



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON  
TIZOXANIDA POR EL MÉTODO DE EMULSIÓN”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA:

**ERICK HUMBERTO SALGADO BAHENA**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. JESÚS RIVERA ISLAS**

CUERNAVACA, MORELOS.

DICIEMBRE 2023



Fecha: 29 de agosto del 2023  
Asunto: VOTOS APROBATORIOS  
Medio de notificación: Electrónico  
Folio: FF/D/SD/JLF/114/2023

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES  
U.A.E.M  
PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON TIZOXANIDA POR EL MÉTODO DE EMULSIÓN”** presentado por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Erick Humberto Salgado Bahena (10010877)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**Jurado**

Dr. Julio César Rivera Leyva

Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

*Firma electrónica*

Dra. Adriana Valladares Méndez

Dra. Blanca Estela Duque Montaña



Atentamente

**“Por una humanidad culta  
una Universidad de excelencia”**

**M.P.D. REYNA AMÉRICA SERRANO LÓPEZ  
SECRETARIA DE DOCENCIA**

C.c.p.: archivo  
\*BEDM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ** | Fecha:2023-08-30 17:43:34 | Firmante

EyoduEyWZ0q9Zl5OOSxzxLe3wXds9fWDcCd8HujvUK8yoqKlv5k4TuwxJKuBWsw7Fe6mlPg YGO2ViFSsm2o06sRUdaWTG7dW5pN32SHMxfkNfZM4bCQiahWM13rBqBrWhIF Nzk6P/ifi41qtRUgKd7ZSI8MHB/UD5V4fBxk+ZMTbm2kVxpGOXmtnpjR8sCTHB6+mV3/iXuVmQj1jKSW72+GWhYZi6JRASUaHnyZLRFd43kEh73sQNORZE09OTIFproX1Le+z4 gJyaPhtpnYL7JDyoy2aP6WdPZ9dgpKMYXzoeheprZc9AzlPcncACgfWzsYVXObKn5b7vBVeFLGQOWWQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ZR1FQesbq](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/iC9iqpFbwXYbto1T320KqsQl09emQHRD>



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA | Fecha:2023-09-28 20:10:16 | Firmante**

198S6wvaq9k2g2CeOqZBkzV8IOR6Ch+cyNK2FdmUauvKmk/gEkqM0qWtx2L/voV/8TPdEJMhT1WqNZ+kKfTU3Uof2ypifZLp7crqL7Lfl8xRiVOTIKUITcZGLbsvCuMC5+pipUM0s  
c3IWL+aA1E4la0a3pO6M//AAMqrWOSVvb0ZETGnVqmANZ7saZOoGorv9nG9R0uC+p+XRFJmj1nRTIUV3CPHvcJ5+J6zvo9tRP/T0CNPdLgCVMGz2TV6J7D+sMc86TfAzzHv1f  
F0bQYAlsCsOjT2/6w9ueu5MyGWM1DwSLcXhZBb+9fMXFgJ1KcktaDcagMZZE/EomlUmT+WA==

**JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2023-09-28 20:17:15 | Firmante**

e0mb0vUyYt5QJDorJBXz7z2SLbE9pZzYswotTS+d0dDGwZiqgAYYEuF774v8Yaw8HWsVC4QlaQPDooPg5WA3KIY6C0V8sPxWCBs1/MDEhNEnQvbMFezcMyYrEA3ISErfYd  
U6KE73iRR6LBo875A7aA3mqRPrqfLej9LEdtKcPTP6JinQMMM0Vl6vSMOvS45/IP/Zx8H1Ru92kk4GCKxYGuWUB4SwjGVmduG++e2YhP088AbamZ/19Hw26jkf/Zjid55JMx6JM  
bkhiAJ0I0g5BS/QMYMjddLHsTk9P4PiREAzLZBhd+yf71Q9UUDb7KPUULThjeu3yK6sgdYmW==

**SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-09-28 21:19:51 | Firmante**

dWfBiHTu9rAJGm1+H+N0h5PZec3ud0nYhn7Ref/a4Wv3zo0hjH1ecBPEO0B935mOW6U6pX6zIPaZD5DBRAwROimwxVDyEHG6Xaony4C9vM6c5TLIbWTcwtbD5ehCRS3jA6g  
58vCQAGXW7tbhWRVigUqt5ldtlpC6ZTjScJKW3YADeV+nSbD9Eu9RSy11iMYFnbx94xzvLi+vF991nmdwLAQbvKuS5y6FoJiGI2ula+4BS8PjyMW7FLa6YRMtUMfNyrkoGaj9egz  
1gxJsJhm3gFxdV5z8DK41C0xnP8S4AedPnoPyNcbOtApAN7F63GAIAtnUB5xDTKNbAWOg==

**ADRIANA VALLADARES MENDEZ | Fecha:2023-09-29 11:51:03 | Firmante**

s8kT17pO2G5yasuHfwnTK5HuNDwJ0VzTPuPccbYc1T9q/0QsFBTnNXWpJW6i3SvL/KW4PsZc/nF1+EUaNiAT3Cg/Hwr9nda1IAgQh88WdKtB6SPL6kSqb9sYzNDJ2Tec6xXj8B2e  
g7dL/Bt0xGjsiZHsAtrMinFdJeUHnTp5lG8GnaGtp7ErqlwRH7GWSQV+hGwrQfNIXKEEUG+xZITNlcp/XS5l6p1toOzXEtEdlcnrGzLeWBkylruJ/TSiT9h+eZcvBvc2Y0B93loi0IEejU  
Zv86hBlk3vFHEpkgCkGwZBR+6iCM6hoVxPki+tn0cy8uGEgoVzWA7Xp7/e6YDA==

**BLANCA ESTELA DUQUE MONTAÑO | Fecha:2023-09-29 16:00:13 | Firmante**

mB9BXRbDA6xSTY9j88GYP7vAwjToPFaH+ft+1BrChWoE6831A5KbpYIBEI6iR2ZMysNpDX8TSghWJ9a3DjhKGFh70Om8OSKXpM7JMWObj2bA36QnomH1//BdPpNfxPBwlwK  
uoxhCgyKI8YjzdOUWjVWVlS91CN3DLSLp2WBUDcsoSJKcFeD6/97Po+A25nVOq/QjBFXALsC90jmwWcyu2CBZmwa+KU5DtuoCaH7LzOiY3anFFmiXMe2a6sSKC3g6P4dDUR  
Lr+YD2bKC37rz1d9r0aVdP1w8PcqG+e9tYRlnplaaHzzwOv762T9nlUz+43yZD5zQnVMMX2cVA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



N6nqygWQw

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/p3kGXmuJvQFzWA4DZs3fXzU4ZfoqFJ1>

La realización del presente trabajo de tesis de licenciatura contó con financiamientos otorgados por el CONAHCYT, a través de una beca de con No. 792615 y del proyecto Ciencia de Frontera 2019 No. 1046617. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Tecnología Farmacéutica (Laboratorio 4) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. Jesús Rivera Islas.

## DEDICATORIAS

A mis padres, esta tesis y todo lo que conlleva es el resultado de su esfuerzo y sacrificio de muchos años trabajando y criándonos a mí y a Ángel, quiero dedicarles este logro para agradecerles sinceramente, realmente valoró mucho todo lo que han hecho para que yo y Ángel lleguemos a tener una buena vida. Su apoyo y aliento constante han sido fundamentales para mí. Los amo mucho, gracias por todo.

A Candy, mi amiga más cercana, mi confidente, y mi compañera en todo, has hecho cada uno de mis días diferentes, me has demostrado que puedo confiar plenamente en ti, en tu apoyo incondicional, me has dado aliento y sabiduría, me has ayudado a ser un mejor hombre. Gracias por llegar a mi vida, le pido a Dios que sigas en ella siempre. Te amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco sinceramente al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el generoso apoyo económico otorgado a través de la beca Ciencia de Frontera 2019, número de referencia 1046617. Esta financiación ha sido fundamental para llevar a cabo mi investigación.

Expreso mi profundo agradecimiento al Dr. Jesús Rivera Islas, mi director de tesis, por su apoyo, paciencia, confianza y orientación decisiva que fueron fundamentales para la culminación exitosa de este proyecto. Además, agradezco su generosidad al proporcionarme conocimientos que trascendieron los límites de mi investigación, abarcando áreas como el análisis químico, la investigación científica y la redacción académica.

Agradezco sinceramente al Dr. Julio Cesar Rivera Leyva por el invaluable apoyo brindado al instruirme en el campo del análisis de medicamentos, así como en el desarrollo y validación de métodos. Su experiencia y dedicación han sido fundamentales para mi formación profesional.

Agradezco a la Bióloga Patricia Rueda del Laboratorio 23 Edificio Norte del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme utilizar equipos indispensables para el desarrollo de mi tesis.

Agradezco al Dr. Sergio Alcalá Alcalá por su apoyo en el proceso de liofilización, el cual desempeñó un papel significativo en la obtención de los resultados de este proyecto. Además, su colaboración durante mi investigación para abordar y resolver problemas que surgieron durante el desarrollo del trabajo académico.

Expreso mi sincero agradecimiento a mis revisoras, Dra. Adriana Valladares Mendez, Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica y Dra. Blanca Estela Duque Montaña por su valioso tiempo y dedicación en la revisión de mi tesis. Sus comentarios expertos y sugerencias han sido fundamentales para mejorar la calidad de mi trabajo académico.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	XV
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 Nitazoxanida	8
2.1.1 Estructura química y características de nitazoxanida	8
2.1.3 Farmacocinética de nitazoxanida	9
2.1.4 Farmacodinamia de nitazoxanida	10
2.1.5 Indicaciones terapéuticas de nitazoxanida	15
2.2 Tizoxanida	15
2.2.1 Estructura química y características de tizoxanida	15
2.2.2 Propiedades fisicoquímicas de tizoxanida	15
2.2.3 Método de síntesis de tizoxanida	15
2.3 Validación de métodos cromatográficos	16
2.3.1 Definiciones	16
2.3.2 Parámetros de desempeño según el tipo de método analítico	17
2.4 Nanotecnología farmacéutica	17
2.4.1 Definición de nanopartícula	18
2.4.2 Clasificación de nanopartículas	18
2.4.3 Métodos para la elaboración de nanopartículas poliméricas	19
2.4.4 Caracterización de las nanopartículas	21
2.5 Polímeros de uso farmacéutico	23
2.5.1 Policaprolactona	23
2.6 Diseño de Experimentos	24
2.6.1 Diseños Factoriales	25
3. ANTECEDENTES	27
3.1 Antecedentes sobre nitazoxanida	27
3.2 Antecedentes sobre nanotecnología farmacéutica	27
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. PROPOSITO	31
	VIII

6. HIPÓTESIS	31
7. OBJETIVOS	32
7.1 Objetivos generales	32
7.2 Objetivos específicos	32
8. MATERIALES Y METODOLOGÍA	32
8.1 Materiales	32
8.2 Equipos, instrumentos y software	32
8.3 Obtención de nitazoxanida y tizoxanida	33
8.3.1 Obtención de nitazoxanida	33
8.3.2 Síntesis de tizoxanida	33
8.4 Preparación de soluciones	34
8.5 Estudios de preformulación	36
8.5.1 Espectroscopia UV-visible.	36
8.5.2 Espectroscopia Infrarroja	36
8.5.3 Resonancia Magnética Nuclear de protón	36
8.5.4 Difracción de rayos X de polvos	36
8.5.5 Calorimetría diferencial de barrido	36
8.6 Desarrollo y validación del método de cuantificación de tizoxanida	36
8.6.1 Método cromatográfico	36
8.6.2 Linealidad del método	37
8.6.3 Adecuabilidad del método	38
8.6.4 Precisión del método	38
8.6.5 Exactitud del método	38
8.6.6 Especificidad	38
8.7 Formulación de nanopartículas poliméricas	38
8.7.1 Diseño experimental	39
8.8 Caracterización de las nanopartículas poliméricas	40
8.8.1 Tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica	40
8.8.2 Determinación de potencial zeta	40
8.8.3 Espectroscopia Infrarroja	40
8.8.4 Difracción de Rayos X de Polvos	40
8.8.5 Calorimetría Diferencial de Barrido	41
8.8.6 Evaluación de la eficiencia de encapsulación	41
8.8.7 Evaluación de la capacidad de carga	41
8.8.8 Perfiles de liberación	41
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
	IX

9.1 Estudios de preformulación	42
9.1.1 Espectroscopia UV-visible	42
9.1.2 Caracterización por Espectroscopia Infrarroja	43
9.1.3 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de protón	47
9.1.4 Difracción de rayos X de polvos	49
9.1.5 Calorimetría diferencial de barrido	52
9.2 Validación del método analítico de cuantificación	55
9.2.1 Linealidad	55
9.2.2 Adecuabilidad	57
9.2.3 Precisión	57
9.2.4 Exactitud	58
9.2.7 Especificidad	58
9.3 Diseño de Experimentos	60
9.3.1 Perfiles de liberación	60
9.3.2 Análisis de la influencia de los factores por cada respuesta	61
9.3.3 Optimización de la formulación	63
9.4 Caracterización de la formulación optimizada	64
9.4.1 Espectroscopia infrarroja	64
9.4.4 Difractometría de Rayos X de Polvos	66
9.4.5 Calorimetría Diferencial de Barrido	68
9.4.6 Perfiles de liberación	69
10. CONCLUSIONES	72
10.1 Conclusión general	72
11.2 Conclusiones particulares	72
11. PERSPECTIVAS	73
12. BIBLIOGRAFÍA	74
13. ANEXOS	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cambio del área superficial total de un sólido dependiendo de su tamaño de partícula ...	6
<b>Figura 2.</b> Estructura química de nitazoxanida .....	9
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de acción de nitazoxanida .....	10
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción como antiparasitario de nitazoxanida. Basado en Hoffman <sup>47</sup> .....	11
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de HBV y mecanismo de acción de nitazoxanida en contra del HBV. Adaptado de Zhao et al <sup>48</sup> y Sekiba et al <sup>49</sup> .....	12
<b>Figura 6.</b> Ciclo de replicación del virus de la hepatitis C. Adaptado de Scheel <sup>50</sup> . .....	13
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción de tizoxanida contra el virus de la hepatitis C.....	14
<b>Figura 8.</b> Estructura química de tizoxanida .....	15
<b>Figura 9.</b> Síntesis de tizoxanida a partir de nitazoxanida.....	16
<b>Figura 10.</b> Tipos de nanopartículas de importancia en el ámbito farmacéutico. Adaptada de Mc Carthy <sup>59</sup> . .....	19
<b>Figura 11.</b> Estructura química de policaprolactona .....	24
<b>Figura 12.</b> Línea de tiempo de la historia de la nanotecnología farmacéutica.....	30
<b>Figura 13.</b> Espectro UV-visible de nitazoxanida ( $\lambda_{\text{max}}= 347\text{nm}$ ).....	42
<b>Figura 14.</b> Espectro UV-visible de tizoxanida ( $\lambda_{\text{max}}= 347\text{nm}$ ).....	42
<b>Figura 15.</b> Espectro FT-IR-ATR de nitazoxanida .....	43
<b>Figura 16.</b> Espectro FT-IR-ATR de tizoxanida .....	44
<b>Figura 17.</b> Espectro FT-IR-ATR de policaprolactona .....	45
<b>Figura 18.</b> Espectro FT-IR-ATR de alcohol polivinílico .....	46
<b>Figura 19.</b> Espectro FT-IR-ATR de manitol.....	47
<b>Figura 20.</b> Espectro <sup>1</sup> H-RMN de nitazoxanida .....	48
<b>Figura 21.</b> Espectro <sup>1</sup> H-RMN de tizoxanida.....	49
<b>Figura 22.</b> Difractograma de nitazoxanida .....	50
<b>Figura 23.</b> Difractograma de tizoxanida .....	50
<b>Figura 24.</b> Difractograma de policaprolactona (PCL). .....	51
<b>Figura 25.</b> Difractograma de alcohol polivinílico.....	51
<b>Figura 26.</b> Difractograma de manitol .....	52
<b>Figura 27.</b> Termograma de calorimetría diferencial de barrido de nitazoxanida.....	52
<b>Figura 28.</b> Termograma de calorimetría diferencial de barrido de tizoxanida.....	53
<b>Figura 29.</b> Termograma de calorimetría diferencial de barrido de policaprolactona.....	53
<b>Figura 30.</b> Termograma de calorimetría diferencial de barrido de alcohol polivinílico.....	54
<b>Figura 31.</b> Termograma de calorimetría diferencial de barrido de manitol .....	54
<b>Figura 32.</b> Resultados del día 1 de linealidad (áreas).....	56
<b>Figura 33.</b> Resultados del día 2 de linealidad (áreas).....	57
<b>Figura 34.</b> Cromatogramas de las materias primas de la formulación.....	60
<b>Figura 35.</b> Segundo perfil de liberación de las formulaciones del diseño de experimentos. ....	61
<b>Figura 36.</b> Primer perfil de liberación de las formulaciones del diseño de experimentos. ....	61
<b>Figura 37.</b> Gráfica de efectos principales para tamaño de partícula.....	62
<b>Figura 38.</b> Diagrama de Pareto para tamaño de partícula.....	62
<b>Figura 39.</b> Diagrama de Pareto para potencial zeta.....	62
<b>Figura 40.</b> Gráfica de efectos principales para potencial zeta. ....	62
<b>Figura 41.</b> Diagrama de Pareto para eficiencia de encapsulación.....	63
<b>Figura 42.</b> Gráfica de efectos principales para eficiencia de encapsulación .....	63

<b>Figura 43.</b> Diagrama de Pareto para capacidad de carga. ....	63
<b>Figura 44.</b> Gráfica de efectos principales para capacidad de carga. ....	63
<b>Figura 45.</b> Espectro infrarrojo de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida. ....	65
<b>Figura 46.</b> Espectros ATR-FT-IR apilados <i>de las</i> materias primas y las nanopartículas poliméricas. Los numerales indicados en la figura, se corresponden con los indicados en la tabla 30. ....	66
<b>Figura 47.</b> Difractograma de nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida.....	67
<b>Figura 48.</b> Difractogramas apilados de las materias primas, fármacos y nanopartículas cargadas con tizoxanida. ....	67
<b>Figura 49.</b> Termograma de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida. ....	68
<b>Figura 50.</b> Termogramas apilados de las materias primas y la formulación final optimizada. ....	68
<b>Figura 51.</b> Perfil de liberación de las formulaciones optimizadas .....	69
<b>Figura 52.</b> Cinética de liberación de la formulación optimizada con el modelo de Higuchi .....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas del virus de la hepatitis que han desarrollado resistencia a las terapias	3
Tabla 2. Cepas del virus de la hepatitis que han desarrollado resistencia a las terapias	4
Tabla 3. Características de nitazoxanida	9
Tabla 4. Características fisicoquímicas de tizoxanida	15
Tabla 5. Parámetros de desempeño según el tipo de método analítico	17
Tabla 6. Ejemplo de diseño factorial 2 <sup>2</sup>	25
Tabla 7. Ejemplo de diseño factorial 2 <sup>3</sup>	26
Tabla 8. Ejemplo de diseño factorial fraccionario 2 <sup>(4-1)</sup>	26
Tabla 9. Materiales	32
Tabla 10. Equipos e instrumentos	32
Tabla 11. Software	33
Tabla 12. Metodología para la curva de cuantificación de tizoxanida	35
Tabla 13. Condiciones cromatográficas del método de cuantificación	37
Tabla 14. Parámetros de validación del método de cuantificación de tizoxanida por CLAR	37
Tabla 15. Preparación de nivel bajo, medio y alto para precisión y exactitud del método	38
Tabla 16. Factores, niveles y respuestas del diseño experimental	39
Tabla 17. Matriz del diseño experimental	40
Tabla 18. Metodología para realizar el diseño experimental	40
Tabla 19. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de nitazoxanida	43
Tabla 20. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de tizoxanida	44
Tabla 21. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de policaprolactona	45
Tabla 22. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de alcohol polivinílico	46
Tabla 23. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de manitol	47
Tabla 24. Asignamiento de las señales de los espectros <sup>1</sup> H-RMN de nitazoxanida	48
Tabla 25. Asignamiento de las señales de los espectros <sup>1</sup> H-RMN de tizoxanida	49
Tabla 26. Criterios de aceptación y resultados de la validación del método de cuantificación de tizoxanida	55
Tabla 27. Resultados del día 1 de linealidad (Áreas)	56
Tabla 28. Resultados del día 2 de linealidad (Áreas)	56
Tabla 29. Resultados de adecuabilidad	57
Tabla 30. Resultados de la prueba de precisión	58
Tabla 31. Resultados de la prueba de exactitud	58
Tabla 33. Optimización de formulación	64

Tabla 34. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida	65
Tabla 35. Modelos cinéticos de liberación	70

## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

NTZ	Nitazoxanida
TZX	Tizoxanida
PCL	Policaprolactona
PVA	Alcohol polivinílico
NPs	Nanopartículas Poliméricas
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
B	Ordenada en el origen
M	Pendiente
R	Coefficiente de correlación de Pearson
CV%	Coefficiente de variación porcentual
M	Concentración molar
IR	Espectroscopia Infrarroja
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UV-vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visible
MTE	Microscopía de Transmisión Electrónica
DRX	Difracción de Rayos X
Rpm	Revoluciones por minuto
pH	Potencial de Hidrógeno
PDI	Índice de Polidispersión
IC	Intervalo de Confianza
CC	Capacidad de carga
EE	Eficiencia de encapsulación
D.E.	Desviación Estándar
R	Coefficiente de Correlación
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinación
mg	Miligramo
g	Gramo
mg/L	Miligramo por litro.

nm	Nanometro
mV	Milivolts
mg/100g	Miligramo por cada 100g
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico
cm <sup>-1</sup>	Centímetro a la menos uno
h	Hora
min	Minuto
g/mol	Gramos por un mol de sustancia
J/g	Julios por gramo
PFOR	Ferredoxina/Flavodoxina oxidorreductasa
NQO1	Quinona Oxidorreductasa
NR1	Nitrorreductasa 1
PDI	Proteína Disulfuro Isomerasa
PLA	Ácido poliláctico
PGA	Ácido poliglicólico
PHB	Polihidroxibutirato
PDO	Polidioxanona
PEG	Polietilenglicol
PEO/PBT	Polibutilenereftalato



## RESUMEN

Nitazoxanida (NTZ) es un profármaco que genera al metabolito activo tizoxanida (TZX) el cual es responsable de la acción farmacológica antiparasitaria, antibacteriana y antiviral, y tiene una pobre solubilidad acuosa. Esto nos ha llevado a la búsqueda de la mejora de su solubilidad mediante la incorporación del tizoxanida dentro de una formulación con nanopartículas poliméricas.

El propósito del presente trabajo es describir el proceso de desarrollo y caracterización de una formulación de Nanopartículas Poliméricas (NPs) cargadas con tizoxanida.

La nitazoxanida utilizada en el proyecto fue obtenida y purificada a partir de una formulación comercial de grageas del fármaco (ParaMix®, Liomont, 500 mg). Posteriormente, se desarrolló un método de preparación de tizoxanida, metabolito activo de nitazoxanida, por medio de hidrólisis ácida del profármaco. La identidad y pureza de nitazoxanida y tizoxanida fue confirmada mediante espectroscopia Infrarroja (IR) y Resonancia Magnética Nuclear de protón ( $^1\text{H-RMN}$ ).

Se llevó a cabo la preparación de nanopartículas mediante el proceso de emulsión utilizando Policaprolactona (PCL) como polímero y Alcohol Polivinílico (PVA) como estabilizante. Las Nanopartículas poliméricas preparadas fueron caracterizadas en su estructura química (IR, UV-vis, RMN), morfología (MTE), estructura cristalográfica (DRX), y de la nanoestructura (potencial zeta, índice de polidispersión, tamaño de partícula).

Los resultados evidenciaron nanoestructuras con un tamaño de  $384 \pm 57$  nm y un potencial Zeta  $-15 \pm 2$  mV. La eficiencia de encapsulación fue del  $99.1 \pm 0.3\%$  y la capacidad de carga fue de  $0.742 \pm 0.77$  mg/100g de formulación. Los espectros de difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido e infrarrojo indicaron que no existen incompatibilidades entre los excipientes de la formulación. Tizoxanida en polvo demostró ser muy poco soluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos como metanol o acetonitrilo. Sin embargo, las nanopartículas de nitazoxanida demostraron ser ligeramente solubles en agua.

Se realizó un diseño experimental  $2^2$ , teniendo la cantidad de policaprolactona (mg) y la cantidad de alcohol polivinílico (mg) como factores experimentales, y se propuso una formulación optimizada, la cual se caracterizó en tamaño de partícula, potencial zeta, espectroscopia infrarroja, difracción de rayos X de polvos, calorimetría diferencial de barrido y perfil de liberación. La formulación optimizada demostró un aumento en la liberación de hasta tres veces con respecto al fármaco puro.

