

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-HERPÉTICA DE SISTEMAS
NANOPARTICULADOS DE RIOLOZATRIONA**

Por

M.C Guadalupe Yazmín Solís Cruz

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con ORIENTACIÓN en
QUÍMICA BIOMÉDICA**

Agosto, 2023

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-HERPÉTICA DE SISTEMAS
NANOPARTICULADOS DE RIOLOZATRIONA**

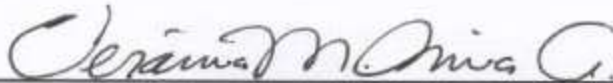
Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Luis Alejandro Pérez López
Director de Tesis



Dra. C. Rocío Álvarez Román
Co-Director de Tesis



Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo
Comisión de Tesis



Dr. C. David Arturo Silva Mares
Comisión de Tesis



Dra. Q. Tannya Rocío Ibarra Rivera
Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-HERPÉTICA DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS DE RIOLOZATRIONA

M.C. Guadalupe Yazmín Solís Cruz

Fecha de presentación: Agosto 2022

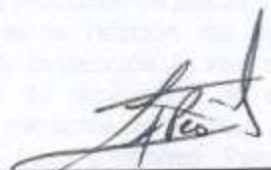
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Presentado por:

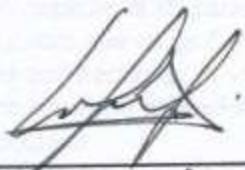
Título de estudio: Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud
M. C. Guadalupe Yazmín Solís Cruz

Número de páginas: 110
Candidata para el grado de doctorado en Ciencias con orientación en Química

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud y en el Bioterio del Departamento de Farmacología y Toxicología todos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección del Dr. C. Luis Alejandro Pérez López, la Co-Dirección de la Dra. C. Rocío Álvarez Román y como miembros de la comisión la Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo, el Dr. C. David Arturo Silva Mares y la Dra. Q. Tannya Rocío Ibarra Rivera.



Dr. C. Luis Alejandro Pérez López
Director de Tesis



Dra. C. Rocío Álvarez Román
Co-Director de Tesis

RESUMEN

M. C. Guadalupe Yazmín Solís Cruz

Fecha de graduación: Agosto, 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título de estudio: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-HERPÉTICA DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS DE RIOLOZATRIONA

Número de páginas: 120

Candidata para el grado de doctorado en
Ciencias con orientación en Química
Biomédica

Área de estudio: Química Analítica.

Propósito y método del estudio: La riolozatriona (RZ) es un compuesto diterpenoide aislado del extracto de diclorometano de la raíz de *Jatropha dioica*. Se ha demostrado que este compuesto posee una actividad antiherpética moderada *in vitro*. Debido a la poca solubilidad de este compuesto en vehículos acuosos, es un desafío generar una formulación estable para su uso potencial en el tratamiento de la infección. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad anti-herpética *in vitro* e *in vivo* de un sistema nanoparticulados de RZ. Constó de cuatro etapas: 1) Obtención de nanopartículas cargas del extracto de diclorometano de *J. dioica* (NPPE) y con riolozatriona (NPPR) por la técnica de nanoprecipitación. Se realizó su caracterización fisicoquímica: tamaño, índice de polidispersidad, potencial zeta, porcentaje de encapsulación (%E) y de eficiencia de encapsulación (%EE). 2) Determinación de disolventes residuales, evaluación del perfil de liberación de RZ y análisis FTIR de NPPR. 3) Evaluación *in vitro* en línea celular Vero de: la actividad citotóxica de las NPPR con el método de Mossman y la actividad anti-herpética con el método de reducción de placas virales. El índice de selectividad (IS) de las NPPR se determinó mediante la relación de su concentración citotóxica cincuenta y concentración inhibitoria 50. 4) Evaluación *in vivo* en ratones BALB/c de: la actividad anti-herpética mediante la escala de puntuación de enfermedad establecida por Cardozo y colaboradores y la toxicidad mediante el análisis macroscópico e histológico del aparato reproductor femenino, hígado, bazo y riñones. Para la administración de las NPPR en los modelos *in vivo*, se desarrolló en frío un hidrogel termosensible (HG).

Conclusiones y contribuciones: Las NPPR fueron homogéneas, estables, con un tamaño de 263.26 nm, %E de 8.51% y %EE de 89.64%, características ideales para su aplicación vaginal. La formulación de NPPR permitió duplicar el IS para el VHS-2 y casi triplicarlo para el VHS-1 respecto al IS reportado para la RZ libre que es de 5.8 para ambos virus; Además, la formulación HG-NPPR presentó una actividad anti-herpética *in vivo* comparable con el HG-aciclovir a una concentración 76 veces menor y no ocasionó alteraciones histológicas en ninguno de los órganos analizados en la evaluación de toxicidad.



Dr. C. Luis Alejandro Pérez López
Director de tesis

DEDICATORIA

A mi amor eterno, mi Yeya

A los pilares de mi vida, mis padres

A mi pequeño gigante, mi hermanito

A mi aventurero favorito, mi Yeyo

Al amor de mi vida, David

AGRADECIMIENTOS

¿Acaso no soy yo el que te ordeno que seas fuerte y valiente? No temas ni te acobardes, porque el Señor, tu Dios, estará contigo dondequiera que vayas (Josué 1:9). Gracias Dios porque cuando mis fuerzas no alcanzaron me hiciste fuerte, porque aún en medio de la tormenta siempre pude sentir tu amor.

A mi esposo David, eres la bendición más grande en mi vida. Gracias por tu apoyo incondicional, por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía, por tu paciencia, por tus ánimos, por tu comprensión, por los fines de semana en el bioterio, por todo y, por tanto. Te amo siempre mi amor.

A mis padres, gracias por estar al pendiente de mí, por su amor, consejos, ánimos y regaños. ¡Los amo!

A mi hermanito, gracias por siempre estar para mí, por tu siempre honesto consejo, por tus palabras de aliento y por hacerte cargo de todo en mi ausencia, nunca podré pagarte por eso. ¡Te amo y te extraño!

A mi mejor amiga Dulce, gracias por inspirarme siempre, eres el mejor ejemplo de perseverancia en mi vida. Gracias por siempre estar para mí, porque a pesar de la distancia nunca te he sentido lejos.

A mis Nebraska guys, ustedes son sin duda alguna de lo mejor que me dejó el doctorado, gracias por ser mi familia en MTY, gracias por estar en las buenas y en las malas, los quiero un montón.

A mi familia los Toscano García, gracias por todo su apoyo, sus ánimos, y sus oraciones. Dios me bendijo con ustedes, ¡los amo!

A mis amigos Aida y Omar gracias por su apoyo, por escucharme, por los ánimos, los consejos, las risas, las comidas y los elotes. Son una bendición en mi vida, ¡Los quiero mucho!

A mi amigo Juan Tamez, gracias por enseñarme a purificar a la riolo, por el mejor consejo del mundo, por los ánimos y las risas.

A mis amigos de Juárez: Antonio, Joseph, Imelda y Lili, gracias por sus ánimos y consejos, los extraño siempre.

Al Dr. Alejandro López, gracias por todo su tiempo, su paciencia, su ánimos, las interminables pláticas, las anécdotas y las risas. Gracias por todo su apoyo, me habría rendido con los ratones si no fuera por usted. Es un ser humano increíble y ha sido para mí un honor ser su primera estudiante de doctorado, ¡lo ha hecho de maravilla!

A la Dra. Rocío Álvarez, gracias porque siempre tenía tiempo para mis dudas y por tomar en cuenta mis propuestas e inquietudes, gracias por su paciencia y consejos. Gracias por presentarme el mundo de las nanopartículas, es increíble todo lo que me ha enseñado en tan poco tiempo.

A la Dra. Verónica Rivas, siempre estaré agradecida con usted por ser la primera en darme una oportunidad, gracias por hacerme parte del “Riolo team”, gracias por estar siempre al pendiente de mí y del proyecto, por todo su tiempo y por todo lo que ha hecho por mi dentro y fuera del ámbito académico.

Al Dr. David Silva, gracias por todo lo que me ha enseñado, por su tiempo, por las buenas charlas y las excelentes recomendaciones musicales.

A la Dra. Tannya Ibarra, gracias por siempre recibirme con amabilidad, por sus certeros consejos y recomendaciones al proyecto y por siempre estar al pendiente de mis avances.

A los QCB Citlaly V. Rodríguez y Brandon D. Muñoz por su valioso apoyo en la realización de los experimentos.

Al M.V.Z Gilberto Arévalo por siempre tener la disposición de ayudarnos y todos los consejos y recomendaciones para la realización de los ensayos *in vivo*.

Al laboratorio de Terapéutica Antioxidante de la Facultad de Medicina de la UANL por su apoyo en la evaluación histológica, especialmente a Yareth, Ana, Diego y Luis.

A Ivonne por ser tan buena y paciente, por siempre brindarme su ayuda y tomarse tiempo para escucharme. Mención especial para Cecy Delgado por siempre ayudarme en ausencia de Ivonne (tanto en pandemia como por su jubilación), gracias por todo tu apoyo y consejos académicos y personales.

A cada uno de los profesores que participaron en mi formación, gracias por su tiempo y dedicación.

A CONACYT por la beca de manutención otorgada durante estos cuatro años.

“Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias. No todo es matemáticas y no todo es simple lógica, también se trata de un poco de belleza y poesía”.

-María Montessori

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Herpes	1
1.1.1 Virus del Herpes simple	3
1.1.2 Prevalencia y transmisión de la infección por VHS	4
1.1.3 Patogénesis y mecanismo de infección del VHS.....	5
1.1.4 Tratamiento contra la infección por VHS	7
1.1.5 Plantas medicinales contra el VHS.....	7
1.1.6 Modelos experimentales para la evaluación de la actividad anti-herpética	10
1.2 Nano encapsulación de principios activos	11
1.2.1 Características ideales de los NP	13
1.2.2 Nanopartículas poliméricas	17
1.2.2.1 NPP en la administración vaginal.....	19
1.3 Antecedentes.....	22
1.3.1 <i>Jatropha dioica</i>	22
1.3.2 Riolozatriona.....	23
1.4 Justificación	25
1.5 Hipótesis.....	26
1.6 Objetivo general.....	27
1.6.1 Objetivos específicos.....	27
CAPITULO II	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1 Material, equipos y reactivos	28
2.1.1 Material.....	28
2.1.2 Equipo	29
2.1.3 Reactivos.....	30
2.1.4 Material Biológico	31
2.2 Métodos	31

4.8 Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad anti-herpética y toxicidad de las formulaciones de HG	94
CAPITULO V	100
CONCLUSIONES	100
PERSPECTIVAS	101
REFERENCIAS	102
ANEXOS	114
ANEXO A.....	114
A1-Barrido UV-Vis de RZ	114
ANEXO B.....	115
B-1 Eudragit® L100-55.....	115
B-2 Medroxiprogesterona	116
B-3 Poloxámero 188.....	117
B-4 Poloxámero 407	118
B-5 Propilenglicol.....	119
B-6 Quitosano de alto peso molecular.....	120
B-7 Rioloatriona	121

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Principales características de importancia clínica de los miembros de la familia <i>Herpesviridae</i> .	2
II	Plantas medicinales con actividad anti-herpética <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	9
III	Modelos animales para la evaluación de la actividad anti-herpética.	11
IV	Ventajas y desventajas que los NP en la administración de fitoquímicos.	16
V	Propiedades ideales de formulaciones basadas en NPP para la administración vaginal.	21
VI	Concentración de RZ en las diferentes disoluciones.	56
VII	Caracterización fisicoquímica de las NPPE obtenidas con diferentes concentraciones de extracto.	57
VIII	Caracterización fisicoquímica de NPPE (F4).	58
IX	Análisis de estabilidad de NPPE (F4).	59
X	Caracterización fisicoquímica de las NPPR con las variables previamente establecidas en el desarrollo de NPPE.	60
XI	Análisis de estabilidad de NPPR.	61
XII	Parámetros del sistema evaluados para cuantificar RZ por espectrofotometría UV-Vis.	64
XIII	Parámetros de validación del método para cuantificar RZ por espectrofotometría UV-Vis.	64
XIV	Actividad anti-herpética <i>in vitro</i> de las NPPR.	67

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura del virus del herpes simple.	4
2	Nanoportadores de principios activos.	13
3	Tipos de NPP.	17
4	Planta de <i>Jatropha dioica</i> .	22
5	Estructura química de RZ.	23
6	Diluciones seriadas para determinación del título viral.	45
7	Perfil cromatográfico del EDJ.	54
8	Cromatogramas CLAR a) RZ de referencia, b) RZ purificada.	55
9	Prueba de solubilidad del EDJ en diversos disolventes.	56
10	Agregados presentes en F1.	57
11	Perfil cromatográfico de EDJ (azul) y del contenido de NPPE (rojo) sobrepuestos.	59
12	Curva de distribución del tamaño de las NPPR.	60
13	Cromatogramas de la solución estándar de la mezcla de disolventes a las concentraciones máximas permitidas por la USP (negro) y de NPPR (rosa).	62
14	Espectro de FT-IR de Eudragit® L100-55, RZ y NPPR, de 4,000 a 400 cm ⁻¹ .	63
15	Perfil de liberación de RZ <i>in vitro</i> a dos valores de pH a partir de NPPR en función del tiempo.	65
16	Viabilidad celular de células Vero después de administrar 20 µg/mL de RZ, NPPR, NPPBco y ACV.	66
17	Fotografías representativas de HG: (A) HG a 4 °C, (B) HG después de 1 minuto a 25 °C y (C) HG después de 1 minuto a 37 °C.	68
18	Evolución de la infección vaginal por VHS-2 en ratones Balb/C y evidencia del efecto de los diferentes tratamientos sobre la infección en los días 0, 2, 4 y 7 de	69

	tratamiento.	
19	Puntuación de la infección de cada grupo a lo largo del periodo de tratamiento.	70
20	Intervalos de confianza de la prueba de comparación múltiple de Dunnett de la puntuación de la infección del grupo CTR+ vs los grupos con tratamientos.	71
21	Intervalos de confianza de la prueba de comparación múltiple de la puntuación de la infección entre el CTR+ y los grupos tratados con HG-ACV y HG-NPPR.	72
22	Tejidos cérvico-vaginales de cada grupo después de 7 días de tratamiento. Tinción hematoxilina-eosina.	73

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

%DER	Porcentaje de desviación estándar relativo
%E	Porcentaje de encapsulación
%EE	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
% p/p	Porcentaje peso-peso
% p/v	Porcentaje peso-volumen
%R	Porcentaje de recuperación
°C	Grado centígrado
µL	Microlitros
ACV	Aciclovir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMB	Anfotericina B
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CC₅₀	Concentración citotóxica media
CCAYAC	Control Analítico y Ampliación de Cobertura de la Cofepris
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMV	Citomegalovirus
Cofepris	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CTR	Control
DE	Desviación estándar
DER	Desviación estándar relativa

DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDJ	Extracto de diclorometano de raíz de <i>J. dioica</i>
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
F1	Formulación 1
F2	Formulación 2
F3	Formulación 3
F4	Formulación 4
FA	Fase acuosa
FO	Fase orgánica
FD	Factor de dilución
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU
FR	Formulación con riolozatriona
FTIR	Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier
g	Gramos
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
h	Horas
HG	Hidrogel termosensible
HG-ACV	Hidrogel termosensible con ACV
HG-NPPBco	Hidrogel termosensible con NPPBco
HG-NPPR	Hidrogel termosensible con NPPR
HG-RZL	Hidrogel termosensible con RZL
HS	heparán sulfato
HS-SPME	Micro extracción en fase sólida modalidad <i>headspace</i>
HVH	Herpes virus humano
IgG	Inmunoglobulina G
IS	Índice de selectividad

LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
mg/mL	Miligramos por mililitros
min	minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mOsm	Miliosmol
MTT	Bromuro metil tiazol tetrazolio
mV	Milivoltios
nm	Nanómetros
NP	Nanoportador
NPP	Nanopartículas poliméricas
NPPBco	Nanopartículas poliméricas blanco
NPPE	Nanopartículas poliméricas cargadas con extracto de diclorometano de <i>J. dioica</i>
NPPR	Nanopartículas poliméricas cargadas con riolozatriona
PBS	Amortiguador de fosfato salino (por sus siglas en inglés)
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
Pi	Piperina
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
ppm	Partes por millón
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Q-NPPBco	Hidrogel de quitosano con nanopartículas blanco
Q-NPPR	Hidrogel de quitosano con nanopartículas cargadas con riolozatriona

R	Coeficiente de correlación
R²	Coeficiente de determinación
RZ	Rioloatriona
RZL	Rioloatriona libre
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
UFP	Unidades formadoras de placas virales
UL	Región larga única
US	Región única corta
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV-Vis	Ultravioleta visible
var.	Variedad
VEB	Virus de Epstein Barr
VHS-1	Virus del herpes simple tipo 1
VHS-2	Virus del herpes simple tipo 2
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VP	Proteínas del virón
VVZ	Virus de la varicela zoster
ζ	Potencial zeta
μg/mL	Microgramo por mililitro

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Herpes

Los miembros de la familia *Herpesviridae* son virus de ADN grandes con un tamaño que va de los 120 a los 260 nm. El virión de todos los herpesvirus se compone de cuatro elementos: un núcleo que contiene el material genético (ADN bicatenario), una cápside icosaédrica conformada por 162 capsómeros, un material proteico amorfo llamado tegumento y una envoltura lipídica rica en glicoproteínas ^{1,2}. Se pueden encontrar diversas especies de herpesvirus en mamíferos, aves, reptiles, peces e incluso moluscos. Nueve de estas especies pertenecientes a tres subfamilias (α , β , γ) tienen la capacidad de infectar al ser humano. Sus características se resumen en la TABLA I ³⁻⁵.

La subfamilia *Alfaherpesvirinae* se caracteriza por tener un ciclo de replicación corto y un amplio rango de hospederos. Por su parte el ciclo de replicación de la subfamilia *Betaherpesvirinae* es largo y tiene un rango de hospederos reducido, mientras que la subfamilia *Gammaherpesvirinae* tiene la capacidad de infectar a una muy limitada cantidad de especies ².

TABLA I. Principales características de importancia clínica de los miembros de la familia *Herpesviridae*.

Nombre común	Abreviatura de uso común	Nomenclatura internacional	Subfamilia	Manifestación de la infección primaria
Virus del herpes simple tipo 1	VHS-1	HVH-1	A	Lesiones mucocutáneas
Virus del herpes simple tipo 2	VHS-2	HVH-2		Lesiones genitales
Virus de la varicela zoster	VVZ	HVH-3		Varicela
Citomegalovirus	CMV	HVH-5	B	Síndrome asintomático
Herpes virus humano 6A	HVH-6A	HVH-6A		Roséola
Herpes virus humano 6B	HVH-6B	HVH-6B		Roséola
Herpes virus humano 7	HVH-7	HVH-7		Pitiriasis rosada
Virus de Epstein Barr	VEB	HVH-4	Y	Mononucleosis infecciosa
Herpes virus humano 8	HVH-8/KSHV	HVH-8		Sarcoma de Kaposi

Una de las características distintivas de estos virus es su capacidad de establecer latencia de por vida en el huésped y reactivarse periódicamente. Las infecciones primarias de estos virus pueden causar un amplio espectro de enfermedades, algunas de las cuales pueden llegar a ser mortales en pacientes inmunocomprometidos ^{1,3,4}.

El presente trabajo se enfoca de manera particular en el virus del herpes simple (VHS).

1.1.1 Virus del Herpes simple

El miembro prototipo de la familia *Herpesviridae* es el VHS. El hospedero natural del VHS tanto del tipo 1 (VHS-1) como del tipo 2 (VHS-2) es el hombre, pero el virus tiene la capacidad de infectar a varios animales incluidos los roedores. La infección por VHS es altamente contagiosa, frecuente y endémica en todo el mundo ⁶. El VHS (Figura 1) tiene un tamaño que oscila entre los 150 y 200 nm que depende de la integridad de su membrana. Como todos los miembros de la familia *Herpesviridae* el VHS se compone de cuatro estructuras:

- El núcleo está formado por ADN bicatenario de alrededor de 155 kb que codifican para aproximadamente 80 genes. El genoma se organiza en dos secciones denominadas región larga única (UL por sus siglas en inglés) que corresponde al 82% del genoma y la región única corta (US por sus siglas en inglés) que es el 18% ⁷.
- La cápside es de forma icosaédrica y se compone de 162 capsómeros de 150 hexones y 12 pentones. Está conformada por cuatro proteínas denominadas proteínas del virión (VP por sus siglas en inglés), la proteína principal VP5 (UL19), VP19C (UL38), VP23 (UL18) y VP26 (UL35) ^{5,7}.
- El tegumento comprende 26 proteínas, estas tienen funciones importantes: el transporte del ADN viral al núcleo, la activación de la transcripción de genes para la replicación viral, la supresión de la biosíntesis de proteínas celulares y la degradación de ARNm ^{1,7}.
- La envoltura viral consiste en una bicapa lipídica que a su vez está conformada por al menos 2 proteínas no glicosiladas (UL20 y US9) y 11

glicoproteínas denominadas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, y gM. Su función principal es mediar la interacción y penetración del virus a la célula blanco al unirse con receptores de membrana como el heparán sulfato ^{8,9}.

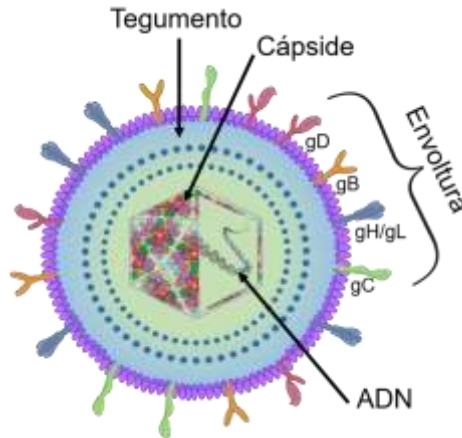


Figura 1. Estructura del virus del herpes simple.

1.1.2 Prevalencia y transmisión de la infección por VHS

El virus del herpes simple es un patógeno humano cosmopolita, es la segunda causa principal de enfermedades virales humanas. Se estima que alrededor del 90% de la población mundial mayor de 50 años presenta anticuerpos contra VHS-1 ^{4,10-12}. Por su parte el VHS-2 presenta una incidencia global de 23 millones de nuevos casos al año, en donde las mujeres representan el 64% ya que tienen mayor susceptibilidad biológica a la infección. Recientes estudios demuestran que existe una fuerte asociación entre la infección por VHS-2 y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las personas con antecedentes de lesiones recurrentes de herpes genital son más susceptibles a la adquisición del VIH ^{7,13,14}. Por otro lado, se ha encontrado una correlación positiva entre la infección en neuronas por VHS-1 y

la presencia de un fenotipo similar a la enfermedad de Alzheimer ¹⁵. Además, la infección de VHS-1 también se ha asociado con comportamientos suicidas y el desarrollo de trastornos psiquiátricos ¹⁶.

La estructura de los viriones es frágil desde el punto de vista de resistencia a factores físicos y químicos, por lo que estos virus deben transmitirse por contacto estrecho entre la persona infectada y el individuo sano ^{6,17}. La infección primaria ocurre a través de los ojos o de alguna pequeña herida en el epitelio nasal, bucal, genital, o incluso la piel. El VHS-1 se adquiere comúnmente por vía oral mediante besos o por auto inoculación en la mucosa conjuntiva ^{6,7}. Por su parte el VHS-2 se adquiere principalmente por contacto sexual a través de micro lesiones en los genitales, pero también puede transmitirse de forma vertical en el parto si la madre presenta la infección durante el alumbramiento¹¹. Aunque existe una mayor prevalencia de la infección genital por parte del VHS-2 ambos virus tienen la capacidad de producir todas las manifestaciones clínicas ^{6,17}.

1.1.3 Patogénesis y mecanismo de infección del VHS

La infección por VHS inicia cuando el virus penetra a través de la piel desgastada o mucosas ^{6,18}. Sin embargo, para que el virus logre ingresar a las células es necesaria una interacción entre la envoltura externa del virus y la membrana de las células diana ^{9,10}. Esta interacción esta mediada por las glicoproteínas gB y gC de la envoltura externa y el heparán sulfato presente en la superficie celular. Una vez que se establece dicha unión, gD se acopla con uno de sus tres receptores: nectina-1, el mediador de entrada del virus herpes o

el heparán 3-O-sulfatado. Lo anterior con el objetivo de liberar la cápside en el citoplasma celular ^{9, 10, 19}. A continuación, la partícula viral se desnuda mientras se dirige al núcleo. Durante este proceso algunas proteínas del tegumento realizan el arresto celular y comienzan la degradación del ARNm celular. Al llegar al núcleo la proteína VP16 se une al ADN e inicia la transcripción en cascada de los genes de la partícula viral ^{1, 20}. El proceso de traducción de las proteínas virales se lleva a cabo en el citoplasma, mientras que la replicación mediante la ADN polimerasa viral se realiza en el núcleo ^{1,21}. Finalmente, después de la producción de nuevos viriones, estos se liberan principalmente por lisis celular para contagiar a nuevas células ¹⁸.

Una parte del inoculo viajará a las neuronas en donde permanecerá en estado de latencia lo que permite evadir la respuesta inmune, mientras que en el sitio de infección comenzará la aparición de lesiones eritematosas, pápulas y úlceras ocasionadas por la destrucción directa del tejido ²². Las manifestaciones clínicas de la infección dependerán del sitio de inoculación, la edad y el estado inmunológico del hospedero. Dentro de las manifestaciones más comunes de la infección se encuentran la gingivoestomatitis herpética, la queratoconjuntivitis herpética, el herpes genital, el panadizo herpético y herpes neonatal. En casos más graves puede llegar a generar encefalitis herpética y en casos aislados puede ocurrir una infección generalizada ¹⁸. Debido al establecimiento de latencia y reactivación del virus, el VHS existe durante toda la vida del huésped infectado. Los cambios histológicos observados en la infección primaria suelen ser más graves que los de los episodios recurrentes ^{7,21,22}.

1.1.4 Tratamiento contra la infección por VHS

La terapia contra VHS está dirigida a la inhibición de la replicación viral. El medicamento de elección es aciclovir (ACV) que además se acompaña de medicamentos para combatir la inflamación y el dolor. Los anti-herpéticos ACV, ganciclovir y penciclovir son análogos de nucleósidos. Estos medicamentos se unen en el sitio activo de la enzima polimerasa y actúan como competidores del sustrato en la síntesis de ADN viral. Para llevar a cabo su función estos deben fosforilarse por la timidina quinasa viral, presente únicamente en células infectadas por el VHS ^{6,7,10,22}.

Las terapias contra el VHS son efectivas para reducir las manifestaciones clínicas, no obstante, aunque pueden reducir la intensidad y frecuencia de los síntomas no curan la infección. En pacientes inmunosuprimidos con tratamientos prolongados de ACV y en pacientes que requieren terapia supresora a largo plazo o que padecen de infecciones recurrentes se puede desarrollar resistencia al ACV. Esta resistencia se debe principalmente a mutaciones en la timidina quinasa viral ^{3,7,10}. Es por esta razón que en la actualidad se buscan nuevas alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por VHS.

1.1.5 Plantas medicinales contra el VHS

El uso de plantas para combatir enfermedades es una práctica que ha acompañado al ser humano a lo largo de toda su historia. Este conocimiento ancestral adquirido de forma empírica se ha transmitido de generación en

generación y es la base de la investigación en los productos naturales ²³. Los compuestos químicos que poseen las plantas, bien llamados fitoquímicos, han sido objeto de estudio debido a su privilegiada variabilidad estructural, a sus singulares estructuras químicas, su elevado potencial terapéutico y a su capacidad de activar múltiples vías de transducción de señales. Todo lo anterior los convierte en excelentes candidatos para combatir enfermedades multifactoriales como el cáncer o aquellas relacionadas con resistencia emergente a fármacos ^{24,25}.

