

17. Ciencia, Tecnología, e Innovación

Síntesis de nuevas formulaciones para la vehiculización de la curcumina como estrategia antiviral para el tratamiento de las infecciones causadas por el virus Zika

Pacho, María Natalia; D'Accorso, Norma B.; Damonte, Elsa; García, Cybele

natalia_pacho@hotmail.com; natalia_pacho@go.fcen.uba.ar

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Resumen

El poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA) es un copolímero de gran interés para aplicaciones medicinales, debido a que es bioreabsorbible, biocompatible, no tóxico, y su cinética de degradación puede modificarse por la relación de copolimerización de los monómeros. En este estudio, se sintetizó PLGA por apertura de los anillos de los dímeros cíclicos de los monómeros D,L-láctido y glicólido en presencia de octoato estannoso como iniciador y alcohol laurílico como co-iniciador. El PLGA fue caracterizado por técnicas espectroscópicas y térmicas, resultando una relación equimolecular para ambos monómeros, con una temperatura de transición vítrea de aproximadamente 35°C, características que lo hacen apropiado para liberación controlada de medicamentos. Por otro lado, la curcumina es una sustancia de origen natural de gran interés biológico, que inhibe la actividad de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) enzima blanco para el descubrimiento de drogas antivirales, en especial las causadas por el flavivirus Zika (ZIKV). Teniendo en cuenta la dificultad en la administración de la curcumina como fármaco, se sintetizaron micropartículas de PLGA que encapsulen dicha sustancia, las cuales fueron caracterizadas y se evaluó su efectividad en el tratamiento del ZIKV mediante diferentes ensayos biológicos.

Palabras clave: PLGA, micropartículas, curcumina, ZIKV, IMPDH.

Introducción

La cúrcuma (el nombre común de *Curcuma Longa*) es una especia india que pertenece a la familia del jengibre. Además del uso como especia, conservante de alimentos y agente colorante, la cúrcuma se ha utilizado

tradicionalmente en la medicina ayurvédica para el tratamiento de diversas dolencias como artritis, úlceras, ictericia, heridas, fiebre, traumatismos y enfermedades de la piel como la psoriasis. La curcumina (*Figura 1*), un polifenol hidrofóbico, es un constituyente activo

principal de la cúrcuma. Además de la curcumina, la cúrcuma también contiene otros constituyentes llamados curcuminoides, como la demetoxicurcumina, la bisdemetoxicurcumina y la ciclocurcumina.

Las preparaciones comerciales disponibles de "curcumina" contienen aproximadamente 77% de curcumina, 17% de demetoxicurcumina y 3% de bisdemetoxicurcumina. Si bien todas presentan actividad biológica, varios estudios han demostrado que la curcumina es más activa que la demetoxicurcumina o bisdemetoxicurcumina (Figura 1).

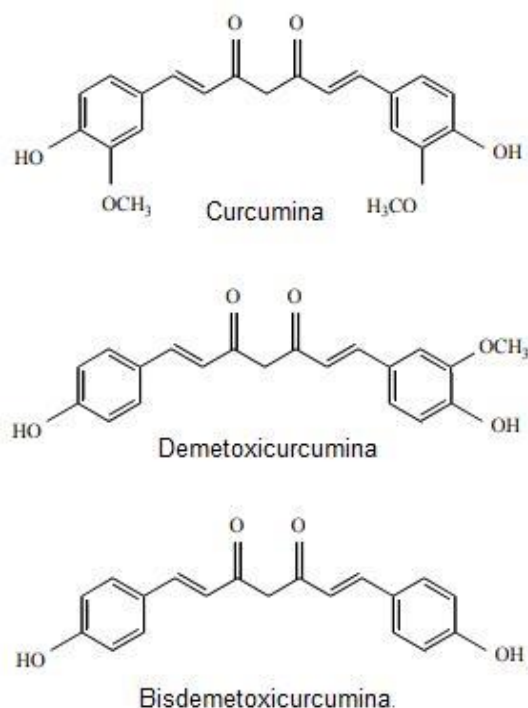


Figura 1. Estructura de los componentes activos presentes en la cúrcuma.

Químicamente, la curcumina es una β -dicetona bis- α,β -insaturada, denominada (E, E) -1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5 diona y comúnmente

llamada diferuloilmetano, que exhibe tautomería ceto-enólica: tiene una forma ceto predominante en soluciones ácidas y neutras, y forma enólica estable en medio alcalino.

