las nanoemulsiones (Alshahrani 2022; Ozogul *et al.*, 2022; Solans *et al.*, 2005).

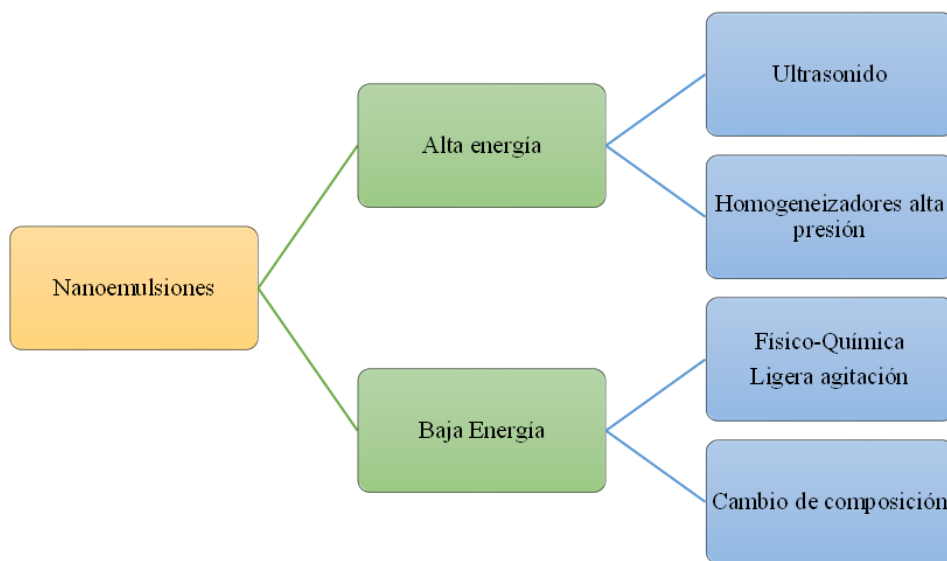


Figura III.6 Representación de la clasificación de las NE
Clasificación de la energía requerida para la formación de NE

Las NE son un enfoque atractivo para la administración de PA antivirales en el tratamiento de diversas infecciones producidas por virus, son relativamente sencillas de desarrollar a partir de diversos y variados componentes, muchos de los cuales presentan propiedades biofísicas que podrían aumentar la eficacia de la terapia en medicamentos, representando un enfoque promisorio para el tratamiento de infecciones virales (Halima *et al.*, 2022). Los resultados que se presentan en este capítulo corresponden al trabajo realizado en el Laboratorio de Química Coloidal e Interfacial del Centro de Investigaciones en Materiales Avanzados (CIMAV), Unidad Monterrey, México el cual fue dirigido por la Dra. Margarita Sánchez Domínguez. Los ensayos de internalización e interacción celular se realizaron en el Laboratorio “NanoImmuno Therapies”, perteneciente al Grupo de Ingeniería de Materiales, del Instituto de Química de Sarrià (IQS), Universidad Ramon Llull, Barcelona, España y fueron dirigidos por la Dra. Cristina Fornaguera.

III.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.2.1 HIPÓTESIS:

- Es posible mejorar la eficiencia de encapsulación del MPA usando NE de baja energía como plantilla para la obtención de NP-PLGA.

III.2.2 OBJETIVO GENERAL:

- Obtener NP poliméricas, usando NE como plantilla, para generar sistemas avanzado de entrega de PA.

III.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Formular NE O/W por el método de PIC de baja energía en base a la composición adecuada para presentar baja toxicidad: solvente, polímero y surfactante.
- Caracterizar la NE, principalmente tamaño de gota, $\text{pot-}\zeta$ y estabilidad.
- Caracterizar las NP poliméricas luego de la evaporación de solventes mediante distribución de tamaño de gota, carga superficial y estabilidad.
- Encapsular PA en las NP-PLGA, para formar sistemas avanzados de administración de medicamentos hidrofóbicos.
- Evaluar el efecto biológico, toxicidad, interacción con componentes sanguíneos y su actividad antiviral en modelos de infección *in vitro*.

III.3 MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1 MÉTODOS

III.3.1.1 PREPARACIÓN DE NE POR EL MÉTODO DE COMPOSICIÓN DE INVERSIÓN DE FASE

Para la obtención de las NP-PLGA se empleó el método de preparación por inversión de fase (PIC). La región de dominio de formación de la NE fue establecida por los reportes de los diagramas de fases descritos en Fornaguera *et al.*, (2015). La fase acuosa (W) estuvo compuesta por PBS y sales de sodio 0,16 M, la fase oleosa (O) estuvo conformada por una mezcla de surfactantes (S) Tween®80 (ref# P4780, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y el polímero D, L-poli(láctico-co-glicólico) PLGA, con una relación láctico/glicólico de 75/25 (ref# 719919 Resomer® RG 752 H, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). En la **Figura III.7** se esquematiza el protocolo de obtención de las NE.

Las relaciones empleadas fueron, 60:40, PLGA y Tween®80 respectivamente y para la formación de la NE fue 90:10, O: W, respectivamente. Se siguió el protocolo propuesto en Fornaguera *et al.*, 2015 y Fornaguera y Solans, 2016. La fase oleosa se colocó en un tubo cónico (**Figura III.7A**), se homogeneizó con vórtex mixer análogo (Fisherscientific™) a velocidad máxima 4500 x g, se añadió gota a gota el PBS 0,16 M a un caudal de 0,90 mL/min (**Figura III.7B**) dosificado con una bomba de infusión (KDS100, Legacy, Fisherbrand™), y se mantuvo en agitación continua usando un vórtex mixer a velocidad máxima 4500 x g para obtener la NE O/W (**Figura III.7C**).

Para separar y purificar las NP-PLGA, se evaporó el acetato de etilo por agitación magnética a 2000 x g por 4 h en un vaso de precipitación cubierto con papel de aluminio perforado. Se adicionó agua ultra pura hasta llegar al peso inicial (**Figura III.7D**), se homogenizó suavemente y se centrifugó a 22000 x g (ClassSXL-90 Beckman, Alemania). Se descartaron los sobrenadantes y se repitió el proceso dos veces más. Las NP aisladas del pellet se re-suspendieron (**Figura III.7E**) en 5 mL de agua ultra pura en condiciones de esterilidad. Se realizaron tres ciclos de sonicación de 15 s, a una frecuencia de 20 kHz, con una potencia total de 125 W, usando ultrasonido con baño de hielo (Qsonica, EEUU). Para la encapsulación de MPA y CUR se adicionó 0,1% (p/p) de los PA en la fase oleosa. Cada formulación individual se preparó al menos tres veces para probar la reproducibilidad

del sistema. Las NE se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se tomaron alícuotas de 1 mL para someterlas a las distintas técnicas de caracterización (Fornaguera y Solans, 2016).

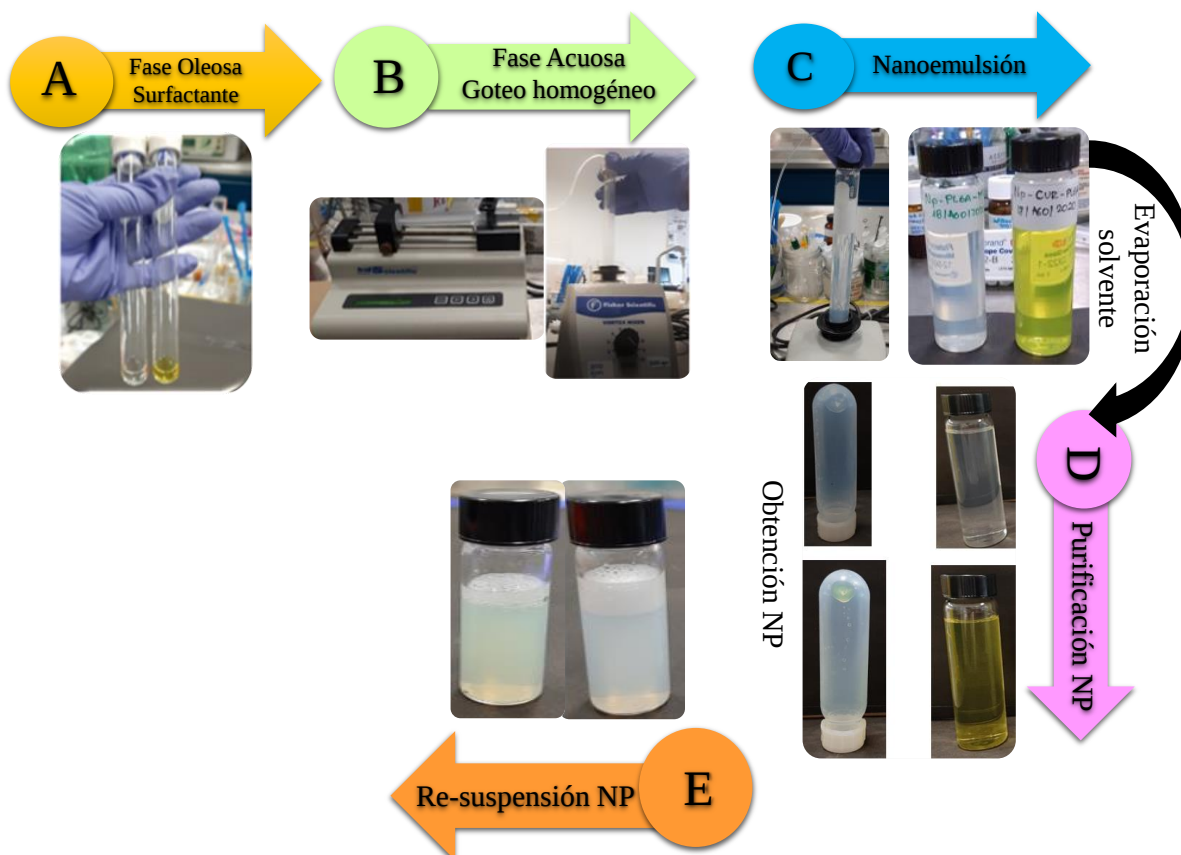


Figura III.7 Formación de NE por el método de composición inversa de fase PIC y purificación de las NP-PLGA. A) Pesaje de los componentes de la fase oleosa; B) goteo controlado con agitación máxima de la fase acuosa sobre la oleosa; C) formación de NE con su color característico traslúcido; D) purificación y obtención de NP-PLGA-MPA y NP-PLGA-CUR (amarilla); E) re-suspensión NP-PLGA-MPA y NP-PLGA-CUR.

Las NP-fluorescentes o NP-PLGA-FITC se obtuvieron siguiendo la misma metodología y adicionando el polímero marcado con la sonda FITC (ref# 908649, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en relación 1:1 (p/p) con el polímero no fluorescente. Se realizó esta modificación debido a que la sonda FITC es tóxica para los cultivos celulares y debe usarse en concentraciones mínimas, esta metodología fue desarrollada y puesta a punto para este trabajo en el laboratorio de la Dra. Fornaguera.

III.3.1.2 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTAS Y NP-PLGA

Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS, mediante el cual se obtuvo la distribución de tamaño de gota y el $\text{pot-}\zeta$. El h_o de las gotas de las NE y de las NP-PLGA aisladas y purificadas, se determinó según lo detallado en el capítulo **MM.1.5.1**. Para la preparación de las muestras de NP-PLGA, las alícuotas separadas fueron centrifugadas a $14857 \times g$, (5804R Eppendorf, Alemania) por 30 min a 25°C en tres oportunidades para eliminar los residuos de surfactante. Los pellets fueron re-suspendidos en agua ultra pura y se determinó el h_o de las gotas y de las NP empleando diluciones 1:100 (v/v) en agua ultra pura previamente filtrada ($0,22 \mu\text{m}$), empleando una cubeta con las cuatro caras transparentes (Achilli E., 2020; Arrua Eva C., 2018; Gallegos Tabanico Amed, 2017).

III.3.1.3 PREPARACIÓN DE NP-PLGA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN CON UNIDAD DE BARRIDO (STEM)

La morfología y tamaño de las NP-PLGA fue determinada mediante el modo STEM que combina los principios de TEM y MEB utilizando el un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo en alto vacío, con una resolución de 1 nm a 30 kV (Nova Nano SEM 200, FEI), disponible en CIMAV, México. En todos los casos se compararon las micrografías obtenidas con las NP sin AP. Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el programa ImageJ 1,52v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Los diagramas de dispersión se realizaron en el programa Origin, (OriginLab Corporation).

III.3.1.4 EfE CONTENIDO DE PA EN LAS NP-PLGA

Para las NP-PLGA, la EfE se calculó, a partir de la **Ec. MM.5**. El MPA fue cuantificado como se describe en la Sección **MM.1.1.1** y la CUR como se describe en la Sección **MM.1.2.2**. Las NP-PLGA aisladas y purificadas fueron liofilizadas por 48 h. Se colocaron 5 mL de suspensión de NP en viales de vidrio pesados previamente y se congelaron a -20°C por 24 h. Luego los viales semi tapados se liofilizaron (FreeZone 2,5 Liter Benchtop Freeze Dryer, Labconco) a 0,09 mbar y -150°C . Se tomaron 6 mg de NP-PLGA y de NP-PLGA-MPA y se disolvieron en 3 mL de NaOH, 0,50 M a

37 °C en agitación constante por 48 h para liberar el PA (**Figura III.8**). La concentración de MPA y CUR se cuantificó por espectroscopía de fluorescencia.

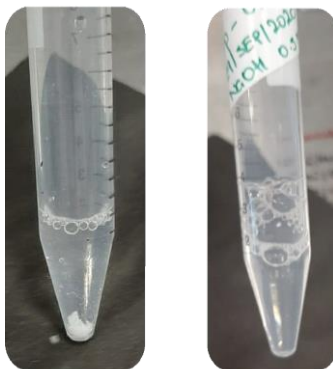


Figura III.8 NP-PLGA en NaOH 0.5 M
T₀ NP-PLGA insolubles. T₄₈ NP-PLGA disueltas

En el caso de las NP-PLGA-CUR, la liberación del AP se midió mediante filtración/centrifugación indirecta por diferencia de concentración, colocando aproximadamente 4 ml de los sobrenadantes obtenidos en la purificación y separación de las NP-PLGA-CUR, en unidades de filtración Amicon® Ultra-4 (ref. # UFC801024, Millipore, Alemania) con un MWCO 3 KDa. Se centrifugó por 60 min a 4400 x g. La CUR libre se cuantificó por espectroscopía de fluorescencia como se describe en **MM.1.2.2 (Figura III.9)**. Los resultados se expresan como eficiencia de encapsulación en porcentaje, así como mg PA/g PLGA y mg PA/mg NP, según corresponda.



Figura III.9 Unidades filtrantes para separar y purificar las NP-PLGA-CUR del PA no encapsulado
NP-PLGA-CUR (izquierda) y CUR libre (derecha)

III.3.1.5 ESTABILIDAD DE LAS NP-PLGA SEGÚN SU ALMACENAMIENTO

Se determinó la distribución de tamaño midiendo el *h_o* de las NP y de las suspensiones coloidales como se describió en la **MM.1.5.1**. El tamaño de gota y el tamaño de NP se midieron en función del tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas: 25, 4 y -20 °C. Las muestras se midieron sin agitación previa, con el objetivo de estudiar sus procesos de migración y desestabilización.

III.3.1.6 LIBERACIÓN DEL PA

La liberación de MPA se estudió en solución acuosa, la liberación del MPA contenido en las NP-PLGA-MPA se llevó a cabo con una simulación de pH fisiológico y temperatura de 37 °C. Se tomaron muestras en distintos tiempos: 15 y 30 min, 1, 1,5, 4, 8, 24 y 48 h empleándose una solución receptora estéril de PBS 0,10 M pH 7,40 (ref. # P4417 Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania). La diálisis se realizó en los dispositivos Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2 Spectrum™G235029 (ref.#11531160, Thermo Scientific, Madrid, España) con una membrana compuesta de éster de celulosa de grado biotecnológico con un MWCO de 3,5 a 5 KDa (**Figura III.10**).

Se tomaron alícuotas de 500 µL de la solución receptora para MPA a intervalos controlados de tiempo y se analizaron y cuantificaron mediante espectroscopía de fluorescencia. Los resultados experimentales se ajustaron mediante el modelo adecuado contemplando todos los tiempos evaluados (Fornaguera, 2014). Las NP-PLGA-MPA se concentraron por centrifugación como se describe en **III.3.1.1** y se destruyeron como se describe en **III.3.1.4** para verificar las concentraciones liberadas. Los porcentajes de liberación se calcularon con la ecuación **Ec. III.1**.

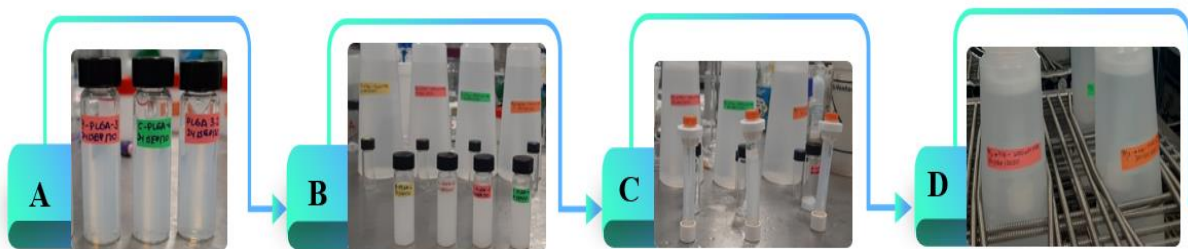


Figura III.10 Esquema liberación de MPA

A) NP-PLGA, B) preparación de los contenedores receptores, C) llenado de los sistemas de diálisis con NP-PLGA, D) receptores con sistemas de diálisis

$$\% \text{ Liberación} = \left(\frac{\text{mg MPA experimental}}{\text{mg MPA teórico}} \right) * 100 \quad \text{Ec III.1}$$

III.3.1.7 CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad se determinó tal como se describe en las secciones **MM.9.1** y **MM.9.2**, empleando concentraciones de NP de 1000, 100, 10 y 1 µg/mL.

III.4 RESULTADOS

III.4.1 FORMACIÓN DE NE

III.4.1.1 MÉTODO PIC

Se empleó el método de PIC para obtener NE que sirvan como molde/plantilla en la generación de NP-PLGA para aplicaciones biomédicas. Se inició esta etapa evaluando la influencia de las propiedades fisicoquímicas de los componentes de la NE. El sistema estuvo compuesto por: una fase acuosa PBS (W) / tensioactivo polisorbato 80 (S) / fase oleosa PLGA 4% (p/p) en acetato de etilo (O), tal como se muestra en la **Figura III.11**. La mezcla de estas fases fue por goteo y agitación constante, dando como resultado una NE con gotas de aceite formadas por el empaquetamiento del surfactante en la interfase W/O, permitiendo su dispersión en la fase acuosa. Posteriormente, se evaporó el surfactante con agitación constante para endurecer las gotas oleosas. Se evaporó el solvente y se añadió agua ultra pura para endurecer las gotas de aceite y finalmente purificar las NP-PLGA con y sin PA.

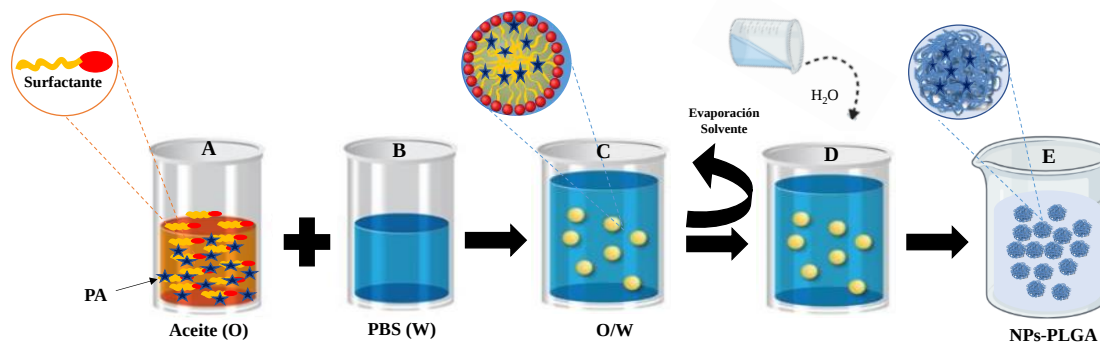


Figura III.11 Representación de los componentes de una NE O/W
A) Fase oleosa: PLGA en acetato de etilo + Tween®80 + PA + S; B) fase acuosa: PBS 0,16 M; C) NE O/W; D) evaporación del solvente y adición de agua ultra pura; E) NP-PLGA.

III.4.1.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS IONES FOSFATO SOBRE LA NE

Uno de los factores clave en la formación de NE es la determinación de la concentración ideal de iones fosfato y sodio que permita obtener un sistema estable en el tiempo con un tamaño de gota

apropiado. Luego de probar distintas condiciones, se usó PBS 0,20 M, 0,16 M y agua ultra pura. La fase oleosa consistió en PLGA de bajo peso molecular 4% (p/p) en acetato de etilo que es un disolvente apolar.

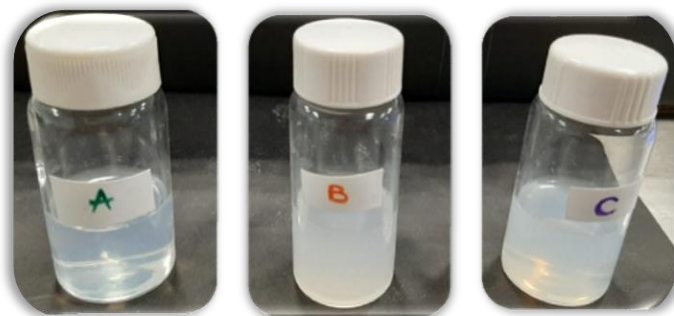


Figura III.12 Aspecto macroscópico de las NE.
A) PBS 0,016 M; B) agua ultra pura; C) PBS 0,20 M

La observación a la escala macro es la fase inicial (**Figura III.12**), que permite estimar cuál de las condiciones es la que se busca. **A)** presentó un tamaño de gota de $43,6 \pm 0,47$ nm, un $\text{pot-}\zeta = -17,5 \pm 0,45$ y un tono traslúcido azulado que se mantuvo ópticamente estable en el tiempo a 25 °C. En el caso del vial **B)**, el tamaño de gota fue de $131,2 \pm 0,82$ nm con un $\text{pot-}\zeta$ de $-0,39 \pm 0,96$, su color fue blanquecino turbio y se observó la precipitación de partículas a las 48 h a 25 °C. En el vial **C)**, el tamaño de gota fue de $7,09 \pm 0,11$ nm con un $\text{pot-}\zeta$ de $-20,4 \pm 0,49$, presentó un color opaco turbio, en el que después de 24 h a 25 °C se produjo separación de fases. Se muestra la distribución del h_o , obtenido por DLS en la **Figura III.13**.

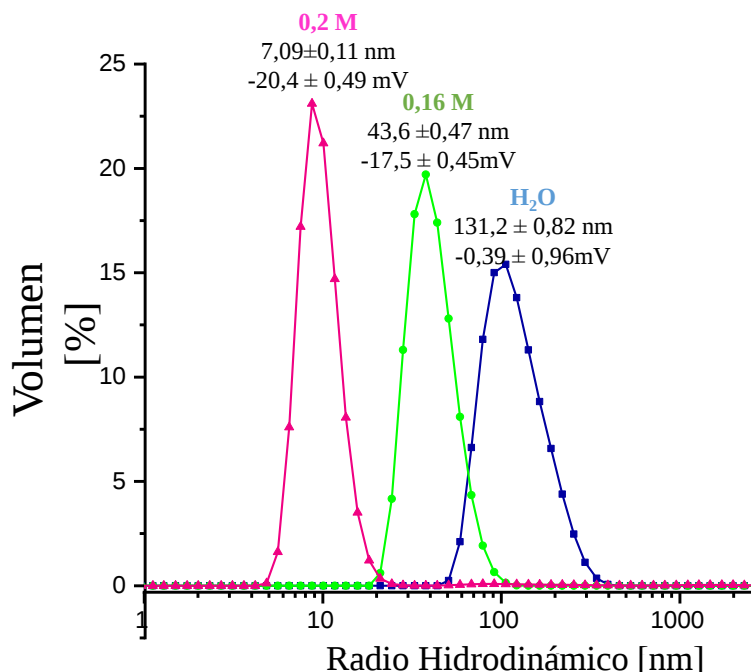


Figura III.13 Distribución del h_0 (tamaño de gota) de las distintas NE Vial A (verde), vial B (azul), vial C (rosa). Los resultados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de al menos tres lotes independientes de NE.

Dado que el tamaño de gota está influenciado por los iones presentes en la fase acuosa y por las concentraciones de polímero y surfactante, el siguiente paso fue determinar de la relación surfactante (S): fase oleosa (O) [S:O]. Se genera un compromiso entre la toxicidad de los distintos surfactantes y las relaciones entre S:O ideales para mantener la estabilidad de la NE, el tamaño de gota y tener una cantidad de masa suficiente para los ensayos posteriores. En la **Tabla III.1** se muestran varias relaciones masa:masa de S:O para las distintas NE y el tamaño de las gotas en cada una. La relación A) 40:60, fue la que cumplió con las condiciones requeridas de h_0 de 43,81 nm y un PdI de 0,259. Los datos evidencian que el IPd se incrementó a medida que aumentó la masa de surfactantes.

En la **Figura III.14**, se muestra la transición de translúcido azulado a blanquecino (A-D) a medida que incrementa la masa del surfactante. En el caso en el que la cantidad de fase O es mínima se observaron precipitados (E y F), indicando que no existe NE. Se establecieron las condiciones, PBS 0,16 M y O:S de 60:40 para la formación de NE estables con un tamaño de gota nanométrico y así continuar con la determinación de la mejor estrategia para incorporar los PA de interés en el sistema de la NE.

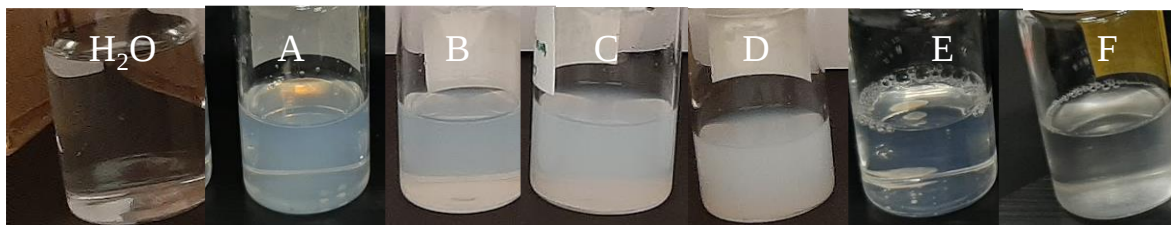


Figura III.14 Aspecto macroscópico de las NE
Distintas relaciones S:O detalladas en la **Tabla III.2**.

Dado que el MPA es un compuesto hidrofóbico soluble en solventes orgánicos como ETOH y DMSO, se evaluaron varias estrategias para adicionarlo en la NE y, de esta manera, lograr encapsularlo. Es importante mencionar que la estrategia por la cual se adicione el PA no debe alterar el equilibrio de la NE. Por ello fueron descartadas estrategias que incluían solventes como DMSO, acetona y acetato de etilo dado que produjeron precipitación, separación de fases o inestabilidad en la NE. En base a esto, la mejor opción fue disolver el PA en ETOH y adicionarlo a la fase oleosa de la NE sin sobrepasar el 10% (p/p) del total de esta fase. La distribución de tamaño de gota de las NE resultó monomodal luego de 5 días de almacenamiento a 25 °C, con *PdI* entre 0,215 -0,295. La NE sin ETOH presentó un h_o de $44,05 \pm 0,56$ nm y la NE con ETOH un h_o de $55,01 \pm 0,48$ nm (**Figura III.15**).

Tabla III.1 Relación O:S

Z-ave y *PdI* de las gotas de aceite dispersas de la NE en función de las relaciones masa:masa evaluadas para su formación.