Hoy en día, la importancia de los productos naturales se ve reflejada en el número de medicamentos basados en fitoquímicos que podemos encontrar en el mercado. De los 1,881 medicamentos aprobados en el mundo desde junio de 1981 a septiembre del 2019, el 53% derivan directa o indirectamente de productos naturales ²⁶. En la actualidad existen diversos estudios en los que se demuestra la actividad anti-herpética de diversas plantas (TABLA II), incluso en algunos casos se ha logrado aislar el o los metabolitos responsables de la actividad. La naturaleza de estos metabolitos es muy variada ya que se incluyen polisacáridos (Lasiodiplodan), alcaloides (harmina), flavonoides (dihidromiricetina), terpenos (hiponorterpenos), entre otros ²⁷⁻³⁰. Esto nos indica que podrían ser una fuente importante para el desarrollo de nuevos medicamentos contra este virus.

TABLA II. Plantas medicinales con actividad anti-herpética *in vitro* e *in vivo*.

<i>In vitro</i>							
Nombre de la planta	Nombre común	Partes usadas	Naturaleza del extracto	Índice de selectividad	Tipo de virus	Ensayo utilizado	Referencia
<i>Erythrina abyssinica</i>	Árbol de coral	Corteza	Extracto acuoso	>7143	VHS-1	Ensayo de reducción de placas virales	Mollet, <i>et al.</i> ³¹ (2022)
<i>Artemisia argyi</i>	Artemisa china	Hojas	Extracto etanólico	8.58	VHS-1	Ensayo de reducción de placas virales	Liu, <i>et al.</i> ³² (2023)
<i>Oryza sativa L</i>	Arroz rojo	Semilla	Extracto etanólico	155.23	VHS-1	Ensayo de reducción de placas virales	Suantai, <i>et al.</i> ³³ (2022)
<i>Jatropha dioica</i>	Sangre de drago	Raíz	Extracto de diclorometano	4.9	VHS-1	Ensayo de reducción de placas virales	Solís, <i>et al.</i> ³⁴ (2019)
<i>Thymus capitatus</i>	Tomillo cabezudo	Partes aéreas	Extracto etanólico	26.8	VHS-2	Reducción de placas virales	Toujani, <i>et al.</i> ³⁵ (2018)
<i>Peganum harmala</i>	Ruda siria	Semillas	Extracto metanólico	13.2	VHS-2	Ensayo de reducción de placas virales	Benzekri, <i>et al.</i> ²⁸ (2018)
<i>In vivo</i>							
Nombre de la planta	Nombre común	Partes usadas	Naturaleza del extracto	Hallazgos	Ensayo utilizado	Referencia	
<i>Tanacetum parthenium</i>	Artemisa	Parte aérea	Extracto hidroetanólico	Las pruebas de eficacia terapéutica tópica y oral mostraron que el extracto fue efectivo contra la infección por VHS-1	Modelo de herpes cutánea por VHS-1 en lomo de ratón	Benassi-Zanqueta, <i>et al.</i> ³⁶ (2019)	
<i>Equisetum giganteum</i>	Yerba del platero	Raíz y tallo	Extracto hidroalcohólico	Es posible prevenir el desarrollo de la infección cuando se administra el extracto antes de la inoculación	Modelo de vaginitis por VHS-2 en ratón	Churqui, <i>et al.</i> ³⁷ (2018)	

1.1.6 Modelos experimentales para la evaluación de la actividad anti-herpética

Para evaluar la actividad anti-herpética se emplean modelos *in vitro* de forma inicial y posteriormente modelos *in vivo* ³⁸.

Los modelos *in vitro* son el primer paso para determinar la potencial actividad anti-herpética de algún compuesto o extracto. Dentro de estos podemos encontrar el ensayo de reducción de placas virales, el ensayo de inhibición del rendimiento viral y la técnica de titulación de punto final ^{39,40}. Estos modelos se basan en la capacidad de los virus para replicarse en las células cultivadas, las líneas celulares más recomendadas para estos ensayos son las líneas celulares Vero y MRC-5. Además de evaluar la concentración a la que se logra inhibir el crecimiento del virus o la inhibición del daño celular, estos modelos deben incluir la citotoxicidad. Lo anterior debido a que la efectividad antiviral se reporta como índice de selectividad (IS). El IS es la relación entre la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de la sustancia a probar y su concentración citotóxica 50 (CC₅₀) ³⁸.

Los modelos *in vivo* se emplean para la evaluación preclínica de la eficacia de los compuestos anti-herpéticos. Estos modelos brindan información sobre la respuesta del organismo a la infección. Los modelos *in vivo* son de mucha utilidad en la investigación ya que permiten el uso de técnicas de análisis que en humanos no serían éticamente correctas. Hoy en día se emplean diversos modelos experimentales para la evaluación de compuestos con potencial actividad contra VHS. En la TABLA III se muestran algunos de los

modelos más utilizados con este fin, así como la forma en la que se evalúan la evolución o resolución de la infección.

TABLA III. Modelos animales para la evaluación de la actividad anti-herpética.

Modelo	Cuadro clínico	Medida de la infección	Referencia
Ratón	Encefalitis	Mortalidad, conducta	Stoyanova, <i>et al.</i> ⁴¹ (2023)
Conejo, ratón	Enfermedad ocular	Severidad de lesión, título viral, transcripción de genes virales y expresión de citocinas	Chapellier, <i>et al.</i> ⁴² (2022)
Cobayo, ratón	Herpes cutáneo		Li, <i>et al.</i> ⁴³ (2018) Schmitz, <i>et al.</i> ⁴⁴ (2022)
Ratón, cobayo,	Herpes genital		Bernstein, <i>et al.</i> ⁴⁵ (2019) Zhang, <i>et al.</i> ⁴⁶ (2023)
Cobayo	Herpes neonatal diseminado	Mortalidad	Bernstein, <i>et al.</i> ⁴⁷ (2011)

En este trabajo se evaluará la actividad anti-herpética de sistemas nanoparticulados con riolozatriona. La actividad anti-herpética *in vitro* se determinará con el ensayo de reducción de placas virales y su citotoxicidad mediante el ensayo de MTT en células Vero. Además, se evaluará su actividad anti-herpética *in vivo* en un modelo de vaginitis herpética en ratón y adicionalmente se evaluará su toxicidad.

1.2 Nano encapsulación de principios activos

El término nanotecnología hace referencia a un campo multidisciplinario que se encarga del estudio, diseño, síntesis y la aplicación de materiales a nivel de la nanoescala. Las nanopartículas son sistemas coloidales con un tamaño

menor a los 1,000 nm lo que les confiere una gran área superficial. Cuando el tamaño de los materiales alcanza el nivel de nanoescala, se observan cambios drásticos en sus propiedades ópticas, biológicas, magnéticas y fisicoquímicas. Estos cambios son la base de las múltiples aplicaciones y áreas de estudio de los nanomateriales como es el caso de la nanomedicina ⁴⁸⁻⁵⁰.

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología para llevar a cabo el diagnóstico médico, tratamiento y prevención de enfermedades. Las principales áreas de interés para la nanomedicina son la ingeniería de tejidos para su uso en la medicina regenerativa, el diagnóstico de enfermedades a través de nanodispositivos y los sistemas nanométricos para la administración de fármacos llamados nanoportadores (NP) ⁴⁸.

El desarrollo de NP ha brindado la oportunidad de abordar y tratar enfermedades desafiantes como cáncer, Alzheimer y Parkinson ⁵¹⁻⁵³. Estos sistemas pueden transportar fármacos a tejidos específicos y proporcionar una terapia de liberación controlada. Además, los NP protegen al fármaco de la degradación o eliminación rápida y mejora la concentración del fármaco en los tejidos diana. Todo lo anterior se traduce en una mejor farmacocinética, farmacodinamia y menor toxicidad ^{48,54-56}.

Actualmente existen más de 50 medicamentos basados en NP aprobados por organismos reguladores tales como la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU) y la EMA (Agencia Europea de Medicamentos). Además, alrededor de 100 productos basados en NP se encuentran en fase de ensayos clínicos. Cabe mencionar que al menos 30 de estos involucran la administración de algún producto natural ⁵⁷.

El uso de NP para la entrega de productos naturales además de mejorar su estabilidad ha resuelto el problema de solubilidad para la administración de muchos metabolitos y/o extractos ^{58,59}. En la Figura 2 se muestran los NP más utilizados para la entrega de productos naturales.

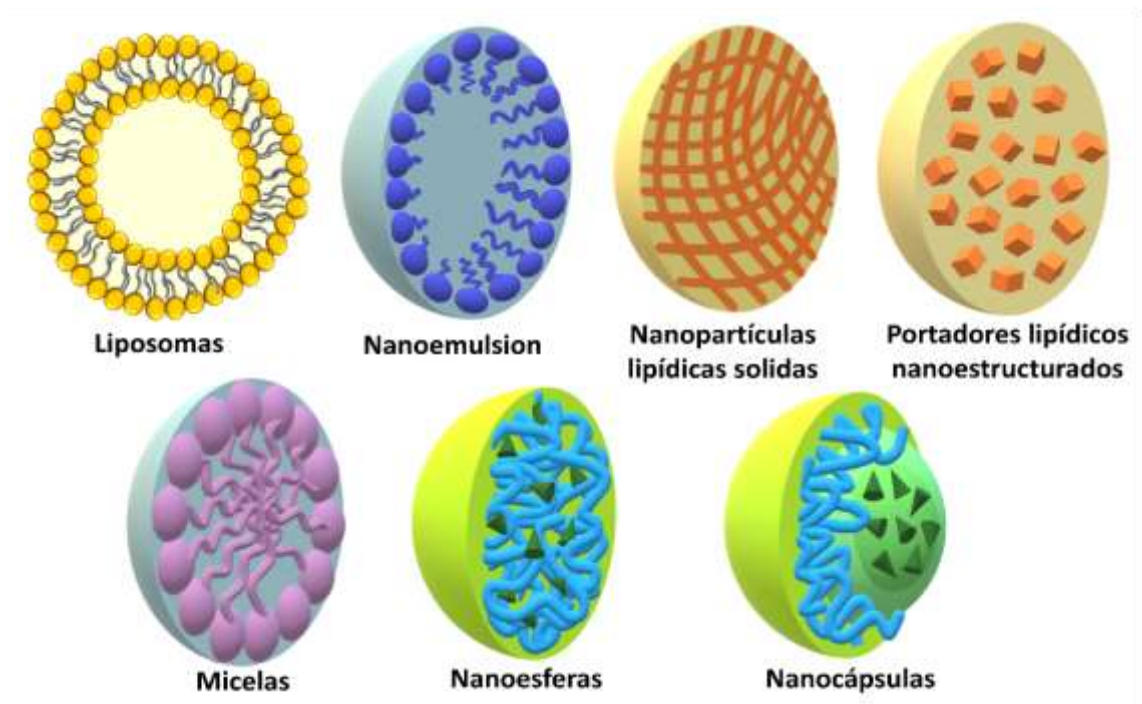


Figura 2. Nanoportadores de principios activos.

1.2.1 Características ideales de los NP

Las características ideales de los NP como sistemas de administración de principios activos dependerán del compuesto que se desee encapsular, el tejido u órgano diana, la vía de administración y en algunos casos el microorganismo al que este dirigido. A continuación, se enlistan algunas de las características más relevantes para el desempeño de los NP como sistemas de administración de principios activos:

- **Tamaño apropiado:** Se ha observado que NP con un tamaño inferior a 5 nm se eliminan rápidamente mediante filtración glomerular en los riñones, mientras que NP con tamaños superiores a 300 nm están más expuestos a la eliminación por macrófagos. Por lo tanto, el tamaño ideal para la aplicación *in vivo* es de 100-300 nm ^{60,61}.
- **Propiedades de la superficie:** Entre las características más importantes de la superficie de un NP, se encuentra el potencial zeta (ζ) y se define como la diferencia del potencial eléctrico que se genera entre la doble capa eléctrica del NP y el medio de dispersión. Este parámetro se utiliza como indicador de estabilidad de los NP ya que un valor ζ mayor o igual a ± 30 mV generará repulsiones electrostáticas entre los NP para evitar su agregación y sedimentación. Además, el ζ tiene una importante injerencia en la actividad biológica de los NP; este potencial eléctrico puede impedir o favorecer la interacción del NP con su sitio de acción ^{62,63}. De igual forma, los grupos funcionales en la superficie de los NP tiene efectos importantes sobre el direccionamiento y la interacción de estos con el microambiente biológico. La superficie de los NP se puede modificar mediante la aplicación de recubrimientos funcionalizados. Estas modificaciones se realizan con base en las características de las células diana y del sitio de acción a donde se dirigen los NP ^{64,65}.
- **Bioseguridad y biocompatibilidad:** Los NP deben ser biocompatibles con el ser humano, así se evitará un rechazo por parte del sistema inmunológico. Además, se busca que los NP sean biodegradables para que puedan ser

metabolizados y eliminados por el organismo sin ocasionar efectos adversos. Es importante considerar que el sistema NP-principio activo debe ser seguro tanto para quien lo consume como para quien lo elabora ^{66,67}.

- Liberación del principio activo: La liberación modificada que se logra con los NP tiene diversas ventajas dentro de las cuales destacan la dosificación disminuida del activo y por lo tanto una menor presencia de efectos secundarios ⁶⁸. Para aumentar la cantidad del principio activo disponible para que ejerza su efecto, es necesario incrementar el % de encapsulación (%E) del principio activo ^{69,70}. Los NP deben además exhibir nula o poca probabilidad de liberación o fuga del principio activo de forma prematura. Finalmente, los NP deben poseer la capacidad de liberar el principio activo de forma completa en una tasa óptima de liberación ^{38,56-60}.

Aunado a todo lo anterior, se busca que el proceso de elaboración de los NP sea simple, económico, libre de compuestos tóxicos y que una vez elaborados puedan someterse a procesos secundarios como liofilización, esterilización y secado ⁷¹. La selección del NP adecuado dependerá de las propiedades fisicoquímicas del principio activo a administrar, del sitio de acción, así como de los excipientes utilizados durante su obtención. En la TABLA IV se mencionan las ventajas y desventajas que ofrece cada NP en la administración de productos naturales.

TABLA IV. Ventajas y desventajas de los NP en la administración de fitoquímicos.

Nanoportador	Excipientes	Ventaja	Desventaja	Referencias
Liposomas	Colesterol, fitoesterol y fosfolípidos	Capacidad de administrar moléculas hidrofílicas y lipofílicas y uso de lípidos naturales que disminuyen la toxicidad	Inestabilidad, oxidación de lípidos y liberación anticipada del fitoquímico	Tai, <i>et al.</i> ⁷² (2020) Alavi, <i>et al.</i> ⁷³ (2022)
Nanoemulsiones	Aceites y tensoactivos	Fácil producción, carga de fitoquímicos elevada y uso de lípidos naturales que disminuyen la toxicidad	Inestabilidad, toxicidad por uso de tensoactivos y bajo control en el tamaño de partícula	Chaijan, <i>et al.</i> ⁷⁴ (2021) Pereira, <i>et al.</i> ⁷⁵ (2023)
Nanopartículas lipídicas sólidas	Ácidos grasos, alcoholes grasos, triglicéridos y ceras	Elevada capacidad de carga y uso de lípidos naturales que disminuyen la toxicidad	Inestabilidad, liberación anticipada del fitoquímico y elevada permeación que lleva a la deposición en células.	Tang, <i>et al.</i> ⁷⁶ (2023) Mohammed, <i>et al.</i> ⁷⁷ (2023)
Portadores de lípidos nanoestructurados	Ácidos grasos, mono, di o triglicéridos y ceras	Capacidad de administrar moléculas hidrofílicas y lipofílicas y uso de lípidos naturales que disminuyen la toxicidad	Inestabilidad y eficiencia pobre en la carga de fitoquímicos hidrofílicos	Houacine, <i>et al.</i> ⁷⁸ (2020) Tang, <i>et al.</i> ⁷⁶ (2023)
Micelas	Tensoactivos y moléculas anfífilas	Fácil producción y capacidad de administrar moléculas hidrofílicas y lipofílicas	Toxicidad por uso de tensoactivos, baja eficiencia de encapsulación, limitado control del tamaño y liberación anticipada del fitoquímico	Jangid, <i>et al.</i> ⁷⁹ (2019) Alavi, <i>et al.</i> ⁷³ (2022)
Nanopartículas poliméricas	Polímeros naturales, sintéticos y semisintéticos y tensoactivos	Capacidad de administrar moléculas hidrofílicas y lipofílicas, buen control sobre el tamaño y uso de compuestos biocompatibles y biodegradables	Toxicidad debido al uso de tensoactivos, degradación más lenta y producción más costosa	Ferreira, <i>et al.</i> ⁸⁰ (2020) Nariseipalli, <i>et al.</i> ⁸¹ (2023)

1.2.2 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (NPP) pueden transportar principios activos, proteínas o material genético hacia un órgano o célula específicos. Las NPP consisten en partículas sólidas formadas con polímeros, en los que el principio activo u otra sustancia terapéutica se encapsula, adsorbe o se incorpora en la matriz polimérica. Con base en su morfología las NPP pueden ser nanocápsulas o nanoesferas. En las nanocápsulas, el agente activo se encapsula dentro de una membrana polimérica, mientras que en las nanoesferas el activo se adsorbe o incorpora en una matriz polimérica (Figura 3) ^{60,82}. Los polímeros utilizados para su formulación pueden ser de origen sintético como los poliacrilatos o el polietilenglicol, semisintéticos como los derivados de la celulosa o naturales como el quitosano ^{80,82}.

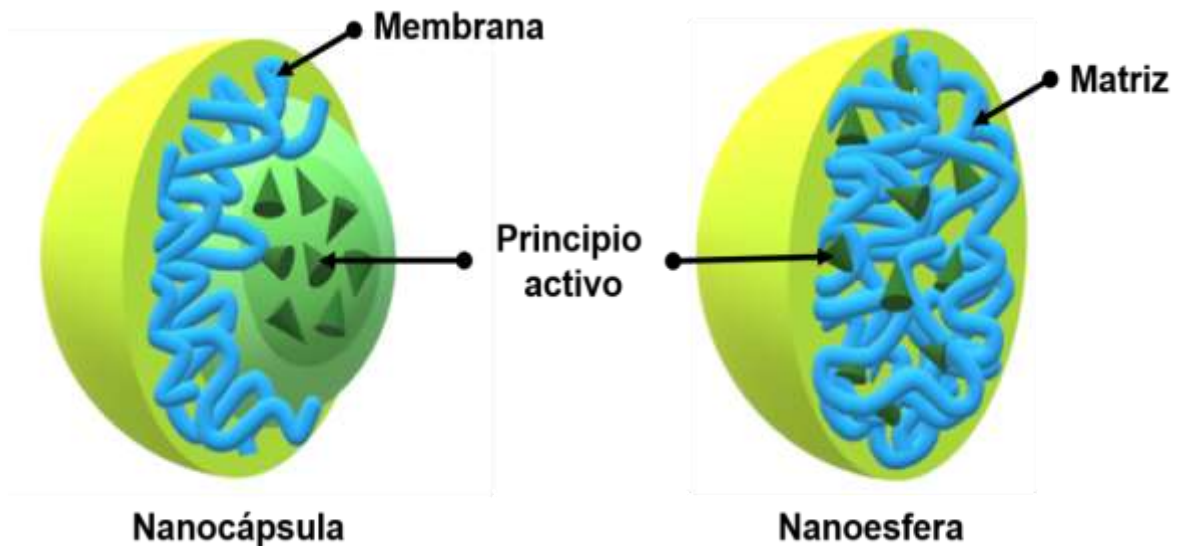


Figura 3. Tipos de NPP.

Las NPP se han vuelto sistemas acarreadores útiles en la entrega de productos naturales para el tratamiento de diversas afecciones y enfermedades como la inflamación, la irritación ocular, la infección de heridas y el herpes. En donde además de evitar la degradación de los productos naturales, han logrado disminuir significativamente la citotoxicidad y favorecer la biodisponibilidad respecto a los productos naturales libres ⁸³⁻⁸⁵. Es por esta razón que la elaboración de nuevas formulaciones de NPP cargadas con productos naturales es un campo de creciente interés.

La elaboración de NPP a partir de polímero preformados se lleva a cabo mediante diversas técnicas que permiten encapsular moléculas de carácter hidrofóbico o hidrofílico. Dentro de estos métodos podemos encontrar emulsión- evaporación, desplazamiento de disolventes (nanoprecipitación), desplazamiento por sales (“salting-out”) y emulsificación-difusión. Debido a su simplicidad y a las condiciones para la formación de las NPP, el método de nanoprecipitación es uno de los más utilizados ^{71,86-88}.

La técnica de nanoprecipitación para la elaboración de NPP se lleva a cabo mediante la lenta interacción de una fase orgánica (FO) y una fase acuosa (FA) a temperatura ambiente y con agitación constante. La FO debe contener al menos un disolvente miscible en agua; en esta fase se encuentran disueltos el polímero y el principio activo. Por su parte a la FA se adiciona en algunas ocasiones un agente tensoactivo. Cuando ambas fases entran en contacto, las cadenas poliméricas se agregan con las moléculas del principio activo lo que da lugar a las NPP; al mismo tiempo el disolvente orgánico difunde hacia la FA.

Después de la formación de las NPP es necesario eliminar el disolvente orgánico, con el fin de estabilizar el sistema y evitar la formación de agregados que puedan incrementar el tamaño de partícula. El método de eliminación del disolvente orgánico más utilizado es la evaporación a presión reducida ^{71,86-88}. En este trabajo se empleará la técnica de nanoprecipitación para la elaboración de las NPP.

1.2.2.1 NPP en la administración vaginal

En los años recientes, las NPP han sido ampliamente utilizadas como portadoras de fármacos para su administración vaginal debido principalmente a su capacidad para proteger de la degradación a los principios activos, la facilidad de ajustar sus propiedades de superficie y su versatilidad para controlar la liberación de los fármacos. Dentro de los polímeros más utilizados con este fin se encuentran el ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA (por sus siglas en inglés), el polietilenglicol (PEG), los polímeros de metacrilato y los poliésteres ⁸⁹⁻⁹¹.

La selección del polímero, así como de los excipientes adecuados para lograr una formulación de NPP exitosa depende sobre todo de la fisiología vaginal ^{90,92,93}. La vagina presenta diversos obstáculos para la administración y absorción de fármacos debido a factores como:

- El epitelio vaginal: está compuesto por células escamosas con uniones intercelulares laxas que promueven la formación de canales entre células adyacentes, estos espacios permiten el movimiento de moléculas,

electrolitos y la absorción de fármacos. Durante el ciclo menstrual el grosor del epitelio vaginal va de 0.2 a 0.5 mm como consecuencia de la variación en los niveles de estrógeno ⁹².

- El flujo vaginal: se trata de una mezcla compleja de secreciones de las glándulas de Bartolino y Skene, células epiteliales, enzimas, urea, ácido láctico, proteínas, carbohidratos y moco vaginal. Este último es una compleja red de microfibras de mucina enredadas con múltiples pliegues, cuyo objetivo es evitar la entrada de posibles patógenos ^{89,92,94}.
- La actividad enzimática: la presencia de enzimas en especial lisozimas está asociada a la degradación de principios activos, principalmente aquellos basados en péptidos ⁹².
- El pH: el valor de pH normal en una mujer adulta sana es de ≈ 4 , debido a la presencia del comensal *Lactobacillus spp.* que produce ácido láctico a partir del glucógeno de las células epiteliales. Este valor de pH brinda protección innata contra los patógenos oportunistas ^{89,92}.

Los desafíos más grandes en la preparación de formulaciones de administración vaginal son asegurar la solubilidad del fármaco y la penetración de este en la mucosa vaginal. Con base en lo anterior Smolenski y colaboradores enlistaron las propiedades imprescindibles para el desarrollo de formas farmacéuticas de administración vaginal a partir de NPP (TABLA V), en donde destacan la solubilidad en agua, el tamaño de la NPP, el pH y las propiedades mucoadhesivas ⁸⁹.

TABLA V. Propiedades ideales de formulaciones basadas en NPP para la administración vaginal.

Propiedades	
Formulación de administración vaginal ideal	Miscible en agua
	Bioadhesivo
	pH ≈ 4
	Osmolaridad <1200 mOsm/kg
	Tamaño de NPP: 100-150 nm : actúan dentro del moco vaginal 200-500 nm: penetran la mucosa vaginal hasta el epitelio vaginal >1,000 nm: acción sobre la superficie del moco vaginal
	Interacciones hidrofóbicas reducidas
	Fácil administración

La mayoría de las investigaciones actuales se enfocan en el desarrollo de formulaciones que permitan un adecuado tiempo de residencia en la cavidad vaginal, en donde los sistemas de liberación mucoadhesivos a base de polímeros han mostrado excelentes resultados ^{89,92,94}. Como ejemplo, Melo y colaboradores prepararon NPP a base de Eudragit® RL100 cargadas con anfotericina B (AMB) y recubiertas con ácido hialurónico para el tratamiento de candidiasis vaginal ⁹⁵. Estas NPP exhibieron una liberación *in vitro* controlada de la AMB durante 96 h y en los ensayos en ratas se demostró que el ácido hialurónico interactuaba con el receptor CD44 de las células epiteliales, lo que favorece la bioadhesión y la internalización de las NPP.

1.3 Antecedentes

1.3.1 *Jatropha dioica*

Jatropha dioica es un arbusto nativo de México, presenta un tamaño promedio de 70 cm, posee ramas de color rojizo y produce un látex amarillo que al oxidarse se torna rojo, de ahí el nombre popular de sangre de drago (Figura 4). *J. dioica* se distribuye en el centro y norte del país en climas secos y semisecos, desde el norte de Querétaro hasta Chihuahua dentro del país, y en el estado de Texas en Estados Unidos de América ^{96,97}.

Los usos medicinales de este arbusto en la medicina tradicional mexicana son muy diversos: los tallos y raíz cocidos se utilizan para evitar la caída del cabello, para aliviar infecciones por golpes o heridas, para aliviar los ojos irritados, etc., mientras que la raíz cruda se ha empleado como astringente ^{98,99}.



Figura 4. Planta de *Jatropha dioica*.

J. dioica tiene diversas actividades biológicas comprobadas. El extracto de éter de petróleo de la raíz tiene actividad contra *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto etanólico del tallo presenta una CMI 0.6 mg/mL contra

Bacillus subtilis y una CMI de 0.8 mg/mL contra *Streptococcus spp.* ^{100,101}. El extracto hexánico de la raíz posee actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Staphylococcus aureus*. ¹⁰² Por su parte el extracto hidroalcohólico de la raíz presenta actividad antifúngica contra *Candida albicans* con una CMI de 500 µg/mL y actividad anti-herpética moderada contra el VHS-1 con una CI_{50} de 280 µg/mL y contra VHS-2 370 µg/mL. Con respecto a la toxicidad, presentó un valor de CC_{50} en células Vero de 644 µg/mL ^{103,104}. De *J. dioica* ya se han logrado aislar diferentes metabolitos de tipo diterpenoide a partir de extractos de la raíz ^{100, 104}.

1.3.2 Riolozatriona

Es un compuesto de tipo diterpenoide (Figura 5), aislado por primera vez por Domínguez y colaboradores en 1980 a partir del extracto de éter de petróleo de la raíz de *J. dioica* ¹⁰⁰. Años más tarde y después de realizar un aislamiento biodirigido Silva-Mares y colaboradores determinaron que la Riolozatriona (RZ) era uno de los metabolitos responsables de la actividad anti-herpética contra VHS-1 y VHS-2 del extracto hidroalcohólico de la raíz de *J. dioica* ¹⁰⁴.

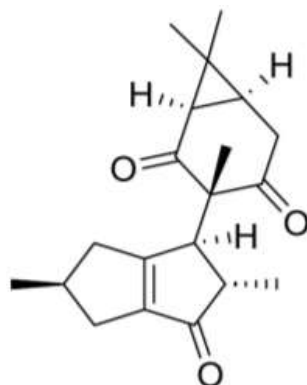


Figura 5. Estructura química de RZ.

Con el objetivo de conocer el estadio en la vía de infección en el que la RZ tiene actividad contra VHS-1, Ferrel Hernández y colaboradores realizaron diferentes ensayos de infección *in vitro* ¹⁰⁵. En estos ensayos se analizó la expresión de proteínas involucradas en los estadios tempranos de la infección viral. Se determinó que la RZ tiene una actividad protectora sobre las células ya que reduce entre 33 a 39% la formación de placas virales respecto al control negativo. Esta protección se genera cuando se trata a las células con el diterpeno 12 h antes de la infección. Además, se demostró que la RZ evita la entrada de la partícula viral a la célula. La formación de partículas virales se redujo significativamente en las células tratadas durante 1h con RZ respecto a las células no tratadas.