El primer estudio sobre el uso de curcumina en enfermedades humanas fue publicado a principio del siglo pasado, y durante los últimos 60 años, más de 3000 estudios han demostrado que la curcumina tiene efectos antioxidantes, antibacterianos, antimicóticos, antivirales, antiinflamatorios, antiproliferativos, proapoptóticos y antiateroscleróticos, que ejercen beneficios medicinales contra enfermedades neurodegenerativas, artritis, alergia, intestino inflamatorio enfermedad, nefrotoxicidad, SIDA, psoriasis, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad cardiovascular y fibrosis pulmonar. Estos efectos de la curcumina han atraído considerable interés de los investigadores para descubrir sus múltiples objetivos celulares y los mecanismos moleculares que subyacen a estas propiedades biológicas. La evidencia indica que los efectos pleiotrópicos de la curcumina dependen de su capacidad de interacción y regulación de múltiples objetivos moleculares. Estos incluyen factores de transcripción, factores de crecimiento, quinasas, citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteínas relacionadas con la apoptosis, entre otras. En particular, la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) es una enzima

que cataliza la oxidación dependiente de nicotinamida adenin dinucleótido (NADp) dependiente de monofosfato de inosina (IMP) a monofosfato de xantina (XMP) en la síntesis de novo. Esta enzima es un determinante crítico del nivel de nucleótidos de guanina, incluido el trifosfato de guanosina (GTP), que son esenciales para muchas funciones celulares. La expresión o actividad mejorada de la enzima IMPDH se correlaciona con un aumento de la proliferación celular y la transformación maligna. Por lo tanto, IMPDH es un objetivo atractivo de agentes inmunosupresores, anticancerígenos y antivirales. Un estudio más reciente encontró que la curcumina tiene un efecto inhibidor sobre la actividad de IMPDH tanto de manera competitiva como no competitiva y para suprimir el nivel de GTP celular en células de carcinoma de colon HT-29.^{2,3}

La IMPDH ha recibido considerable interés como enzima blanco para el descubrimiento de drogas antivirales.⁴⁻⁷ Las enfermedades virales transmitidas por mosquitos, en especial las causadas por el flavivirus Zika ha tomado relevancia en los últimos años, dado que no existe tratamiento disponible. En particular, en nuestra región ha habido una creciente propagación de infecciones causadas por este virus.

El virus Zika (ZIKV) se identificó por primera vez en Uganda, en 1947, en macacos de la India, y en 1952 en

humanos, en Uganda y Tanzania. En ratones el virus es altamente neurotrópico, causando degeneración neuronal, sin haberse aislado de otros tejidos. Se sabe con certeza que también el mosquito *Aedes aegypti* es la principal vía de transmisión del ZIKV. Sólo el 20 % de las infecciones van acompañadas con síntomas, el resto pasan inadvertidas y esto contribuye en gran medida a la diseminación del virus en la población. La enfermedad se presenta con exantema, conjuntivitis y fiebre no muy elevada. Los síntomas duran entre 2 y 7 días. Se puede transmitir en humanos por vía parenteral, sexual y por transfusión sanguínea.⁸ Por el momento, no existen vacunas ni tratamientos específicos, y son muy escasos los trabajos reportados abordando el campo antiviral.⁹

En el 2015 comenzó una epidemia de Zika en el norte de Brasil, y desde allí la propagación fue explosiva, extendiéndose a casi todo el continente americano. En Argentina se han confirmado decenas de casos importados de infecciones por ZIKV, aunque no se ha oficializado el brote epidémico con más de 300 personas afectadas en Tucumán en enero/2016.

Cabe resaltar que en el norte de Brasil hubo un llamativo aumento de casos de microcefalia y trastornos neurológicos en recién nacidos.^{10,11} Recientemente, se ha reportado reactividad cruzada entre los anticuerpos contra el virus dengue (DENV) y ZIKV, y por lo tanto la presencia de anticuerpos contra DENV en una

persona podría incrementar la multiplicación del ZIKV, aumentando así su virulencia en la población, a través del mismo fenómeno ADE (antibody dependent enhancement) descrito en infecciones con distintos serotipos de DENV.¹² Por lo que nuevamente se pone en discusión el uso de la vacuna Dengvaxia, especialmente en nuestra región donde ambos flavivirus co-circulan. Por todo lo mencionado la búsqueda de compuestos antivirales efectivos es de gran interés.

El éxito de cualquier tratamiento médico depende no solo de la actividad farmacocinética/farmacodinámica del agente terapéutico, sino, en gran medida, de su biodisponibilidad en el sitio de acción en el sistema humano. En este contexto, el PLGA (poliláctico-co-glicólico) es un polímero ampliamente utilizado para fabricar nano o micropartículas debido a la buena biocompatibilidad y biodegradabilidad que presentan, debido a que se hidroliza en el cuerpo para producir ácido láctico y ácido glicólico, que son procesados eficazmente por el cuerpo, lo que resulta en una toxicidad sistémica mínima. A lo que se le suma, el historial de larga data en aplicaciones biomédicas y la utilidad bien documentada para la liberación sostenida de fármacos en comparación con los dispositivos convencionales hasta días, semanas o meses, y la facilidad de administración parenteral mediante inyección.