Muestra	(S) Tween®80	(O) PLGA:ACET 4% (p/p)	<i>PdI</i>	Z- ave (nm)
A	40	60	0,259	43,81
B	50	50	0,223	146,00
C	60	40	0,374	396,20
D	70	30	0,531	262,80
E	80	20	0,623	16,50
F	90	10	0,424	7,99

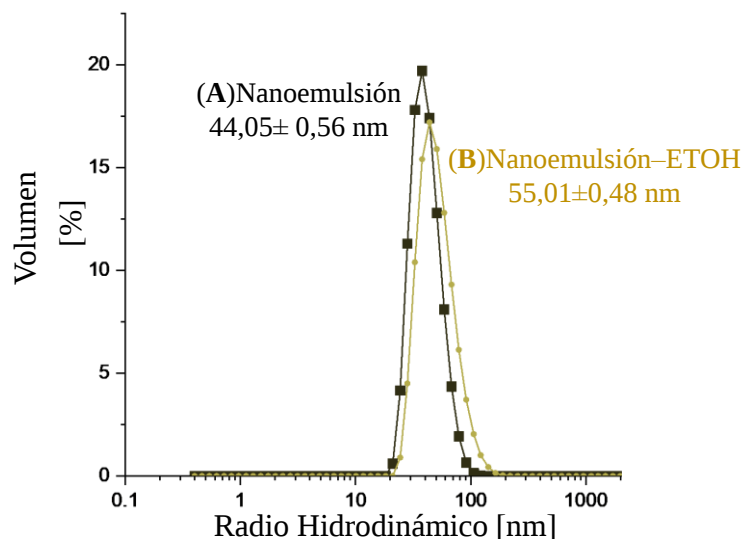


Figura III.15 Distribución de tamaños de gota de las NE

A) NE sin etanol; B)NE con ETOH. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de al menos tres lotes independientes de NE.

Secuencialmente, después de determinar que el ETOH no alteraba la formación de la NE y ni el tamaño de gota, se adicionaron a la fase oleosa los PA disueltos en ETOH y se analizó el tamaño de gota y el pot- ζ . En la **Figura III.16** se muestra la distribución de tamaño de gota de la NE con ETOH y los PA disueltos en ETOH. Se observó una ligera distribución de tamaño en la distribución monomodal, con Z-ave de $56,06 \pm 0,80$ nm y un pot- ζ de $-16,02 \pm 0,22$, luego de 48 h de almacenamiento a 25 °C.

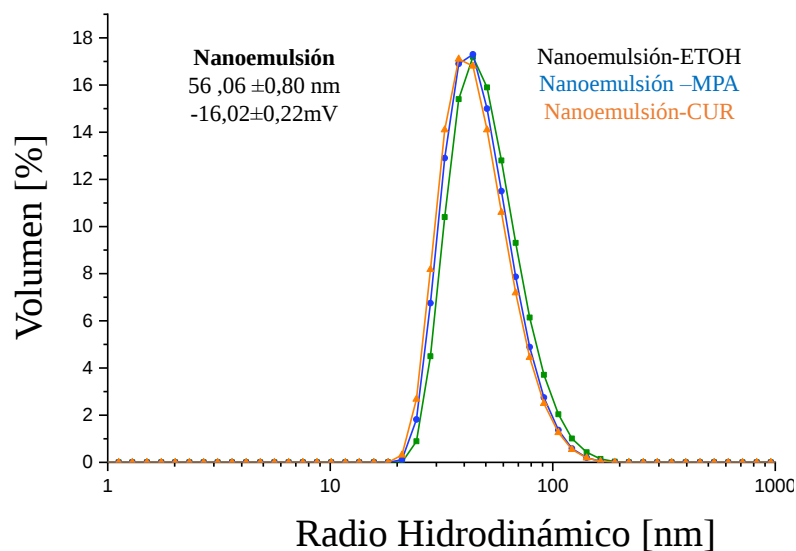


Figura III.16 ho de las gotas en la NE con PA en ETOH

Finalizado este tiempo, se aislaron y purificaron las NP-PLGA para su caracterización. Otras muestras fueron almacenadas por 30 días para evaluar la estabilidad de la NE en el tiempo. En la **Tabla III.2** se observa la distribución de tamaño de las gotas en la NE y su pot- ζ .

Tabla III.1 Distribución de tamaño gota de las NE

Tamaño de gota de la NE con ETOH y con PA disuelto en ETOH

Nanoemulsión	Radio hidrodinámico (nm)*	pot- ζ (mv)*
NE- PLGA	58,92 $\pm$ 7,25	-16,61 $\pm$ 0,91
NE-PLGA-MPA	54,27 $\pm$ 5,15	-16,35 $\pm$ 0,62
NE-PLGA-CUR	54,46 $\pm$ 9,56	-16,25 $\pm$ 0,72

* Promedio $\pm$ DE, n=3 (muestras de lotes independientes de NE)

En el caso de las NE-CUR, al ser la curcumina soluble en ETOH permitió aplicar las condiciones establecidas para el sistema con MPA para encapsular este PA, obteniéndose una solución amarilla translúcida (**Figura III.17**).

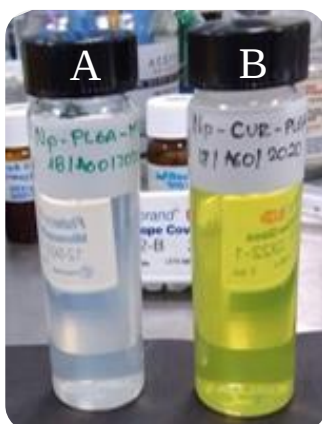


Figura III.17 Aspecto macroscópico de las NE-PA
A) NE-MPA, B) NE-CUR

III.4.2 CARACTERIZACIÓN DE NP-PLGA

La caracterización morfológica de las NP-PLGA obtenidas usando la plantilla de NE se realizó por la técnica de microscopía electrónica en modo STEM debido a que las muestras orgánicas no

presentan el mismo contraste que una muestra inorgánica metálica. Las NP-PLGA fueron teñidas de manera negativa para mejorar el contraste. Para las NP-PLGA sin PA se obtuvo una dispersión monomodal y un histograma con distribución centrada en $29,05 \pm 0,70$ nm. Para el caso de las NP-PLGA-PA, en general, se observó un campo de partículas uniforme en cuanto a tamaño y aspecto general, bordes, rugosidad superficial. Debido a que las NP-PLGA son susceptibles a la degradación y fractura, y al usar una técnica de observación no estándar, los resultados mostrados evidenciaron que su morfología no fue alterada y que puede emplearse esta técnica como alternativa para su caracterización. En la **Figura III.18** se muestran las micrografías de las NP-PLGA con y sin PA y los histogramas de distribución de tamaño.

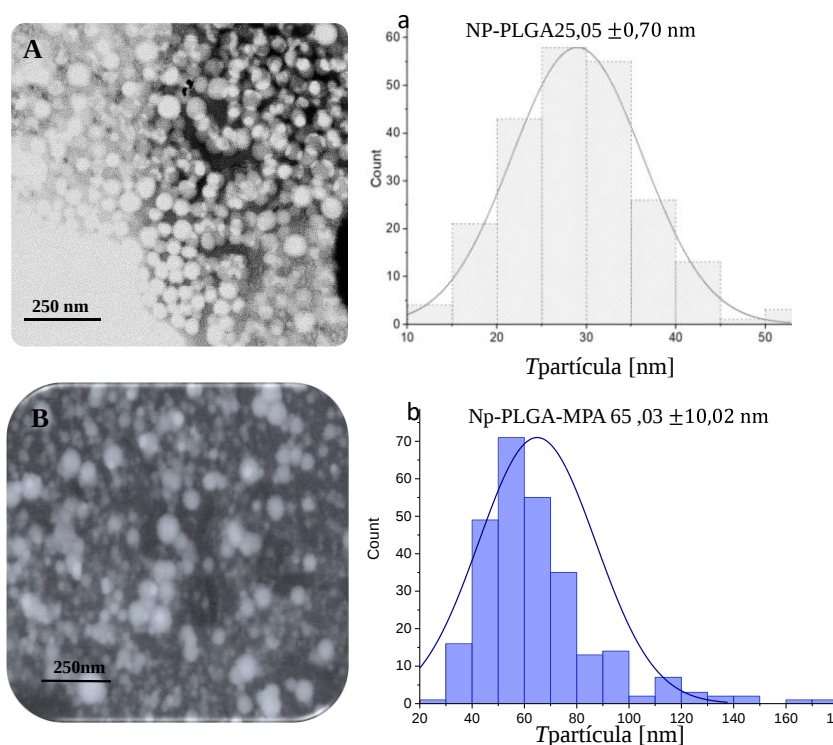


Figura III.18 distribución de tamaño de NP-PLGA
Micrografía (A) e histograma de distribución de tamaño (a) de NP-PLGA sin PA
Micrografía (B) e histograma de distribución de tamaño (b) de NP-PLGA- MPA

III.4.3 ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Dado que la evaluación del efecto biológico de las NP-PLGA se realizaría durante un período de tiempo de varios meses, y que además este tipo de partícula no poseen ninguna clase de cubierta que limite la liberación del PA, se analizó el efecto que podría ejercer el congelamiento sobre el tamaño

de las NP-PLGA. Se tomaron muestras de las diferentes NP-PLGA y se almacenaron por diferentes tiempos a distintas temperaturas. Los resultados obtenidos (Tabla III.3, Figura III.19) demuestran un aumento del tamaño al mayor tiempo evaluado (2 meses) tanto para las que contienen como las que no contienen PA, y que se mantiene la homogeneidad dado que se observó una dispersión monomodal.

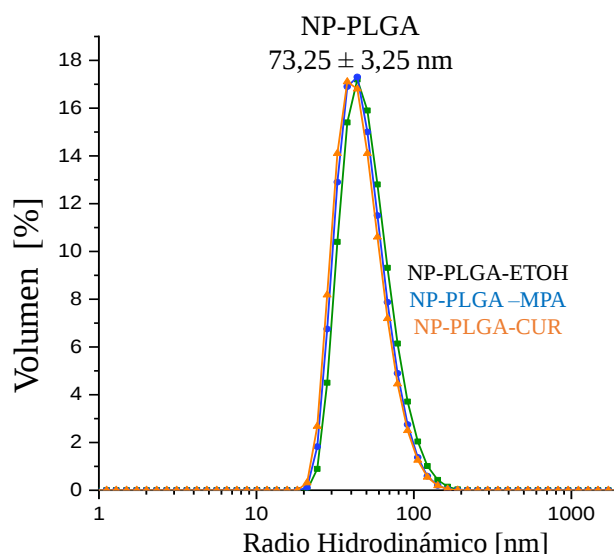


Figura III. 1 NP-PLGA en distintas condiciones de almacenamiento. Distribución de tamaño de partícula expresado en volumen. Los resultados corresponden al promedio $\pm$ DE de tres lotes independientes de NP.

Tabla III.3 Condiciones de almacenamiento NP-PLGA

Almacenamiento	Muestra	Z-Ave (nm)*	Pot- ζ (mV)*
Re-suspensión 4°C (2 meses)	NP-PLGA-MPA	74,52 $\pm$ 2,25	-29,63 $\pm$ 1,77
	NP-PLGA-CUR	73,42 $\pm$ 1,85	-30,61 $\pm$ 2,59
Re-suspensión -20 °C (2 meses)	NP-PLGA-CUR	72,01 $\pm$ 3,19	-39,03 $\pm$ 1,17
	NP-PLGA-MPA	73,59 $\pm$ 4,22	-29,83 $\pm$ 5,16

* Promedio $\pm$ DE, n=tres de lotes independientes de NP-PLGA

III.4.4 EfE

La determinación de *EfE* del MPA se realizó por un método directo destruyendo las NP-PLG con y sin MPA y luego cuantificando el PA por espectroscopía de fluorescencia ex. $\lambda = 342$ nm. $\lambda = 425$ nm. Se

trabajaron muestras por triplicado y se usaron tres lotes distintos de NP-PLGA. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura III.20**, resultando la *EfE* de MPA de $22,22 \pm 4.89$ %.

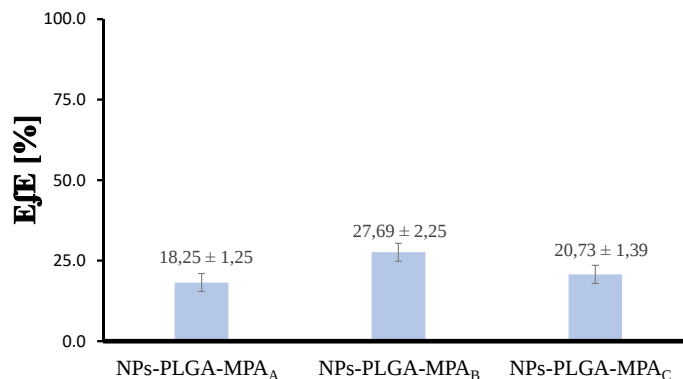


Figura III.20 *EfE* de NP-PLGA-MPA

La *EfE* de NP-PLGA para MPA. MPA fue cuantificado de manera directa degradando las NP-PLGA-MPA después de 48 h. Los resultados mostrados corresponden al promedio $\pm$ DE de tres lotes independientes de NP-PLGA-MPA.

En el caso de las NP conteniendo CUR la cuantificación fue indirecta, se determinó la cantidad de PA libre por espectroscopía UV-VIS a $\lambda = 425$ nm utilizando los sobrenadantes de la purificación de las NP. Los resultados se muestran en la **Figura III.21**, la *EfE* de CUR igual a 55 ± 5 %.

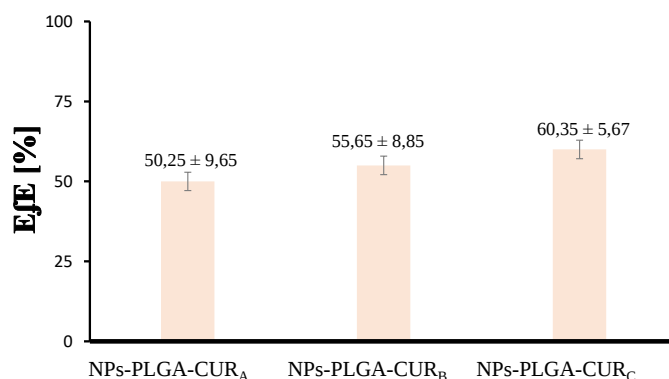


Figura III.21 *EfE* de NP-PLGA-CUR

Los resultados corresponden al promedio $\pm$ DE de tres lotes independientes de NP-PLGA-CUR.

III.4.5 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL PA

Debido a que el MPA es un PA poco soluble en agua se presentaron varios inconvenientes que obligaron a modificar las condiciones descritas en la bibliografía disponible. El MPA comenzó a liberarse a partir de 1,5 h y la totalidad de carga fue liberada a las 24 h cómo se muestra en la **Figura III.22**. El porcentaje de liberación inicial estuvo alrededor de $\%L = 26,25 \pm 1,5$ hasta llegar al 100%. El modelo aplicado respondió a un comportamiento similar sigmoidea de liberación de MPA.

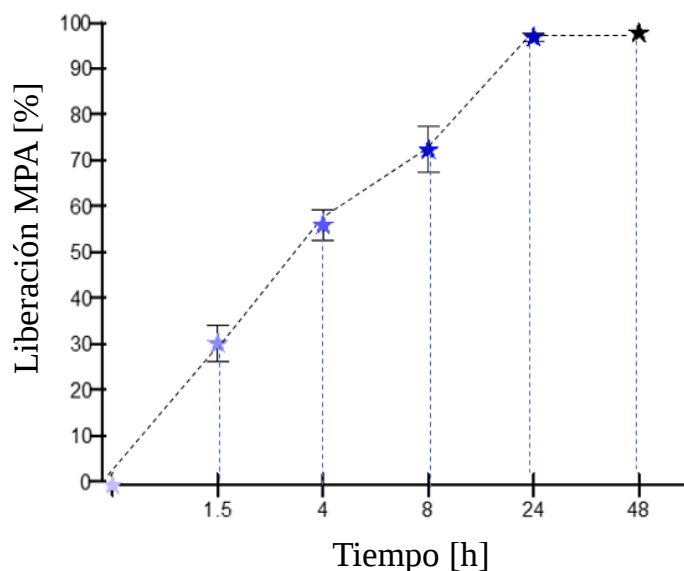


Figura III.22 Liberación de MPA

Concentración acumulada de MPA en función del tiempo en condiciones fisiológicas. Cada punto representa la media $\pm$ DE, n=dos medidas independientes, de experimentos independientes provenientes de 3 lotes de NP-PLGA distintos.

III.4.6 ENSAYOS BIOLÓGICOS

En esta sección se describen los estudios *in vitro* de las NP diseñadas para evaluar su posible uso como nanodispositivos terapéuticos. Se detallan los estudios de citotoxicidad, actividad antiviral y de reacción con proteínas séricas.

III.4.6.1 CITOTOXICIDAD DE CUR Y NP-PLGA

Para evaluar el efecto tóxico de CUR y de las NP-PLGA sobre las células, se realizó el ensayo de viabilidad celular (MTT) luego de 48 h de tratamiento. Los resultados se encuentran resumidos en la **Tabla III.4**, para CUR libre y en la **Tabla III.5** para las NP-PLGA con y sin PA.

Tabla III.4 Citotoxicidad de CUR libre

Línea celular	CC ₅₀ * CUR	
	μM	ng/mL
Vero	65,23 ± 0,49	24135,10 ± 490,03
A549	54,53 ± 0,51	20176,12 ± 510,63
Huh-7	52,52 ± 0,25	19432,4 ± 250,50

* Los resultados corresponden a la media ± DE, de tres experimentos independientes realizados con cada uno de tres lotes distintos de NP-PLGA.

Para poder establecer el rango de concentraciones apropiadas para los estudios posteriores, inicialmente se determinó el nivel de citotoxicidad en cultivos de células humanas A549. Se debe mencionar que la citotoxicidad se ha realizado en el presente estudio con las NP preparadas y purificadas, que corresponde a NP-PLGA no cargadas, cargadas con MPA y CUR. Se evaluaron concentraciones crecientes de 2 a 2000 μg/mL de NP-PLGA, cargadas con MPA o CUR y sin PA por períodos de 24 a 96 h utilizando el método de MTT.

Los resultados de absorbancia se utilizaron para calcular el porcentaje de viabilidad celular respecto a un control sin tratar y se determinaron así las concentraciones citotóxicas 50% (CC₅₀) para cada uno de los sistemas, es decir, concentración de NP-PLGA que producen la muerte del 50% de las células presentes en el cultivo tratado. Los resultados se resumen en la **Tabla III.5**. Las NP-PLGA en sus diferentes formulaciones demostraron no ser citotóxicas en las concentraciones evaluadas.

Tabla III.5 Citotoxicidad de las NP-PLGA a 48 h

Tiempo de tratamiento	Sistema	CC50
		[mg/mL]
24 h	NP-PLGA	631 ± 2,10
	NP-PLGA-MPA	564 ± 3,10
	NP-PLGA-CUR	213 ± 2,40
48 h	NP-PLGA	612 ± 1,25
	NP-PLGA-MPA	512 ± 2,10
	NP-PLGA-CUR	205 ± 3,60
72 h	NP-PLGA	626 ± 1,24
	NP-PLGA-MPA	501 ± 1,89
	NP-PLGA-CUR	212 ± 2,01
96 h	NP-PLGA	634 ± 1,50
	NP-PLGA-MPA	498 ± 2,46
	NP-PLGA-CUR	219 ± 1,89

* Los resultados corresponden a la media ± DE, de tres experimentos independientes realizados con cada uno de los tres lotes distintos de NP-PLGA.

III.4.6.2 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS PA LIBRES CONTRA HSV-1 Y VSV

Inicialmente se evaluó el efecto antiviral del MPA y CUR sin encapsular y se determinó la CI_{50} mediante ensayos de inhibición del efecto citopático causado por HSV-1 y VSV, en células Vero, A549 y Huh-7, tratadas con distintas concentraciones del PA (Tabla III.6 y Tabla III.7).

Tabla III.6 Actividad antiviral de CUR libre contra HSV-1 y VSV

Línea celular	HSV-1			VSV		
	CI_{50}^*		IS	CI_{50}^*		IS
	μM	ng/mL		μM	ng/mL	
Vero	35,24 ± 1,22	13038,80 ± 1202,50	1,85	45,38 ± 0,96	16790,63 ± 492,05	0,99
A549	12,54 ± 1,90	4638,91 ± 706,41	4,35	32,05 ± 0,82	11858,50 ± 705,23	1,70
Huh-7	10,25 ± 1,25	3792,50 ± 203,15	5,12	22, 14 ± 1,25	8191,8 ± 243,12	2,37

* Los resultados corresponden a la media ± DE, de tres experimentos independientes realizados con cada uno de los tres lotes distintos de NP-PLGA.

La CUR mostró tener efecto antiviral en concentraciones superiores a las reportadas para el MPA, resultando en bajos índices de selectividad (Tabla III.6). Las CI_{50} , fueron menores para HSV-1 que para VSV, en ambos casos se evidenciaron mejores resultados en la línea celular Huh-7. El MPA mostró efecto antiviral a bajas concentraciones contra ambos virus, en las tres líneas celulares

evaluadas, resultando en altos índices de selectividad (**Tabla III.7**). Las CI_{50} fueron similares para ambos virus en cada línea celular, mostrando el mayor efecto en la línea hepática Huh-7.

Tabla III.7 Actividad antiviral de MPA libre contra HSV-1 y VSV

Línea celular	HSV-1			VSV		
	CI_{50}^*		IS	CI_{50}^*		IS
	μM	ng/mL		μM	ng/mL	
Vero	$0,39 \pm 0,01$	$124,93 \pm 2,74$	1282	$0,52 \pm 1,25$	$166,58 \pm 13,74$	962
A549	$0,37 \pm 0,63$	$118,53 \pm 1,25$	1351	$0,49 \pm 2,25$	$156,97 \pm 23,74$	1020
Huh-7	$0,32 \pm 0,01$	$101,63 \pm 2,74$	1563	$0,42 \pm 0,95$	$134,54 \pm 30,63$	1190

* Los resultados corresponden a la media $\pm$ DE, de tres experimentos independientes realizados con cada uno de los tres lotes distintos de NP-PLGA.

III.4.6.3 EFECTO ANTIVIRAL DE LAS NP-PLGA-MPA CONTRA HSV-1 Y VSV

En base a los resultados obtenidos, lo siguiente fue evaluar el efecto protector de las NP-PLGA-MPA (**Figura III.23**) y NP-PLGA-CUR (**Figura III.24**) sobre cultivos de células Vero infectados con HSV-1 y VSV tratados de igual modo que con el MPA y CUR libre. En la **Figura III.23**, en **A**) se muestran los resultados de HSV-1 y en **B**) los de VSV. Los tratamientos con distintas concentraciones de NP-PLGA-MPA produjeron una protección de la acción citopática viral igual de significativa que en la máxima concentración de PA libre ensayada. A fin de determinar la equivalencia del PA en las NP-PLGA respecto al MPA libre, se valoraron los efectos protectores de tres concentraciones de NP-PLGA y se cuantificó la cantidad de MPA contenido en esas NP. La mayor concentración de NP-PLGA-MPA usada fue $100 \mu g/mL$ conteniendo $47,41 ng/mL$ de MPA, $10 \mu g/mL$ de NP-PLGA-MPA con $4,74 ng/mL$ y la menor concentración evaluada de $1 \mu g/mL$ con $0,47 ng/mL$ de MPA. Las NP-PLGA sin PA mostraron menor viabilidad celular que el CV, pudiendo descartar un efecto protector de las NP vacías.

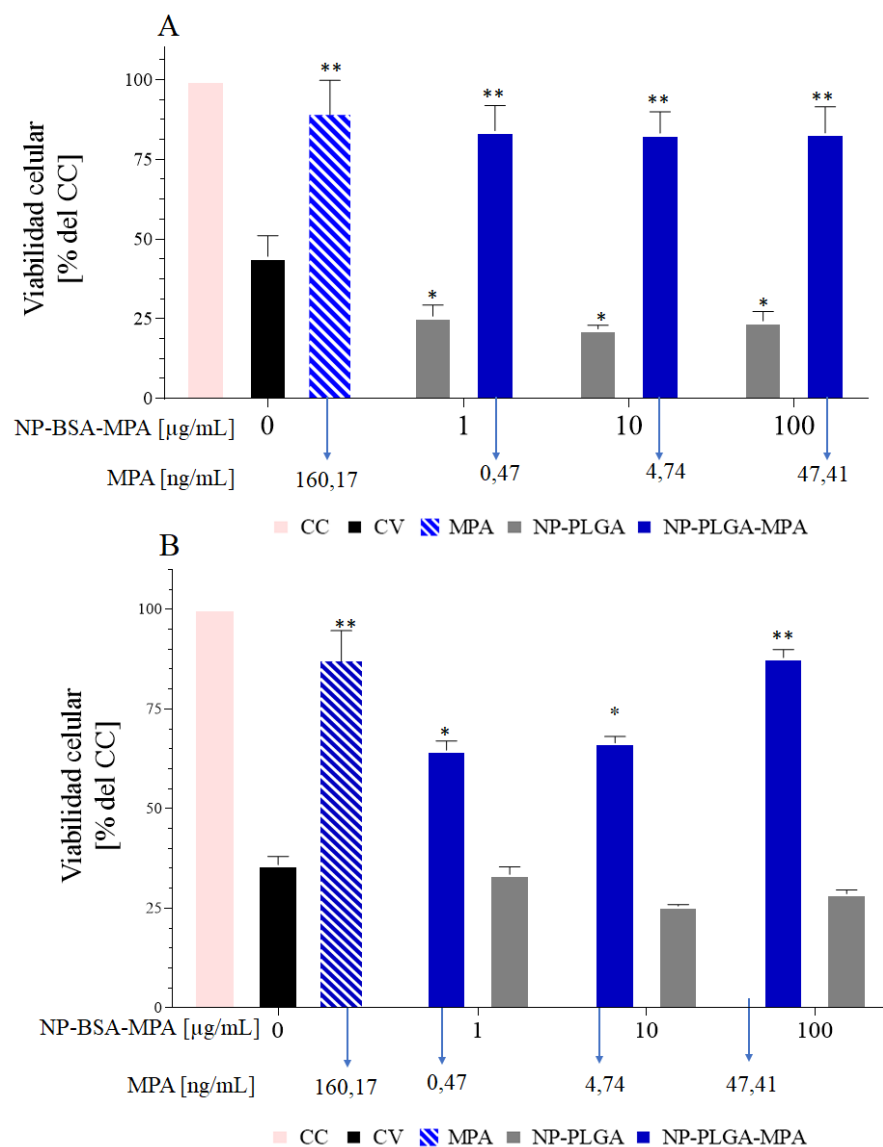


Figura III.23 Efecto protector de NP-PLGA-MPA sobre la acción citopática de **A)** HSV-1 y **B)** VSV. Viabilidad respecto al control celular (CC) sin infectar y sin tratar; el control viral (CV) corresponde a monocapas infectadas con HSV-1 y VSV no tratadas. Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n = 3$ experimentos independientes con cada uno de dos lotes de NP.

En la figura **Figura III.23**, se detalla la masa de PA empleada en cada concentración de NP-PLGA evaluada. Es importante remarcar las diferencias en las concentraciones empleadas, ya que la concentración de MPA libre que protegió la monocapa en un 95% fue de 160,17 ng, y en el caso de las NP-PLGA-MPA se usaron concentraciones uno y dos órdenes inferiores. En la concentración más alta de NP-PLGA-MPA empleada, la concentración del PA se redujo tres veces, en la siguiente se redujo 33 veces la dosis y en la menor dosis se redujo 343 veces. Las tres concentraciones de

tratamiento protegieron las monocapas entre el 70-90 % para el caso de VSV y entre un 80-90 % para el caso de HSV-1, demostrando que la encapsulación del MPA en NP-PLGA, realizó una entrega efectiva mejorando la biodisponibilidad del PA.

III.4.6.4 EFECTO ANTIVIRAL DE LAS NP-PLGA-CUR CONTRA HSV-1 Y VSV

El efecto antiviral de las NP-PLGA-CUR se analizó de manera similar al MPA. Inicialmente, se determinó la CI_{50} del PA libre, obteniéndose un efecto protector dependiente de la dosis (**Tabla III.6**). La siguiente fase consistió en la evaluación de las NP-PLGA-CUR, para ello se emplearon las mismas concentraciones en masa que en el caso de las NP-PLGA-MPA. La mayor concentración de NP-PLGA-CUR usada fue de 100 $\mu\text{g/mL}$ conteniendo 69,99 ng/mL de CUR, la segunda fue de 10 $\mu\text{g/mL}$ con 7,31 ng/mL y la menor fue 1 $\mu\text{g/mL}$ conteniendo 0,69 ng/mL de CUR. La diferencia en las concentraciones empleadas entre las NP-PLGA-CUR y la CUR libre se muestra en la **Figura III.24**. Nuevamente, es importante remarcar la diferencia en las concentraciones empleadas.