La actividad de la RZ también se ha evaluado en modelos *in vivo*. Tamez Fernández y colaboradores desarrollaron un ungüento oftálmico con RZ como principio activo ¹⁰⁶. A pesar de que se prefieren vehículos farmacéuticos acuosos en las formulaciones oftálmica, el grupo de trabajo eligió un ungüento debido a la baja solubilidad de la RZ en soluciones acuosas. Esta formulación fue evaluada en un modelo de queratoconjuntivitis herpética en ratones. El ungüento oftálmico (0.3% p/p) logró una mejor resolución de la enfermedad con resultados similares al ACV (2.5% p/v), que se empleó como control positivo. Estos resultados alientan la evaluación de la actividad de la RZ en otros modelos de infección *in vivo* y al desarrollo de nuevas formulaciones que mejoren la solubilidad y disponibilidad de RZ.

1.4 Justificación

La Rioloatriona es un diterpenoide aislado de *J. dioica* que ha demostrado un efecto anti-herpético moderado *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, debido a la poca solubilidad de este compuesto en vehículos acuosos, es un reto generar una formulación estable para su potencial uso en el tratamiento de la infección.

Debido a la elevada incidencia de infecciones por VHS, así como la aparición de cepas resistentes al ACV, es de importancia la búsqueda de alternativas de vehículos de principios activos, en donde las nanopartículas poliméricas son una excelente alternativa.

Por lo anterior se propone evaluar la actividad anti-herpética de formulaciones de nanopartículas poliméricas con RZ en un modelo murino de infección vaginal.

1.5 Hipótesis

La riolozatriona administrada en nanopartículas favorece su actividad contra el VHS al incrementar su disponibilidad.

1.6 Objetivo general

Evaluar la actividad anti-herpética *in vitro* e *in vivo* de un sistema nanoparticulados de riolozatriona.

1.6.1 Objetivos específicos

1. Optimizar una formulación de nanopartículas poliméricas cargada con extracto de diclorometano de raíz *J. dioica* y caracterizarla fisicoquímicamente.
2. Formular y caracterizar fisicoquímicamente nanopartículas poliméricas cargadas con RZ y evaluar su perfil de liberación.
3. Evaluar la actividad anti-VHS de las nanopartículas poliméricas cargadas con RZ en células Vero.
4. Evaluar la actividad anti-VHS-2 de las nanopartículas poliméricas cargadas con RZ en un modelo de infección vaginal en ratón.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material, equipos y reactivos

2.1.1 Material

- Acrodiscos PVDF 45 mm de diámetro con filtro de 0.22 μm , Millipore[®]
- Caja de cultivo celular con ventilación de 25 cm^2 , 75 cm^2 y 175 cm^2
- Cámara de Neubauer
- Columna cromatográfica AccQ-Tag (3.9 x 150 mm, 4 μm), Waters[®]
- Columna cromatográfica DB-WAX (30 x 0.22 mm, 0.25 μm), Agilent[®]
- Microplacas estériles de poliestireno de 24 y 96 pozos de fondo plano, Nest[®]
- Microtubos de 1.5 mL con filtro de 0.22 μm , Millipore[®]
- Pipetas automáticas de 10, 20, 200 y 1,000 μL , Eppendorf[®]
- Pipetas serológicas desechables de 5 mL, 10 mL, 25 mL y 50mL, CELLTREAT[®]
- Tubos cónicos estériles 15 y 50 mL, Corning[®]
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL y 5 mL, Eppendorf[®]

2.1.2 Equipo

- Agitador vórtex Scientific Industries[®], modelo SI-A536
- Balanza analítica OHAUS Pioneer[®], modelo PA214C
- Balanza granataria OHAUS Pioneer[®], modelo PA3102
- Baño de ultrasonido Bromson[®], modelo 2510R-DTH
- Baño recirculador de agua, LabTech[®], modelo LCB-6D
- Bomba de vacío Vacubrand[®], modelo IC
- Campana de bioseguridad PRENDO[®], modelo CSB-120
- Campana de extracción Lumistell[®], modelo CEE-120
- Campana de seguridad biológica Esco[®], modelo LR2-6S2
- Centrifuga Spectrafuge 24D, Labnet[®]
- Centrifuga Thermo IEC[®], modelo Centra CL3
- Cromatógrafo de gases 6890N, Agilent[®], acoplado al espectrómetro de masas 5973, INERT[®]
- Cromatógrafo de líquidos analítico Alliance 2695 con DAD, Waters[®]
- Equipo de rotaevaporación Heidolph[®], modelo 517-61000-01-0
- Espectrofotómetro IR-FT, Perkin Elmer[®], modelo Frontier Óptica
- Espectrofotómetro UV- Vis, Thermo Scientific[®], modelo Genesys 10s
- Incubadora Quincy Lab[®], modelo 10140
- Lector de microplacas Thermo Scientific[®], modelo 357
- Microscopio invertido OLYMPUS CORPORATION, modelo CKX41SF
- Potenciómetro Orion, Thermo Scientific[®], modelo Star A211
- Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, modelo Nano-Zs90

2.1.3 Reactivos

- Acetato de etilo grado analítico, Fermont®
- Acetona grado CLAR, Baker®
- Acetonitrilo grado CLAR, J.T Baker®
- Aciclovir, polvo liofilizado Laboratorios PISA®
- Ácido cítrico, Mallinckrodt Pharmaceuticals®
- Ácido láctico, Sigma Aldrich®
- Alcohol etílico, CTR®
- Amortiguador de fosfato Salino (PBS), Sigma Aldrich®
- Antibiótico/Glutamina, Sigma Aldrich®
- Bromuro metil tiazol tetrazolio (MTT), Sigma Aldrich®
- Citrato de sodio, Mallinckrodt Pharmaceuticals®
- Cloruro de metileno grado CLAR, J.T Baker®
- Colorante de Giemsa, CTR®
- Dimetil sulfóxido (DMSO), Fermont®
- Doxorrubicina, Sigma Aldrich®
- Eudragit® L100-55, Evonik Industries®
- Hexano grado analítico, Fermont®
- Inmunoglobulina Humana Normal (IgG), Flebogamma® IV
- Isopropanol grado CLAR, Tedia®
- Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Gibco®
- Medroxiprogesterona, Depo-Provera®
- Metanol grado CLAR, J.T Baker®

- Poloxámero 188, Sigma Aldrich®
- Poloxámero 407, Sigma Aldrich®
- Propilenglicol, Analytyka®
- Quitosano de alto peso molecular (310-375 kDa), Sigma Aldrich®
- Sílica (0.04-0.063 µm), Aldrich®
- Solución de Glucosa 5%, Laboratorios Pisa®
- Tripsina, Gibco®

2.1.4 Material Biológico

- Células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero) (ATCC® CCL-81-VHG)
- VHS-1 cepa Kos (ATCC® VR-1493)
- VHS-2 cepa G (ATCC® VR-734)
- Raíz de la planta *Jatropha dioica* var. *sessiliflora*
- Ratones BALB/c

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención del EDJ y purificación de RZ

❖ Obtención del extracto de diclorometano de raíz de *J. dioica* (EDJ)

Para la obtención de EDJ se colectó la raíz en octubre del 2020 en el municipio de Villaldama, Nuevo León. La raíz se lavó con abundante agua y

jabón y se enjuagó muy bien; después se secó a temperatura ambiente y se desmenuzó en finos trozos para posteriormente molerla en licuadora. La raíz pulverizada (60g) se sometió a 3 extracciones con 600 mL de diclorometano a temperatura ambiente y en agitación constante durante 1 h. El extracto obtenido se filtró y se llevó a sequedad mediante evaporación a presión reducida. El EDJ se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) según la metodología descrita más adelante en esta sección.

❖ **Aislamiento y purificación de RZ**

La purificación de RZ se realizó por cromatografía en columna a baja presión y el seguimiento de la RZ en las fracciones se realizó en cromatografía de capa fina. La RZ purificada se recuperó mediante recristalización según la metodología descrita por Tamez Fernández y colaboradores a continuación, se mencionan las condiciones ¹⁰⁶.

▪ **Cromatografía en capa fina para monitoreo de la RZ**

La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en cromatofolios TLC de sílica gel 60 F254 Merck®, como fase móvil se empleó una solución de hexano/acetato de etilo en proporción 6:4.

▪ **Columna cromatográfica 19:1**

En la columna cromatográfica se empleó como fase estacionaria gel de sílice 60 y como fase móvil una disolución de cloruro de metileno/acetona en proporción (19:1). Las fracciones que contenían RZ se combinaron y se evaporó el disolvente a presión reducida.

- **Columna cromatográfica 6:4**

La fase estacionaria de esta columna fue sílice gel 60 y como fase móvil se emplearon 3 diferentes soluciones en donde se varió la proporción de hexano/acetato de etilo. Las fracciones que contenían RZ se combinaron y se evaporó el disolvente a presión reducida.

- **Obtención de cristales de RZ**

La fracción que contenía RZ obtenida en la columna cromatográfica 6:4, se recristalizó en una solución de éter etílico/éter de petróleo en proporción 4:1. La solución resultante se llevó a refrigeración a 4 °C durante toda la noche. Los cristales formados se lavaron con éter etílico y se analizaron mediante CLAR según la metodología descrita en la sección 2.2.1.

- ❖ **Cromatografía de líquidos de alta resolución para la identificación de metabolitos.**

Se realizó un análisis cromatográfico según lo descrito por Castro-Ríos y colaboradores ¹⁰⁷. Se pesaron 2 mg de la muestra (EDJ o RZ) y se disolvieron en una solución de DMSO y acetonitrilo en proporción 1:50. A continuación, la solución se filtró a través de una membrana de nylon (0.22 µm), para posteriormente inyectar 5 µL al cromatógrafo. Todos los disolventes fueron filtrados a través de membranas de nylon (0.45 µm) y se sometieron a baño de ultrasonido por 15 min para su desgasificación.

Se utilizó un gradiente de la fase móvil de acetonitrilo:agua (50:50) hasta llegar a 100% de acetonitrilo con un flujo de 0.2 mL/min. El tiempo de corrida

fue de 35 min y se mantuvo por 5 min antes de regresar a las proporciones iniciales. La detección de los diferentes metabolitos presentes en la muestra se realizó a una longitud de onda de 254 nm. Su identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención previamente reportados en nuestro grupo de investigación ¹⁰⁷.

2.2.2 Desarrollo y caracterización de la formulación de NPPE

Las NPP cargadas con EDJ (NPPE) se obtuvieron según la metodología desarrollada por Salas-Cedillo y colaboradores con modificaciones ¹⁰⁸. Se disolvió el polímero Eudragit® L100-55 y el extracto en diferentes concentraciones en la fase orgánica. A continuación, la fase acuosa se inyectó a la fase orgánica en agitación constante (250 rpm). Finalmente, los disolventes orgánicos se eliminaron mediante evaporación a presión reducida a 30 °C y 150 rpm. Se prepararon NPP blanco (NPPBco) en las cuales no se incorporó el EDJ.

Como parte de los estudios de preformulación se evaluaron diferentes disolventes para seleccionar la fase orgánica adecuada. Los disolventes fueron: etanol, isopropanol, acetona y una mezcla de isopropanol:acetona (1:1). Se disolvieron 2 mg del extracto de raíz de *J. dioica* en 1 mL del disolvente en agitación constante (250 rpm) a 25 °C durante 24h. Posteriormente, se realizó un análisis por CLAR según la metodología descrita en la sección 2.2.1.

Para obtener las NPP con las características óptimas para su aplicación vaginal, se modificaron dos variables:

a) Concentración del EDJ

Se evaluaron 0.6, 0.84 y 1.4 mg/mL de EDJ en el disolvente previamente establecido. Las NPPE y NPPBco se prepararon por triplicado. La concentración de polímero utilizada en estas formulaciones fue de 14 mg/mL. Las formulaciones preparadas se caracterizaron de acuerdo con la metodología descrita más adelante en esta sección.

b) Concentración del polímero

La concentración del polímero evaluada fue 8 mg/mL. Se prepararon NPPE y NPPBco por triplicado. Las formulaciones preparadas se caracterizaron de acuerdo con la metodología descrita más adelante en esta sección.

❖ Caracterización fisicoquímica de las NPPE

a) Tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta

El tamaño y el índice de polidispersidad de las NPP se determinó por espectroscopia de correlación fotónica en un ángulo de 90°. Por su parte el potencial zeta se estableció mediante microelectroforesis con láser Doppler en el equipo Zetasizer Nano Malvern (UK). Cada determinación se realizó por triplicado.

b) Cálculo de porcentajes de encapsulación y porcentaje de eficiencia de encapsulación de NPP

El sobrenadante y el sedimento de las NPP se obtuvieron en base a la metodología previamente establecida en el grupo de trabajo ¹⁰⁹. El sedimento

se solubilizó en la fase móvil y se analizó por CLAR según la metodología descrita en la sección 2.2.1.

En una primera etapa, para las NPPE, se calculó el porcentaje de abundancia (%A) de cada uno de los metabolitos del EDJ relativo al área de señal obtenida. Posteriormente, se seleccionaron 3 metabolitos de seguimiento con el mayor %A (citalitriona, RZ y jatroratriona) para su cuantificación en las NPPE. A continuación, se calculó la proporción de cada metabolito de seguimiento con base en la normalización de áreas ¹¹⁰. Finalmente se calcularon el porcentaje de encapsulación (%E) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) con las Fórmulas 1 y 2 respectivamente. Este proceso se llevó a cabo por triplicado.

$$(\%E) = \frac{(\text{mg de metabolitos encapsulados})}{(\text{mg polímero} + \text{mg de metabolitos totales})} * 100 \quad \text{Fórmula 1}$$

$$(\%EE) = \frac{(\text{mg de metabolitos encapsulados})}{(\text{mg de metabolitos totales})} * 100 \quad \text{Fórmula 2}$$

Por otro lado, para cuantificar la RZ incorporada en las NPP, las NPP cargadas con RZ (NPPR) se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1h ¹⁰⁹. El sedimento se solubilizó en la fase móvil y se analizó por CLAR según la metodología descrita en la sección 2.2.1. Posteriormente, a partir de las áreas bajo la curva de RZ se realizó un análisis de regresión lineal. Con la ecuación de la recta de la curva de calibración de RZ, se determinó su concentración. Finalmente se calcularon el porcentaje de encapsulación (%E) y el porcentaje

de eficiencia de encapsulación (%EE) con las Fórmulas 3 y 4 respectivamente. Este proceso se llevó a cabo por triplicado.

$$(\%E) = \frac{(\text{mg de RZ encapsulados})}{(\text{mg polímero} + \text{mg de RZ totales})} * 100 \quad \text{Fórmula 3}$$

$$(\%EE) = \frac{(\text{mg de RZ encapsulados})}{(\text{mg de RZ totales})} * 100 \quad \text{Fórmula 4}$$

c) *Estabilidad de las nanopartículas*

La estabilidad de la dispersión acuosa de las NPPE se evaluó a los 5 y 11 meses, mientras que la estabilidad de la dispersión acuosa de las NPPR se evaluó a los 6 meses. Las dispersiones acuosas de las NPP se almacenaron en la obscuridad a 25.47 ± 2.21 °C con una humedad relativa de $48.65 \pm 6.61\%$. La estabilidad de las dispersiones acuosas se evaluó mediante la inspección visual de agregados y sedimentos. Asimismo, se realizaron determinaciones del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta. Además, se determinó el %E y %EE de RZ en las NPPR después de 6 meses de almacenamiento.

2.2.3 Obtención y caracterización de NPPR

Las NPPR se prepararon según la metodología establecida en la sección 2.2.2, se disolvió la RZ y el polímero Eudragit® L100-55 en una relación 1:10 en la fase orgánica en agitación (250 rpm). A continuación, la fase acuosa se inyectó a la fase orgánica en agitación constante (250 rpm). Finalmente, los

disolventes orgánicos se eliminaron mediante evaporación a presión reducida a 30 °C y 150 rpm.

Para llevar a cabo la caracterización de las NPPR se siguió la metodología descrita en el apartado 2.2.2

Disolventes residuales

La presencia de disolventes residuales en las NPPR se determinó mediante micro extracción en fase sólida modalidad *headspace* (HS-SPME) por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) de acuerdo con la guía 467 de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) ¹¹¹. El análisis se llevó a cabo en un CG-EM Agilent 6890N con detector de masas 5973 Inert y con una columna DB-WAX 30 mx, 0.22 mm y 0.25 µm de espesor. Se preparó una solución estándar de una mezcla de disolventes que contenía: 5,000 µg/mL de acetato de etilo, éter etílico, isopropanol y acetona; 600 µg/mL de diclorometano y 290 µg/mL de hexano. Se analizó la solución estándar, las NPPR y las NPPBco por triplicado. La adquisición de datos se realizó por barrido completo en un rango de 20 a 500 m/z con una velocidad de 3.06 escaneos por segundo.

Análisis por FT-IR

El análisis FT-IR de las NPPR se llevó a cabo mediante la obtención de 40 barridos en un rango de los 4,000-700 cm⁻¹ en un espectrofotómetro Frontier Óptica de Perkin Elmer®. Se obtuvieron los espectros de cada uno de los componentes de NPPR individualmente (Eudragit® L100-55 y RZ) así como de la suspensión de NPPR. Para su análisis, se formaron películas de NPPR

según una metodología previamente establecida en nuestro grupo de investigación ¹¹². Cada determinación se realizó por triplicado.

2.2.4 Estudio de liberación de RZ a partir de NPPR *in vitro*.

El perfil de liberación se evaluó mediante el método de muestreo y separación ¹¹³. Para ello, se adicionó la dispersión de NPPR (10.15 µg/mL de RZ) al medio de disolución que contenía propilenglicol, amortiguador (pH 4.3 o 7.4) y agua en proporción 1:3:5 respectivamente a 37 °C y agitación constante a 150 rpm. La liberación de RZ se evaluó a los 15 y 30 min, y a las 1, 2, 4, 24 y 48 h. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se utilizó un Microcon[®] (Merck Millipore[®], Alemania) para recuperar el sobrenadante ¹⁰⁸. La cuantificación de la RZ liberada de la NPPR se realizó mediante espectroscopia UV-visible en un espectrofotómetro Genesys 10s Thermo Scientific[®] (EE. UU.) a una longitud de onda de 245 nm.

a) Validación del sistema por espectrofotometría UV-Vis

Para la validación del sistema se utilizó un estándar de RZ disuelto en el medio de liberación del estudio *in vitro*. Se preparó una curva de calibración con seis niveles de concentración (8, 10, 12, 14, 16 y 18 µg/mL de RZ) por triplicado. Se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 245 nm. Los parámetros evaluados fueron: linealidad, precisión, precisión intermedia, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ). Las determinaciones se

realizaron según lo establecido por la Comisión de Control Analítico y ampliación de cobertura (CCAYAC) de la Cofepris ¹¹⁴.

- Linealidad: Se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración con los seis niveles de concentración y se realizó un análisis de regresión lineal. Los criterios para la evaluación de la linealidad fueron el coeficiente de correlación (R) y el coeficiente de determinación (R²).
- Precisión: Se determinó con el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de las respuestas correspondientes a cada nivel de la curva de calibración obtenido con la Fórmula 5.

$$\%DER = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) 100 \quad \text{Fórmula 5}$$

%DER = Desviación estándar relativa en porcentaje

S = Desviación estándar

\bar{x} = Media

- Precisión intermedia: Se determinó con el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de las respuestas de los niveles de concentración de 6, 12 y 18 µg/mL de RZ preparados y analizados en 3 días no consecutivos.
- LD: Se calculó al sustituir los valores de la ordenada en el origen y la pendiente obtenidos en el análisis de regresión lineal en la Fórmula 6.

$$LD = \left(\frac{3.3 \sigma}{m} \right) \quad \text{Fórmula 6}$$

σ = Desviación estándar de la ordenada en el origen

m = Pendiente

- LQ: Se calculó al sustituir los valores de la ordenada en el origen y la pendiente obtenidos en el análisis de regresión lineal en la Fórmula 7.

$$LQ = \left(\frac{10 \sigma}{m} \right) \quad \text{Fórmula 7}$$

σ = Desviación estándar de la ordenada en el origen
 m = Pendiente

Los parámetros se evaluaron según los criterios para la verificación de métodos fisicoquímicos farmacopeicos de la Cofepris ¹¹⁴.

b) Validación del método por espectrofotometría UV-Vis

La validación se llevó a cabo con el método de adición de estándar (o de patrón) para lo cual se adicionó un volumen constante de NPPR a los estándares de RZ. Los parámetros evaluados fueron: linealidad, precisión y exactitud. Las determinaciones se realizaron según lo establecido por la CCAYAC de la Cofepris ¹¹⁴. Cada parámetro se evaluó por triplicado.

- Linealidad: Se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración con seis niveles de concentración (8, 10, 12, 14, 16 y 18 µg/mL). Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal. Los criterios para la evaluación de la linealidad fueron R y R².
- Precisión: Se determinó con %DER de las absorbancias de las NPPR adicionadas con estándar con la Fórmula 3.
- Exactitud: Se evaluó con el porcentaje de recuperación (%R) de la RZ establecido con la Fórmula 8.

$$\%R = \left(\frac{\text{Concentración de RZ encontrada}}{\text{Concentración de RZ adicionada}} \right) 100$$

Fórmula 8

2.2.5 Evaluación de la citotoxicidad

a) Cultivo celular

Las células Vero se cultivaron en monocapa en placas de 24 o 96 pozos con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 2% y glutamina y penicilina al 1% a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂. Cuando se obtuvo una confluencia 80-90%, estas placas se utilizaron en los bioensayos de reducción de placas virales (24 pozos) y citotoxicidad (96 pozos) ¹⁰⁴.

b) Evaluación de la citotoxicidad mediante la viabilidad celular

La determinación de la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos según la metodología descrita por Silva Mares y colaboradores ¹⁰⁴. Se sembraron 15,000 células por pozo y se cultivaron con medio DMEM suplementado (suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomina y penicilina al 1%), incubándolas 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. A continuación, se adicionó con diferentes concentraciones de muestra a probar y se llevó a incubación por 72 h. Como control negativo se emplearon células Vero adicionadas únicamente con el medio DMEM suplementado (suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomina y penicilina al 1%). Se determinó la viabilidad celular de las siguientes muestras:

- RZ, NPPR, NPPBco y ACV a 20 µg/mL.

- NPPR a concentraciones de 11.25, 22.5, 45, 90, 180 y 360 µg/mL de RZ.
- NPPBco correspondientes a 45, 90, 180, 360, 720 y 1,440 µg/mL de polímero Eudragit® L100-55.

Una vez concluido el periodo de incubación, se determinó la viabilidad celular mediante la adición de 10 µL de una solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL por pozo, se incubaron 3 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se removió y se añadieron 100 µL de DMSO con el objetivo de disolver los cristales de formazán. Posteriormente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplaca. La CC₅₀ fue la concentración de la muestra que redujo la viabilidad celular en un 50%, para la determinación de la viabilidad celular se utilizó la Fórmula 9:

$$\%Viabilidad = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} (100) \quad \text{Fórmula 9}$$

DO: Densidad óptica
 Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.2.6 Evaluación de la actividad anti-herpética *in vitro*

a) Obtención del concentrado Viral

La obtención del concentrado viral se llevó a cabo según la metodología de Ferrel Hernández y colaboradores con ligeras modificaciones ¹⁰⁵. Previamente se cultivaron células Vero en 4 frascos T-175 hasta llegar a una confluencia del 90%. Se descongelaron 4 viales correspondiente a la cepa VHS-2 G a una temperatura de 4 °C. A partir de estos viales se preparó una

suspensión viral 1:10 en PBS glucosado al 0.1%. A continuación, se eliminó el medio de cultivo de los frascos T-175 y se reemplazó por la suspensión viral. En seguida, los frascos T-175 se llevaron a incubación 1 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 60 rpm. Posteriormente, se eliminó la suspensión viral de los frascos T-175 y se añadieron 15 mL de medio DMEM suplementado (estreptomicina y penicilina/glutamina al 1%, suero fetal bovino al 2%, y aminoácidos esenciales). Después, se llevaron a incubación 72 h a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente se trasvaso el medio de los frascos T-175 hacia tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 4 °C por 10 minutos a 1,000 rpm. Los tubos cónicos se pasaron a un baño de hielo y se tomaron alícuotas de 1 mL, mismas que se depositaron en crioviales que se encontraban en baño de hielo. Finalmente, los crioviales se almacenaron a -80 °C hasta su uso en la determinación del título viral y la inoculación del virus en el modelo de infección vaginal.

b) Determinación del título viral

El título viral se realizó mediante diluciones seriadas Log₁₀ a partir de las suspensiones virales ¹¹⁵. En una serie de tubos de fondo cónico se adicionaron 4.5 mL de PBS glucosado al 0.1% y se introdujeron en hielo. Los tubos se enumeraron del 1 al 6, se tomó 0.5 mL de la suspensión viral y se depositó en el tubo # 1, se agitó y a partir de este tubo se hicieron diluciones seriadas (1:10) hasta el tubo # 6 como se observa en la Figura 6. se sembraron 120,000 células Vero por pocillo en una placa de 24 pozos, después de 24 h se infectaron con 0.1 mL de cada tubo marcado en su pozo

correspondiente y se incubó durante 1 h, a 37 °C y 5% CO₂ en agitación constante.

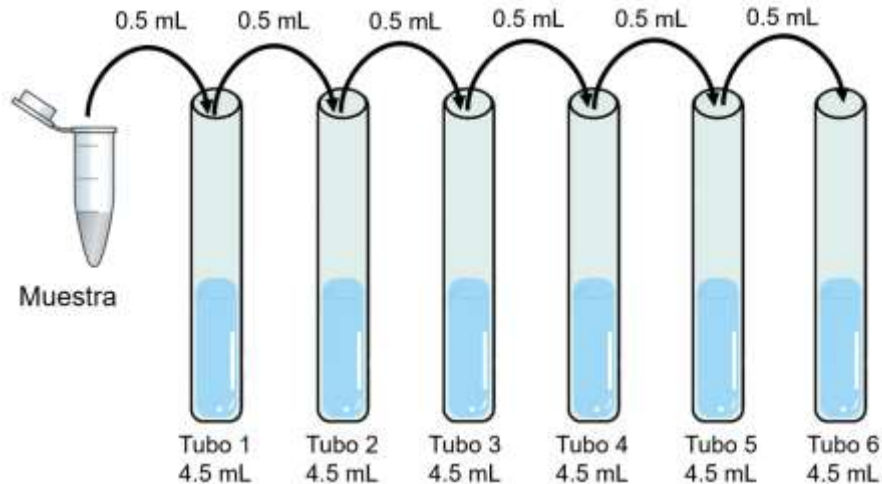


Figura 6. Diluciones seriadas para determinación del título viral.

A continuación, se desechó el sobrenadante de cada pocillo y de forma inmediata se adicionó 1 mL de medio DMEM suplementado (suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomycin y penicilina al 1%) con 0.32% de IgG. Las placas se dejaron en incubación 72 h, posteriormente se retiró el medio de los pocillos por decantación y se procedió a la tinción. Las células se fijaron con 2 mL de metanol durante 10 min y se tiñeron con 1 mL de Giemsa durante 10 min. Finalmente se realizó el conteo de placas formadas, para determinar la concentración del título viral se utilizó el pozo cuyo unidades formadoras de placas virales (UFP) fue de aproximadamente 25 (pozo título). La concentración del título viral se determinó según la siguiente fórmula:

$$\text{Titulo viral} = \frac{\text{UFP contadas en el pozo titulo}}{\text{FD del tubo titulo}} (\text{Vol de infección} * 10)$$

Fórmula 10

FD: Factor de dilución

UFP: Unidades formadoras de placas virales

Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado y se incluyó un control de crecimiento celular.

c) Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)

La CI₅₀ se determinó mediante el ensayo de reducción de placas virales según la metodología descrita por Silva Mares y colaboradores ¹⁰⁴. Para llevar a cabo el ensayo se sembraron 120,000 células Vero por pocillo en una placa de 24 pocillos. A continuación, se infectaron con 25 UFP del virus (VHS-1 KOS o VHS-2 G) y se llevaron a incubación por 1 h, a 37 °C en agitación constante. Después de la incubación, se retiró el sobrenadante y se adicionó medio fresco suplementado (suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomycin y penicilina al 1%) con DMSO al 1% y con 0.32% de IgG. Posteriormente, se añadieron a los pozos diferentes concentraciones de muestra a probar y se llevaron a incubación 72 h. Se determinó la CI₅₀ de las siguientes muestras:

- NPPR a concentraciones de 12, 24, 48, 96 y 192 µg/mL de RZ.
- NPPBco correspondientes a 45, 90, 180, 360 y 720 µg/mL de polímero Eudragit® L100-55.