PLGA es un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico. Dependiendo de la relación de lactida y glicolida, se pueden obtener diferentes formas de PLGA, que generalmente se identifican con respecto a la relación de monómeros utilizada (por ejemplo, PLGA 75:25 identifica un copolímero cuya composición es 75% de ácido láctico y 25% de ácido glicólico).

La velocidad de degradación de PLGA depende de la relación molar de ácidos láctico y glicólico en la cadena de polímero, el peso molecular del polímero, el grado de cristalinidad y la temperatura de transición vítrea (Tg) del polímero. En base a estos factores, se puede modificar entonces, el perfil de liberación de la droga por parte de la matriz polimérica.

En nano/micropartículas de PLGA se puede encapsular una amplia variedad de agentes terapéuticos, que incluyen fármacos lipófilos o hidrófilos de bajo peso molecular, e incluso ADN de alto peso molecular, se pueden encapsular dentro de estas. El resto atrapado en la matriz polimérica de las partículas se libera a una tasa sostenida por difusión o por degradación de la matriz polimérica, dando así una formulación de liberación sostenida para provocar una eficacia terapéutica potenciada.

Se proponen muchos enfoques para la preparación de partículas de PLGA. La técnica más común utilizada para la preparación de las partículas de PLGA es la técnica de evaporación del disolvente de emulsión. Esta técnica permite la

encapsulación de fármacos hidrófobos y consiste en disolver el polímero y el compuesto en un disolvente orgánico (por ejemplo, diclorometano). La emulsión de aceite (O) en agua (W), es decir, O/W, se prepara mezclando una solución acuosa de un agente tensioactivo (por ejemplo, alcohol polivinílico (PVA) polisorbato-80, poloxámero-188) con la solución de polímero. Las gotitas de tamaño nano o micrométrico son inducidas por sonicación u homogeneización. El disolvente se evapora o se extrae y las partículas se recogen después de la centrifugación. Una modificación de esta técnica, la emulsión doble W/O/W, se usa para encapsular fármacos hidrófilos, tales como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las partículas también se pueden formar por el método de precipitación también llamado método de deposición interfacial. Brevemente, el polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente orgánico (tal como acetona) y se añaden gota a gota al agua. El disolvente orgánico se evapora y los gránulos se recogen después de la centrifugación. Existen otras técnicas, como el método de secado por pulverización. La carga de fármaco en las partículas se logra por dos métodos: (i) la incorporación del fármaco durante la producción de las partículas y (ii) la adsorción del fármaco en las partículas después de su producción.¹³

Dependiendo del método de preparación, la organización estructural puede diferir. El fármaco está atrapado

dentro del núcleo de una "cápsula" así como atrapado o adsorbido en la superficie de una "esfera" de matriz (Figura 2).¹³

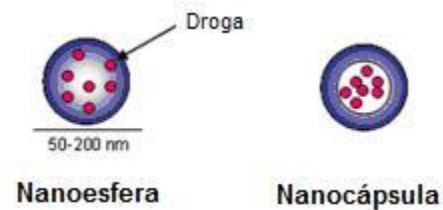


Figura 2. Distribución de la droga en las nanoesferas y nanocápsulas.

En muchas de estas técnicas se incluye el uso de PVA como emulsionante durante la formulación de nano/micropartículas de PLGA porque las partículas formadas usando este emulsionante son relativamente uniformes y de menor tamaño, y son fáciles de redispersar en medio acuoso.¹⁴

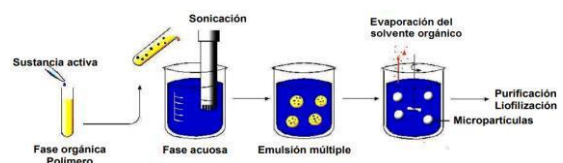


Figura 3. Encapsulación por evaporación del disolvente de la emulsión.

Las partículas de PLGA se han preparado principalmente por emulsión-difusión, evaporación del disolvente de emulsión (Figura 3), deposición interfacial y método de precipitación. Generalmente, en el método de emulsión-difusión, los polímeros de PLGA se disuelven en disolvente orgánico, se vierten y se separan en fase acuosa que tiene estabilizador y posteriormente se emulsionan mediante homogeneizador. En el método de evaporación con

disolvente, los polímeros se disuelven en disolvente orgánico volátil (diclorometano, acetona, cloroformo, etc.) y se vierten en una fase acuosa de agitación continua con o sin emulsionante/estabilizador y se someten a ultrasonidos. Los métodos de deposición interfacial se han utilizado para la formación de nanocápsulas y nanoesferas. Las partículas se sintetizan en la capa interfacial de agua y disolvente orgánico (miscible en agua) y finalmente las partículas se separan mediante centrifugaciones. El método más comúnmente utilizado para la preparación de nano/micropartículas de PLGA es la nanoprecipitación. El polímero disuelto en acetona se añade gota a gota en una fase acuosa de agitación continua con o sin emulsionante/estabilizador y, en consecuencia, la fase orgánica se evapora a presión reducida.¹⁵