La dosis de CUR libre usada fue de 29470 ng (40 μM) y protegió las monocapas en un 95%. En la concentración más alta de NP-PLGA-CUR empleada, la concentración del PA se redujo 400 veces, en la siguiente, se redujo 4000 veces y en la menor concentración se redujo 42000 veces. Las tres concentraciones de tratamiento protegieron las monocapas entre el 85-90 % para el caso de HSV-1 y en el caso de VSV la protección estuvo alrededor de 70-75%, demostrando que la encapsulación del CUR en NP-PLGA, realizó una entrega dirigida y eficiente en la célula, mejorando la solubilidad, la biodisponibilidad y reduciendo su toxicidad.

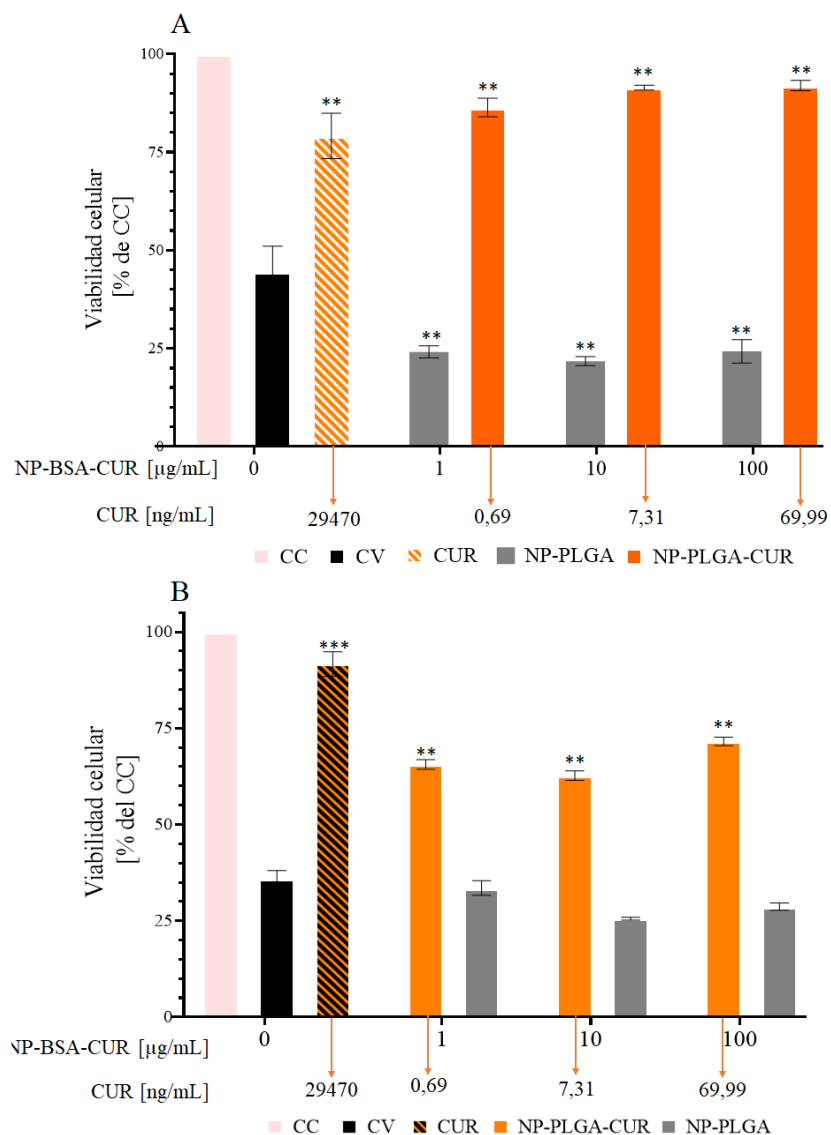


Figura III.24 Efecto protector de NP-PLGA-CUR sobre la acción citopática de **A)** HSV-1 y **B)** VSV en células Vero Viabilidad respecto al control celular (CC) sin infectar y sin tratar, el control viral (CV), corresponde a monocapas infectadas con HSV-1 y VSV Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

Los resultados exploratorios anteriormente realizados demostraron una clara mejora en la protección de las células en los cultivos infectados con virus con genoma de DNA o RNA, lo cual se traduciría en una mejora en la disponibilidad y entrega efectiva de los PA cuando se encuentran en las NP-PLGA. Estos hallazgos motivaron a extender el estudio a otros virus patógenos humanos utilizando ensayos de inhibición del rendimiento viral en células humanas A549 y Huh-7.

III.4.6.5 EFECTO ANTIVIRAL DE LAS NP-PLGA CONTRA ZIKV

Se ensayó la actividad antiviral utilizando concentraciones no citotóxicas de NP-PLGA-MPA y NP-PLGA-CUR, sobre cultivos de células A549 y Huh-7 infectadas con ZIKV cepa Puerto Rico. A las 48 h p.i. se determinó el rendimiento viral por el método de formación de placas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura III.25** para las NP-PLGA-MPA y en la **Figura III.26** para las NP-PLGA-CUR. Estas líneas celulares, a diferencia de las Vero, presentan respuesta antiviral innata inducida por interferón, los resultados obtenidos con las NP-PLGA sin PA indican que las partículas por sí mismas no son capaces de inducir esta respuesta antiviral.

En cuanto a la inhibición del rendimiento viral, los resultados obtenidos (**Figura III.25A**) confirmaron que el empleo de NP-PLGA-MPA mejora la biodisponibilidad del PA dado que aún con treinta y tres veces menos PA que en su versión libre (100 µg/mL de NP-PLGA-MPA), se obtuvo un 100% de inhibición viral. En función de los resultados obtenidos, se decidió estudiar el efecto inhibitorio de las NP-PLGA en infecciones con ZIKV en células de hepatocarcinoma humano Huh-7. La elección de esta línea celular se basó en que las mismas presentan una fuerte respuesta antiviral intrínseca por interferón y al ser de origen hepático, poseen actividad degradativa permitiendo un acercamiento al metabolismo hepático. Los resultados que se muestran en la **Figura III.25B** evidenciaron un efecto antiviral mayor de las NP-PLGA-MPA en estas células respecto al determinado en A549, se observaron altos niveles de inhibición en todas las concentraciones, incluso en la más baja donde no presentó efecto antiviral en A549.

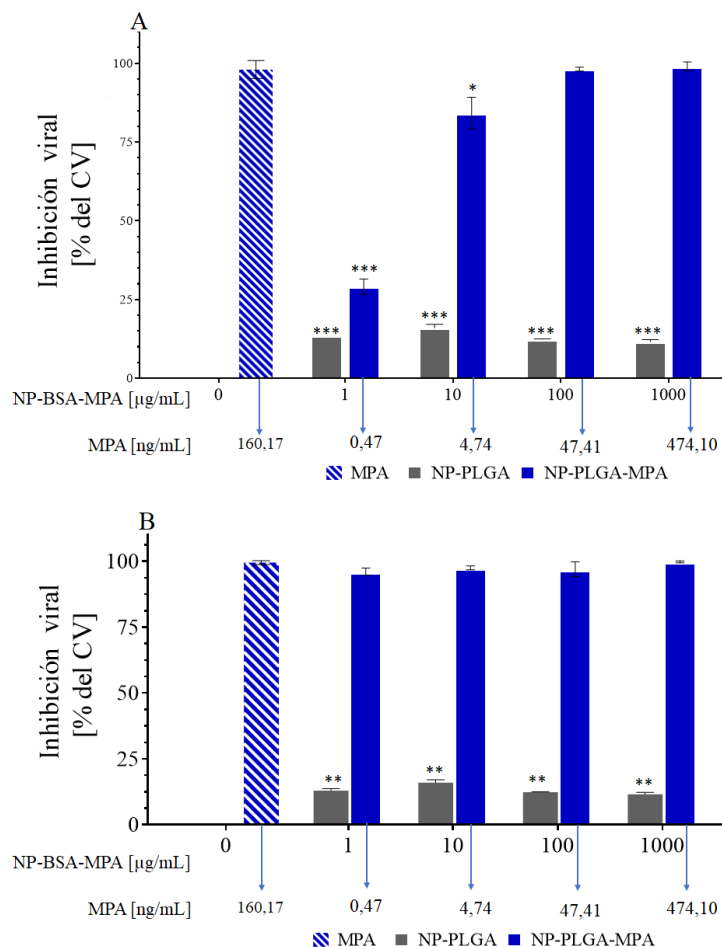


Figura III.25 Efecto de NP-PLGA-MPA sobre el rendimiento viral de ZIKV

Inhibición viral en células infectadas y tratadas con distintas concentraciones de NP-PLGA-MPA respecto al CV infectado sin tratar y las rosadas al porcentaje de inhibición de cultivos **A)** A549 y **B)** Huh-7 infectados y tratados con distintas concentraciones de NP-PLGA sin PA. Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n = 3$ experimentos independientes con cada uno de 2 lotes de NP.

En el caso de las NP-PLGA-CUR, los resultados obtenidos confirmaron que existió una potente inhibición viral (**Figura III.26**) en todas las concentraciones evaluadas dado que se obtuvieron los mismos niveles de inhibición viral en las células A549 con 400 veces menos PA encapsulado que en su versión libre (**Figura III.26A**). En Huh-7 (**Figura III.26B**) al igual que con MPA, se replican altos niveles de inhibición viral utilizando concentraciones de CUR equivalentes a 4200 veces menores que con el PA libre.

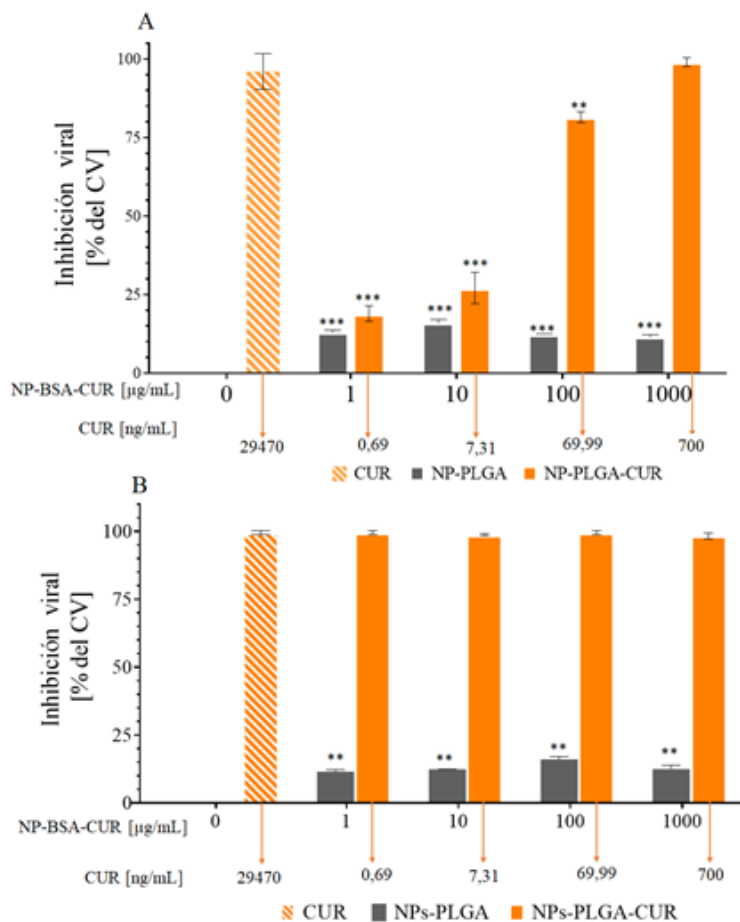


Figura III.26 Efecto de NP-PLGA-CUR sobre el rendimiento viral de ZIKV. Inhibición viral en células infectadas y tratadas con distintas concentraciones de NP-PLGA-CUR respecto al CV infectado sin tratar y de cultivos **A)** A549 y **B)** Huh-7 infectados y tratados con distintas concentraciones de NP-PLGA- CUR y sin PA. Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n = 3$ experimentos independientes con cada uno de 2 lotes de NP.

III.4.7 ADSORCIÓN PROTEICA

III.4.7.1 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP-PLGA CON BSA

La adsorción de proteínas en la superficie de las NP es uno de los primeros eventos que tiene lugar cuando entran en el torrente sanguíneo, este fenómeno, denominado “opsonización”, contribuye a la determinación del destino de las NP en el organismo, el cual dependerá del patrón proteico (tipo y cantidad de proteínas) adsorbido en cada tipo de NP. En base a esto se analizó el efecto de distintas concentraciones de BSA sobre las NP-PLGA sin (**Figura III.27**) y con (**Figura III.28**) PA.

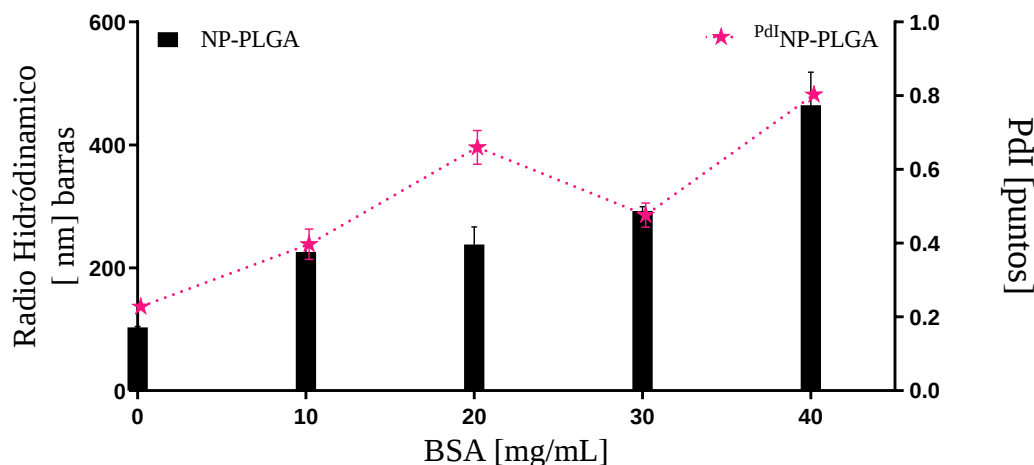


Figura III.27 Interacción de NP-PLGA con BSA

Efecto de distintas concentraciones de BSA sobre el radio hidrodinámico de las NP-PLGA y la variación del PDI (línea punteada). Los resultados corresponden a la media $\pm$ DE de $n=3$ experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA.

Como se observa en la **Figura III.27**, a medida que se incrementa la concentración de BSA, el h_o de las partículas incrementa y conjuntamente el IPd, lo cual demuestra una interacción entre las NP-PLGA y la BSA. El mismo fenómeno se observó cuando se incubaron las NP-PLGA-MPA con concentraciones crecientes de BSA (**Figura III.28**).

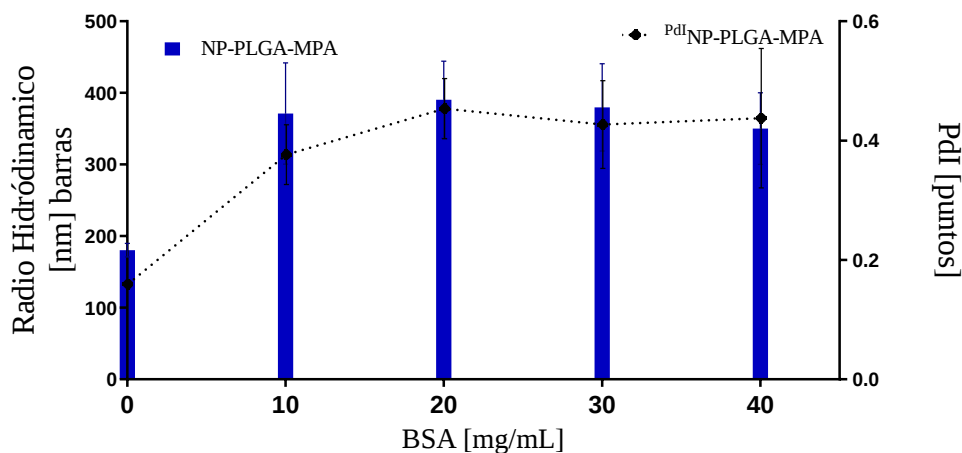


Figura III.28 Interacción de BSA con NP-PLGA-MPA

Efecto de distintas concentraciones de BSA sobre el radio hidrodinámico de las NP-PLGA-MPA (barras) y la variación del PDI (línea punteada). Los resultados corresponden a la media $\pm$ DE de $n=3$ experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA-MPA.

El aumento del tamaño de las NP-PLGA y NP-PLGA-MPA en presencia de BSA podría deberse a moléculas de la proteína adsorbidas en la superficie externa de las NP, sin penetrar en la matriz polimérica. Para validar esta hipótesis, se midió el pot- ζ de las NP en presencia de BSA esperando que el mismo cambiara debido a la adsorción proteica. Para ello, se realizó la medición de los cambios en el potencial electrocinético de las NP antes y después de la incubación con concentraciones crecientes de BSA desde 0 hasta 40 mg/mL, similares a las posibles concentraciones fisiológicas plasmáticas de BSA. Los resultados muestran un importante descenso de los valores de pot- ζ tanto para NP-PLGA como para NP-PLGA-MPA, dichos valores disminuyen en función de la concentración de BSA (**Figura III.29**).

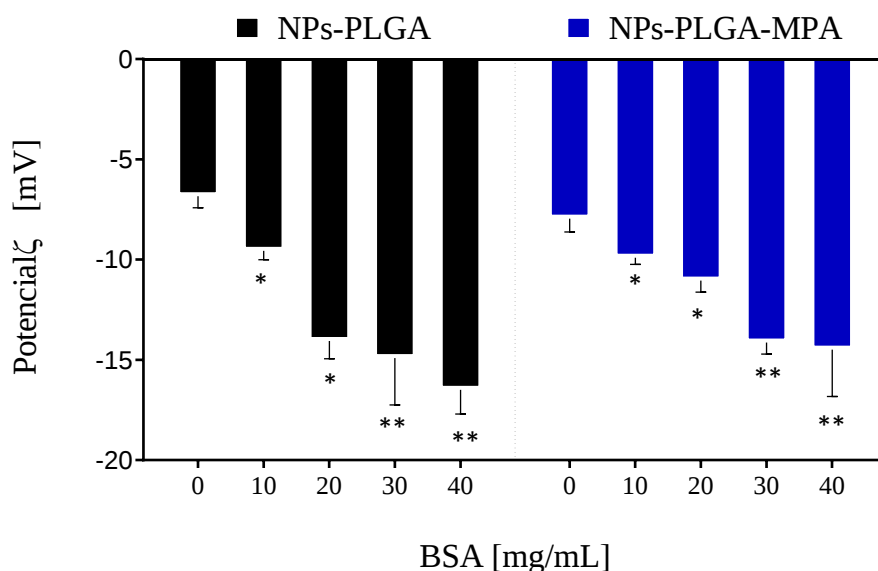


Figura III.29 Influencia de BSA sobre el pot- ζ de las NP-PLGA

Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n =$ tres experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA.

Dado que BSA es la proteína más abundante en el suero, se presenta la idea de que la agregación máxima de proteínas en la superficie de las NP sea con BSA. Sin embargo, la adsorción depende del tipo de proteína, por lo tanto, las pruebas de adsorción se deben realizar con diferentes proteínas y podrían dar resultados diferentes.

III.4.7.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP-PLGA CON FIBRINÓGENO

La interacción con el fibrinógeno se estudió mediante la determinación del tamaño (**Figura III.30**), y potencial electrocinético (**Figura III.31**) de las suspensiones de NP-PLGA con o sin PA luego de ser incubadas con 2 mg/mL de fibrinógeno, similar a la concentración plasmática. La interacción con el fibrinógeno generó un incremento del h_0 de las NP-PLGA con y sin PA como se observa en la **Figura III.30**.

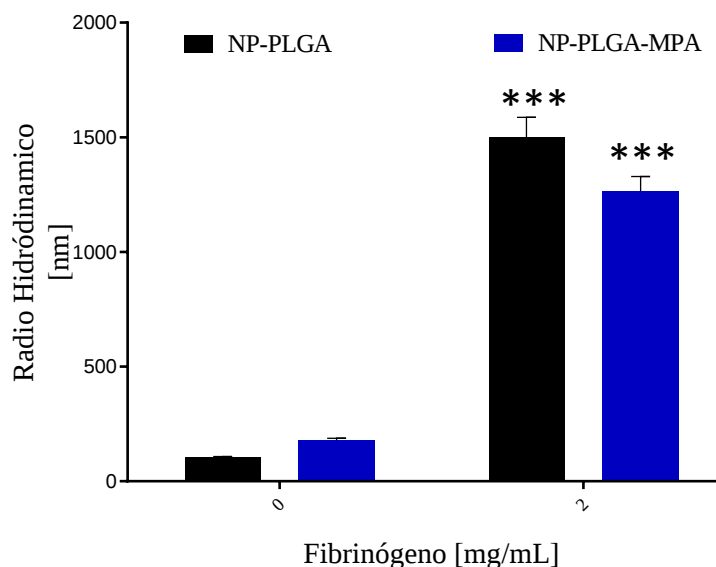


Figura III.30 Interacción del fibrinógeno con las NP-PLGA

Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n = 3$ experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA.

Por otro lado, la incubación con concentraciones plasmáticas de fibrinógeno evidenció un cambio en el $\text{pot-}\zeta$ de las NP (**Figura III.31**), donde se ve que el potencial se acerca hacia la neutralidad en función de la asociación con el fibrinógeno, pudiendo ser un indicio de la interacción superficial de esta proteína con las NP. No se observaron agregaciones a nivel macroscópico.

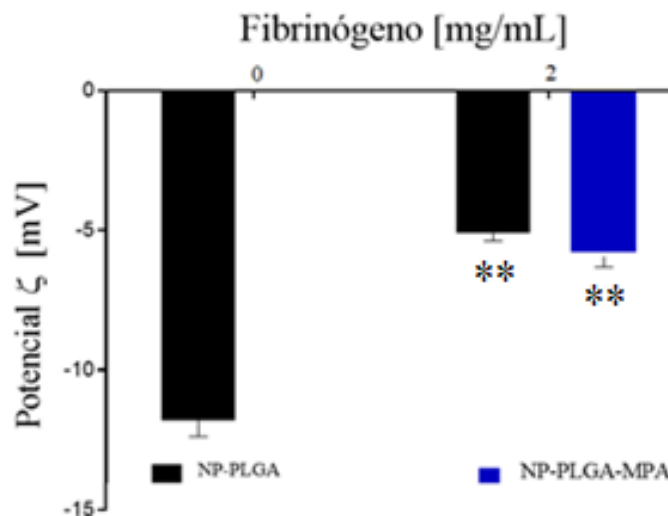


Figura III.31 Influencia del fibrinógeno sobre el pot-ζ de las NP-PLGA

Los resultados representan la media ± DE de n = 3 experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA

III.4.7.3 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NP-PLGA CON ISOENZIMA

La interacción con la isoenzima se estudió mediante la determinación del tamaño y potencial electrocinético de las suspensiones de NP-PLGA con o sin PA luego de ser incubadas con 2 mg/mL de isoenzima. La interacción con la isoenzima influenció el incremento del h_0 de las NP-PLGA con y sin PA (**Figura III.32**). También se observó un cambio del pot-ζ (**Figura III.33**) en el caso de las NP-PLGA-MPA alejándose de la neutralidad y para el caso de las NP-PLGA acercándose a la neutralidad.

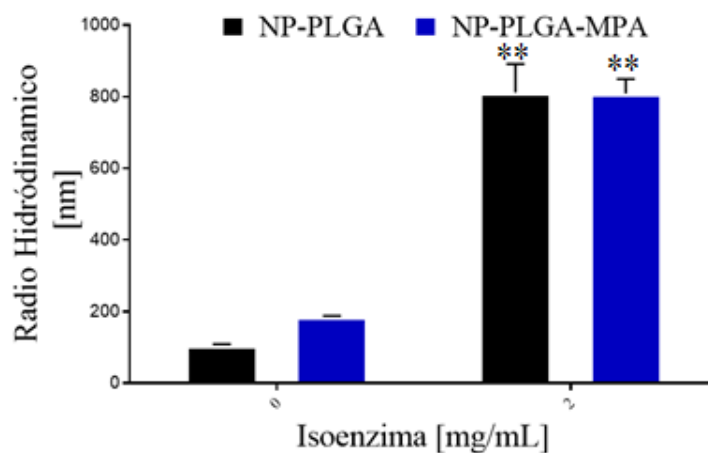


Figura III. 32 Interacción de las NP-PLGA con isoenzima.

Los resultados representan la media ± DE de n = 3 experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA.

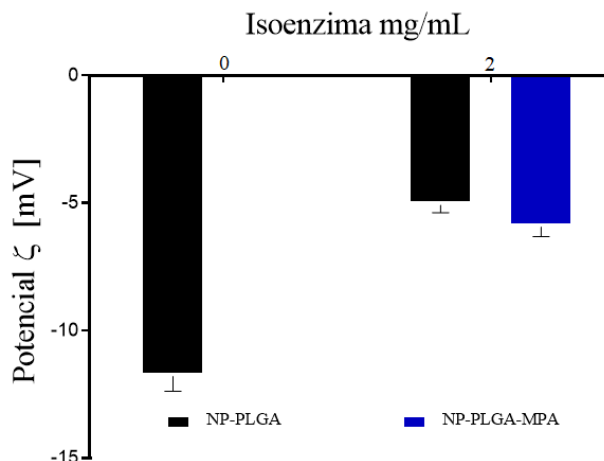


Figura III.33 Influencia de la isoenzima sobre el pot- ζ de las NP-PLGA.

Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n = 3$ experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA.

III.4.8 ENSAYO DE HEMÓLISIS *IN VITRO*

Se evaluó si las NP-PLGA eran capaces de generar hemólisis sanguínea usando distintas concentraciones de NP con una cantidad fija de sangre humana de donantes sanos, emulando las condiciones fisiológicas con PBS. No se detectó hemólisis para ninguna de las concentraciones de NP-PLGA-MPA luego de 10 min de incubación de las células con las distintas NP (**Figura III.34**). Por otro lado, se detectó hemólisis menor al 1% cuando se incubó con la concentración más baja de NP-PLGA sin PA, pero este nivel se encuentra aceptado como ausencia de hemólisis por la norma ISO-10993 y se corresponde con el error de la técnica.

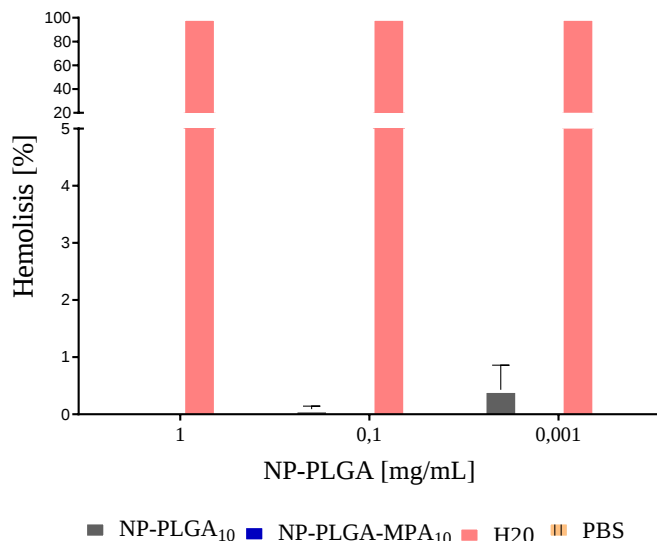


Figura III.35 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-PLGA luego de 10 min de incubación. Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n = 3$ experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA.

Sorpresivamente, al aumentar el tiempo de exposición a 30 min no se detectó hemólisis en el caso de las NP-PLGA sin PA, y se detectó un porcentaje de hemólisis inferior al 1% para el caso de las NP-PLGA-MPA el cual se considera nulo dentro de las normas internacionales (**Figura III.35**).

