

CAPÍTULO 3.

Desarrollo de un prototipo de formulación del virus que brinde eficiente protección frente a la radiación ultravioleta

LAURA VILLAMIZAR Ph.D., MIGUEL LÓPEZ-FERBER Ph.D.,
ALBA MARINA COTES Ph.D., FLEMING MARTÍNEZ Ph.D.

INTRODUCCIÓN

La inactivación de los baculovirus por efecto de la radiación solar bajo condiciones de campo es el principal factor ambiental que limita el uso masivo de estos agentes de biocontrol (Ignoffo *et al.*, 1997). La luz solar afecta negativamente las partículas virales, particularmente la radiación comprendida en el espectro ultravioleta (Farrar *et al.*, 2000) y especialmente la radiación entre 280 nm y 310 nm (Asano, 2005). Algunos trabajos se han desarrollado en busca de protectores solares que eviten el deterioro de los baculovirus por causa de la luz mediante estrategias como el uso de derivados de la lignina, con los cuales se han alcanzado niveles de protección de 421 días bajo condiciones de campo (Hamed *et al.*, 2004). Otra alternativa para fotoestabilizar los agentes de biocontrol es el desarrollo de formulaciones utilizando tecnologías como la microencapsulación, que permite recubrir pequeñas partículas sólidas o gotas de líquidos con una capa delgada y uniforme del material de recubrimiento, formando cápsulas con tamaños que pueden oscilar entre 1 y 1.000 μm (Florence y Attwood, 1998).

A pesar de contar con un aislamiento de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* con alto potencial para el desarrollo de un bioplaguicida, cuando el virus sea aplicado bajo condiciones de campo, éste se verá expuesto a condiciones ambientales deletéreas, entre ellas la radiación ultravioleta del sol. Por tales razones, surgió la necesidad de evaluar el potencial de la microencapsulación con un polímero pH-dependiente como una estrategia para proteger las partículas virales de la inactivación causada por la radiación ultravioleta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación del efecto tóxico del polímero de recubrimiento sobre las larvas

Para determinar el posible efecto tóxico del polímero sobre las larvas de *S. frugiperda* se llevó a cabo un bioensayo bajo condiciones controladas de laboratorio. El polímero fue



disuelto en tampón fosfato (pH 8) a una concentración de 4 mg/mL (Asano, 2005), y a dicha dispersión se le adicionó colorante azul de alimentos Tuska® (1%) y sacarosa (4%). Con la dispersión polimérica se desarrolló un bioensayo siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1. Se contó con un testigo absoluto consistente en larvas neonatas sin tratamiento alguno.

El diseño experimental fue completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo. Los resultados de mortalidad fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA con una confiabilidad del 95%.

Determinación de efecto de diferentes solventes sobre la actividad biocontroladora de un aislamiento de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda*

Con miras a seleccionar solventes orgánicos que no afectaran la actividad del virus y que pudieran ser utilizados en el proceso de microencapsulación, se realizó un estudio de compatibilidad. Muestras de 0,01 g de virus purificado liofilizado fueron dispensadas en 16 tubos Eppendorf de 500 µL, y en cada tubo se adicionaron 20 µL de cada solvente (Tabla 5) agitándolos mediante inversiones manuales y centrifugados posteriormente a 14.000 rpm durante 30 minutos.

El sobrenadante se eliminó y el sedimento correspondiente a las partículas virales fue lavado dos veces con 500 µL de agua destilada estéril. El sedimento fue nuevamente resuspendido en 50 µL de agua y se preparó una suspensión ajustada a 1×10^{10} CI/mL. Se colocaron 10 µL de cada suspensión viral en un pozo de una microplaca de 96 pozos de fondo plano y se adicionaron 10 µL de una solución de sacarosa al 4% y colorante azul de alimentos al 1% a cada pozo. El contenido de cada pozo se utilizó para un bioensayo siguiendo la metodología previamente descrita. El tratamiento testigo positivo consistió en un virus purificado no expuesto a solvente alguno y se contó con un testigo absoluto en el que las larvas no recibieron tratamiento.

El diseño experimental fue completamente al azar. Los resultados de mortalidad al séptimo día fueron corregidos con respecto al testigo utilizando la fórmula de Schneider – Orelli (Zar, 1999) y fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA con una confiabilidad del 95%.

Tabla 5. Solventes utilizados para el estudio de compatibilidad con el virus

Solvente	Marca
Butanol	Sigma
Metanol	Mallinckrodt
Etanol	Merck
Cloroformo	Chemical
Benceno	RPE
n-Hexano	Merck
Acetona	J.T. Baker
Tolueno	Sigma
Heptano	Merck
n-Propanol	Fisher
Xileno	J.T. Baker
Dimetilsulfóxido	J.T. Baker
Alcohol isoamílico	J.T. Baker
Dietiléter	ProAnalysis
Etilenglicol	Merck
Cloruro de metileno	J.T. Baker

Selección de condiciones para el proceso de formación de micropartículas mediante la metodología de evaporación de solvente.

Concentración de tensioactivo: se disolvieron 0,20 g de polímero en 5 mL del solvente seleccionado (acetona) y la solución polimérica fue emulsificada con 20 mL de parafina líquida a la cual se le adicionó previamente como estabilizante Span 80, evaluando tres concentraciones: 1%, 2% y 3%. La emulsificación se llevó a cabo en un vaso de precipitados de 50 mL, homogeneizando la mezcla a 14.000 rpm durante 2 minutos. Las emulsiones se mantuvieron luego con un agitador vertical rotatorio de brazos con una velocidad de 2.400 rpm durante 2 horas para permitir la evaporación del solvente y la consecuente formación de las micropartículas. Para los tratamientos en los que se obtuvo la formación de micropartículas, estas se recuperaron mediante centrifugación a 15.000 rpm durante 10 minutos, se lavaron dos veces con n-Hexano y se dejaron secar toda la noche exponiéndolas al ambiente en una cabina extractora (modificado de Trapani *et al.*, 2007).

Las micropartículas obtenidas fueron observadas en un microscopio Olympus CH3ORF100 (Hirech *et al.*, 2003). También se determinó la morfología de su superficie por observación en microscopio de campo oscuro y con estos resultados se seleccionó la concentración de tensioactivo que produjo la mejor respuesta; es decir, la formación de esferas con la menor distribución de tamaños de partícula y el menor diámetro promedio.

Relación de fases y concentración de polímero: con miras a determinar un punto que permitiera la formación adecuada de micropartículas, el cual sería optimizado posteriormente utilizando un diseño factorial multinivel, una vez seleccionada la concentración de tensioactivo se procedió a evaluar las variables: (a) concentración de polímero y (b) relación de fases, siguiendo la metodología previamente descrita para la formación de las micropartículas.

Relaciones de fase acuosa: fase oleosa evaluadas fueron 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:6. Las concentraciones de polímero variaron según la cantidad de este, que se disolvió en un mismo volumen de solvente: 0,20 g; 0,25 g o 0,30 g en 5 mL (Tabla 6).

Tabla 6. Codificación de los tratamientos evaluados para la formación de micropartículas por el método de evaporación del solvente.