En conclusión, se obtuvieron nanopartículas poliméricas sólidas cargadas con tizoxanida con una mejoría en su solubilidad acuosa con respecto a las formulaciones convencionales y con una mejor liberación. Este impacto positivo en la solubilidad y en la liberación puede traducirse en una reducción de dosis manteniendo la misma efectividad.



## ABSTRACT

Nitazoxanide (NTZ) is a prodrug that generates the active metabolite tizoxanide (TZX), which is responsible for its pharmacological actions as an antiparasitic, antibacterial, and antiviral agent, but it has poor aqueous solubility. This has led us to search for improved solubility by incorporating tizoxanide into a formulation with polymeric nanoparticles.

The purpose of this study is to describe the development and characterization process of a formulation of Tizoxanide-Loaded Polymeric Nanoparticles (NPs). Nitazoxanide used in the project was obtained and purified from a commercial tablet formulation (ParaMix®, Liomont, 500 mg). Subsequently, a method for the preparation of tizoxanide, the active metabolite of nitazoxanide, was developed through acid hydrolysis of the prodrug. The identity and purity of nitazoxanide and tizoxanide were confirmed by Infrared Spectroscopy (IR) and Proton Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ).

Nanoparticles were prepared using the emulsion process with Polycaprolactone (PCL) as the polymer and Polyvinyl Alcohol (PVA) as the stabilizer. The prepared polymeric nanoparticles were characterized for their chemical structure (IR, UV-Vis, NMR), morphology (TEM), crystallographic structure (XRD), and nanostructure (zeta potential, polydispersity index, particle size).

The results showed nanostructures with a size of  $384 \pm 57$  nm and a zeta potential of  $-15 \pm 2$  mV. The encapsulation efficiency achieved was  $99.1 \pm 0.3\%$ , with a loading capacity of  $0.742 \pm 0.77$  mg/100g of formulation. X-ray diffraction spectra, differential scanning calorimetry, and infrared spectroscopy indicated no incompatibilities among the formulation excipients. Tizoxanide powder was found to be poorly soluble in water but soluble in organic solvents such as methanol or acetonitrile. However, nitazoxanide nanoparticles showed slight solubility in water.

An experimental design  $2^2$  was performed with the amount of polycaprolactone (mg) and the amount of polyvinyl alcohol (mg) as experimental factors, and an optimized formulation was proposed. The optimized formulation was characterized for particle size, zeta potential, infrared spectroscopy, powder X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, and release profile. The optimized formulation increased release up to three times compared to the pure drug.

In conclusion, solid polymeric nanoparticles loaded with tizoxanide were successfully obtained, exhibiting improved aqueous solubility compared to conventional formulations and enhanced release. This positive impact on solubility and release can potentially translate into dose reduction while maintaining the same effectiveness.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hepáticas son la sexta causa de muerte más común en México, llegando a causar hasta 41 520 defunciones en 2020<sup>1</sup>, mientras que en el mundo se estima que 2 millones de personas mueren al año debido a enfermedades hepáticas<sup>2</sup>. La mitad de estas muertes son asociadas a complicaciones de cirrosis mientras que la otra mitad son debidas a casos de carcinoma hepatocelular.

Las infecciones por los virus de hepatitis B y C son los principales factores de riesgo asociados con el desarrollo de carcinoma hepatocelular, por lo cual es importante desarrollar terapias efectivas para el tratamiento y control de dichas infecciones, a fin de detener el avance de la enfermedad y por consecuencia su mortalidad.

Actualmente existen diversas terapias aprobadas para el tratamiento de las hepatitis B y C; sin embargo, los resultados obtenidos por estas pueden llegar a ser insuficientes en infecciones crónicas, debido a que se genera una resistencia al tratamiento. Dicha resistencia a las terapias farmacológicas está ligada a diversos factores, entre los cuales está la rápida replicación viral de VHB y VHC, mutaciones genéticas en la región RT de la polimerasa del virus, adaptación selectiva de las cepas mutadas y polimorfismos genéticos del hospedero.<sup>3,4</sup> En la tabla 1, podemos encontrar una recopilación de algunas de las mutaciones del virus de la hepatitis B (VHB) que se han identificado que son resistentes a fármacos utilizados normalmente para tratar a dicho virus.

Tabla 1. Cepas del virus de la hepatitis B que han desarrollado resistencia a las terapias		
Fármaco	Mutación de VHB	Referencias
Lamivudina	M204V/I L180M + M204V/I A181T/V A181T/V+N236T L180M+M204V/I±T184 L180M+M204V/I±S202 L180M+M204V/I±I169T±M250	Allen et al 1998 <sup>5</sup> Li et al, 2005 <sup>6</sup> Angus et al, 2003 <sup>7</sup> Angus et al, 2003 <sup>7</sup> Sherman et al, 2008 <sup>8</sup> Sherman et al, 2008 <sup>8</sup> Sherman et al, 2008 <sup>8</sup>
Adefovir	A181T/V N236T	Villet et al, 2008 <sup>9</sup> Angus et al, 2003 <sup>7</sup>
Entecavir	L180M+M204V/I±T184 L180M+M204V/I±S202 L180M+M204V/I±I169T±M250	Sherman et al, 2008 <sup>8</sup> Sherman et al, 2008 <sup>8</sup> Sherman et al, 2008 <sup>8</sup>
Tenofovir	N236T A181T/V+N236T	Angus et al, 2003 <sup>7</sup> Angus et al, 2003 <sup>7</sup>

En la tabla 2, podemos encontrar una recopilación de algunas de las mutaciones del virus de la hepatitis C (VHC) que se han identificado que son resistentes a fármacos utilizados normalmente para tratar a dicho virus.



**Tabla 2. Cepas del virus de la hepatitis C que han desarrollado resistencia a las terapias**

Fármaco	Mutación de VHC	Referencias
Asunaprevir	D168A/E/H/Q/T/V/Y S122 Q80K/L R155	McPhee et al, 2013 <sup>10</sup> McPhee et al, 2012 <sup>11</sup> McPhee et al, 2012 <sup>11</sup> McPhee et al, 2012 <sup>11</sup>
Glecaprevir	V36 M Y56H/N Q80 K/R R155T A156G/T/V Q168A/K/L/R	Krishnan et al, 2018 <sup>12</sup> Krishnan et al, 2018 <sup>12</sup>
Grazoprevir	V36A/M F43S/C T54A/S Y56H/F Q80K R155K/Q/T A156T/V D168A/E/G/T/V/Y V36M + R155K T54S + R155K	Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Summa et al, 2012 <sup>14</sup> Summa et al, 2012 <sup>14</sup> Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Black et al, 2015 <sup>15</sup> Summa et al, 2012 <sup>14</sup> Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Summa et al, 2012 <sup>14</sup> Summa et al, 2012 <sup>14</sup>
Paritaprevir	V36A/M/L F43L Y56 Q80K R155G/K/T A156H D168V	Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Pilot-Matias et al, 2015 <sup>17</sup> Kumada et al, 2015 <sup>18</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Pilot-Matias et al, 2015 <sup>17</sup> Pilot-Matias et al, 2015 <sup>17</sup> Schnell et al, 2015 <sup>19</sup>
Simeprevir	V36M R155K/G/T Q80K/R S122R/T D168A/E/F/H/N/T/V	Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Verbinnen et al, 2015 <sup>20</sup> Lenz et al, 2015 <sup>21</sup>
Vaniprevir	R155K D168V V36M+R155K T54S+R155K R155K+A165S R155Q+D168N	Jensen et al, 2015 <sup>22</sup> Jensen et al, 2015 <sup>22</sup> Ali et al, 2013 <sup>23</sup> Barnard et al, 2013 <sup>24</sup> Barnard et al, 2013 <sup>24</sup> Barnard et al, 2013 <sup>24</sup>
Voxilaprevir	R155W D168K/L/R A156L/T/V	Gane et al, 2016 <sup>25</sup> Gane et al, 2016 <sup>25</sup> Gane et al, 2016 <sup>25</sup>
Daclatasvir	M28T/V Q30E/H/K/R L31I/M/V H58D Y93C/H/N L31F/M/V Y93C/H/I/R A30K L28M/V L23F+L31F M28A+Q30R	Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Gao et al, 2010 <sup>27</sup> Everson et al, 2014 <sup>28</sup>
Elbasvir	M28A/G/T/S Q30H/K/R/Y L31F/I/M/V H58D Y93C/H/N/S L28M/S	Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Zeuzem et al, 2015 <sup>29</sup> Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup>



	L30H P58D L31M+Y93H	Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Komatsu et al, 2017 <sup>13</sup> Black et al, 2015 <sup>15</sup>
Ledipasvir	Y93H K24R M28A/T/V Q30E/H/K/R/Y L31F/I/M/V A92T Y93C/F/N L28M Q30H L31I/F/M/V	Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Manns et al, 2016 <sup>30</sup> Zhou et al, 2016 <sup>31</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Zhou et al, 2016 <sup>31</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup>
Ombitasvir	M28T/V Q30E/H/K/L/R/Y L31V Y93C/F/H/L/N/S L28M R30Q L31F/M/V L31M+Y93H	Feld et al, 2014 <sup>32</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Harrington et al, 2018 <sup>26</sup> Feld et al, 2014 <sup>32</sup> Schnell et al, 2015 <sup>19</sup> Di Maio et al, 2017 <sup>16</sup> Schnell et al, 2015 <sup>19</sup> Krishnan et al, 2015 <sup>33</sup>
Pibrentasvir	S24F M28G/K A30G/K L31F/I/M P58T	Poordad et al, 2018 <sup>34</sup> Krishnan et al, 2015 <sup>33</sup> Poordad et al, 2018 <sup>34</sup> Schnell et al, 2015 <sup>19</sup> Krishnan et al, 2015 <sup>33</sup>
Velpatasvir	Q30E/H/K/L/R L31I/M/V Y93H/N A30K/V E92K Q30H+Y93H	Feld et al, 2015 <sup>35</sup> Feld et al, 2015 <sup>35</sup> Feld et al, 2015 <sup>35</sup> Gane et al, 2016 <sup>25</sup> Lawitz et al, 2016 <sup>36</sup> Feld et al, 2015 <sup>35</sup>

Uno de los grupos de fármacos que han sido puestos en mira en los últimos años ya que han demostrado efectividad en contra de los virus de la hepatitis B y C son las tiazolidas, las cuales han demostrado tener una actividad inhibitoria de la replicación los virus de la hepatitis B y C. <sup>37-39</sup>

Nitazoxanida es un profármaco perteneciente a la familia de las tiazolidas, el cual históricamente ha sido principalmente usado como un fármaco con acción antiparasitaria, sin embargo, se ha investigado y demostrado la acción de nitazoxanida y otras tiazolidas en contra de otros agentes patológicos, como virus y bacterias. <sup>37,40</sup>

Actualmente en el mercado existen diversas formulaciones farmacéuticas que contienen nitazoxanida. Sin embargo, la gran limitación de estas formulaciones se debe a que nitazoxanida es un profármaco que presenta una baja solubilidad acuosa ( $7.55 \times 10^{-3}$  mg/mL)<sup>41</sup> lo cual a su vez causa su baja biodisponibilidad (ca. 1%)<sup>41</sup>. Por lo que se buscan nuevas formulaciones que mejoren la solubilidad acuosa de nitazoxanida.

La solubilidad de algunos fármacos es un problema común en la industria farmacéutica, y una de las estrategias para mejorarla es la formulación de nanopartículas. Las nanopartículas se caracterizan por su reducido tamaño y su capacidad para atravesar membranas biológicas con mayor facilidad, lo que permite una mayor absorción del fármaco en los tejidos. De esta manera, las formulaciones farmacéuticas con nanopartículas han demostrado mejorar las propiedades biofarmacéuticas de los fármacos, aumentando su eficacia terapéutica. En este sentido, el desarrollo de formulaciones con



nanopartículas se ha convertido en un área de investigación altamente prometedora en el ámbito de la tecnología farmacéutica.<sup>42</sup>

Para explicar el efecto del tamaño de partícula sobre el proceso de disolución de un fármaco, es necesario recurrir a la ecuación modificada de Noyes-Whitney:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{A \cdot D \cdot (C_s - C_t)}{h}$$

Donde:

$\frac{dC}{dt}$  = Velocidad de disolución con respecto al tiempo t

A=Área superficial expuesta al medio de disolución

D= Coeficiente de difusión

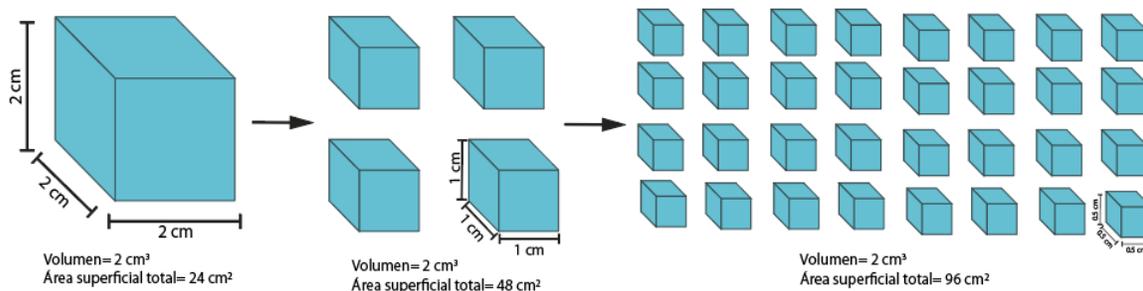
Cs= Concentración de saturación del fármaco

Ct= Concentración del fármaco en el tiempo t

h = Espesor de la capa de difusión

Esta ecuación nos explica que existe una relación directa entre el área superficial expuesta al medio de disolución y su velocidad de disolución, siendo que a mayor área superficial expuesta mayor será la velocidad de disolución al inicio de una formulación con nanopartículas si se compara con un experimento de la misma molécula, pero con una menor área superficial expuesta.<sup>9</sup>

El área superficial de cualquier material con un volumen determinado es dependiente de su tamaño de partícula. Una forma de observar esto, es suponiendo el caso de un material con una forma cúbica con aristas de 2 cm, con un área superficial de 24 cm<sup>2</sup>. Si este mismo cubo se cortara en 8 partes iguales para obtener cubos de 1 cm<sup>3</sup>, el área superficial total de estos cubos sería de 48 cm<sup>2</sup>, aumentando al doble su área superficial y manteniendo el mismo volumen total. Por lo que deducimos que a menor tamaño de partícula mayor será el área superficial; teniendo en cuenta la ecuación de Noyes-Whitney se traduce que a menor tamaño de partícula mayor será su área superficial en contacto con el medio de disolución y esto mejorará su velocidad de disolución. En la figura 1, podemos ver ilustrado el efecto que tiene la disminución del tamaño de partícula sobre el área superficial total, manteniendo un mismo volumen.



**Figura 1.** Cambio del área superficial total de un sólido dependiendo de su tamaño de partícula

En el marco teórico de esta tesis, se realiza una exhaustiva exploración de los conceptos fundamentales que respaldan el desarrollo y la caracterización de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida. Para comenzar, se describe en detalle la nitazoxanida, un profármaco



esencial en esta investigación. Se abarca su estructura química, sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como sus indicaciones terapéuticas. Esta comprensión sienta las bases para comprender la generación del metabolito activo, tizoxanida, que es el componente clave con el que se trabajará en este estudio. Del cual se describirá su estructura química, propiedades fisicoquímicas y el método de síntesis utilizado en este estudio.

En el subtema *Validación de métodos cromatográficos*, encontraremos las pautas establecidas por el Consejo Nacional de Químicos Farmacobiólogos. Se describen los procedimientos y criterios necesarios para garantizar la confiabilidad de los análisis cromatográficos, lo cual resulta fundamental para la posterior evaluación y cuantificación de las muestras.

La nanotecnología farmacéutica adquiere gran relevancia en esta investigación. Por lo que en el subtema *Nanotecnología farmacéutica* se explora el concepto de nanopartículas en detalle. Se presenta una clasificación de las nanopartículas en función de los materiales utilizados en su construcción y se profundiza en los métodos de fabricación, que se dividen en estrategias ascendentes (bottom-up) y descendentes (top-down). Además, se detallan los diversos métodos de caracterización de las nanopartículas, abarcando aspectos morfológicos, eléctricos, topográficos, espectroscópicos y ópticos. Esta comprensión completa de las propiedades y características de las nanopartículas es fundamental para el desarrollo y la evaluación de las formulaciones propuestas.

El subtema *Polímeros de uso farmacéutico* se enfoca en los polímeros utilizados en formulaciones farmacéuticas, con especial énfasis en la policaprolactona, que desempeñará un papel esencial en la estructura matricial de las nanopartículas poliméricas que se desarrollaran en este estudio. Se explora su utilización en diversas aplicaciones farmacéuticas y se destacan sus propiedades beneficiosas para la entrega controlada de fármacos.

Para finalizar, en el capítulo *Marco teórico*, se aborda el diseño de experimentos, una herramienta crucial en el desarrollo farmacéutico. Se define su importancia y se proporcionan ejemplos concretos de diseños factoriales, que permiten evaluar de manera sistemática y eficiente el impacto de diferentes variables en los resultados obtenidos.

El marco teórico proporciona los fundamentos necesarios para comprender el desarrollo y la caracterización de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida, permitiendo al lector adentrarse en los conceptos esenciales que sustentan todo el trabajo de investigación.

En el capítulo de *Antecedentes*, se presentan dos subtemas relevantes. En el primer subtema, se abordan los antecedentes de nitazoxanida, donde se describe la historia de su descubrimiento, sus usos aprobados actualmente y las líneas de investigación en las que se está utilizando, principalmente como agente antiviral contra las hepatitis B y C, la diarrea causada por el astrovirus y el COVID-19.

En el subtema *Antecedentes sobre nanotecnología farmacéutica*, se exploran los antecedentes históricos de la nanotecnología en el ámbito farmacéutico de manera cronológica y detallada. Se mencionan importantes hitos en el desarrollo de la nanotecnología, como el planteamiento inicial realizado por Richard Feynman en 1959. Además, se destacan descubrimientos relevantes en tecnología, como el desarrollo del Microscopio de Túnel de Barrido (STM) por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer en 1981 o la introducción de la estrategia ascendente de elaboración de nanopartículas introducida por Erick Drexler en 1981.

Asimismo, se presentan ejemplos concretos de medicamentos formulados con nanotecnología que han sido significativos en la industria farmacéutica, como Doxil® en 1995, que emplea nanopartículas liposomales para la entrega de doxorubicina con el fin de tratar el cáncer de ovario y del cáncer de mama metastásico, y Ontak® en 1999, medicamento basado en nanopartículas proteicas utilizado en el tratamiento del linfoma de células T. Estos casos se mencionan como ejemplos representativos, y en el subtema completo se detallarán más descubrimientos y avances relevantes en el uso de la nanotecnología en la industria farmacéutica.



En los capítulos 4, 5, 6 y 7, se abordará la justificación de llevar a cabo este estudio, se definirá el propósito de este y establecerán las hipótesis y objetivos que se desean cumplir durante este proyecto de investigación. En *Justificación*, se abarca la importancia y la necesidad de abordar las enfermedades hepáticas, como el carcinoma hepatocelular y la hepatitis crónica. Se destaca que los tratamientos actualmente disponibles están mostrando cada vez más ineficacia debido al desarrollo de resistencia por lo que se considera el uso de terapias conjuntas con otras sustancias con actividad antiviral, como nitazoxanida. En *Propósito*, se describirá el objetivo de este estudio el cual es llevar a cabo el desarrollo y caracterización de una formulación de nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con tizoxanida mediante el método de emulsión evaporación de solvente. En los capítulos 6 y 7, se presentan la hipótesis y los objetivos del trabajo de investigación.

En el capítulo *Materiales y métodos*, se proporcionan detalles sobre los materiales utilizados y los procedimientos experimentales llevados a cabo en el estudio.

El capítulo *Resultados* constituye una parte crucial de este estudio, ya que presenta los hallazgos obtenidos y los datos recopilados durante la investigación. A través de diferentes subtemas, se brinda una visión detallada y sistemática de los resultados obtenidos en cada etapa del estudio.

Los resultados de este proyecto de investigación se presentan de la siguiente manera, primero se caracterizan las materias primas en los *Estudios de preformulación*, posteriormente se presentará la *Validación del método analítico de cuantificación* que se utilizará en este proyecto. Luego, se iniciará con la fase de formulación y el diseño experimental, en la cual encontraremos los resultados de las respuestas del diseño experimental y se propondrá una formulación optimizada. Finalmente encontraremos la *Caracterización de la formulación optimizada*, en donde se caracterizarán las nanopartículas optimizadas y se evaluarán sus respuestas.

En el capítulo *Conclusiones*, se presentan conclusiones basadas en los resultados y tomando en cuenta los objetivos del proyecto de investigación; el capítulo *Perspectivas* plantea los potenciales estudios a futuro relacionados con este proyecto.

## 2. MARCO TEÓRICO

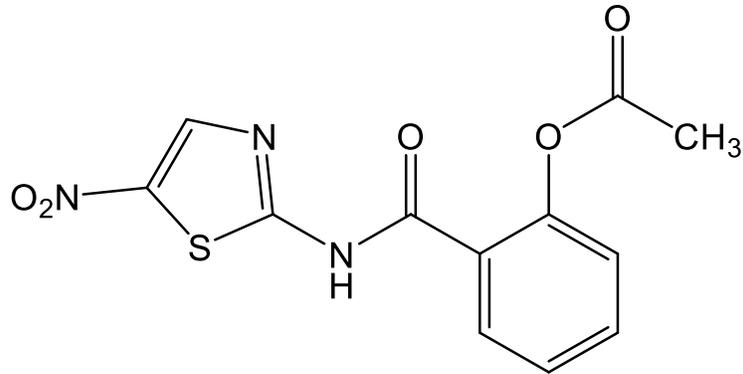
### 2.1 Nitazoxanida

Nitazoxanida es un profármaco miembro de la familia de las tiazolidas, que fue descubierto por el científico francés J.F. Rossignol<sup>43</sup> en 1975. Nitazoxanida se ha utilizado con éxito en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, incluyendo infecciones por parásitos y virus. Se ha demostrado que es efectiva en el tratamiento de infecciones por *Cryptosporidium* y *Giardia*, dos tipos de parásitos que pueden causar diarrea y otros síntomas gastrointestinales. Además, nitazoxanida ha demostrado potencial actividad antiviral contra una variedad de virus, incluyendo el virus respiratorio sincitial, parainfluenza, coronavirus, rotavirus, norovirus, hepatitis B, hepatitis C, dengue, fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En este subtema, se describirán con más detalle las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de nitazoxanida, incluyendo sus mecanismos de acción, farmacocinética y efectos adversos.

#### 2.1.1 Estructura química y características de nitazoxanida

En este apartado podemos encontrar la estructura química (*figura 2*) y las características fisicoquímicas de nitazoxanida (*tabla 3*).



**Figura 2.** Estructura química de nitazoxanida

Tabla 3. Características de nitazoxanida	
<b>Nombre IUPAC</b>	[2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) carbamoil]fenil]etanoato
<b>Fórmula química condensada</b>	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S
<b>Peso molecular</b>	307.282 g/mol
<b>Apariencia</b>	Polvo amarillo cristalino
<b>Punto de fusión</b>	202°C
<b>Punto de ebullición</b>	394°C
<b>pKa</b>	8.3 <sup>44</sup>
<b>Log P</b>	1.63 <sup>44</sup>
<b>Clase BCS</b>	IV
<b>Solubilidad acuosa predicha</b>	7.55 x10 <sup>-3</sup> mg/mL <sup>41</sup>
<b>Solubilidad en otros disolventes</b>	Etanol, metanol, acetonitrilo, Propanol, Butanol, Acetato de etilo y <i>N, N</i> -Dimetilformamida.