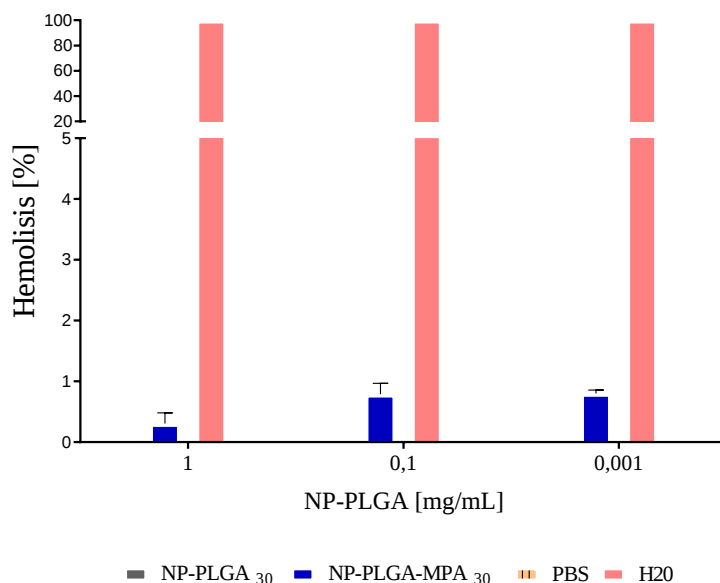


Figura III.35 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-PLGA luego de 30 min de incubación. Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n = 3$ experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA.

Por otro lado, al aumentar el tiempo de exposición a 240 min, se observó hemólisis en la concentración más alta de NP-PLGA con y sin PA (**Figura III.36**). Sin embargo, esta hemólisis no se atribuye a las características físico-químicas de las NP sino al desequilibrio osmótico ocasionado por el largo período de exposición. Es destacable que la incubación con la concentración más baja de NP-PLGA no presentara hemólisis pudiéndose emplear esta concentración en posteriores ensayos que requieran tiempos prolongados.

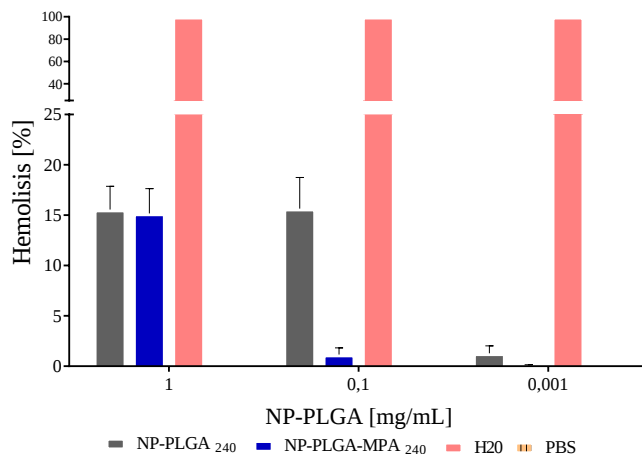


Figura III.36 Porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NP-PLGA luego de 240 min de incubación. Los resultados representan la media $\pm$ DE de $n = 3$ experimentos independientes realizados con cada uno de los 3 lotes distintos de NP-PLGA.

III.4.9 INTERNALIZACIÓN CELULAR DE NP-PLGA

Se evaluó la captación celular, también conocido como “*uptake*”, de NP marcadas con el fluoróforo FIT-C empleando citometría de flujo. Los parámetros se establecieron excluyendo las NP no internalizadas y el fondo basal de fluorescencia de las células A549 no tratadas. Las mediciones se llevaron a cabo a distintos tiempos a fin de determinar el momento en el cual se produce el ingreso de las NP a las células. Como se muestra en la **Figura III.37**, las NP-PLGA-MPA-FITC liofilizadas ingresan a los 15 min siendo el porcentaje de células positivas del 8-10%, a medida que transcurrió el tiempo se observó el desplazamiento del pico de fluorescencia, es decir, el porcentaje de células fluorescentes pasó a ser del 25-30% luego de 2 h, del 65-70% entre las 4 y 6 h, se estabilizó en 70-75% a las 24 h y alcanzó un máximo de entre el 90-95% a las 48 h post-tratamiento.

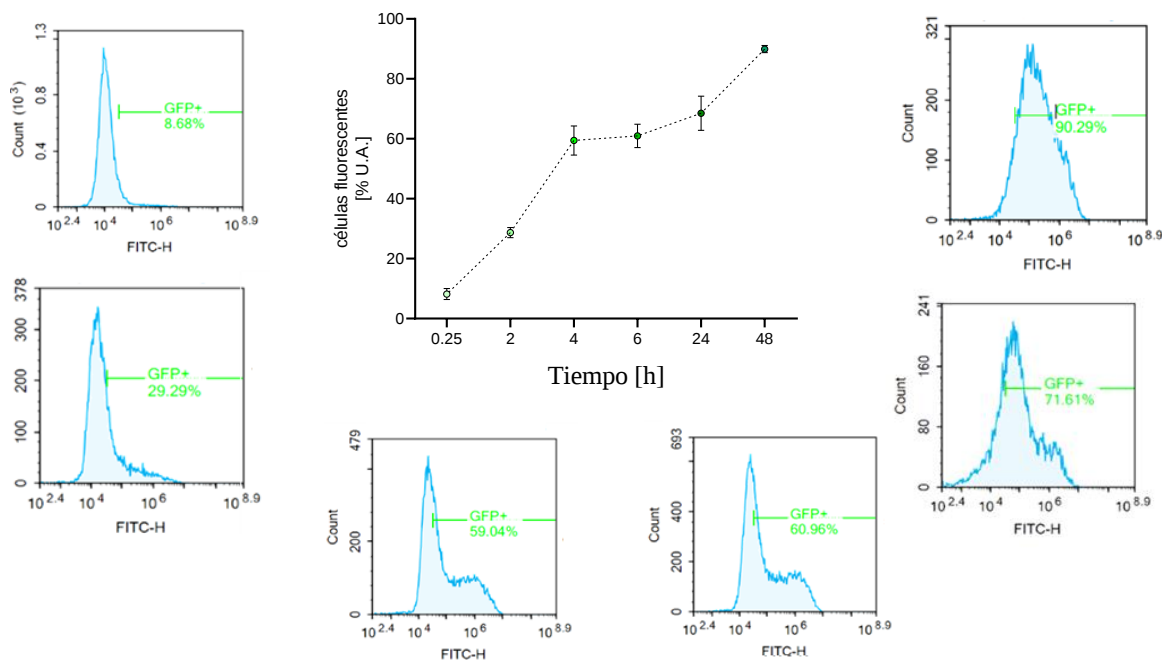


Figura III.37 Cinética de ingreso de las NP-PLGA-MPA liofilizadas

En la parte superior e inferior se encuentra el desplazamiento de la fluorescencia en los distintos tiempos de acuerdo al ingreso de las NP. Los resultados representan la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes.

En el caso de las NP-PLGA-MPA-FITC denominadas “frescas”, debido a que no pasaron por un proceso de liofilización, se observó un ingreso más eficiente. En la **Figura III.38** se muestra que, si bien a los 15 min el porcentaje de células positivas para fluorescencia verde es de alrededor del 10% como en el caso anterior, a partir de las 2 a 6 h los eventos positivos están entre 65-70%, entre el 85-90% a las 24 h y se redujo al 70% a las 48 h. Este decaimiento podría deberse a que a las 48 h se inició el proceso de eliminación de las NP (Oh y Park 2014).

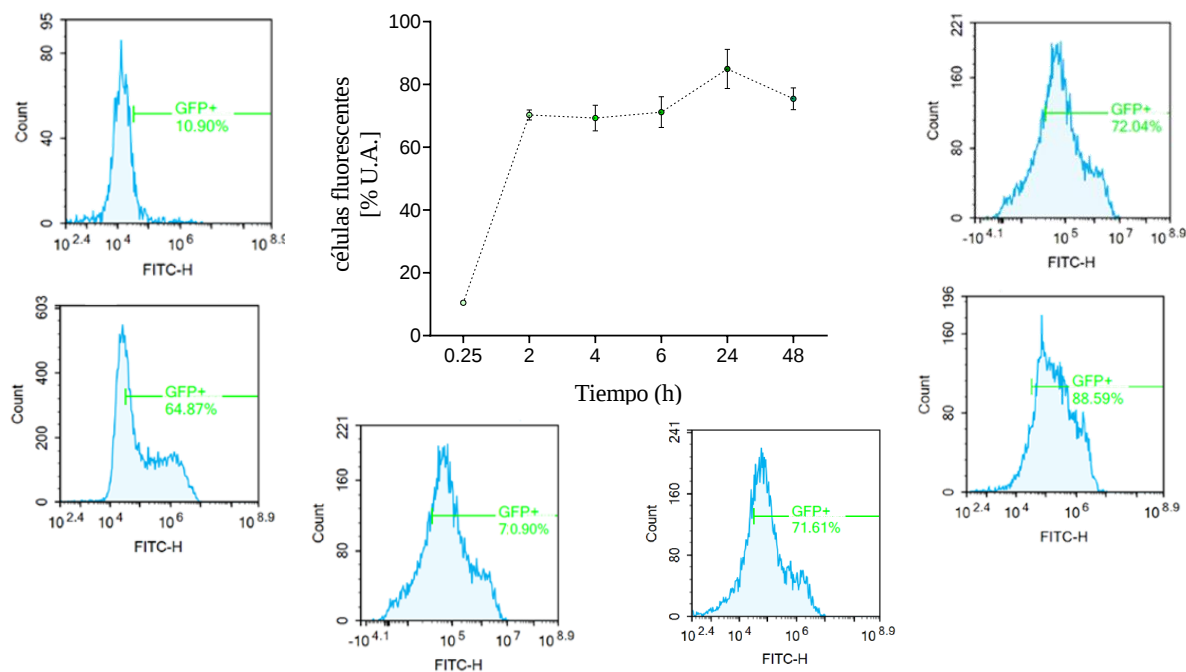


Figura III.38 Cinética de ingreso de las NP-PLGA-MPA purificadas y re-suspendidas

En la parte superior e inferior se encuentra el desplazamiento de la fluorescencia en los distintos tiempos de acuerdo al ingreso de las NP. Los resultados representan la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes.

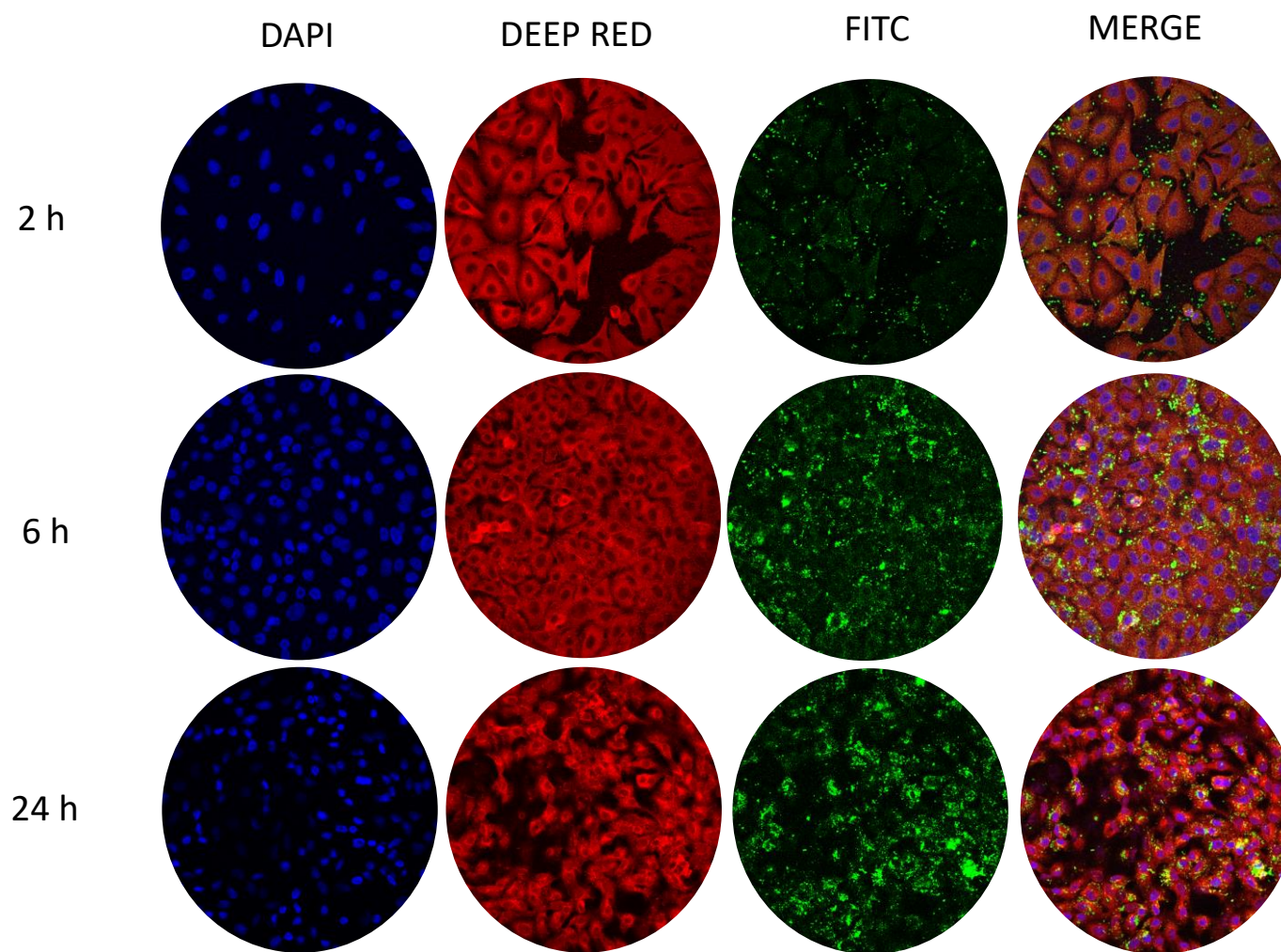


Figura III.39 Internalización de las NP-PLGA-MPA-FITC en función del tiempo.

Microscopía confocal de células A549 incubadas con NP-PLGA-MPA-FITC por distintos tiempos. La columna 1 corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI, en la columna 2 se observan los citoplasmas teñidos con Deep-red, en la columna 3 se muestran las NP-PLGA-MPA-FITC internalizadas por las células y la columna 4 la superposición de canales. Aumento 100X.

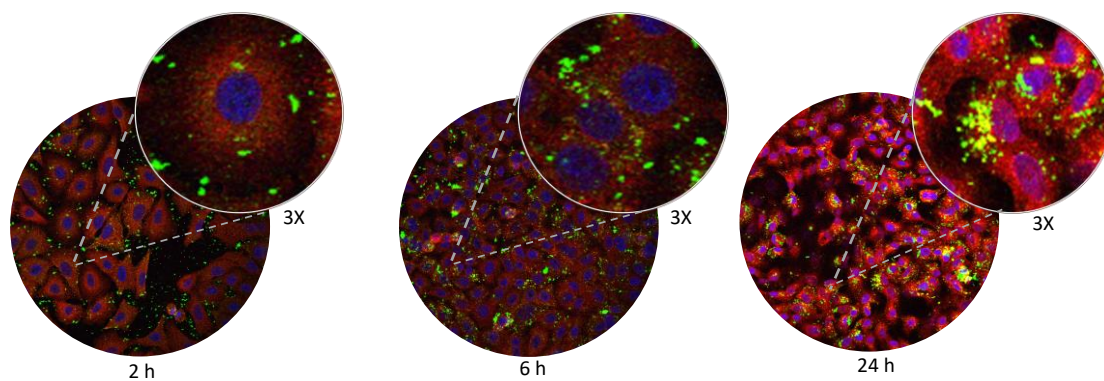


Figura III.40 Internalización de las NP-PLGA-MPA-FITC en función del tiempo.

Microscopía confocal de células A549, núcleos teñidos con DAPI (azul), citoplasma teñido con la sonda deep red (rojo) y NP-PLGA-MPA-FITC (verde). Aumento 300X

III.5 DISCUSIÓN

La idea de explorar una nueva metodología y matriz para la encapsulación de compuestos antivirales surgió por la *EfE* que presentó el sistema del capítulo II, el cuál inicialmente era el centro de esta tesis doctoral. Además, la oportunidad de viajar y realizar estadías en laboratorios especializados en el desarrollo de nanosistemas para aplicaciones biológicas, fue un factor importante en el desarrollo de este capítulo y el siguiente. Es aquí donde se ampliaron las perspectivas y se empezó a pensar en la manera de administración de las NP por lo que al explorar un nuevo sistema surge la necesidad de conocer las condiciones fisiológicas requeridas para que un sistema nano pueda ser administrado.

La administración intravenosa requiere que la formulación presente el pH fisiológico de la sangre, en torno a 7,4 y la osmolalidad, en torno a 300 mOsm/kg por ello el tampón comúnmente utilizado para aplicaciones biomédicas es la solución salina tamponada con fosfato o PBS, que consiste en una mezcla de sales como cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico y fosfato disódico monobásico. Los reportes de Fornaguera 2015, mencionan que se deben formular las NE con concentraciones ideales de electrolitos. Si la concentración es baja, la osmolalidad es directamente afectada. La solución de PBS tiene la capacidad de mantener el pH en un rango específico, entre 7-8, por lo tanto, en un tampón a concentraciones aproximadamente superiores a 0,016M, si la concentración de iones disueltos es alta, se requeriría una mayor concentración de electrolitos.

La osmolalidad de una solución depende de la concentración de sal. Por esta razón, cuanto mayor sea la concentración de electrolitos, mayor será la osmolalidad. Por lo tanto, se eligió PBS con una concentración de 0,16 M que cumple con el requerimiento de osmolaridad en sangre (Dobrovolskaia *et al.*, 2008). El aspecto macroscópico es crucial cuando se emplean sistemas de emulsión, sean de escala micro o nano, ya que estos son los que ayudan de manera inicial con la selección de los componentes para su diseño. Si una NE no está formulada correctamente se verán precipitados o la formación de sedimentos, muchos de estos fenómenos se presentan en el momento de generar la NE o en periodos cortos de almacenamiento.

Sin embargo, un factor no trivial es la concentración de iones que está ligada a mantener las condiciones fisiológicas y a su vez, está asociada a la hidratación que presentan los iones en fase acuosa. Este fenómeno, también conocido como “*salting out*”, influencia el empaquetamiento u

organización del surfactante para generar la gota como se reporta en los trabajos de Israelachvili *et al.* (2011) y Nagarajan *et al.* (2002). El radio de hidratación de los iones influencia el empaquetamiento de los surfactantes y la estabilidad de la NE por lo que su selección apropiada es otro factor a considerar al momento de realizar la formulación.

Todas las formulaciones de NE requieren un surfactante para facilitar la emulsificación y mejorar la estabilidad cinética. El tensioactivo tiene que ser hidrofílico (HLB >10) para preparar NE O/W. Los surfactantes etoxilados no iónicos solubles en agua a bajas temperaturas, tienden a formar estructuras O/W. Entre ellos, se eligió el polisorbato 80, con un valor HLB de 15, que ha sido ampliamente utilizado para aplicaciones biomédicas durante mucho tiempo (Bazylińska, Kulbacka, y Wilk 2014; Bazylińska *et al.*, 2014; Calderó *et al.*, 2016; Forgiarini *et al.*, 2001; Fornaguera Puigvert C. 2015; Gómez Vega Aurea Guadalupe 2014; Tadros *et al.*, 2004). Además, se usa en muchas formulaciones aprobadas por la FDA tanto para alimentos como para medicamentos (FDA, 2014) y la Red de Datos Toxicológicos (TOXNET) lo ha definido como no tóxico y no irritante en formulaciones parenterales (TOXNET, 2014).

Desde el punto de vista de la seguridad, se recomienda una concentración baja para las formulaciones farmacéuticas, ya que suele ser el componente que aporta la toxicidad en las preparaciones (Parveen *et al.*, 2015 y Wilson *et al.*, 2022a). La principal ventaja del método de preparación de NP usando como plantilla la NE seguido de evaporación del solvente desarrollada y descrita en este capítulo, es que el tensioactivo polisorbato 80 es un componente del propio nanosistema; se agrega en el paso inicial de la formación de la NE molde, permitiendo producir NP en un procedimiento de un solo paso y fácil de escalar (García-Celma *et al.*, 2016 y Gupta 2020). Al ser MPA y CUR solubles en etanol, pudieron ser dispersados y/o solubilizados en el componente oleoso, antes de la formación de las NE, y aumentar la EfE (Bahadar *et al.*, 2016 y Maus, Strait, y Zhu 2021).

Debido a la baja solubilidad de las drogas, es imposible y realmente peligroso administrar soluciones por vía intravenosa, ya que puede precipitar y obstruir los vasos sanguíneos. Los compuestos poco solubles en agua son un desafío para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas adecuadas. Los sistemas heterogéneos ampliamente utilizados para este tipo de PA son emulsiones simples de aceite en agua (O/W) y emulsiones múltiples de agua en aceite en agua (W/O/W) (Kolluru, Atre, y Rizvi

2021). Las características de absorción errática y la baja biodisponibilidad sistémica son problemas típicos con medicamentos poco solubles en agua. La vía de administración parenteral (intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraarterial, subcutánea, etc.) ofrece un perfil de absorción significativamente alto y, por lo tanto, biodisponibilidad (Sutradhar y Amin 2013 y Wilson *et al.*, 2022b).

Las NP poliméricas han sido ampliamente estudiadas y confirmadas para fines diagnósticos y propósitos terapéuticos. Se ha señalado la importancia de estudiar al menos, tres factores cuando se las pretende administrar por inyección intravenosa: (a) el patrón de adsorción de proteínas; (b) la influencia en la cascada de la coagulación; y (c) su carácter hemolítico (Norma ISO-10993). Por eso, es relevante estudiar la interacción de diferentes tipos de proteínas en términos de tamaño y forma, por ejemplo, ya que ambos parámetros influyen en la adsorción de la proteína en la superficie de las NP. El fibrinógeno, es mucho más grande que la BSA, y mientras la BSA es esférica, el fibrinógeno es alargado. Además, estudiar el comportamiento con proteínas pequeñas como las isoenzimas aporta información relevante para entender la interacción de las NP con las proteínas en general (Vauthier *et al.*, 2011).

En este sentido, se realizó una caracterización completa de las NP cargadas con los PA, (MPA y CUR) emulando un tiempo prolongado de circulación sanguínea (240 min). Las NP desarrolladas en el presente estudio podrían usarse para la administración intravenosa ya que no resultaron citotóxicas ni hemolíticas en las concentraciones y líneas celulares probadas y aunque adsorbieron algunas proteínas séricas, los bajos niveles de pegado podrían definirlas como activadores débiles del sistema del complemento, aunque se requiere profundizar más en este estudio. Las NP de PLGA mostraron un aumento de la hemólisis de hasta un 80% que fue atribuido a los tensioactivos presentes (Kim *et al.*, 2005) dado que, al aislar y purificar las NP, la hemólisis disminuyó significativamente.

En este trabajo se formularon NP usando el tensioactivo polisorbato 80, sin embargo, este surfactante no produjo ninguna toxicidad a la concentración del 3% en (p/p) estudiada. La controversia del carácter hemolítico de los tensioactivos fue estudiada por Jumaa *et al.*, (2019) y Date *et al.*, (2018) quienes encontraron que, aunque muchos tensioactivos son hemolíticos, su hemólisis se reduce claramente cuando se los utiliza para formar NE. Los resultados obtenidos están en buen acuerdo con esos estudios y los de Fornaguera *et al.*, 2015 y Shukla *et al.*, 2021.

En las últimas décadas se han hecho grandes logros hacia la comprensión de las reglas que gobiernan la absorción celular que muestran que la internalización de las moléculas se ve afectada en gran medida por su tamaño. Por ejemplo, las macromoléculas, como las proteínas y los ácidos nucleicos, normalmente no pueden internalizarse en las células. Curiosamente, en el caso de NP, los tamaños más grandes, aún dentro de la nanoescala, parecen facilitar la internalización a través de vías endocíticas, a través de las cuales las partículas quedan atrapadas en lisosomas y endosomas (Mosquera, García y Liz-Marzán 2018 y Park (2014). Los resultados de este capítulo demuestran que las NP-PLGA fueron internalizadas a los 15 min y luego se dispersaron en el citosol. Por otro lado, los resultados también demostraron que las NP-PLGA “frescas” que fueron purificadas y ensayadas sin liofilizar, internalizaron en mayor relación que las que pasaron por un proceso de deshidratación.

Las NP poliméricas son coloides de cadena larga de tamaños que van de 10 a 1000 nm, que facilitan la penetración capilar y, por lo tanto, mejoran la eficacia de absorción por las células para que la concentración del PA en el objetivo pueda ser mayor, como lo validaron los resultados de este capítulo, dónde se evidencia la reducción de la concentración entre 100 y 400 veces y generará el mismo efecto que el PA libre. Los beneficios especiales de los polímeros son la constante descarga de agentes antivirales y la estabilidad metabólica potenciada de los PA incorporados. Estas propiedades validan el inmenso potencial del polímero para su eficaz entrega de agentes antivirales a base de NP. PLGA y PLA son los polímeros más utilizados debido a su mayor biodegradabilidad y biocompatibilidad descrito por Maus, Strait, y Zhu (2021).

Una de las hipótesis de esta eficacia está detallada en el trabajo de Mosquera, García, y Liz-Marzán (2018) que mencionan que la alta actividad antiviral de las Np-PLGA se encuentra relacionada con la cadena ramificada y estructura flexible de la molécula de PLGA. Algunos otros autores como Vauthier y Bouchemal (2009) emplean las NP-PLGA con modificaciones superficiales como cofactores para el tratamiento de enfermedades virales.

III.6 CONCLUSIONES

En este capítulo se desarrollaron NP-PLGA usando NE como plantilla. Esta estrategia permite encapsular PA de baja solubilidad en agua. Las NP-PLGA han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas, por lo que en este capítulo nos centramos en establecer condiciones que permitan encapsular PA con actividad antiviral para utilizar este sistema como un mecanismo de administración avanzada de antivirales que podrían ser administradas por vía intravenosa para controlar las infecciones virales.

Formación y caracterización de NE O/W por el método PIC:

- La NE de PLGA disuelto en acetato de etilo se logró con éxito mediante el método de composición de inversión de fase (PIC), un método de baja energía, que utiliza Tween®80 como tensioactivo y PBS como el componente electrolítico acuoso.
- Se logró diseñar NE con radios hidrodinámicos tan bajos como 50 nm con una concentración de electrolitos de 0,16 M y relaciones O/S de 60/40.
- El tamaño de las gotas de las NE se redujo cuando los electrolitos se incorporaron en la fase acuosa debido al efecto de *salting out* mejorado.
- Las NE resultaron estables a la separación de fases durante al menos 30 días. Sin embargo, debido a la difusión del solvente de una fase a otra, desestabilizó el sistema y generó sedimentación.
- En este capítulo, se diseñaron NP poliméricas de PLGA, se caracterizaron y ajustaron sus propiedades con el fin de poder utilizarlas como sistemas avanzados de administración de PA para el tratamiento de infecciones virales.
- El disolvente, acetato de etilo, se utilizó como único disolvente de la fase oleosa o combinado con un máximo del 10% (p/p) de etanol, dónde los PA fueron solubilizados.
- El pH y la osmolalidad de las NE formuladas con PBS 0,16 M se encontraron dentro del rango de valores fisiológicos de pH = 7,4 y osmolalidad = 300 mOsm/kg.

- Se seleccionaron NE con una concentración de electrolitos de 0,16 M, 90 % en peso de contenido acuoso y una relación O/S de 60/40 como plantillas para la preparación de nanopartículas, ya que cumplen las condiciones fisiológicas, poseen el tamaño adecuado (radios hidrodinámicos de alrededor de 50 nm) y estabilidad. Además, su contenido en tensioactivo es bastante bajo.

Las NP de PLGA se obtuvieron con éxito y de forma reproducible a partir de plantillas de NE por evaporación de solventes. Su caracterización permitió concluir que:

- Los tamaños se redujeron en comparación con los tamaños de gota de la NE de su plantilla, lo que se atribuyó a la evaporación del solvente.
- La ausencia de fisuras en la superficie de las NP se atribuye a la posible formación de poros que produciría una mayor flexibilidad de la estructura.
- El tamaño no se vio afectado por los cambios de temperatura o de concentración de electrolitos después de la preparación o mediante un paso posterior a la concentración. Solo los cambios durante el proceso de emulsificación produjeron efectos en el tamaño de las NP.
- La estabilidad coloidal fue mayor en presencia de electrolitos debido a los tamaños más pequeños de las NP. La sedimentación se confirmó como el principal proceso de desestabilización.
- La degradación química del PLGA en el tiempo aumentó en presencia de electrolitos y en ausencia de suero.
- Las NP formuladas representaron una buena alternativa para la encapsulación de diferentes tipos de compuestos, permitieron eficiencias de encapsulación mayores a las obtenidas con las NP-BSA.
- La liberación fue lenta y controlada. Lo que permitió mantener las propiedades funcionales de los compuestos encapsulados.