El control positivo consistió en la adición de ACV 0.5 µg/mL, mientras que el control negativo consistió en reemplazar el volumen añadido del extracto por

medio de cultivo DMEM suplementado (suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomycin y penicilina al 1%).

Finalmente, las células se fijaron con 1 mL de metanol durante 10 min y se tiñeron con 1 mL de Giemsa durante 10 min. La CI_{50} fue aquella en la que se observó una reducción del 50% de la formación de UFP comparándola contra el 0% de reducción del control negativo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se determinó la CI_{50} de las muestras contra VHS-1 y contra VHS-2.

d) Determinación del índice de selectividad

El índice de selectividad (IS) de las muestras se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}} \qquad \text{Fórmula 11}$$

2.2.7 Formulación de un hidrogel termosensible con NPPR (HG-NPPR)

El hidrogel termosensible (HG) se preparó en frío (4 °C) según el método descrito por Argenta y colaboradores ¹¹⁶. Primero, se preparó una solución de quitosano 1% (p/v) en ácido láctico al 0.5% (v/v) en agitación constante a 200 rpm durante 24 h. De forma independiente se preparó una solución que contenía poloxámero 407 (P407) y poloxámero 188 (P188) a una concentración de 30% (p/v) y 2% (p/v) respectivamente en amortiguador de citratos (pH 4.3) en agitación constante a 200 rpm durante 6 h. Después, la solución de quitosano se añadió gota a gota en agitación constante (200 rpm) a la solución

de los poloxámeros hasta una concentración de 0.2% (p/v) y se dejó en agitación 2h. Finalmente, en baño de hielo, se añadió propilenglicol gota a gota y en agitación constante (200 rpm) hasta una concentración de 3.8% (v/v) y se dejó en agitación durante 1 h. En el caso del HG con NPPR (HG-NPPR), se sustituyó el amortiguador de citratos por la dispersión acuosa de NPPR, lo mismo ocurrió con el HG con NPPBco (HG-NPPBco). Se preparó un HG con RZ libre (HG-RZL) para lo cual se empleó una solución de 1,000 µg/mL de RZ en propilenglicol. Por último, se preparó un HG con ACV (HG-ACV) 5% (p/v) en el cual el ACV se incorporó a la solución de los poloxámeros antes de añadir el quitosano.

Caracterización fisicoquímica de las formulaciones de HG

Las formulaciones de HG (2 mL) se colocaron en un baño de hielo durante 15 min. Posteriormente, se calentaron a 37 °C en un baño maría con agitación a 300 rpm. Se estableció el tiempo de gelificación como el tiempo que tardó la barra de agitación en no continuar en agitación ¹¹⁶. La medición del pH de los HG se realizó en un potenciómetro Orion Star A211, Thermo Scientific® (EE.UU).

2.2.8 Evaluación *in vivo* de la actividad anti-herpética y toxicidad de las formulaciones de HG

Los ratones empleados en los ensayos *in vivo* fueron hembras de la cepa BALB/c, todos contaban con una edad entre 6 y 8 semanas, y un peso aproximado de 25 a 34 g. Estos ratones permanecieron en jaulas individuales con cama de aserrín estéril, bajo condiciones estándar de humedad y

temperatura, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, y con comida y agua *ad libitum*. El manejo y cuidado de estos animales se realizó según la NOM-062-ZOO-1999.

La limpieza y el encamado de las jaulas se realizó dos veces por semana, los desechos resultantes se procesaron bajo las normativas del bioterio y conforme a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Se realizaron observaciones diariamente, además el área estuvo supervisada por el M.V.Z. Gilberto Arévalo Martínez, quien supervisó la salud de los animales.

La anestesia que se utilizó para el procedimiento de inoculación fue 100 mg/kg de ketamina, 10 mg/kg de xilacina y 100 mg/kg de Zoletil® (tiletamina/zolazepam) vía intramuscular. Además, se observaron los siguientes indicadores de dolor en los ratones: disminución en la ingesta de alimento, pérdida de peso, aspecto descuidado, etc. Cuando los animales presentaron signos de dolor se les administró el analgésico Tramadol 5 mg/Kg vía intramuscular 1 dosis diaria por 5 días.

Después de la eutanasia según lo establecido por la NOM-033-SAG/ZOO-2014, los cadáveres se desecharon en bolsas amarillas para residuos anatómicos y se almacenaron a 4 °C en un refrigerador designado para este tipo de desechos. Se realizó la solicitud para la recolección de residuos biológicos al departamento de bioseguridad de la Facultad de Medicina que se encargó de entregar los residuos a un servicio externo de disposición de residuos RPBI según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

A) Evaluación de la actividad anti-herpética de las NPPR en el modelo murino de vaginitis.

❖ Inoculación del virus

Cuatro días previos a la inoculación del virus se les administró a las hembras BALB/c 2 mg de medroxiprogesterona vía subcutánea. Los ratones BALB/c hembra se anestesiaron con 100 mg/kg de ketamina, 10 mg/kg de xilacina y 100 mg/kg de Zoletil® (tiletamina/zolazepam) vía intramuscular. A continuación, con ayuda de una micropipeta y puntillas estériles se inoculó a los ratones vía vaginal el VHS-2 G (1.66×10^4 UFP/10 μ L).

❖ Aplicación de los tratamientos

Se establecieron 7 grupos conformados por 5 ratones hembra de la cepa BALB/c cada uno, elegidos aleatoriamente después del establecimiento de la infección. Los tratamientos se aplicaron 7 después de la inoculación del virus, estos consistieron en 15 μ L de:

- HG
- HG-NPPR a una concentración de RZ de 0.5 mg/mL
- HG-NPPBco
- HG-RZL a una concentración de RZ de 7.69 μ g/mL
- HG-AVC a una concentración de ACV de 38.46 mg/mL
- Control + el cual fue PBS
- Control - de infección que no se inoculo con el virus.

❖ Evaluación del efecto anti-herpético

Después de la inoculación se observó diariamente la conducta de los ratones, la evolución de la enfermedad y se registró su peso cada semana. Los días 0, 2, 4 y 7 de tratamiento se puntuó la enfermedad genital. Se empleó la escala descrita por Cardozo y colaboradores ¹¹⁷. La enfermedad se clasificó como sigue: 0, sin signos de infección; 1, ligero enrojecimiento de los genitales externos; 2, hinchazón y enrojecimiento de los genitales externos, y/o pus/mucosidad; 3, inflamación grave de los genitales externos con pus/mucosidad y alopecia en la zona circundante; 4, ulceración del tejido genital, enrojecimiento e hinchazón; 5, aumento de la ulceración, enrojecimiento, hinchazón, parálisis de las extremidades posteriores o muerte. Los ratones moribundos o con parálisis de las extremidades posteriores se les retiró del ensayo y se sometieron a eutanasia.

El día 15 post-inoculación se llevó a cabo la eutanasia según lo establecido por la NOM-033-SAG/ZOO-2014, mediante sobredosis anestésica con pentobarbital sódico 150 mg/kg vía intramuscular. Los ratones que mostraron signos de sufrimiento agudo o morbidez se retiraron del experimento según lo establece el Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales ¹¹⁸.

B) Determinación de la toxicidad de las formulaciones de HG

Se establecieron 4 grupos conformados por 3 ratones hembra de la cepa BALB/c cada uno. A los ratones se les administró vía vaginal diariamente el tratamiento, estos consistieron en 15 μ L de:

- HG
- HG-NPPR a una concentración de RZ de 0.5 mg/mL
- HG-NPPBco
- Control - el cual fue PBS

Diariamente se observó la conducta de los ratones. El día 15 después de la inoculación se procedió con el sacrificio según lo establecido por la NOM-033-SAG/ZOO-2014. Los ratones se anestesiaron con Ketamina/xilacina 100:10 mg/kg vía intramuscular y una vez inconscientes se realizó una dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una disección abdominal para la obtención del órgano reproductor femenino, el hígado, riñones y bazo. Los órganos se deshidrataron e incluyeron en parafina, se cortaron en secciones y se procesaron para su tinción con hematoxilina y eosina. Finalmente se evaluó la presencia de alteraciones histológicas en los tejidos procesados.

2.2.9 Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico se llevó a cabo en el software GraphPad Prism 8, se realizaron pruebas t de student para comprar medias de dos grupos. En caso de comparar medias de más de dos grupos se realizó un ANOVA de una vía

seguida de una prueba de comparación múltiple. Se fijo $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Obtención del EDJ y purificación de RZ

La obtención del EDJ tuvo un rendimiento de $2.68 \pm 0.18\%$ (p/p). En la Figura 7 se muestra el perfil cromatográfico de EDJ obtenido mediante CLAR (sección 2.2.1.); se identificaron 34 picos cromatográficos, los metabolitos con mayor %A fueron la RZ (15.40%), jatrofatriona (3.86%) y citlalitriona (3.84%).

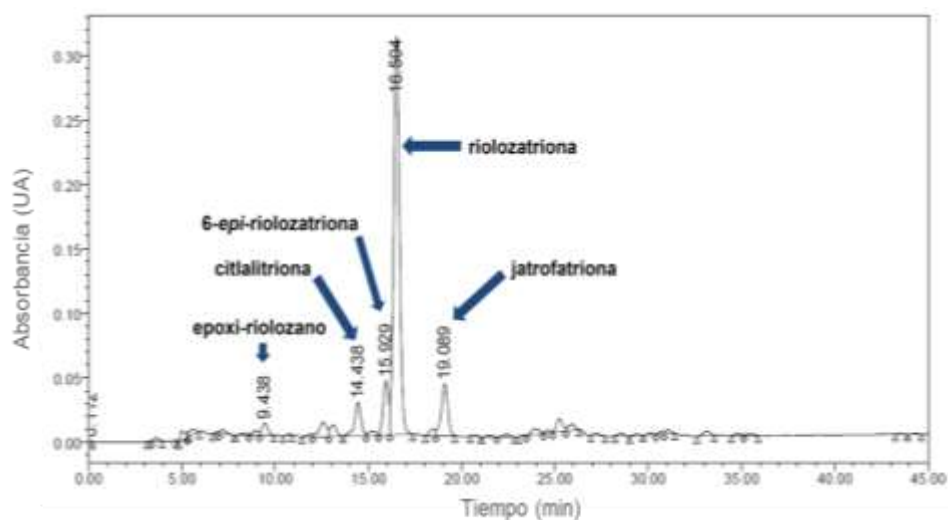


Figura 7. Perfil cromatográfico del EDJ.

La purificación de RZ a partir de EDJ tuvo un rendimiento de $3.26 \pm 0.09\%$ (p/p). Se obtuvieron 1.20 g de RZ a partir de 1.50 kg de la raíz seca y molida de *J. dioica*. En la Figura 8 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante CLAR (sección 2.2.1.) de la RZ purificada y RZ de referencia.

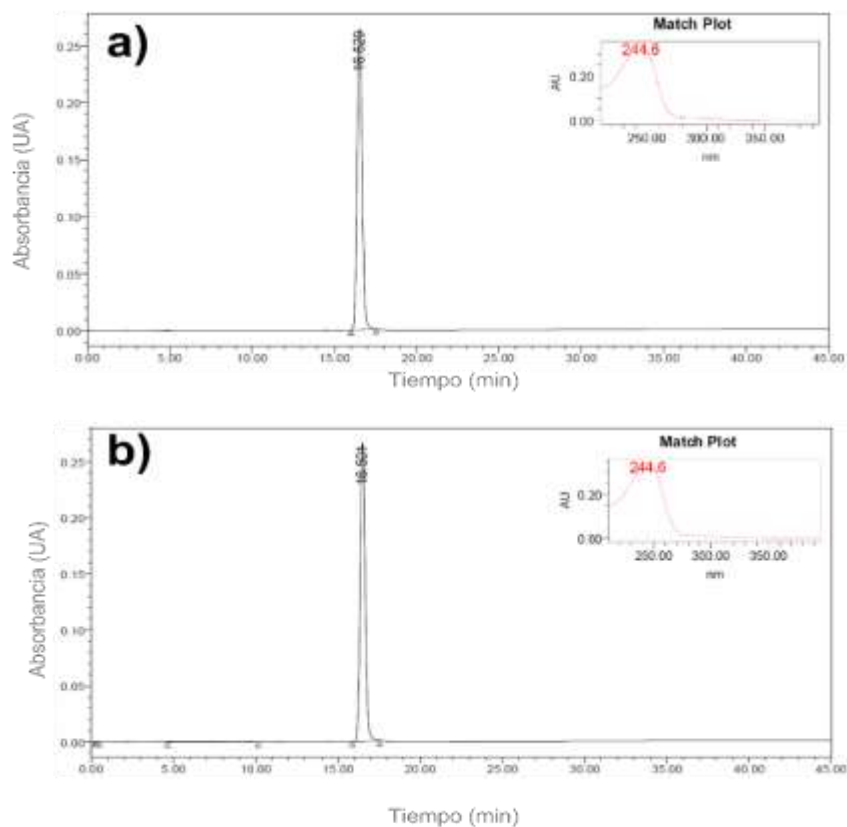


Figura 8. Cromatogramas CLAR a) RZ de referencia, b) RZ purificada.

3.2 Desarrollo y caracterización de la formulación de NPPE

Preformulación, elección de la fase orgánica

Se evaluaron cuatro disolventes orgánicos para establecer la fase orgánica, los cuales fueron, etanol, isopropanol, acetona y una mezcla de isopropanol:acetona en proporción 1:1 (Figura 9).

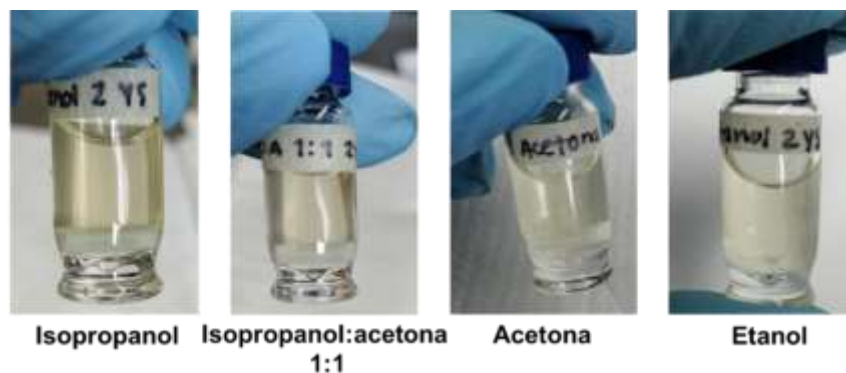


Figura 9. Prueba de solubilidad del EDJ en diversos disolventes.

En la TABLA VI se muestra la concentración de RZ en cada una de las disoluciones, la cuantificación se realizó mediante CLAR (sección 2.2.1). La mezcla de isopropanol:acetona en proporción 1:1 se seleccionó como fase orgánica.

TABLA VI. Concentración de RZ en las diferentes disoluciones.

Disolvente	Concentración de RZ ($\mu\text{g/mL}$)
Isopropanol	214.48 ± 17.74
Acetona	327.17 ± 16.39
Etanol	236.29 ± 16.63
Isopropanol:acetona (1:1)	398.47 ± 14.52

($\square \pm \sigma$, n=3)

Selección de la concentración del extracto

La concentración del extracto evaluada fue: 1.40, 0.84 y 0.60 mg/mL y se denominaron F1, F2 y F3 respectivamente. En la TABLA VII se presenta la caracterización fisicoquímica de las tres formulaciones evaluadas, así como de las NPPBco.

TABLA VII. Caracterización fisicoquímica de las NPPE obtenidas con diferentes concentraciones de extracto.

	F1 (1.4 mg/mL)	F2 (0.84 mg/mL)	F3 (0.6 mg/mL)	Bco
Tamaño (nm)	402.60 ± 9.81	392.30 ± 3.24	390.40 ± 8.01	465.70 ± 8.95
IPD	0.24 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Potencial zeta (mV)	-30.43 ± 0.95	-41.10 ± 0.50	-35.40 ± 0.20	-41.53 ± 0.37
Presencia de agregados	Si	No	No	No
%E*	NA	1.32 ± 0.17	0.73 ± 0.04	NA
%EE*	NA	33.23 ± 1.64	23.65 ± 0.14	NA

(□ ± σ, n=3)

NA: No aplica

* Corresponden a citralitrona, RZ y jatrofatriona.

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA, $p < 0.05$) que indicó que no existe diferencia significativa entre el tamaño de NPP de las formulaciones F1-F3.

En la Figura 10 se pueden apreciar los agregados formados durante el proceso de evaporación a presión reducida de F1.



Figura 10. Agregados presentes en F1.

En cuanto a la cuantificación de los metabolitos incorporados en F2 y F3, con los resultados de %A de citlaltiriona, RZ y jatrofatriona se determinaron los %E y %EE. El análisis estadístico realizado (prueba t, $p < 0.05$) demostró que si existe diferencia significativa entre el %EE de F2 y F3. El desarrollo de la formulación se continuó con una concentración de extracto de 0.84 mg/mL (F2).

Selección de la concentración del polímero

Después de la selección de la concentración de EDJ, se modificó la concentración de polímero. Se preparó una formulación denominada F4 con una concentración de polímero de 8 mg/mL. La TABLA VIII muestra la caracterización fisicoquímica de la F4.

TABLA VIII. Caracterización fisicoquímica de la NPPE (F4).

	F4
Tamaño (nm)	246.45 ± 13.55
IPD	0.07 ± 0.04
Potencial zeta (mV)	-30.43 ± 0.95
%E*	6.24 ± 0.06
%EE*	65.72 ± 0.63

($\bar{x} \pm \sigma$, n=3)

* Corresponden a citlaltiriona, RZ y jatrofatriona

Para verificar la presencia de citlaltiriona, RZ y jatrofatriona en F4 y calcular los %E y %EE, se obtuvo su perfil cromatográfico (Figura 11, color rojo); Se compara con el perfil cromatográfico de EDJ libre (Figura 11, color azul) a la misma concentración (0.84 mg/mL). Se señalan en los cromatogramas los metabolitos identificados por sus tiempos de retención.

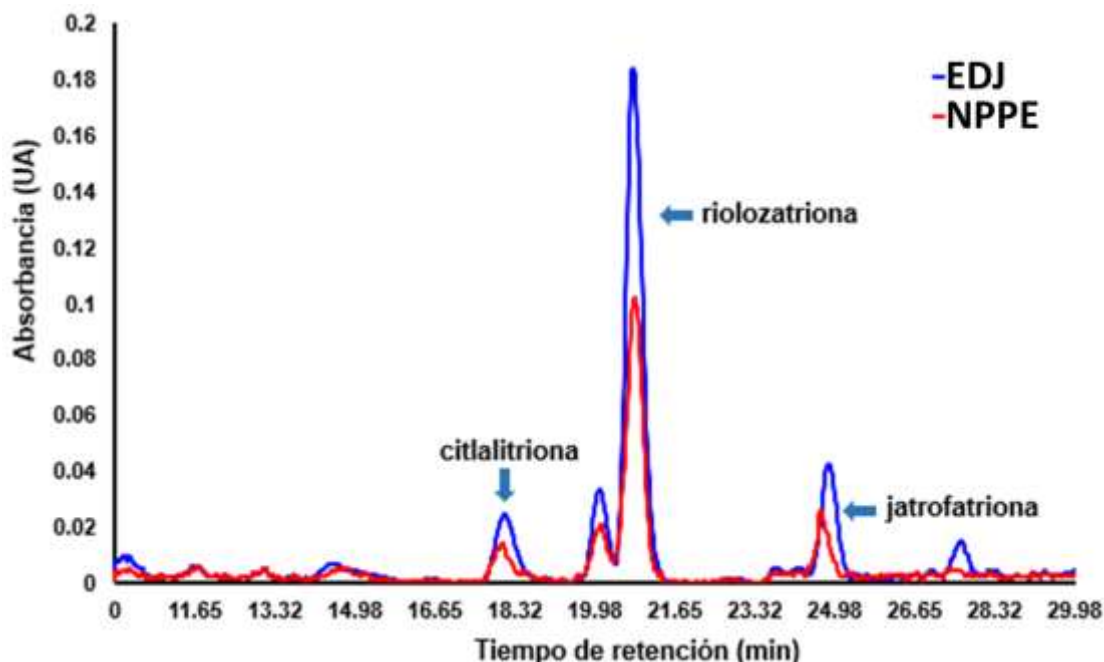


Figura 11. Perfil cromatográfico de EDJ (azul) y del contenido de NPPE (rojo) sobrepuestos.

La TABLA IX muestra el análisis de estabilidad de F4 después de 5 y 11 meses de almacenamiento. Se realizó una prueba estadística (ANOVA, $p < 0.05$), la cual reveló que no existe diferencia significativa entre el tamaño e IPD de las formulaciones en ninguno de los tiempos evaluados.

TABLA IX. Análisis de estabilidad de NPPE (F4).

	Inicial	5 meses	11 meses
Tamaño (nm)	246.45 ± 13.55	245.00 ± 18.02	247.00 ± 26.71
IPD	0.07 ± 0.04	0.09 ± 0.05	0.11 ± 0.02
Presencia de agregados	No	No	No

($\bar{X} \pm \sigma$, n=3)

3.3 Obtención y caracterización de NPPR

En la TABLA X se presenta la caracterización fisicoquímica de las NPPR con la formulación establecida previamente para las NPPE.

TABLA X. Caracterización fisicoquímica de las NPPR con la formulación establecida previamente para las NPPE.

	NPPR
Tamaño (nm)	263.26 ± 14.21
IPD	0.13 ± 0.02
Potencial zeta (mV)	-37.16 ± 2.16
%E	8.51 ± 0.66
%EE	89.64 ± 7.81

(□ ± σ, n=3)

En la Figura 12 se presenta la curva de distribución de tamaño de las NPPR.

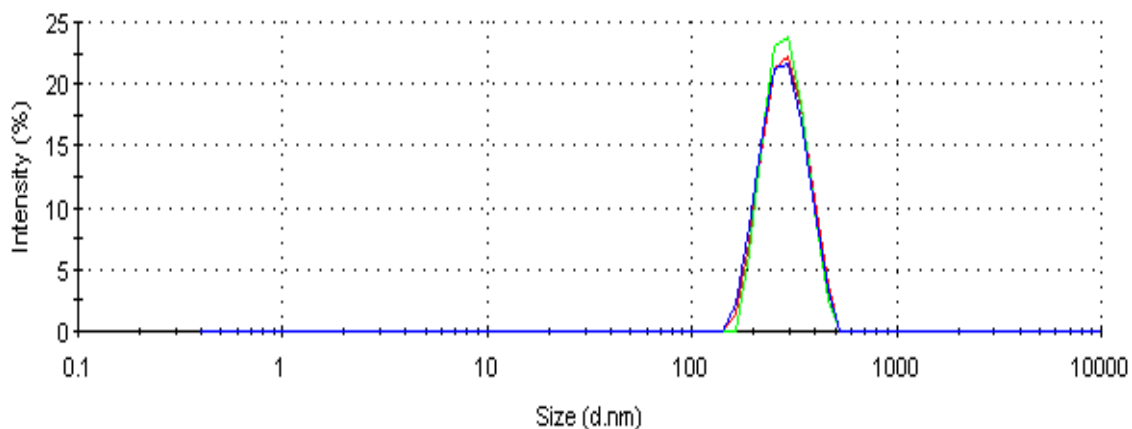


Figura 12. Curva de distribución del tamaño de las NPPR.

En la TABLA XI se muestra el análisis de estabilidad de NPPR después de 6 meses de almacenamiento. Se realizó un análisis estadístico (prueba t, $p < 0.05$) que demostró que no existe diferencia significativa entre el tamaño e IPD de las formulaciones en los tiempos evaluados. Además, el %EE no mostró diferencias significativas después de 6 meses de almacenamiento (prueba t, $p < 0.05$).

TABLA XI. Análisis de estabilidad de NPPR.

	Inicial	6 meses
Tamaño (nm)	263.26 ± 14.21	268.45 ± 3.73
IPD	0.13 ± 0.02	0.07 ± 0.004
Presencia de agregados	No	No
%E	8.51 ± 0.66	8.45 ± 0.71
%EE	89.64 ± 7.81	90.02 ± 8.35

(□ ± σ, n=3)

Dentro de la caracterización de NPPR se evaluó la presencia de disolventes residuales. Se analizó mediante CG-masas una solución estándar de la mezcla de disolventes que contenía: acetato de etilo, éter etílico, isopropanol, acetona, diclorometano y hexano a las concentraciones máximas permitidas por la USP, así como una muestra de NPPR. En la Figura 13 se compara el cromatograma de la mezcla de disolventes (cromatograma en color negro) con la NPPR (cromatograma color rosa).

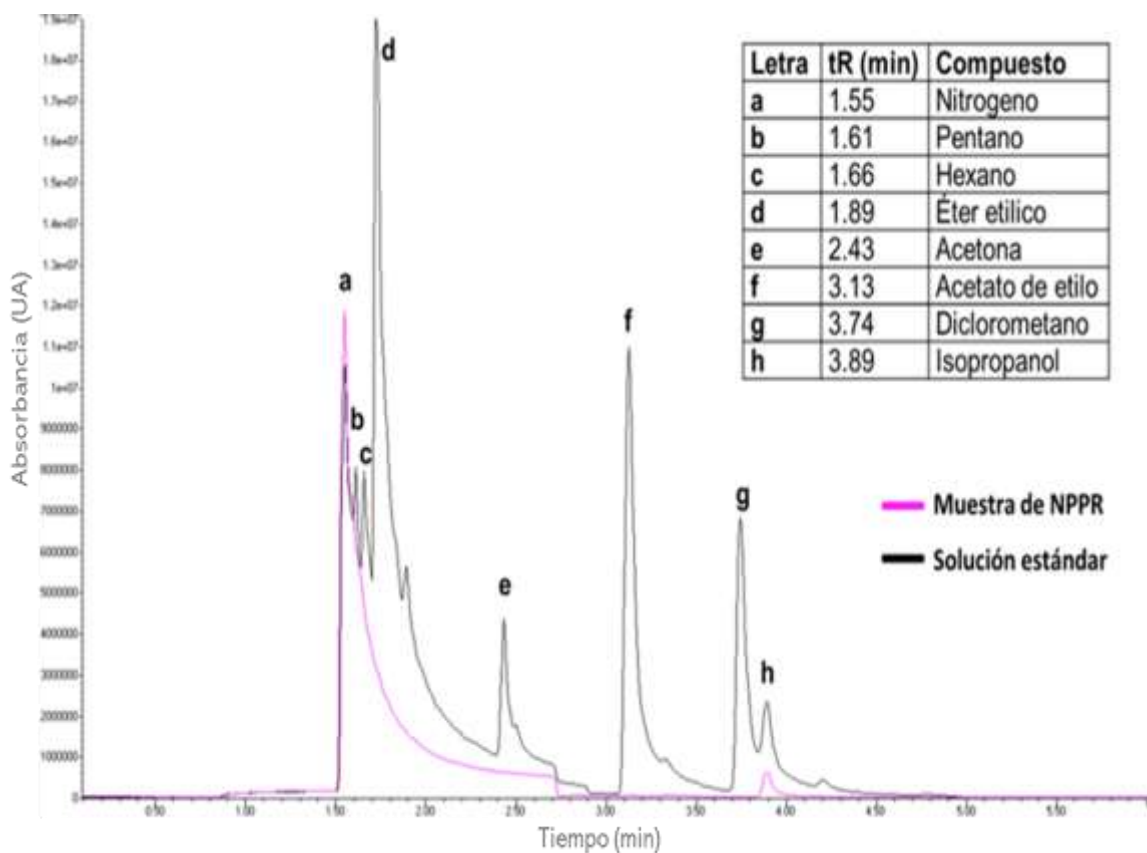


Figura 13. Cromatogramas de la solución estándar de la mezcla de disolventes a las concentraciones máximas permitidas por la USP (negro) y de NPPR (rosa).