### 2.1.3 Farmacocinética de nitazoxanida

Nitazoxanida es un profármaco el cuál se administra comúnmente por vía oral, al entrar al organismo atraviesa las siguientes etapas farmacocinéticas:

- **Absorción**  
Nitazoxanida es un profármaco que se administra por vía oral. Al ser una base débil con un pKa de 8.3, se absorbe mejor en ambientes alcalinos, donde se presenta en su forma no ionizada (liposoluble). Al pasar por el tracto gastrointestinal, nitazoxanida se absorbe en su mayoría en el intestino delgado, específicamente en el íleon. Este lugar presenta un pH entre 7 y 8, lo que favorece la absorción de nitazoxanida. Además, el íleon cuenta con una superficie interna cubierta por enterocitos que tienen una gran cantidad de microvellosidades que aumentan la superficie de absorción. Asimismo, el íleon posee una alta presencia de vasos sanguíneos que también facilitan la absorción de fármacos.<sup>45</sup>
- **Distribución**  
Nitazoxanida se encuentra en circulación sanguínea principalmente como su metabolito activo, tizoxanida. Tras la administración oral de nitazoxanida, se observa una concentración plasmática máxima de tizoxanida de 2 mg/L entre 1 a 4 h y esta se une a las proteínas plasmáticas en un 99.9%.<sup>45</sup>
- **Metabolismo**  
La reacción metabólica inicial de nitazoxanida es su hidrólisis a tizoxanida por acción de las esterasas plasmáticas, esta reacción tiene lugar inmediatamente después de la absorción del



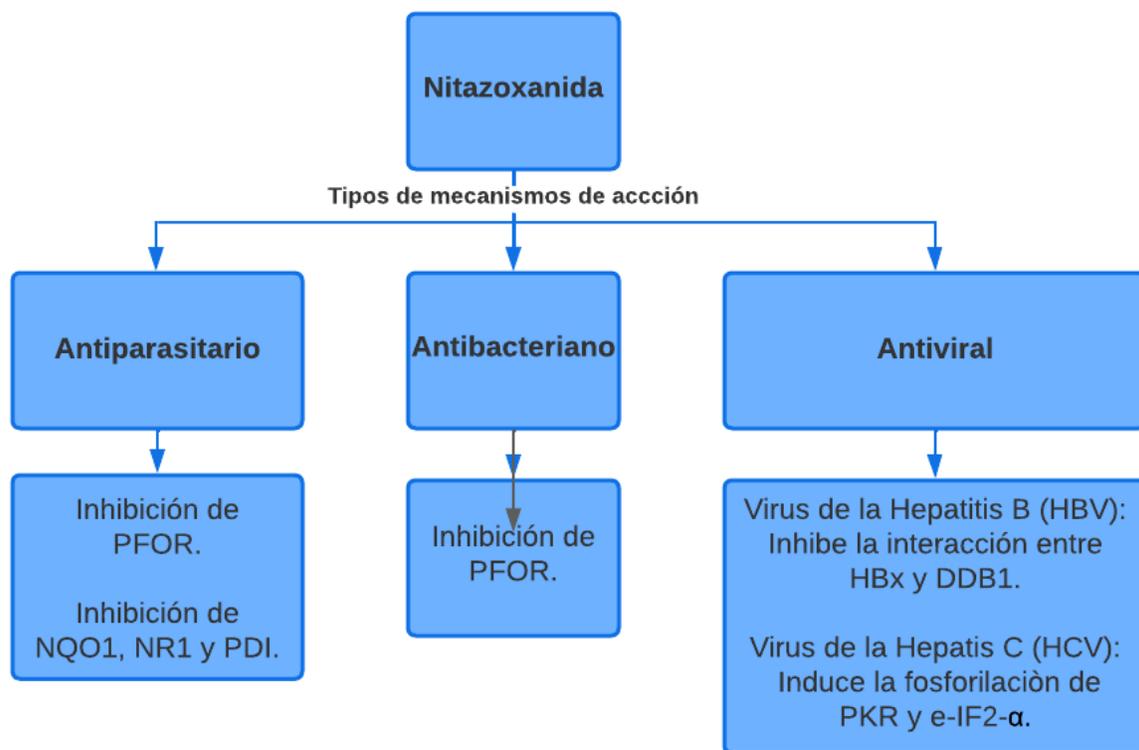
fármaco. Tizoxanida es a su vez transformado por metabolismo secundario a glucurónido de tizoxanida en el hígado.<sup>45</sup>

- Excreción

Tizoxanida se excreta a través de la orina, la bilis y las heces, mientras que el glucurónido de tizoxanida se excreta únicamente en orina y bilis. Aproximadamente 2/3 de la dosis oral de nitazoxanida se excreta en las heces y 1/3 en la orina.<sup>45</sup>

#### 2.1.4 Farmacodinamia de nitazoxanida

Nitazoxanida ha sido estudiada como un fármaco multiterapéutico con propiedades como antiparasitario, antibacteriano y antiviral. En la *figura 3* se resumen los mecanismos de acción que posee nitazoxanida.



**Figura 3.** Mecanismos de acción de nitazoxanida

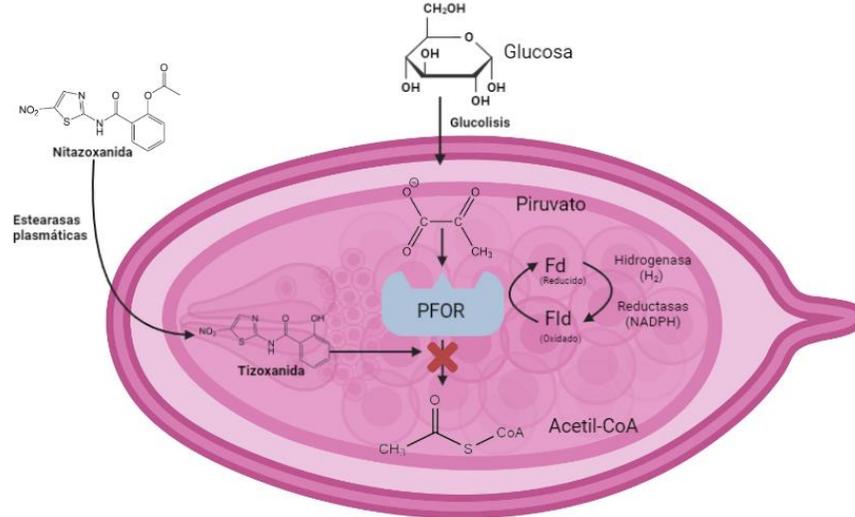
- Mecanismo de acción como antiparasitario (figura 4)

El mecanismo más ampliamente aceptado de nitazoxanida es la interrupción del metabolismo energético en microbios anaeróbicos por inhibición del ciclo piruvato, en específico por la inhibición de la enzima Ferredoxina/Flavodoxina oxidoreductasa (PFOR). En los protozoos parásitos, nitazoxanida también induce lesiones en las membranas celulares y despolariza la membrana mitocondrial al tiempo que inhibe la quinona oxidoreductasa (NQO1), la nitrorreductasa-1 (NR1) y las enzimas proteínas disulfuro isomerasa (PDI).

Además, este fármaco también inhibe la glutatión-S-transferasa (una enzima desintoxicante importante) y modula el gen Avr-14, que codifica para la subunidad de tipo alfa del canal iónico de



cloruro controlado por glutamato presente en los nematodos<sup>46</sup>. En la figura 4, podemos observar una representación gráfica del mecanismo de acción de nitazoxanida en parásitos.



**Figura 4.** Mecanismo de acción como antiparasitario de nitazoxanida. Basado en Hoffman<sup>47</sup>.

- Mecanismo de acción como antibacteriano  
Inhibe la enzima piruvato deshidrogenasa en *Escherichia coli*, interrumpe el potencial de membrana y la homeostasis del pH en *Mycobacterium tuberculosis*, suprime la vía chaperona de la bacteria gramnegativa y estimula la autofagia de macrófagos huésped en pacientes con tuberculosis.<sup>47</sup>
- Mecanismos de acción como antiviral en contra de los virus de la hepatitis B y C  
Virus de la hepatitis B (figura 5)

Durante una infección por el virus de la hepatitis B, la proteína viral HBx se une a la proteína humana DDB1, lo que favorece la transcripción del genoma viral y la replicación del virus. Este proceso implica la formación de un complejo proteico que recluta a otras proteínas, incluyendo CUL4A/B, ROC1 y E2. Juntos, estas proteínas promueven la ubiquitinación de SMC5/6, una proteína que interviene en la regulación de la replicación viral. Una vez que SMC5/6 es ubiquitinada, se produce la replicación del virus y se sintetizan sus proteínas.

Nitazoxanida actúa inhibiendo la unión entre HBx y DDB1, lo que interrumpe la formación del complejo proteico y, por tanto, la ubiquitinación de SMC5/6. Esto reduce la replicación viral y la síntesis de proteínas virales, lo que disminuye la carga viral y previene la progresión de la infección por el virus de la hepatitis B.

Virus de la hepatitis C (figura 7):

Nitazoxanida actúa potenciando la actividad antiviral del interferón  $\alpha$ , para llevar a cabo esta acción primero activa la fosforilación de una proteína quinasa dependiente del ARN de doble cadena (PKR), una molécula inducida por los genes del interferón tipo I en función de la respuesta autoinmune del paciente a causa de la infección por VHC.

Una vez fosforilada la PKR, fosforila la serina en la posición 51 (Ser51) de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación eucariótico  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) el cual inhibe el intercambio de nucleótidos mediado por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (eIF2 $\beta$ ) que unido a guanósín trifosfato (GTP) permite la entrega del ARN de transferencia (ARNt) hacia el iniciador de metionina (met-ARNt) en la subunidad ribosómica pequeña iniciando la síntesis de proteínas de manera normal en la célula.

Sin embargo, al ser inhibido el intercambio de nucleótidos no se presenta el cambio de guanósín difosfato (GDP) a GTP lo que imposibilita la síntesis de proteínas y, en consecuencia, se activa la inhibición de la traducción del ARN viral.

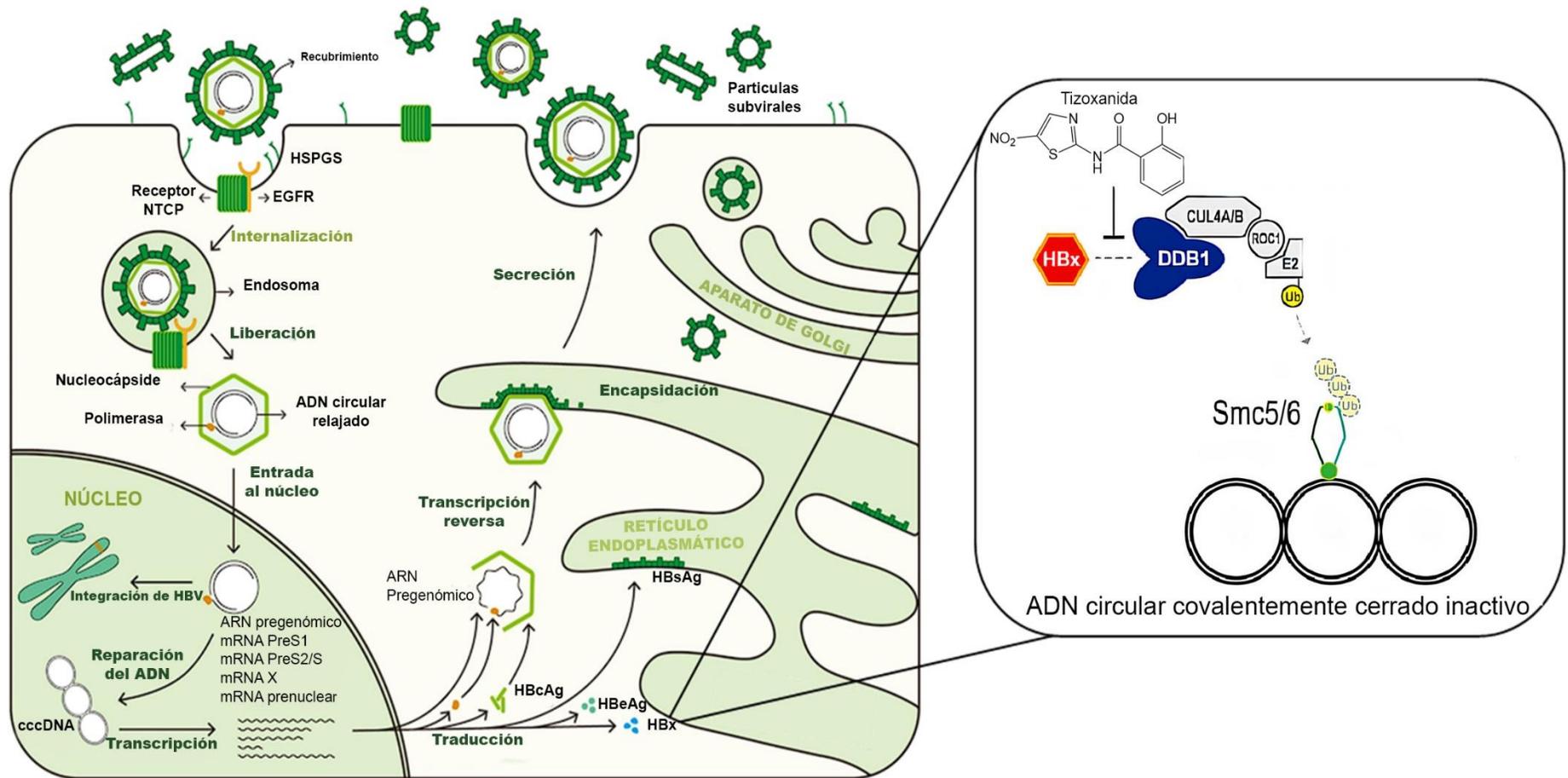
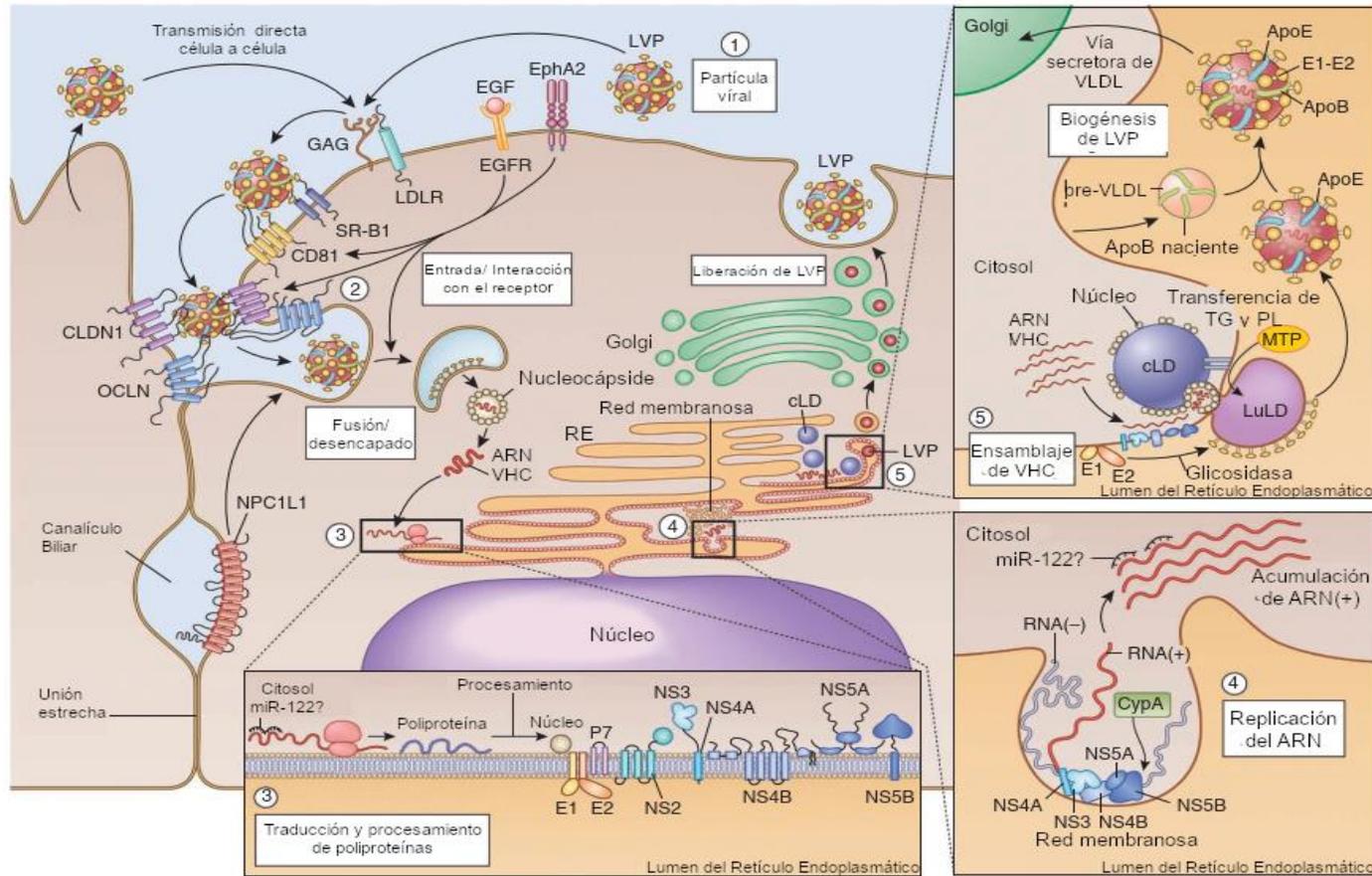


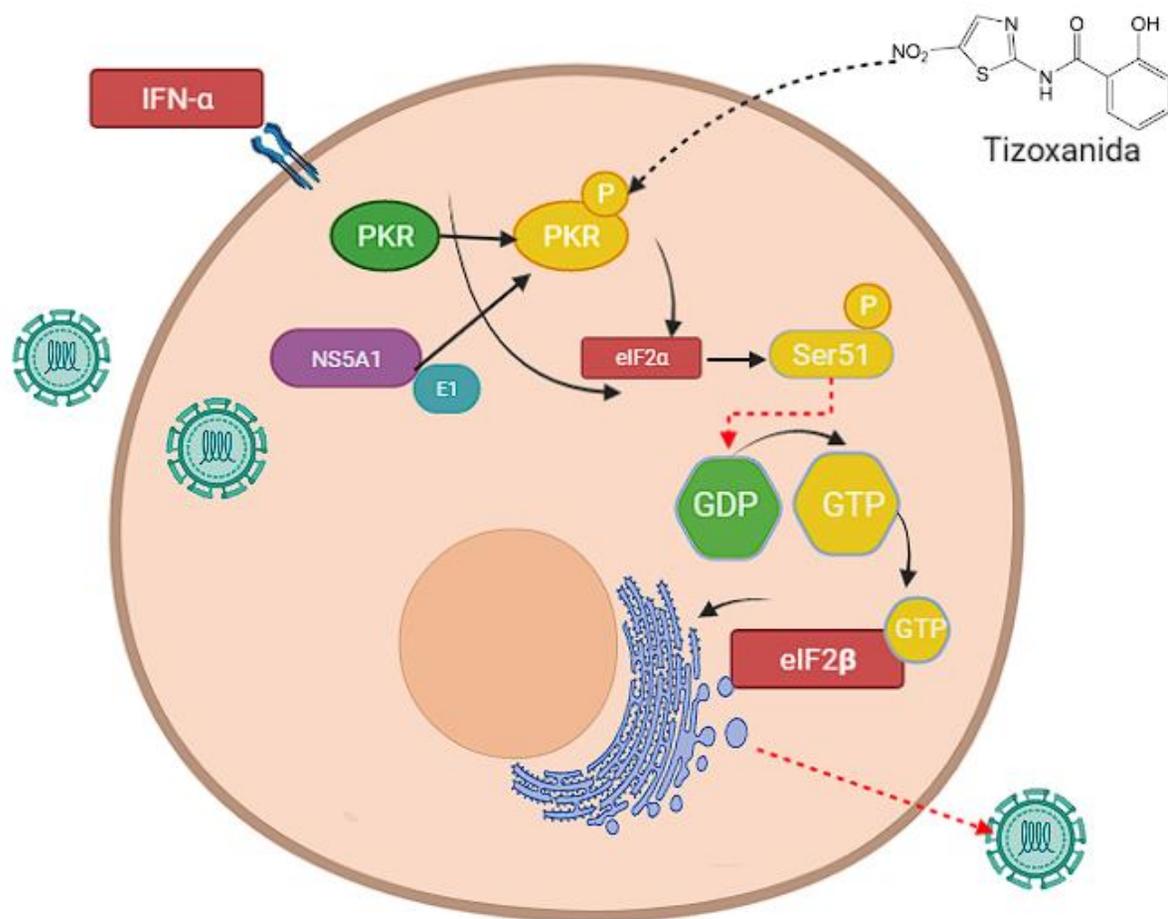
Figura 5. Ciclo de vida de HBV y mecanismo de acción de nitazoxanida en contra del HBV. Adaptado de Zhao et al<sup>48</sup> y Sekiba et al<sup>49</sup>.



Puntos de intervención en el ciclo de vida de VHC

- ① La partícula viral (anticuerpos neutralizantes, péptidos virocidas)
- ② Entrada y receptor de interacción (anticuerpos y moléculas pequeñas que se dirigen a receptores, inhibidores de quinasas)
- ③ Traducción y procesamiento de poliproteínas (inhibidores de proteasas NS3-NS4A)
- ④ Replicación del ARN (polimerasa NS5B, inhibidores de NS5A, antagonistas de miR-122, inhibidores de ciclofilina, estatinas, inhibidores de PI4KIIIα)
- ⑤ Ensamblamiento y morfogénesis del virión (inhibidores de NS5A, inhibidores de DGAT1, inhibidores de glicosidasa, inhibidores de MTP)

**Figura 6.** Ciclo de replicación del virus de la hepatitis C. Adaptado de Scheel<sup>50</sup>.



**Figura 7.** Mecanismo de acción de tizoxanida contra el virus de la hepatitis C.



### 2.1.5 Indicaciones terapéuticas de nitazoxanida

Nitazoxanida es utilizada para tratar la diarrea causada por los protozoarios *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*. También está indicado para el tratamiento de Amebiasis intestinal aguda o disentería amebiana causada por *Entamoeba histolytica*; además es un antihelmíntico efectivo contra nematodos, cestodos y trematodos (p. ej., *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides* y *Strongyloides stercoralis*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Hymenolepis nana*, *Fasciola hepatica*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*).

## 2.2 Tizoxanida

Tizoxanida, metabolito activo de nitazoxanida, se obtiene naturalmente en el organismo después de la absorción de nitazoxanida, ya que esta es desacetilada por acción de las esterasas plasmáticas al entrar en circulación sistémica. Tizoxanida es la sustancia que genera la actividad farmacológica antiparasitaria, antibiótica y antiviral descrito en los tratamientos con nitazoxanida.

### 2.2.1 Estructura química y características de tizoxanida

En este apartado podemos encontrar la estructura química (figura 8) y las características fisicoquímicas de tizoxanida (tabla 4).

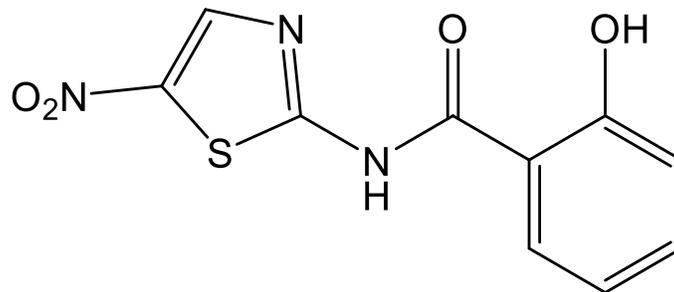


Figura 8. Estructura química de tizoxanida

### 2.2.2 Propiedades fisicoquímicas de tizoxanida

Tabla 4. Características fisicoquímicas de tizoxanida	
Nombre IUPAC	2-hidroxi-N-(5-nitrotiazol-2-il) benzamida
Fórmula química condensada	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S
Peso molecular	265.25 g/mol
Apariencia	Polvo blanco
Punto de fusión	> 240 °C
pKa (predicho)	6.7 <sup>41</sup>

### 2.2.3 Método de síntesis de tizoxanida

Tizoxanida puede obtenerse en el laboratorio a través de sus profármacos, como nitazoxanida, por medio de hidrólisis usando un medio ácido (como ácido clorhídrico) para poder generar la desacetilación del profármaco y producir tizoxanida como se muestra en la figura 9.

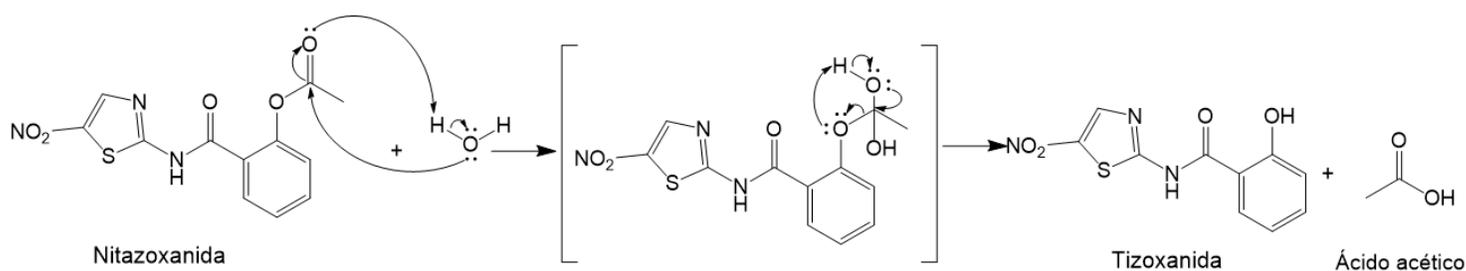


Figura 9. Síntesis de tizoxanida a partir de nitazoxanida

## 2.3 Validación de métodos cromatográficos

### 2.3.1 Definiciones

Las definiciones de los conceptos relevantes para validación de un método analítico fueron extraídas de la Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacobiólogos.<sup>51</sup>

- Validación del método analítico  
Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorios, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada
- Linealidad  
Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.
- Especificidad  
Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.
- Precisión  
Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.
- Precisión intermedia  
Precisión de un método analítica, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.
- Exactitud  
Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
- Robustez  
Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros normales de operación del método.
- Repetibilidad  
Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.