La caracterización de los efectos biológicos permitió confirmar que:

- Las NP no fueron citotóxicas en las concentraciones y células evaluadas.
- Las NP dispersas en PBS no fueron hemolíticas a la concentración de uso.
- Las NP-PLGA no produjeron alteración en la cinética de la coagulación a las concentraciones evaluadas, independientemente de la carga.
- Las NP-PLGA adsorbieron moléculas de BSA y la orientación de BSA en la superficie de las NP, así como el número de capas de BSA alrededor, dependió de la composición y carga de la superficie.
- El fibrinógeno se adsorbió a la superficie de las NP a través de interacciones electrostáticas.
- La interacción de las NP con los componentes sanguíneos estudiados (BSA, fibrinógeno y sistema del complemento) fue débil.
- Las NP-PLGA mejoraron la biodisponibilidad de los PA usados, promoviendo su entrega efectiva y contribuyeron beneficiosamente a la reducción de la concentración de PA; en el caso del MPA la misma se redujo 100 veces y 400 veces para CUR.
- El tipo de genoma del virus y el mecanismo de replicación también mostraron tener influencia en el mecanismo de acción de las NP-PLGA.
- Efectivamente existe una diferencia entre el tipo de célula empleada en cada caso. Se vio mayor efecto de antiviral de las NP en el caso de las células Huh-7, las mismas presentan un metabolismo hepático y mayor secreción citoquinas.
- También se demostraron diferencias en el porcentaje de inhibición viral dependiendo del tipo de virus. Los virus con genoma de RNA fueron mayormente inhibidos respecto a los virus con genoma de DNA.

IV VESÍCULAS LÍPIDICAS: NIOSOMAS

IV.1 Introducción

El número de estudios que investigan sistemas eficientes de administración de medicamentos ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, todavía es necesario superar limitaciones como la inadecuada biodistribución, la baja solubilidad en el pH fisiológico y la insuficiente asimilación celular. El uso de nanosistemas ha surgido como un progreso en la biomedicina aplicada para aumentar la concentración intracelular de PA en las células y minimizar la toxicidad (Kauslya *et al.* 2021; Marianecchi *et al.* 2014a). El tratamiento de las enfermedades infecciosas y la inmunización han experimentado un cambio revolucionario con el avance de la biotecnología y la ingeniería genética. No solo se ha desarrollado una gran cantidad de productos biológicos específicos para enfermedades, sino que también se ha hecho hincapié en la entrega efectiva de estos productos biológicos (Diksha, Kumar, and Verma 2021; Kazi *et al.* 2010).

Los sistemas vesiculares como liposomas, niosomas (NIO), transferosomas, farmacosomas y etosomas brindan una alternativa para mejorar la administración de PA. Las nanovesículas artificiales se componen básicamente de moléculas anfifílicas, presentan características que dependen principalmente de la formulación utilizada, la carga superficial resultante, el tamaño y el método de preparación empleado (Kauslya *et al.* 2021). Es sustancial considerar que para su aplicación biomédica es necesario que las vesículas sean biocompatibles, biodegradables y capaces de proteger el compuesto encapsulado de su degradación metabólica o inmunogénica (Estupiñán Sánchez 2016).

Las vesículas pueden presentar una lamela o varias, lo cual está determinado fundamentalmente por el método de preparación y por el tamaño. De esta manera es posible tener vesículas unilamelares pequeñas (**SUV**), las cuales miden hasta 10-100 nm, unilamelares grandes 100-800 nm (**LUV**), para rangos mayores; o multilamelares (**MLV**) con un amplio rango de tamaños (**Figura IV.1**) El tamaño de las vesículas cobra una relevancia crucial puesto que partículas demasiado pequeñas serán completamente excluidas vía renal, mientras que las demasiado grandes pueden ser eliminadas por el sistema fagocítico mononucleado (Blanco, Shen, and Ferrari 2015).

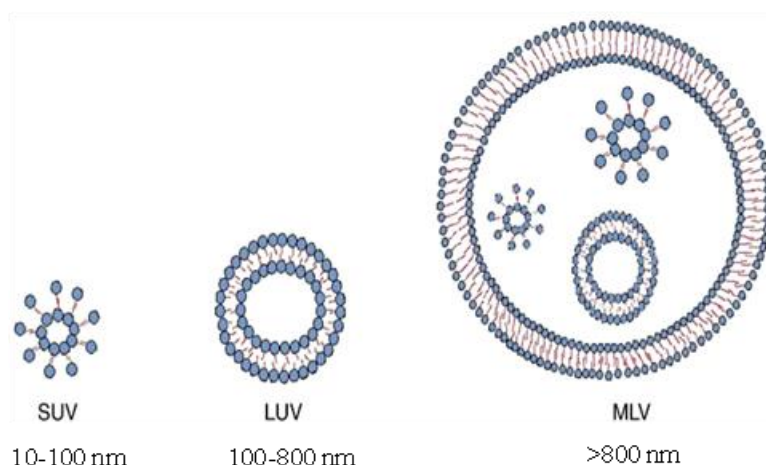


Figura IV. 1 Clasificación de las vesículas artificiales

Cada tipo de vesícula tiene ventajas y desventajas para encapsular diferentes tipos de PA. Adaptado de (Khoee y Yaghoobian 2017a)

Los NIO juegan un papel importante en los sistemas de administración de PA debido a los surfactantes no iónicos que constituyen su estructura. El diseño y desarrollo de un nuevo sistema de administración de PA tiene dos requisitos previos. En primer lugar, debe administrar el PA de acuerdo con una velocidad predeterminada y, en segundo lugar, debe liberar una cantidad terapéuticamente eficaz del PA en el sitio de acción. Las formas de dosificación convencionales no pueden cumplir estos requisitos. Los NIO son esencialmente vesículas multilamelares o unilamelares basadas en un tensioactivo no iónico en las que una solución acuosa de soluto está completamente rodeada por una membrana resultante de la organización de las moléculas de tensioactivo en forma de bicapa (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Los NIO se forman con una película de tensioactivo no iónico que eventualmente se hidrata absorbiendo o encapsulando la solución acuosa hidratante, siendo su objetivo principal ejercer la liberación de forma sostenida, modificar el perfil de distribución y dirigir el PA a un sitio específico del cuerpo. (Estupiñán Sánchez 2016; Kauslya *et al.* 2021; Khoee y Yaghoobian 2017a).

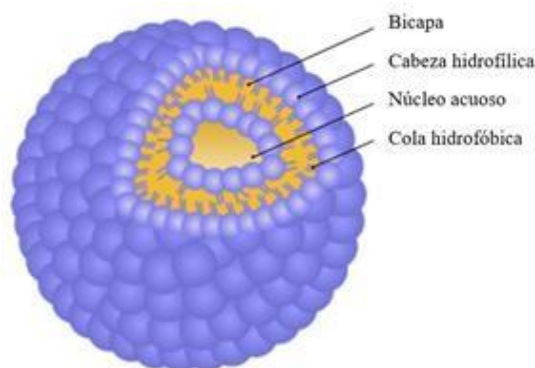


Figura IV.2 Estructura del niosoma

Se evidencia la bicapa, la estructura de surfactante y el núcleo acuoso. Adaptado <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2016/7372306/>.

Capítulo IV: Vesículas Lipídicas- Niosomas

Los NIO son sistemas coloidales más novedosos que los liposomas, aunque comparten gran similitud. La principal diferencia es que los fosfolípidos de la membrana vesicular han sido totalmente sustituidos por tensioactivos no iónicos, generalmente de cadena única. De esta manera, se consigue que la membrana sea menos rígida, dando mayor flexibilidad y permeabilidad al sistema vesicular, siendo consideradas vesículas ultra deformables, lo cual permite mejorar su capacidad de biodistribución (Pardeshi, Jogade, y Bothara 2022; Sharma, Dua, y Parsad 2022).

Numerosos estudios muestran que los tensioactivos no iónicos pueden aumentar la concentración de PA poco solubles por encapsulación facilitando la administración transdérmica, aunque su aplicación se está extendiendo a la administración por otras vías por su facilidad de traspasar barreras biológicas (Drakulevska *et al.* 2018; Manca *et al.* 2014; Manconi *et al.* 2009; Mehanna, Motawaa, and Samaha 2015; D. Pando *et al.* 2015; Sharma *et al.* 2022). Además, los tensioactivos no iónicos son químicamente más estables a la oxidación y a la temperatura que los fosfolípidos lo que facilita su manipulación, son compuestos más económicos y versátiles (Pardakhty y Moazeni 2013).

La elección de una formulación adecuada resulta fundamental puesto que son los componentes de membrana los que determinan su rigidez, fluidez o su compactación. Lo que se reflejará en el tamaño de la vesícula, la eficacia de encapsulación o en la estabilidad. Las propiedades de las vesículas se pueden cambiar variando la composición de los NIO, tamaño, lamellaridad, carga superficial y concentración (Bayindir y Yuksel 2010; Estupiñán Sánchez 2016). Su estabilidad se ve afectada por el tipo de surfactante, la naturaleza del PA a encapsular y la temperatura de almacenamiento debido a la presencia de fracciones hidrofílicas, anfifílicas y lipofílicas en la estructura. Estas nanoestructuras pueden acomodar moléculas de PA con un amplio rango de solubilidad, pueden actuar como un depósito, liberar el PA de forma controlada mejorando su rendimiento por su liberación lenta o constante en la circulación y protegerlo del entorno biológico (Marianecci *et al.* 2014a, 2014b; Pardeshi *et al.* 2022).

Los NIO contienen principalmente dos tipos de componentes, un **tensioactivo no iónico** que forma la capa vesicular y **los aditivos**, como el colesterol y las moléculas cargadas. Los **tensioactivos no iónicos** son un componente esencial de los NIO, naturalmente anfifílicos, biodegradables, biocompatibles y no inmunogénicos. Los tensioactivos no iónicos comúnmente utilizados en la preparación de NIO son los Span® (60, 40, 20,80), Tweens® (20, 40, 60, 80) y Brij®.

El **balance hidrófilo-lipofílico o equilibrio hidrófilo-lipofílico**, o simplemente HLB (acrónimo inglés de *Hydrophilic-Lipophilic Balance*) de un tensioactivo es una medida del grado en el que es hidrófilo o lipófilo, determinado mediante el cálculo de los valores para las diferentes regiones de la molécula, como describe Griffin, W.C. (1949) y puede tomar valores de 0 a 20. Valores bajos de HLB son indicativos de tensioactivos con un mayor carácter lipófilo, mientras que valores más altos son característicos de tensioactivos hidrófilos. Si el colesterol se combina con tensioactivos de bajo HLB, aumenta la estabilidad de la vesícula, y si el valor del HLB es mayor de 6, ayuda en la creación de vesículas bicapa (Sharma *et al.* 2022).

El HLB es un parámetro crítico adimensional en la selección de surfactante para la formación de NIO, ya que afecta el tamaño y la cantidad de carga de PA. Surfactantes con un HLB entre 4 y 8 son compatibles con la formación de vesículas. Los tensioactivos con valores de HLB superiores a 6 apenas pueden para formar vesículas; por lo tanto, para la formación de NIO se debe agregar colesterol. Este sistema de transporte protege a los PA de la degradación prematura e inactivación del sistema inmune y reduce los efectos farmacológicos no deseados (Estupiñán Sánchez 2016; Khoee and Yaghoobian 2017a; Pardeshi *et al.* 2022; Rajera *et al.* 2011)

El colesterol es el compuesto importante entre los aditivos ya que, siendo un derivado de esteroides, mejora la rigidez de la bicapa, aumenta la viscosidad y es un componente importante de la membrana celular. Su presencia en la membrana afecta la fluidez y la permeabilidad de la bicapa, la eficiencia de encapsulación, la facilidad de rehidratación de NIO liofilizados, otorga estabilidad y alarga el período de almacenamiento (Diksha *et al.* 2021; Kazi *et al.* 2010; Rajera *et al.* 2011).

Molécula cargada: los NIO tienen algo de carga debido a las moléculas añadidas para aumentar su estabilidad al proporcionar repulsión eléctrica y así promover colisiones. El fosfato de diacetilo (DCP) y el ácido fosfatídico son compuestos ampliamente utilizados que tienen carga negativa. De manera similar, en las preparaciones de NIO, la estearilamina y el cloruro de estearil piridinio son compuestos altamente estudiados de carga positiva (Yeo *et al.* 2017) .

Medio de hidratación: Uno de los más significativos componentes en la formulación de NIO es el medio de hidratación. El buffer fosfato es comúnmente empleado como medio de hidratación, sin embargo, el pH está determinado por la solubilidad del PA a encapsular (Diskaeva *et al.*, 2019; Homaei, 2016; Khoee & Yaghoobian, 2017).

IV.1.1 TEMPERATURA DE TRANSICIÓN GEL-LÍQUIDO (T_c)

Uno de los parámetros transcendentales que influyen en la preparación de los NIO es la temperatura de transición de fase (T_c) que afecta la EjE, la permeabilidad de la membrana, la rigidez de la bicapa y la estabilidad. La T_c y la longitud de la cadena alquílica de los tensioactivos no iónicos son factores interconvertibles que afectan la formulación de NIO debido a que ambos son mutuamente dependientes. La T_c depende del grado de insaturación en la cadena alquílica, la cual a su vez cambia la flexibilidad de la cadena, la permeabilidad de la membrana y la tasa de liberación del fármaco y/o PA. La falta de saturación en la cadena reduce la T_c, en consecuencia, aumenta la fluidez de la cadena y la permeabilidad de los NIO (Kauslya *et al.* 2021; Kazi *et al.* 2010; Thabet, Elsabahy, y Eissa 2021).

Se encontró que los NIO formados a partir de tensioactivos con T_c menores producen vesículas con mayor flexibilidad. Por lo general, la disminución del número de carbonos de la cadena de alquilo conduce a una disminución en la T_c y cuanto menor sea la T_c da como resultado la producción de más NIO con “fugas”. En resumen, la permeabilidad de la membrana de los tensioactivos de cadena corta es mayor que la de los tensioactivos con cadenas alquílicas más largas. La EjE es otra propiedad de los NIO fuertemente afectada por la T_c, con una T_c elevado se obtiene una mayor EjE (Rajera *et al.* 2011; Sharma *et al.* 2022).

IV.1.2 PARÁMETRO CRÍTICO DE EMPAQUETAMIENTO (CPP, DE “CRITICAL PACKING PARAMETERS”)

Es un parámetro adimensional que determina la capacidad de formación de vesículas que tiene la molécula del tensioactivo, y está definido por su estructura química, por el volumen y la longitud de la cola lipofílica, además de la superficie de la cabeza polar. La **ecuación 4.1** permite el cálculo de la CPP para un tensioactivo cuyos parámetros quedan definidos en la **Figura IV.3** (Marianecchi *et al.* 2014b; Moghassemi y Hadjizadeh 2014; Thabet *et al.* 2021).

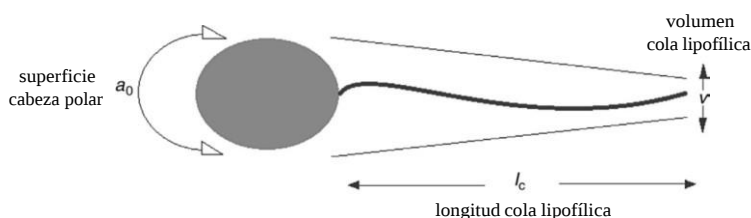


Figura IV. 3 Parámetros relacionados con la CPP
Representación esquemática de los factores que intervienen en el empaquetamiento de los surfactantes.
Adaptado de (Khoee and Yaghoobian 2017a)

$$CCP = \frac{v}{lc \cdot a_0} \quad \text{Ec. 4.1}$$

Las moléculas con un CPP menor a $1/3$ son capaces de formar micelas esféricas, mientras que valores entre $1/3$ y $1/2$ indican que son moléculas con capacidad de formar vesículas con bicapas, a la vez que valores superiores a $1/2$ se obtienen en moléculas que forman micelas invertidas. Además de los parámetros anteriores, la membrana puede contener o estar compuesta de otros elementos como el colesterol y moléculas que otorguen carga positiva o negativa además de los fosfolípidos y los tensioactivos (Kumar y Rajeshwarrao 2011; Pardakhty *et al.* 2011; Pardakhty y Moazeni 2013).

De forma general las vesículas se crean a partir de la exposición de las moléculas anfifílicas y/o surfactantes a un entorno acuoso, en el que tienden a organizarse de manera que las regiones polares queden enfocadas hacia el medio acuoso y las apolares se cubran entre sí. En determinadas condiciones termodinámicas, esa organización forma una estructura coloidal formando las vesículas. Las características fisicoquímicas de las vesículas dependen en gran medida del método de preparación empleado. Las técnicas más usadas emplean soluciones orgánicas para disolver los componentes de membrana de manera previa a su exposición al ambiente acuoso, además de incorporar una etapa de ultrasonido, filtrado o extrusión para obtener tamaños menores y monodispersión de la muestra (Homaei 2016; Khoee y Yaghoobian 2017b; Pardakhty y Moazeni 2013).

En el método de **hidratación de película fina** o “*Thin Film Hydration*”, se emplea colesterol disuelto en solventes orgánicos. Si el PA es lipofílico, debe agregarse simultáneamente. Luego de la evaporación la película fina que se forma sobre las paredes del recipiente, se hidrata con el disolvente acuoso para formar las vesículas. La mezcla se hidrata por encima de la temperatura T_c del

Capítulo IV: Vesículas Lipídicas- Niosomas

surfactante. Si el PA es hidrofílico se añade a la mezcla en este momento (Uchegbu y Vyas 1998, Shilpa *et al.* 2011, Moghassemi y Hadjizadeh 2014).

IV.2 Objetivos E Hipótesis

IV.2.1 HIPÓTESIS:

- Es posible encapsular PA hidrofóbicos e hidrofílicos en NIO y mejorar la E_fE.

IV.2.2 OBJETIVO GENERAL:

- Obtener NIO mediante la técnica de film delgado, como sistemas de administración de PA hidrofóbicos e hidrofílicos.

IV.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Establecer las condiciones para la obtención de NIO nanométricos capaces de encapsular PA.
- Caracterizar los NIO, principalmente tamaño de partícula y pot- ζ .
- Determinar la E_fE de este sistema de vesículas lipídicas.
- Evaluar su efecto biológico: toxicidad y su actividad antiviral en un modelo de infección *in vitro*.

IV.3 Materiales y Métodos

IV.3.1 MÉTODO DE HIDRATACIÓN DE PELÍCULA DELGADA - TFH

Para la preparación de NIO se empleó el método de hidratación de película delgada (TFH). Utilizando Spam20® (ref# S6635, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), el colesterol (ref# C8503, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de una pureza del 92,5% y un fosfolípido con carga negativa, diacetilfosfato de sodio (ref# D263, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en una relación molar de 4:2:1 en 100 mg totales de NIO. Los componentes se pesaron, se disolvieron en 10 mL de cloroformo grado reactivo (ref # 102444 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en un matraz de fondo redondo (Figura IV.4). Se homogenizó la mezcla con un vórtex rápido (Fisherscientific™) obteniéndose una solución transparente. Se llevó a evaporación rotatoria a 200 rpm con baño térmico precalentado a 68 °C (Modelo RE 111 BÜCHI) por 1 h hasta obtenerse una película delgada en el fondo del matraz (Figura IV.4) (Bayindir y Yuksel, 2010; Sadeghi Ghadi *et al.*, 2019a; Thabet *et al.*, 2021).

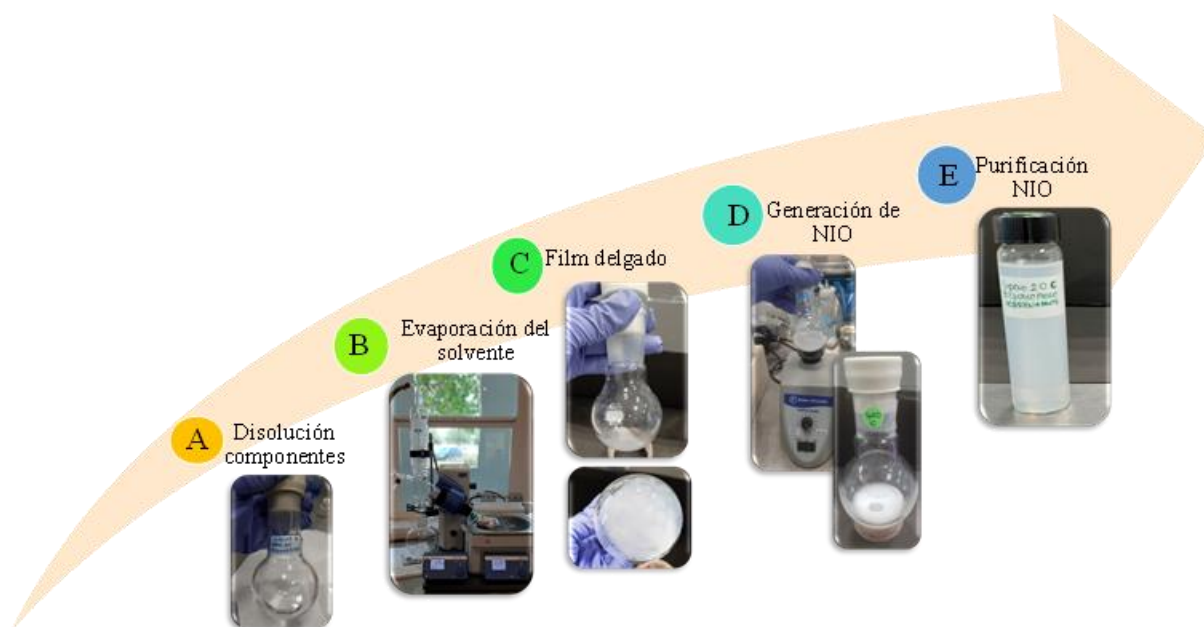


Figura IV. 4 Obtención de NIO por el método TFH.

A Disolución de los componentes, B evaporación de solvente, C formación del film, D rehidratación del film y formación de NIO, E purificación.

La formación de las vesículas lipídicas, se realizó por rehidratación de la película con una solución acuosa estéril en el matraz. Se homogenizó con vortex mixer análogo (Fisherscientific™) a velocidad máxima 4500 x g por 10 min, luego se sonicó durante 15 min a 125 W y 20 khz (Qsonica). El proceso se repitió cuatro veces (**Figura. IV. 4D**). La dispersión coloidal, se centrifugó a 38.000 x g durante 1 h a 25 °C usando la ultracentrífuga Class S XL-90 (Beckman). El proceso se repitió dos veces más de acuerdo al método empleado por Bayindir y Yuksel (2010) y Sadeghi Ghadi *et al.*, (2019b). Los NIO fueron cargados con 20 mM de CUR (**NIO^{CUR}**) y 10 mM de MPA (**NIO^{MPA}**) adicionados en la formación de la membrana como parte de los componentes. Para los NIO cargados con 100 µM de RBV (**NIO^{RBV}**), el PA se colocó en la solución acuosa de rehidratación previamente calentada a 55 °C. Los pellets fueron re-suspendidos en 5 mL de agua ultra pura y los sobrenadantes fueron sonicados por 15 s a 125 W y 20 khz (Qsonica) (**Figura IV.4**). Se tomaron alícuotas de 1 mL para su caracterización.

IV.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS NIO

Se procedió de acuerdo a las técnicas detalladas en la Sección **MM.3.1**. Las muestras usadas fueron: NIO, NIO^{MPA}, NIO^{RBV}, NIO^{CUR}. Se tomaron alícuotas que fueron aisladas y centrifugadas a 14857 x g 5804R (Eppendorf, Alemania) por 60 min a 4 °C. Se centrifugó tres veces para eliminar los residuos de surfactante, estos pellets fueron re-suspendidos en agua ultrapura. Se determinó el *ho* empleando diluciones de las partículas anteriormente formuladas 1:1000 (v/v) en agua ultra pura previamente filtrada con filtros de 0,22 µm.

IV.3.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE BARRIDO (STEM)

En el caso de los NIO se realizaron varios lavados para eliminar el excedente de surfactante, las suspensiones de los distintos NIO se centrifugaron cuatro veces, a 21380 x g, por 60 min a 25 °C, el pellet se dispersó cada vez en agua ultra pura filtrada y una vez limpias y concentradas se tiñeron de acuerdo al procedimiento descrito en la sección **3.4 del Capítulo III**. Finalmente, la suspensión de NIO se colocó sobre un soporte metálico y se dejó secar por 24 h antes de ser visualizadas en el microscopio.

IV.3.4 *EfE*

La eficiencia de encapsulación *EfE* se midió mediante un método indirecto de filtración/centrifugación, la concentración del PA no incorporado fue determinada en los sobrenadantes (SN). La *EfE* se calculó según la ecuación 4.2 donde el mg teórico es la cantidad de PA colocado inicialmente y mg NIOSN es la masa de PA cuantificado en el sobrenadante.

$$EfE = \frac{mg\ Teórico - mgNIOSN}{mgTeórico} * 100 \quad \text{Ec. 4.2}$$

Los SN se colocaron en unidades de filtración Amicon® Ultra-4 (MWCO 3 kDa, Millipore) y se centrifugaron 60 min a 5.000 rpm. El líquido que pasó por el filtro conteniendo el PA no encapsulado, se cuantificó mediante espectroscopia de fluorescencia para MPA (**MM1.2.1**) y RBV (**MM.1.3.1**) y espectroscopia UV-Vis en el caso de CUR (**MM.1.3.2**). Los resultados se expresaron como *EfE* [%].

IV.4 Resultados

IV.4.1 CONDICIONES DE ENCAPSULACIÓN DE PA USANDO NIO

Los resultados que se muestran en **Tabla IV.1** corresponden a las distintas condiciones que se evaluaron para obtener un protocolo reproducible que genere como resultado NIO dentro de la nanoescala y con un bajo PdI. La estandarización y/o determinación de las condiciones óptimas de trabajo se realizó en tres etapas. En la **etapa 1** se evaluó la influencia del surfactante probando Span 20 y Span 60 en las mismas relaciones molares y de formación de vesículas. Para el caso del Span 60 se observó mayor tamaño de partícula con un $Z\text{-ave} = 692,80 \pm 1,25$ nm y un PdI de 0,496. En base a estos resultados, se pasó a la **etapa 2**, en la cual se añadió el uso de vórtex para inducir la formación de vesículas de menor tamaño.

Esta etapa solo produjo una disminución en el tamaño de los NIO cuando se usó Span 20. En base a estos resultados se descartó el uso del Span 60. Llegando finalmente a la **etapa 3**, en la cual se probó introducir ciclos intercalados de homogenización con vórtex y baño ultrasónico, se obtuvieron poblaciones monodispersas y con tamaño de partícula dentro de la escala nano, además el $\text{pot-}\zeta$ se mantuvo constante. Las poblaciones correspondientes a los sobrenadantes de las suspensiones coloidales fueron seleccionadas para ser caracterizadas. Una vez concluida esta fase se determinó la influencia de los distintos PA en los NIO. En la **Figura IV.5**, se muestra esquematizado el proceso de la obtención de NIO con las condiciones establecidas en las distintas etapas descritas en la **Tabla IV.1**

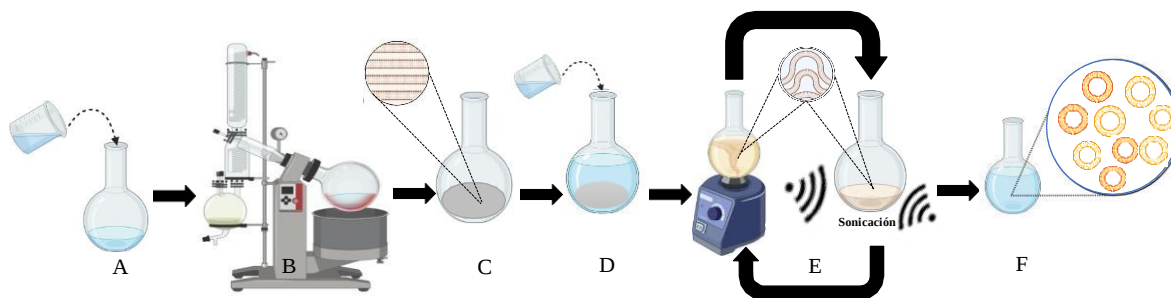


Figura IV.5 Esquema para la preparación de NIO
A) Disolución de los componentes oleosos, B) evaporación de los solventes, C) formación del film, D) hidratación del film, E) deformación del film para inducir a la formación de vesículas y F) suspensión de NIO.