Como parte de la caracterización química de las NPPR, se realizó un análisis de FTIR del polímero Eudragit® L100-55, la RZ y las NPPR, los espectros se presentan en la Figura 14.

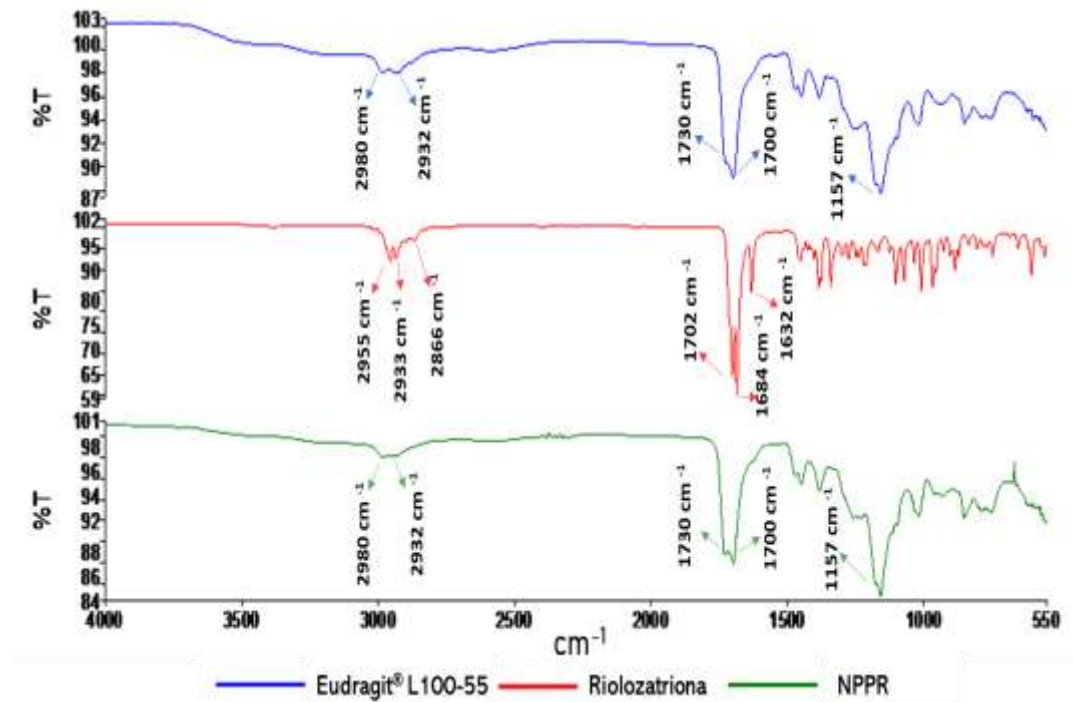


Figura 14. Espectro de FT-IR de Eudragit® L100-55, RZ y NPPR, de 4,000 a 400 cm^{-1} .

3.4 Estudio de liberación de RZ a partir de NPPR *in vitro*

Para llevar a cabo el estudio de liberación de RZ a partir de NPPR *in vitro*, se desarrolló y validó un método de espectrofotometría UV-Vis para la cuantificación de RZ.

Validación del sistema para la cuantificación de RZ por UV-Vis

En la TABLA XII se muestran los parámetros evaluados, así como sus criterios de aceptación según la CCAYAC de la Cofepris ¹¹⁴.

TABLA XII. Parámetros del sistema evaluados para cuantificar RZ por espectrofotometría UV-Vis.

Parámetro	Resultado	Criterio de aceptación
Linealidad	$R = 0.996$ y $R^2 = 0.993$	> 0.990 ambos
LD ($\mu\text{g/mL}$)	1.270	< Concentración del intervalo de trabajo
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	3.840	< Concentración del intervalo de trabajo
Precisión	% DER 1.800	DER <2.000%
Precisión intermedia	%DER 1.470	DER <3.000%

$(\bar{x} \pm \sigma, n=3)$

Validación del método para la cuantificación de RZ por UV-Vis

La validación del método se llevó a cabo con el método de adición de estándar (o de patrón), para lo cual se adicionaron NPPR con estándares de RZ. En la TABLA XIII se muestran los parámetros evaluados, así como sus criterios de aceptación según la CCAYAC de la Cofepris ¹¹⁴.

TABLA XIII. Parámetros de validación del método para cuantificar RZ por espectrofotometría UV-Vis.

Parámetro	Resultado	Criterio de aceptación
Linealidad	$R = 0.996$ y $R^2 = 0.993$	> 0.990 ambos
Precisión	% DER = 1.010	DER <2.000%
Exactitud	%R = 100.050 ± 1.030	%R= 95.000-105.000%

$(\bar{x} \pm \sigma, n=3)$

Análisis de la liberación in vitro de RZ a partir de NPPR

En la Figura 15 se presenta el perfil de liberación de RZ a partir de NPPR en función del tiempo a dos valores de pH.

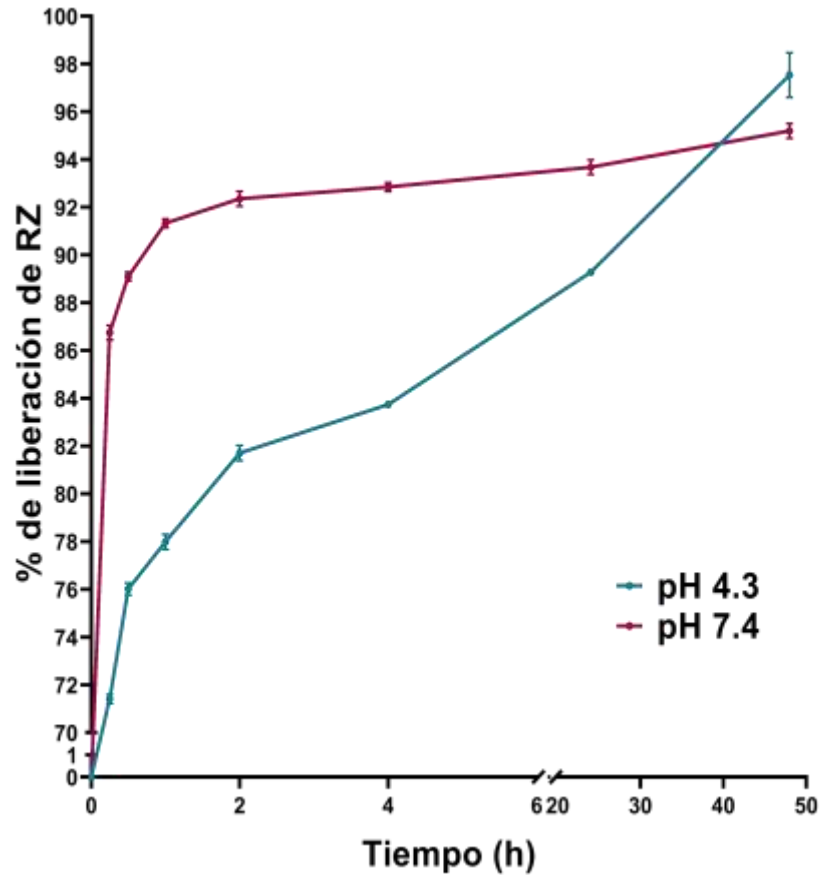


Figura 15. Perfil de liberación de RZ *in vitro* a dos valores de pH a partir de NPPR en función del tiempo, ($\bar{x} \pm \sigma$, n=3).

3.5 Evaluación de la citotoxicidad

En la Figura 16 observan los porcentajes de viabilidad celular en células Vero después de la administración de RZ, NPPR, NPPBco y ACV a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los análisis estadísticos realizados (ANOVA, $p < 0.0001$) demostraron que existe diferencia significativa en las medias de los compuestos evaluados. Una

prueba de comparación múltiple de Dunnett indicó que, si existe diferencia significativa entre el control y la RZ, así como entre el control y las NPPR.

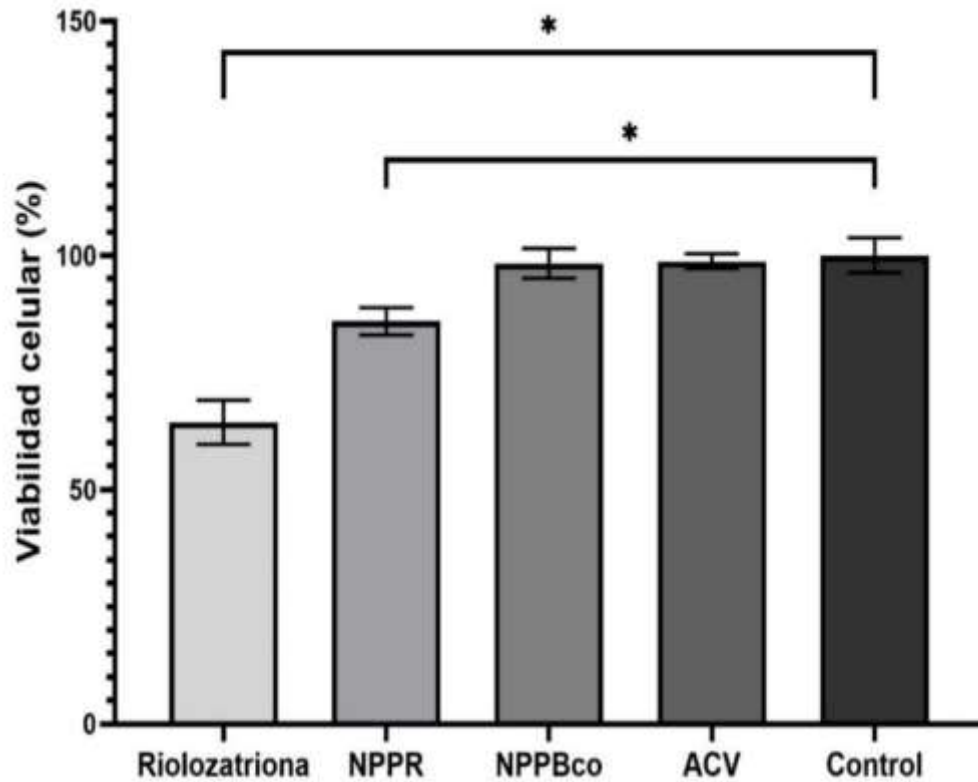


Figura 16. Viabilidad celular de células Vero después de administrar 20 µg/mL de RZ, NPPR, NPPBco y ACV. * diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), ($\bar{x} \pm \sigma$, $n=5$).

Las NPPR exhibieron un valor de CC_{50} de 229 ± 17.80 µg/mL con un efecto citotóxico dependiente de la dosis. Por su parte, el porcentaje de viabilidad celular de las células Vero tratadas con las NPPBco a la concentración más alta evaluada (1,440 µg/mL de polímero) fue de $95.06 \pm 0.23\%$.

3.6 Evaluación de la actividad anti-herpética *in vitro*

Con el objetivo de evaluar la actividad anti-herpética *in vitro* se preparó un concentrado viral, su concentración evaluada mediante título viral fue de 1.66×10^5 UFP/mL.

En los ensayos *in vitro* las NPPBco no mostraron actividad antiviral perceptible contra VHS-1 o VHS-2 a ninguna de las concentraciones evaluadas. En la TABLA XIV se muestran los valores de CI_{50} e IS de las NPPR contra VHS-1 y VHS-2.

TABLA XIV. Actividad anti-herpética *in vitro* de las NPPR.

	NPPR	
	VHS-1	VHS-2
CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	14.39 ± 0.68	17.58 ± 0.59
IS	15.91	13.02

($\bar{x} \pm \sigma$, n=4)

3.7 Formulación de un hidrogel termosensible con NPPR (HG-NPPR)

Los HG termosensibles preparados fueron: HG, HG-NPPBco, HG-NPPR y HG-ACV. Todos los HG a excepción del HG-ACV presentaron tiempos de gelificación entre 30 y 38 segundos a 37 °C y valores de pH entre 4.50 y 4.84 a 4 °C. El HG-ACV presentó un valor de pH de 10.5 a 4 °C y un tiempo de

gelificación de 72 ± 5 segundos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La Figura 17 muestra imágenes representativas de HG a diferentes temperaturas.

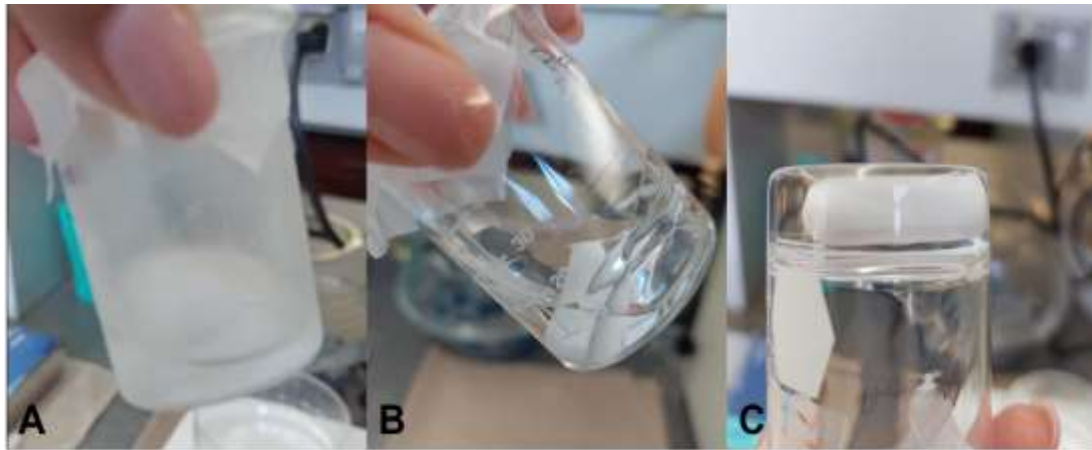


Figura 17. Fotografías representativas de HG: (A) HG a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, (B) HG después de 1 minuto a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y (C) HG después de 1 minuto a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8 Evaluación *in vivo* de la actividad anti-herpética y toxicidad de las formulaciones de Hidrogel termosensible

La evaluación de la actividad anti-herpética de las formulaciones de HG *in vivo* se llevó a cabo en ratones BALB/c a los que se les inoculó vía vaginal 1.66×10^4 UFP/ $10\text{ }\mu\text{L}$ de VHS-2 G, después del establecimiento de la infección (7 días post inoculación) se inició con la administración de los tratamientos cada 24 h durante 7 días.

La Figura 18 muestra fotografías representativas de la evaluación de la zona genital de los ratones de cada grupo durante la aplicación de los tratamientos en los días 0, 2, 4 y 7.

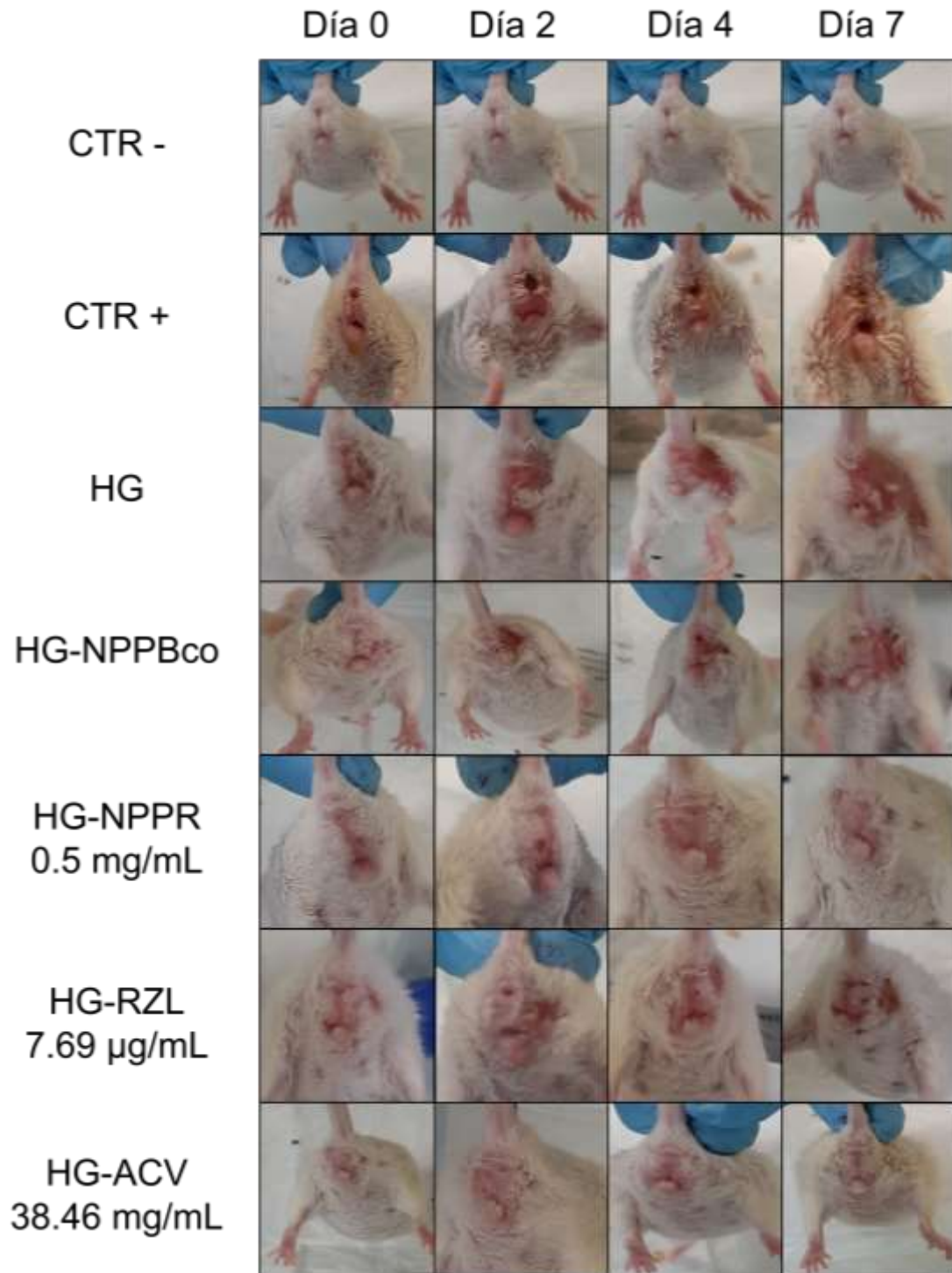


Figura 18. Evolución de la infección vaginal por VHS-2 en ratones Balb/C y evidencia del efecto de los diferentes tratamientos sobre la infección en los días

0, 2, 4 y 7 de tratamiento.

La Figura 19 muestra la gráfica la puntuación de la infección para cada grupo en los días 0, 2, 4 y 7 de tratamiento.

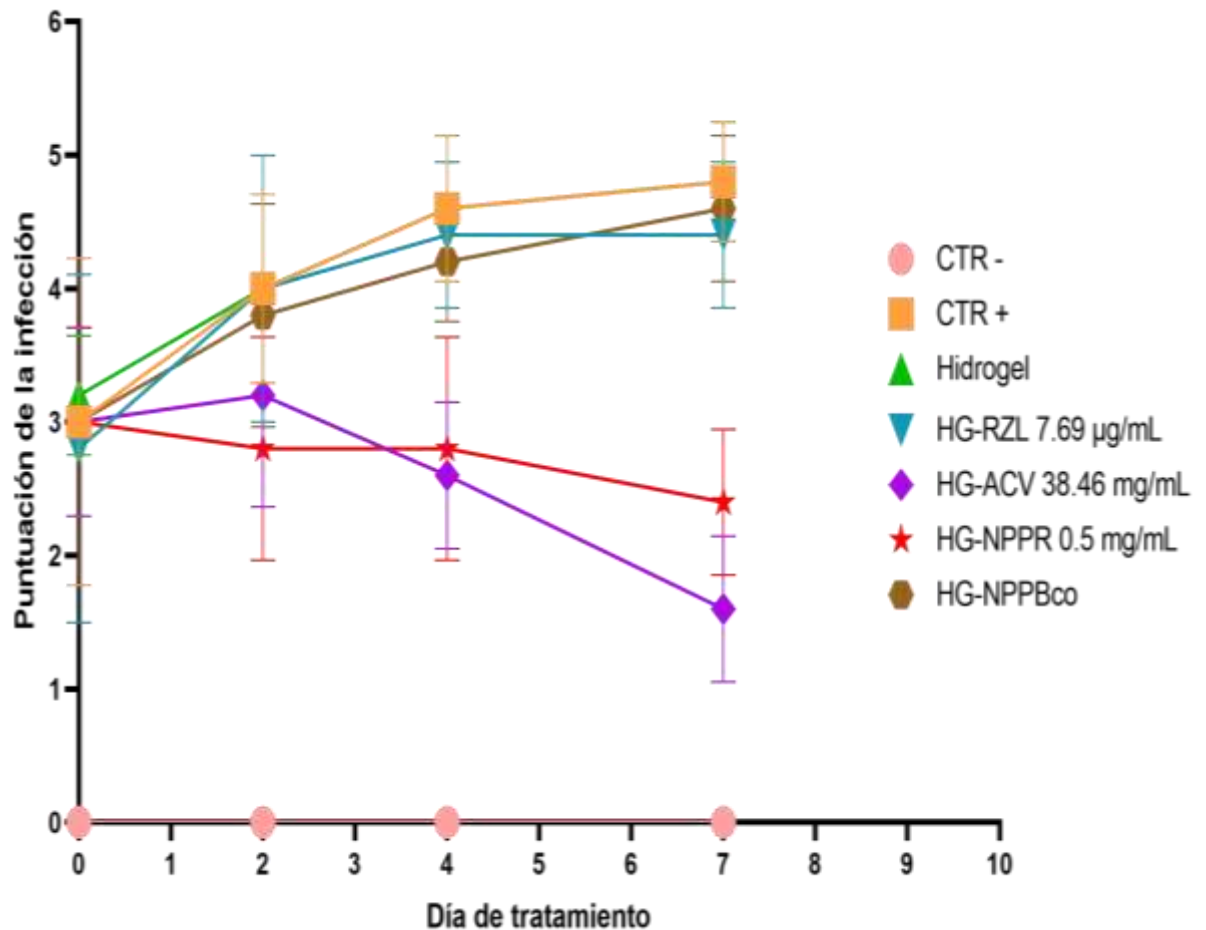


Figura 19. Puntuación de la infección de cada grupo a lo largo del periodo de tratamiento. Puntuación: 0, sin signos de infección; 1, ligero enrojecimiento; 2, hinchazón y enrojecimiento, y/o pus/mucosidad; 3, inflamación grave con pus/mucosidad y alopecia; 4, ulceración del tejido; 5, aumento de la ulceración, parálisis de las extremidades posteriores o muerte ($\bar{x} \pm \sigma$, n=5).

El análisis estadístico (ANOVA) mostró que si existe diferencia significativa entre los puntajes de infección de los diferentes tratamientos ($p <$

0.0008). La prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que únicamente existe diferencia significativa entre los puntajes de infección del grupo CTR+ con los puntajes de los grupos tratados con HG-ACV y con HG-NPPR (Figura 20).

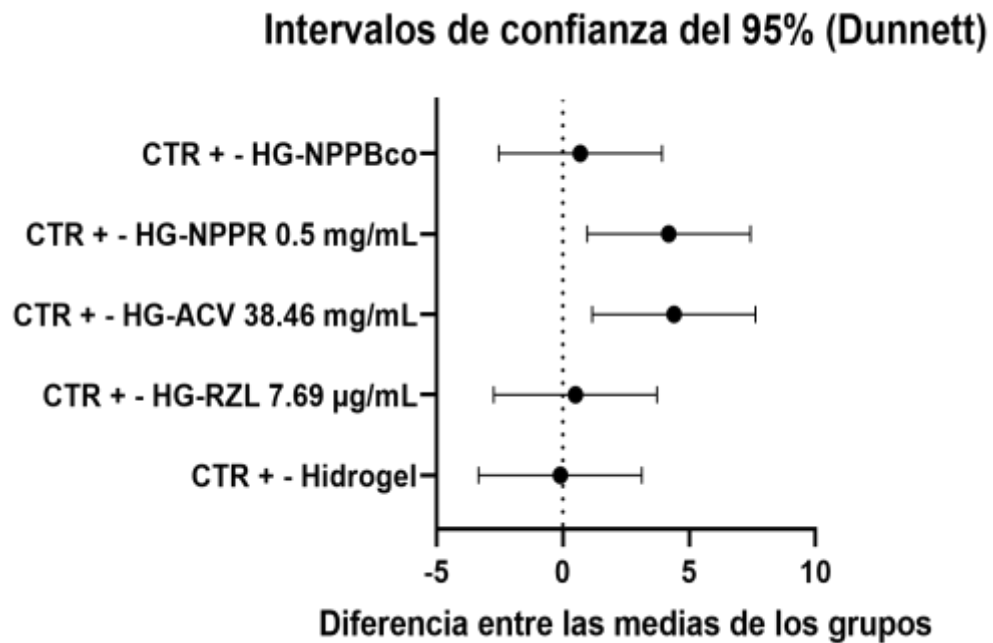


Figura 20. Intervalos de confianza de la prueba de comparación múltiple de Dunnett de la puntuación de la infección del grupo CTR+ vs los grupos con tratamientos.

La prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$) indicó que no existe diferencia significativa entre los puntajes de infección de los grupos tratados con HG-ACV y HG-NPPR (Figura 21).

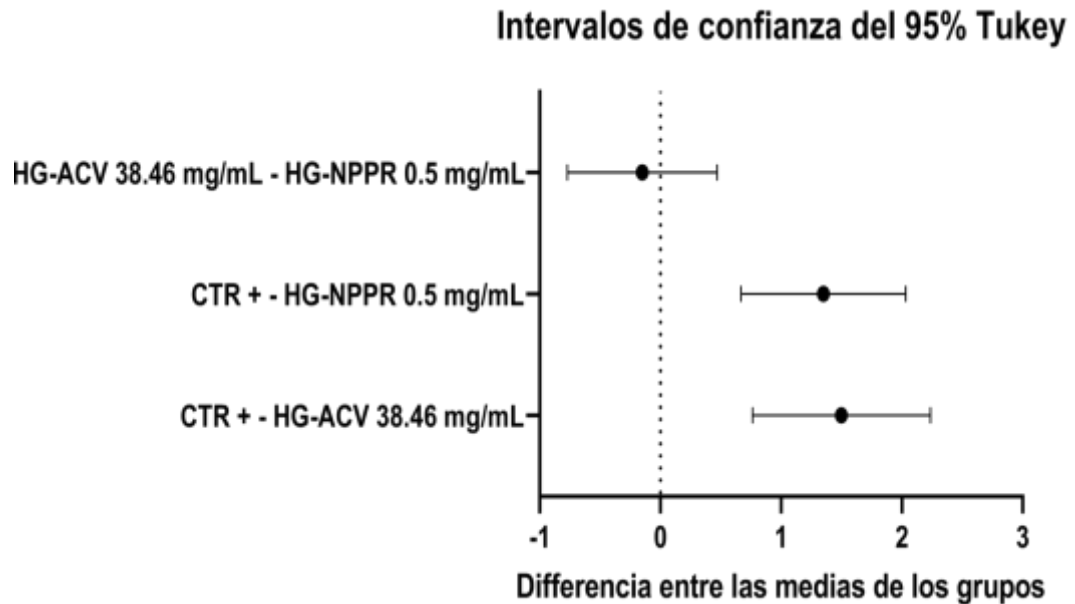


Figura 21. Intervalos de confianza de la prueba de comparación múltiple de la puntuación de la infección entre el CTR+ y los grupos tratados con HG-ACV y HG-NPPR.

La evaluación de la toxicidad de las formulaciones de HG *in vivo* se llevó a cabo en ratones BALB/c. Los tratamientos: PBS (CTR -), HG, HG-NPPBco y HG-NPPR se administraron vía vaginal cada 24 h por 7 días vía vaginal. Posteriormente, los ratones se sacrificaron y se les realizó una disección abdominal para la obtención del órgano reproductor femenino, el hígado, riñones y bazo.