Objetivos

En virtud de la gran demanda a nivel mundial de nuevos antivirales, en especial aquellos que ataque al flavivirus Zika, el cual afecta principalmente a nuestra región, se propone como innovación utilizar en el tratamiento de dichas afecciones productos provenientes de la biomasa renovable, en particular, la curcumina. Luego, dada la ineficiencia de su farmacocinética, se propone el uso de agentes de liberación controlada utilizando como matriz copolímeros biocompatibles que sintetizaremos y caracterizaremos a tal efecto.

Materiales y Métodos

1. Materiales

Lactida (3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona), glicólida, curcumina, ácido octanoico, diclorometano (DCM), alcohol polivinílico (PVA) M_w 89.000-98.000 99% hidrolizado, todos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

2. Síntesis de PLGA

El PLGA se sintetiza mediante la apertura de los anillos de D,L-lactida y glicólida en una polimerización en masa. La reacción de copolimerización se ilustra en la *Figura 4*. La proporción del iniciador octoato estannoso fue 0,02% de la masa monomérica total y del coiniciador alcohol laurílico 0,01% se eligen en base a estudios previos.^{16,17}

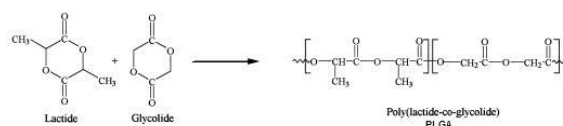


Figura 4. Reacción de copolimerización.

Se usan relaciones de monómero de 50/50 (D, L-láctido/glicérido) en la síntesis. Estas proporciones se han elegido considerando el tiempo de degradación de estos copolímeros,¹⁸ proporciones más comúnmente utilizadas en los sistemas de administración controlada de medicamentos.

Dado que la aplicación de vacío y la agitación resultan esenciales para la obtención de buenos resultados se utiliza balón de 50 ml con un tapón de goma, que se sumergió en un baño termostático

de glicerina y se logra el vacío después de que se hubieran agregado todos los reactivos. La agitación magnética se continua hasta que la barra magnética deja de moverse debido al aumento de la viscosidad de la solución, luego de aproximadamente 10 minutos de síntesis.¹⁹ El calentamiento se prolonga durante 2h a 170-175°C y luego se detuvo el calentamiento, para dejar que baje progresivamente la temperatura. En cuanto al vacío se aplica durante 2,5 h para garantizarlo durante todo este proceso.

3. Caracterización del PLGA

3.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

La prueba se realiza a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min desde temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$) a 400°C en un recipiente de muestra de platino sin sellar en atmósfera de nitrógeno con un caudal de 20°C/min. El equipo utilizado fue un SDTA 851 Mettler Toledo La masa de las muestras analizadas fue de 3mg.

3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El equipo DSC utilizado es un DSC Q20 TA-Instruments, COOLING RCS 90 y cápsulas Tzero Pan Aluminum. Se usa también un recipiente de muestra de aluminio sin sellar con nitrógeno como gas portador a un caudal de 50ml/min. La masa de la muestra analizada fue de 3mg.

Se programa para calentar primero las muestras desde la temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$) a 150°C a una velocidad de

10°C/min (1°ciclo). Las muestras de PLGA se someten a esta primera ejecución para eliminar el historial térmico del material. Al final de la primera ejecución, el horno se enfrió con nitrógeno líquido hasta alcanzar una temperatura de -10°C. El equipo fue luego programado para otra ejecución hasta 150°C, a una velocidad de calentamiento de 5°C/min. La segunda curva de DSC fue la referencia para determinar la temperatura de transición vítrea (T_g).²⁰

3.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las muestras de RMN se preparan disolviendo el PLGA en CDCl_3 . Los espectros de ^1H -RMN se obtienen a 200MHz utilizando un Bruker AC-200.

3.4. Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros se registran en un espectrómetro Nicolet IS50 FT-IR que funcionaba en el modo ATR (reflectancia total atenuada). Los espectros de absorción infrarroja se recogen a 20°C a partir de 4000-450 cm^{-1} . Se realizaron 10 escaneos para una resolución de 4 cm^{-1} .

4. Síntesis de micropartículas de PLGA

Para la *Solución A* se disuelven 200mg de PVA en 20ml de agua MilliQ para obtener una solución de PVA al 1% (p/v). Se agrega una barra de agitación y coloca en una placa de agitación magnética durante 24hs para permitir la disolución completa.