- **Reproducibilidad**  
Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.
- **Límite de cuantificación**  
Concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.
- **Límite de detección**  
Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

### 2.3.2 Parámetros de desempeño según el tipo de método analítico

En función de la aplicación analítica de un método, es necesario cumplir con distintos parámetros de desempeño para poder garantizar la confiabilidad del método. A continuación, en la *Tabla 5*, se describirán los parámetros de desempeños que se deben cubrir dependiendo de tipo de método que se está desarrollando en función de su aplicación analítica.

Tabla 5. Parámetros de desempeño según el tipo de método analítico				
Tipo de método en función de su aplicación analítica				
Parámetro de desempeño	Contenido/Potencia/Valoración	Prueba de impurezas		Identificación
		Contenido/Valoración	Limite	
Precisión/Adecuabilidad del sistema	Sí	Sí	No	No
Linealidad del sistema	Sí	Sí	No	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	Sí
Exactitud y Repetibilidad	Sí	Sí	No	No
Precisión del método o Precisión intermedia	Sí	Sí	No	No
Estabilidad analítica de la muestra	*	*	No	No
Límite de detección	No	No	Sí	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

\*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método o del analito

En este proyecto de investigación, se desarrollará y validará un método de cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la cuantificación de tizoxanida, el cual tiene como función analítica cuantificar el contenido(contenido/potencia/valoración) de tizoxanida presente en las muestras. El protocolo de validación, lo podremos encontrar en la sección 8.6 Desarrollo y validación del método de cuantificación de tizoxanida.

## 2.4 Nanotecnología farmacéutica

La Nanotecnología es una ciencia multidisciplinar que está dedicada al estudio, diseño, síntesis, manipulación, caracterización y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica. Esta ciencia multidisciplinar y sus productos pueden tener aplicaciones en un sinnúmero de áreas, como puede ser el área farmacéutica, el área textil, en la electrónica, en la industria alimenticia, entre muchas otras. En el presente trabajo, el enfoque estará



orientado en las aplicaciones de la nanotecnología en el área farmacéutica, en específico en desarrollo de formulaciones farmacéuticas de nanopartículas poliméricas.

#### **2.4.1 Definición de nanopartícula**

Una nanopartícula es definida comúnmente como todo aquel material que cuente con una o más dimensiones en el rango de 1 a 100 nm, sin embargo, se ha demostrado que cuando se manejan materiales como polímeros o lípidos se pueden obtener las virtudes de las nanopartículas en rangos de tamaño de 100 a 500 nm. Un ejemplo de lo antes mencionado es el Myocet®, un medicamento comercializado por Elan Pharmaceuticals® y aprobado en el año 2000 por la FDA para el tratamiento de cáncer de mamá metastásico. Myocet® es una formulación nanoliposomal que contiene doxorrubicina como agente quimioterapéutico y presenta un tamaño de partícula de 150 nm.<sup>52</sup>

#### **2.4.2 Clasificación de nanopartículas**

Las nanopartículas más comúnmente utilizadas en el área farmacéutica pueden clasificarse según el componente principal:

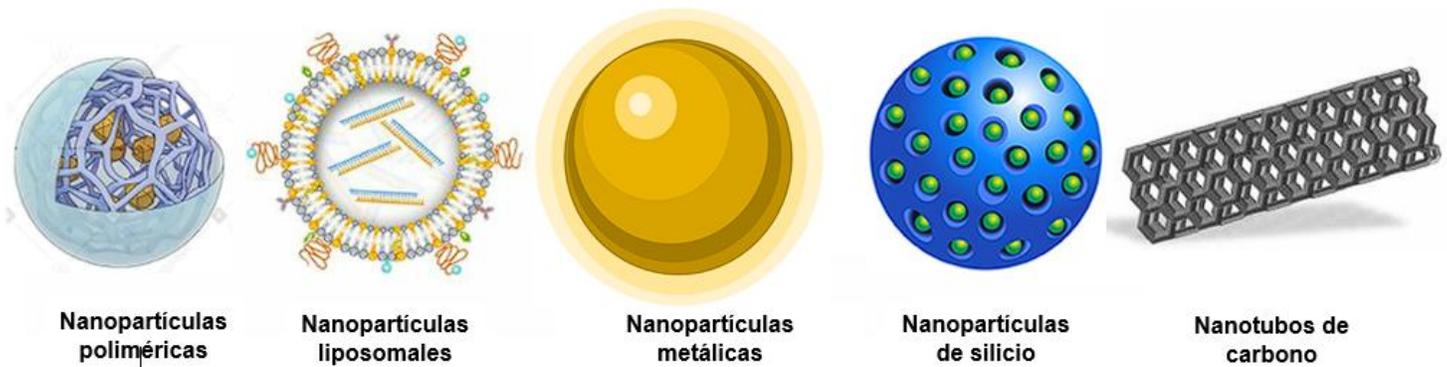
- **Nanopartículas poliméricas:**  
Las Nanopartículas Poliméricas son nanoestructuras las cuales son sintetizadas a partir de polímeros, ya sean sintéticos (Policaprolactona, Poliacrilamida, Poliacrilato, etc.) o naturales (Chitosan, Albúmina, ADN, etc.) las cuales pueden ser cargadas con fármacos afines a la matriz polimérica. Este tipo de nanopartículas destaca en terapias de liberación modificada, por ejemplo, las nanopartículas de PLGA–mPEG descritas por Avgoustakis<sup>53</sup> para la liberación prolongada de cisplatino.
- **Nanopartículas liposomales**  
Una nanopartícula liposomal es un tipo de nanopartícula que se forma a partir de una bicapa de lípidos que rodea y contiene una cavidad o núcleo. Estas nanopartículas se utilizan comúnmente como vehículos de entrega para fármacos, ya que pueden proteger al fármaco durante su transporte y liberarlo de manera controlada en el lugar deseado del cuerpo. Las nanopartículas liposomales también se han utilizado en aplicaciones de investigación y diagnóstico médico, ya que pueden ser modificadas para interactuar con ciertas células o tejidos <sup>54</sup>.
- **Nanopartículas metálicas**  
Son aquellas nanoestructuras formadas por partículas de metales u óxidos de metales las cuales tienen al menos una dimensión en el rango de 1 a 100nm y poseen características distintas a las del metal en dimensiones macroscópicas. Las nanopartículas metálicas tienen la capacidad de actuar como acarreadores que pueden contener en su superficie a los fármacos para transportarlos. Un ejemplo de su uso como acarreadores son las nanopartículas de oro cargadas con paclitaxel para el tratamiento de cáncer descritas por Wang<sup>55</sup>.
- **Nanopartículas de silicio:**  
Las nanopartículas de sílice son un tipo de nanoestructuras que poseen ventajas únicas como acarreadoras, incluyendo una excelente biocompatibilidad, alta hidrofobicidad, gran estabilidad sistémica y resistencia a los cambios de pH, así como una gran multifuncionalidad. Se ha descubierto que las nanopartículas de silicio pueden ser utilizadas para el transporte de fármacos, en imagenología médica y para ingeniería de tejidos. Un ejemplo de su uso en el área farmacéutica es el descrito por Poostforooshan<sup>56</sup>, que describe la preparación y evaluación de



un sistema de nanopartículas de sílica mesoporosa para su uso como transportador de quimioterapéuticos y antibióticos.

- **Nanopartículas de carbono**

Las nanopartículas de carbono son estructuras que poseen buena conductividad eléctrica, conductividad térmica y propiedades mecánicas. Los nanomateriales basados en el carbono incluyen los fullerenos, los nanotubos de carbono, el grafeno y sus derivados, el óxido de grafeno, los nanodiamantes y los puntos cuánticos basados en el carbono. Al existir gran diversidad de nanopartículas de carbono, sus aplicaciones biomédicas son igualmente bastante variadas, pero un ejemplo de sus aplicaciones es como acarreador para la liberación de fármacos, como en el caso de los nanotubos de carbono de pared simple conjugados con paclitaxel descritos por Liu<sup>57</sup>. Al poseer buenas propiedades de conductividad eléctrica, también se ha investigado el uso de los nanotubos de carbono como biosensores, por ejemplo, Barone<sup>58</sup> describió la efectividad de un biosensor de nanotubos de carbono de pared simple como biosensor NFIR.



**Figura 10.** Tipos de nanopartículas de importancia en el ámbito farmacéutico. Adaptada de Mc Carthy<sup>59</sup>.

### 2.4.3 Métodos para la elaboración de nanopartículas poliméricas

Existe una gran cantidad de métodos disponibles para poder sintetizar nanopartículas, por lo cual, comúnmente se les puede agrupar en dos ramas dependiendo de la estrategia de síntesis que se siga, ya sea ascendente o descendente.

#### 2.4.3.1 Estrategia descendente

Son todos aquellos métodos de síntesis de nanopartículas que parten de materiales macroscópicos y mediante métodos físicos, químicos o tecnológicos van disminuyendo el tamaño de los materiales hasta transformarlos en nanomateriales. A continuación, se describen varios ejemplos de su elaboración:

- **Elaboración de nanopartículas por emulsión evaporación de solvente**

El método consiste en la formación de una emulsión a partir de dos fases inmiscibles. Una fase acuosa o continua provista de un agente emulgente apropiado, más una fase dispersa orgánica que contiene el principio activo y el polímero destinado a la formación de la matriz. Una fuente de energía permite formar pequeñas gotas de la fase dispersa, generalmente se emplea una sonda de ultrasonido. Una vez formada la emulsión, el solvente orgánico es evaporado, por lo que debe ser suficientemente volátil. El polímero precipita atrapando al fármaco, lo que permite la formación de nanopartículas.<sup>60</sup>



- Elaboración de nanopartículas por precipitación

El método de elaboración de nanopartículas por precipitación consiste en la formación de partículas por nucleación, a partir de una solución sobresaturada, la cual va a tener condiciones controladas de temperatura, pH y tiempos de nucleación para lograr formar el crecimiento de la estructura cristalina hasta el tamaño deseado de las nanopartículas. <sup>61</sup>

- Elaboración de nanopartículas por coprecipitación

El método de elaboración de nanopartículas por coprecipitación consiste en la disolución de los materiales que formarán las nanopartículas (comúnmente óxidos metálicos como el óxido de Zinc<sup>62</sup>, óxido de hierro<sup>63</sup>, y óxido de cobre<sup>64</sup>) para formar una solución acuosa, la cual posteriormente será mezclada con un agente surfactante que iniciará la precipitación. Posteriormente, para poder separar las nanopartículas del surfactante es necesario llevar a cabo la separación por evaporación de solvente.

- Elaboración de nanopartículas por el método de difusión y emulsificación.

Utiliza un solvente parcialmente soluble como acetona en el que se disuelven polímeros o compuestos bioactivos, después, se emulsionan en una fase acuosa que contiene un estabilizador que evita la agregación de las gotas en la emulsión. Por último, se agrega agua a la emulsión para que se disuelva el solvente y se precipitan las nanopartículas<sup>60</sup>

- Elaboración de nanopartículas por doble emulsión

La doble emulsión es una técnica novedosa en la que el fármaco se disuelve en una solución acuosa y se emulsiona posteriormente en un lípido. La emulsión primaria se estabiliza mediante la adición de un estabilizador que se dispersa en la fase acuosa que contiene un emulsionante hidrofílico. La segunda emulsión es estabilizada por medio de un emulsionante lipofílico disuelto en un solvente no polar (acetona, acetato de etilo, etc.) el cual posteriormente es extraído por evaporación. <sup>65</sup>

#### 2.4.3.2 Estrategia ascendente

Son todos aquellos métodos de síntesis de nanopartículas en los que para construir las nanopartículas se parte de átomos o moléculas y mediante métodos físicos, químicos, biológicos o tecnológicos se generan nanomateriales.

- Elaboración de nanopartículas por síntesis biológica

El método de elaboración de nanopartículas por síntesis biológica es una técnica que permite producir material nanoparticulado metálico, está basado en la reducción del material mediante enzimas como las reductasas. Pueden utilizarse una gran variedad de organismos modificados genéticamente para llevar a cabo este tipo de síntesis, como por ejemplo bacterias (*Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*), extractos de plantas (*Medicago sativa*) y hongos (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, entre otras). Dentro de este tipo de métodos, generalmente se expone el cultivo o la planta a una solución que contenga iones de material metálico, y posteriormente, después de la reacción de reducción y el proceso de nucleación, se extraen las nanopartículas del cultivo, ya sea de la biomasa o por el método que se considere necesario según la especie que se esté utilizando. <sup>66</sup>

- Elaboración de nanopartículas por síntesis de fluidos supercríticos



El método de elaboración de nanopartículas por síntesis de fluidos supercríticos consiste en la deposición de metales u óxidos metálicos en distintas morfologías sobre soportes orgánicos o inorgánicos que son considerados fluidos supercríticos (p. ej., CO<sub>2</sub>). El uso de un fluido supercrítico que contiene una elevada superficie interna permite prevenir la agregación y oxidación de las nanopartículas, a fin de facilitar su formación en su superficie. Las etapas fundamentales para este tipo de método son, la disolución del precursor metálico en el fluido supercrítico, seguido de la adsorción del precursor sobre la fase supercrítica y finalmente la conversión del precursor al sustrato metálico, esto último normalmente se realiza usando un agente reductor y cambios a una presión reducida.<sup>67</sup>

- Elaboración de nanopartículas por deposición química de vapor

Consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), en la superficie del sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas.<sup>68</sup>

- Elaboración de nanopartículas por condensación de gas inerte

El método de elaboración de nanopartículas por condensación de gas inerte consiste en la evaporación en fase gas de un material que se encuentra dentro de una atmósfera de gas inerte (He, Xe, Ar, etc.). Mientras este proceso ocurre, las colisiones de las moléculas del material evaporado con los átomos del gas inerte pierden energía cinética y se condensan en forma de un polvo ultrafino (nanopartículas).<sup>69</sup>

## **2.4.4 Caracterización de las nanopartículas**

### 2.6.4.1 Caracterización morfológica

- Tamaño de partícula

La medición del tamaño de partícula por medio de difracción de luz laser consiste en establecer la distribución del tamaño de las partículas mediante la estimación de la variación angular de la intensidad de la luz dispersada cuando un rayo láser pasa por una muestra de partículas en un líquido. Las partículas grandes dispersan la luz en ángulos pequeños con respecto al rayo láser y las partículas pequeñas dispersan la luz en ángulos grandes. Las distribuciones de tamaño de las partículas se calculan comparando el patrón de dispersión de una muestra con un modelo óptico apropiado. Tradicionalmente, se utilizan dos modelos diferentes: la aproximación de Fraunhofer y la teoría de Mie.<sup>70,71</sup>

- Dispersión de luz dinámica

Esta técnica nos permite determinar el tamaño de partícula de las nanoestructuras que se desean analizar. En esta técnica, la luz laser alcanza a las partículas que se encuentran en suspensión, dispersándose en todas las direcciones posibles, al generarse esta dispersión con un patrón que puede ser analizado en el equipo siguiendo algún modelo geométrico, como la esfera, se obtiene de manera indirecta información sobre el movimiento de las partículas, su tamaño promedio y su índice de polidispersión.

- Microscopía electrónica

Esta técnica consiste en acelerar los electrones a un rango de entre 100 KeV y 1 MeV, posteriormente pasan a través de una muestra delgada por medio de una lente condensadora y



finalmente los electrones llegan a los diversos detectores que contenga el equipo. Dependiendo del equipo, la magnificación puede ir desde 50X hasta 100X, además, algunos de estos equipos permiten también obtener información sobre la difracción de la muestra analizada.

- Microscopía de fuerza atómica

Esta técnica mecánico-óptica nos permite formar imágenes de las superficies de las muestras analizadas utilizando una sonda que recorre a la muestra haciendo una exploración línea por línea, es decir, mientras que por medio de software se genera una imagen topográfica 3D de la muestra analizada.

#### 2.6.4.2 Caracterización eléctrica

- Potencial zeta

En esta técnica se obtiene una medida de la magnitud de repulsión o atracción electrostática entre las partículas. Las partículas al encontrarse en suspensión sobre un medio específico generan una carga superficial, sobre esta superficie se encontrará el medio, que tiene una carga contraria a la de la partícula, potencial zeta será entonces una medida de la diferencia entre estas dos cargas, y nos permitirá conocer el comportamiento y la estabilidad (resistencia a la agregación) de nuestras partículas.

#### 2.6.4.3 Caracterización topográfica

- Difracción de rayos X

Esta técnica es muy potente capaz de evaluar (identificar, cuantificar y/o estudiar) las fases cristalinas presentes en cualquier tipo de material, ya sea natural o sintético, así como de determinar la estructura cristalina de los sólidos.

En esta técnica un haz colimado de rayos X incide en la muestra y es difractado por la estructura cristalina de acuerdo con la ley de Bragg. Durante el proceso se va cambiando el ángulo de incidencia del haz de rayos X para poder obtener un perfil de difracción que describa la estructura cristalina de nuestro material. La difracción de rayos X de polvo, a diferencia de la difracción de rayos X de monocristal, genera un perfil de difracción que representa el comportamiento del material en su totalidad

#### 2.6.4.3 Caracterización espectroscópica

- Espectroscopia UV-visible

Esta técnica espectroscópica se fundamenta en la interacción entre la luz y la materia, específicamente en la absorción de radiación electromagnética en las regiones ultravioleta y visible del espectro. Cuando una muestra absorbe luz en esta región, los electrones de los enlaces químicos experimentan transiciones electrónicas a estados más energéticos. Este cambio en la energía se refleja en un espectro que representa la absorción en función de la longitud de onda. Esta técnica tiene aplicaciones cuantitativas ya que siguiendo la ley de Lambert y Beer, se puede correlacionar el valor de absorbancia obtenido por una muestra con su concentración.

- Espectroscopia infrarroja



Esta técnica espectroscópica nos permite obtener información sobre los grupos funcionales de la molécula que estamos analizando. El fundamento de esta técnica que utiliza radiación en el espectro infrarrojo es que, a ese mismo nivel de energía, se encuentran las vibraciones moleculares, por lo que al realizar un barrido con longitudes de onda en el espectro se obtiene información en forma de bandas en un espectro las cuales están relacionadas con los grupos funcionales.

#### 2.6.4.5 Caracterización óptica

- Microscopía de Transmisión Electrónica

En esta técnica, los electrones son transmitidos a través de una muestra ultradelgada, lo que permite obtener detalles a una escala nanométrica. La interacción de los electrones con la muestra produce imágenes de alta resolución que revelan detalles estructurales finos, como orgánulos celulares, nanopartículas y estructuras cristalinas.

- Espectroscopia Raman

Esta técnica espectroscópica se basa en la dispersión inelástica de la luz que se produce cuando la materia es irradiada por una fuente de luz. En esta técnica se mide la fracción de luz que después de interactuar con la muestra modifica su longitud de onda, a este fenómeno se le llama efecto Raman. Es una técnica nos proporciona información sobre la estructura química, el polimorfismo, la cristalinidad y la dinámica molecular del analito.

## 2.5 Polímeros de uso farmacéutico

Los polímeros son compuestos químicos formados por cadenas de monómeros los cuales están unidos por enlaces covalentes. Los polímeros, tienen aplicaciones y propiedades muy variadas que dependen del tamaño de su cadena y el monómero que las forme, pero en el ámbito farmacéutico, los polímeros normalmente se utilizan como excipientes en formulaciones de liberación controlada, en sistemas bioadhesivos y como estabilizantes.

El uso de polímeros en sistemas de liberación permite la protección del principio activo, mejora la estabilización física y química, e incluso puede incrementar la solubilidad de la formulación, lo cual se ve reflejado como un aumento de la biodisponibilidad del fármaco.

Los polímeros de uso farmacéutico deben ser biodegradables, para que, una vez finalizado su propósito, pueda ser degradado en subproductos naturales que el cuerpo pueda expulsar, y también deben ser biocompatibles, es decir, que puedan llevar a cabo su acción en el organismo sin desencadenar una respuesta inmunológica en el organismo.<sup>72</sup>

Entre los polímeros más empleados en la fabricación de nanopartículas están: ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), colágeno, polihidroxibutirato (PHB), policaprolactona (PCL), polidioxanona (PDO), derivados de la quitina, quitosán, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), copolímeros de poli (óxido de etileno) y polibutilentereftalato (PEO/PBT).<sup>73</sup>

### 2.5.1 Policaprolactona

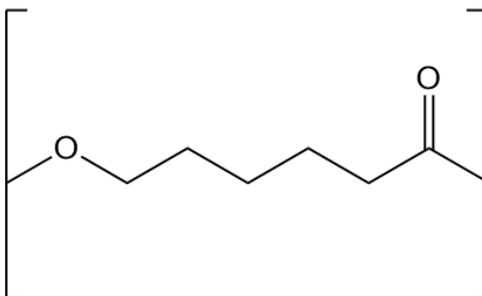
La policaprolactona (PCL) es un polímero semicristalino biodegradable y biocompatible que presenta bajo punto de fusión (59 a 64°C) y una baja temperatura de transición vítrea (-60°C), por esta razón, en condiciones normales siempre se encuentra en estado gomoso. Esta naturaleza física contribuye a una elevada permeabilidad a un gran número de principios activos, y confiere también una alta resistencia y flexibilidad. Es térmicamente estable y compatible con otros polímeros. Es insoluble en agua, medio en el cual colapsa pudiendo ser así útil para atrapar entre sus cadenas a sustancias



insolubles en disolventes acuosos. Es soluble en disolventes orgánicos como diclorometano, benceno, cloroformo, ácido acético, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, entre otros. La PCL forma parte de la familia de poliésteres alifáticos los cuales, debido a su reputación como materiales seguros y no tóxicos, se usan como portadores en muchos tipos de sistemas de administración de uso humano y veterinario (implantes, inyectables, microcápsulas, microesferas, nanopartículas entre otros). Sus productos de biodegradación no son tóxicos y este no es carcinógeno por ello cuenta con la aprobación de la FDA. <sup>74-76</sup>

La policaprolactona tiene propiedades de degradación lenta *in vivo* que lo hace un polímero adecuado para el diseño de dispositivos para entrega de fármacos de liberación prolongada, se degrada fácilmente por hidrólisis de sus enlaces éster. La velocidad de este proceso depende de los aditivos, de la forma y del tamaño del dispositivo final. El principal producto de biodegradación de PCL es el ácido 6-hidroxicapróico que es removido por el metabolismo. <sup>74,77</sup>

La degradación de la PCL tiene lugar por la enzima gluconolactonasa que la cataboliza transformándola en 6-hidroxihexanoato. Esta enzima se encuentra presente en distintos tipos de bacterias como en *Xanthomonas campestris* (bacteria patógena de plantas) o *Brucella melitensis* (bacteria patógena intracelular que produce la fiebre de Malta en humanos) formando parte de la vía de las Pentosas Fosfato. La ruta metabólica continúa con la formación de semialdehído adípico, adipato, y finalmente en CO<sub>2</sub> ya que van a ser eliminados por el organismo a través de la formación de productos de degradación biocompatibles que se transforman en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O por las vías metabólicas usuales. <sup>77,78</sup>



**Figura 11.** Estructura química de policaprolactona

## 2.6 Diseño de Experimentos

El diseño de experimentos es una técnica utilizada en investigación científica y en otras áreas para evaluar el impacto de ciertas variables en un sistema o proceso. Consiste en establecer y controlar de manera cuidadosa las condiciones del experimento, a fin de poder determinar con precisión la relación entre la variable independiente (la que se manipula) y la variable dependiente (la que se mide). <sup>79</sup>

Un buen diseño experimental es esencial para obtener resultados precisos y confiables. A partir de este, nos encargamos de eliminar todas las variables irrelevantes que puedan afectar el resultado del experimento, y se toman las medidas adecuadas para controlar las variables relevantes.

El diseño de experimentos es una herramienta valiosa en el campo de la tecnología farmacéutica para mejorar la calidad de los productos y procesos, y reducir el tiempo y los costos de producción. El diseño de experimentos es una técnica sistemática que se utiliza para investigar la relación entre las variables y los resultados de un proceso. En la tecnología farmacéutica, el diseño de



experimentos se utiliza en la etapa de desarrollo farmacéutico, en la cual se investigan los factores que afectan la calidad del producto y se optimizan las condiciones de fabricación.

### 2.6.1 Diseños Factoriales

Existente distintos tipos de diseños experimentales, uno de los tipos más comunes en el área farmacéutica es el diseño factorial. Este tipo de diseño permite evaluar el efecto de dos o más variables independientes simultáneamente, lo que permite determinar la interacción entre estas variables. Por ejemplo, en el desarrollo de un nuevo medicamento, se puede utilizar un diseño factorial para evaluar el efecto de diferentes dosis del medicamento y diferentes grupos de pacientes al mismo tiempo.