Fase acuosa (mL)	Fase oleosa (mL)	Polímero (g)		
		0,20	0,25	0,30
5	10	A	B	C
	15	D	E	F
	20	G	H	I
	25	J	K	L
	30	M	N	O

Ajuste de condiciones del proceso de formación de micropartículas: teniendo como base el tratamiento que presentó la respuesta más promisoría, se estudió la



influencia de dos parámetros en la formación de las micropartículas utilizando un diseño experimental de selección multinivel (Trapani *et al.*, 2007). Los tratamientos se definieron a partir de un punto central o punto 0, que correspondió a un tratamiento que produjo una respuesta positiva en los ensayos previos; es decir, aquel con el que se obtuvo la formación de micropartículas con características adecuadas. A partir de este punto se evaluaron las variables: (a) cantidad de núcleo (talco industrial malla 325) suspendido en los 5 mL de solución polimérica y (b) cantidad de polímero disuelto en los 5 mL de solvente. Se definieron dos puntos equidistantes del valor central, uno por encima y otro por debajo para cada variable, según se presenta en la Tabla 7. Además, se utilizó la concentración de tensioactivo y la relación de fases seleccionada previamente (Villamizar *et al.*, 2010).

El diseño requirió un total de nueve experimentos, cada uno de los cuales se realizó por triplicado. Las variables respuesta fueron el tamaño medio de partícula, que se evaluó mediante medición en microscopio Olympus CH3ORF100 (Hirech *et al.*, 2003), y el rendimiento, que se calculó pesando las microcápsulas obtenidas y aplicando la fórmula (Trapani *et al.*, 2007):

Tabla 7. Factores y niveles del diseño experimental para el método de evaporación de solvente utilizando agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
Núcleo (g)	0,050	0,075	0,100
Polímero (g)	0,100	0,150	0,200

$$\% \text{Rendimiento} = (PM / PT) \times 100$$

Donde:

PM: es el peso de las microcápsulas obtenidas

PT: es el peso esperado de las microcápsulas, o sea el peso del polímero más el de los materiales microencapsulados.

Para determinar las relaciones entre los factores y las variables evaluadas se realizó un análisis de superficies de respuesta con el programa Statgraphic 4.0 (Trapani *et al.*, 2007).

La morfología de las micropartículas obtenidas se determinó mediante microscopía electrónica de barrido –siguiendo la metodología descrita por Trapani *et al.* (2007)– en un microscopio Philips XL 20.

Para determinar las relaciones entre los factores y las variables evaluadas se realizó un análisis de superficies de respuesta (Trapani *et al.*, 2007).

Microencapsulación del virus

Una vez seleccionado el método de microencapsulación por evaporación de solvente y las condiciones más adecuadas para el mismo, se procedió a la microencapsulación del virus. Para tal fin, se utilizaron 0,0250 g de polímero disueltos en 5 mL de acetona y 0,050 g de virus purificado y liofilizado (núcleo). La velocidad de agitación se ajustó en 5.000 rpm (Villamizar *et al.*, 2010). El procedimiento seleccionado fue exitoso para la

microencapsulación del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* y, por tanto, se elaboraron tres lotes de micropartículas, que fueron caracterizadas como se describe a continuación:

- **Tamaño de partícula:** el tamaño de las microcápsulas formadas fue evaluado mediante microscopía óptica midiendo el diámetro de 300 partículas con un micrómetro adaptado al ocular del microscopio (Villamizar *et al.*, 2010).
- **Morfología de las microcápsulas – Microscopía electrónica de barrido:** las microcápsulas fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido. Las muestras fueron fijadas en un portamuestra con glutaraldehído al 2,5% por 24 horas y fijadas nuevamente con tetraóxido de osmio al 1% por 1 hora. El portamuestra se lavó con tampón de fosfato pH 6 y se sometió a un proceso de deshidratación con etanol al 50% por 15 minutos, seguido de etanol al 70% por 15 minutos, etanol al 80% por 15 minutos y etanol al 100% por 15 minutos 2 veces. La muestra fue cubierta con oro y se tomaron fotografías en un microscopio electrónico de barrido (Villamizar *et al.*, 2010).
- **Composición de la superficie:** la composición superficial de 10 micropartículas fue determinada en el microscopio electrónico, donde se introdujo una sonda (AXIS His-165 Ultra, Kratos Analytical, Shimadzu, Japan) que analizó la composición mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X. Se utilizó el modo de transmisión fija con una energía de 80 eV y los datos se analizaron con el programa provisto por el fabricante (Villamizar *et al.*, 2010).
- **Eficiencia de microencapsulación y concentración de las micropartículas:** se preparó una suspensión de microcápsulas ajustada a una concentración de 10^9 microcápsulas por mililitro en agua destilada y se dispensó un mililitro en un tubo de ensayo. El pH se ajustó a 10 mediante la adición de NaOH 0,1N y se midió el volumen final de la muestra, la cual se agitó durante 30 minutos para permitir la disolución del polímero de las microcápsulas. Luego se cuantificó la concentración de partículas virales mediante recuento en cámara de Neubauer y se relacionó con la concentración inicial de microcápsulas, teniendo en cuenta el volumen inicial y final (Villamizar *et al.*, 2010).

Paralelamente se realizó el cálculo esperado de dicho contenido teniendo en cuenta el peso de polímero y de virus utilizados en el proceso, así como la concentración del virus puro y seco (principio activo) determinada previamente. Con dichos valores se aplicó la siguiente fórmula (Jain *et al.*, 2005):

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulación} = (\text{concentración real} / \text{concentración teórica}) \times 100$$

Contenido residual de solventes en las microcápsulas: el contenido residual de solvente en las microcápsulas fue evaluado mediante cromatografía de gases (Tuduri *et al.*, 2002). Se pesaron 20 mg de microcápsulas y se ubicaron en un vial de vidrio de 2 mL. El vial se tapó y se dejó en reposo durante 1 hora para permitir que la atmósfera interna alcanzara el equilibrio. Posteriormente, se introdujo por la tapa del vial la aguja de una jeringa y a través de esta se expuso una fibra de polidimetilsiloxano-carboxeno durante 10 minutos. La fibra fue previamente estabilizada en el cromatógrafo de gases



a 220 °C durante 5 horas. Terminado el tiempo de exposición de la fibra a la atmósfera interna del vial, esta fue recogida dentro de la aguja, retirada del vial e inyectada en un cromatógrafo de gases Termo Electrón – TRACE GC ULTRA con una columna HP-1 (100% polydimethylsiloxane), 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25 µm de espesor de la película. La inyección se aplicó utilizando una temperatura de 220 °C, la cual se mantuvo constante durante toda la evaluación. El gas de carga fue helio. La presencia de solventes fue establecida mediante un espectrómetro de masas DSQ (cuadripolo) adaptado al cromatógrafo como detector (Villamizar *et al.*, 2010).

Efecto de la microencapsulación del virus frente a la radiación ultravioleta

Para evaluar el efecto protector de la microencapsulación del virus frente a la radiación ultravioleta se realizó un bioensayo. Los tratamientos evaluados fueron el virus sin microencapsular, el virus microencapsulado y un testigo absoluto. Se prepararon suspensiones con el virus microencapsulado y sin microencapsular y se ajustaron a una concentración de 2×10^7 CI/mL o g, según fuera el caso. Se colocaron 200 µL de cada suspensión viral en 5 pozos de una fila de una microplacas de 96 pozos de fondo plano. La microplaca fue expuesta a una lámpara Repti Glo 8.0 que simula la radiación solar y emite un 33% de UVA y un 8% de UVB, ubicada a 10 cm de altura, de manera que las muestras se expusieran a la misma intensidad de radiación ultravioleta tipo B (250 W/cm²). Antes de iniciar la irradiación se cubrió la primera columna de pozos de la microplaca con papel aluminio (un pozo de cada tratamiento). Cada 15 minutos durante una hora y cada 3 horas hasta las seis se cubrió la columna siguiente de pozos, representando cada columna de la microplaca un tiempo diferente de exposición a la radiación ultravioleta. Luego se adicionaron a cada pozo 200 µL de una solución de sacarosa al 10% que contenía un colorante azul de alimentos al 1%. Con la muestra contenida en cada pozo se inocularon 30 larvas neonatas de *S. frugiperda* (Villamizar *et al.*, 2010).