Tabla IV.1 Estandarización de condiciones para la obtención de NIO en base a Z-ave, PdI, y pot- ζ

	Muestra	Span	PdI	Z-Ave (nm)	pot- ζ	Condiciones
Etapa 1	Sobrenadante	60	0,496	692,80 $\pm$ 1,25	-36,60	Homogenización con rotavapor 20 min a 60 °C + baño ultrasónico 10 min.
	Sobrenadante	20	0,274	299,80 $\pm$ 2,12	-42,00	
Etapa 2	Sobrenadante	60	0,596	782,56 $\pm$ 3,02	-35,25	Homogenización con vórtex 10 min + rotavapor 20 min a 50 °C+ baño ultrasónico.
	Sobrenadante	20	0,253	150,90 $\pm$ 1,35	-49,90	
Etapa 3	Sobrenadante	20	0,272	276,40 $\pm$ 1,75	-25,00	Homogenización con vórtex 10 min + 20 min de sonicación a 50 °C, cuatro veces se repitió este proceso vórtex/sonicación.
	Pellet	20	0,297	63,01 $\pm$ 5,15	-25,00	
	Sobrenadante RBV	20	0,215	201,0 $\pm$ 1,26	-28,70	
	Pellet RBV	20	0,218	84,11 $\pm$ 1,15	-36,90	

*Promedio $\pm$ DE, cuatro experimentos independientes

IV.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS NIO ¹

Las propiedades de estas entidades están específicamente dictadas por el tamaño, la forma y la química de la superficie, los cuales son capaces de modificar la farmacocinética intrínseca del PA y su liberación. Por ello es fundamental conocer las características del NIO previo a la encapsulación del PA y con el PA. Las suspensiones coloidales empleadas corresponden a la etapa 3 detallada en la **Tabla IV.1**. Para la caracterización de estas vesículas, se purificaron las suspensiones como se detalla en la sección **4.1**. Como se muestra en la **Figura IV.6**, una población de NIO se aisló del pellet y otra del sobrenadante. Ambas poblaciones fueron caracterizadas por DLS, los SN además por microscopía electrónica con tinción negativa en modo STEM.

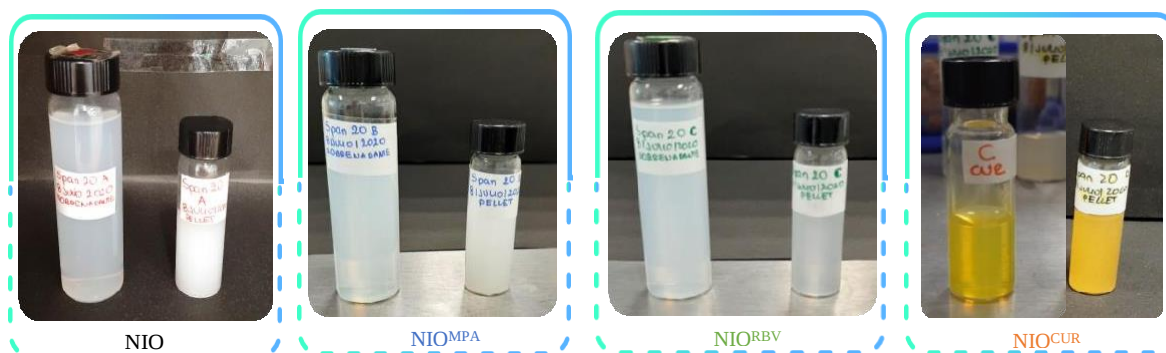


Figura IV. 6 Suspensiones coloidales de la obtención de NIO

Suspensión de los sobrenadantes (viales grandes) y la de los pellets (viales pequeños). NIO: niosomas sin PA, NIO^{MPA} conteniendo MPA en la membrana, NIO^{RBV}: conteniendo RBV en su centro acuoso; y NIO^{CUR}, conteniendo CUR en la membrana del NIO.

Las distribuciones de tamaño de partícula fueron determinadas para las vesículas lipídicas aisladas, y purificadas tal como se muestran en la **Figura IV.7**. Los valores obtenidos para los NIO sin PA (NIO^E) en el pellet fueron $Z\text{-ave} = 222,6 \pm 0,23 \text{ nm}$ y $\text{pot-}\zeta = -36,8 \pm 1,25 \text{ mV}$, y para los del SN fueron $Z\text{-ave} = 84,53 \pm 0,53 \text{ nm}$ y $\text{pot-}\zeta = -23,1 \pm 1,25 \text{ mV}$.

Para facilitar la lectura se creó un código de colores: ¹ NIO^E, NIO^{MPA}, NIO^{RBV}, NIO^{CUR}

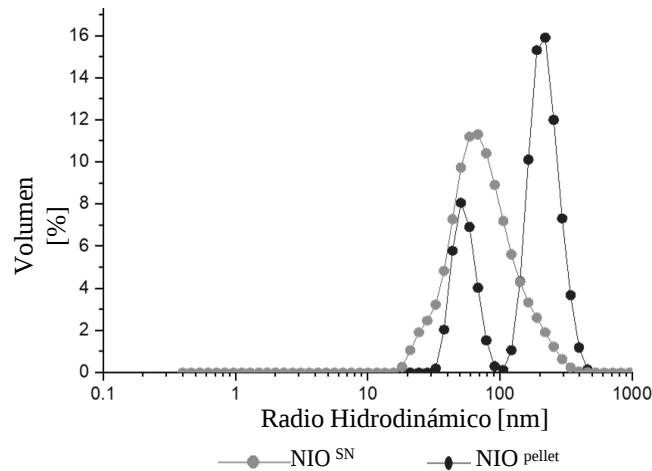


Figura IV. 7 Distribución de tamaño de NIO sin PA.
ho de los NIO contenidos en el pellet (NIO^{pellet}) y en el sobrenadante α (NIO^{SN}).

Los NIO^{RBV} en el pellet presentaron $Z\text{-ave} = 201,00 \pm 0,13$ nm y $\text{pot-}\zeta = -28,7 \pm 0,53$ mV y los del SN $Z\text{-ave} = 84,11 \pm 0,93$ nm y $\text{pot-}\zeta = -36,9 \pm 0,56$ mV. La distribución de tamaños referida al radio hidrodinámico se muestra en la **Figura IV.8**.

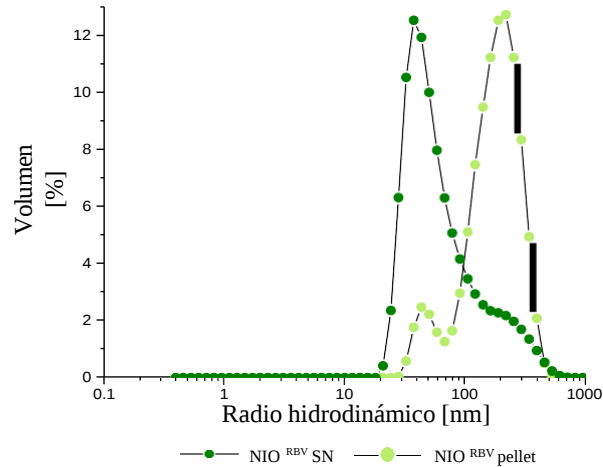


Figura IV. 8 Distribución de tamaño los de NIO^{RBV}
ho de los NIO contenidos en el pellet (NIO^{RBV}) pellet y en el sobrenadante α (NIO^{RBV}SN).

Los NIO^{MPA} en el pellet presentaron $Z\text{-ave} = 225,01 \pm 0,43$ nm y $\text{pot-}\zeta = -43,56 \pm 0,13$ mV y los del sobrenadante $Z\text{-ave} = 139,01 \pm 0,93$ nm y $\text{pot-}\zeta = -39,80 \pm 0,66$ mV. La distribución de tamaños evaluado en términos del radio hidrodinámico se muestra en la **Figura IV.9**.

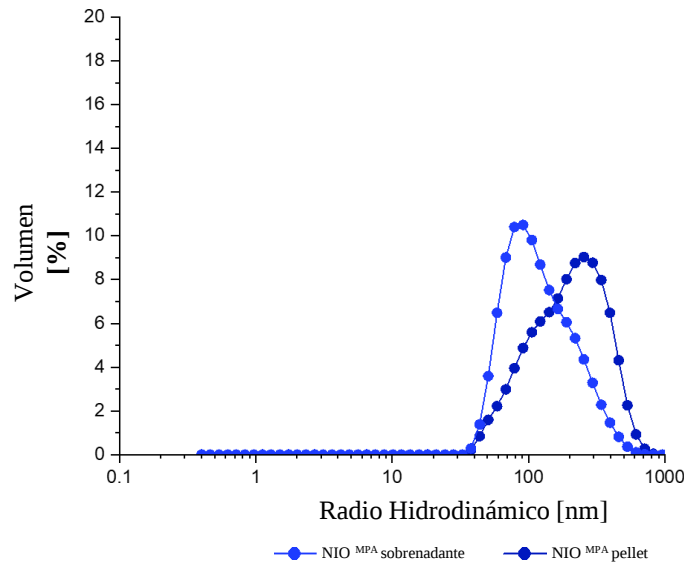


Figura IV. 9 Distribución del tamaño de NIO^{MPA} de los NIO contenidos en el pellet (NIO^{MPA} pellet) y en el sobrenadante a (NIO^{MPA} SN).

Por último, en el caso de los NIO^{CUR} en el pellet fue $Z\text{-ave} = 275,31 \pm 1,83$ nm y un $\text{pot-}\zeta = -66,56 \pm 2,13$ mV y para los del sobrenadante un $Z\text{-ave} = 98,01 \pm 1,93$ nm y un $\text{pot-}\zeta = -59,30 \pm 2,66$ mV. La distribución, en términos del radio hidrodinámico, se muestra en la **Figura IV.10**

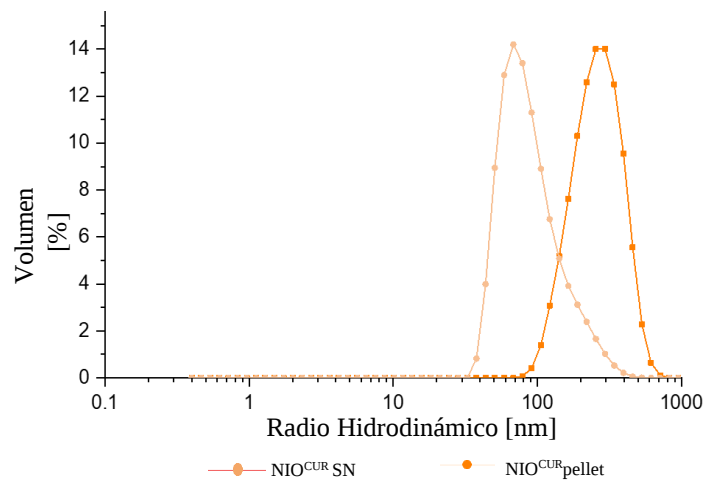


Figura IV. 10 Distribución de Tamaño de partículas de NIO^{CUR} de los NIO contenidos en el pellet (NIO^{CUR} pellet) y en el sobrenadante a (NIO^{CUR} SN).

IV.4.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En la **Figura IV.11**, se presentan las microscopías electrónicas modo STEM de los NIO en sus distintas combinaciones. Las imágenes mostraron la morfología esférica característica de las estructuras vesiculares, tanto con PA como sin PA y que no ocurrió fragmentación de los distintos NIO. Se observan aglomerados de NIO debido al proceso de deshidratación que sufrieron.

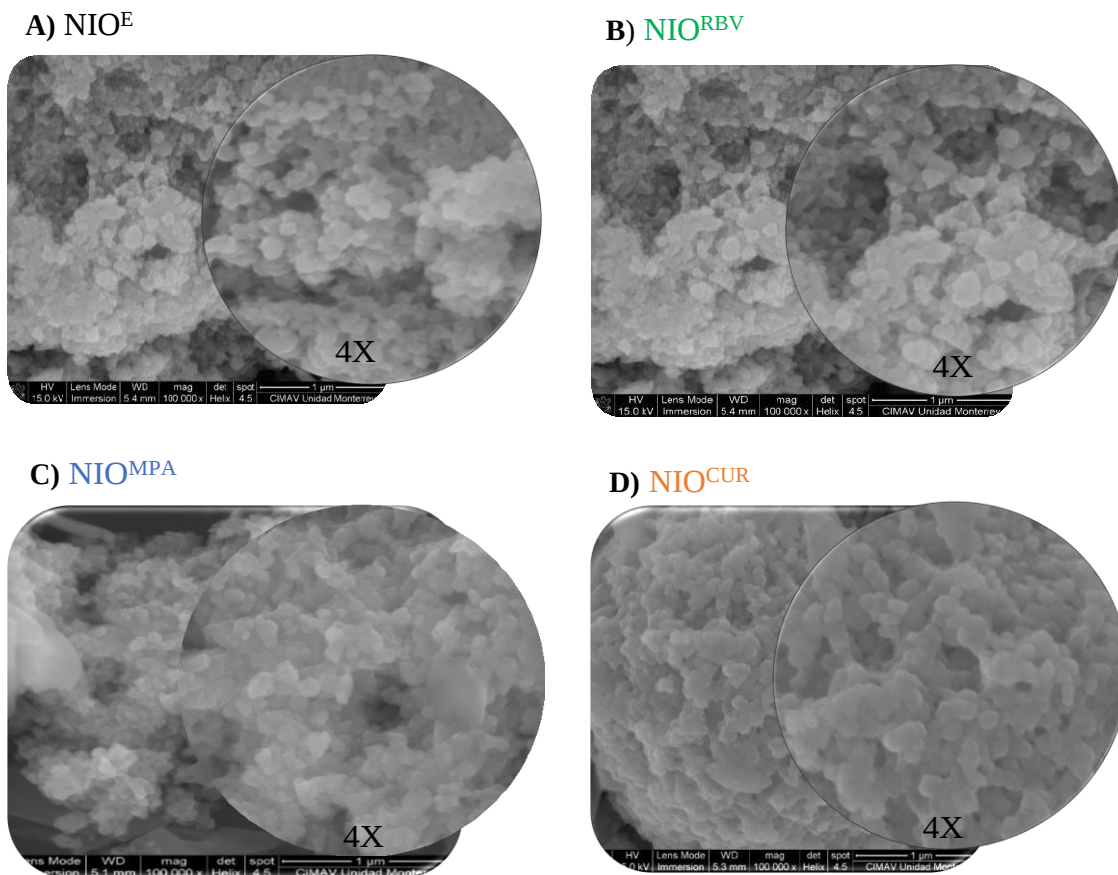


Figura IV. 11 Micrografías STEM con tinción negativa de NIO obtenidas por. A) NIO^E, B) NIO^{RBV}, C) NIO^{MPA} y D) NIO^{CUR}. A: 100X

IV.4.4 RENDIMIENTO Y EfE DE NIO

Se determinó el rendimiento en unidades de masa (mg) para cada proceso de obtención como el promedio de tres lotes independientes de cada uno de los NIO. El menor rendimiento se obtuvo para los NIO^{RIB}, donde el PA se encapsula en el centro acuoso, y el mayor rendimiento se obtuvo para los NIO^{MPA} donde el PA queda atrapado en la membrana (**Tabla IV.2**). Esto permitió concluir que el rendimiento del proceso de obtención está relacionado al tipo de PA.

Tabla IV. 2 Rendimiento en términos de masa obtenida (mg de NIO)

NIO ^{MPA}	87,5 ± 17,7
NIO ^{RBV}	69,50 ± 3,5
NIO ^{CUR}	73,50 ± 8,9
NIO Mixtos ^{MPA-CUR}	80,5 ± 9,90
NIO ^E	85,50 ± 8,9

*Promedio ± DE, n = cuatro experimentos independientes

Los valores de EfE se determinaron de manera indirecta como se describe en la Sección **MM.1.9**. Cuando los PA se agregaron durante la formación de las vesículas, como en el caso de MPA y CUR, los NIO presentaron mayores porcentajes de encapsulación, siendo el más alto para el MPA. En el caso de la RBV que se encapsula en el centro acuoso, se evidenció que la temperatura influyó sobre los porcentajes de encapsulación (**Figura IV.12**). Se observó un aumento de casi tres veces de los valores de encapsulación cuando la solución acuosa conteniendo al PA se calentó a 50 °C respecto a la solución mantenida a 25 °C. Para el caso de los NIO mixtos, es decir aquellos que contenían MPA y CUR, se colocó 10 mM de cada uno de los PA en el proceso de formación del film. Los resultados evidenciaron una diferencia marcada en la EfE entre los PA usados.

Tabla IV. 3 EfE (% PA en NIO)

NIO ^{MPA}	96,16 ± 1,95
NIO ^{CUR}	96,65 ± 2,54
NIO ^{RBV_C}	78,88 ± 4,74
NIO ^{RBV}	27,23 ± 1,35
NIO Mixtos ^{MPA-CUR}	18,73 ^{CUR} ± 3, 56
	73,12 ^{MPA} ± 4,87

*Promedio ± DE, n = cuatro experimentos independientes

Se evaluó la influencia de la temperatura en la EfE de los NIO^{RBV} utilizando soluciones acuosas a T = 25 °C y T = 55 °C. Los resultados obtenidos se graficaron y se muestran en la **Figura IV.12**.

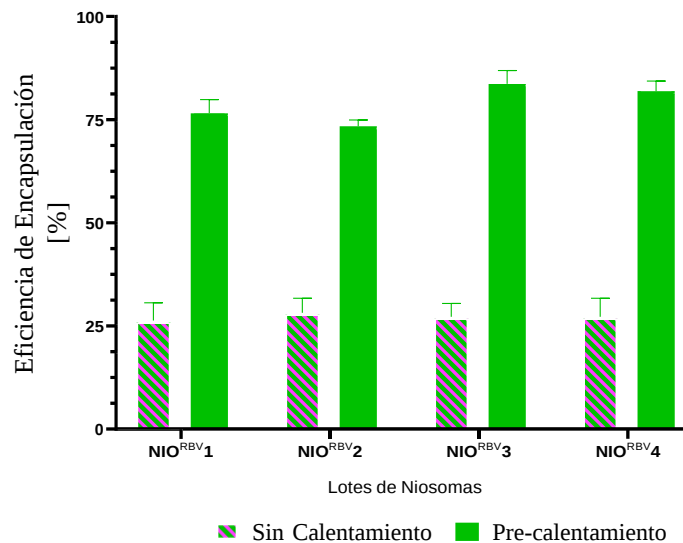


Figura IV. 12 Efecto de la temperatura sobre la EfE de RBV

EfE, las barras verdes corresponden a las soluciones acuosas precalentadas a T= 50 °C. Las barras rayadas representan a las de las soluciones acuosas a T = 25 °C.

IV.4.5 ENSAYOS BIOLÓGICOS

IV.4.5.1 CITOTOXICIDAD

En base a los resultados obtenidos se evaluó la toxicidad de los diversos tipos de NIO en células Vero usando la técnica de cristal violeta detalles en la Sección **MM.1.11.2**. Las células se trataron por 48 h empleándose 2000 $\mu\text{g/mL}$ de masa de NIO como concentración máxima y 1 $\mu\text{g/mL}$ como concentración mínima. El efecto de los PA libres fue evaluado en los capítulos anteriores por lo que estos ensayos se centraron en la evaluación de los nanosistemas. Los NIO, sin PA (NIO^{E}) no resultaron citotóxicos ni citostáticos, aún en la máxima concentración ensayada, se obtuvieron valores de viabilidad celular similares al control sin tratar.

En los cultivos tratados con NIO^{MPA} se observó una disminución de los valores de absorbancia correspondientes al cristal violeta asociado a las células en función del aumento de la concentración. Si bien no se evidenciaron efectos citotóxicos sobre los cultivos, se pudo observar el efecto citostático del MPA (**Figura IV.13**) con 2000 $\mu\text{g/mL}$ de NIO^{MPA} conteniendo 704,37 ng/mL de MPA redujeron la absorbancia aproximadamente al 50% respecto al control de células sin tratar y al tratamiento con la misma concentración de NIO^{E} . Este efecto citostático disminuyó en función de la concentración de NIO^{MPA} , lo cual reflejó el efecto dosis respuesta del PA. Las concentraciones a utilizar en los ensayos de actividad antiviral se establecieron en base a estos resultados.

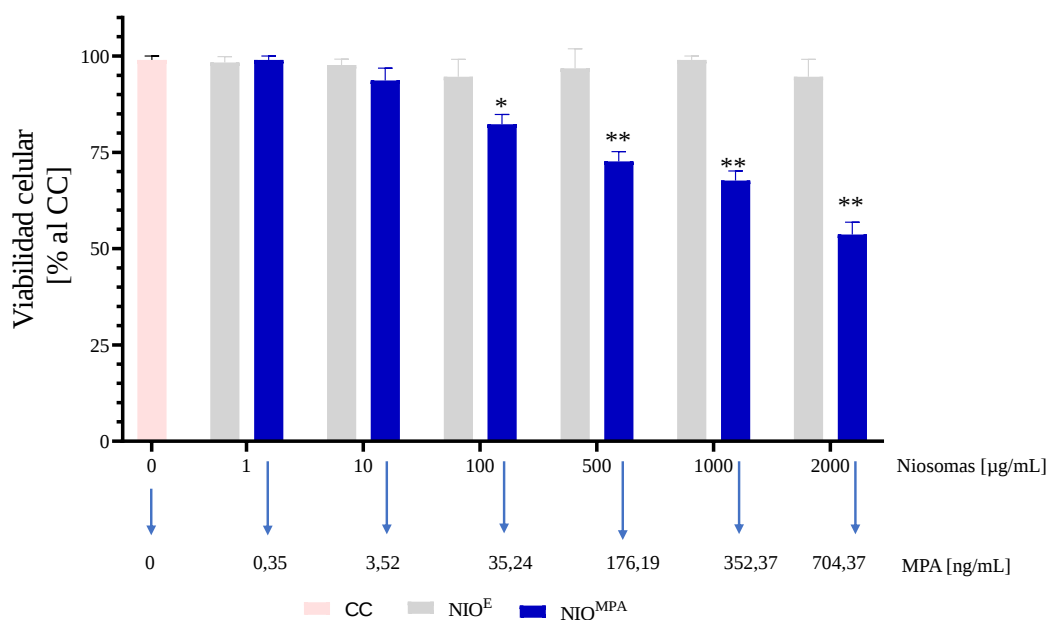


Figura IV. 13 Citotoxicidad de los NIO^{MPA}
Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con tres lotes distintos de NIO.

En el caso de los NIO^{CUR} se observó citotoxicidad en función de la concentración de CUR, así, los cultivos tratados por 48 h con 5282,56 ng/mL de CUR (2000 µg/mL masa de NIO^{CUR}) mostraron un 65% de reducción de la viabilidad celular (**Figura IV.14**), el efecto citotóxico disminuyó en función de la disminución de la concentración de NIO^{CUR}.

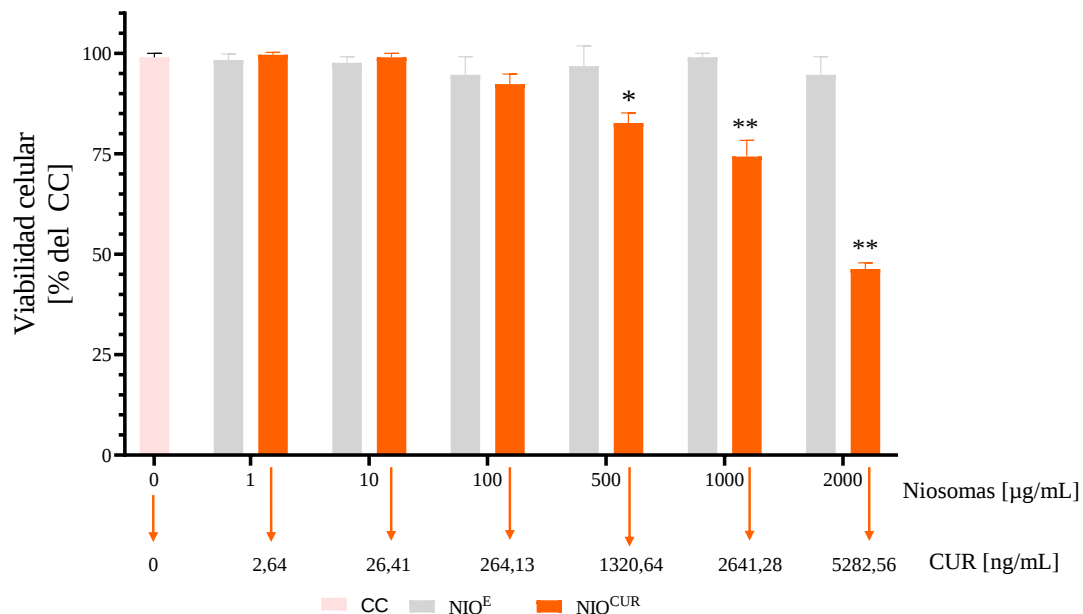


Figura IV. 14 Citotoxicidad de los NIO^{CUR}

Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes con tres lotes distintos de NIO.

Para el caso de los NIO mixtos denominados NIO^{MPA-CUR} que contienen MPA y CUR, la viabilidad celular se redujo un 75% y al igual que en los otros sistemas, esa reducción fue en función de la concentración de NIO (**Figura IV.15**).

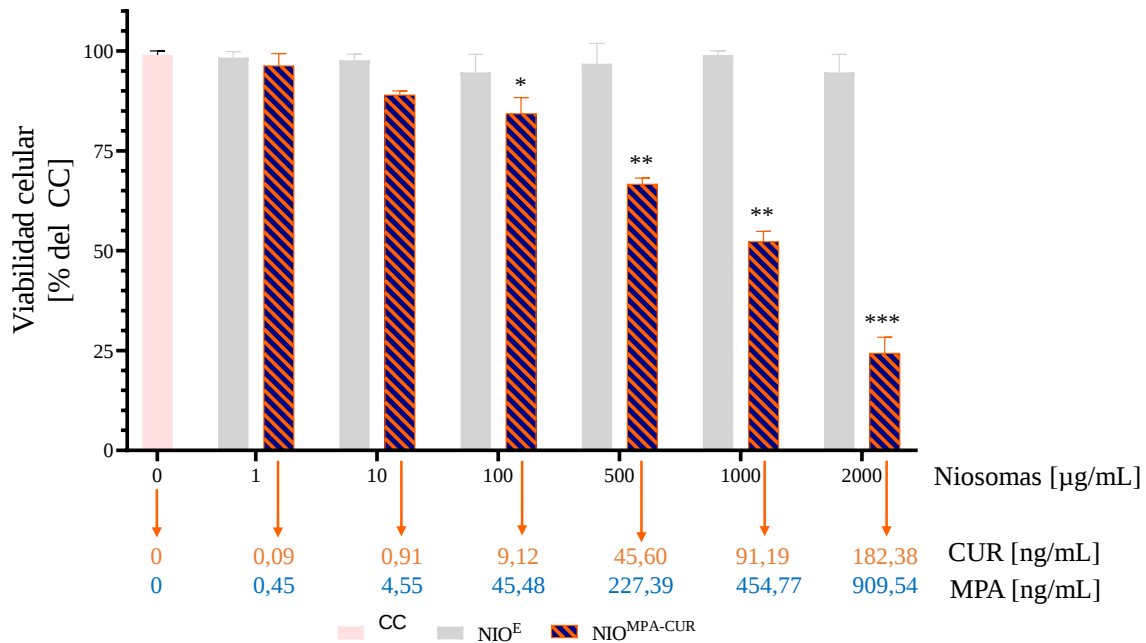


Figura IV. 15 Citotoxicidad NIO^{MPA-CUR}

Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes de con tres lotes distintos de NIO

Finalmente, en cuanto al efecto de los NIO^{RBV}, los resultados demostraron que existe un efecto dosis respuesta, como en todos los casos anteriores, a medida que decreció la masa de NIO, la viabilidad celular aumentó (**Figura IV. 16**).