El diseño factorial es especialmente útil cuando se quiere evaluar el efecto de múltiples variables en un proceso complejo, ya que permite determinar cómo cada variable afecta al resultado final. Además, permite reducir el número de experimentos necesarios para evaluar el efecto de cada variable por separado poseer este conocimiento puede ahorrar tiempo y recursos.<sup>80</sup>

En los diseños de experimentos factoriales, se suele utilizar la notación " $N^k$ " para indicar el número total de unidades experimentales o ensayos necesarios para completar un diseño factorial completo. La letra "N" representa el número de niveles posibles para cada factor, mientras que la letra "k" representa el número de factores en el diseño.

$$N^k = \text{número de unidades experimentales}$$

$N$  = Número de niveles

$k$  = Cantidad de factores

Un ejemplo de esto es un diseño factorial completo de dos factores con dos niveles cada uno, se necesitarán  $N^k = 2^2 = 4$  unidades experimentales. Cada unidad experimental recibirá un tratamiento diferente, pues es una combinación única de los niveles de los dos factores. A continuación, se muestra una tabla en la cual podemos ver representada en forma de matriz un diseño factorial  $2^2$ . El nivel bajo se representa como -1, mientras que el nivel alto se representa como +1. En la Tabla 6, podemos observar gráficamente un ejemplo de diseño factorial  $2^2$ .

**Tabla 6. Ejemplo de diseño factorial  $2^2$**

Tratamiento	Factor A	Factor B
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

Una de las ventajas de los diseños factoriales, es la facilidad de su planteamiento, ya que nos permiten escalarlo fácilmente para evaluar múltiples factores, por ejemplo, en un diseño factorial completo de tres factores con dos niveles cada uno, se necesitarán  $N^k = 2^3 = 8$  unidades experimentales. Cada unidad experimental recibirá uno de los ocho tratamientos únicos, que son combinaciones únicas de los niveles de los tres factores. En la Tabla 7, podemos observar gráficamente un ejemplo de un diseño factorial  $2^3$ .



Tabla 7. Ejemplo de diseño factorial $2^3$			
Tratamiento	Factor A	Factor B	Factor C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

En general, el número de unidades experimentales necesarias aumenta exponencialmente a medida que se agregan más factores o niveles al diseño factorial. Por lo tanto, los diseños factoriales completos pueden ser útiles para examinar múltiples factores y cómo interactúan entre sí, pero también pueden requerir una cantidad considerable de recursos para implementar y analizar. En algunos casos, los diseños factoriales fraccionados o incompletos pueden ser una opción más eficiente.

Un diseño fraccionario es un tipo de diseño experimental en el que no se incluyen todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores. En cambio, se selecciona solo una fracción de estas combinaciones, lo que permite reducir el número de ensayos necesarios para llevar a cabo el experimento.

Por ejemplo, consideremos un diseño fraccionario  $2^{4-1}$  en el que se están estudiando cuatro factores (A, B, C y D) con dos niveles cada uno. En un diseño factorial  $2^4$  se requerirían 16 unidades experimentales, sin embargo, en el el diseño fraccionario selecciona una fracción de las combinaciones posibles, en este caso,  $2^{4-1} = 2^3 = 8/2 = 4$  combinaciones. La tabla 8 representa este diseño sería la siguiente:

Tabla 8. Ejemplo de diseño factorial fraccionario $2^{(4-1)}$				
Tratamiento	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	+1	-1
3	-1	+1	+1	-1
4	+1	+1	-1	+1

En este diseño, se seleccionaron solo cuatro tratamientos únicos de los 16 posibles, que representan el 25% de las combinaciones totales. Este diseño permite ahorrar tiempo y recursos al no incluir todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores, pero puede haber cierta pérdida de información. Por lo tanto, es importante elegir cuidadosamente qué combinaciones incluir en el diseño fraccionario para asegurarse de que se capturen los efectos más importantes de los factores.

En el presente trabajo de investigación se realizó un diseño de experimentos factorial  $2^2$  para investigar el efecto que tienen la cantidad de Policaprolactona (PCL) y la cantidad de alcohol polivinílico (PVA) sobre la formulación de nanopartículas cargadas con tizoxanida.



### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Antecedentes sobre nitazoxanida

Nitazoxanida fue sintetizada originalmente por Jean-François Rossignol<sup>43</sup> en el Instituto Pasteur en 1975. Los estudios que realizaron posteriormente Rossignol y Cavier en 1982 demostraron que la molécula tenía una gran efectividad como antihelmíntico<sup>81</sup>. Posteriormente, en conjunto con Romark Laboratories ® se licenció la patente de nitazoxanida bajo el nombre de Alinia ® para el tratamiento de *Cryptosporidium* en pacientes pediátricos menores a 12 meses dentro de los Estados Unidos.

Actualmente, nitazoxanida está aprobada por varias entidades regulatorias, entre ellas la FDA, como tratamiento efectivo contra la criptosporidiosis en pacientes pediátricos.

En el año 2008, los investigadores Rossignol y Keefe<sup>82</sup> iniciaron estudios controlados utilizando nitazoxanida sobre diversas líneas celulares (AVA5, Huh7.5, Vero cells, BHK-21, PBMC, MA104 y HG23) en los cuales confirmaron la actividad antiviral de nitazoxanida sobre los virus de la hepatitis C y B. Estos estudios se basaron en los informes previos del investigador Brent Korba<sup>37</sup>, quien había identificado mediante estudios *in vitro* que nitazoxanida tiene actividad antiviral contra el virus de la hepatitis B y C. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios clínicos y preclínicos que han demostrado la eficacia de nitazoxanida en el tratamiento de diversas enfermedades virales, incluyendo la hepatitis viral. Nitazoxanida ha demostrado ser segura y bien tolerada en estudios clínicos, lo que la convierte en un candidato prometedor para el tratamiento de enfermedades virales en humanos.

Actualmente, continúan las investigaciones que intentan probar la efectividad de nitazoxanida contra otras enfermedades, entre las más destacables se encuentran, la diarrea causada por astrovirus<sup>80</sup>, el COVID-19<sup>83</sup> y la hepatitis viral<sup>82</sup>.

#### 3.2 Antecedentes sobre nanotecnología farmacéutica

El primer antecedente en el cual se menciona el planteamiento de la Nanotecnología fue hecho por Richard Feynman en 1959, cuando en medio de una conferencia, presentó su idea de que, gracias a los constantes avances en la tecnología, se alcanzara un punto en el cual se fabricaran de máquinas que nos permitieran manipular la materia a nivel atómico. Dicha conferencia, inició una fiebre en la cual científicos de todo el mundo se adentraron en la investigación de la fabricación de nanomateriales, descubriendo así que los materiales a esa escala presentan diferentes propiedades que cuando se encuentran en macroescala.<sup>84</sup>

En 1974 Norio Taniguchi introdujo el término nanotecnología y lo definió como "El proceso de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula".<sup>85</sup>

En 1981 Gerd Binnig y Heinrich Rohrer diseñaron el Scanning Tunnel Microscope (STM) el cual permite ver la imagen de los átomos, hecho que influyó en el desarrollo de los fullerenos, cuyas formas estables de carbono permiten crear nanotubos y nanoesferas, elementos fundamentales para la creación de estructuras más complejas.<sup>84</sup>

En 1981 Eric Drexler, un alumno del MIT, propuso construir objetos más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares, revolucionó la nanotecnología introduciendo el término bottom-up (de abajo hacia arriba), para desarrollar los objetos a partir de un proceso de autoensamblado, afianzando así el término de Nanotecnología Molecular.<sup>84</sup>



En 1984, Donald A. Tomalia descubrió los dendrímeros, una nueva clase de polímeros ramificados con una estructura en árbol altamente ramificada que se ramifica desde un núcleo central. Tomalia también definió el término "dendrímero", que se refiere a cualquier molécula ramificada que presenta una estructura de árbol con múltiples niveles de ramificación. Desde entonces, los dendrímeros se han convertido en una herramienta útil para el diseño de fármacos y la entrega de medicamentos debido a su capacidad para encapsular moléculas y liberarlas de manera controlada en el cuerpo.<sup>86</sup>

En 1990, Sigma Tau® lanzó Adagen®, el primer medicamento en utilizar nanopartículas poliméricas de PEG en su formulación. Adagen® se utilizó para tratar la deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), una enfermedad hereditaria que afecta al sistema inmunológico y que puede llevar a la muerte prematura si no se trata adecuadamente. Las nanopartículas poliméricas de PEG en Adagen® permitieron que el medicamento se mantuviera en el cuerpo durante más tiempo, lo que resultó en una mayor eficacia del tratamiento y en la necesidad de administrar menos dosis del medicamento en comparación con los tratamientos convencionales.<sup>87</sup>

En 1991, Sumio Iijima descubrió los nanotubos de carbono, una forma única y sorprendente de estructura de carbono en la que los átomos de carbono están dispuestos en una estructura tubular. Los nanotubos de carbono son extremadamente resistentes y tienen propiedades eléctricas y mecánicas únicas que los hacen ideales para aplicaciones en la nanotecnología, incluyendo la entrega de fármacos y la creación de biosensores.<sup>88</sup>

En 1995, Doxil® se convirtió en la primera formulación de nanopartículas liposomales aprobada por la FDA. Doxil® es un medicamento utilizado en el tratamiento del cáncer de ovario y del cáncer de mama metastásico, y utiliza una formulación de liposomas para entregar el fármaco doxorubicina de manera más eficiente y con menos efectos secundarios. Los liposomas son pequeñas vesículas que se componen de una bicapa lipídica y que pueden encapsular fármacos hidrófobos en su interior. Al entregar el fármaco a través de liposomas, se pueden evitar los efectos secundarios tóxicos que se observan con la administración de doxorubicina por sí sola. Su aprobación por la FDA marcó un hito importante en la historia de la nanotecnología en el campo de la medicina.<sup>89</sup>

En 1999, Eisai Inc. ® lanzó Ontak®, que fue la primera nanopartícula proteica combinada con un fármaco en el mercado. Ontak® es un medicamento utilizado en el tratamiento del linfoma de células T, y está compuesto por una proteína que se une específicamente a las células cancerosas y una toxina derivada de la difteria que las destruye. La proteína se encuentra unida a la toxina mediante un enlace peptídico estable, lo que permite que la toxina se dirija específicamente a las células cancerosas sin dañar las células sanas circundantes.<sup>90</sup>

En el año 2000, la FDA aprobó el primer producto basado en la tecnología de nanocristales líquidos, Rapamune®. Este medicamento es utilizado para prevenir el rechazo de órganos trasplantados en pacientes adultos. Esta tecnología se basa en la formación de nanocristales de un fármaco insoluble en agua en un vehículo líquido apropiado. Los nanocristales de Rapamune® son pequeñas partículas sólidas que se dispersan uniformemente en un líquido para crear una suspensión homogénea. Esto aumenta la superficie de contacto entre el fármaco y el líquido, lo que aumenta la velocidad de disolución y, por lo tanto, la eficacia del medicamento. La tecnología de nanocristales líquidos ha permitido la formulación de muchos fármacos insolubles en agua, lo que ha mejorado su biodisponibilidad y eficacia terapéutica.<sup>91</sup>

En 2003, Stryker® lanzó al mercado Vitoss®, un producto de nanopartículas de fosfato de calcio con capacidades biomiméticas. Este medicamento es utilizado en la regeneración ósea y se compone de pequeñas partículas de fosfato de calcio que se adhieren a la superficie del hueso dañado,



imitando la estructura del hueso natural. La alta superficie específica de las nanopartículas permite la rápida formación de un andamio de calcio, que luego se mineraliza para formar hueso nuevo. Vitoss® se ha utilizado con éxito en la regeneración ósea en diversas áreas del cuerpo, incluyendo la columna vertebral y las extremidades, y ha mejorado significativamente la tasa de éxito en los procedimientos de regeneración ósea.<sup>92</sup>

En el año 2005, Bioscience® lanzó al mercado Abraxane®, un medicamento a base de nanopartículas liposomales que contiene paclitaxel, un potente agente quimioterapéutico utilizado para tratar diversos tipos de cáncer. Abraxane® es una formulación innovadora en la que el paclitaxel se une a nanopartículas lipídicas, mejorando su biodisponibilidad y permitiendo su administración sin la necesidad de un solvente tóxico. Además, las nanopartículas en Abraxane® se dirigen específicamente a las células cancerosas, reduciendo la toxicidad en las células sanas.<sup>93</sup>

En 2009, AMAG Pharmaceuticals® lanzó Feridex®, un agente de contraste utilizado en imágenes de resonancia magnética (MRI) que se basa en nanopartículas de dióxido de hierro con dextrano. Feridex® se utiliza para mejorar la visualización de ciertas estructuras corporales durante la realización de una MRI y permite a los médicos detectar enfermedades y lesiones con mayor precisión. El uso de nanopartículas de dióxido de hierro en Feridex® permite una mayor sensibilidad y especificidad en la imagen de MRI en comparación con otros agentes de contraste utilizados anteriormente.<sup>94</sup>

En 2010, MagForce® lanzó al mercado Nanotherm®, un sistema de terapia basado en nanopartículas de dióxido de hierro que utiliza campos magnéticos para tratar el cáncer de próstata. Las nanopartículas se inyectan directamente en el tumor y, a continuación, se calientan mediante un campo magnético externo, lo que resulta en la destrucción selectiva de las células cancerosas.<sup>95</sup>

Los hechos antes mencionados, sentaron las bases de la nanotecnología farmacéutica, y en años próximos una gran cantidad de empresas empezaron a desarrollar productos que aplicaban las tecnologías que se iban desarrollando. En la línea de tiempo que se muestra a continuación (*figura 12*), se muestran cronológicamente algunos de los eventos más relevantes en la historia de la nanotecnología farmacéutica:



R. Feynman propone que se podrá manipular la materia a nivel atómico

1959



Eric Drexler diseña maquinas moleculares que mimetizan enzimas y ribosomas

1981



Sigma Tau Pharmaceuticals® lanza Adagen®, primer medicamento a base de nanopartículas poliméricas de PEG

1990



Doxil® se convierte en la primera formulación de nanopartículas liposomales en ser aprobada por la FDA

1995



La FDA aprueba el primer producto basado en la tecnología de nanocristales líquidos, el Rapamune®

2000



Bioscience® lanza Abraxane®, nanopartículas liposomales con paclitaxel (anticancerígeno)

2005



MagForce® lanza al mercado NanoTherm®, primeras nanopartículas de dióxido de hierro en el mercado

2010

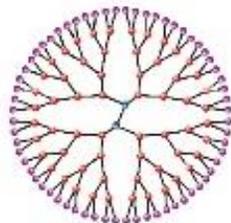
1974

Norio Taniguchi introduce el término "nanotecnología"



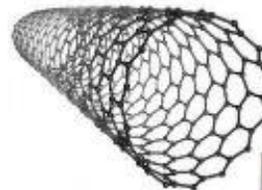
1984

Donald A. Tomalia acuña el término "dendrimeros" y publica su método de preparación



1991

Sumio Iijima descubre los nanotubos de carbono



1999

Eisai Inc.® lanza Ontak®, primera nanopartícula proteica combinada con un fármaco (toxina diftérica)



2003

Stryker® lanza al mercado Vitoss®, producto de nanopartículas de fosfato de calcio con capacidades biomiméticas



2009

AMAG pharmaceuticals® lanza Feridex®, un agente de contraste hecho a base de nanopartículas de dióxido de hierro con dextrano



Figura 12. Línea de tiempo de la historia de la nanotecnología farmacéutica.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Las enfermedades hepáticas, como el carcinoma hepatocelular y la hepatitis, se han vuelto un problema de salud pública para la población mexicana llegando a ser una de las principales causas de muerte, por lo que se considera una prioridad la investigación farmacéutica que pueda contribuir al desarrollo de nuevas terapias que puedan tratar y/o curar enfermedades hepáticas. Unas de las múltiples enfermedades hepáticas de relevancia son la hepatitis viral de tipo B y C, las cuales actualmente ya cuentan con esquemas de tratamiento aprobados en el sector salud para su uso en el tratamiento de estas enfermedades, sin embargo, se ha identificado que existen cepas de VHB y VHC resistentes a las terapias más comúnmente utilizadas, esto debido al uso crónico. Dicha resistencia a la terapia genera una menor eficacia del tratamiento en pacientes crónicos, por lo que se ha optado por generar terapias conjuntas, en las cuales se administren dos o más antivirales para mantener la eficacia, sin embargo, considerando que el uso continuo de estas terapias puede llegar a causar resistencia, se vuelve imprescindible la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos antivirales con acción en contra de VHB y VHC.

Nitazoxanida, un fármaco que actualmente es utilizado como antiparasitario, ha demostrado efectividad como antiviral en contra de VHB y VHC <sup>37</sup>, y actualmente ya se han publicado estudios clínicos<sup>38,96</sup> que demuestran que es un medicamento efectivo y seguro para su uso como antiviral en el tratamiento de la hepatitis viral. Sin embargo, nitazoxanida es un fármaco con una pobre solubilidad acuosa ( $7 \times 10^{-3}$  mg/mL) por lo cual para poder lograr su acción farmacológica es necesario administrar grandes dosis de fármaco, sin embargo, este problema puede ser resuelto mediante tecnología farmacéutica usando alguna técnica para mejorar la solubilidad como pueden ser la formación de sales, la síntesis de cocrisales o la formulación en nanopartículas. En el presente trabajo se propone una formulación de Nanopartículas poliméricas la cual tiene por objetivo mejorar la solubilidad acuosa de nitazoxanida para así lograr el efecto terapéutico con una menor dosis.

#### **5. PROPOSITO**

Se llevará a cabo el desarrollo de una formulación de nanopartículas poliméricas de policaprolactona por el método de emulsión usando alcohol polivinílico como estabilizante, la formulación estará cargada con tizoxanida. Además, las nanopartículas poliméricas preparadas serán caracterizadas en su estructura química (IR, UV-vis, RMN), estructura cristalográfica (DRX), y de la nanoestructura (potencial zeta, índice de polidispersión, tamaño de partícula). Se desarrollará y validaran métodos de cuantificación de nitazoxanida y tizoxanida por CLAR/UV-vis, para posteriormente utilizarlos para evaluar la capacidad de carga, eficiencia de encapsulación y la liberación del fármaco.

#### **6. HIPÓTESIS**

Las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida desarrolladas tendrán una mejoría en la solubilidad acuosa con respecto a la observada en formulaciones convencionales.



## 7. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivos generales

- Desarrollar y caracterizar una formulación farmacéutica de nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con tizoxanida que tengan liberación mejorada con respecto al fármaco.

### 7.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un método para la síntesis de tizoxanida.
- Desarrollar un método de obtención de nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con tizoxanida.
- Caracterizar y evaluar las nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con tizoxanida.
- Determinar la cinética de liberación de las nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con tizoxanida

## 8. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 8.1 Materiales

Tabla 9. Materiales		
Material	Marca	Número de lote
Nitazoxanida (Paramix®)	Liomont®	C06030
Policaprolactona	Sigma-Aldrich®	MKB4985V
Alcohol polivinílico	Sigma-Aldrich®	039K0147
Manitol	BASF®	99880516K0
Fosfato monosódico	Fermont®	359421
Metanol CLAR	Fermont®	012564
Acetato de etilo	Fermont®	032452
Ácido clorhídrico	Meyer®	C0113014
Ácido fosfórico	Meyer®	C0113009
Agua tridestilada	JTBAKER	E34W03
Dimetilsulfoxido	Fermont®	471283

### 8.2 Equipos, instrumentos y software

Tabla 10. Equipos e instrumentos			
Material	Marca	Modelo	Número de serie
Balanza analítica	OHAUS®	PA214	B316236347
Parrilla de agitación múltiple	Labline®	1262	0301-3072
Rotaevaporador	Büchi®	R-200	0400026081
Baño de calentamiento para rotaevaporador	Büchi®	B-490	0400028917
Bomba de vacío	Büchi®	V-100	1000197032
Controlador	Hitachi®		54664
Detector UV-vis	Hitachi®	L-2400	54806
Horno para columna	Hitachi®	L-2300	54662
Automuestreador	Hitachi®	L-2200	55648
Bomba	Hitachi®	L-2130	54663
Ultraturrax	IKA®	T18 D S1	03498810



Ultracentrífuga	Beckman-Coulter®		
Centrífuga Minispin	Eppendorf®	5452	5452CK171336
Zetasizer	Malvern®	Nano ZS	NS581264
Potenciometro	OAKLON®	pH 700	2260978
Espectrofotometro UV	Shimadzu®	UV-1700	A11024136160CS

Tabla 11. Software	
Software	Versión
Excel 365	2304
Origin Pro-9.0	90E
MestreNova 14	14.2.0-26256
ThermoScientific OMNIC	8.2.0.387
Universal Analysis 2000	4.2E
Statgraphics Centurion XVI	16.1.18

### 8.3 Obtención de nitazoxanida y tizoxanida

#### 8.3.1 Obtención de nitazoxanida

La nitazoxanida utilizada en este trabajo fue obtenida a partir de una formulación comercial Paramix® de Liomont®. Se trituraron las tabletas comerciales hasta obtener un polvo fino, el cual se diluyó en 100 mL de acetato de etilo y se dejó en agitación constante durante 24 h. Posteriormente se filtró con papel filtro la solución y se depositó en un matraz bola. Esta solución se evaporó a baja presión a 40°C con el fin de extraer el acetato de etilo presente en el matraz y finalmente obtener el sólido. Este proceso se repitió por tres días para obtener la mayor cantidad posible de nitazoxanida de las tabletas.

#### 8.3.2 Síntesis de tizoxanida

Para obtener el producto de degradación, tizoxanida, se llevó a cabo primero una revisión bibliográfica para conocer los posibles métodos que se podían utilizar para la reacción de degradación por hidrólisis ácida, así como las posibles variables que existían en los métodos para optimizar el proceso. De esta investigación se encontró un método de síntesis de tizoxanida propuesto por J. F. Rossignol<sup>97</sup>, en el cual se propone que para obtener tizoxanida se debe hacer una suspensión con 100 g de nitazoxanida en 500 mL de ácido clorhídrico concentrado (37% m/v) a 50°C por 24 h con agitación constante. La suspensión resultante deberá dejarse enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, posteriormente se filtrará la solución con papel filtro y se harán lavados con agua destilada para extraer cualquier resto de ácido clorhídrico. Se debe secar el polvo a temperatura ambiente y una vez seco, se debe extraer el polvo y almacenar adecuadamente en un vial debidamente etiquetado. En el presente proyecto, se hizo una modificación de la metodología propuesta por Rossignol<sup>97</sup>, para la preparación de un lote de tizoxanida, se pesaron 0.30 g de nitazoxanida, los cuales se colocaron en suspensión con 1.8 mL de ácido clorhídrico concentrado (38% m/v) a temperatura ambiente por 72 horas con agitación constante, posteriormente se lavó y filtró la solución resultante, para finalmente dejar secar el sólido y almacenar el producto resultante.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**U.A.E.M**  
**PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **"DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON TIZOXANIDA POR EL MÉTODO DE EMULSIÓN"** presentado por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia, **C. Erick Humberto Salgado Bahena (10010877)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

#### Jurado

Dr. Julio César Rivera Leyva

Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Dra. Adriana Valladares Méndez

Dra. Blanca Estela Duque Montaña

*Firma electrónica*



Atentamente

**"Por una humanidad culta  
una Universidad de excelencia"**

**M.P.D. REYNA AMÉRICA SERRANO LÓPEZ**  
**SECRETARIA DE DOCENCIA**

C.c.p.: archivo  
"BEDM"

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2º piso.  
Tel. (777) 329 7000.



*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023

## 8.4 Preparación de soluciones

- Solución de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 0.5%



Se tomaron 100 mL de agua tridestilada y se colocaron en un matraz volumétrico de 200 mL, posteriormente se tomaron 0.68 mL de ácido fosfórico concentrado 85%, se añadieron al volumen de agua y se agito la solución para homogeneizarla. Finalmente se llevó a volumen de aforo con agua tridestilada.

- Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 (0.05 M)**  
 Para preparar 500 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, se pesaron 3.45 g de fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), se colocaron en un vaso de precipitados de 500 mL, se les añadió 450 mL de agua tridestilada, se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 1 M y la ayuda de un potenciómetro. Una vez ajustado el pH, se vertió la solución amortiguadora en un matraz volumétrico de 500 mL y se completó el volumen con agua tridestilada. Además, se verifico el pH de la solución después de completar el aforo.
- Solución stock de tizoxanida (1000 µg/mL)**  
 Se tomó un peso equivalente a 10 mg de tizoxanida, posterior a ello se disolvió con 3 mL de DMSO en un matraz volumétrico de 10 mL, se agitó vigorosamente con ayuda de un Vortex y se aforó con metanol de grado analítico hasta alcanzar un volumen de 10 mL.
- Solución de trabajo de tizoxanida (100 µg/mL)**  
 Se tomó una alícuota de 1 mL de solución stock de tizoxanida con una micropipeta y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL. Se añadieron 5 mL de metanol de grado analítico y se agito vigorosamente con ayuda de un vortex, posteriormente se llevó a volumen de aforo con metanol de grado analítico.
- Curva de cuantificación de tizoxanida**  
 Se preparo una curva de cuantificación de tizoxanida a partir de la solución de trabajo de tizoxanida (100 µg/mL) utilizando la metodología descrita en la tabla 12.