Diariamente se llevó un registro de la mortalidad y las larvas muertas fueron recolectadas y almacenadas en congelador a -20 °C.

El experimento contó con dos repeticiones en el tiempo para confirmar la repetibilidad del mismo. Los resultados de mortalidad fueron corregidos con respecto al testigo para calcular el porcentaje de eficacia, utilizando la fórmula de Schneider - Orelli descrita por Zar (1999):

$$\% \text{ Eficacia} = ((A - B) / (100 - B)) \times 100$$

Donde:

A: Mortalidad en el tratamiento

B: Mortalidad en el testigo

Con los valores de eficacia se calculó el porcentaje de actividad original remanente utilizando la siguiente ecuación (Shapiro, 1989):

$$\% \text{ AOR} = (C / A) \times 100$$

Donde:

A: Eficacia del virus no expuesto

C: Eficacia del virus expuesto a la radiación UV

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey con una confiabilidad del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del efecto tóxico del polímero de recubrimiento sobre las larvas

Como se observa en la Figura 15, las larvas que consumieron el polímero presentaron una mortalidad total del 23%, similar a la observada para las larvas del tratamiento testigo (no sometidas a ningún tratamiento) que alcanzaron el 20%. El análisis de varianza no detectó diferencias estadísticas entre las mortalidades de los dos tratamientos en cada día de evaluación, confirmando que el polímero no presentó un efecto tóxico sobre el insecto.

Este polímero utilizado es un excipiente calidad farmacéutica, empleado comúnmente como agente de recubrimiento de tabletas y en procesos de microencapsulación de fármacos. Es un polimetacrilato, es decir, un polímero sintético del ácido metacrílico y su éster, considerado como un material no tóxico y no irritante (Rowe *et al.*, 2006).

Considerando que el polímero no representa riesgo alguno de toxicidad para animales y humanos, y que no afectó a las larvas neonatas de *S. frugiperda*, este fue seleccionado para continuar con el desarrollo del bioplaguicida a base de un aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus.

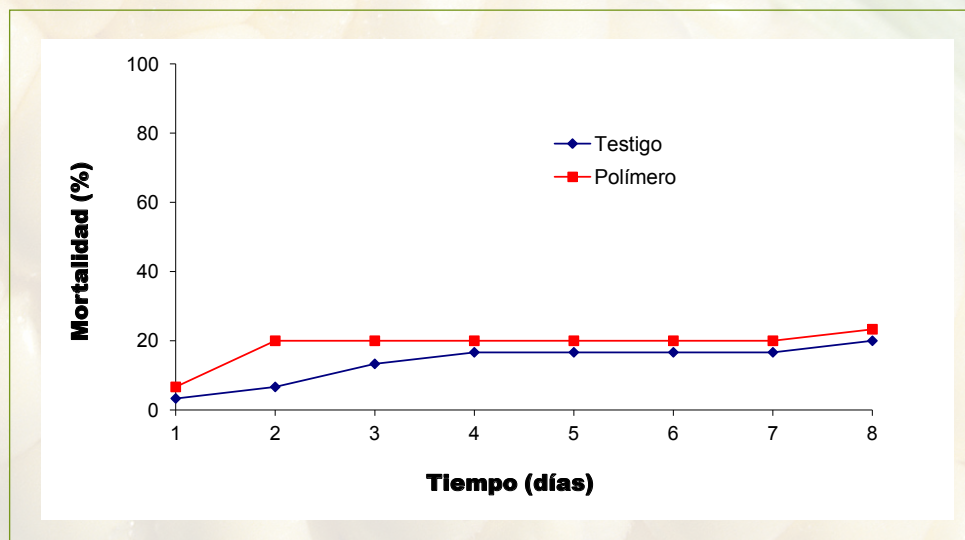


Figura 15. Mortalidad de larvas neonatas de *S. frugiperda* expuestas al polímero de recubrimiento



Determinación del efecto de diferentes solventes sobre la actividad biocontroladora del aislamiento de nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*

La exposición de las partículas virales a los 16 solventes orgánicos evaluados no afectó su actividad biocontroladora sobre larvas neonatas de *S. frugiperda*. Tanto con el virus expuesto a los solventes como con el virus no expuesto, se alcanzó el 100% de mortalidad de las larvas a los 8 días post-inoculación, valores que al ser corregidos con respecto al testigo absoluto correspondieron a una eficacia del 100%.

Considerando que para todos los tratamientos y las réplicas de los mismos se obtuvo un 100% de eficacia, se puede sugerir que el virus es compatible con todos los solventes evaluados, los cuales podrían ser utilizados en el desarrollo de una técnica de microencapsulación. Dicha compatibilidad podría deberse a que los baculovirus son virus ocluidos que presentan viriones embebidos en una matriz cristalina proteica, 'poliedro', que constituye el conocido cuerpo de inclusión (CI). El CI posiblemente evitó el contacto directo de los viriones constituidos por la nucleocápside y el ADN con los solventes, protegiéndolos de cualquier efecto detrimental de estos sobre las unidades infectivas. Así como lo reportó Caballero *et al.* (2001), los cuerpos de inclusión brindan protección a los viriones debido a que son insolubles en agua, excepto bajo condiciones extremadamente alcalinas y resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos y también a tratamientos físicos como la congelación, desecación o liofilización, características que les confieren persistencia en el medio.

Los baculovirus son muy estables desde el punto de vista fisicoquímico por la presencia y composición del CI. Otros virus también han demostrado ser estables frente a compuestos orgánicos, como es el caso de los rotavirus. Estos últimos son funcionales en un rango de pH de 3 a 9, y las partículas virales son estables por meses a 40 °C y aún a 200 °C bajo condiciones particulares. La partícula completa mantiene su integridad y su infectividad cuando es tratada con solventes orgánicos tales como éter, cloroformo o freón, lo que refleja la ausencia de lípidos en su estructura (Kurtz *et al.*, 1980; Vaughn *et al.*, 1986). Por el contrario, virus como el de la rabia que pertenece a la familia *Rhabdoviridae* son rápidamente inactivados por el calor, los rayos ultravioleta, la desecación, los solventes orgánicos y la tripsina (Montaño y Mata, 1996).

Selección de condiciones para el proceso de formación de micropartículas mediante la metodología de evaporación de solvente

El proceso de microencapsulación por el método de evaporación o extracción del solvente corresponde a un conjunto de procedimientos en los que se da como circunstancia común a todos la formación de una emulsión. La fase interna de la emulsión debe ser un disolvente orgánico que presente una solubilidad limitada en la fase externa de la emulsión, la cual puede ser agua o aceite. Para la formación de una emulsión estable y la consecuente formación de las micropartículas, es fundamental la incorporación de un agente tensioactivo en la fase externa. Una vez formada la emulsión se puede extraer el disolvente con otro líquido, el cual es soluble en el disolvente, o evaporar este último

para conseguir la precipitación gradual del polímero a medida que se va eliminando el disolvente, dando lugar a la formación de las microesferas (Chiappetta, 2006).

Concentración de tensioactivo: como se observa en la Figura 16, sólo cuando se utilizó la mayor concentración de tensioactivo, equivalente al 3%, se obtuvo la formación de micropartículas. Para el tratamiento en que se utilizó el tensioactivo al 2% se observó la formación de pequeñas masas de polímero, que no correspondieron a micropartículas sino a aglomerados de forma y tamaño variables que sugirieron la inestabilidad de la emulsión durante el proceso de evaporación del disolvente.