En ninguno de los órganos analizados se presentaron alteraciones morfológicas evidentes. La Figura 22 muestra imágenes representativas del tejido cérvico-vaginal de cada grupo después de 7 días de tratamiento.

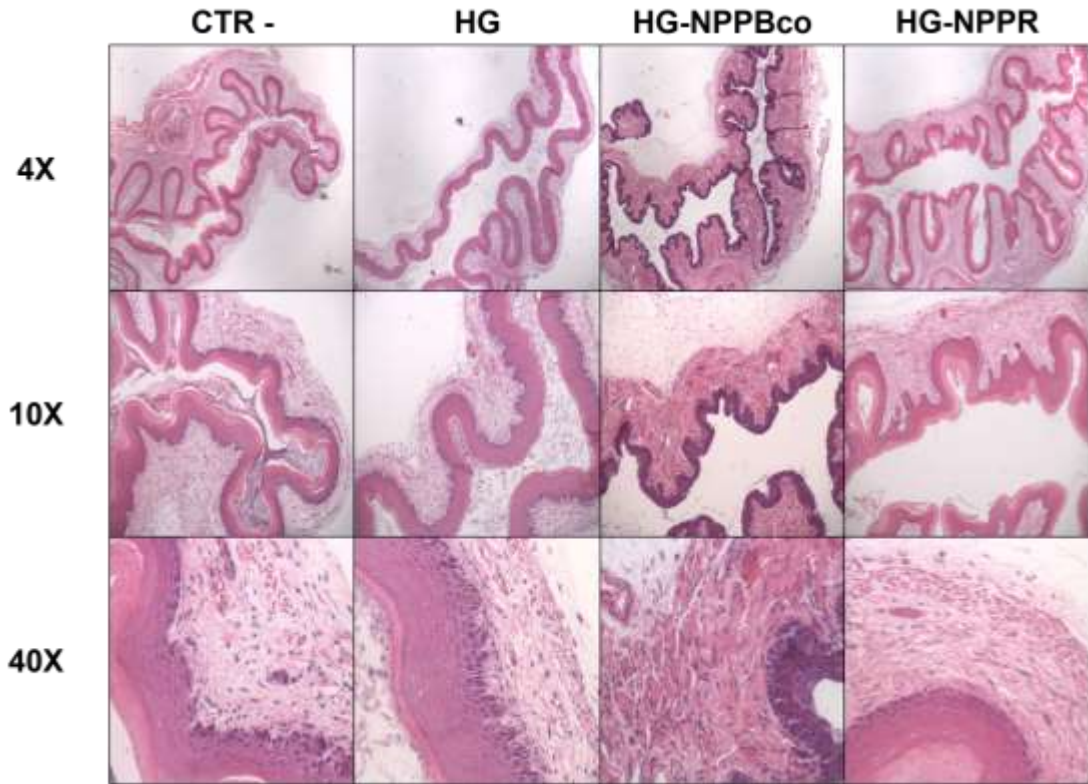


Figura 22. Tejidos cérvico-vaginales de cada grupo después de 7 días de tratamiento. Tinción hematoxilina-eosina.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

La RZ es un compuesto diterpenoide aislado a partir del extracto de diclorometano de la raíz de *Jatropha dioica*¹⁰⁰. De acuerdo con su IS, este compuesto posee moderada actividad anti-herpética *in vitro*¹⁰⁴. A diferencia del ACV que inhibe la replicación viral, el mecanismo de acción de la RZ podría basarse en evitar la entrada de las partículas virales a la célula¹⁰⁵. Se han realizado evaluaciones *in vivo* de su actividad anti-herpética, en donde la RZ (0.3% p/p) ha mostrado resultados comparables al ACV (2.5% p/v)¹⁰⁶. Sin embargo, debido a su limitada solubilidad en vehículos acuosos, su aplicación biológica se ha visto limitada. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se desarrolló y caracterizó fisicoquímicamente una formulación de NPP cargadas con RZ para la evaluación de su actividad anti-herpética y toxicidad. Para el desarrollo de la formulación de NPPR fue necesario obtener el EDJ y a partir del mismo purificar la RZ. De forma inicial, se optimizaron las variables para encapsular la RZ a partir de EDJ, para lo cual se consideraron las características fisicoquímicas óptimas para su administración vaginal.

Posteriormente, ya establecidas las mejores condiciones de encapsulación de la RZ, se obtuvo la formulación de las NPPR, su perfil de liberación *in vitro* y su actividad anti-herpética *in vitro* en células Vero. Por último, se evaluó la actividad anti-herpética *in vivo*, así como la toxicidad de las NPPR en un modelo murino de herpes vaginal, para lo cual fue necesario desarrollar un hidrogel termosensible como vehículo de las NPPR.

4.1 Obtención del EDJ y purificación de RZ

La obtención del EDJ, así como la purificación de RZ se realizaron según la metodología establecida en el laboratorio de extracción del departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL. El porcentaje de rendimiento (p/p) de la obtención del EDJ concuerda con los rendimientos reportados para el proceso de extracción optimizado que van de 2.5 a 2.9 %³⁴. En el perfil cromatográfico del EDJ se identificaron mediante los tiempos de retención a los metabolitos: epoxi-riolozano, citlalitrona, 6-*epi*-riolozatriona, RZ y jatrofatriona (Figura 7), algunos de estos metabolitos se relacionan con la actividad anti-herpética y la RZ fue el metabolito mayoritario³⁴.

Específicamente, la pureza e identidad de la RZ se evaluó mediante CLAR. En la Figura 8 se observan cromatogramas de la RZ de referencia (a) y la RZ purificada (b) para el desarrollo de este trabajo. Se observa que tanto los tiempos de retención como el máximo de absorbancia de ambos picos cromatográficos coinciden, por lo que podemos inferir que se trata del mismo

compuesto. Además, en el cromatograma de la RZ purificada (b) no aparece ninguna señal adicional por lo que al menos cromatográficamente se considera pura. El rendimiento de la purificación de este diterpeno fue ligeramente mayor al 3%, lo cual es común en metabolitos mayoritarios como en el caso de la RZ¹¹⁹. Cabe mencionar que el proceso de purificación de la RZ a partir de EDJ es arduo y costoso por lo que se utilizó el EDJ para establecer las mejores condiciones de encapsulación de la RZ.

4.2 Desarrollo y caracterización de la formulación de NPPE (F4)

Dentro de las características ideales de las NPP para su aplicación biológica se encuentra la bioseguridad y biocompatibilidad de los polímeros formadores^{120,121}. La familia de polímeros Eudragit® son polimetacrilatos biocompatibles utilizados ampliamente en la industria farmacéutica para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos¹²². Además, estos polímeros se han utilizado con éxito para la entrega de productos naturales. Por ejemplo, Ren y colaboradores desarrollaron un NP de Eudragit® S100, cargado con piperina (Pi), un alcaloide presente en la pimienta negra el cual es responsable de muchos efectos farmacológicos como la epilepsia¹²³. Mediante el uso del NP la biodisponibilidad de Pi aumentó 2.7 veces, en comparación con la de Pi libre en la administración oral en ratas epilépticas.

El polímero Eudragit® L100-55 es un copolímero compuesto por ácido metacrílico: acrilato de etilo en proporción 1:1 y es sensible a $\text{pH} \geq 5.5$ ¹²²,

característica deseable en una formulación vaginal. Sobre todo, el copolímero Eudragit® L100-55 podría asegurar una liberación controlada de la RZ a un pH vaginal (cercano a 4).

La formulación de las NPP se llevó a cabo mediante la técnica de nanoprecipitación establecida por Fessi y colaboradores ¹²⁴. Esta técnica se ha utilizado con éxito para incorporar en NPP una amplia variedad de productos naturales con altos % EE. Por ejemplo, el aceite esencial de *Piper nigrum L.* con un 89% EE,¹²⁵ el extracto metanólico del propóleo rojo con el 81% EE,¹²⁶ el extracto hidroalcohólico de *Passiflora edulis* con el 100% EE ¹²⁷ y la luteolina con un 71% EE ¹²⁸.

La nanoprecipitación o desplazamiento de disolventes, se basa en la lenta interacción de una fase orgánica (FO) y una fase acuosa (FA) a temperatura ambiente y con agitación constante. Cuando ambas fases entran en contacto, el disolvente miscible en la FA difunde desde la FO hacia la FA lo que modifica la solubilidad tanto del polímero como del principio activo. A medida que la concentración del polímero en la mezcla resultante excede su límite de solubilidad termodinámica, las cadenas del polímero comienzan a agregarse al mismo tiempo que incorporan el principio activo, lo que resulta en la formación de las NPP ¹²⁹.

Dentro de las variables clave que controlan la formación de las NPP en la técnica de nanoprecipitación se encuentran: características químicas del principio activo que en este trabajo sería el EDJ o la RZ, naturaleza del

polímero (o copolímero) y el grado de solubilidad de estos últimos en ambas fases. Con base en estudios previos del grupo de trabajo, se evaluaron cuatro disolventes. Posterior a la prueba de solubilidad (Figura 9), se cuantificó la RZ por CLAR y se estableció que la mezcla de isopropanol:acetona (1:1) permitió disolver la mayor cantidad de RZ por mL de disolvente (TABLA VI). Por lo tanto, se seleccionó la solución de isopropanol:acetona (1:1) como FO.

Para optimizar la concentración de EDJ se realizaron tres formulaciones F1, F2 y F3 con diferente concentración del extracto: 1.40, 0.84 y 0.60 mg/mL respectivamente. En la TABLA VII se observa que al incrementar la cantidad de EDJ el tamaño de las NPPE aumentó. Este comportamiento podría atribuirse a una mayor cantidad de EDJ disponible en el medio para incorporarse a las NPP durante su formación. El mismo comportamiento fue reportado por Alves y colaboradores quienes elaboraron mediante la técnica de nanoprecipitación NPP cargadas con el extracto hidroalcohólico de hoja de *Passiflora edulis* ¹²⁷. Las nanoformulaciones del extracto (NPPE) mostraron tamaños superiores a los 390 nm (TABLA VII) y el análisis estadístico (ANOVA, $p < 0.05$) demostró que no existe diferencia significativa en el tamaño de las tres formulaciones. Esto es importante ya que diversos autores consideran que el tamaño ideal para la aplicación biológica de NPP es de 100 a 300 nm; ya que se evita tanto su eliminación tanto por filtración glomerular como por macrófagos ^{25,60,130}. Por lo tanto, ninguna de las formulaciones cumple con el tamaño ideal para su aplicación biológica; a pesar de lo anterior se continuó con la caracterización para seleccionar la formulación que continuaría en el proceso de optimización.

En cuanto al IPD, se obtuvieron valores de 0.17 a 0.26 (TABLA VII). El IPD es una medida de la homogeneidad de una muestra basada en su tamaño, los valores de IPD van de 0 a 1. Sadeghi y colaboradores afirman que una formulación se considera mono dispersa si su IPD es <0.3 y presenta un solo pico en la curva de distribución de tamaño ¹³¹. Por lo tanto, las tres formulaciones se consideran mono dispersas. Además, es posible observar que el IPD se incrementó en función de la concentración de EDJ, lo que sugiere que un exceso de EDJ propicia la formación de agregados (Figura 10).

En la TABLA VII, también se muestra el potencial zeta de las tres formulaciones. Este potencial es un parámetro que mide la diferencia de potencial eléctrico generado entre la doble capa eléctrica de la NPP y el medio dispersor ¹³². Kamble y colaboradores aseguran que valores de potencial zeta mayores o iguales a ± 30 mV generan repulsiones electrostáticas entre las nanopartículas lo que ayuda a evitar su agregación ⁶⁵. Las tres NPPE presentaron un potencial zeta de -30.43 a -41.53 mV (TABLA VII); estos valores pueden atribuirse a la naturaleza aniónica del copolímero Eudragit® L100-55 por la presencia de grupos terminales de ácido carboxílico ¹²². Con base en lo anterior, los valores de potencial zeta de las formulaciones de NPPE podrían favorecer su estabilidad.

Para calcular el %EE de EDJ en las NPPE se seleccionaron 3 metabolitos de seguimiento: citlalitriona, RZ y jatrofatriona, debido a que fueron los metabolitos más abundantes en EDJ con %A de 3.84%, 15.40% y 3.86% respectivamente. El %EE de los metabolitos de seguimiento en F2 fue de

5.24% de citlaltiriona, 22.17% de RZ y 5.82% de jatrofatriona, es decir el %EE total de EDJ en F2 fue de 33.23% (TABLA VII). Por su parte en F3 los %EE fueron: 3.07% de citlaltiriona, 17.87% de RZ y 2.70% de jatrofatriona, con un %EE total de EDJ en F3 de 23.65%. Lo anterior indica que F2 logró encapsular el 22.17% de RZ presente en EDJ, mientras que F3 encapsulo solo el 17.87%. Esta disminución del %EE de RZ observada en F3 probablemente se deba a que el polímero no incorpora suficiente RZ debido a su baja polaridad, lo que afecta la relación RZ/copolímero ^{127,133}. Dado que la F2 obtuvo el mejor %EE de RZ, se seleccionó una concentración de 0.84 mg/mL de EDJ para continuar con el desarrollo de NPPR.

Con el objetivo de disminuir el tamaño de las NPPE se decidió elaborar una formulación con una menor concentración de copolímero (8mg/mL). Esto debido a que la concentración del polímero tiene un efecto directo sobre el tamaño de las NPP. Bashir y colaboradores demostraron que el tamaño medio de las NPP elaboradas mediante la técnica de nanoprecipitación dependía en gran medida de la proporción de polímero/disolvente ¹³⁴. El tamaño de partícula de F4 fue de 246.45 ± 13.55 nm (TABLA VIII), es decir la disminución en la concentración del polímero de 14 mg/mL (F2) a 8 mg/mL (F4), ocasionó una disminución importante en el tamaño de partícula. Estos resultados concuerdan con Beck-Broichsitter y colaboradores, quienes mencionan que cuanto mayor sea la concentración del polímero en la fase orgánica, menor será la velocidad de difusión debido al aumento de la viscosidad de la solución de polímero, y las partículas resultantes serán más grandes ¹³⁵.

Por otro lado, el potencial zeta de F4 fue de -30.43 mV y el IPD de 0.07 (TABLA VIII). La disminución del valor de IPD en F4 respecto a F2 (IPD 0.20) también puede estar relacionada con la disminución de la concentración del copolímero. Elmowafy y colaboradores reportan que una adecuada viscosidad de la FO permite una mejor distribución de los componentes en la misma, lo que se traduce en menor presencia de agregados y mejores %EE ¹²⁸. Lo anterior queda demostrado, ya que F4 presentó un %EE de 65.72% (TABLA VIII) en donde el 46.46% corresponde a RZ, es decir F4 duplicó el %EE respecto a F2.

En la Figura 11 se compara el cromatograma del contenido de la formulación de NPPE (F4 en rojo) con una solución de EDJ (azul) preparada a la misma concentración, es posible observar que en ambos cromatogramas la RZ es el componente mayoritario. Además de la señal correspondiente a RZ, se aprecian las señales correspondientes a citlalitriona y jatrofatriona (metabolitos de seguimiento), mismas que también se relacionan con la actividad anti-herpética.

En relación con la estabilidad de F4 se evaluaron después de 6 y 11 meses de almacenamiento el tamaño, IPD y la presencia de agregados (TABLA IX). El análisis estadístico realizado (ANOVA, $p < 0.05$) demostró que no existen variaciones significativas ni en el tamaño de las NPP ni en el IPD y no se observó la presencia de agregados, por lo que F4 fue estable durante al menos 11 meses. Según la NOM-073-SSA1-2015, se debe evaluar la estabilidad de un fármaco nuevo durante 12 meses a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5\%$ de humedad

relativa para que se considere estable a largo plazo; se debe evaluar la estabilidad de F4 un mes más para alcanzar la categoría de formulación estable a largo plazo.

La F4 presentó características ideales para su administración vaginal y ha demostrado ser estable. A sí mismo, F4 logró encapsular 9.30 % de citlalitriona, 46.46% de RZ y 9.95% de jatrofatriona, mismos que podrían ejercer un efecto de sinergia en la actividad anti-herpética ³⁴. Al tomar en cuenta lo anterior, así como el tiempo y recursos necesarios para la purificación de RZ no se descarta la posibilidad de llevar a cabo evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de la actividad anti-herpética de F4 y de resultar equiparable a NPPR podría emplearse en su lugar.

4.3 Obtención y caracterización de NPPR

Después del desarrollo de la formulación de NPPE y de acuerdo con los parámetros para tamaño de partícula, IPD y potencial zeta mencionados anteriormente, se seleccionó F4 para continuar con los estudios de encapsulación de la RZ pura. Una de las metas de este trabajo fue desarrollar NPPR que en un futuro puedan administrarse vía vaginal para combatir la infección por VHS-2; por lo que se buscaba que las NPPR además de encapsular la RZ, cumplieran con las características fisicoquímicas ideales para la administración vaginal.

En cuanto al tamaño de las NPP, Smolenski y colaboradores mencionan en su revisión que $NPP > 200$ nm poseen la capacidad de penetrar la mucosa vaginal y llegar hasta el epitelio vaginal ⁸⁹. Las NPPR obtenidas exhibieron un tamaño de 263.26 ± 14.21 nm, lo que las vuelve ideales para su aplicación vaginal (TABLA X). El IPD de las NPPR fue de 0.13 ± 0.02 con un solo pico en la curva de distribución de tamaño, lo que indica que la formulación es homogénea, (Figura 12) y su potencial zeta fue de -37.16 ± 2.16 mV (TABLA X). El cambio de potencial zeta respecto a las NPP con el extracto (NPPE) podría deberse a la presencia de compuestos en el EDJ de naturaleza catiónica ⁶⁵. Sin embargo, esta densidad de carga aniónica de las NPPR favorecerían la interacción de las NPPR con las partículas virales. Es sabido que las glicoproteínas presentes en la envoltura viral poseen cargas positivas para unirse con los receptores de heparán sulfato de la membrana celular. Así que, se podrían generar interacciones electrostáticas entre las NPPR y las glicoproteínas de la envoltura del VHS ^{8, 9}. En un estudio realizado por Yadavalli y colaboradores, se elaboraron NPP de varios polímeros de policarboxilato (ftlato de hidroxipropilmetilcelulosa, Eudragit[®] L100, Eudragit[®] L100-55, Eudragit[®] S100, etc); todas las formulaciones de NPP presentaron un tamaño inferior a 125 nm y valores de potencial zeta negativos debido a la presencia de grupos terminales de ácido carboxílico. Los resultados de ese estudio comprobaron que la interacción entre las NPP y el virus depende de la densidad de carga aniónica y del peso molecular del polímero; además demostraron que las NPP son capaces de crear sinergias con medicamentos antivirales ¹³⁶.

El %E de las NPPR fue de 8.51 ± 0.66 (TABLA X), esto quiere decir que el 8 % de la NPP está formada por la RZ y el resto corresponde al Eudragit® L100-55. Por su parte, el %EE de las NPPR resultó de 89.64 ± 7.81 , lo que indica que se logró encapsular cerca del 90% de la RZ presente en el EDJ. Este %EE es similar a los reportados por Farías y colaboradores para la encapsulación del extracto etanólico de propóleo rojo (EEP), las NPP de Eudragit® E100-Pluronic cargadas con EEP presentaron tamaños de 175 a 380 nm y %EE de 61.2 a 81% ¹²⁶.

El incremento de %EE de la RZ en NPPR (89.64%) respecto a NPPE (46.46%) se puede atribuir a la ausencia de otros metabolitos hidrófobos como el β -sitosterol que compiten con la RZ por su incorporación en la matriz polimérica. Además, al tratarse de RZ pura no se presentarían interferencias por la masa de otros metabolitos como los isojatrofanos y el epoxi-riolozano que pudieran dificultar la difusión de la RZ a la FA ¹³⁷.

Para el estudio de estabilidad de las NPPR, se evaluó el tamaño de partícula, potencial zeta, el %E y el %EE después de 6 meses de almacenamiento (TABLA XI). El análisis estadístico realizado (prueba t, $p < 0.05$) reveló que no existen variaciones significativas en ninguno de los parámetros evaluados. Al mantenerse constantes los valores de %E y %EE, se puede inferir que no se libera RZ de las NPPR a lo largo del periodo de estabilidad evaluado. Debido a lo anterior se considera que las NPPR fueron estables al menos durante 6 meses.

Dentro de la caracterización de las NPPR se incluyó un análisis de disolventes residuales. Las farmacopeas emplean el término disolvente residual para hacer referencia a las impurezas orgánicas volátiles que están presentes en los productos farmacéuticos; estos no tienen valor terapéutico y en algunos casos pueden llegar a ser tóxicos ¹³⁸. Debido a lo anterior se llevó a cabo un análisis de disolventes residuales en donde se evaluó la presencia de todos los disolventes empleados desde la extracción de EDJ (diclorometano) y purificación de la RZ (acetato de etilo, hexano, pentano y éter etílico) hasta la formación de NPPR (isopropanol y acetona). Los resultados evidenciaron que en las NPPR únicamente estaba presente el isopropanol. De acuerdo con la USP el isopropanol se clasifica como disolvente residual de clase 2, es decir, puede estar presente en formulaciones farmacéuticas siempre y cuando se encuentre a una concentración menor a 5,000 ppm ¹¹¹. Es posible observar en la Figura 13 que la señal del isopropanol en las NPPR (pico h en el cromatograma en rosa) es menor que la señal del isopropanol presente en la solución estándar (pico h en el cromatograma en negro), mismo que se encontraba a 5,000 ppm. Con base en lo anterior, la formulación cumple con los parámetros de disolventes residuales de la USP.

Como parte de la caracterización química de las NPPR, se realizó un análisis de FTIR del polímero Eudragit® L100-55, la RZ y las NPPR (Figura 14). En el espectro de Eudragit® L100-55 se identifican señales de los grupos funcionales más importantes de la unidad polimérica de este copolímero. Una banda ancha en $2,932\text{ cm}^{-1}$ debido al estiramiento C-H de los grupos alquilo.

Dos señales intensas en 1,730 y 1,700 cm^{-1} que corresponden al estiramiento de los C=O del ácido carboxílico y éster respectivamente, y la señal que se aprecia en 1,157 cm^{-1} que corresponde al estiramiento C-O del éster. Estas señales concuerdan con el espectro de Eudragit® L100-55 obtenido mediante reflectancia total atenuada-FTIR por Yu y colaboradores ¹³⁹.

Por otra parte, en el espectro de la RZ se observan tres señales anchas de baja intensidad en 2,955, 2,933 y 2,866 cm^{-1} que corresponden al estiramiento de enlaces C-H de metilo, metileno y metino. Además, se aprecian dos señales intensas en 1,702 y 1,684 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del C=O no conjugado y conjugado respectivamente. Asimismo, se aprecia una señal de intensidad media en 1,632 cm^{-1} debido al estiramiento C=C de un alqueno conjugado. Este espectro de IR es muy similar al espectro de RZ reportado por Melchor-Martínez y colaboradores ¹⁴⁰.

Así, en el espectro de FTIR de las NPPR se observan señales representativas del polímero Eudragit® L100-55, como lo son el estiramiento O-H (señal ancha en 2,982 cm^{-1}), el estiramiento C=O del éster (señal intensa a 1,730 cm^{-1}) y el estiramiento C=O del ácido carboxílico (señal intensa en 1,700 cm^{-1}). Cabe mencionar que alrededor de 1,600 cm^{-1} no se observa ninguna señal que pudiera corresponder al estiramiento C=C del alqueno conjugado en la RZ; esto podría explicarse con el %E de RZ en las NPPR que es del 8%, lo que significa que únicamente el 8% de la NPP corresponde a RZ. En general, no se observaron bandas nuevas que indiquen la formación de otros compuestos, por lo que se infiere que no ocurre una interacción química

covalente entre el polímero y la RZ.

4.4 Estudio de liberación de RZ a partir de NPPR *in vitro*

Una parte importante del desarrollo de formulaciones farmacéuticas es el estudio de la liberación del principio activo a partir del sistema de dosificación. El estudio de los perfiles de liberación *in vitro* aporta indicios sobre el posible comportamiento farmacocinético *in vivo*. En una primera etapa, se desarrolló y validó un método de UV-Vis para cuantificar la RZ liberada a partir de las NPPR. Para la validación del sistema se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación, mientras que para llevar a cabo la validación del método se evaluaron la precisión y exactitud. Con respecto a la linealidad del sistema, se obtuvieron valores de coeficiente de correlación y coeficiente de determinaciones mayores de 0.99 (TABLA XII). Por lo que se estableció que los datos obtenidos para la curva de calibración de 8 a 18 µg/mL de RZ son lineales de acuerdo con los requerimientos de la CCAYAC¹¹⁴. Los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación se encuentran por debajo del nivel más bajo de concentración de RZ en la curva de calibración. Estos valores cumplen con los criterios estipulados por la CCAYAC (TABLA XII)¹¹⁴. En cuanto, a la precisión y precisión intermedia del sistema, se calcularon los valores de %DER respecto a la curva de calibración y se obtuvieron valores menores al 2% y 3% respectivamente. Según los criterios de la CCAYAC, el sistema se considera preciso (TABLA XII)¹¹⁴.

En relación a la validación del método se llevó a cabo mediante la adición de estándar (TABLA XIII). Se obtuvieron valores de coeficiente de correlación y coeficiente de determinaciones mayores de 0.99. Por lo que se estableció que los datos obtenidos para la curva de calibración de 8 a 18 $\mu\text{g/mL}$ de RZ es lineal ¹¹⁴. La precisión del método se evaluó mediante la determinación del %DER y los valores obtenidos fueron menores al 2%, lo cual de acuerdo con los criterios de la CCAYAC se considera preciso ¹¹⁴. Para evaluar la exactitud del método se determinó el %R. Se obtuvo un %R de 100.05 ± 1.03 , por lo que, según los criterios de la CCAYAC, se establece que el método es exacto ¹¹⁴. Una vez validado el método para la cuantificación de RZ por UV-Vis, se procedió a evaluar su liberación a partir de las NPPR.

Los valores de pH que se emplearon para evaluar el perfil de liberación de RZ a partir de NPPR fueron de 4.3 y 7.4. El pH vaginal sano es ligeramente ácido (pH de 4 a 5) debido a la producción de ácido láctico por parte de *Lactobacillus spp*, este pH sirve de defensa contra patógenos oportunistas ^{141,142}. Se evaluó a un pH de 7.4 debido a que es el pH óptimo para el crecimiento de las células Vero empleadas para las evaluaciones de citotoxicidad y actividad anti-herpética *in vitro* ¹¹⁵. En el perfil de liberación de la RZ (Figura 15) se puede observar una liberación bifásica en ambos valores de pH. Es decir, se observa una liberación inicial de RZ rápida, seguida de una liberación de RZ sostenida durante 48 h. Cabe mencionar que a pH de 7.4 (línea rosa) la liberación de RZ fue del 92% en las primeras dos horas. Este comportamiento es el esperado, ya que el polímero empleado es sensible a pH,

a valores mayores a 5.5 las cadenas poliméricas de NPPR se vuelven laxas lo que permite la rápida difusión de RZ al medio ¹²². Por otro lado, a pH de 4.3, la liberación inicial de la RZ a partir de las NPPR fue menor, durante las primeras 2 horas se liberó el 81 % de RZ y después el porcentaje de RZ liberado fue constante. Si bien, el Eudragit® L100-55 es insoluble a pH menores a 5.5, la liberación de RZ a pH de 4.3 podría atribuirse al hinchamiento paulatino del copolímero formador de las NPPR ¹⁴³. Finalmente, a las 48 h, el porcentaje de liberación de RZ fue de 95.19 % y 97.53 % a valores de pH de 7.4 y 4.3 respectivamente. Estos resultados son favorables ya que cerca del 100% de la RZ encapsulada fue liberada y disponible para su actividad anti-herpética. Además, después de dos horas, la liberación de RZ fue sostenida lo que podría implicar una disminución en la frecuencia de aplicación de las NPPR ¹⁴⁴.