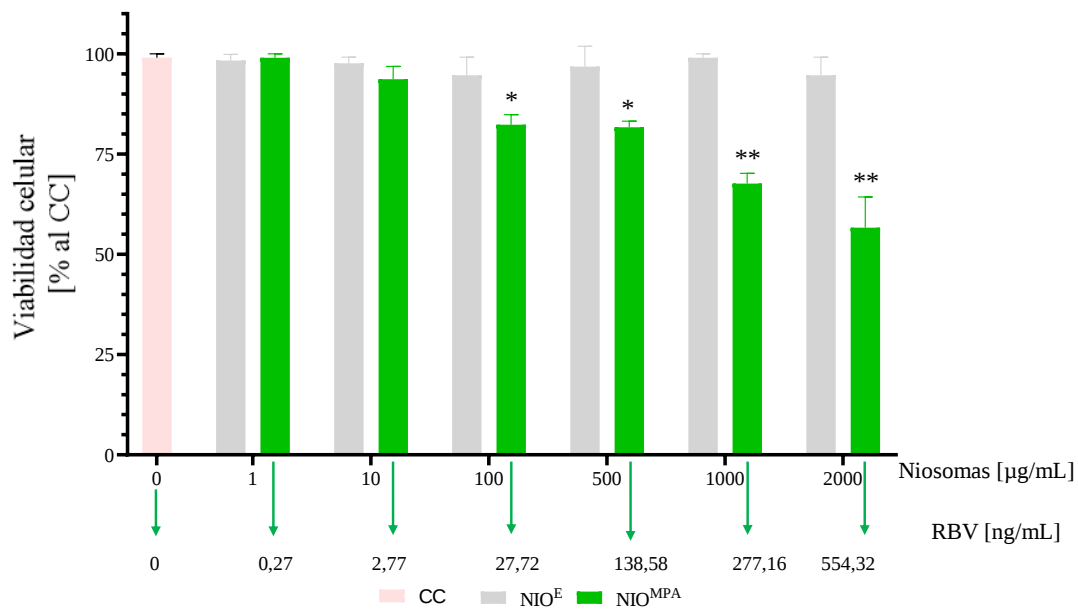


Figura IV. 16 Citotoxicidad de NIO^{RBV}

Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes de tres lotes distintos de NIO.

De acuerdo a los resultados de citotoxicidad mostrados en las **Figuras IV. 13 a 16**, se demostró que, aun utilizando altas concentraciones de PA, el cultivo presentó una toxicidad reducida respecto a los niveles de toxicidad observados en tratamientos con el PA libre. Se determinó la máxima concentración de NIO en 100 µg/mL para los siguientes experimentos ya que, para todos los casos, la viabilidad celular fue superior al 80%.

IV.4.5.2 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

El objetivo fue determinar si los NIO, en sus distintas variaciones, presentaban efecto antiviral. Se emplearon virus de rápida replicación y muy evidente efecto citopático en las células que infectan. Esta característica permitió usar la técnica de cristal violeta. De esta manera, si existiera acción antiviral, el cultivo celular se vería protegido de la acción citopática viral obteniéndose valores de absorbancia del colorante similar a los cultivos no infectados (CC). Debido a que los PA utilizados para la encapsulación están dirigidos a blancos celulares, el tipo de genoma viral podría mostrar diferencias en los niveles de acción antiviral. A fin de determinar si existían tales diferencias, los ensayos se realizaron en cultivos de células Vero infectados con HSV-1 con genoma de DNA y con VSV, un virus con genoma de RNA.

Los datos que se presentan a continuación corresponden a porcentajes de viabilidad celular en los cultivos infectados, tratados y no tratados, respecto al control sin infectar ni tratar, obtenidos por absorbancia del cristal violeta. El tratamiento con NIO^E no logró proteger los cultivos celulares de la infección viral en ninguno de los casos ensayados, obteniéndose valores de viabilidad celular semejantes a los del control viral (CV).

IV.4.5.3 EFECTO ANTIVIRAL DE LOS NIO^{MPA}

El tratamiento con 1 µg/mL de NIO^{MPA} conteniendo 0,35 ng/mL de MPA produjo un porcentaje de inhibición para HSV-1 de orden similar al 99,9% (**Figura IV.17.A**) y del 70% para VSV (**Figura IV.17.B**) correspondiendo a 160,17 ng/mL del PA libre, es decir, se obtuvieron niveles de inhibición viral cercanos con 400 veces menos PA. Cabe destacar que en la máxima concentración de 100 µg/mL de NIO^{MPA}, la concentración del PA fue cuatro veces menor a la de MPA libre usada como control (35,24 ng/mL vs. 160,17 ng/mL).

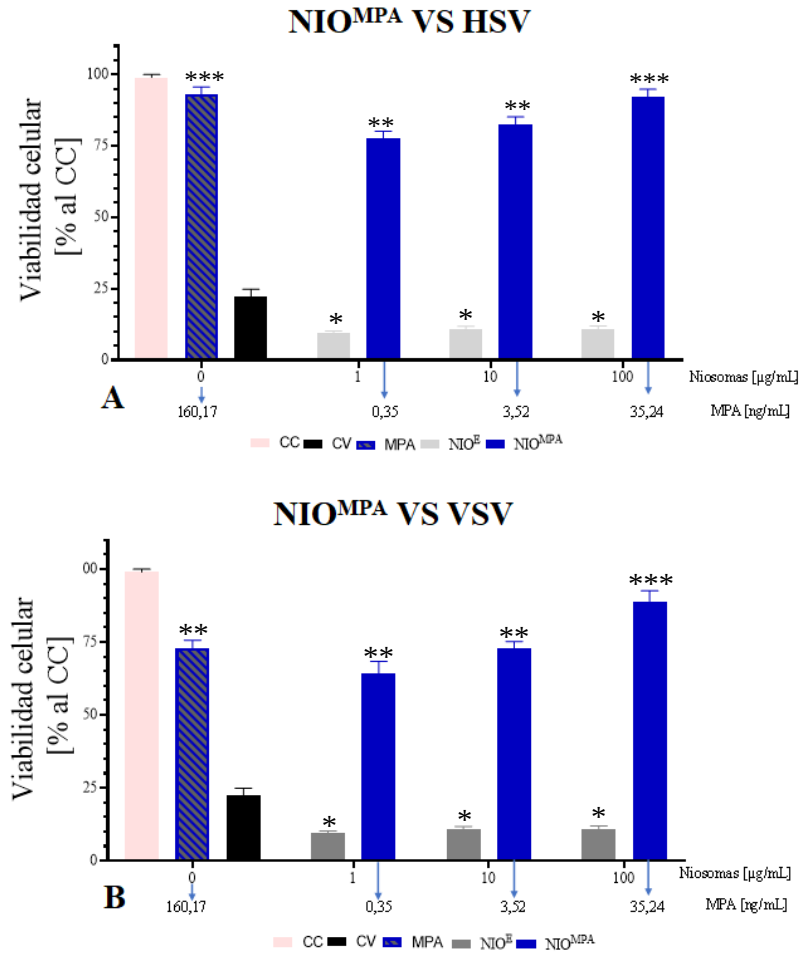


Figura IV.17 Efecto Antiviral de los NIO^{MPA}
A) Efecto antiviral de los NIO^{MPA} sobre la infección con HSV-1 en células Vero, **B)** efecto antiviral de los NIO^{MPA} sobre la infección con VSV en células Vero. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes de tres lotes distintos de NIO.

IV.4.5.4 EFECTO ANTIVIRAL DE LOS NIO^{CUR}

El tratamiento con 1 $\mu\text{g/mL}$ de NIO^{CUR} conteniendo 2,64 ng/mL de CUR produjo un porcentaje de inhibición para HSV-1 de orden similar al 99,9% (**Figura IV.18.A**) y del 70% para VSV (**figura IV.18.B**). Se obtuvieron altos niveles de inhibición viral con 11.000,00 veces menos PA que su versión libre. Cabe destacar que en la máxima concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de NIO^{CUR}, la concentración del PA fue 110 veces menor a la de MPA libre usada como control (264,13 ng/mL vs. 29.470,40 ng/mL).

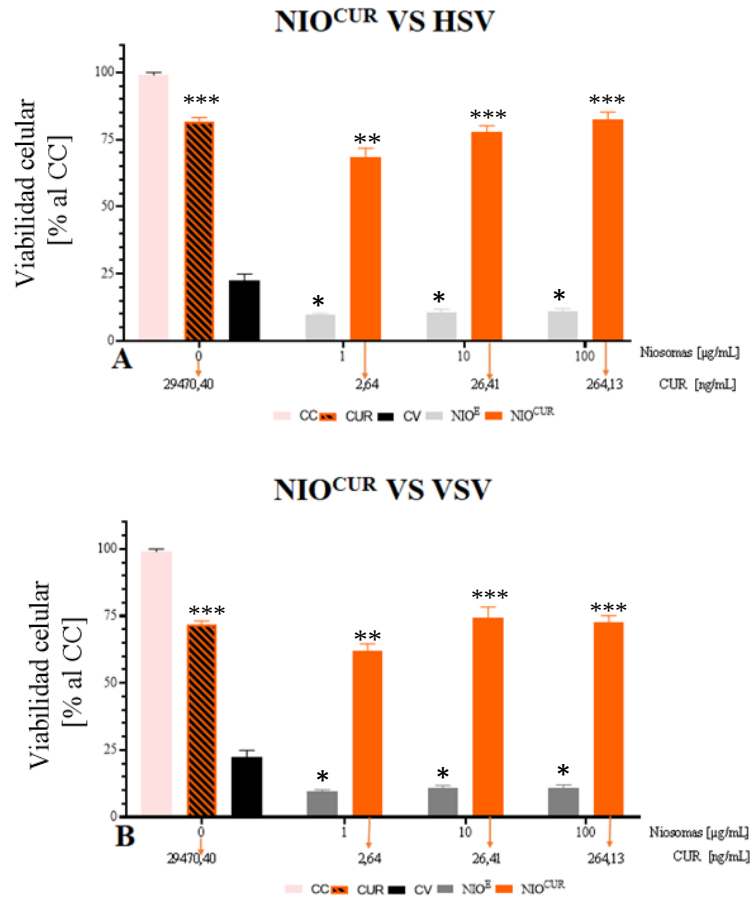


Figura IV.18 Actividad antiviral de los NIO^{CUR}
Efecto antiviral de los NIO^{CUR} sobre la infección con HSV-1 en células Vero, B) efecto antiviral de los NIO^{CUR} sobre la infección con VSV en células Vero. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes de tres lotes distintos de NIO.

IV.4.5.5 EFECTO ANTIVIRAL DE LOS NIO^{MPA-CUR}

El tratamiento con 1 µg/mL de NIO^{MPA-CUR} conteniendo 0,09 ng/mL de CUR y 0,45 ng/mL de MPA produjo porcentajes de inhibición de HSV-1 (**Figura IV.19.A**) y VSV (**Figura IV.19.B**), mayores que para los PA libres, pero menores a los determinados para cada NIO^{PA} por separado. Solo la máxima concentración ensayada de 100 µg/mL de NIO^{MPA-CUR}, exhibió niveles similares a los de cada uno de los NIO^{PA} por separado.

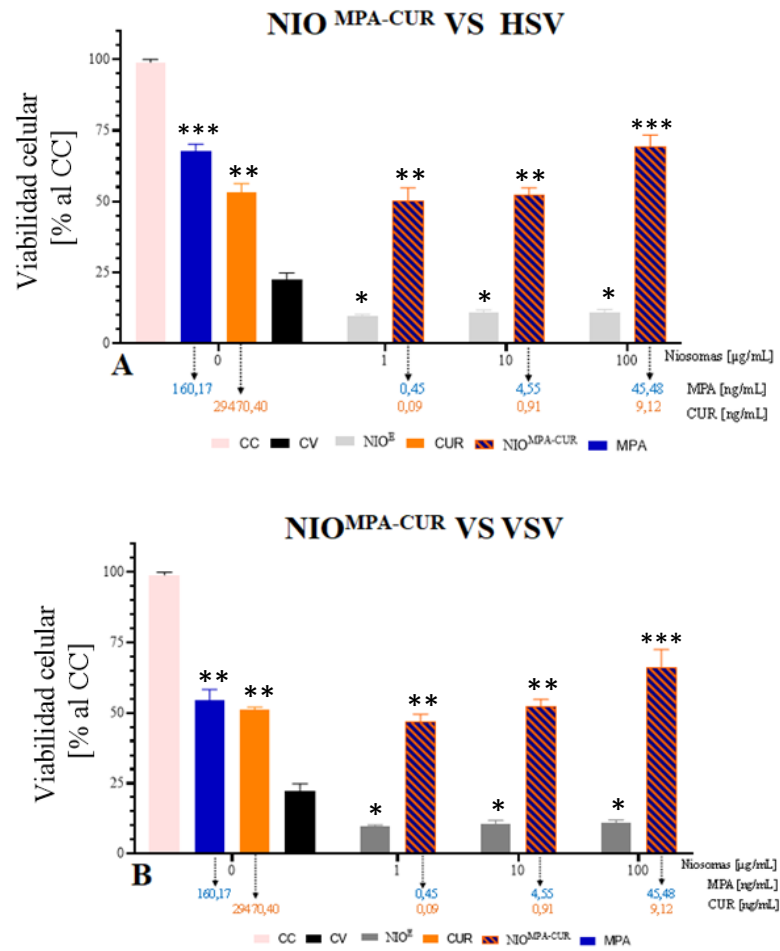


Figura IV.19 Actividad antiviral de los NIO^{MPA-CUR}

A) Efecto antiviral de los NIO^{MPA-CUR} sobre la infección con HSV-1 en células Vero, B) efecto antiviral de los NIO^{MPA-CUR} sobre la infección con VSV en células Vero. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes de tres lotes distintos de NIO

IV.4.5.6 EFECTO ANTIVIRAL DE LOS NIO^{RBV}

El tratamiento con 100 µg/mL de NIO^{RBV} conteniendo 27,72 ng/mL de RBV produjo un porcentaje de inhibición para del 99,9% para HSV-1 (**Figura IV.18. A**) y del 70% para VSV (**Figura IV.18.B**) y fueron de orden similar al producido por 3418,8 ng/mL del PA libre, es decir, se obtuvieron niveles de inhibición viral cercanos con 12600 veces menos PA. Cabe destacar que en la máxima concentración de 100 µg/mL de NIO^{RBV}, la concentración del PA fue 126 veces menor a la de MPA libre usada como control (27,72 ng/mL vs. 3418,8 ng/mL).

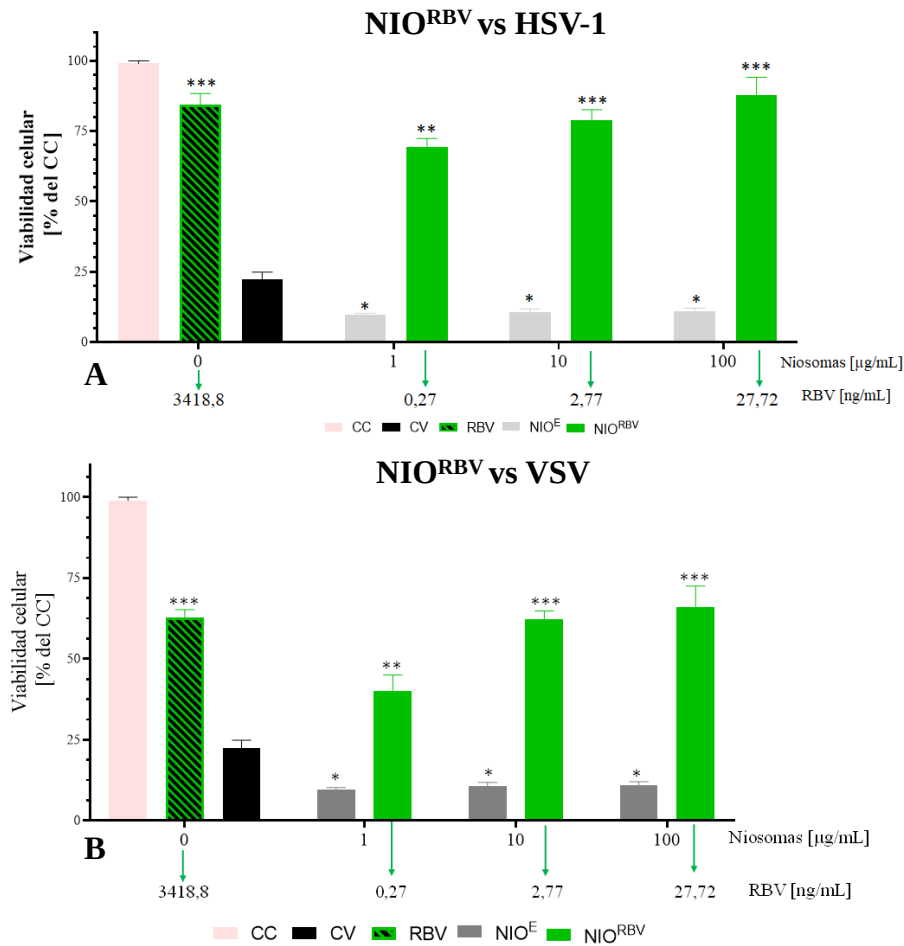


Figura IV.20 Actividad Antiviral de los NIO^{RBV}

A) Efecto antiviral de los NIO^{RBV} sobre la infección con HSV-1 en células Vero. **B)** Efecto antiviral de los NIO^{RBV} sobre la infección con VSV en células Vero. Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes de tres lotes distintos de NIO

IV.5 Discusión

Este capítulo se centró en entender los parámetros relevantes para la formación de NIO con capacidad de encapsular PA. Arribar a NIO con la estructura deseada depende de la comprensión y conocimiento profundo de las propiedades fisicoquímicas de sus componentes, dado que varios factores están involucrados en su formulación. Estos factores pueden depender del método de preparación, vía de administración y de los componentes de la membrana. Los resultados obtenidos demostraron que la elección del surfactante es un parámetro crítico para el ensamblaje de las vesículas, de acuerdo a los resultados resumidos en la **Tabla IV.1**

En los protocolos reportados para la generación de NIO se emplea mayoritariamente Span 60 para controlar el tamaño de partícula. Se ha reportado que valores crecientes de HLB aumenta el tamaño de partícula (Khan *et al.* 2015), debido a que el Span 60 posee un bajo valor HLB (Abu Elfadl *et al.*, 2021, 2021; Khan *et al.*, 2015; Pardakhty *et al.*, 2007; Sadeghi Ghadi *et al.*, 2019; Thabet *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos en este capítulo arrojaron menor tamaño de partícula y poblaciones monodispersas utilizando Span 20 como surfactante, de acuerdo con los resultados de Yaghoobian (2020).

Otro parámetro importante para tener en cuenta al momento de obtener los NIO, es la temperatura a la cual se realiza el ensamblaje. Se observó que influye en el tamaño de la partícula y por lo tanto en la formación de las vesículas. La T_c afecta la E_f/E , ya que a mayor T_c mayor E_f/E (Kauslya 2020; Kazi 2010; R. Kumar 2019 y Thabet 2021). La permeabilidad de la membrana, la rigidez de la bicapa y la estabilidad dependen de T_c y del grado de insaturación en la cadena alquílica. La falta de saturación de la cadena reduce la T_c , en consecuencia, aumenta la fluidez, la permeabilidad de los NIO y la liberación del PA. Los resultados de E_f/E determinados para NIO^{RBV} (**Tabla IV.3**) y (**Figura V.12**).

demostraron que existió mayor encapsulación cuando la solución acuosa fue precalentada a 50 °C. Este hecho puede asociarse a las fuerzas de interacción presentes en el sistema, a la T_c , el HBL y el empaquetamiento del surfactante, dado que también fue observado por otros autores. (Estupiñán Sánchez, 2016 Khoe y Yaghoobian, 2017 y Samimi *et al.*, 2019). De manera general, el objetivo de este capítulo fue encontrar un sistema que permitiera mejorar la E_f/E de los PA con respecto a los sistemas NP-BSA y NP-PLGA descritos en los capítulos II y III. Durante el desarrollo de los NIO se logró comprender aún mejor el sistema y optimizarlo para poder encapsular PA que presentan

limitaciones de solubilidad como el MPA y la CUR, pudiéndose además mejorar la E_fE de estos PA con respecto a los sistemas estudiados en el capítulo II y III.

Por otro lado, es importante estudiar la interacción del colesterol con los surfactantes tipo Span®, ya que los reportes bibliográficos mencionan que la presencia de colesterol debería aumentar la rigidez de la membrana (Devaraj *et al.* 2002; Nasser 2005). Sin embargo, este último efecto puede deberse a la formación de grupos y/o aglomerados con un alto contenido de colesterol que impedirían la correcta interacción con el tensioactivo depositándose en las bicapas, comprometiendo así su uniformidad, resistencia y permeabilidad. Este comportamiento fue evidente cuando las mediciones se realizaron por encima y por debajo de 25 °C y fue también descrito por otros autores (Marianecchi *et al.*, 2014 y Matos *et al.*, 2015).

Por otro lado, la combinación de dos PA en un mismo NIO produjo una disminución de la eficiencia de E_fE, lo cual podría deberse a una competencia entre el colesterol y la CUR debido a que sus grupos apolares conforman estructuras poco solubles en agua. Al inducir la formación de los NIO en un medio acuoso, ambos compuestos podrían adoptar conformaciones semejantes en presencia del surfactante, compitiendo entre ellos en la formación de la membrana del NIO. Existen reportes en la literatura donde el colesterol y la CUR mostraron un efecto similar sobre la membrana liposomal (Sahu, Mishra, y Mishra 2020). La decisión de usar la combinación MPA-CUR se basó en poder aprovechar las propiedades fluorescentes de la CUR para usarla como sonda y permitir la visualización y cuantificación de las partículas en los cultivos celulares.

La selección de los NIO como nueva propuesta de plataforma para la encapsulación de PA se basó en el pot- ζ que presentan al momento de ser administrados, ya sea de manera tópica, intranasal, oral o intravenosa, lo que los vuelve más competitivos y ventajosos que los otros dos sistemas estudiados en esta tesis. Además de su bajo costo de producción, mayor estabilidad en el tiempo y su E_fE (Hashim *et al.*, 2010; Pardakhty *et al.*, 2011; Umbarkar 2021; Yaghoobian *et al.*, 2020b, 2020a).

Debido a que las infecciones virales son enfermedades emergentes y que gran cantidad de agentes infecciosos generan fármaco-resistencia con mayor velocidad que las bacterias y/o protozoarios, así como también algunos poseen reservorios difíciles de alcanzar por la quimioterapia convencional, desarrollar nuevos sistemas de administración de PA que puedan ser direccionados a blancos o *targets* específicos se ha convertido en una necesidad. Por otro lado, los PA antivirales son compuestos

Capítulo IV: Vesículas Lipídicas- Niosomas

químicos que habitualmente muestran elevada toxicidad, por lo que encontrar sistemas que permitan encapsularlos, reducir su toxicidad y al mismo tiempo realizar una entrega eficiente, representa un gran avance en la lucha contra las infecciones virales (Chianese 2022; Sepúlveda 2022; Xu *et al.* 2022).

Los NIO, pueden permitir, cuando sea necesario, llevar diferentes drogas incompatibles, manteniendo una de ellas en el núcleo y la otra en la envoltura (Chiari-Andréo *et al.* 2019) lo cual se ha demostrado aquí encapsulando MPA y CUR en estas vesículas, mostrando efecto antiviral en los distintos virus ensayados. Al presentar un núcleo hidrofóbico de lípidos biocompatibles que son sólidos a temperatura ambiente y a la corporal, los PA se disuelven o dispersan en la matriz lipofílica de estas NP lipídicas (Manaia *et al.* 2017; Chiari-Andréo *et al.* 2019). Estructuras similares cargadas con lopinavir, tenofovir y ritonavir con el propósito de lograr una actividad sinérgica, lograron un aumento en actividad contra el HIV de 3 a 30 veces mayor que sus formas libres (Walvekar *et al.* 2019). Este reporte contrasta con los resultados que se obtuvieron en este capítulo en donde se observaron efectos menores que los NIO con cada uno de los PA pero un efecto mayor que con sus formas libres.

Los resultados de citotoxicidad demostraron que en los tratamientos donde se utilizaron elevadas concentraciones de PA, las células no fueron fuertemente afectadas, sino que la toxicidad fue moderada respecto al PA libre debido al efecto de la encapsulación. Los resultados más llamativos se centraron en la potente acción antiviral de los PA encapsulados utilizando concentraciones hasta 1000 veces menores que las versiones libres. Queda pendiente en este trabajo explorar y entender cuál es el mecanismo molecular operante que permite explicar cabalmente estos resultados. Los trabajos de Almeida (2021); Milovanovic *et. al.* (2017); Cagno *et. al.* (2018), muestran algunas posibles alternativas para explicar los mecanismos de internalización que permiten que la entrega del PA sea más eficiente que la del sin encapsular.

Los ensayos *in vitro* contra virus con genoma de DNA y RNA permitieron considerar un efecto antiviral de amplio espectro de los PA y sus versiones asociadas a NIO, pero es necesario ampliar el estudio y abarcar una mayor variedad de virus. Las características de los NIO como vehículos y su proceso de obtención permitirían generar formulaciones comerciales de aplicación tópica, intravenosa, inhalable, etc. y abre las puertas a una gama mayor de aplicaciones y estudios que permitan perfeccionar este sistema para tratar enfermedades que requieren estrategias farmacológicas novedosas.

IV.6 Conclusiones

Formación de vesículas y caracterización:

- Se logró determinar los principales parámetros para la obtención de NIO por TFH. La formación se vio afectada por el tipo de homogenización empleada para lograr una dispersión uniforme. El tiempo de homogenización, así como la sonicación y la temperatura resultan factores relevantes que afectan el Z-ave de la suspensión de NIO como a así también su polidispersidad.
- Se lograron obtener dos poblaciones uniformes diferenciadas de NIO, las del sobrenadante, que presentaron un tamaño de partícula de 60-120 nm, y una población de mayor tamaño presente en los pellets resuspendidos, con tamaños de 20 a 130 nm.
- El protocolo desarrollado permitió encapsular compuestos hidrofílicos como la RBV e hidrofóbicos como MPA y CUR. Este sistema de transporte de PA resultó muy robusto en cuanto a la eficiencia de encapsulación de distintos PA, además de ser óptimo para distintas maneras de administración tanto tópica como intravenosa.
- Debido a la naturaleza ampliamente hidrofílica de la RBV, así como a su pequeño tamaño, las técnicas de encapsulación directa tradicionales no resultaron efectivas. Sin embargo, el precalentamiento de la solución, mejoró notablemente la E_fE, lo que permitió alcanzar valores en torno al 80%. Para el caso de los PA hidrofóbicos, la ubicación de los mismos fue en la membrana lo que permitió obtener E_fE del 96%.
- Los NIO obtenidos mostraron tener valores de pot- ζ entre los -30 a -60 mV lo indicando que son sistemas estables.

En cuanto a los ensayos biológicos:

- En referencia a la citotoxicidad de los NIO, las concentraciones evaluadas no resultaron tóxicas en el modelo *in vitro* utilizado. En las concentraciones donde los PA en su forma libre presentaron toxicidad, su contraparte en los NIO resultaron inocuos.
- Los resultados de los ensayos antivirales realizados demostraron que los NIO son sistemas eficientes para la internalización efectiva del PA, las dosis se redujeron 10000 veces para el caso de CUR y 1000 para el caso del MPA y la RBV. Es decir que los NIO^{PA} fueron incorporados por las células aún en las concentraciones en que sin encapsular no se vio ningún efecto.

BIBLIOGRAFÍA

Abo-zeid, Y., Urbanowicz, R. A., Thomson, B. J., Irving, W. L., Tarr, A. W., & Garnett, M. C. (2018). Enhanced nanoparticle uptake into virus infected cells: Could nanoparticles be useful in antiviral therapy? *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1), 572-581. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.027>

AbuElfadl, Aya, Mariza Boughdady, and Mahasen Meshali. 2021. “<p>New Peceol™/Span™ 60 Niosomes Coated with Chitosan for Candesartan Cilxetil: Perspective Increase in Absolute Bioavailability in Rats (2010).” *International Journal of Nanomedicine* 16:5581–5601. doi: 10.2147/IJN.S324171.

Achilli E. (2020). *Diseño de nanopartículas proteicas con reconocimiento molecular mediante entrecruzamiento radioinducido*. Universidad Nacional de Quilmes.

Almutary, A., & Sanderson, B. J. S. (2016). The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. *International Journal of Toxicology*, 35(4), 454-462. <https://doi.org/10.1177/1091581816648906>

Anon. n.d. “Preparation and Characterization of Nanoliposomes for the Entrapment of Bioactive Hydrophilic Globular Proteins | Protocol (Translated to Spanish).” Retrieved September 27, 2022 (<https://www.jove.com/es/v/59900/preparation-characterization-nanoliposomes-for-entrapment-bioactive?language=Spanish>).