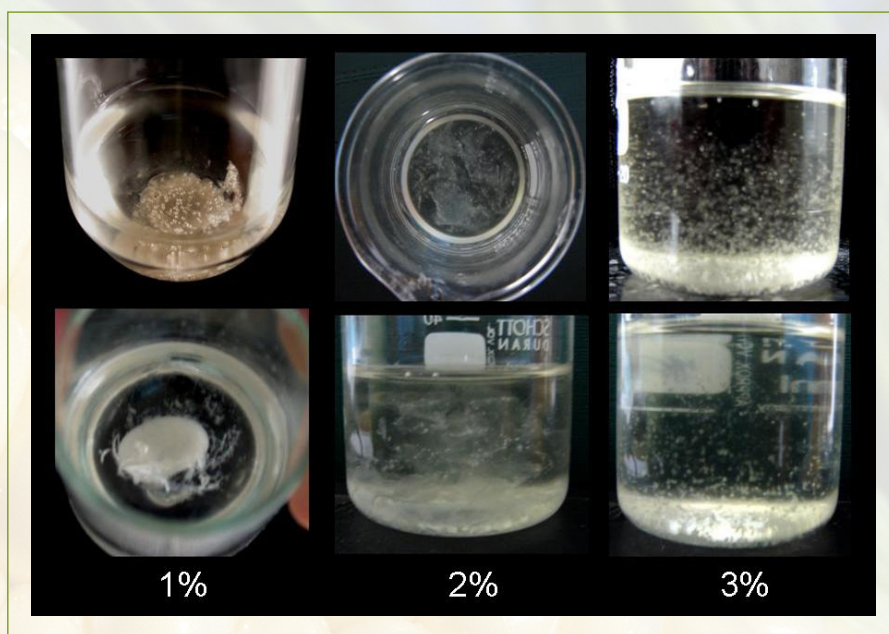


Figura 16. Efecto de la concentración de Span 80 en la formación de micropartículas de Eudragit® S100

Cuando el tensioactivo fue utilizado a la menor concentración (1%), se produjo la formación de un agregado de forma ovoide de aproximadamente 1 cm de diámetro, fenómeno que posiblemente se dio por la utilización de una baja concentración de tensioactivo, que no fue suficiente para estabilizar la emulsión. La inestabilidad de la fase dispersa (solución polimérica) favoreció la coalescencia de las gotas de dicha fase y la formación de una masa de polímero de forma ovoidal que concentró todo el Eudragit® S100.

Es posible que al utilizar la menor concentración de tensioactivo se haya presentado el fenómeno de coalescencia de gotas, obteniéndose al final del proceso la formación de una masa de polímero de gran tamaño. Dicho fenómeno probablemente se debió a que la baja concentración de polímero no fue suficiente para formar una capa continua y rígida alrededor de todas las microgotas (Aranberri *et al.*, 2006). Por el contrario, cuando la concentración de tensioactivo se incrementó al 3%, la emulsión fue estable y permitió

obtener microesferas. En un trabajo similar, Jain *et al.* (2005) seleccionaron esta misma concentración de tensioactivo como la más efectiva para formación de micropartículas de Eudragit® S100 para la liberación oral de insulina.

En la Figura 17 se presenta la morfología de la micropartículas obtenidas cuando se utilizó el tensioactivo al 3%. En esta fotografía se observa que las micropartículas son de forma esférica y superficie lisa. También es posible detectar que algunas partículas están adheridas con otras en un punto de contacto, lo que sugiere que estas se solidificaron en el momento en que se estaba produciendo su coalescencia. Este comportamiento indica que la emulsión no fue lo suficientemente estable, a pesar de usarse la mayor concentración de tensioactivo. El resultado obtenido también se puede atribuir a otras causas, como una deficiente agitación o una inadecuada relación de fases, factores que favorecen la coalescencia de las gotas (Eccleston, 2002).

Basados en los resultados, se seleccionó el tensioactivo a la concentración del 3% para continuar con el presente trabajo.

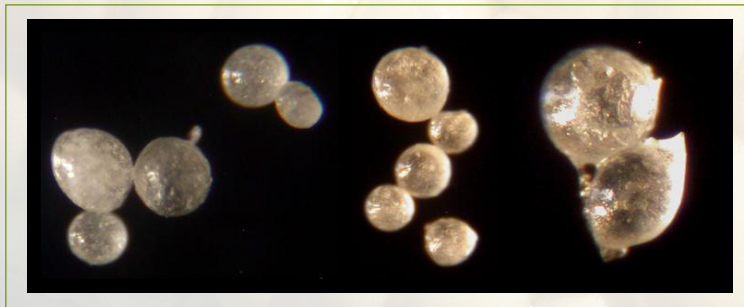


Figura 17. Micropartículas de Eudragit® S100 obtenidas mediante la técnica de evaporación de solvente (acetona) utilizando Span 80 al 3% como estabilizador de la emulsión

Relación de fases y concentración de polímero: una vez seleccionada la concentración de tensioactivo se procedió a evaluar el efecto de la relación de las fases en la emulsión y de la concentración del polímero. En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos con cada tratamiento.

Con los tratamientos en los que se utilizó la relación de fases 1:2 de la acuosa con respecto a la oleosa, no se obtuvieron micropartículas, sino la formación de un agregado de tamaño considerable para las tres concentraciones de polímero evaluadas. Este resultado sugiere que la relación de fases es inadecuada, lo que podría atribuirse a que la fase dispersa (solución del polímero en acetona) se encontraba en una alta proporción con respecto a la fase dispersante, lo que favorece la coalescencia de las gotas (Eccleston, 2002).

Cuando se redujo la cantidad de fase dispersa utilizando la relación 1:3 se obtuvo la respuesta esperada, únicamente con la concentración intermedia de polímero. Se observó la formación de micropartículas de tamaño medio $366 \pm 227 \mu\text{m}$ y el rendimiento del proceso fue del 78,9%.

Tabla 8. Efecto de la relación de fases y la concentración de polímero sobre la formación de micropartículas de Eudragit® S100. (W) fase acuosa, (O) fase oleosa

Tratamiento	W : O	Cantidad de polímero (g)	Tamaño (μm)	SD (μm)	Peso real (g)	Peso esperado (g)	Rendimiento (%)
A	1 : 2	0,20	-	-	-	-	-
B		0,25	-	-	-	-	-
C		0,30	-	-	-	-	-
D	1 : 3	0,20	-	-	-	-	-
E		0,25	367	227	0,276	0,350	78,9
F		0,30	-	-	-	-	-
G	1 : 4	0,20	285	189	0,269	0,300	89,7
H		0,25	448	198	0,277	0,350	79,1
I		0,30	-	-	-	-	-
J	1 : 5	0,20	470	404	0,265	0,300	88,3
K		0,25	856	393	0,292	0,350	83,4
L		0,30	-	-	-	-	-
M	1 : 6	0,20	812	390	0,231	0,300	77,0
N		0,25	422	142	0,269	0,350	76,9
O		0,30	-	-	-	-	-

Al reducir aún más la cantidad de fase dispersa con respecto a la fase dispersante (1:4; 1:5 y 1:6) se obtuvo formación de micropartículas para las dos menores concentraciones de polímero. En los tratamientos en que se utilizaron 0,20 g y 0,25 g de Eudragit® S100 disueltos en 5 mL de acetona se observó la formación de microesferas de tamaños diversos entre 285 μm y 856 μm. Los rendimientos en todos los casos oscilaron entre 76,9% y 89,7%.

Se puede apreciar que cuando se utilizó una relación de fases oleosa:acuosa 2:1 no se obtuvo la formación de esferas, posiblemente debido a que la baja proporción de fase oleosa aumentó la probabilidad de coalescencia de gotas de la fase dispersa y favoreció la formación de un aglomerado de tamaño considerable (Eccleston, 2002).