4.5 Evaluación de la citotoxicidad

Dentro de los métodos experimentales más empleados para evaluar la citotoxicidad de un nuevo principio activo o fármaco se encuentra la determinación de la viabilidad celular ¹⁴⁵. Se evaluó el efecto de la administración de RZ, las NPPR, las NPPBco y el ACV a la misma concentración y en el mismo medio de disolución sobre la viabilidad celular. Los resultados (Figura 16) mostraron que las NPPBco y el ACV no generan efectos citotóxicos en las células Vero, lo que concuerda con la clasificación GRAS de los polímeros Eudragit® y con la CC₅₀ reportada para el ACV en células Vero

(>1441 g/mL) ^{120,136}. Por otro lado, las NPPR conducen a una mayor viabilidad celular, respecto a la RZ libre a la misma concentración. Dado que el efecto citotóxico de cualquier compuesto activo depende en gran medida de su forma de administración, podemos inferir que la liberación controlada de RZ a partir de las NPPR ayudo a disminuir su citotoxicidad ⁵¹.

Las NPPR exhibieron un valor de CC₅₀ de 229 ± 17.80 µg/mL con un efecto citotóxico dependiente de la dosis. Por otro lado, las NPPBco mantuvieron una viabilidad celular de 95.06 % a la concentración más alta evaluada que fue de 1,440 µg/mL de polímero, por lo que a dicha concentración no se consideran citotóxicas.

4.6 Evaluación de la actividad anti-herpética *in vitro*

Las NPPBco no mostraron actividad antiviral *in vitro* perceptible contra VHS-1 o VHS-2 a ninguna de las concentraciones evaluadas. Lo anterior coincide con un estudio realizado por Yadavalli y colaboradores en donde demostraron que Eudragit® L100-55 no posee actividad terapéutica contra el VHS y que su efecto para inactivarlo es muy limitado ¹³⁶.

Las NPPR exhibieron valores de CI₅₀ de 14.39 µg/mL para VHS-1 y de 17.58 µg/mL para VHS-2 (TABLA XIV). Esta ligera selectividad de la RZ sobre VHS-1 puede atribuirse a las diferencias fenotípicas entre ambos virus. Trybala y colaboradores reportan que las glicoproteínas purificadas de VHS-1 y VHS-2

(gB y gC) interactúan de forma diferente con los proteoglicanos de heparán sulfato (HS) en la superficie celular. Lo anterior provoca que la unión de VHS-1 a la membrana celular sea más sensible a las fuerzas iónicas del medio comparado con VHS-2 ¹⁴⁶. Por otro lado, Ferrel Hernández y colaboradores demostraron que la RZ evita la entrada de la partícula viral a la célula sin influir en el proceso de adherencia ¹⁰⁵. Por lo que podemos inferir que la presencia de las NPPR podría influir en estas interacciones ya que posee un potencial zeta de -37.16, valor que es significativo para generar repulsiones/atracciones electrostáticas entre ellas y el microambiente ⁶⁵.

Además de actuar como acarreadores de RZ y permitir el desarrollo de una formulación acuosa, las NPPR ayudaron a mejorar significativamente la efectividad antiviral de la RZ; las NPPR duplicaron el IS para el VHS-2 y casi lo triplicaron para el VHS-1 respecto al IS reportado para la RZ libre que es de 5.8 para ambos virus. El IS de un compuesto es un parámetro ampliamente aceptado y usado para expresar su eficacia en la actividad antiviral *in vitro* ³⁸.

Cabe resaltar que, dentro de nuestro grupo de trabajo, Estrada Chavarría realizó modificaciones estructurales a la RZ y uno de los compuestos obtenidos (compuesto 1) mostró un IS de 10.9 para el VHS-1 ¹⁴⁷, este sería un candidato ideal para su posterior nanoencapsulación y evaluación de la actividad anti-herpética.

4.7 Formulación de un hidrogel termosensible con NPPR (HG-NPPR)

Las formulaciones de administración vaginal convencionales como óvulos, cremas y geles presentan con frecuencia una mala retención. Ya que la fuerza de gravedad y los movimientos de las mujeres al realizar sus actividades son un desafío para la retención de las formulaciones. Por lo que el uso de hidrogeles termosensibles representa una alternativa prometedora. Dentro de los excipientes más utilizados para la formulación de hidrogeles termosensibles se encuentran los poloxámeros ¹⁴⁸. Los poloxámeros son copolímeros tribloque formados por una cadena central hidrofóbica de poli(óxido de propileno) ubicada entre dos cadenas de poli(óxido de etileno) de carácter hidrofílico, no iónicos y termosensibles ¹⁴⁹. Propiedades que permiten obtener un hidrogel termosensible para la aplicación vaginal de las NPPR.

Si bien los poloxámeros son considerados como mucoadhesivos, sus propiedades mucoadhesivas son limitadas en medios biológicos ¹⁴⁸. Debido a lo anterior, se incorporó el quitosano a los hidrogeles termosensibles para favorecer su interacción electrostática con la mucina (proteína producida por las células vaginales) y asegurar una buena mucoadhesión ¹⁵⁰.

Se desarrolló un hidrogel termosensible (HG) y se utilizó como base para elaborar 4 formulaciones más: HG-NPPR, HG-RZL, HG-NPPBco y HG-ACV. Se incluyó la formulación de HG-ACV ya que, el ACV es el estándar de actividad anti-herpética

Como parte de la caracterización de los HG se evaluó su pH. Los HG preparados (a excepción de HG-ACV) presentaron valores de pH entre 4.50 y 4.84, valores ideales para la aplicación vaginal, cabe mencionar que el pH vaginal presenta valores de pH entre 4 y 5 ^{141,142}. En el caso de la HG-ACV el pH aumentó a 10.5, probablemente debido a que el ACV empleado para elaborar el gel se encontraba en forma de sal como ACV sódico el cual tiene un pH de ≈ 11 .

El cambio en el pH de HG-ACV incremento alrededor de 30 segundos su tiempo de gelificación respecto al resto de las formulaciones. Estos resultados coinciden con Chen y colaboradores, quienes reportan que la transición sol gel de los poloxámeros es sensible al pH; Un cambio en el pH puede provocar que no se lleve a cabo una adecuada transición sol gel, que esta sea más lenta como en el caso del HG-ACV o incluso puede provocar la degradación de los poloxámeros lo que impide la formación del sol gel ¹⁴⁹.

En la Figura 17 se muestran los cambios del HG en función de la temperatura. A los 4°C es líquida y a 37°C se gelificó después de 30 a 72 segundos. La aplicación del HG permitió que las NPP permaneciera en la cavidad vaginal a pesar del movimiento natural de los ratones hembra y además evitó el uso de anestesia durante la aplicación de los tratamientos en el modelo *in vivo* de infección vaginal.

4.8 Evaluación *in vivo* de la actividad anti-herpética y toxicidad de las formulaciones de HG

Para llevar a cabo la evaluación *in vivo* de la actividad anti-herpética, el primer punto a considerar fue la selección del modelo biológico. Los hospederos más utilizados para reproducir la patogénesis herpética son: ratones, ratas, conejos y cobayos. Además, se debe considerar el cuadro clínico a establecer, el objetivo final de la investigación y las instalaciones en donde se realicen los ensayos ⁴¹⁻⁴⁷. Es importante mencionar que diferentes grupos de investigación ya han evaluado la actividad de productos naturales en el modelo murino ^{36,37}. En cuanto a la cepa, se han utilizado tanto los ratones C57Bl/6 como los BALB/c. Sin embargo, la cepa BALB/c presenta la ventaja de ser más susceptible a la infección por VHS y gracias a su pelaje (blanco) es más sencillo dar seguimiento visual al cuadro clínico ¹⁵¹.

Una vez seleccionado el hospedero, se establecieron dos variables para asegurar el establecimiento de la infección:

- a) Tratamiento hormonal: modifica la susceptibilidad y las respuestas inmunitarias a las infecciones del tracto genital. La administración de medroxiprogesterona a ratones incrementa de forma significativa la duración del diestro lo que provoca que los ratones sean 100 veces más susceptibles a contraer VHS-2 ¹⁵². Con base en lo anterior, se administraron 2 mg de medroxiprogesterona a los ratones 5 días antes de la inoculación del VHS-2 G.

b) Concentración del inoculo viral: a dosis muy bajas los inóculos actúan como vacunas e inducen inmunidad sin permitir que se desarrolle la infección ¹⁵³. Cuando las concentraciones del inoculo son menores a 1×10^3 UFP/10 μ L se debe realizar micro lesiones en la zona genital y vaginal para asegurar el establecimiento de la infección ⁴⁶. Se estableció una concentración del inoculo viral de VHS-2 G de 1.66×10^4 UFP/10 μ L, este valor es equiparable con los valores publicados en la literatura en modelos similares que van de 1×10^6 UFP/10 μ L a 5000 UFP/10 μ L ^{154,155}.

El establecimiento de la infección se confirmó con la inflamación y presencia de úlceras en la zona genital. Se empleó la escala descrita por Cardozo y colaboradores para puntuar la infección ¹¹⁷. Cabe mencionar que el comportamiento de los sujetos no se vio afectado a lo largo de ensayo y no se observaron diferencias significativas en el peso de los ratones durante el ensayo (ANOVA $p < 0.05$). Sin embargo, varios sujetos fueron retirados del estudio debido a que presentaron parálisis de las extremidades posteriores.

En la Figura 18 se puede apreciar una disminución de la diseminación y severidad de la infección viral en los grupos tratados con HG-ACV (38.46 mg/mL de ACV) y HG-NPPR (0.5 mg/mL de RZ). Después de 7 días de tratamiento con HG-ACV, la infección viral en los ratones estuvo resuelta por completo, incluso se observó la reaparición de pelo en las zonas que previamente presentaban alopecia. Cuando se aplicó el tratamiento con HG-NPPR, la infección estuvo resuelta casi por completo, sin embargo, las zonas

con alopecia no se habían recuperado por completo y en 2 ratones del grupo permanecía una ligera inflamación. Los grupos tratados con HG, HG-NPPBco y HG-RZL (0.79 µg/mL de RZ) presentaron una evolución de la enfermedad visualmente similar al grupo CTR+ que solo fue tratado con PBS.

La gráfica de puntuación de la infección presentada en la Figura 19 permite ver claramente la evolución de la infección viral. Todos los tratamientos iniciaron con una puntuación de 3 (inflamación grave de los genitales externos con pus/mucosidad y alopecia en la zona circundante) y después de 2 días, se observaron claramente dos comportamientos con base al tratamiento aplicado. En el primer comportamiento que involucra el tratamiento con HG-ACV y HG-NPPR los ratones mostraron una clara disminución en la puntuación de la infección a partir del día 4 de tratamiento. Mientras que en el segundo comportamiento que involucra al CTR+ y tratamientos con HG, HG-RLZ y HG-NPPBco la puntuación incrementó hasta 5 (aumento de la ulceración, enrojecimiento, hinchazón, parálisis de las extremidades posteriores o muerte) después de 7 días.

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA $p < 0.0008$) e indicó que existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados con base a la escala establecida ¹¹⁷. Por lo tanto, se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett para determinar la diferencia significativa entre la puntuación de los grupos de tratamientos aplicados, en comparación con el CTR+. En la Figura 20 se observa que los intervalos de confianza de la diferencia entre las medias de los tratamientos con HG-ACV y HG-NPPR no cruzan la vertical de efecto nulo

(0), es decir los tratamientos son significativamente diferentes al CTR+ ($p < 0.05$). Este comportamiento se podría atribuir al ACV y a la RZ presente en los hidrogeles aplicados y no a los excipientes empleados en las formulaciones.

Además, para establecer la diferencia significativa entre las puntuaciones de los tratamientos con HG-ACV y HG-NPPR, se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey que incluyó al CTR+. En la Figura 21 se observa que la media del tratamiento con HG-ACV y HG-NPPR cruzan la vertical del efecto nulo (0), por lo que se confirma que estos tratamientos no son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Esto significa que la actividad anti-herpética *in vivo* de la formulación de hidrogel con las nanopartículas cargadas con riolozatriona (HG-NPPR) no presenta diferencia significativa con la actividad del hidrogel con el aciclovir (HG-ACV).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo. Tamez Fernández demostró que un ungüento oftálmico con RZ (0.3% p/p) resolvió de forma equiparable al ACV (2.5% p/v) un cuadro de queratoconjuntivitis herpética en un modelo murino¹⁰⁶. Cabe mencionar que en este trabajo el HG-NPPR resolvió la infección por VHS-2 en un modelo murino a una concentración 76 veces menor que el ACV; por lo que podemos inferir que la encapsulación de la RZ permitió mejorar su actividad anti-herpética tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo*.

Una vez establecida la actividad anti-herpética es necesario evaluar su toxicidad. En general la evaluación de la toxicidad *in vivo* se divide en dos

categorías, una involucra cambios morfológicos (estructura del tejido, apoptosis e inflamación), mientras que la otra se enfoca en la fisiología mediante la evaluación de marcadores bioquímicos de daño en los diferentes sistemas ¹⁵⁶. En este trabajo se abordó la primera categoría, se analizó el aparato reproductor femenino, el hígado, los riñones y el bazo, luego de administrar los tratamientos durante 7 días a ratones BALB/c.

Los tratamientos administrados a los ratones no tuvieron efecto en la integridad de la mucosa vaginal, el epitelio vaginal permanece intacto y no hay evidencia de edema o de reclutamiento de células inflamatorias en la mucosa vaginal ni en la lámina propia (Figura 22). Al igual que en el órgano reproductor femenino, el hígado, riñones y bazo permanecieron intactos; después de la administración de los tratamientos no se observaron alteraciones histológicas, edemas o infiltración de leucocitos que pudieran indicar un efecto tóxico. Estos resultados sugieren que ninguna de las formulaciones desarrolladas en este trabajo ocasionan toxicidad después de 7 días de administración. Es necesario incrementar el número de sujetos, así como el tiempo de exposición para confirmar que las formulaciones no son tóxicas en administración crónica. También sería recomendable incluir el análisis de parámetros bioquímicos que brinden más información del estado del sujeto después de la administración de los tratamientos.

La formulación de NPPR desarrollada en este trabajo permitió la entrega de RZ para llevar a cabo su actividad anti-herpética tanto *in vitro* como *in vivo*. Debido a sus características fisicoquímicas y a la liberación controlada de RZ,

las NPPR mejoraron significativamente su actividad antiviral *in vitro*, en comparación con la RZL. A sí mismo, a una concentración 76 veces menor, el HG-NPPR resolvió la infección por VHS-2 en el modelo *in vivo* de forma equiparable al HG-ACV. Aunado a lo anterior no se encontró evidencia histológica que indique que la formulación HG-NPPR genere algún efecto toxico a corto plazo.

La formulación de NPPR desarrollada en este trabajo aporta evidencias para continuar con las evaluaciones de actividades biológicas de la RZ, mismas que se han visto limitadas por su baja solubilidad. Asimismo, estos resultados demuestran que la nanoencapsulación de la RZ podría mejorar el índice de selectividad de derivados de RZ.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una formulación de NPPR estable, con un tamaño de partícula adecuado, un IPD homogéneo y un potencial zeta idóneo para su administración vaginal.
- La encapsulación de RZ presentó menor citotoxicidad en comparación con la RZ libre.
- Las NPPR incrementaron hasta 3 veces el IS en la evaluación de la actividad anti-herpética *in vitro* en comparación con la RZ libre.
- La formulación HG-NPPR presentó una actividad anti-herpética *in vivo* comparable con el HG-ACV a una concentración 76 veces menor.
- La administración de la formulación HG-NPPR 0.5 mg/mL durante 7 días no ocasionó alteraciones histológicas en ninguno de los órganos evaluados.

PERSPECTIVAS

- Complementar la caracterización de las NPPR mediante técnicas de microscopia electrónica.
- Determinar el modelo cinético de liberación *in vitro* de la RZ a partir de HG-NPPR.
- Establecer el mecanismo de acción de la RZ contra la infección por VHS.
- Ampliar la caracterización fisicoquímica de las formulaciones de HG.
- Incrementar la n en el ensayo de evaluación de la citotoxicidad e incluir parámetros bioquímicos.
- Evaluar la actividad anti-herpética *in vivo* de las NPPR en un modelo de herpes cutánea en ratón.
- Evaluar la actividad anti-herpética de las NPPE.
- Encapsular los compuestos derivados de la RZ y evaluar su actividad anti-herpética.

REFERENCIAS

1. Zarrouk, K., Piret, J. & Boivin, G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res.* **234**, 177–192 (2017).
2. Kimberlin, D. W. & Prober, C. G. Introduction to Herpesviridae in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 1074-1075.e1 (Elsevier, 2023).
3. Riddell, A., Jeffery-Smith, A. & Tong, C. Herpesviruses. *Medicine (United Kingdom)*. **45**, 767–771 (2017).
4. McElwee, M., Vijayakrishnan, S., Rixon, F. & Bhella, D. Structure of the herpes simplex virus portal-vertex. *PLoS Biol.* **16**, e2006191 (2018).
5. Wang, J., *et al.* Structure of the herpes simplex virus type 2 C-capsid with capsid-vertex-specific component. *Nat. Commun.* **9**, 1–10 (2018).
6. Omarova, S., Cannon, A., Weiss, W., Bruccoleri, A. & Puccio, J. Genital Herpes Simplex Virus—An Updated Review. *Adv. Pediatr.* **69**, 149–162 (2022).
7. Das, D. & Hong, J. Herpesvirus Polymerase Inhibitors in *Viral Polymerases*. 333–356 (Elsevier, 2019).
8. das Neves, J., Nunes, R., Machado, A. and Sarmiento, B. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **92**, 53-70 (2015).
9. Vollmer, B. & Grunewald, K. Herpesvirus membrane fusion – a team effort. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **62**, 112–120 (2020).
10. Lobo, A., Agelidis, A. & Shukla, D. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation. *Ocul. Surf.* **17**, 40–49 (2019).
11. Pinninti, S. & Kimberlin, D. Neonatal herpes simplex virus infections. *Semin. Perinatol.* **42**, 168–175 (2018).
12. Schiffer, J. & Corey, L. Herpes Simplex Virus. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. **2**, 1713-1730.e6 (Elsevier Inc., 2014).
13. Looker, K., *et al.* Global and regional estimates of the contribution of herpes simplex virus type 2 infection to HIV incidence: a population attributable fraction analysis using published epidemiological data. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 240-249(2019).
14. Ouedraogo, H., *et al.* Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) and its association with HIV, HCV, HBV, HTLV-1&2 and syphilis among men who

- have sex with men in Burkina Faso. *Indian J. Med. Microbiol.* **42**, 59–64 (2023).
15. Protto, V., *et al.* Role of HSV-1 in Alzheimer's disease pathogenesis: A challenge for novel preventive/therapeutic strategies. *Curr. Opin. Pharmacol.* **63**, 102200 (2022).
 16. Nissen, J., *et al.* Herpes Simplex Virus Type 1 infection is associated with suicidal behavior and first registered psychiatric diagnosis in a healthy population. *Psychoneuroendocrinology.* **108**, 150–154 (2019).
 17. Cole, S. Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Nurs. Clin. N. Am.* **55**, 337–345 (2020).
 18. Kimberlin, D. & Prober, C. Herpes Simplex Virus in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 1056-1065.e3.(Elsevier Inc., 2018).
 19. Carmichael, J., *et al.* Glycoprotein D of HSV-1 is dependent on tegument protein UL16 for packaging and contains a motif that is differentially required for syncytia formation. *Virology.* **527**, 64–76 (2019).
 20. Marcocci, M., *et al.* Herpes Simplex Virus-1 in the Brain: The Dark Side of a Sneaky Infection. *Trends Microbiol.* **28**, 808–820 (2020).
 21. Chattopadhyay, S., *et al.* HSV Replication: Triggering and Repressing STING Functionality. *Viruses.* **15**, 226 (2023).
 22. Vargas Córdoba, M. Infecciones causadas por virus de la familia Herpesviridae in *Virología médica*. (Editorial El Manual Moderno Colombia, 2016).
 23. Antal, S., Ardelean, F., Chis, R., Ollivier, E. & Serban, M. Nanoscale Delivery Systems: Actual and Potential Applications in the Natural Products Industry. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 2414–2421 (2017).
 24. Grigalunas, M., Burhop, A., Christoforow, A. & Waldmann, H. Pseudo-natural products and natural product-inspired methods in chemical biology and drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **56**, 111-118 (2020).
 25. Bilia, A., *et al.* Nanocarriers: A Successful Tool to Increase Solubility, Stability and Optimise Bioefficacy of Natural Constituents. *Curr. Med. Chem.* **26**, 4631–4656 (2019).
 26. Newman, D. & Cragg, G. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **83**, 770–803 (2020).
 27. Wouk, J., *et al.* Sulfonated (1 → 6)-β- d -Glucan (Lasiodiplodan): A Promising Candidate against the Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Strain . *Biomacromolecules.* **23**, 4041-4052 (2022)
 28. Benzekri, R., *et al.* Anti HSV-2 activity of *Peganum harmala* (L.) and

- isolation of the active compound. *Microb. Pathog.* **114**, 291–298 (2018).
29. Zhou, H., *et al.* Anti-HSV-1 effect of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* via the TLR9-dependent anti-inflammatory pathway. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **23**, 370–376 (2020).
 30. Zhang, X., *et al.* Hipponorterpenes A and B, two new 14-noreudesmane-type sesquiterpenoids from the juice of *Hippophae rhamnoides*. *Phytochem. Lett.* **52**, 82–86 (2022).
 31. Mollel, J., *et al.* Anti-respiratory syncytial virus and anti-herpes simplex virus activity of six Tanzanian medicinal plants with extended studies of *Erythrina abyssinica* stem bark. *J. Ethnopharmacol.* **292**, 115204 (2022).
 32. Liu, P., *et al.* Ethanol extract from *Artemisia argyi* leaves inhibits HSV-1 infection by destroying the viral envelope. *Viol. J.* **20**, 1–15 (2023).
 33. Suantai, B., *et al.* Anthocyanins in Red Jasmine Rice (*Oryza sativa* L.) Extracts and Efficacy on Inhibition of Herpes Simplex Virus, Free Radicals and Cancer Cell. *Nutr.* **14**, 1905 (2022).
 34. Solís, G. Y. Correlación de la actividad biológica con el perfil metabólico de *Jatropha dioica*. México; Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de Maestría, 2019.
 35. Toujani, M., *et al.* Inhibition of HSV-2 infection by pure compounds from *Thymus capitatus* extract *in vitro*. *Phyther. Res.* **32**, 1555–1563 (2018).
 36. Benassi-Zanqueta, E., *et al.* Evaluation of anti-HSV-1 activity and toxicity of hydroethanolic extract of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip. (Asteraceae). *Phytomedicine.* **55**, 249–254 (2019).
 37. Churqui, M., *et al.* Extracts of *Equisetum giganteum* L and *Copaifera reticulate* Ducke show strong antiviral activity against the sexually transmitted pathogen herpes simplex virus type 2. *J. Ethnopharmacol.* **210**, 192–197 (2018).
 38. Cos, P., Vlietinck, A., Berghe, D. & Maes, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* ‘proof-of-concept’. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 290–302 (2006).
 39. Valdés, S. Los modelos animales en la evaluación preclínica de los antivirales contra los virus del herpes simple. *Salud Anim.* **31**, 86–92 (2009).
 40. McGregor, A., Choi, K., Schachtele, S. & Lokensgard, J. Human Herpesviruses and Animal Models. in *Animal Models for the Study of Human Disease*. 905–925 (Elsevier Inc., 2013).
 41. Stoyanova, A., *et al.* Effect of castalagin against HSV-1 infection in newborn mice. *Nat. Prod. Res.* Ahead of print. PMID: 36714926 (2023).
 42. Chapellier, B., *et al.* Meganuclease targeting HSV-1 protects against

- herpetic keratitis: Application to corneal transplants. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. **30**, 511–521 (2022).
43. Li, M., *et al.* Antiviral activity of arbidol hydrochloride against herpes simplex virus I *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **51**, 98–106 (2018).
 44. Schmitz, Y., *et al.* Superior antiviral activity of IFN β in genital HSV-1 infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 1520 (2022).
 45. Bernstein, D., *et al.* Intranasal nanoemulsion-adjuvanted HSV-2 subunit vaccine is effective as a prophylactic and therapeutic vaccine using the guinea pig model of genital herpes. *Vaccine*. **37**, 6470–6477 (2019).
 46. Zhang, X., *et al.* A potential anti-HIV-1 compound, Q308, inhibits HSV-2 infection and replication *in vitro* and *in vivo*. *Biomed. Pharmacother.* **162**, 114595 (2023).
 47. Bernstein, D., *et al.* N-Methanocarbothymidine is more effective than acyclovir for treating neonatal herpes simplex virus infection in guinea pigs. *Antiviral Res.* **92**, 386–388 (2011).
 48. Rizvi, S. & Saleh, A. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm. J.* **26**, 64–70 (2018).
 49. Kulshreshtha, N., *et al.* Nanostructures as Antimicrobial Therapeutics. in *Antimicrobial Nanoarchitectonics: From Synthesis to Applications*. 29–59 (Elsevier Inc., 2017).
 50. Flühmann, B., Ntai, I., Borchard, G., Simoens, S. & Mühlebach, S. Nanomedicines: The magic bullets reaching their target? *Eur. J. Pharm. Sci.* **128**, 73–80 (2019).
 51. Nocca, G., *et al.* Controlled release of 18- β -glycyrrhetic acid from core-shell nanoparticles: Effects on cytotoxicity and intracellular concentration in hepg2 cell line. *Materials (Basel)*. **14**, 3893 (2021).
 52. Sharma, S., *et al.* Role of Rutin Nanoemulsion in Ameliorating Oxidative Stress: Pharmacokinetic and Pharmacodynamics Studies. *Chem. Phys. Lipids*. **228**, 104890 (2020).
 53. Zhang, L., Yang, S., Wong, L., Xie, H. & Ho, P. *In vitro* and *in vivo* comparison of curcumin-encapsulated chitosan-coated poly (lactic- co-glycolic acid) nanoparticles and curcumin/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin inclusion complexes administered intranasally as therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol. Pharm.* **17**, 4256–4269 (2020).
 54. Dilnawaz, F., Acharya, S. & Sahoo, S. Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics. *Int. J. Pharm.* **538**, 263–278 (2018).
 55. Carvalho, S., *et al.* Advances and challenges in nanocarriers and nanomedicines for veterinary application. *Int. J. Pharm.* **580**, 119214

- (2020).
56. Yousefi, M., Narmani, A. & Jafari, S. Dendrimers as efficient nanocarriers for the protection and delivery of bioactive phytochemicals. *Adv. Colloid Interface Sci.* **278**, 102125 (2020).
 57. Martins, J., *et al.* The solid progress of nanomedicine. *Drug Deliv. Transl. Res.* **10**, 726–729 (2020).
 58. Patra, J., *et al.* Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology.* **16**, 1–33 (2018).
 59. Bilia, A., *et al.* Improving on Nature: The Role of Nanomedicine in the Development of Clinical Natural Drugs. *Planta Med.* **83**, 366–381 (2017).
 60. Cai, X., *et al.* Molecular Mechanisms, Characterization Methods, and Utilities of Nanoparticle Biotransformation in Nanosafety Assessments. *Small.* **1907663**, 1–19 (2020).
 61. Yadav, N., Parveen, S. & Banerjee, M. Potential of nano-phytochemicals in cervical cancer therapy. *Clin. Chim. Acta.* **505**, 60–72 (2020).
 62. Feng, Y., Kilker, S. & Lee, Y. Surface charge (zeta-potential) of nanoencapsulated food ingredients. in *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients*. 213–241 (Elsevier, 2020).
 63. Nascimento, K., *et al.* Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and antiproliferative effects of Tucumã oil nanocapsules in breast adenocarcinoma cells (MCF-7). *Nat. Prod. Res.* **35**, 2060-2065 (2019).
 64. Pires, J., *et al.* Healing of dermal wounds property of Caryocar brasiliense oil loaded polymeric lipid-core nanocapsules: formulation and *in vivo* evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **150**, 105356 (2020).
 65. Kamble, S., *et al.* Revisiting Zeta Potential, the Key Feature of Interfacial Phenomena, with Applications and Recent Advancements. *ChemistrySelect.* **7**, e202103084 (2022).
 66. Huang, Y., Cambre, M. & Lee, H. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, ID 2702(2017).
 67. Wen, J., *et al.* Construction of a biodegradable, versatile nanocarrier for optional combination cancer therapy. *Acta Biomater.* **83**, 359–371 (2019).
 68. Trenfield, S. & Basit, A. Modified drug release: Current strategies and novel technologies for oral drug delivery in *Nanotechnology for Oral Drug Delivery*. 177–197 (Elsevier, 2020).
 69. Almeida, K., *et al.* PLGA nanoparticles optimized by Box-Behnken for efficient encapsulation of therapeutic *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids Surf.* **181**, 935–942 (2019).