Por otro lado, se preparan diferentes soluciones en 2ml de DCM en un vial de

vidrio de 10 ml conteniendo distintas concentraciones de PLGA, curcumina y ácido octanoico, a las cuales denominamos *Solución B*. En este punto, se deja descansar la *Solución B* de 24hs, con los viales tapados, a temperatura ambiente (20°C). Luego, se sonica durante 10 segundos a 10-12W para garantizar la distribución uniforme de la molécula pequeña entre las cadenas del polímero.

Concluidas las 24hs, es necesario filtrar la *Solución A* con vacío a través de un filtro de 0,2µm y se trasvasa a un vaso de precipitados de 50ml que se enfría en baño de hielo a 4-8°C. Se coloca la sonda homogeneizadora dentro del vaso de precipitados de forma que la sonda quede sumergida pero no en contacto con la superficie del vidrio y con una pipeta Pasteur de vidrio se agrega *Solución B* gota a gota mientras se homogeneiza para crear una emulsión.

Una vez finalizado el agregado se homogeneiza la mezcla durante 2 minutos más, se apaga el homogeneizador y se retira el vaso de precipitados del baño de hielo. Se agrega una barra de agitación magnética de 1-1,5cm de largo al vaso de precipitados, se cubre con papel de aluminio perforado con 20-30 orificios y se mueve a una placa de agitación bajo campana a 300rpm aproximadamente. Se deja evaporar el solvente durante 4-5h.

La evaporación incompleta del solvente da como resultado la agregación de partículas y la pérdida de micropartículas

en pasos posteriores. Por otro lado, el excesivo tiempo de evaporación conduce a la descomposición de las partículas debido a la hidrólisis y la pérdida gradual de la carga. Es por ello que para determinar el punto óptimo se toman 200µl de la muestra y se centrifuga a 200rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego, las micropartículas deben resuspenderse fácilmente en 1ml agua MilliQ, formando una suspensión de partículas individuales.

Cuando la prueba da el resultado esperado, se transfiere la suspensión a tubos de centrifuga de 15ml y centrifugan a 200rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la centrifugación, se retira el sobrenadante, se agregan 10ml de agua MilliQ y se vuelve a poner nuevamente. El proceso de lavado se repite dos veces.

Después de finalizados los lavados, se resuspenden las partículas en 1ml de agua MilliQ, se filtra la suspensión a través de un filtro de tamaño de poro 40µm para eliminar partículas grandes y agregados y se lava el filtrado con 1ml de agua MilliQ fría. En este punto, se reservan 40µl para la caracterización y el resto de la suspensión es transferido a un vial. Se pone a congelar, para luego liofilizar durante 8hs.

5. Caracterización de las nanopartículas

5.1. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad de las micropartículas

Se agregan 10µl de suspensión de micropartículas a 1ml de agua destilada

en una cubeta, se homogeniza bien e inserta la mezcla en el Zetasizer para medir el diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad de las micropartículas de PLGA a través de DLS.

5.2. Potencial zeta

Se diluyen 2µl de suspensión de micropartículas concentradas en 1ml de agua destilada, se carga la suspensión en una celda para medir el potencial zeta y se mide dicho potencial con un Zetasizer.

5.3. Tamaño de las partículas y polidispersidad

La microscopía electrónica de barrido (SEM) también se realiza para confirmar la distribución del tamaño y evaluar la morfología de la superficie, ya que la presencia de partículas grandes o residuos puede causar errores en las mediciones de DLS.

Para ello, se transfieren 20µl de suspensión de partículas diluidas a un portaobjetos de vidrio limpio. Se usa un microscopio con 40 de aumento para visualizar las partículas y así confirmar el tamaño de las partículas y la polidispersidad.

5.4. Ensayo de liberación

El ensayo consiste en armar “caramelitos” con una membrana de diálisis

Spectra/PorR4, tanto para las micropartículas de PLGA cargadas como no. Estos son colocados en viales pequeños con 5ml de agua MilliQ, y se mantienen en agitación magnética a 37°C. Los ensayos son hechos por triplicado.

A tiempo: 15; 30; 60; 90 minutos; 2; 5 y 24h, se toma 1ml de la solución para realizar mediciones y se repone el medio con 1ml de agua MilliQ.

La concentración de curcumina se determina por HPLC mediante cromatografía de fase inversa en una columna 18 con elución isocrática de acetonitrilo y ácido acético al 2% v/v (40:60, v/v) a un caudal de 2,0ml/min, una temperatura de columna de 33°C y con detección UV a 425nm. Este método fue validado y aplicado para la cuantificación de curcuminoides individuales en extractos comerciales de cúrcuma.²¹

Para la curva de calibración, la muestra se prepara disolviendo el extracto en acetonitrilo y posteriormente diluyendo con acetonitrilo al 50%.²¹ Las soluciones patrones se preparan usando la curcumina de Aldrich y tienen una concentración de entre 10 y 100µg/ml.