El comportamiento más adecuado se obtuvo con el tratamiento codificado como G, con el cual se obtuvieron microesferas con un tamaño promedio de 285 micrómetros y un rendimiento del 89,7%; por esto dicho tratamiento fue seleccionado como el punto cero para el diseño factorial multinivel.

Ajuste de condiciones del proceso de formación de micropartículas: utilizando la relación de fases y concentración de tensioactivo seleccionadas, se evaluaron las variables concentración de polímero y de núcleo, empleando el sistema de agitación mediante un agitador vertical rotatorio de brazos. Para tal fin se utilizó un diseño factorial multinivel con dos variables y tres niveles por variable. La codificación de los tratamientos se presenta en la Tabla 9.

Con todos los tratamientos y repeticiones de los mismos se obtuvo la formación de partículas de tamaño y forma variable. Por su parte, con los tratamientos A, B y C, en los que se utilizó la menor concentración de núcleo, se obtuvieron partículas de formas esféricas,



Tabla 9. Tratamientos del diseño factorial multi-nivel para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

Núcleo (g)	Polímero (g/5 mL)		
	0,150	0,200	0,250
0,050	A	B	C
0,075	D	E	F
0,100	G	H	I

ovaladas y similares a una gota. La mayoría presentó una superficie lisa y con algunos poros, como se puede observar en la Figura 18.

La morfología de las partículas cambió al aumentar la concentración de polímero al nivel más alto (+1), ya que se obtuvieron agregados de forma irregular y superficie rugosa. Para los tratamientos en los que se empleó el nivel intermedio de concentración de núcleo (nivel 0) la morfología de las partículas cambió a medida que aumentó la concentración de polímero evaluada. Las partículas obtenidas con la menor concentración de polímero (tratamiento D) fueron de forma irregular y superficie rugosa. Con el nivel intermedio de polímero (tratamiento E) se produjeron partículas con forma más regular (alargada, ovoide, forma de gota o algunas esféricas). Por último, con la mayor concentración de polímero (tratamiento F), todas las partículas obtenidas fueron esféricas y con irregularidades en la superficie (Villamizar *et al.*, 2010).

Para los tratamientos en los que se empleó la mayor concentración de núcleo (G, H e I), en todos los casos se produjeron partículas de tamaño variable y superficie irregular (Figura 18).

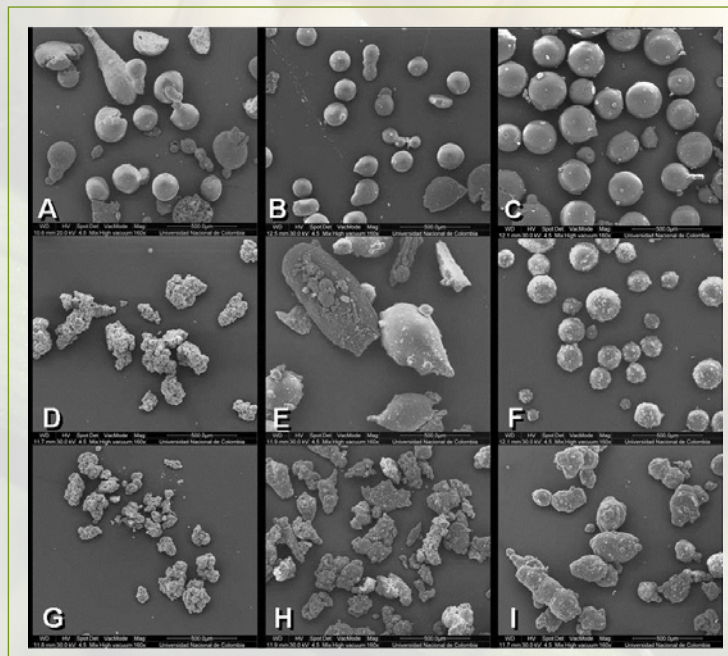


Figura 18. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las micropartículas de Eudragit® S100 elaboradas con el método de evaporación de solvente y agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

La morfología de las micropartículas se ve influenciada por las condiciones propias del proceso. La solubilidad del polímero en el solvente, su concentración y la volatilidad del solvente empleado, son probablemente los factores más influyentes (Raula *et al.*, 2004; Li, 2005).

En cuanto al tamaño, el diámetro medio de las partículas osciló entre 173 y 300 μm (Tabla 10). Los menores tamaños se obtuvieron con los tratamientos C, H e I, con diámetros de 173, 193 y 197 μm respectivamente.

Tabla 10. Tamaño medio de partícula de los tratamientos evaluados en el diseño factorial multinivel para la formación de micropartículas de Eudragit® S100, mediante el método de evaporación de solvente y utilizando agitación vertical rotatoria.

Tratamiento	Tamaño medio de partícula (μm)				SD
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	
A	273	298	264	278	18
B	331	276	291	300	28
C	188	170	163	173	13
D	288	248	254	263	21
E	210	291	267	256	42
F	210	224	220	218	8
G	291	287	298	292	5
H	194	179	205	193	13
I	209	199	181	197	14

En la Figura 19 se presenta la superficie de respuesta obtenida para la variable tamaño de partícula, donde se observa que la superficie del plano tiene una marcada pendiente negativa a medida que aumenta la concentración de polímero, sin observarse aparentemente un efecto significativo de la concentración de núcleo. La superficie de respuesta sugiere que con el tratamiento que involucra el mayor nivel de los dos factores se obtendría la mejor respuesta, correspondiente al menor diámetro de las partículas.

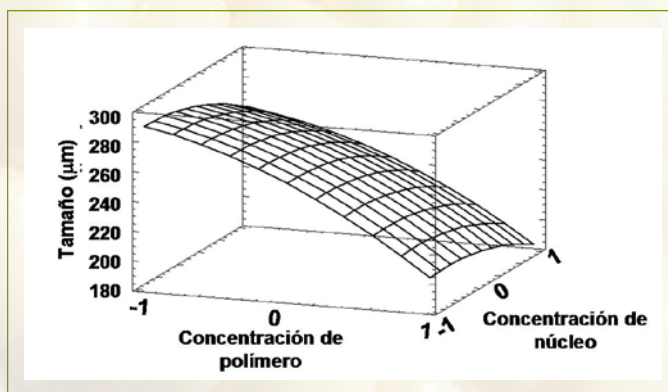


Figura 19. Superficie de respuesta de los diámetros medios de partícula en función de la concentración de polímero y de núcleo para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

En la Figura 20 se presenta el diagrama de Pareto, que muestra claramente la influencia de los factores evaluados y sus interacciones en la respuesta tamaño de partícula.

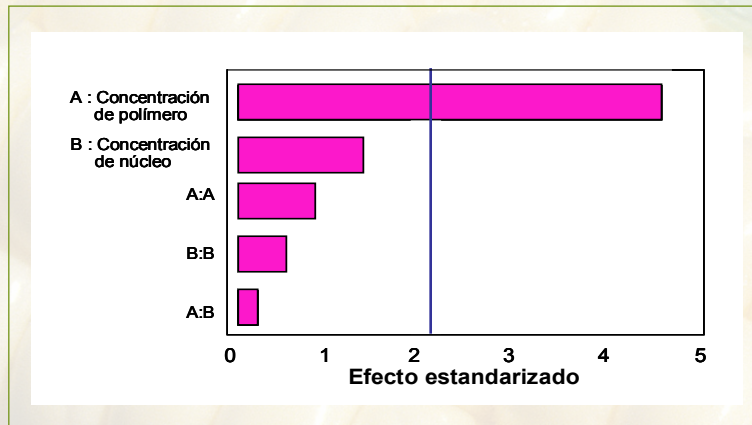


Figura 20. Diagrama de Pareto de la influencia de la concentración de polímero y de núcleo sobre los diámetros medios de partícula para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria.