70. García-Manrique, P., *et al.* Effect of drug molecular weight on niosomes size and encapsulation efficiency. *Colloids Surf.* **186**, 110711 (2020).
71. Pulingam, T., Foroozandeh, P., Chuah J., and Sudesh K. Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles, *Nanomater.* **12**, 576, (2022).
72. Tai, K., Rappolt, M., Mao, L., Gao, Y. & Yuan, F. Stability and release performance of curcumin-loaded liposomes with varying content of hydrogenated phospholipids. *Food Chem.* **326**, 126973 (2020).
73. Alavi, M. & Nokhodchi, A. Micro- and nanoformulations of paclitaxel based on micelles, liposomes, cubosomes, and lipid nanoparticles: Recent advances and challenges. *Drug Discov. Today.* **27**, 576–584 (2022).
74. Chaijan, M., Srirattanachot, K., Nisoa, M., Cheong, L. & Panpipat, W. Role of antioxidants on physicochemical properties and *in vitro* bioaccessibility of β -carotene loaded nanoemulsion under thermal and cold plasma discharge accelerated tests. *Food Chem.* 128157 (2020)
75. Pereira, C., *et al.* Nanoemulsions Based on Sunflower and Rosehip Oils: The Impact of Natural and Synthetic Stabilizers on Skin Penetration and an *ex vivo* Wound Healing Model. *Pharmaceutics.* **15**, 999 (2023).
76. Tang, C., Chen, H. & Dong, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Food-Grade Nanovehicles for Hydrophobic Nutraceuticals or Bioactives. *Appl. Sci.* **13**, 1726 (2023).
77. Mohammed, R., *et al.* Solid lipid nanoparticles for targeted natural and synthetic drugs delivery in high-incidence cancers, and other diseases: Roles of preparation methods, lipid composition, transitional stability, and release profiles in nanocarriers' development, *Nanotechnol. Rev.* **12** (2023).
78. Houacine, C., Adams, D. & Singh, K. Impact of liquid lipid on development and stability of trimyristin nanostructured lipid carriers for oral delivery of resveratrol. *J. Mol. Liq.* **316**, 113734 (2020).
79. Jangid, A., *et al.* Designing of fatty acid-surfactant conjugate based nanomicelles of morin hydrate for simultaneously enhancing anticancer activity and oral bioavailability. *Colloids Surf.* **175**, 202–211 (2019).
80. Ferreira, D., Domingues, S., Viana, D. & Tebaldi, M. Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. *Biomed. Pharmacother.* **131**, 110695 (2020).
81. Narisepalli, S., Salunkhe, S., Chitkara, D. & Mittal, A. Asiaticoside polymeric nanoparticles for effective diabetic wound healing through increased collagen biosynthesis: *In-vitro* and *in-vivo* evaluation. *Int. J. Pharm.* **631**, 122508 (2023).

82. Elmowafy, M., *et al.* Polymeric Nanoparticles for Delivery of Natural Bioactive Agents: Recent Advances and Challenges. *Polymers (Basel)*. **15**, (2023).
83. Caldas dos Santos, T., *et al.* *In vitro* antiherpes effect of C-glycosyl flavonoid enriched fraction of *Cecropia glaziovii* encapsulated in PLGA nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C*. **75**, 1214–1220 (2017).
84. Saha, S., Kundu, J., Verma, R. & Chowdhury, P. Albumin coated polymer nanoparticles loaded with plant extract derived quercetin for modulation of inflammation. *Materialia*. **9**, 100605 (2020).
85. Li, J., *et al.* Trimethyl chitosan nanoparticles for ocular baicalein delivery: Preparation, optimization, *in vitro* evaluation, *in vivo* pharmacokinetic study and molecular dynamics simulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **156**, 749–761 (2020).
86. Karolewicz, B. A review of polymers as multifunctional excipients in drug dosage form technology. *Saudi Pharm. J.* **24**, 525–536 (2016).
87. Almoustafa, H., Alshawsh, M. & Chik, Z. Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method. *Int. J. Pharm.* **533**, 275–284 (2017).
88. Urrejola, M., *et al.* Polymeric nanoparticle systems: Structure, elaboration methods, characteristics, properties, biofunctionalization and self-assembly layer by layer technologies. *Int. J. Morphol.* **36**, 1463–1471 (2018).
89. Smoleński, M., Karolewicz, B., Gołkowska, A., Nartowski, K. & Małolepsza-Jarmołowska, K. Emulsion-Based Multicompartment Vaginal Drug Carriers: From Nanoemulsions to Nanoemulgels. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6455 (2021).
90. Osmalek, T., *et al.* Recent Advances in Polymer-Based Vaginal Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. **13**, 884 (2021).
91. Zhang, Y., *et al.* pH-Responsive Mucus-Penetrating Nanoparticles for Enhanced Cellular Internalization by Local Administration in Vaginal Tissue. *ACS Macro Lett.* **12**, 446–453 (2023).
92. Dedeloudi, A., Siamidi, A., Pavlou, P. & Vlachou, M. Recent Advances in the Excipients Used in Modified Release Vaginal Formulations. *Mater.* **15**, 327 (2022).
93. Carvalho, G., *et al.* Highlights in poloxamer-based drug delivery systems as strategy at local application for vaginal infections. *Int. J. Pharm.* **602**, 120635 (2021).
94. Vanić, Ž., Jøraholmen, M. & Škalko-Basnet, N. Nanomedicines for the topical treatment of vulvovaginal infections: Addressing the challenges of antimicrobial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **178**, 113855 (2021).

95. Melo, C., *et al.* Amphotericin B-loaded Eudragit RL100 nanoparticles coated with hyaluronic acid for the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Carbohydr. Polym.* **230**, 115608 (2020).
96. Araujo-Espino, D., *et al.* Genotoxic and cytotoxic evaluation of *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. by the micronucleus test in mouse peripheral blood. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **86**, 260–264 (2017).
97. Fresnedo-Ramírez, J. & Orozco-Ramírez, Q. Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. *Genet. Resour. Crop Evol.* **60**, 1087–1104 (2013).
98. Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7483>. Accesado el 24 de septiembre del 2019.
99. Gutiérrez-Tlahque, J., *et al.* Effect of climate conditions on total phenolic content and antioxidant activity of *Jatropha dioica* Cerv. var. *dioica*. *Cienc. Investig. Agrar.* **45**, 70–81 (2018).
100. Dominguez, X. A. *et al.* Riolozatrione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. *Sessiliflora*. *Phytochemistry* **19**, 2478 (1980).
101. Treviño, L., Torres, I., Cárdenas, B. & Vallarta, M. Análisis de susceptibilidad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos aislados de pacientes con periodontitis, al extracto etanólico del tallo de *Jatropha dioica*. *Rev. salud publica y bucal*. Edición Es, 4–6 (2006).
102. Silva-Belmares, Y., Rivas-Morales, C., Viveros-Valdez, E., de la Cruz-Galicia, M. G. & Carranza-Rosales, P. Antimicrobial and cytotoxic activities from *Jatropha dioica* roots. *Pakistan J. Biol. Sci.* **17**, 748–50 (2014).
103. Alanís-Garza, B., González-González, G., Salazar-Aranda, R., Waksman de Torres, N. & Rivas-Galindo, V. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *J. Ethnopharmacol.* **114**, 468–471 (2007).
104. Silva-Mares, D. *et al.* Plants from Northeast Mexico with Anti-HSV Activity. *Nat. Prod. Commun.* **8**, 297-298 (2013).
105. Ferrel Hernández, D. Estudio *in vitro* de la actividad antiviral de riolozatriona en la vía de infección por VHS-1. México; Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis Maestría, 2018.
106. Támez Fernández, J. Desarrollo de una formulación tópica de riolozatriona y evaluación de su actividad *in vivo* contra VHS-1. México; Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis Maestría, 2017.
107. Castro-Ríos, R., *et al.* HPLC Method Validation for *Jatropha dioica* Extracts Analysis. *J. Chromatogr. Sci.* **58**, 445–453 (2020).

108. Salas-Cedillo, H. I. Desarrollo de un potencial insecticida nanoparticulado de *Schinus molle* para el control de *Aedes aegypti*. México; Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis Maestría, 2016.
109. Rocha A. G. Factibilidad de las nanoparticulas polimericas para remover un colorante contaminante persistente en agua. México; Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de Licenciatura, 2021.
110. Silva P. G. Desarrollo y evaluación dermatocinética de nanopartículas con aceites esenciales para su aplicación en piel. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de Doctorado, 2019.
111. United States Pharmacopeia, <467> Residual Solvents, Residual Solvents-Verification of Compendial Procedures and Validation of Alternative Procedures, December 2020; https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/gc-467-residual-solvents-ira-20190927.pdf; last access date April 7, 2023.
112. González-Moreno, B. J. Cubierta biopolimérica de nanoingredientes a base de *Thymus vulgaris* con potencial aplicación en productos hortofrutícolas. México; Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis Maestría, 2020.
113. Weng, J., Tong, H. & Chow, S. *In Vitro* Release Study of the Polymeric Drug Nanoparticles: Development and Validation of a Novel Method. *Pharm.* **12**, 732 (2020).
114. Comisión de control analítico y Ampliación de Cobertura, C. *Criterios para la verificación de métodos fisicoquímicos farmacopeicos*. (2017).
115. Silva-Mares, D. *et al.* Screening of north-east Mexico medicinal plants with activities against herpes simplex virus and human cancer cell line. *Nat. Prod. Res.* **6419**, 1–4 (2018).
116. Argenta, D., Bernardo, B., Chamorro, A., Matos, P. & Caon, T. Thermosensitive hydrogels for vaginal delivery of secnidazole as an approach to overcome the systemic side-effects of oral preparations. *Eur. J. Pharm. Sci.* **159**, 105722 (2021).
117. Cardozo, F., *et al.* *In Vivo* Anti-Herpes Simplex Virus Activity of a Sulfated Derivative of *Agaricus brasiliensis* Mycelial Polysaccharide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2541-2549 (2013)
118. Navarro, J., Ramírez, R. & Villagrán, C. *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*. samsara (Samsara, 2012).
119. Lin, H., *et al.* *Andrographis paniculata* diterpenoids and ethanolic extract inhibit TNF α -induced ICAM-1 expression in EA.hy926 cells. *Phytomedicine.* **52**, 157–167 (2019).
120. Huang, Y., Cambre, M. & Lee, H. The Toxicity of Nanoparticles Depends

- on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, ID 2702(2017).
121. Wen, J., *et al.* Construction of a biodegradable, versatile nanocarrier for optional combination cancer therapy. *Acta Biomater.* **83**, 359–371 (2019).
 122. Dos Santos, J., da Silva, G., Velho, M. & Beck, R. Eudragit®: A Versatile Family of Polymers for Hot Melt Extrusion and 3D Printing Processes in Pharmaceuticals. *Pharmaceutics.* **13**, 1424 (2021).
 123. Ren, T., *et al.* Piperine-loaded nanoparticles with enhanced dissolution and oral bioavailability for epilepsy control. *Eur. J. Pharm. Sci.* **137**, 104988 (2019).
 124. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **55**, R1–R4 (1989).
 125. Zhang, M., *et al.* Preparation of Black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil nanoparticles and its antitumor activity on triple negative breast cancer *in vitro*. *J. Food Biochem.* **46**, e14406 (2022).
 126. Farias, L., *et al.* Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, PCL-Pluronic versus Eudragit®E100-Pluronic. *J. Apic. Res.* **57**, 255–270 (2018).
 127. Alves, J., *et al.* *In Vivo* Antidepressant Effect of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* into Cationic Nanoparticles: Improving Bioactivity and Safety. *Pharmaceutics.* **12**, 383 (2020).
 128. Elmowafy, M. *et al.* Hybrid polylactic acid/Eudragit L100 nanoparticles: A promising system for enhancement of bioavailability and pharmacodynamic efficacy of luteolin. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **65**, 102727 (2021).
 129. Piacentini, E., Russo, B., Bazzarelli, F. & Giorno, L. Membrane nanoprecipitation: From basics to technology development. *J. Memb. Sci.* **654**, 120564 (2022).
 130. Yadav, N., Parveen, S. & Banerjee, M. Potential of nano-phytochemicals in cervical cancer therapy. *Clin.Chim. Acta.* **505**, 60–72 (2020).
 131. Sadeghi, R., Etemad, S., Keshavarzi, E. & Haghshenasfard, M. Investigation of alumina nanofluid stability by UV–vis spectrum. *Microfluid. Nanofluidics.* **18**, 1023–1030 (2015).
 132. Solís-Cruz, G., *et al.* Nanocarriers as Administration Systems of Natural Products. *Curr. Top. Med. Chem.* **21**, 2365–2373 (2021).
 133. Rivero-Segura, N. & Gomez-Verjan, J. *In Silico* Screening of Natural Products Isolated from Mexican Herbal Medicines against COVID-19. *Biomolecules.* **11**, 1–12 (2021).

134. Bashir, K., *et al.* Design and Evaluation of pH-Sensitive Nanoformulation of Bergenin Isolated from *Bergenia ciliata*. *Polym.* **14**, 1639 (2022).
135. Beck-Broichsitter, M., Rytting, E., Lehardt, T., Wang, X. & Kissel, T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. *Eur. J. Pharm. Sci.* **41**, 244–253 (2010).
136. Yadavalli, T. *et al.* Pharmaceutically Acceptable Carboxylic Acid-Terminated Polymers Show Activity and Selectivity against HSV-1 and HSV-2 and Synergy with Antiviral Drugs. *ACS Infect. Dis.* **6**, 2926–2937 (2020).
137. Han, L., Fu, Y., Cole, A., Liu, J. & Wang, J. Co-encapsulation and sustained-release of four components in ginkgo terpenes from injectable PELGE nanoparticles. *Fitoterapia.* **83**, 721–731 (2012).
138. Dikpati, A., *et al.* Residual Solvents in Nanomedicine and Lipid-Based Drug Delivery Systems: a Case Study to Better Understand Processes. *Pharm. Res.* **37**, 149 (2020).
139. Yu, C., *et al.* Targeted delivery of sodium metabisulfite (SMBS) by pH-sensitive Eudragit L100-55 nanofibrous mats fabricated through advanced coaxial electrospinning. *J. Mater. Sci.* **57**, 3375–3395 (2022).
140. Melchor-Martínez, E. M. *et al.* Stereochemistry of a Second Riolozone and Other Diterpenoids from *Jatropha dioica*. *J. Nat. Prod.* **80**, 2252–2262 (2017).
141. dos Santos, A. M. *et al.* Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. *Int. J. Pharm.* **590**, 119867 (2020).
142. Löwhagen, G., Bonde, E., Forsgren-brusk, U., Runeman, B. & Tunbäck, P. The microenvironment of vulvar skin in women with symptomatic and asymptomatic herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infection. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **20**, 1086–1089 (2006).
143. Yu, C. *et al.* Targeted delivery of sodium metabisulfite (SMBS) by pH-sensitive Eudragit L100-55 nanofibrous mats fabricated through advanced coaxial electrospinning, *J. Mater. Sci.* **57**, 3375–3395 (2022).
144. Madawi, E., *et al.* Polymeric Nanoparticles as Tunable Nanocarriers for Targeted Delivery of Drugs to Skin Tissues for Treatment of Topical Skin Diseases. *Pharmaceutics.* **15**, 657 (2023).
145. Debruyne, A., Okkelman, I., & Dmitriev, R. Balance between the cell viability and death in 3D. *Semin. Cell Dev. Biol.* **144**, 55–66 (2023).
146. Trybala, E., Liljeqvist, J., Svennerholm, B. & Bergström, T. Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Differ in Their Interaction with Heparan Sulfate. *J. Virol.* **74**, 9106–9114 (2000).

147. Estrada Chavarria, Y. D. Obtención de derivados de riolozatriona y evaluación de su actividad antiherpética *in vitro*. México; Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de Maestría, 2016.
148. Diaz-Salmeron R., *et al.* Mucoadhesive Poloxamer-Based Hydrogels for the Release of HP- β -CD-Complexed Dexamethasone in the Treatment of Buccal Diseases. *Pharmaceutics*. **13**, 117 (2021).
149. Chen, W., *et al.* The degradation of poloxamer 188 in buffered formulation conditions. *AAPS Open*. **8**, 5 (2022).
150. Araujo, V., *et al.* Chitosan-based systems aimed at local application for vaginal infections, *Carbohydr. Polym.* **261**, 117919 (2021).
151. Mancini, M. & Vidal. S. Insights into the pathogenesis of herpes simplex encephalitis from mouse models, *Mamm. Genome*. **29**, 425–445 (2018).
152. Kaushic, C., Ashkar, A., Reid, L., and Rosenthal, K. Progesterone Increases Susceptibility and Decreases Immune Responses to Genital Herpes Infection. *J. Virol.* **77**, 4558–4565 (2003).
153. Handel, A., Li, Y., McKay, B., Pawelek, K., Zarnitsyna, V. & Antia, R. Exploring the impact of inoculum dose on host immunity and morbidity to inform model-based vaccine design. *PLOS Comput. Biol.* **14**, e1006505 (2018).
154. Agelidis, A., *et al.* An intra-vaginal zinc oxide tetrapod nanoparticles (zoten) and genital herpesvirus cocktail can provide a novel platform for live virus vaccine. *Front. Immunol.* **10**, 500 (2019).
155. Hopkins J., *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* Activity, Tolerability, and Mechanism of Action of BX795 as an Antiviral against Herpes Simplex Virus 2 Genital Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, 9 (2020).
156. Yang, Y., *et al.* Toxicity assessment of nanoparticles in various systems and organs. *Nanotechnol. Rev.* **6**, 279–289 (2017).

ANEXOS

ANEXO A

A1-Barrido UV-Vis de RZ

La Figura A1 muestra el barrido de UV-Vis de una solución de 20 $\mu\text{g/mL}$ de RZ en el medio de disolución (propilenglicol, amortiguador y agua en proporción 1:3:5 respectivamente). La longitud de onda máxima de absorción de la RZ en el medio de disolución fue de 245 nm.

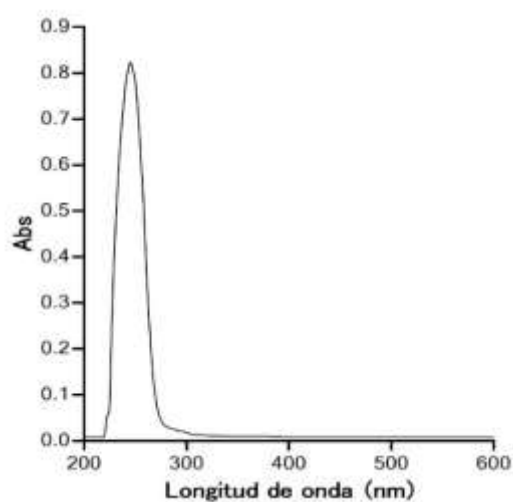
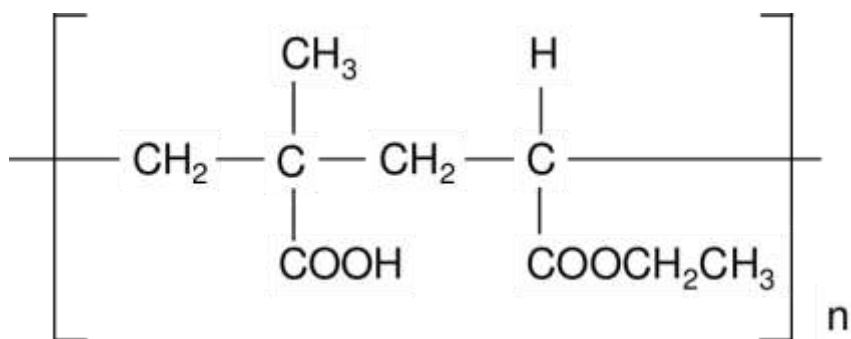


Figura A1. Barrido de UV-Vis de RZ en el medio de disolución

ANEXO B

B-1 Eudragit® L100-55

- Estructura:



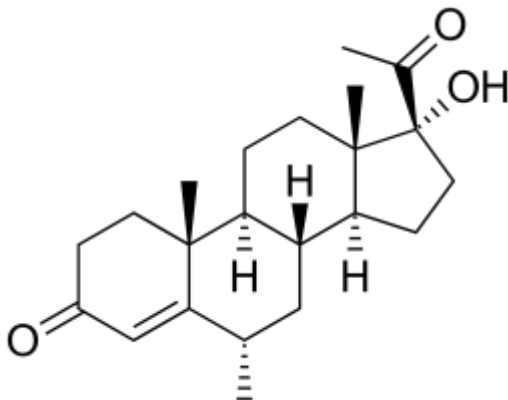
- Nombre IUPAC: Copolímero ácido metacrílico-etil acrilato (1:1)
- Nombre común: Eudragit® L100-55
- CAS: 25212-88-8
- Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o Valor
Formula Molecular	---
Peso Molecular	320,000 g/mol
Estado	Polvo
Color	Blanco
Densidad Relativa	0.821-0.841 g/cm ³
Solubilidad	Disolventes orgánicos

- Aplicaciones: Industria Alimenticia y Farmacéutica.
- Marca y lote empleado: Evonik, Lote No. B190304209

B-2 Medroxiprogesterona

- Estructura:



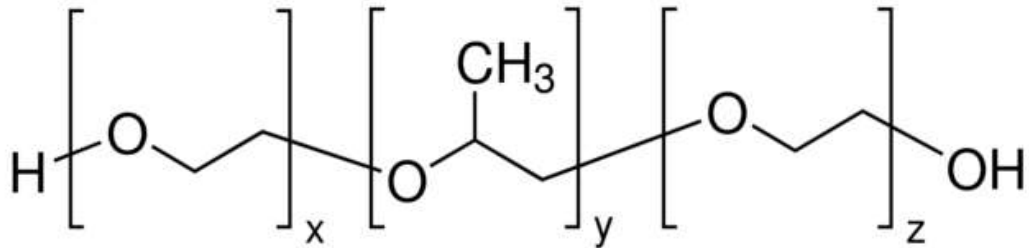
- Nombre químico: (6 alfa)-17-hidroxi-6-metilpregn-4-eno-3,20-diona
- Nombre común: Medroxiprogesterona
- CAS: 520-85-4
- Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o Valor
Formula Molecular	C ₂₂ H ₃₂ O ₃
Peso Molecular	344.5 g/mol
Estado	Líquido
Color	Blanquecino
Densidad Relativa	----
Solubilidad	Disolventes orgánicos

- Aplicaciones: Industria farmacéutica (anticonceptivo).
- Marca y lote empleado: Depo-provera, Lote No. FF1971

B-3 Poloxámero 188

- Estructura:



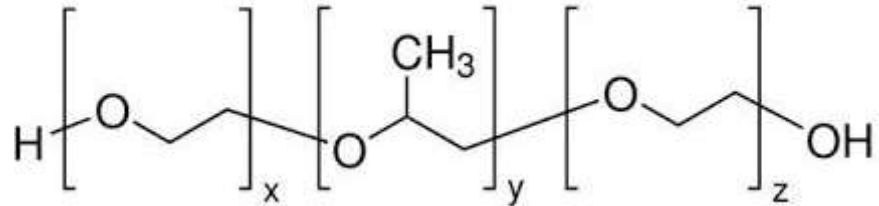
- Nombre químico: 2-metiloxirano; oxirano
- Nombre común: Poloxámero 188, Pluronic F68, Lutrol F68
- CAS: 691397-13-4
- Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o Valor
Formula Molecular	$(C_3H_6O \cdot C_2H_4O)_x$
Peso Molecular	8400 Daltons
Estado	Polvo
Color	Blanco
Densidad Relativa	1.06 g/cm ³
Solubilidad	Agua

- Aplicaciones: Industria cosmética y farmacéutica.
- Marca y lote empleado: BASF, Lote No. W028363

B-4 Poloxámero 407

- Estructura:



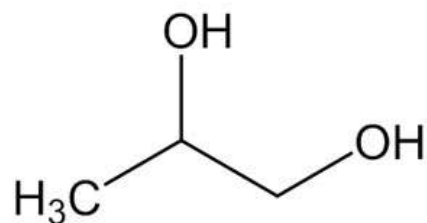
- Nombre químico: Oxirano, metil- polímero con oxirano
- Nombre común: Poloxámero 407, Pluronic F-127
- CAS: 9003-11-6
- Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o Valor
Formula Molecular	$C_2H_6O_2(C_3H_6O)_n(C_2H_4O)_n(C_2H_4O)_n$
Peso Molecular	12.600 g/mol
Estado	Polvo
Color	Blanco
Densidad Relativa	1.06 g/cm ³
Solubilidad	Agua

- Aplicaciones: Industria cosmética y farmacéutica.
- Marca y lote empleado: Sigma, Lote No. BCCC7417

B-5 Propilenglicol

- Estructura:



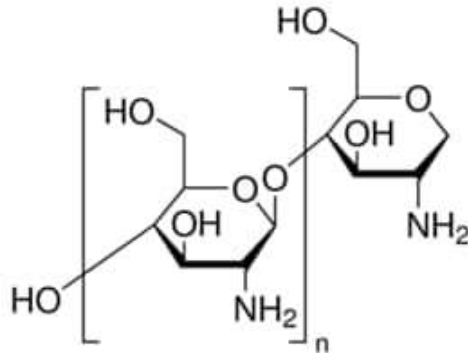
- Nombre químico: Propano-1,2-diol
- Nombre común: Propilen glicol, 1,2-propanodiol
- CAS: 57-55-6
- Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o Valor
Formula Molecular	C ₃ H ₈ O ₂ (CH ₃ CHOHCH ₂ OH)
Peso Molecular	76.09 g/mol
Estado	Liquido
Color	Incoloro
Densidad Relativa	1.0361 g/cm ³
Punto de ebullición	187.6°C
Coefficiente de partición	-0.92
Solubilidad	Agua, Etanol, Acetona

- Aplicaciones: Industria Alimenticia y Farmacéutica.
- Marca y lote empleado: BASF, Lote No. W028363

B-6 Quitosano de alto peso molecular

- Estructura:



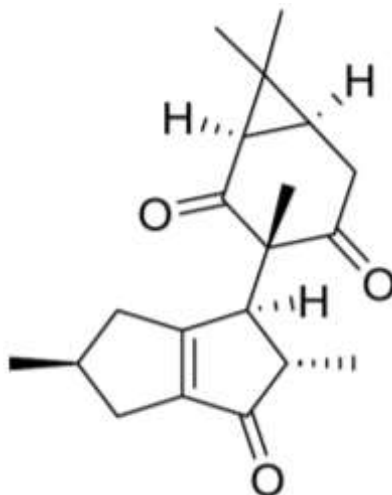
- Nombre químico: Quitina desacetilada, poli(D-glucosamina)
- Nombre común: Quitosano, poliglosa, desacetilquitina
- CAS: 9012-76-4
- Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o Valor
Formula Molecular	C ₅₆ H ₁₀₃ N ₉ O ₃₉
Peso Molecular	310000-375000 Da
Estado	Polvo
Color	Amarillento
Densidad Relativa	0.20- 0.38 g/cm ³
Solubilidad	Agua a pH ácido

- Aplicaciones: Industria Alimenticia y Farmacéutica.
- Marca y lote empleado: Sigma, Lote No. BCCH4876

B-7 Riolozatriona

- Estructura:



- Nombre químico: (1R ,3S ,6S)-3-[(1S ,2S ,5S)-2,5-dimetil-3-oxo-2,4,5,6-tetrahydro-1 H -pentaleno- 1-il]-3,7,7-trimetilbiciclo[4.1.0]heptano-2,4-diona.
- Nombre común: Riolozatriona
- CAS: 77820-41-8
- Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o Valor
Formula Molecular	C ₂₀ H ₂₆ O ₃
Peso Molecular	314.4 g/mol
Estado	Polvo
Color	Blanquecino
Densidad Relativa	----
Solubilidad	Disolventes medianamente polares