**Tabla 12. Metodología para la curva de cuantificación de tizoxanida**

Puntos de la curva de cuantificación	Concentración (µg/mL)	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de metanol (µL)	Volumen final (mL)
1	0.5	50 µL de solución 6	1950 µL	2 mL
2	1	100 µL de solución 6	1900 µL	2 mL
3	5	500 µL de solución 6	1500 µL	2 mL
4	10	1000 µL de solución 6	1000 µL	2 mL
5	15	1500 µL de solución 6	500 µL	2 mL
6	20	2000 µL de solución de trabajo de tizoxanida	8000 µL	10 mL



## 8.5 Estudios de preformulación

### 8.5.1 Espectroscopia UV-visible.

Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible para obtener los espectros de absorción UV-visible de nitazoxanida y tizoxanida en un rango de 200-600 nm. Se prepararon curvas de cuantificación de nitazoxanida y tizoxanida siguiendo la metodología descrita en el subtema 8.4 en la sección “Curva de cuantificación”, finalmente se leyeron las muestras en el espectrofotómetro.

### 8.5.2 Espectroscopia Infrarroja

Se tomaron muestras de 10 mg de las materias primas (nitazoxanida, tizoxanida, policaprolactona, alcohol polivinílico y manitol), las cuales se colocaron sobre el sensor de diamante ATR, y se hicieron 16 escaneos de cada muestra, en un intervalo entre 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

### 8.5.3 Resonancia Magnética Nuclear de protón

La identificación de nitazoxanida y tizoxanida fue llevada a cabo mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón. Se tomó una muestra de 10 mg del polvo de la muestra, la cual se solubilizo en DMSO deuterado y se analizó con un equipo Bruker AVANCE III HD (500MHz) en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

### 8.5.4 Difracción de rayos X de polvos

Se prepararon muestras de 60 mg de la formulación optimizada y de las materias primas. Para cada medición se colocó la muestra en la platina del difractómetro rayos X para polvos con condiciones de escanear la muestra de 5 a 45° ( $2\theta$ ) durante 20 minutos. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

### 8.5.5 Calorimetría diferencial de barrido

Se emplearon crisoles de aluminio con sus respectivas tapas, los cuales fueron previamente pesados y ajustados. Aproximadamente 3 mg de la formulación optimizada o de las materias primas se colocaron con precisión en cada crisol. Posteriormente, los crisoles se sellaron junto con las tapas utilizando una prensa especializada.

Para establecer una referencia, se incluyó un crisol de aluminio calibrado en el equipo. Durante el análisis, las muestras se sometieron a un aumento de temperatura programado de 20°C/min, dentro de un rango de 30 a 400 °C. Además, se aplicó un flujo constante de nitrógeno a una velocidad de 50 mL/min.

## 8.6 Desarrollo y validación del método de cuantificación de tizoxanida

### 8.6.1 Método cromatográfico

En el presente proyecto se decidió desarrollar y validar un método de cuantificación de tizoxanida basado en el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) con un detector UV-visible. En la Tabla 13 se describen las condiciones cromatográficas del método.



Tabla 13. Condiciones cromatográficas del método de cuantificación	
Fase estacionaria: Columna	Waters XBridge C18 (2.5 $\mu$ m x 4.6 mm x 75 mm)
Fase móvil	Metanol: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.05M 75:25
Volumen de inyección	25 $\mu$ L
Flujo	0.8 mL/min
Longitud de onda	347 nm
Rango de cuantificación	0.5-20 $\mu$ g/mL
Temperatura	25°C
Tiempo de corrida	5 min

El método analítico fue validado conforme al protocolo establecido en el laboratorio y siguiendo las recomendaciones establecidas por la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos<sup>98</sup>. La forma y los criterios de evaluación para cada parámetro de la validación se encuentran brevemente descritos en la tabla 14.

Tabla 14. Parámetros de validación del método de cuantificación de tizoxanida por CLAR		
Parámetro de validación	Forma de evaluación	Criterios de evaluación
<b>Linealidad</b>	Tres curvas con seis puntos de concentración, sin incluir el punto cero.	R $\geq$ 0.99 R <sup>2</sup> $\geq$ 0.98
<b>Adecuabilidad</b>	Inyectar por quintuplicado la solución de adecuabilidad	CV% $\leq$ 2% Reportar: Factor de capacidad (K')
<b>Precisión</b>	Tres niveles de concentración, seis repeticiones por cada nivel.	CV% $\leq$ 2%
<b>Exactitud</b>	Se utilizan los datos de la prueba de precisión	% Recobro = 100 $\pm$ 2% CV% < 2%
<b>Especificidad</b>	Colocar cromatogramas de las posibles sustancias interferentes	No debe haber interferencia con el analito

En las siguientes secciones se describe explícitamente la metodología empleada para evaluar cada parámetro de la validación del sistema de cuantificación de tizoxanida.

### 8.6.2 Linealidad del método

Para la evaluación de la linealidad del método se prepararon curvas de cuantificación por triplicado por dos días, con seis niveles de concentración cada una, siguiendo la metodología descrita en el subtema 8.4 *Preparación de soluciones* en la subsección “*Curva de cuantificación de tizoxanida*”. Posteriormente se analizaron las curvas siguiendo el método de cuantificación descrito en el punto 8.6.1 *Método cromatográfico*. Los datos obtenidos se analizaron en el software Microsoft Excel, determinando la ordenada al origen (b), la pendiente(m), el coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>).



### 8.6.3 Adecuabilidad del método

Para la evaluación de la adecuabilidad del método a partir de la solución de trabajo de tizoxanida (TZX 100 µg/mL) se prepararon 2 mL de una solución de adecuabilidad (TZX 10 µg/mL), la cual se inyectó 5 veces. De estas mediciones, se extrajeron los datos de área, con los cuales se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Además, se reportó el tiempo muerto, tiempo de retención y factor de capacidad de cada medición.

### 8.6.4 Precisión del método

Para la evaluación de la precisión del método, se prepararon tres niveles de concentración (nivel bajo, medio y alto) con cinco replicas por cada nivel durante dos días diferentes. Para preparar los tres niveles de concentración, se partió de la solución de trabajo de tizoxanida (100 µg/mL) y se prepararon los tres niveles de concentración siguiendo las indicaciones que se encuentran en la tabla 15. Se obtuvieron los datos de altura y área de los picos cromatográficos, los cuales se analizaron con el software Microsoft Excel para determinar la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 15. Preparación de nivel bajo, medio y alto para precisión y exactitud del método				
Nivel de concentración	Concentración (µg/mL)	Volumen de alícuota tomado de la solución de trabajo de TZX a 100 µg/mL (mL)	Volumen de aforo con metanol (mL)	Volumen final (mL)
Bajo	3.5	0.42	11.58	12
Medio	12	1.44	10.56	12
Alto	17.5	2.1	9.9	12

### 8.6.5 Exactitud del método

Para evaluar la exactitud del método, se tomaron los datos de la prueba de precisión del método, los cuales se interpolaron con una curva de cuantificación, para calcular la concentración recuperada. Posteriormente se calculó el porcentaje de recobro usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Recobro} = \frac{\text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

### 8.6.6 Especificidad

Se analizaron las posibles sustancias interferentes, las cuales son, la nitazoxanida, la policaprolactona, el alcohol polivinílico, el manitol y el metanol. Y se compararon los cromatogramas obtenidos por cada una de estas sustancias con el obtenido al analizar tizoxanida, para demostrar que la señal obtenida por el método al analizar tizoxanida se debe únicamente al analito.

## 8.7 Formulación de nanopartículas poliméricas

El proceso de formulación de nanopartículas poliméricas se llevó a cabo por medio del método de emulsión y evaporación de solvente. Para iniciar, se pesó la cantidad de policaprolactona y tizoxanida



necesaria según la formulación a realizar de acuerdo con los niveles de cada factor en el diseño experimental y fue disuelto en 6 mL de acetato de etilo (Solución A). Después se pesó la cantidad requerida de estabilizador (alcohol polivinílico) para cada experimento y se disolvió en 9 mL de agua tridestilada (solución B). Se mantuvo en calentamiento a 40°C y agitación constante a ambas soluciones durante 10 minutos hasta observar que ambas soluciones fueran homogéneas.

En la siguiente fase del proceso, se llevó a cabo la emulsificación, para lo cual se mezcló la fase orgánica y la fase acuosa dentro de un vial de 20 mL y se agitó con un homogeneizador Ultraturrax a 12000 rpm durante 10 minutos. Al finalizar la homogeneización, se transfirió la muestra a un matraz, se agregaron 16 mL de agua destilada a la emulsión final y se evaporó el disolvente a 40°C y baja presión para retirar el acetato de etilo presente en el matraz. Se tomó una muestra de 1 mL para de la solución para medir el tamaño de partícula y potencial zeta. Se centrifugó la solución a 12000 rpm, durante hora y media, y se separó el sobrenadante del pellet. Se tomó una alícuota de 1 mL de sobrenadante para posteriormente medir la eficiencia de encapsulación del método.

El pellet se preparó para su liofilización, para lo cual se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL, se le añadió 1 mL de agua tridestilada y 10 mg de manitol, se homogeneizó la muestra con agitación vigorosa y se congeló utilizando dióxido de carbono sólido (hielo seco), se mantuvo la muestra congelada hasta su liofilización. Finalmente, las muestras liofilizadas se almacenaron en tubos Eppendorf de 2 mL debidamente etiquetados hasta su evaluación.

### 8.7.1 Diseño experimental

Se propuso realizar un diseño experimental 2<sup>2</sup> para optimizar la formulación de nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida, descubriendo cuáles son los niveles adecuados de cada factor (X<sub>n</sub>) para obtener las mejores variables de respuesta (Y<sub>n</sub>). En este diseño experimental el objetivo es la obtención de nanopartículas poliméricas con la talla más pequeña posible, el mayor potencial Z y la mejor EE%. A continuación, en la Tabla 16 se muestran los factores, niveles y respuestas consideradas en este diseño experimental.

Tabla 16. Factores, niveles y respuestas del diseño experimental			
Factores (k)		Niveles	
		Bajo	Alto
X1	PCL (mg)	30	60
X2	PVA mg)	40	180
Respuestas evaluadas			
Y1	Tamaño de partícula (nm)		
Y2	Potencial zeta (mV)		
Y3	Eficiencia de encapsulación (%)		
Y4	Capacidad de carga (%)		

En la Tabla 17 se muestra la matriz del diseño experimental con los valores utilizados de cada factor para cada unidad experimental.



Tabla 17. Matriz del diseño experimental		
Formulación	PCL (mg)	PVA (mg)
F1	30	60
F2	40	60
F3	30	180
F4	40	180

En la Tabla 18, se resumen las etapas de la metodología para realizar el diseño experimental.

Tabla 18. Metodología para realizar el diseño experimental								
Formulación	Factores (k)		TZX (mg)	Volumen de fase orgánica (mL)	Volumen de fase acuosa (mL)	Volumen de aforo con agua destilada post-emulsión (mL)	Tiempo de emulsión (min)	Velocidad Ultraturrax (rpm)
	PCL (mg)	PVA (mg)						
F1	30	60	10	6	9	16	10	12000
F2	40	60	10	6	9	16	10	12000
F3	30	180	10	6	9	16	10	12000
F4	40	180	10	6	9	16	10	12000

## 8.8 Caracterización de las nanopartículas poliméricas

En las siguientes secciones se describen las metodologías utilizadas para medir las respuestas consideradas en el diseño experimental.

### 8.8.1 Tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica

Para la determinación del tamaño de partícula, de la muestra de 1 mL de la nanosuspensión previa a la centrifugación, se tomó una muestra de 100  $\mu$ L y se añadió 1 mL de agua tridestilada, la cual se transfirió a una celda poliestireno con tapa para su uso en el Zetasizer Nano ZS90. Las condiciones del método fueron: ángulo de 90°, temperatura de 25°C y agua como medio dispersante. Se realizaron 3 determinaciones por dispersión de luz dinámica (de 11 lecturas cada una) para cada muestra y un tiempo de equilibrio de 120 s a una temperatura de 25°C.

### 8.8.2 Determinación de potencial zeta

Para la determinación del potencial zeta, de la muestra de 1 mL de la nanosuspensión previa a la centrifugación, se tomó una muestra de 100  $\mu$ L y se añadió 1 mL de agua tridestilada, se colocó la cantidad suficiente de la suspensión de NPs en una celda especial para determinación del potencial Z (celda DTS1070) para cada muestra, estas se leyeron en el equipo Zetasizer nano ZS90, con 3 determinaciones (11 lecturas para cada una) y un tiempo de equilibrio de 120 s.

### 8.8.3 Espectroscopia Infrarroja

Se tomaron 10 mg de muestra de la formulación optimizada para realizar un análisis por espectroscopia infrarroja. La muestra se colocó sobre un cristal ATR en un espectrómetro de infrarrojo, con las condiciones de escanear la muestra de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

### 8.8.4 Difracción de Rayos X de Polvos

Se preparó una muestra de 60 mg de la formulación optimizada, para cada evaluación se colocó la muestra en la platina del difractor rayos X para polvos con condiciones de escanear la muestra de 5 a 45° (2 $\theta$ ) durante 20 minutos.



### 8.8.5 Calorimetría Diferencial de Barrido

Se empleó un crisol de aluminio de baja masa con sus respectivas tapas perforadas, los cuales fueron previamente pesados y ajustados. Se colocaron con precisión 5 mg de la formulación optimizada en el crisol. Posteriormente, los crisoles se sellaron herméticamente junto con las tapas utilizando una prensa especializada.

Para establecer una referencia, se incluyó un crisol de indio calibrado en el equipo. Durante el análisis, las muestras se sometieron a un aumento de temperatura programado de 20°C por minuto, dentro de un rango de 30 a 250 °C. Además, se aplicó un flujo constante de nitrógeno a una velocidad de 50 mL/min.

### 8.8.6 Evaluación de la eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se evaluó leyendo en el CLAR la muestra del sobrenadante de la formulación que se tomó después de la centrifugación a 1100 rpm durante hora y media.

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de TZX pesada (g)} - \text{Cantidad de TZX presente en el sobrenadante (g)}}{\text{Masa total de la formulación (g)}} * 100$$

### 8.8.7 Evaluación de la capacidad de carga

La capacidad de carga de las nanopartículas poliméricas se realizó pesando 10 mg de cada formulación, los cuales fueron colocadas en tubos Eppendorf de 3 mL con 2 mL de acetato de etilo y se sometieron a agitación vigorosa durante 10 horas. Posteriormente se centrifugaron a 11000 rpm en una centrifuga durante 30 minutos, se tomó 1 mL del sobrenadante y se inyectó en el cromatografo para cuantificar la concentración de tizoxanida disponible.

Con la siguiente fórmula se calculó la capacidad de carga, la evaluación se realizó por cada unidad experimental del diseño experimental.

$$CC(\%) = \frac{\text{Cantidad de TZX presente en el sobrenadante (g)}}{\text{Masa total de la formulación (g)}} * 100$$

### 8.8.8 Perfiles de liberación

Se realizó el estudio de liberación *in vitro* de las unidades experimentales del diseño experimental, y de las nanopartículas optimizadas, mediante el método de difusión de bolsa de diálisis. Se transfirió una cantidad equivalente a 10 mg de la formulación a analizar dentro de la bolsa de diálisis previamente hidratada con buffer de fosfatos pH 6.8, se añadió 3 mL de buffer de fosfatos, y se selló la bolsa de diálisis. La bolsa de diálisis sellada se colocó dentro de un vaso de precipitados que contenía 80 mL de buffer de fosfatos pH 6.8. Todas las formulaciones analizadas se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm y a una temperatura de 37°C. Se extrajeron alícuotas de 2 mL las cuales se sustituyeron por un volumen igual de buffer de fosfatos para mantener condiciones "sink". Las muestras se analizaron por medio del método de cuantificación por CLAR.



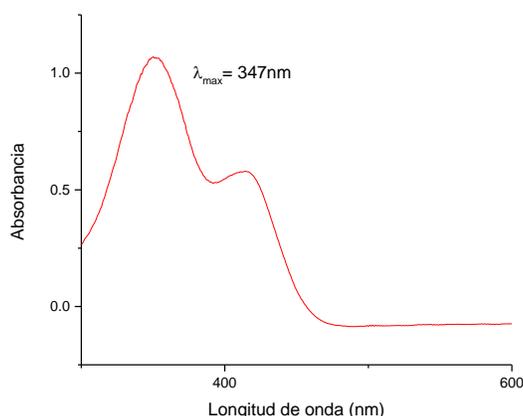
## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Estudios de preformulación

En este subtema encontraremos los resultados de los estudios de preformulación (espectroscopía UV-visible, espectroscopia IR,  $^1\text{H}$ -RMN, difracción de rayos X de polvos y calorimetría diferencial de barrido) realizados a las materias primas (nitazoxanida, tizoxanida, policaprolactona, alcohol polivinílico y manitol) con las que se elaboraron las formulaciones de nanopartículas poliméricas solidas cargadas con tizoxanida.

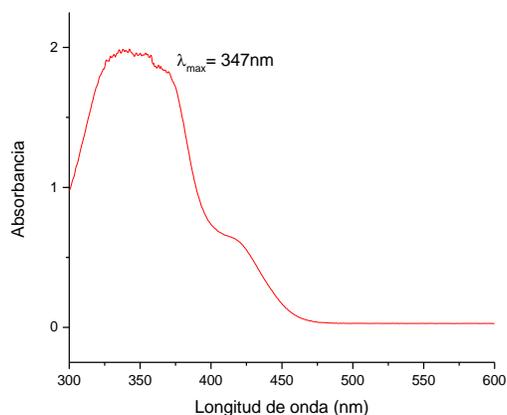
#### 9.1.1 Espectroscopia UV-visible

En la figura 13 se muestra el espectro de absorción UV-visible de una muestra de nitazoxanida (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en un rango de 200 a 600 nm, en el cual se observa una longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\text{max}}$ ) a 347nm.



**Figura 13.** Espectro UV-visible de nitazoxanida ( $\lambda_{\text{max}}= 347\text{nm}$ )

En la figura 14 se muestra el espectro de absorción UV-visible de una muestra de tizoxanida (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en un rango de 200 a 600 nm, en el cual se observa una longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\text{max}}$ ) a 347nm. Se utilizará esta longitud de onda máxima para desarrollar el método de cuantificación de tizoxanida.



**Figura 14.** Espectro UV-visible de tizoxanida ( $\lambda_{\text{max}}= 347\text{nm}$ )



### 9.1.2 Caracterización por Espectroscopia Infrarroja

En esta sección se encuentran los espectros IR de las materias primas utilizadas para la formulación de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida (nitazoxanida, tizoxanida, policaprolactona, alcohol polivinílico y manitol), además, en seguida de cada espectro, encontraremos una tabla en la cual se encontrará de manera estructurada la información de las bandas de cada espectro, así como el tipo de vibración y el grupo funcional al que se asocia dicha banda.

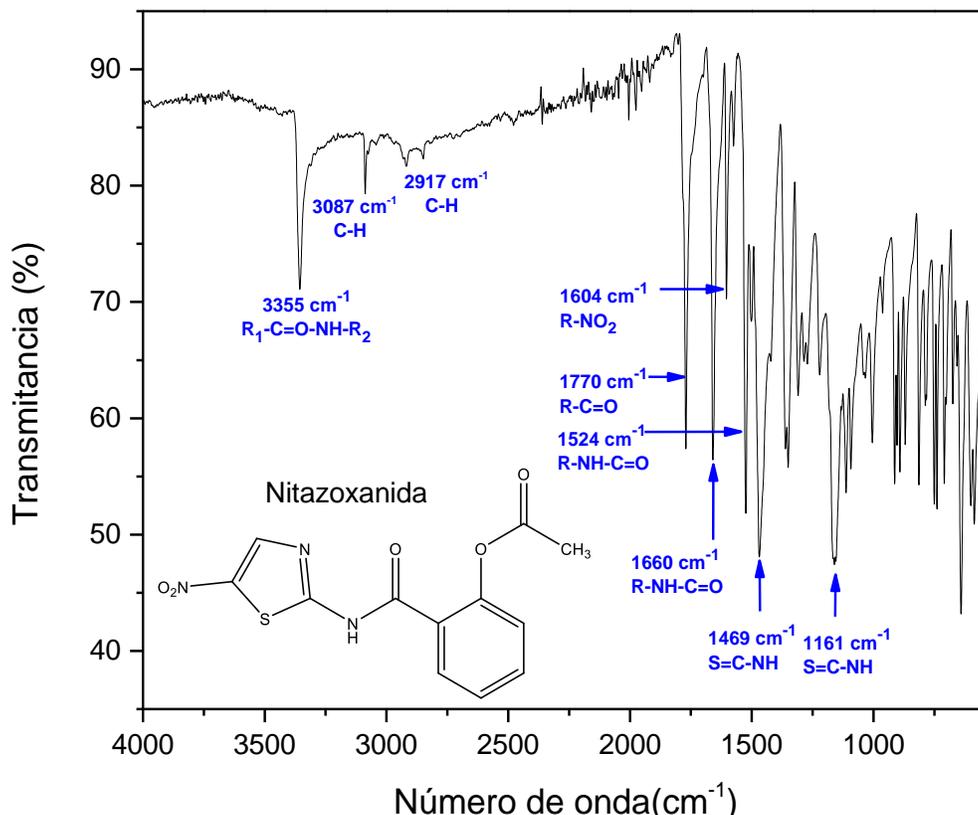


Figura 15. Espectro FT-IR-ATR de nitazoxanida

Tabla 19. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de nitazoxanida		
Banda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración molecular	Grupo funcional
3355 (m, sh)	Tensión	Amida secundaria (R <sub>1</sub> -C=O-NH-R <sub>2</sub> )
3087 (w, sh)	Tensión	Metilo (C-H <sub>3</sub> )
2917 (w, sh)	Tensión simétrica	Metilo (C-H <sub>3</sub> )
1770 (s, sh)	Tensión	Carbonilo de éster (R-C=O)
1660 (s, sh)	Tensión	Carbonilo de amida (R-N-C=O)
1604 (m, sh)	Tensión	Nitro (R-NO <sub>2</sub> )
1161 (s, sh)	Tensión	Sulfonamida (S=C-N)

w: débil, m: media, s: fuerte, sh: afilada, br: ancha

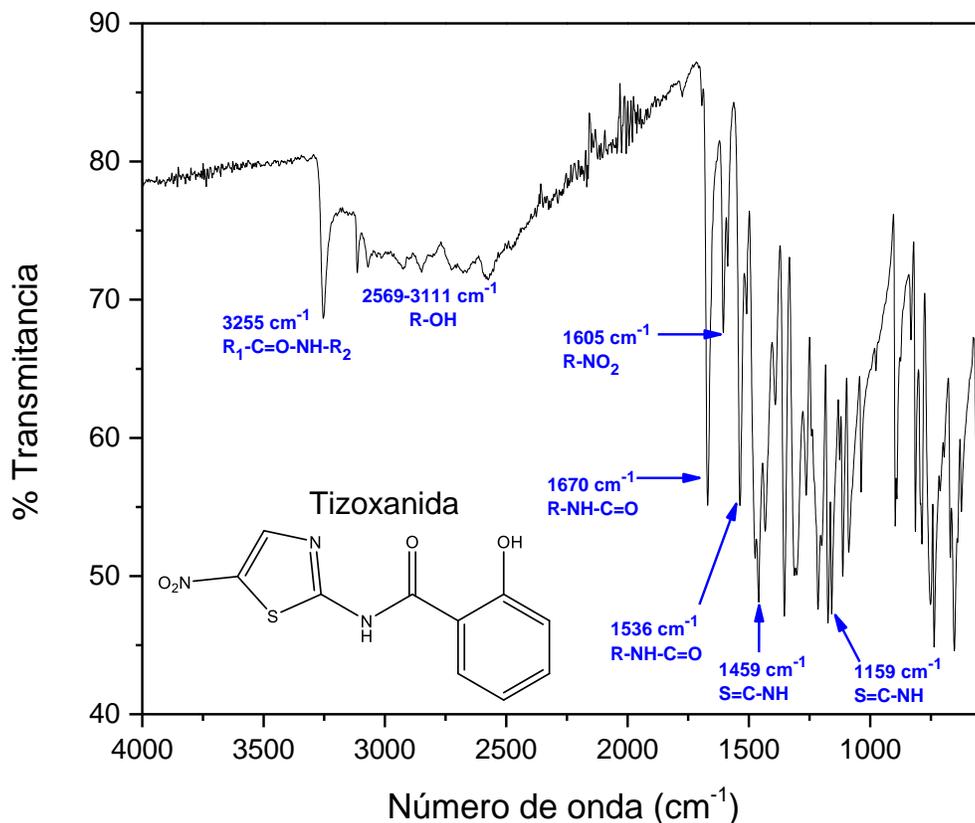


Figura 16. Espectro FT-IR-ATR de tizoxanida

Tabla 20. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de tizoxanida		
Banda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración molecular	Grupo funcional
3255 (m, sh)	Tensión	Amina secundaria (R <sub>1</sub> -NH- R <sub>2</sub> )
2569-3111 (m, br)	Tensión	Alcohol (R-OH)
1670 (w, sh)	Tensión	Amida (R-N-C=O)
1605 (s, sh)	Tensión	Nitro (R-NO <sub>2</sub> )
1536 (s, sh)	Tensión	Amida (R-N-C=O)
1159 (s, sh)	Tensión	Sulfonamida (S=C-N)

w: débil, m: media, s: fuerte, sh: afilada, br: ancha

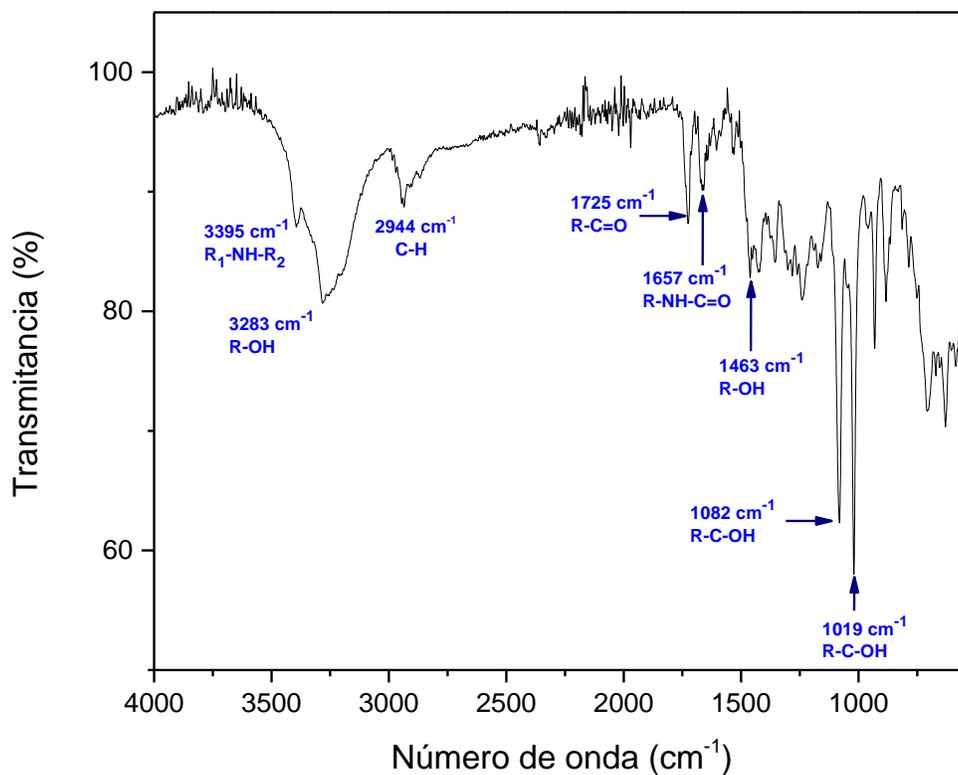


Figura 17. Espectro FT-IR-ATR de policaprolactona

Tabla 21. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de policaprolactona