Según el diagrama, el único factor que tuvo una influencia significativa en la respuesta fue el factor concentración de polímero (A), confirmando lo sugerido anteriormente con respecto a la influencia que tiene la viscosidad de la fase dispersa, tanto en el tamaño como en la morfología de las micropartículas (Raula *et al.*, 2004).

En cuanto al rendimiento, este osciló entre el 76,7% para el tratamiento A y el 89,6% obtenido con el tratamiento I (Tabla 11). Utilizando el sistema de agitación vertical, la mayoría de los tratamientos presentaron rendimientos adecuados, es decir, superiores al 80% (Amorim y Ferreira, 2001; Alavi *et al.*, 2002).

Tabla 11. Rendimiento de los tratamientos evaluados en el diseño factorial multinivel para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 mediante el método de evaporación de solvente y utilizando agitación vertical rotatoria.

Tratamiento	Rendimiento (%)			Promedio	SD
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
A	82,0	76,0	72,0	76,6	5,0
B	98,0	79,5	91,0	89,5	9,3
C	92,4	78,4	94,4	88,4	8,7
D	97,1	71,4	66,3	78,2	16,5
E	93,1	61,5	91,3	81,9	17,7
F	96,3	82,5	72,0	83,5	12,2
G	86,0	96,4	85,2	89,2	6,2
H	91,7	69,0	73,0	77,9	12,1
I	86,3	89,1	93,4	89,6	3,6

En la Figura 21 se observa la superficie de respuesta obtenida para la variable *Rendimiento*, donde se puede determinar un máximo en la respuesta cuando el factor concentración de polímero tiende al nivel +1 y el factor concentración de núcleo tiende al nivel -1. Sin embargo, cuando el polímero se utiliza a la mayor concentración se puede observar que la respuesta tiene un mínimo hacia el nivel 0 del factor concentración de núcleo y aumenta cuando dicho factor se incrementa al nivel +1, así como cuando se reduce al nivel -1.

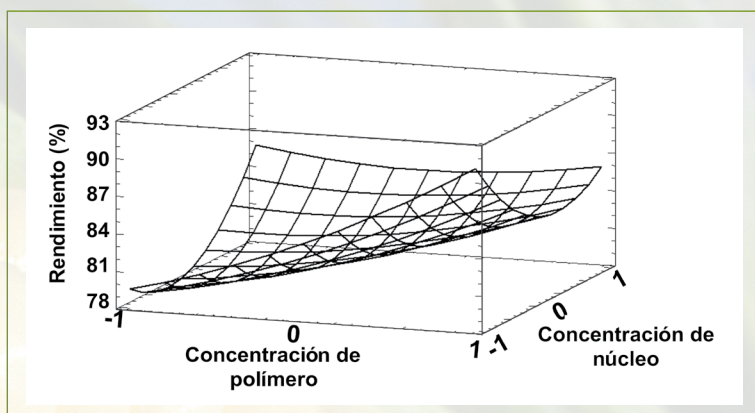


Figura 21. Superficie de respuesta de la variable *Rendimiento* en función de la concentración de polímero y de núcleo para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

En el diagrama de Pareto para esta variable respuesta (Figura 22) se presenta la influencia de los factores sobre el rendimiento del proceso; se puede observar que ninguno de los factores de forma independiente o en interacción tuvo, desde el punto de vista estadístico, un efecto significativo (Villamizar *et al.*, 2010).

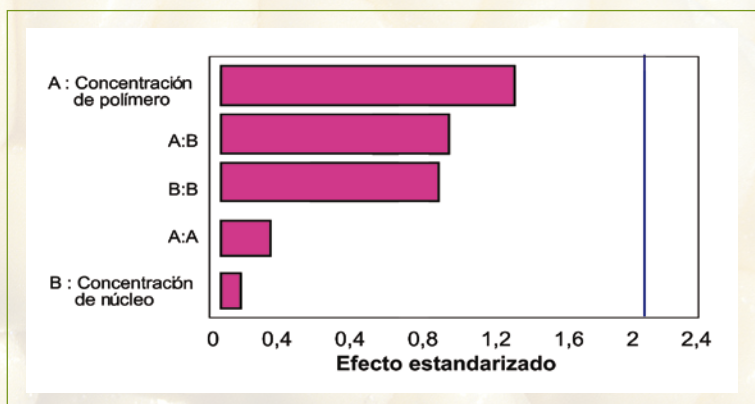


Figura 22. Diagrama de Pareto de la influencia de la concentración de polímero y de núcleo sobre el rendimiento, para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria.

El programa Statgraphic 4.0 representó las interacciones y efectos de los factores y generó la superficie de respuesta que se observa en la Figura 23, en la cual se predice cómo se podría obtener la respuesta deseada expresada como deseabilidad teniendo en cuenta el efecto de la interacción de los factores.

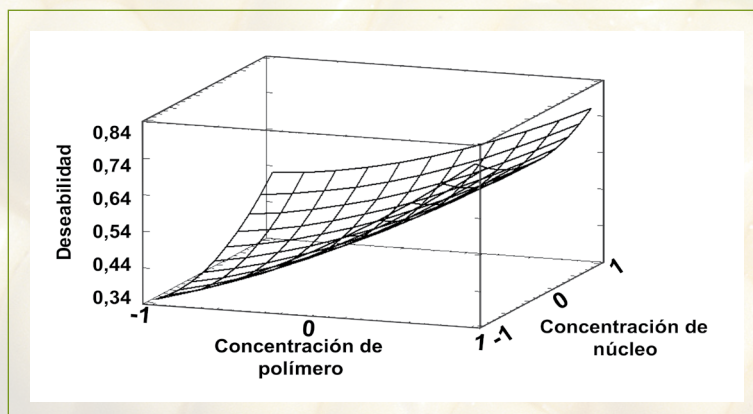


Figura 23. Superficie de respuesta para la deseabilidad de la respuesta durante la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria.

Considerando que la deseabilidad óptima tiende hacia 1, se podría sugerir que para obtener el mayor rendimiento y el menor tamaño de partícula utilizando el método de evaporación de solvente con agitación vertical rotatoria la concentración de polímero debe tender hacia el nivel +1, independientemente de la concentración de núcleo utilizada.

El programa además estableció los valores óptimos para cada factor, que permitirían obtener la mejor respuesta para las dos variables (menor tamaño y mayor rendimiento). Los niveles óptimos según dicho modelo correspondieron al nivel +1 de concentración de polímero (0,200 g de polímero/5 mL de acetona) y al nivel -1 de concentración de núcleo (0,050 g de núcleo).

El punto óptimo correspondió al tratamiento C evaluado en el diseño factorial, y las respuestas obtenidas para este fueron un diámetro promedio de $173 \pm 13 \mu\text{m}$ y un rendimiento del $88,0 \pm 8,7\%$. El rendimiento no fue significativamente diferente del estimado en la predicción; no obstante, el diámetro de las partículas obtenido experimentalmente fue significativamente menor que el estimado por el modelo, razón por la que el tratamiento C fue seleccionado para llevar a cabo la microencapsulación de las partículas virales (Villamizar *et al.*, 2010).

Microencapsulación del virus

Tamaño de partícula: el tamaño medio de las microcápsulas fue de $198 \pm 62 \mu\text{m}$. Este valor no fue significativamente diferente del valor teórico y práctico determinado previamente para este tratamiento utilizando un núcleo trazador, lo cual sugiere repetibilidad en las características de las partículas elaboradas usando este procedimiento (Villamizar *et al.*, 2010).