Arrua Eva C. (2018). *Diseño y evaluación in vitro/ in vivo de sistemas poliméricos micro y nanoparticulados de fármacos*. Universidad Nacional de Rosario.

Atwood, J. L., & Steed, J. W. (2004). *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*. CRC Press.

Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K., & Abdollahi, M. (2016). Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian Biomedical Journal*, 20(1), 1-11. <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.001>

Balakrishnan, Prabagar, Srinivasan Shanmugam, Won Seok Lee, Won Mo Lee, Jong Oh Kim, Dong Hoon Oh, Dae-Duk Kim, Jung Sun Kim, Bong Kyu Yoo, Han-Gon Choi, Jong Soo Woo, and Chul Soon Yong. (2009). “Formulation and in Vitro Assessment of Minoxidil Niosomes for Enhanced Skin Delivery.” *International Journal of Pharmaceutics* 377(1):1–8. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.04.020.

Balfour, h. H. (1999). Antiviral drugs. *New england journal of medicine*, 340(16), 1255-1268. <https://doi.org/10.1056/nejm199904223401608>

Banerjee, T., Singh, S. K., & Kishore, N. (2006). Binding of naproxen and amitriptyline to bovine serum albumin: Biophysical aspects. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 110(47), 24147-24156. <https://doi.org/10.1021/jp062734p>

Bayindir, Zerrin Sezgin, and Nilufer Yuksel. (2010). “Characterization of Niosomes Prepared with Various Nonionic Surfactants for Paclitaxel Oral Delivery.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(4):2049–60. doi: 10.1002/jps.21944.

Blanco, Elvin, Haifa Shen, and Mauro Ferrari. (2015). "Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery." *Nature Biotechnology* 33(9):941–51. doi: 10.1038/nbt.3330.

Boal, A. K., Ilhan, F., DeRouchey, J. E., Thurn-Albrecht, T., Russell, T. P., & Rotello, V. M. (2000). Self-assembly of nanoparticles into structured spherical and network aggregates. *Nature*, 404(6779), Art. 6779. <https://doi.org/10.1038/35008037>

Boiero, C. (2017). Nanopartículas proteínicas como sistemas de bioadhesivos de administración de fármacos [DoctoralThesis]. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/15300>

Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>

Cagno, Valeria, Patrizia Andreozzi, Marco D'Alicarnasso, Paulo Jacob Silva, Marie Mueller, Marie Galloux, Ronan Le Goffic, Samuel T. Jones, Marta Vallino, Jan Hodek, Jan Weber, Soumyo Sen, Emma-Rose Janeček, Ahmet Bekdemir, Barbara Sanavio, Chiara Martinelli, Manuela Donalizio, Marie-Anne Rameix Welti, Jean-Francois Eleouet, Yanxiao Han, Laurent Kaiser, Lela Vukovic, Caroline Tapparel, Petr Král, Silke Krol, David Lembo, and Francesco Stellacci. (2018). Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism. *Nature materials*, 17(2), art. 2. <https://doi.org/10.1038/nmat5053>

Chaudhary, K. R., Puri, V., Singh, A., & Singh, C. (2022). A review on recent advances in nanomedicines for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 69, 103069. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.103069>

Chen, L., & Liang, J. (2020). An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents. *Materials Science and Engineering: C*, 112, 110924. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110924>

Chianese, Annalisa, Carla Zannella, Alessandra Monti, Anna De Filippis, Nunzianna Doti, Gianluigi Franci, and Massimiliano Galdiero. (2022). "The Broad-Spectrum Antiviral Potential of the Amphibian Peptide AR-23." *International Journal of Molecular Sciences* 23(2), art. 2. <https://doi.org/10.3390/ijms23020883>

Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y., Hong, Z., Andino, R., & Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nature medicine*, 6(12), 1375-1379. <https://doi.org/10.1038/82191>

De clerq, e. (2002). Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(1), 13-25. <https://doi.org/10.1038/nrd703>

De clerq, e., & li, g. (2016). Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical microbiology reviews*, 29(3), 695-747. <https://doi.org/10.1128/cmr.00102-15>

Dejnirattisai, W., Zhou, d., Supasa, P., Liu, C., Mentzer, A. J., Ginn, h. M., Zhao, y., Duyvesteyn, H. M. E., Tuekprakhon, a., Nutalai, r., Wang, b., López-Camacho, C., Slon-campos, J., Walter, T. S., Skelly, D., Costa clemens, S. A., naveca, F. G., nascimento, V., Nascimento, F., ... Sreaton, G. R. (2021). Antibody evasion by the p.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell*, 184(11), 2939-2954.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.055>

Desai, N. (2016). Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (Abraxane®). En M. Otagiri & V. T. G. Chuang (Eds.), *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications* (pp. 101-119). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9_6

Desiraju, G. R. (2011). Reflections on the Hydrogen Bond in Crystal Engineering. *Crystal Growth & Design*, 11(4), 896-898. <https://doi.org/10.1021/cg200100m>

Desiraju, G. R. (2013). Crystal Engineering: From Molecule to Crystal. *Journal of the American Chemical Society*, 135(27), 9952-9967. <https://doi.org/10.1021/ja403264c>

Devaraj, Gopi N., S. R. Parakh, Ravi Devraj, S. S. Apte, B. Ramesh Rao, and D. Rambhau. 2002. "Release Studies on Niosomes Containing Fatty Alcohols as Bilayer Stabilizers Instead of Cholesterol." *Journal of Colloid and Interface Science* 251(2):360–65. doi: 10.1006/jcis.2002.8399.

Devi, S. Gayathri, Venkatesh, and N. Udupa. 2000. "Niosomal Sumatriptan Succinate For Nasal Administration." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 62(6):479.

Díaz-Saldivar, P., & Huidobro-Toro, P. (2019). ATP-loaded biomimetic nanoparticles as controlled release system for extracellular drugs in cancer applications. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 2433-2447. <https://doi.org/10.2147/IJN.S192925>

Diksha, D., Prevesh Kumar, and N. Verma. 2021. "An Overview on Niosomes: As an Auspicious Drug Delivery System on the Bases of Application." doi: 10.52711/0974-360X.2021.00508.

Diskaeva, Elena Igorevna, Olga Vladimirovna Veher, Igor Alexandrovich Bazikov, and Alexandr Nikolaevich Maltsev. 2019. "Dispersion Analysis of Niosomes Different Composition." *Journal of Nanoparticle Research* 21(1):21. doi: 10.1007/s11051-018-4453-6.

Drakulevska, E., B. Angelovska, A. Cvetkovski, and T. Stefanovska. 2018. "FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF NIOSOMES AS POTENTIAL NANOPARTICLES FOR DRUG DELIVERY." *ACTA MEDICA BALKANICA* 3(5):19–22.

Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 157(2), 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>

Estupiñán Sánchez, Óscar Rafael. (2016). "Nanovesículas para la encapsulación de fármacos antitumorales: biomimesis de estrategias de transporte."

Evans, a. S. (2013). *Viral infections of humans: epidemiology and control*. Springer science & business media.

Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

G, D., and Veera Lakshmi P. (2020). "Recent Advances of Non-Ionic Surfactant-Based Nano-Vesicles (Niosomes and Proniosomes): A Brief Review of These in Enhancing Transdermal Delivery of Drug." *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi: 10.1186/s43094-020-00117-y.

Galán-Sánchez, f., Fernández-Gutiérrez del 'Alamo, c., & Rodríguez-Iglesias, m. (2014). Infecciones víricas. *Medicine*, 11(49), 2885-2892. [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(14\)70711-5](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(14)70711-5)

Grzelczak, M., Vermant, J., Furst, E. M., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Directed Self-Assembly of Nanoparticles. *ACS Nano*, 4(7), 3591-3605. <https://doi.org/10.1021/nn100869j>

Hashim, Fahima, Mohamed El-Ridy, Mohamed Nasr, and Yasmin Abdallah. 2010. "Preparation and Characterization of Niosomes Containing Ribavirin for Liver Targeting." *Drug Delivery* 17(5):282–87. doi: 10.3109/10717541003706257.

Hickman, M. R., Saunders, D. L., Bigger, C. A., kane, C. D., & Iversen, P. L. (2022). The development of broad-spectrum antiviral medical countermeasures to treat viral hemorrhagic fevers caused by natural or weaponized virus infections. *Plos neglected tropical diseases*, 16(3), e0010220. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010220>

Homaei, Maryam. (2016). "Preparation and Characterization of Giant Niosomes."

Iwao, Y. (2016). Albumin Nanoparticles. En M. Otagiri & V. T. G. Chuang (Eds.), *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications* (pp. 91-100). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9_5

Iwao, Y. (2016). Albumin Nanoparticles. En M. Otagiri & V. T. G. Chuang (Eds.), *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications* (pp. 91-100). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9_5

Jennings, M. R., & Parks, R. J. (2020). Curcumin as an antiviral agent. *Viruses*, 12(11), art. 11. <https://doi.org/10.3390/v12111242>

Jithan, A., Madhavi, K., Madhavi, M., & Prabhakar, K. (2011). Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 1(2), 119-125. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.82432>

Kauslya, Arumugam, Payal D. Borawake, Jitendra V. Shinde, and R. Chavan. (2021). "Niosomes: A Novel Carrier Drug Delivery System." doi: 10.22270/JDDT.V11I1.4479.

Kazi, Karim Masud, Asim Sattwa Mandal, Nikhil Biswas, Arijit Guha, Sugata Chatterjee, Mamata Behera, and Ketousetuo Kuotsu. (2010). "Niosome: A Future of Targeted Drug Delivery Systems." *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 1(4):374–80. doi: 10.4103/0110-5558.76435.

Khan, Muhammad Imran, Asadullah Madni, Saeed Ahmad, Muhammad Ahmad Mahmood, Mubashar Rehman, and Muhammad Ashfaq. (2015). "Formulation Design and Characterization of a Non-Ionic Surfactant Based Vesicular System for the Sustained Delivery of a New Chondroprotective Agent." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 51:607–15. doi: 10.1590/S1984-82502015000300012.

Khoe, Sepideh, and Morteza Yaghoobian. (2017a). "Chapter 6 - Niosomes: A Novel Approach in Modern Drug Delivery Systems." Pp. 207–37 in *Nanostructures for Drug Delivery, Micro and Nano Technologies*, edited by E. Andronescu and A. M. Grumezescu. Elsevier.

Kotha, r. R., & luthria, d. L. (2019). Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*, 24(16), art. 16. <https://doi.org/10.3390/molecules24162930>

Kragh-Hansen, U. (2016). Human Serum Albumin: A Multifunctional Protein. En M. Otagiri & V. T. G. Chuang (Eds.), *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications* (pp. 1-24). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9_1

Kuiken, t., Fouchier, r., Rimmelzwaan, g., & Osterhaus, a. (2003). Emerging viral infections in a rapidly changing world. *Current opinion in biotechnology*, 14(6), 641-646. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.10.010>

Kumar, Gannu P., and Pogaku Rajeshwarrao. 2011. "Nonionic Surfactant Vesicular Systems for Effective Drug Delivery—an Overview." *Acta Pharmaceutica Sinica B* 1(4):208–19. doi: 10.1016/j.apsb.2011.09.002.

Kumar, Raj. (2019.) "Chapter 8 - Lipid-Based Nanoparticles for Drug-Delivery Systems." Pp. 249–84 in *Nanocarriers for Drug Delivery, Micro and Nano Technologies*, edited by S. S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, and S. Thomas. Elsevier.

Lestari, m. L. A. D., & indrayanto, g. (2014). Chapter three—curcumin. En h. G. Brittain (ed.), *profiles of drug substances, excipients and related methodology* (vol. 39, pp. 113-204). Academic press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800173-8.00003-9>

Leung, a. K. C., Kellner, j. D., & Davies, h. D. (2005). Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of the national medical association*, 97(12), 1708-1713. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2640754/>

Leyssen, p., Balzarini, j., de Clercq, e., & Neyts, j. (2005a). The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of imp dehydrogenase. *Journal of virology*, 79(3), 1943-1947. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.3.1943-1947.2005>

Leyssen, p., Balzarini, j., de Clercq, e., & Neyts, j. (2005b). The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of imp dehydrogenase. *Journal of virology*, 79(3), 1943-1947. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.3.1943-1947.2005>

Li, C., Zhang, D., Guo, H., Hao, L., Zheng, D., Liu, G., Shen, J., Tian, X., & Zhang, Q. (2013). Preparation and characterization of galactosylated bovine serum albumin nanoparticles for liver-targeted delivery of oridonin. *International Journal of Pharmaceutics*, 448(1), 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.019>

Linero, Florencia N., Claudia S. Sepúlveda, Federico Giovannoni, Viviana Castilla, Cybele C. García, Luis A. Sclaro, and Elsa B. Damonte. (2012). "Host Cell Factors as Antiviral Targets in Arenavirus Infection." *Viruses* 4(9):1569–91. doi: 10.3390/v4091569.

MaHam, A., Tang, Z., Wu, H., Wang, J., & Lin, Y. (2009). Protein-Based Nanomedicine Platforms for Drug Delivery. *Small*, 5(15), 1706-1721. <https://doi.org/10.1002/sml.200801602>

Manca, Maria Letizia, Maria Manconi, Amparo Nacher, Claudia Carbone, Donatella Valenti, Anna Maria Maccioni, Chiara Sinico, and Anna Maria Fadda. (2014). "Development of Novel Diolein-Niosomes for Cutaneous Delivery of Tretinoin: Influence of Formulation and in Vitro Assessment." *International Journal of Pharmaceutics* 477(1):176–86. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.10.031.

Manconi, M., S. Mura, C. Sinico, A. M. Fadda, A. O. Vila, and F. Molina. (2009). "Development and Characterization of Liposomes Containing Glycols as Carriers for Diclofenac." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 342(1):53–58. doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.04.006.

Marianecci, Carlotta, Luisa Di Marzio, Federica Rinaldi, Christian Celia, Donatella Paolino, Franco Alhaique, Sara Esposito, and Maria Carafa. (2014a). "Niosomes from 80s to Present: The State of the Art." *Advances in Colloid and Interface Science* 205:187–206. doi: 10.1016/j.cis.2013.11.018.

Maus, A., Strait, L., & Zhu, D. (2021). Nanoparticles as delivery vehicles for antiviral therapeutic drugs. *Engineered Regeneration*, 2, 31-46. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2021.03.001>

Mehanna, Mohammed M., Adel M. Motawaa, and Magda W. Samaha. (2015). "Nanovesicular Carrier-Mediated Transdermal Delivery of Tadalafil: I- Formulation and Physicochemical Characterization." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 41(5):714–21. doi: 10.3109/03639045.2014.900075.

Merisko-liversidge, e. M., & liversidge, g. G. (2008). Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicologic pathology*, 36(1), 43-48. <https://doi.org/10.1177/0192623307310946>

Milovanovic, M., Arsenijevic, A., Milovanovic, J., Kanjevac, T., & Arsenijevic, N. (2017). Chapter 14—Nanoparticles in Antiviral Therapy. En A. M. Grumezescu (Ed.), *Antimicrobial Nanoarchitectonics* (pp. 383-410). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52733-0.00014-8>

Mirza, A. Z., & Siddiqui, F. A. (2014). Nanomedicine and drug delivery: A mini review. *International Nano Letters*, 4(1), 94. <https://doi.org/10.1007/s40089-014-0094-7>

Moghassemi, Saeid, and Afra Hadjizadeh. (2014). "Nano-Niosomes as Nanoscale Drug Delivery Systems: An Illustrated Review." *Journal of Controlled Release* 185:22–36.

Nasseri, Behrooz. (2005). "Effect of Cholesterol and Temperature on the Elastic Properties of Niosomal Membranes." *International Journal of Pharmaceutics* 300(1):95–101. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.05.009.

Oh, N., & Park, J.-H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9(Suppl 1), 51-63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>

Ossowicz, P., Janus, E., Klebeko, J., Świątek, E., Kardaleva, P., Taneva, S., Krachmarova, E., Rangelov, M., Todorova, N., & Guncheva, M. (2020). Modulation of the binding affinity of naproxen to bovine serum albumin by conversion of the drug into amino acid ester salts. *Journal of Molecular Liquids*, 319, 114283. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114283>

Ossowicz, P., Janus, E., Klebeko, J., Świątek, E., Kardaleva, P., Taneva, S., Krachmarova, E., Rangelov, M., Todorova, N., & Guncheva, M. (2020). Modulation of the binding affinity of naproxen to bovine serum albumin by conversion of the drug into amino acid ester salts. *Journal of Molecular Liquids*, 319, 114283. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114283>

Otagiri, M., & Chuang, V. T. G. (Eds.). (2016). *Albumin in Medicine*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9>

Pan, X., Wang, H., Zhang, Y., Wang, X., Li, C., Ji, C., & Zhang, J. Z. H. (2022). AA-Score: A New Scoring Function Based on Amino Acid-Specific Interaction for Molecular Docking. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(10), 2499-2509. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01537>

Pando, D., M. Beltrán, I. Gerone, M. Matos, and C. Pazos. (2015). "Resveratrol Entrapped Niosomes as Yoghurt Additive." *Food Chemistry* 170:281–87. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.082.

Pando, Daniel, María Matos, Gemma Gutiérrez, and Carmen Pazos. (2015). "Formulation of Resveratrol Entrapped Niosomes for Topical Use." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128:398–404. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.037.

Pankiewicz, k. W., patterson, s. E., black, p. L., jayaram, h. N., risal, d., goldstein, b. M., stuyver, l. J., & schinazi, r. F. (2004). Cofactor mimics as selective inhibitors of nad-dependent inosine monophosphate dehydrogenase (impdh)—the major therapeutic target. *Current medicinal chemistry*, 11(7), 887-900. <https://doi.org/10.2174/0929867043455648>

Pardakhty, A., E. Moazeni, J. Varshosaz, V. Hajhashemi, and A. Rouholamini Najafabadi. (2011). "Pharmacokinetic Study of Niosome-Loaded Insulin in Diabetic Rats." *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 19(6):404–11.

Pardakhty, Abbas, and Esmaeil Moazeni. (2013). "Nano-Niosomes in Drug, Vaccine and Gene Delivery: A Rapid Overview." *Nanomedicine Journal* 1(1):1–12.

Pardakhty, Abbas, Jaleh Varshosaz, and Abdolhossein Rouholamini. (2007). "In Vitro Study of Polyoxyethylene Alkyl Ether Niosomes for Delivery of Insulin." *International Journal of Pharmaceutics* 328(2):130–41. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.08.002.

Pardeshi, Jagruti C., Nikita N. Jogade, and Dr Sunil B. Bothara. (2022). "A Nano Drug Carrier System: NIOSOMES." Retrieved September 23, 2022 (<https://www.semanticscholar.org/paper/A-Nano-Drug-Carrier-System%3A-NIOSOMES.-Pardeshi-Jogade/ee0078587401c4eb74b13519b8f91c1ec3116c45>).

Patil, G. V. (2003). Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Development Research*, 58(3), 219-247. <https://doi.org/10.1002/ddr.10157>

Pauli, G. F., Chen, S.-N., Simmler, C., Lankin, D. C., Gödecke, T., Jaki, B. U., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., & Napolitano, J. G. (2014). Importance of Purity Evaluation and the Potential of Quantitative ¹H NMR as a Purity Assay. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(22), 9220-9231. <https://doi.org/10.1021/jm500734a>

Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. (2000). Pdfcoffee.Com. Recuperado 11 de agosto de 2022, de <https://pdfcoffee.com/quantitative-nmr-spectroscopy-in-pharmaceutical-applications-pdf-free.html>

Rahman, M. M., Rahman, M. H., & Rahman, N. N. (2005). Competitive binding of ibuprofen and naproxen to bovine serum albumin: Modified form of drug-drug displacement interaction at the binding site. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(1), 43-47.

Rajera, Rampal, Kalpana Nagpal, Shailendra Kumar Singh, and Dina Nath Mishra. (2011). "Niosomes: A Controlled and Novel Drug Delivery System." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 34(7):945–53. doi: 10.1248/bpb.34.945.

Rogerson, A., J. Cummings, N. Willmott, and A. T. Florence. (1988). "The Distribution of Doxorubicin in Mice Following Administration in Niosomes." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 40(5):337–42. doi: 10.1111/j.2042-7158.1988.tb05263.x.

Roy, j. (2011). *An introduction to pharmaceutical sciences: production, chemistry, techniques and technology*. Elsevier.

Sadeghi Ghadi, Zaynab, Rassoul Dinarvand, Neda Asemi, Fereshteh Talebpour Amiri, and Pedram Ebrahimnejad. (2019). "Preparation, Characterization and in Vivo Evaluation of Novel Hyaluronan Containing Niosomes Tailored by Box-Behnken Design to Co-Encapsulate Curcumin and Quercetin." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 130:234–46. doi: 10.1016/j.ejps.2019.01.035.

Sahin, A., Esendagli, G., Yerlikaya, F., Caban-Toktas, S., Yoyen-Ermis, D., Horzum, U., Aktas, Y., Khan, M., Couvreur, P., & Capan, Y. (2017). A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(8), 1657-1664. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1276924>

Sahu, Anand Kumar, Jhili Mishra, and Ashok Kumar Mishra. (2020). "Introducing Tween-Curcumin Niosomes: Preparation, Characterization and Microenvironment Study." *Soft Matter* 16(7):1779–91. doi: 10.1039/C9SM02416F.

Sahu, T., Ratre, Y. K., Chauhan, S., Bhaskar, L. V. K. S., Nair, M. P., & Verma, H. K. (2021). Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102487. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102487>

Salata, O. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>

Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(4), 1518-1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00028>

Sepúlveda, c. S., garcía, c. C., & damonte, e. B. (2022). Inhibitors of nucleotide biosynthesis as candidates for a wide spectrum of antiviral chemotherapy. *Microorganisms*, 10(8), art. 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081631>

Sepúlveda, c. S., García, c. C., Fascio, m. L., D'accorso, n. B., Docampo Palacios, m. L., Pellón, r. F., & damonte, e. B. (2012). Inhibition of junin virus rna synthesis by an antiviral acridone derivative. *Antiviral research*, 93(1), 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.10.007>

Sepúlveda, Claudia Soledad, Cybele Carina García, and Elsa Beatriz Damonte. (2022). "Inhibitors of Nucleotide Biosynthesis as Candidates for a Wide Spectrum of Antiviral Chemotherapy." *Microorganisms* 10(8):1631. doi: 10.3390/microorganisms10081631.

Sharma, Riya, J. S. Dua, and D. Parsad. (2022). "An Overview on Niosomes: Novel Pharmaceutical Drug Delivery System." Undefined.

Shirali, A. C., Look, M., Du, W., Kassis, E., Stout-Delgado, H. W., Fahmy, T. M., & Goldstein, D. R. (2011). Nanoparticle delivery of mycophenolic acid upregulates PD-L1 on dendritic cells to prolong murine allograft survival. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(12), 2582-2592. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03725.x>

Shukla, R., Thok, K., Kakade, S., Handa, M., & Beg, S. (2021). Chapter 18—Clinical translation status of nanoformulations. En S. Beg, M. Rahman, H. Choudhry, E. B. Souto, & F. J. Ahmad (Eds.), *Nanoformulation Strategies for Cancer Treatment* (pp. 303-338). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821095-6.00012-4>

Siddiqui, S., Ameen, F., ur Rehman, S., Sarwar, T., & Tabish, M. (2021). Studying the interaction of drug/ligand with serum albumin. *Journal of Molecular Liquids*, 336, 116200. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116200>

Siebert, a., prejs, m., cholewinski, g., & dzierzwicka, k. (2017). New analogues of mycophenolic acid. Mini reviews in medicinal chemistry, 17(9), 734-745. <https://doi.org/10.2174/1389557516666161129160001>

Silva, C. P., Martínez, J. H., Martínez, K. D., Farías, M. E., Leskow, F. C., & Pérez, O. E. (2018). Proposed molecular model for electrostatic interactions between insulin and chitosan. Nano-complexation and activity in cultured cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 537, 425-434. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.040>

Sinico, Chiara, and Anna Maria Fadda. (2009). "Vesicular Carriers for Dermal Drug Delivery." *Expert Opinion on Drug Delivery* 6(8):813–25. doi: 10.1517/17425240903071029.

Siri, M. (2017). *Estudio de nanopartículas proteicas y su posible aplicación como vectores de drogas antitumorales*.

Smee, d. F., Bray, m., & Huggins, j. W. (2001). Antiviral activity and mode of action studies of ribavirin and mycophenolic acid against orthopoxviruses in vitro. *Antiviral chemistry & chemotherapy*, 12(6), 327-335. <https://doi.org/10.1177/095632020101200602>

Solanki, R., Rostamabadi, H., Patel, S., & Jafari, S. M. (2021). Anticancer nano-delivery systems based on bovine serum albumin nanoparticles: A critical review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 528-540. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.040>

Sundar, S., Kundu, J., & Kundu, S. C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1), 014104. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014104>

Thabet, Yasmeena, Mahmoud Elsabahy, and Noura G. Eissa. (2021). "Methods for Preparation of Niosomes: A Focus on Thin-Film Hydration Method." *Methods* (San Diego, Calif.) S1046-2023(21)00130-4. doi: 10.1016/j.ymeth.2021.05.004.

Thangadurai, D., Islam, S., & Adetunji, C. O. (Eds.). (2022). *Viral and Antiviral Nanomaterials: Synthesis, Properties, Characterization, and Application*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003136644>

Topalâ, T., BODOKI, A., OPREAN, L., & OPREAN, R. (2014). Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes. *Clujul Medical*, 87(4), 215-219. <https://doi.org/10.15386/cjmed-357>

Umbarkar, Mahesh Gajanan. (2021). "Niosome as a Novel Pharmaceutical Drug Delivery: A Brief Review Highlighting Formulation, Types, Composition and Application." *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 5(1):34.

Vimalson, d. C. (2016). Techniques to enhance solubility of hydrophobic drugs: an overview. *Asian journal of pharmaceutics (ajp)*, 10(2), art. 2. <https://doi.org/10.22377/ajp.v10i2.625>

Wani, T. A., Alsaif, N. A., Alanazi, M. M., Bakheit, A. H., Khan, A. A., & Zargar, S. (2021). Binding of colchicine and ascorbic acid (vitamin C) to bovine serum albumin: An in-vitro interaction study using multispectroscopic, molecular docking and molecular dynamics simulation study. *Journal of Molecular Liquids*, 342, 117542. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117542>

Wawer, I., & Diehl, B. (2017). *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. Elsevier.

Williams, R. H., lively, D. H., delong, D. C., Cline, J. C., Sweeney, M. J., Poore, g. A., & Larsen, S. H. (1968). Mygophenolig acid: antiviral and antitumor properties. *The journal of antibiotics*, 21(7), 463-464. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.21.463>

Xu, Shujing, Dang Ding, Xujie Zhang, Lin Sun, Dongwei Kang, Boshi Huang, Xinyong Liu, and Peng Zhan. (2022). "Newly Emerging Strategies in Antiviral Drug Discovery: Dedicated to Prof. Dr.Erik De Clercq on Occasion of His 80th Anniversary." *Molecules* 27(3):850. doi: 10.3390/molecules27030850.

Yaghoobian, Morteza, Azadeh Haeri, Noushin Bolourchian, Soraya Shahhosseini, and Simin Dadashzadeh. (2020a). "The Impact of Surfactant Composition and Surface Charge of Niosomes on the Oral Absorption of Repaglinide as a BCS II Model Drug." *International Journal of Nanomedicine* 15:8767–81. doi: 10.2147/IJN.S261932.

Yaghoobian, Morteza, Azadeh Haeri, Noushin Bolourchian, Soraya Shahhosseini, and Simin Dadashzadeh. (2020b). "The Impact of Surfactant Composition and Surface Charge of Niosomes on the Oral Absorption of Repaglinide as a BCS II Model Drug." *International Journal of Nanomedicine* 15:8767–81. doi: 10.2147/IJN.S261932.

Yamasaki, K., & Anraku, M. (2016). Stability of Albumin and Stabilization of Albumin Preparations. En M. Otagiri & V. T. G. Chuang (Eds.), *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications* (pp. 25-49). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9_2

Yeo, Pei Ling, Chooi Ling Lim, Soi Moi Chye, Anna Pick Kiong Ling, and Rhun Yian Koh. (2017). "Niosomes: a review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications." *Asian Biomedicine* 11(4):301–14. doi: 10.1515/abm-2018-0002.

Yu, Z., Yu, M., Zhang, Z., Hong, G., & Xiong, Q. (2014). Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 343. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-343>