Banda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración molecular	Grupo funcional
2944 (m, sh)	Tensión	Alcano (R-CH)
2864 (m, sh)	Tensión	Alcano (R-CH)
1721 (w, sh)	Tensión	Éster (R <sub>1</sub> -COO-R <sub>2</sub> )
1165 (w, sh)	Tensión	Éster (R <sub>1</sub> -COO-R <sub>2</sub> )

w: débil, m: media, s: fuerte, sh: afilada, br: ancha

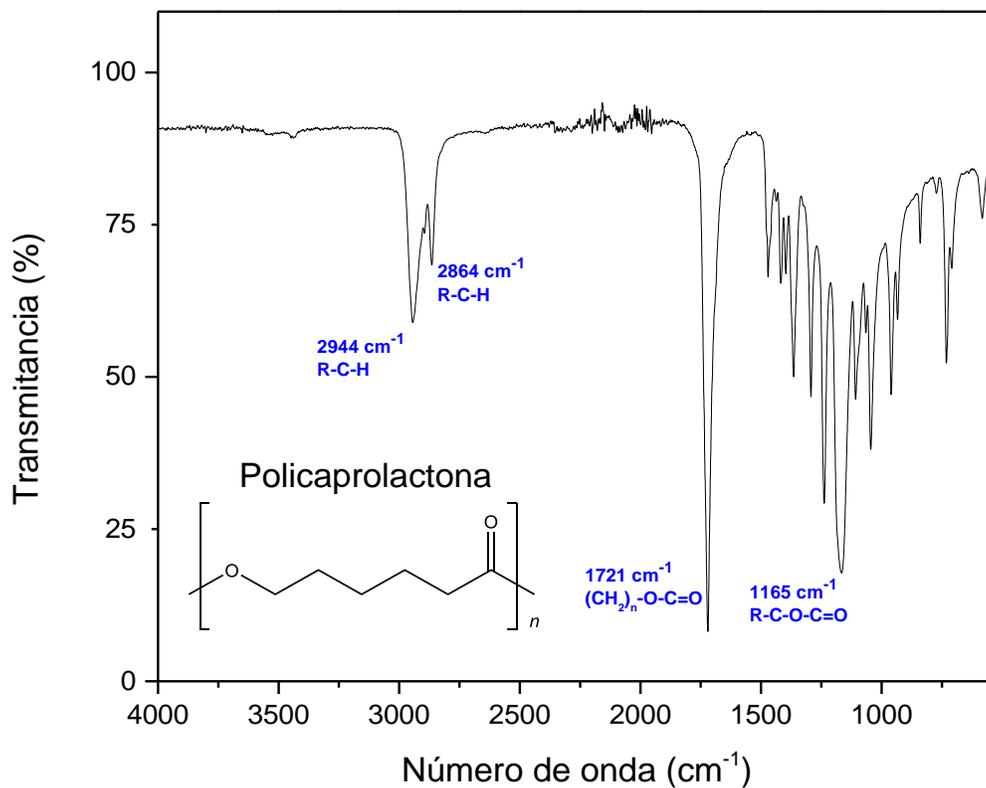


Figura 18. Espectro FT-IR-ATR de alcohol polivinílico

Tabla 22. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de alcohol polivinílico		
Banda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración molecular	Grupo funcional
3298 (m, br)	Tensión	Alcohol (R-OH)
2904 (m, sh)	Tensión	Alcano (R-CH)
1372 (s, sh)	Flexión	Alcohol (R-OH)
1087 (s, sh)	Tensión	Alcohol secundario (R <sub>1</sub> -OH-R <sub>2</sub> )

w: débil, m: media, s: fuerte, sh: afilada, br: ancha

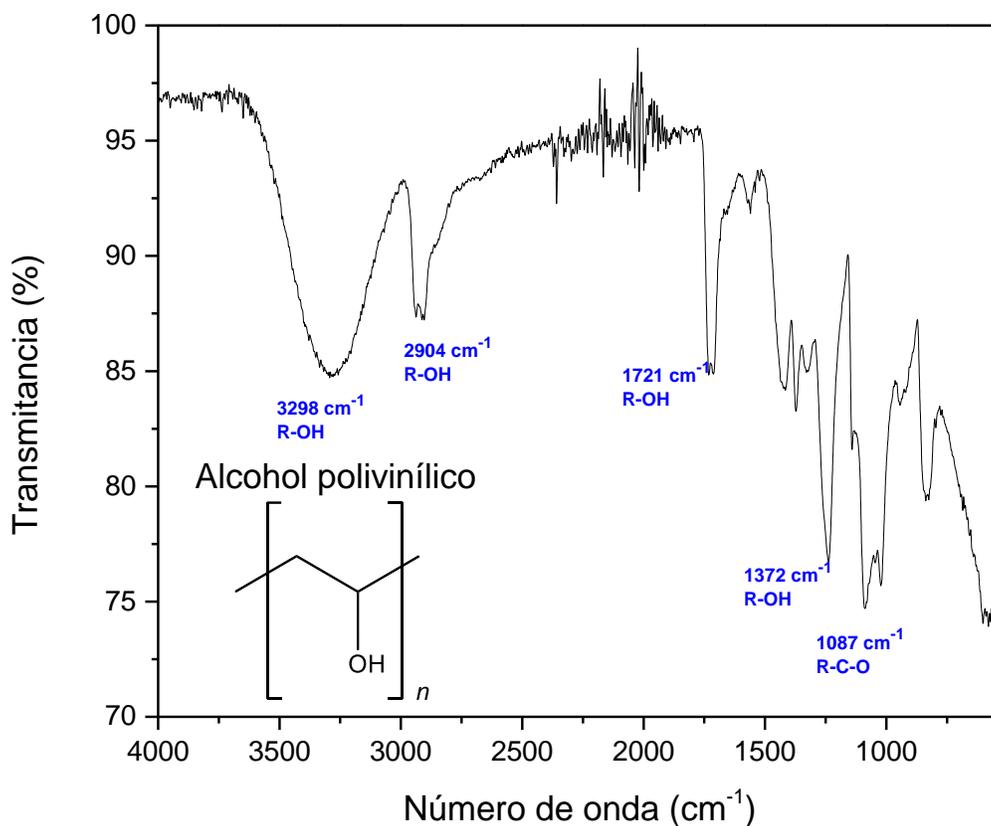


Figura 19. Espectro FT-IR-ATR de manitol

Tabla 23. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de manitol		
Banda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración molecular	Grupo funcional
3282 (m, br)	Tensión	Alcohol (R-OH)
2984 (w, sh)	Tensión	Alcano (R-CH <sub>3</sub> )
2970 (w, sh)	Tensión	Alcano (R-CH <sub>3</sub> )
1420 (m, sh)	Flexión	Alcohol (R-OH)
1015 (s, sh)	Tensión	Alcohol (R-OH)
629 (s, sh)	Flexión	Alcohol (R-OH)

w: débil, m: media, s: fuerte, sh: afilada, br: ancha

### 9.1.3 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de protón

En esta sección encontraremos los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN) del profármaco nitazoxanida y del fármaco tizoxanida. Además, dentro de los propios espectros podremos encontrar una asociación de las señales del espectro con la estructura del analito. Para complementar los espectros, enseguida de cada uno, encontraremos una tabla en la cual se encuentra la información de cada señal (desplazamiento químico, multiplicidad, integral y tipo de hidrogeno con el que se asocia) y su posición dentro de la estructura química.

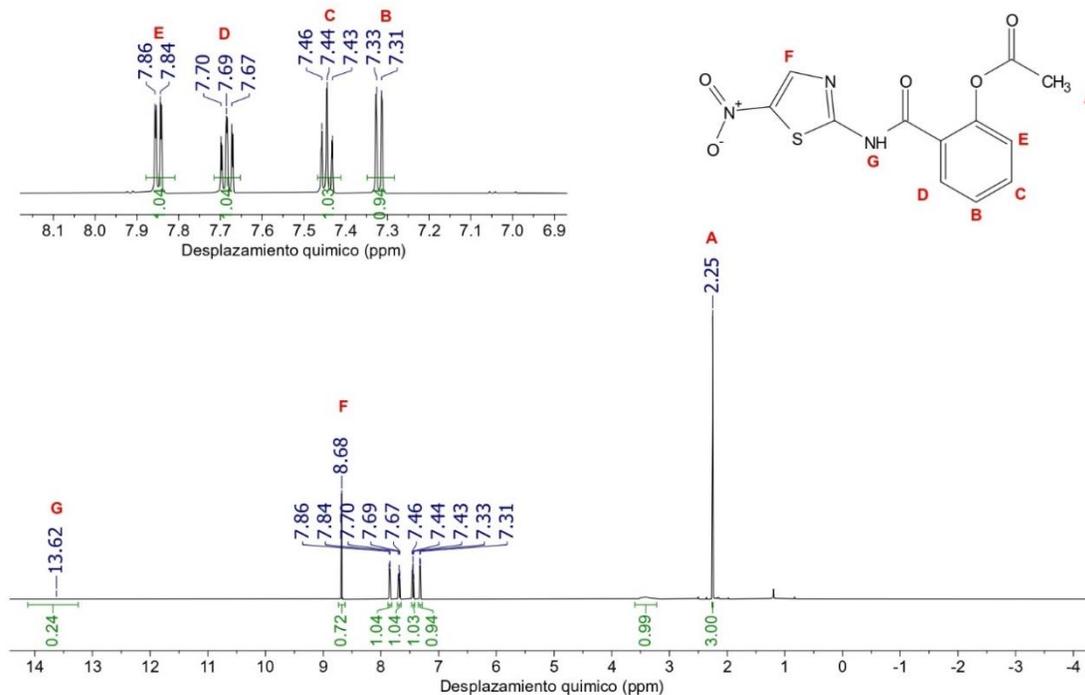


Figura 20. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de nitazoxanida

Tabla 24. Asignación de las señales de los espectros <sup>1</sup>H-RMN de nitazoxanida

Nitazoxanida	
Posición	Información de la señal
A	2.25 ppm (s,3H, CH <sub>3</sub> )
B	7.33-7.31 ppm (dd,1H, Phe)
C	7.46-7.43 ppm (ddd,1H, Phe)
D	7.70-7.67 ppm (ddd,1H, Phe)
E	7.86-7.84 ppm (dd,1H, Phe)
F	8.68 ppm (s,1H,)
G	13.62 ppm (s,1H, N-H)



Folio 011-RMN-EHSB-5  
single\_pulse

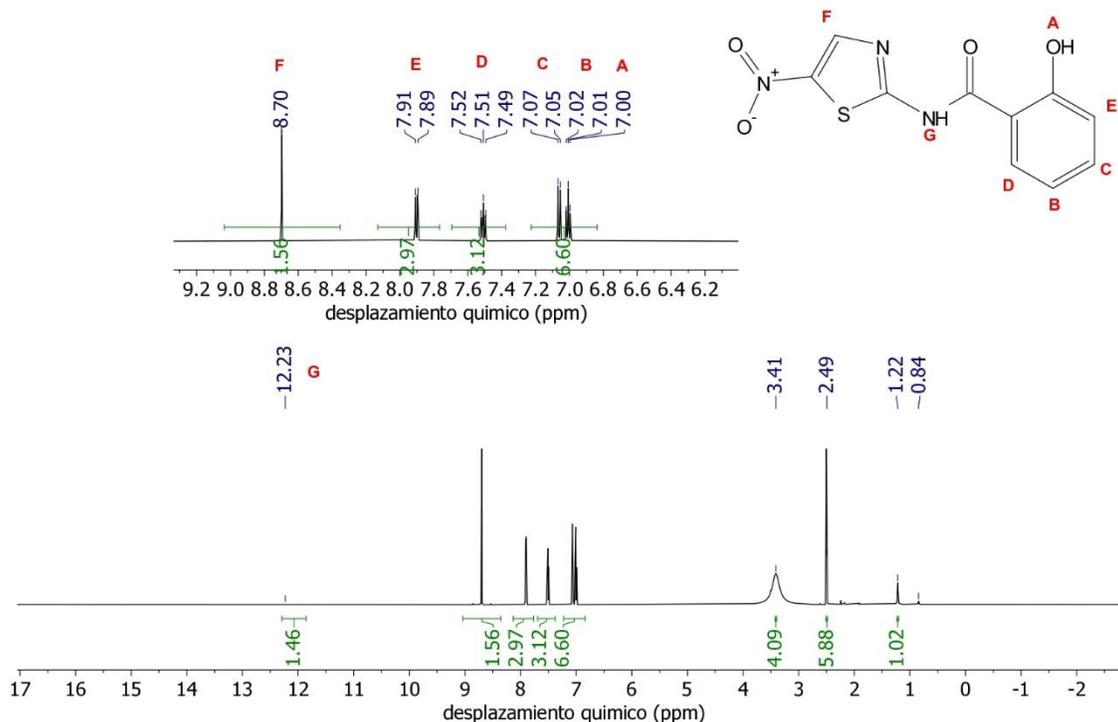
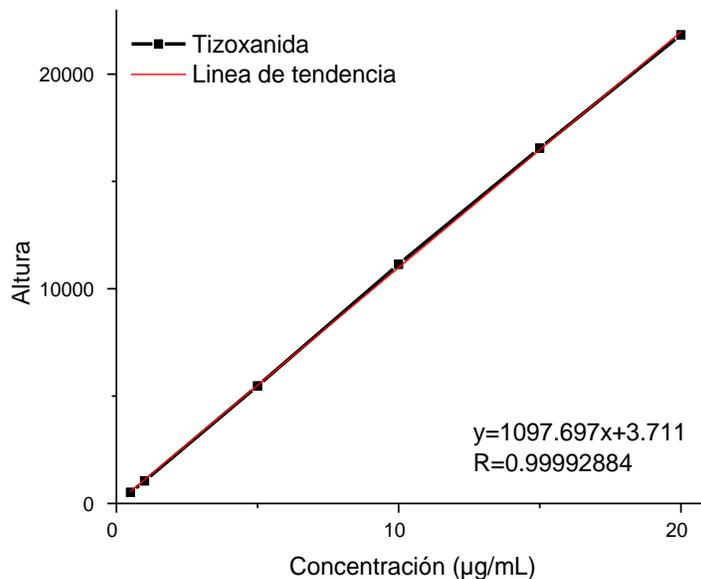


Figura 21. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de tizoxanida

Tabla 25. Asignación de las señales de los espectros <sup>1</sup> H-RMN de tizoxanida	
Tizoxanida	
Posición	Información de la señal
A	6.99 (s,1H, OH)
B	7.01-7.02 (dd,1H, Phe)
C	7.07-7.05 (ddd,1H, Phe)
D	7.51-7.49 (ddd,1H, Phe)
E	7.91-7.89 (dd,1H, Phe)
F	8.70 (s,1H,)

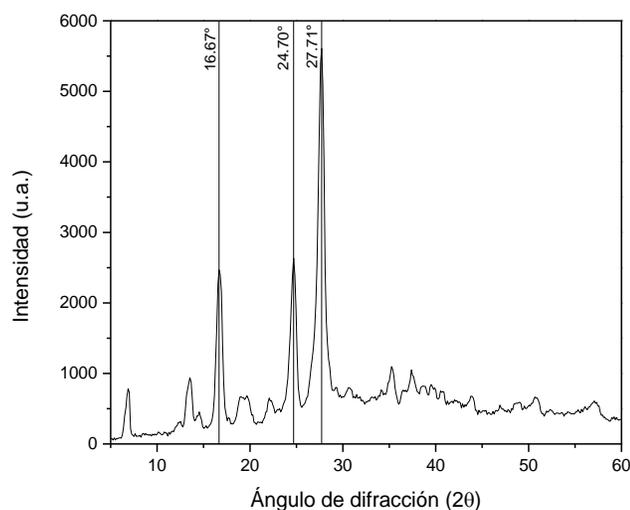
#### 9.1.4 Difracción de rayos X de polvos

En esta sección, encontraremos los difractogramas de rayos X de polvos de las materias primas (nitazoxanida, tizoxanida, policaprolactona, alcohol polivinílico y manitol) utilizadas para la formulación de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida. Dentro de cada difractograma, podremos encontrar que se encuentran destacados los principales picos presentes en cada difractograma.



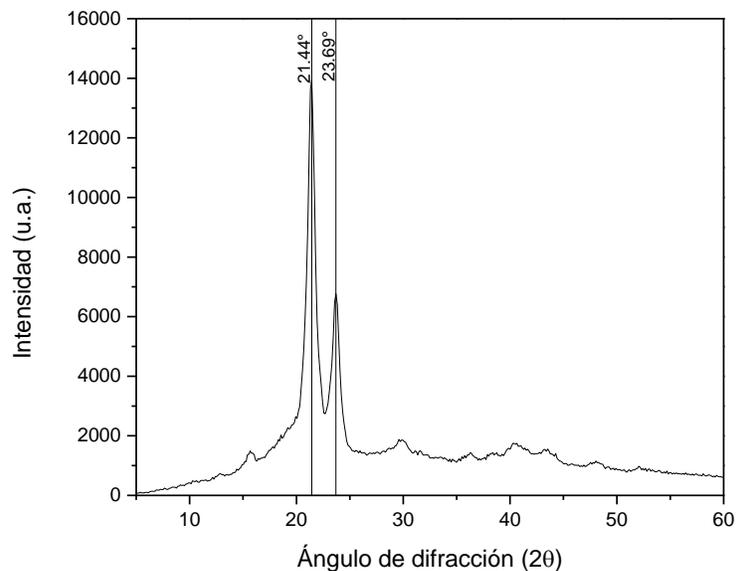
**Figura 22.** Difractograma de nitazoxanida

En la figura 22 se muestra el difractograma de una muestra de polvo de nitazoxanida, donde se observan picos definidos y estrechos lo que indica la naturaleza cristalina de la muestra de nitazoxanida. Se destacan los siguientes picos a 15.91°, 17.67°, 21.19°, 29.72° y 32.10°.



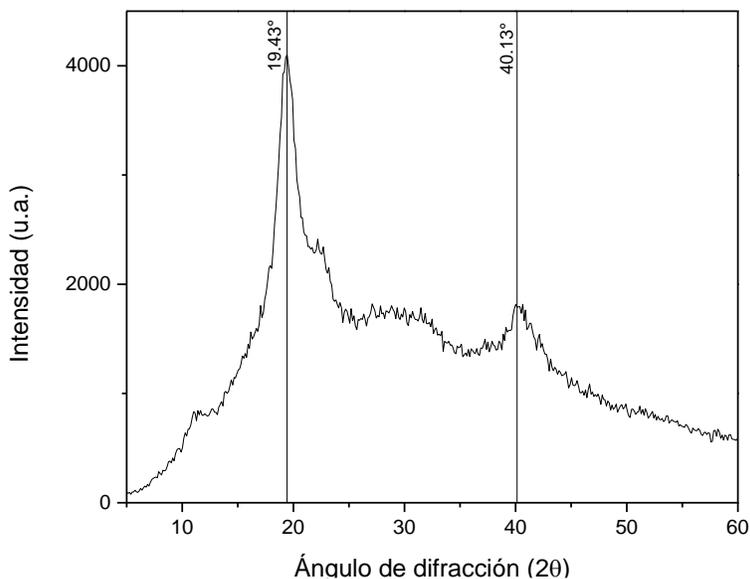
**Figura 23.** Difractograma de tizoxanida

En la figura 23 se muestra el difractograma de una muestra de polvo de tizoxanida, donde se observan picos definidos y estrechos lo que indica la naturaleza cristalina de la muestra de tizoxanida. Se destacan los siguientes picos a 16.67°, 24.70° y 27.71° (2θ).



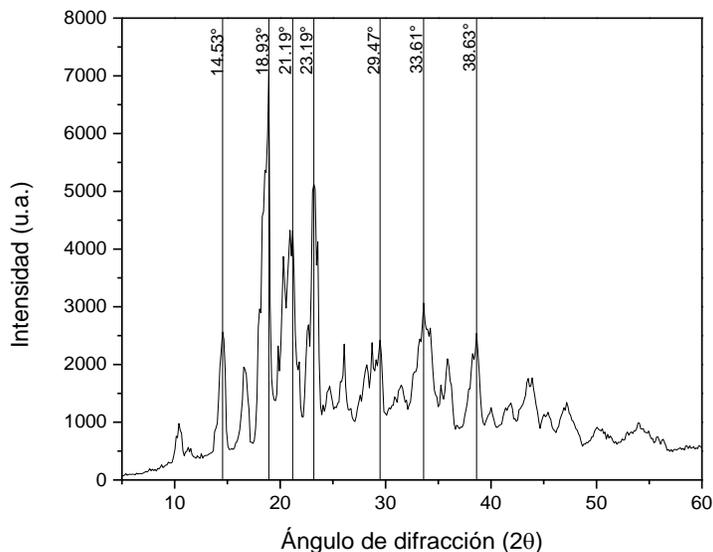
**Figura 24.** Diffractograma de policaprolactona (PCL).

En la figura 24 se observan dos picos completamente definidos a  $21.44^\circ$  y  $23.69^\circ$  ( $2\theta$ ). Lo cual nos indica la naturaleza cristalina de la muestra de policaprolactona.



**Figura 25.** Diffractograma de alcohol polivinílico

En la figura 25 se observan dos picos a  $19.43^\circ$  y  $40.13^\circ$  ( $2\theta$ ). También se observa bandas anchas dentro del diffractograma, lo cual se asocia con la presencia de material amorfo dentro de la muestra de alcohol polivinílico.