Morfología de las microcápsulas – Microscopía electrónica de barrido: las microcápsulas obtenidas en los tres lotes fueron de forma esférica y superficie lisa, con algunas irregularidades y escasos poros. En la Figura 24 se presenta la microfotografía de una micropartícula donde se pueden observar dichas características (Villamizar *et al.*, 2010).

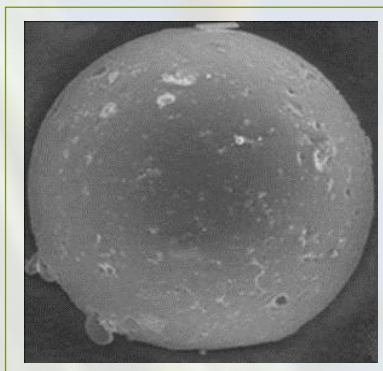


Figura 24. Morfología de las micropartículas obtenidas al encapsular el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 con Eudragit® S100.

Composición de la superficie: la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X permite determinar cualitativa y cuantitativamente todos los componentes superficiales de las partículas en una profundidad de 5 a 10 nm, a excepción del hidrógeno y el helio (Ramos *et al.*, 2007). Así, el espectro obtenido mostró la misma composición cualitativa en todas las muestras, observando que la superficie está compuesta principalmente por carbono y oxígeno. No se detectó señal para nitrógeno, lo que indicaría que las partículas virales se encuentran distribuidas en el interior de las micropartículas, ya que si estuvieran superficialmente, su composición proteica habría generado dicha señal (Villamizar *et al.*, 2010).

Eficiencia de microencapsulación y concentración de las micropartículas: se obtuvo para los tres lotes una concentración promedio de $2,62 \times 10^9$ CI/g, que presentó una desviación estándar (DS) del 19,42%. Teniendo en cuenta que la concentración del principio activo (virus liofilizado) era de $2,94 \times 10^{10}$ CI/g y que para cada lote se emplearon 0,050 g del mismo y 0,250 g del polímero (0,30 g de sólidos totales), la concentración teórica de las microcápsulas obtenidas debía ser de $4,9 \times 10^9$ CI/g. Con este valor teórico y la concentración experimental de cada lote de micropartículas se calcularon los porcentajes de eficiencia que se presentan en la Tabla 12 (Villamizar *et al.*, 2010).

Tabla 12. Eficiencia del proceso de microencapsulación (Villamizar *et al.*, 2010).

Lote	Concentración experimental (CI/g)	Eficiencia de microencapsulación (%)
1	$2,48 \times 10^9$	50,69
2	$3,18 \times 10^9$	64,90
3	$2,19 \times 10^9$	44,69
Promedio	$2,62 \times 10^9$	53,43
DS	$5,08 \times 10^8$	10,37

La eficiencia del proceso de microencapsulación fue del $53 \pm 10\%$. El proceso mostró una baja eficiencia, ya que se produjo una pérdida significativa del principio activo que osciló entre el 25,31% y el 35,10%. La eficiencia del proceso de encapsulación depende de



muchos factores como: los materiales utilizados, la solubilidad de los componentes y su coeficiente de reparto, entre otros (Kim *et al.*, 2002).

Contenido residual de solventes en las microcápsulas: el pico más alto del cromatograma, correspondiente al compuesto más abundante, presentó un tiempo de retención de 6,48 minutos y fue identificado principalmente como n-Hexano, solvente empleado para el lavado de las micropartículas. Este resultado indica que las partículas obtenidas presentan cierto contenido residual de este solvente, lo que podría sugerir que el tiempo de secado no fue suficiente para su completa eliminación, requiriéndose un mayor tiempo o la utilización de un proceso adicional como la extracción con vacío, que asegure la eliminación total del hexano de las microcápsulas (Villamizar *et al.*, 2010).

La mayoría de técnicas de microencapsulación emplean solventes orgánicos para disolver polímeros lipofílicos, razón por la cual es común que las micropartículas presenten residuos de los solventes empleados (Bitz y Doelker, 1996).

En ningún caso se detectó acetona, solvente utilizado para disolver el polímero, lo que indica que el tiempo de proceso fue suficiente para permitir la completa evaporación de dicho solvente.

Efecto de la microencapsulación del virus frente a la radiación ultravioleta

La eficacia del virus microencapsulado sin irradiar fue del 67%, mientras que la del virus sin microencapsular fue del 81,8% (Tabla 13). El análisis de varianza detectó diferencias estadísticas entre los dos tratamientos ($p < 0,05$), lo que sugiere que la microencapsulación de los cuerpos de inclusión afectó la eficacia del virus. Esto puede deberse a que la velocidad de liberación de las partículas virales se ve afectada por el polímero que lo recubre, en este caso el Eudragit® S100, pudiendo retrasar el proceso de infección viral. Por ejemplo, Lee *et al.* (2000) determinaron que para la liberación total del activo a partir de microesferas de Eudragit® S100 se requerían aproximadamente 10 horas.

Tabla 13. Porcentajes promedio de eficacia, actividad original remanente (AOR) e inactivación del virus microencapsulado y sin microencapsular, expuesto a la radiación ultravioleta tipo A y B durante 6 horas.

Tratamientos	Exposición UV (min)	Eficacia (%)	AOR (%)	Inactivación (%)
Virus microencapsulado	0	65 ± 7	---	---
	15	70 ± 4	100	0,0
	30	63 ± 4	96	3,6
	45	61 ± 8	93	7,1
	60	49 ± 8	75	25,0
	180	49 ± 11	75	25,0
	360	26 ± 4	39,3	60,7
Virus puro (sin microencapsular)	0	81 ± 8	---	---
	15	72 ± 7	88,6	11,4
	30	54 ± 8	65,7	34,3
	45	12 ± 4	14,3	85,7
	60	4 ± 5	4,8	95,2
	180	1 ± 1	1,0	99,0
	360	1 ± 1	1,0	99,0

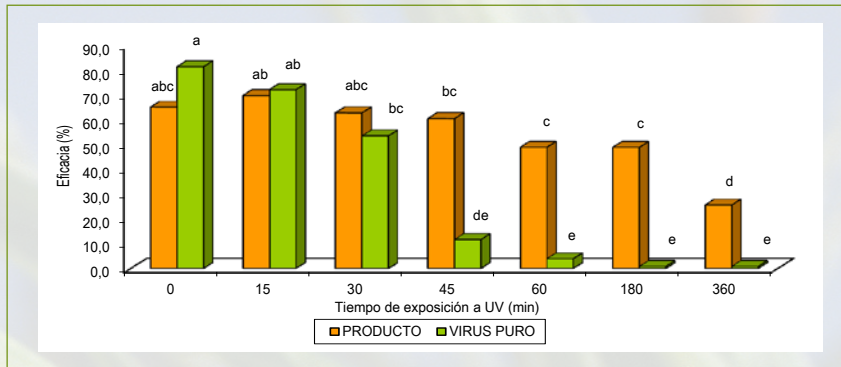


Figura 25. Eficacia de las microcápsulas del aislamiento NPV003 irradiadas con luz ultravioleta tipo A y B. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (95%)

En la Tabla 13 y en la Figura 25 se presentan los resultados de actividad original remanente (AOR) obtenidos para cada tiempo de exposición evaluado. El virus sin formular mostró una actividad original remanente inferior al 5% después de 60 minutos de exposición, entretanto que el virus microencapsulado conservó una actividad del 75% después de los mismos 60 minutos de exposición a la radiación, la cual se redujo al 40% después de 6 horas.