6. Ensayos biológicos

6.1. Ensayos de citotoxicidad

Para todos los ensayos se utilizan las siguientes líneas celulares: de riñón de mono verde africano Vero y de hepatocarcinoma humano HepG2 que ya han sido ampliamente utilizadas en muchísimos trabajos con flavivirus.

Brevemente, se siembran células en microplacas de 96 pocillos y 24h más tarde se colocan distintas concentraciones de las micropartículas (diluciones seriadas al medio en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino). Se observan

las células bajo el microscopio para evidenciar el eventual efecto tóxico, y a las 24 y 48h de incubación se agrega al medio el reactivo comercial MTS (Promega), para así medir la viabilidad celular en función de la absorbancia, en un lector de placas con el filtro correspondiente (570 nm) luego de 4, 8 ó 12 h de incubación con el reactivo.

A partir de estos datos, se calculan las CC50 (concentración citotóxica de NP que reduce la viabilidad celular en un 50%). La CC50 obtenida se compara con los datos obtenidos en paralelo utilizando la curcumina disuelta en DMSO.

Alternativamente se ensaya la citotoxicidad de las micropartículas por el método de exclusión de azul tripán ó utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT).

Se emplean los mismos protocolos para ensayar la acción citotóxica de las micropartículas cargadas con curcumina. Estos experimentos nos permitirán identificar las dosis en las cuales las micropartículas no son tóxicas.

6.2. Ensayos de inhibición del rendimiento viral (UFP)

Se ensaya el efecto inhibitorio de todas las micropartículas preparadas en un rango de concentración que no hayan resultado tóxicas para el cultivo celular.

Para ello, se siembran las células HepG2 en microplacas de 96 pocillos y 24h más tarde se infectan por triplicado con virus Zika, usando distintas m.i de 0,1-1. Inmediatamente después de 1h de

adsorción a 37°C, se colocan en los pocillos medio fresco (DMEM) conteniendo distintas concentraciones (diluciones seriadas al medio) de las micropartículas a ensayar. A las 24 y 48h post infección (p.i.), se cosechan los sobrenadantes, para ser titulados posteriormente en células Vero por el método de unidades formadoras de placas (UFP), y así calcular la CE50 (concentración efectiva de micropartículas que reduce la formación de partículas virales en el sobrenadante en un 50%).

Brevemente, para la titulación se siembran células Vero en microplacas de 48 pocillos, y 24h más tarde se infectan las células con diluciones seriadas al décimo de los sobrenadantes cosechados, y 7-14 días p.i. se fijan las células infectadas con formol (10%), para revelar las placas de lisis por tinción con cristal violeta. A partir de estos datos se calculan los valores de CE50 correspondiente para cada tratamiento. Las CE50 obtenidas se comparan con los datos obtenidos utilizando la curcumina libre, así como con distintas concentraciones de micropartículas vacías.

Resultados y Discusión

1. Síntesis y caracterización del PLGA

A continuación se muestran a modo representativo los análisis realizados a una muestra de PLGA.

- Análisis térmicos

En el termograma de TGA (*Figura 5*) se observa la línea negra que respresenta la

pérdida de masa, mientras que la curva en rojo corresponde a la primera derivada (DrTG). En ambas se puede ver que existen tres eventos térmicos. En el primero, la pérdida de masa es despreciable y asociamos este pico a la evaporación de solvente que puede haber quedado en la muestra. El segundo corresponde a la degradación del PLGA a 155°C, siendo la degradación del 80% de la masa. Mientras que el último pico a 328,6°C se debe a la degradación total de un 7% de la masa de la muestra. Podemos concluir también que un porcentaje del 13% permanece como residuo carbonoso debido a que la cantidad de oxígeno presente en la estructura polimérica no es suficiente para completar la combustión.

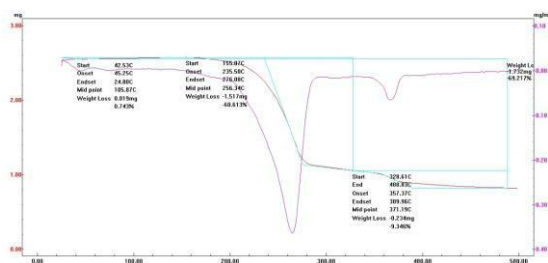


Figura 5. Análisis termogravimétrico (TGA)