La prueba de comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas entre la actividad original remanente del virus microencapsulado y sin microencapsular después de 15 y 30 minutos de irradiación. Sin embargo, la eficacia del virus microencapsulado a partir de los 60 minutos y hasta las 6 horas de exposición a la radiación fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) a la obtenida para el virus sin formular, lo que sugiere que el virus microencapsulado fue significativamente más fotoestable que el virus puro.

El virus puro fue inactivado a partir de los 30 minutos de exposición con respecto al virus sin irradiar, alcanzando una inactivación superior al 95% desde los 60 minutos. El virus microencapsulado perdió su actividad con respecto al virus sin irradiar a las 6 horas de exposición, con un 60% de inactivación, confirmando la protección brindada por el recubrimiento de las partículas con Eudragit® S100. Este resultado es muy interesante, considerando que el virus microencapsulado presentó una inactivación mucho menor que la del virus sin formular.

La fotoestabilidad ofrecida por la microencapsulación depende del polímero utilizado para la formación de la pared (Barbosa *et al.*, 2005). En el presente estudio se obtuvieron resultados promisorios con el Eudragit® S100, aunque en el estudio de Ignoffo y Batzer (1971) se demostró que la microencapsulación del nucleopoliedrovirus de *Heliothis zea* HzSNPV con etilcelulosa no fotoestabilizó el virus durante 4 horas de exposición a la radiación ultravioleta artificial.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la microencapsulación tuvo un efecto fotoestabilizador de las partículas virales, si bien algunas alcanzaron a ser afectadas por la radiación UV, posiblemente aquellas que estaban ubicadas hacia la parte externa de las micropartículas. Este comportamiento lo sugirieron Barbosa *et al.* (2005), quienes evaluaron la estabilidad frente a la luz de microcápsulas que contenían un



carotenoide como principio activo. Estos autores encontraron dos cinéticas de degradación del carotenoide: una rápida, relacionada con la fotodegradación de la sustancia ubicada en la superficie de las microcápsulas, y una degradación lenta, que se atribuyó a la sustancia encapsulada en el interior de las partículas.

La fotoprotección ofrecida por la micropartícula podría ser incrementada mediante la inclusión de filtros ultravioleta, antioxidantes o de pigmentos que en diversos trabajos han demostrado su efectividad y podrían ser microencapsulados conjuntamente con el virus.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló un proceso de microencapsulación de las partículas virales con Eudragit® S100, que permitió fotoestabilizar el virus frente a los efectos deletéreos de la radiación ultravioleta. Sin embargo, el proceso debe ser optimizado para reducir el tamaño de las partículas y evitar la utilización de solventes orgánicos costosos y con problemas de toxicidad.

Bibliografía

- ALAVI, A.; SQUILLANTE, E.; MEHTA, K.** (2002). Formulation of enterosoluble microparticles for an acid labile protein. *Journal of Pharmaceutics and Pharmaceutical Science*. 5: 234-244.
- AMORIM, M.; FERREIRA, J.** (2001). Microparticles for delivering therapeutic peptides and proteins to the lumen of the small intestine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 52: 39-44.
- ARANBERRI, I.; BINKS, B.; CLINT, J.; FLETCHER, P.** (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 7(3): 211-231.
- ASANO, S.** (2005). Ultraviolet protection of a granulovirus product using iron oxide. *Applied Entomology and Zoology*, 40 (2): 359-354.
- BARBOSA, M.; BORSARELLI, C.; MERCADANTE, A.** (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparation. *Food Research International*. 38: 989-994
- BITZ, C.; DOELKER, E.** (1996). Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 131: 171-181.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ- FERBER, M.; WILLIAMS, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. Navarra, España. 518 p.
- CHIAPPETTA, D.** (2006). Microencapsulación de medicamentos. URL: <http://www.fyb.uba.ar/farmacotecnia%20I/Microencapsulacion.htm>. (Consulta: agosto de 2009).
- ECCLESTON, G.** (2002). Emulsions and Microemulsions. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker Inc. New York. Vol. 9. p. 1066-1085.
- FARRAR, R.; RIDGEWAY, R.** (2000). Laboratory evaluation of selected spray adjuvant as ultraviolet light protectants for the nuclear polyhedrosis virus of the celery looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomological Science* 35: 239-250.

- FLORENCE, A.; AITWOOD, D.** (1998). *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Mac Millan Press LTD. Third edition. Easton. p. 357-358.
- HIRECH, K.; PAYAN, S.; CARNELLE, G.; BRUJES, L.; LEGRAND, J.** (2003). Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerization. *Powder Technology*. 130: 324-330.
- IGNOFFO, C.; BATZER, O.** (1971). Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. *Journal of Economic Entomology*. 64(4): 850-853.
- IGNOFFO, C.; GARCÍA, C.; SAATHOFF, S.** (1997). Sunlight stability and rain-fatness of formulations of Baculovirus *Heliothis*. *Environmental Entomology* 26 (6): 1470-1474.
- JAIN, D.; PANDA, A.; MAJUMDAR, D.** (2005). Eudragit® S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*. 6(1): 100-107.
- KIM, B.; HWANG, S.; PARK, H.** (2002). Preparation and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *Journal of Microencapsulation*. 19: 811-822.
- KURTZ, J.; LEE, T.; PARSONS, A.** (1980). The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *Journal of Hospital Infection* 1(4):321-325.
- LEE, J.; PARK, T.; CHHOI, H.** (2000). Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion. *International Journal of Pharmaceutics*. 196: 75-86.
- LI, D.** (2005). Microencapsulation of proteins with Eudragit S100 polymer. Thesis of Master of Applied Science Engineering. University of Adelaide.
- MONTAÑO, H.; MATA, A.** (1996). Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. *Ciencia Veterinaria*. 7: 68-91.
- RAMOS, E.; SALLES, C.; BITTENCOURT, E.; ÁGUILA, Z.** (2007). Combinación de análisis de XPS y análisis goniométrico para el estudio de la remoción del aceite superficial en aluminio utilizando plasma frío. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia*. 41: 108-119.
- RAULA, J.; EERIKAINEN, H.; KAUPINEN, E.** (2004). Influence of the solvent composition on the aerosol synthesis of pharmaceutical polymer nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 284: 13-21.
- ROWE, R.; SHESKRY, P.; OWEN, S.** (2006). Handbook of pharmaceutical excipients. 5th edition, Pharmaceutical Press. Gran Bretaña. p. 554.
- SHAPIRO, M.** (1989). Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economical Entomology*. 82: (2) 548-550.
- TRAPANI, A.; LAQUINTANA, V.; DENORA, N.; LOPEDOTA, A.; CUTIGNELLI, A.; FRANCO, M.; TRAPANI, G.; LISO, G.** (2007). Eudragit RS100 microparticles containing 2-hidroxypropyl-β-cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30: 64-74.
- TUDURI, L.; DESAUZIERS, V.; FANLO, J.** (2002). Dynamic versus static sampling for the quantitative analysis of volatile organic compounds in air with polydimethylsiloxane-Carboxen solid-phase microextraction fibers. *Journal of Chromatography A*. 963: (1-2) 49-56.
- VAUGHN, J.; CHEN, Y.; THOMAS, M.** (1986). **Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine.** *Applied Environmental Microbiology*. 51: 391-394.
- VILLAMIZAR, L.; BARRERA, G.; COTES, A.; MARTÍNEZ, F.** (2010). Eudragit® S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and in vitro virus release. *Journal of Microencapsulation*, 27(4): 314-324.
- ZAR, J.** (1999). *Biostatistical Analysis*. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey. p. 523.