A partir de los datos del termograma obtenido por DSC donde se utiliza el segundo calentamiento (Figura 6) para determinar la temperatura de transición vítrea (Tg). Se establece que la Tg es 35,1°C, próxima a la temperatura corporal, lo que promueve el uso del PLGA sintetizado para la liberación en el organismo de sustancias encapsuladas. Este valor resulta menor que los valores para PLGA 50:50 encontrados en la

literatura, posiblemente debido al hecho que los polímeros obtenidos tienen masas moleculares más bajas. Los polímeros con masas moleculares más bajas se degradan más fácilmente que aquellos con masas moleculares más altas.²⁰

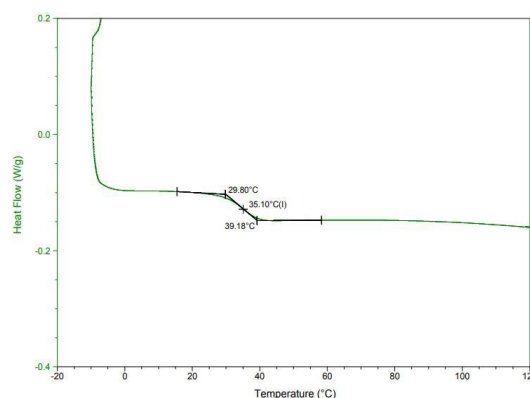


Figura 6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

- Análisis espectroscópicos

En base al espectro de ¹H-RMN (Figura 7) y, teniendo en cuenta, la asignación de los picos (Tabla 1) y las relaciones expresadas a continuación, se determina la relación de los monómeros en la cadena polimérica que resulta estequiométrica es decir 50/50.

Grupo Funcional	CH ₃	CH ₂	CH
D,L-lactida (ppm)	1,66	--	5,08
Glicólida (ppm)	--	4,99	--

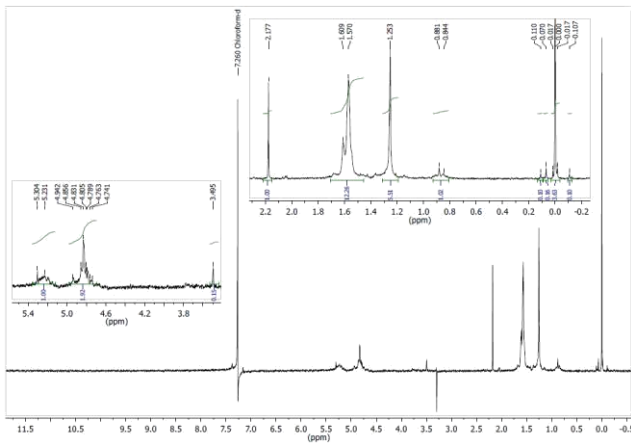
Tabla 1. Desplazamientos químicos obtenidos de los diferentes grupos funcionales presentes en el PLGA.

$$\% \text{ Monómero} = \frac{\text{Area}(\text{CH}) \times 100}{\text{Area}(\text{CH}_2)/2 + \text{Area}(\text{CH})}$$

D, L-lactida

$$\% \text{ Monómero} = \frac{\text{Area}(\text{CH}_2)/2 \times 100}{\text{Area}(\text{CH}_2)/2 + \text{Area}(\text{CH})}$$

glicólida



orgánico es crucial para determinar el tamaño de partícula final. La reducción de la concentración del polímero en el disolvente dará como resultado partículas de menor diámetro, mientras que el aumento de la concentración aumentará el diámetro de la partícula. Por ello, se prueban con dos diferentes concentraciones de PLGA.

En todos los casos se observó turbidez en las soluciones luego de la evaporación del solvente orgánico y la deposición posterior a la centrifugación. Las formulaciones que contenían ácido octanoico presentaban mayor dificultad a la hora de la centrifugación y requirieron mayor tiempo.

En cuanto a la caracterización de las micropartículas y a los ensayos biológicos, si bien se obtienen buenos resultados preliminares, no se incluyen en este resumen debido a que se pretende garantizar antes la reproducibilidad de los valores obtenidos. Por ello, aún se continúan con las mediciones.

Conclusiones

La copolimerización en masa de los monómeros D,L-láctido y glicólido a 175°C, con el uso de octoato estanioso como iniciador y de alcohol laurílico como co-iniciador, y la aplicación de vacío y agitación en el medio de reacción, resulta en rendimientos cuantitativos para la obtención de PLGA.

Con respecto a los copolímeros de PLGA sintetizados, tienen una

temperatura de transición vítrea próxima a la temperatura corporal por lo que resultan de gran interés para su utilización como vectores de drogas en el organismo humano. La degradación térmica comienza por encima de 155°C y la pérdida de masa se produce casi totalmente en esta etapa.

El espectro de FT-IR obtenido se corresponde con los bibliográficos. Mientras que el análisis de RMN permitió determinar que la composición utilizada de los monómeros coincide con la composición del copolímero, siendo esta igual a la relación estequiométrica. Esto además permite inferir que no existen monómeros residuales.

Si bien no se incluyen los análisis biológicos en este trabajo, en base a ensayos preeliminares, se puede concluir que la actividad de las formulaciones con curcumina aumenta en relación a la de la curcumina libre.

Bibliografía

[1] Hongyu Zhou, Christopher S. Beevers and Shile Huang. The Targets of Curcumin. *Current Drug Targets*, 2011, 12, 332-347 1389-4501/11 \$58.00+.00 © 2011 Bentham Science Publishers Ltd.

[2] Issei DAIRAKU, Yunkyung HAN, Noriyuki YANAKA & Norihisa KATO. Inhibitory Effect of Curcumin on IMP Dehydrogenase, the Target for Anticancer and Antiviral Chemotherapy Agents.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry ISSN: 0916-8451 (Print)

1347-6947 (Online) Journal homepage:
<http://www.tandfonline.com/loi/tbbb20>

[3] Dairaku I, Han Y, Yanaka N, *et al.* Inhibitory effect of curcumin on IMP dehydrogenase, the target for anticancer and antiviral chemotherapy agents. *Biosci Biotechnol Biochem*; 74: 185-7.

[4] Story S, Gupta M, Bonsu E, Nair V. (2005) Inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase: probes for antiviral drug discovery. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 24(5-7):717-20.

[5] Franchetti P, Grifantini M. (1999) Nucleoside and non-nucleoside IMP dehydrogenase inhibitors as antitumor and antiviral agents. *Curr Med Chem*.6(7):599-614.

[6] Ratcliffe AJ.(2006) Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 9(5):595-605.

[7] Khan M, Dhanwani R, Patro IK, Rao PV, Parida MM.(2011) Cellular IMPDH enzyme activity is a potential target for the inhibition of Chikungunya virus replication and virus induced apoptosis in cultured mammalian cells. *Antiviral Res*. 89(1):1-8.

[8] Fauci A, Morens DM. (2016) Zika virus in the Americas-Yet another arbovirus threat. *Perspectives*. *N Engl J Med* 374:601-4.

[9] Eyer L, Nencka R, Huvarová I, Palus M, Joao Alves M, Gould EA, De Clercq E, Růžek D. (2016) Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. *J Infect Dis*. pii: jiw226.

[10] Heymann DL, Hodgson A, Sall AA, *et al.* (2016) Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *The Lancet* 387: 719-21.

[11] Laerte Pinto Jr V, Luz K, Parreira R, Ferrinao P. (2015) Zika virus: A review to clinicians. *Acta Med Port*, 28: 760-5.

[12] Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Malasit P, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR. (2016) Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol*. doi: 10.1038/ni.3515.

[13] Fabienne Danhier a , Eduardo Ansorena a , Joana M. Silva a,b , Régis Coco a , Aude Le Breton a , Véronique Prétat. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 161 (2012) 505–522.

[14] Sarbari Acharya, Sanjeeb K. Sahoo. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 170–183.

[15] Avnesh Kumari, Sudesh Kumar Yadav, Subhash C. Yadav*Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75 (2010) 1–18

[16] M. Kiremitçi-Gümüşderelioglu and G. Deniz, "Synthesis, Characterization and *in Vitro* Degradation of Poly(D,L-Lactide)/Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide),"

Turkish Journal of Chemistry, Vol. 23, No. 2, 1999, pp. 153-161.

[17] D. Bendix, "Chemical Synthesis of Polylactide and Its Copolymers for Medical Applications," *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 59, No. 1-3, 1998, pp. 129-135. doi:10.1016/S0141-3910(97)00149-3

[18] M. Chasin and R. Langer, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems," McGraw-Hill, New York, 1990.

[19] Cynthia D'Avila Carvalho Erbeta¹, Ricardo José Alves², Jarbas Magalhães Resende³, Roberto Fernando de Souza Freitas¹, Ricardo Geraldo de Sousa¹. "Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer" *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2012, 3, 208-225.

[20] M. V. Scarpa, E. S. do Egito and A. G. Oliveira, "Thermal Behavior and Stability of Biodegradable Spray-Dried Microparticles Containing Triamcinolone," *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 368, No. 1-2, 2009, pp. 45-55.

[21] Wichitnithad W, Jongaroonngamsang N., Pummangura S., Rojsitthisak P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochem Anal.* 2009 Jul-Aug;20(4):314-9. doi: 10.1002/pca.1129.

[22] N. B. Colthup, L. H. Daly and S. E. Wiberley, "Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy," 2nd Edition, Academic Press, New York, 1975.

Agradecimientos

Los autores agradecemos al Dr. Diego Chippetta y al Dr. Mario Contin pertenecientes a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Buenos Aires por su colaboración, así como también a Eugenio Pugini del Departamento de Química Biológica de la facultad.