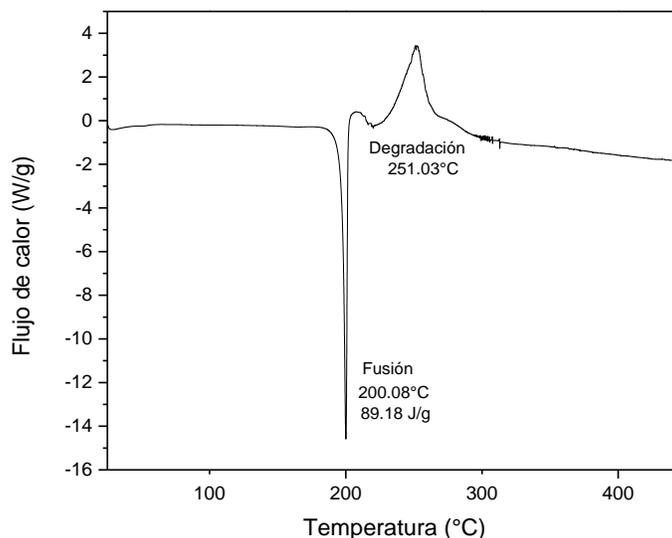


**Figura 26.** Difractograma de manitol

En la figura 26 se observan varios picos definidos y estrechos a 14.53°, 18.93°, 21.19°, 29.47°, 33.61° y 38.63°. Los picos definidos y estrechos en este difractograma indican que el material analizado tiene naturaleza cristalina.

### 9.1.5 Calorimetría diferencial de barrido

En esta sección, encontraremos los termogramas de las materias primas (nitazoxanida, tizoxanida, policaprolactona, alcohol polivinílico y manitol) utilizadas para la formulación de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida. Además, en cada termograma encontraremos información de cada evento térmico que se presenta, por ejemplo, las temperaturas de fusión o cristalización, acompañadas de su entalpia de fusión o cristalización, o la temperatura de transición vítrea, en aquellos materiales que la presenten.

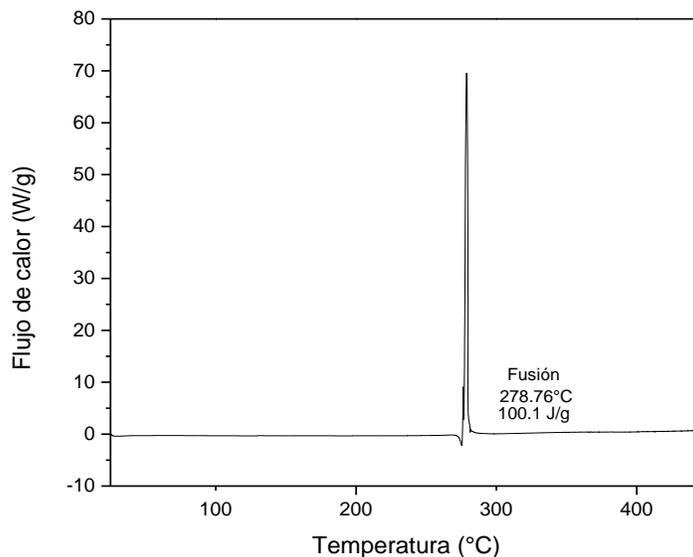


**Figura 27.** Termograma de calorimetría diferencial de barrido de nitazoxanida

En la figura 27, se encuentra el termograma de la muestra de nitazoxanida, en el cual podemos encontrar una fusión a 200.08°C con una entalpia de fusión de 89.18 J/g, este punto de fusión se asemeja con el reportado en la literatura<sup>99</sup> el cual es de 198°C. A 251.03°C podemos observar que

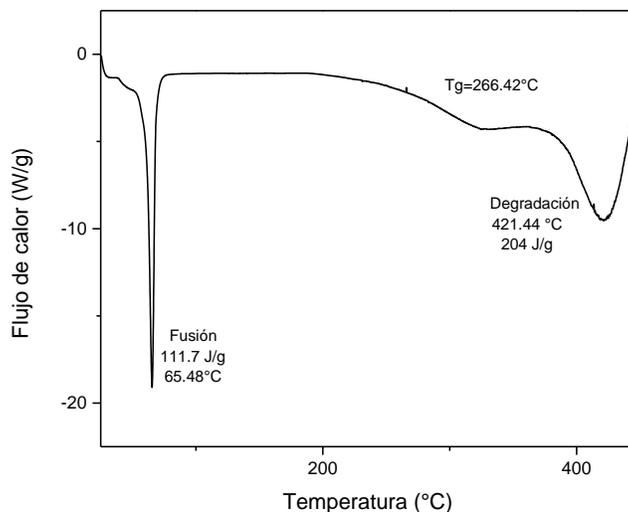


ocurre el proceso de degradación de la muestra, lo cual se corresponde por lo observado por Abbasalipourkabir<sup>100</sup>.



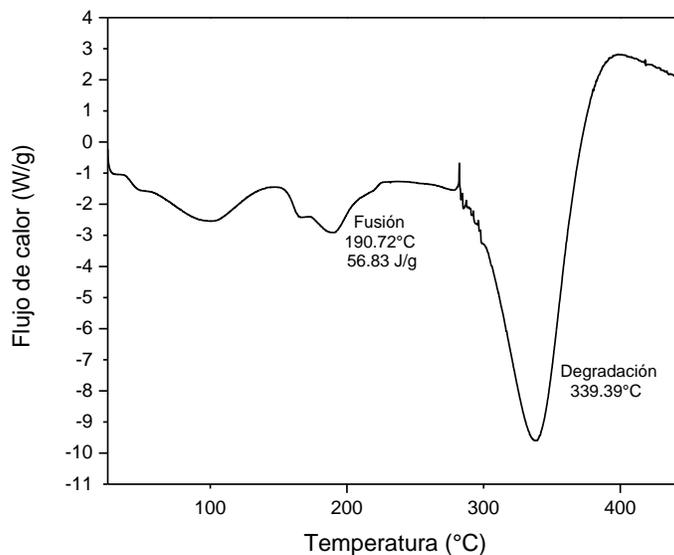
**Figura 28.** Termograma de calorimetría diferencial de barrido de tizoxanida

En la figura 28, se encuentra el termograma de la muestra de tizoxanida, en el cual se observa un suceso exotérmico a 278.76°C con una entalpia de 100.1 J/g, el cual asociamos con una fusión exotérmica, un proceso poco observable pero que ocurre en casos como el sistema acetaminofén–O-ácido acetil salicílico desarrollado por Leitner<sup>101</sup>, quien registró un proceso exotérmico en la fusión.



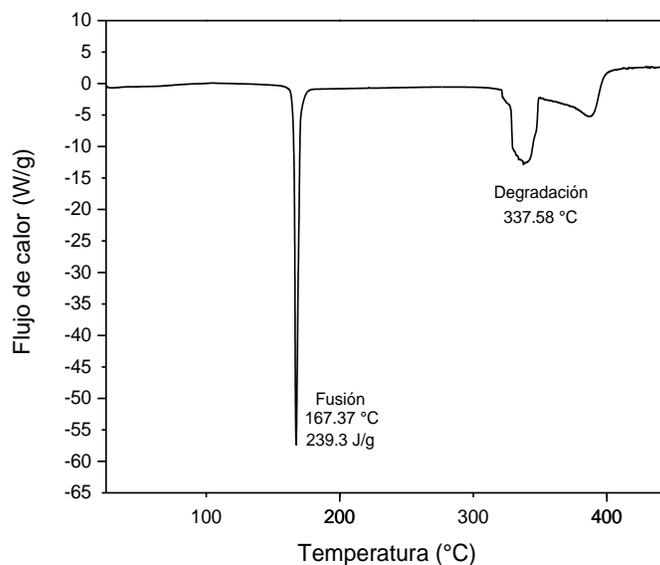
**Figura 29.** Termograma de calorimetría diferencial de barrido de policaprolactona

En la figura 29, se encuentra el termograma de la muestra de PCL, en el cual podemos encontrar una transición vítrea a 40.28°C, seguido de una fusión a 65.48°C con una entalpia de fusión de 111.7 J/g, este punto de fusión se asemeja con el reportado en la literatura<sup>102</sup> el cual es de 60°C. Finalmente, a 421.44°C encontramos el inicio de un proceso de degradación.



**Figura 30.** Termograma de calorimetría diferencial de barrido de alcohol polivinílico

En la figura 30, podemos observar el termograma de PVA, en el cual observamos una fusión a 190.72°C con una entalpia de fusión de 56.83 J/g, lo cual se asemeja con el punto de fusión reportado en la bibliografía<sup>103</sup> el cual es de 200°C. En 339.39°C observamos el proceso de degradación de PVA.



**Figura 31.** Termograma de calorimetría diferencial de barrido de manitol

En la figura 31 se presenta el termograma de MNT, en el cual se observa una fusión a 167.37°C con una entalpia de fusión de 239.3 J/g, lo cual se asemeja con el punto de fusión reportado en la bibliografía<sup>104</sup> el cual es de 166°C. En 337.58°C se registra el proceso de degradación de MNT.



### 9.2 Validación del método analítico de cuantificación

En este subtema, encontraremos los resultados sobre la validación del método de cuantificación de tizoxanida por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en conjunto con un detector UV-visible. El contenido de esta sección está dividido por subsecciones, cada uno de las cuales se relaciona con un parámetro de la validación, y en el cual encontraremos los resultados de las pruebas que se realizaron para cumplir con cada parámetro en forma de tablas y gráficas. Para la validación del método se tomaron en cuenta las recomendaciones de la Guía de validación de métodos analíticos del Consejo Nacional de Químicos Farmacobiólogos.

La siguiente tabla, muestra un compilado de los resultados de los parámetros de validación del método de cuantificación de tizoxanida.

Tabla 26. Criterios de aceptación y resultados de la validación del método de cuantificación de tizoxanida			
Parámetro		Criterios de aceptación	Resultado experimental
<b>Linealidad</b>	Coeficiente de correlación lineal (R)	$R \geq 0.99$	R = 0.999849
	Coeficiente de determinación ( $R^2$ )	$R^2 \geq 0.98$	R = 0.999699
<b>Adecuabilidad</b>	Coeficiente de variación (CV%)	$CV\% \leq 2\%$	CV% = 0.86
<b>Precisión</b>	Coeficiente de variación	$CV\% \leq 2\%$	Bajo = 0.46 Medio = 0.85 Alto = 0.34
<b>Exactitud</b>	Porcentaje del recobro (% Recobro)	$\%Recobro = 100 \pm 2\%$	Bajo = $100.64 \pm 0.46\%$ Medio = $100.32 \pm 0.85\%$ Alto = $99.91 \pm 0.34\%$
	Coeficiente de variación del recobro	$CV\%Recobro \leq 2\%$	Bajo = 0.46 Medio = 0.86 Alto = 0.34
<b>Especificidad</b>		No debe haber interferencia con la señal del analito	No hay interferencia con la señal del analito

#### 9.2.1 Linealidad

Para la evaluación de la linealidad del método analítico, se realizaron tres curvas de cuantificación por dos días, con 6 puntos cada una. De cada inyección se determinó el área, y a continuación, se muestran los resultados de la prueba de linealidad para cada día.



Tabla 27. Resultados del día 1 de linealidad (Áreas)						
Concentración (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	D.E.	CV%
0.5	244926	245644	245494	245354.66	378.73	0.15
1	448041	452140	453435	451205.33	2815.85	0.63
5	2382678	2363766	2356749	2367731	13411.53	0.57
10	4656215	4634292	4631813	4640773.33	13430.2	0.29
15	6957357	6940981	6937834	6945390.66	10481.93	0.15
20	9482584	9413673	9532462	9476239.66	59648.09	0.63
<b>Pendiente (m)</b>	470826	467942	472304	470358		
<b>Ordenada al origen (b)</b>	-12627	-8083	-27649	-16120		
<b>Coefficiente de correlación (R)</b>	0.99986	0.99991	0.99976	0.99985		
<b>Coefficiente de determinación (R2)</b>	0.99973	0.99983	0.99952	0.99971		

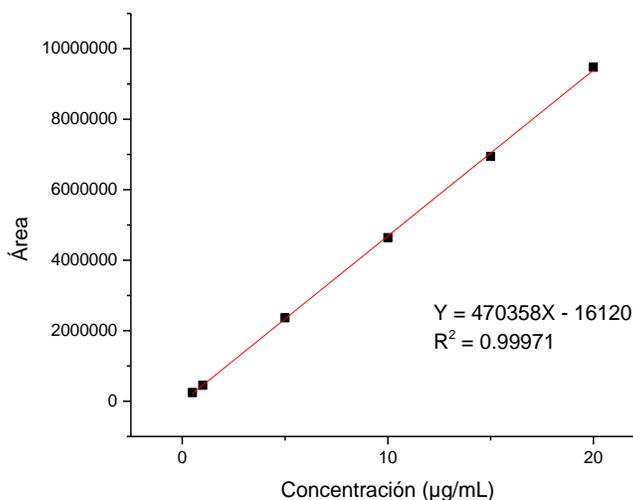
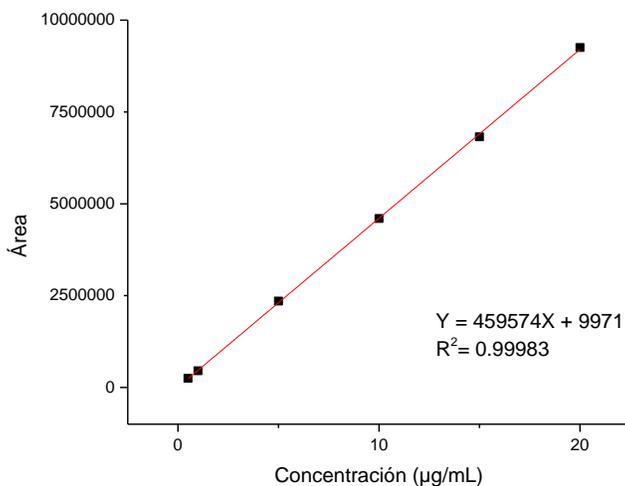


Figura 32. Resultados del día 1 de linealidad (áreas)

Tabla 28. Resultados del día 2 de linealidad (Áreas)						
Concentración (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	D.E.	CV%
0.5	246888	246687	244526	246033.667	1309.54	0.53
1	460171	455014	447220	454135.000	6520.09	1.44
5	2369827	2357215	2324350	2350464.000	23478.1	0.99
10	4621593	4618430	4556129	4598717.333	36916.47	0.80
15	6898799	6875942	6696577	6823772.667	110745.9	1.63
20	9317059	9311050	9136150	9254753.000	102757.1	1.11
<b>Pendiente (m)</b>	463141	462708	452872	459574		
<b>Ordenada al origen (b)</b>	10428	5809	13677	9971		
<b>Coefficiente de correlación (R)</b>	0.99994	0.99993	0.99985	0.99991		
<b>Coefficiente de determinación (R2)</b>	0.99988	0.99986	0.99970	0.99983		



**Figura 33.** Resultados del día 2 de linealidad (áreas)

Los coeficientes de correlación lineal (R) y coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) son mayores a 0.99 ambos días, por lo que el método cumple con el criterio de aceptación para el parámetro de linealidad.

**9.2.2 Adecuabilidad**

Para la evaluación de la adecuabilidad del método analítico, se realizaron 5 inyecciones de la solución de adecuabilidad (TZX 10µg/mL). De cada inyección se determinó el área, dato con el cual se calculó el promedio, DE, y CV%. Además, se reporta el tiempo muerto, tiempo de retención y factor de capacidad.

Tabla 29. Resultados de adecuabilidad				
Concentración (µg/mL)	Área	Tiempo muerto (min)	Tiempo de retención (min)	Factor de capacidad
10	274625	1.16	2.18	0.88
10	274948	1.149	2.173	0.89
10	272354	1.161	2.17	0.87
10	273033	1.156	2.173	0.88
10	269069	1.148	2.17	0.89
<b>Promedio</b>	272805.8			
<b>DE</b>	2351.485			
<b>CV%</b>	0.86196298			

El coeficiente de variación (CV%) es menor al 2%, por lo cual, el método cumple con el criterio de aceptación para el parámetro de adecuabilidad.

**9.2.3 Precisión**

Para la evaluación de la precisión del método analítico, se prepararon 6 repeticiones en 3 niveles concentración (3, 12 y 17 µg/mL). De cada nivel se determinó el área, y se calculó DE, y CV%.



**Tabla 30. Resultados de la prueba de precisión**

Muestra	Área		
	Bajo	Medio	Alto
1	1395041	5522695	7901608
2	1398770	5642520	7822817
3	1390547	5543011	7870590
4	1394282	5612458	7841651
5	1405162	5547477	7856814
6	1386898	5546773	7857571
<b>Promedio</b>	1395116.667	5569155.667	7858508.500
<b>DE</b>	6377.873	47054.230	26703.327
<b>CV%</b>	0.46	0.84	0.34

El coeficiente de variación (CV%) es menor al 2%, por lo cual, el método cumple con el criterio de aceptación para el parámetro de precisión.

#### 9.2.4 Exactitud

Para la evaluación de la exactitud del método analítico, se utilizaron los datos de la prueba de precisión, las 6 repeticiones en 3 niveles concentración (3, 12 y 17 µg/mL), sin embargo, en este parámetro se interpolan los datos del área en una curva de cuantificación para obtener la concentración y el porcentaje recuperados. De cada nivel se calculó % Recobro y CV% Recobro.

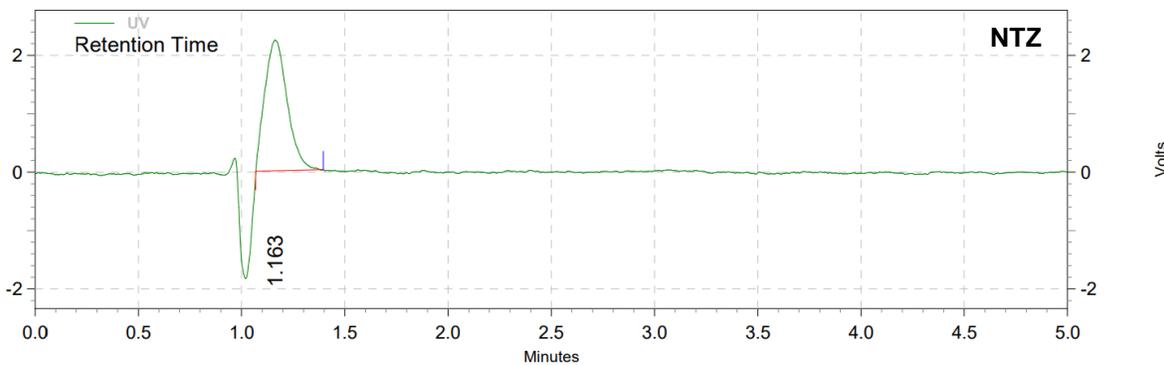
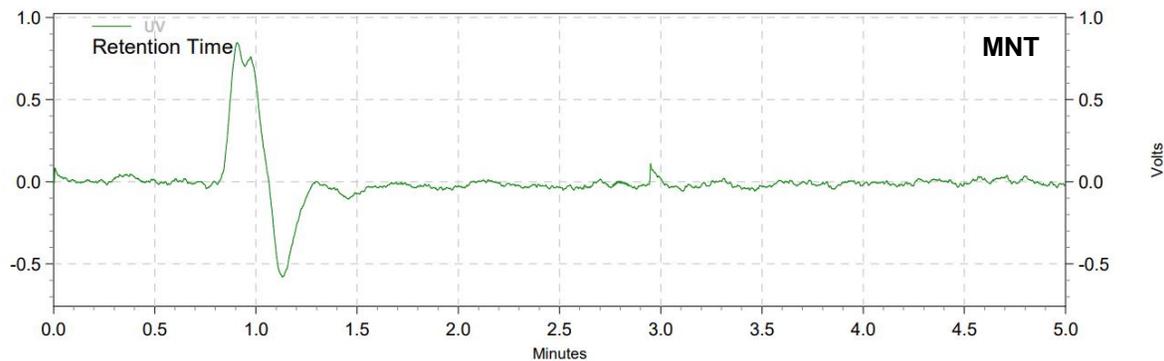
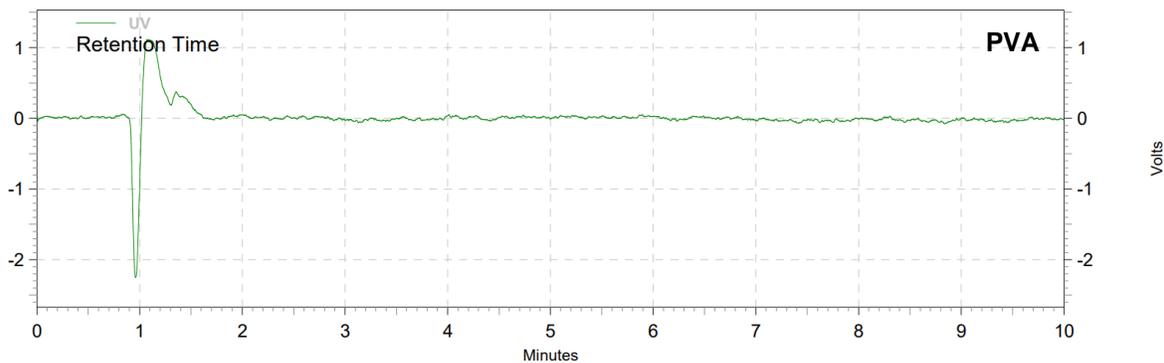
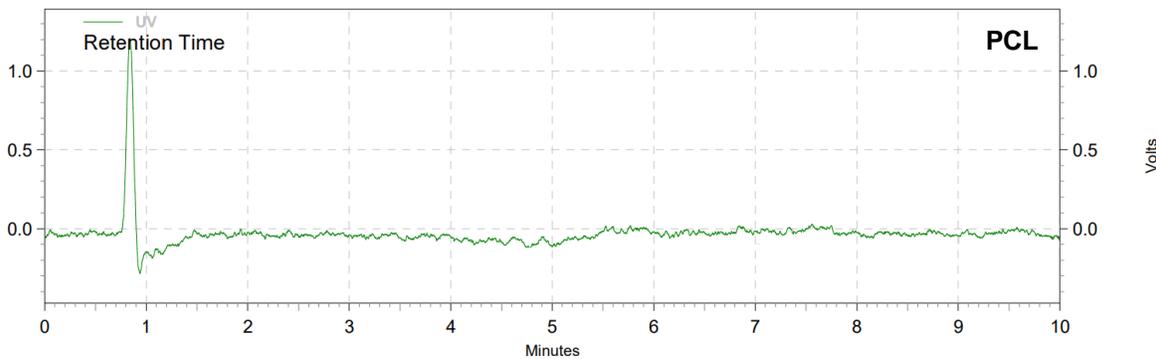
**Tabla 31. Resultados de la prueba de exactitud**

Muestra	Concentración (µg/mL)			% Recuperado (%)		
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
1	3.02	11.94	17.08	100.64	99.49	100.46
2	3.03	12.20	16.91	100.91	101.64	99.46
3	3.01	11.98	17.01	100.31	99.85	100.07
4	3.02	12.13	16.95	100.58	101.10	99.70
5	3.04	11.99	16.98	101.37	99.93	99.89
6	3.00	11.99	16.98	100.05	99.92	99.90
<b>Promedio</b>	3.019	12.039	16.986	100.643	100.322	99.915
<b>DE</b>	0.014	0.102	0.058	0.459	0.847	0.33
<b>CV%</b>	0.46	0.84	0.34	0.46	0.84	0.34

Para los tres niveles, el % de Recobro se encuentra dentro del criterio de aceptación ( $100 \pm 2\%$ ), y también, el CV% Recobro es  $<2\%$ , por lo que el método cumple con los criterios de aceptación para el parámetro de exactitud.

#### 9.2.7 Especificidad

Para determinar la especificidad del método de cuantificación de tizoxanida, se analizaron muestras de todas las posibles sustancias interferentes usando el método cromatográfico. En la figura 34, se comparan los cromatogramas de las diferentes muestras y se observa que no existe interferencia entre el analito y los componentes de la formulación, por lo tanto, la señal obtenida por el método es específica para la cuantificación de tizoxanida sin interferencia alguna.



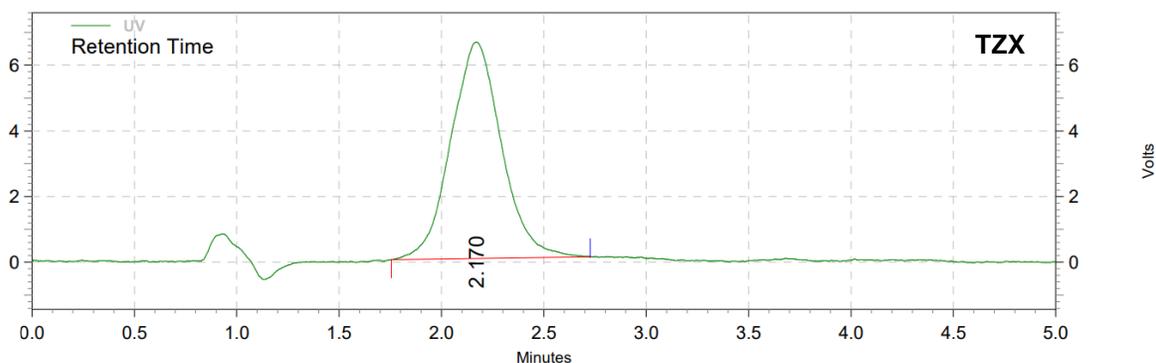


Figura 34. Cromatogramas de las materias primas de la formulación

### 9.3 Diseño de Experimentos

En este subtema encontraremos los resultados del diseño experimental que se planteó con el fin de investigar como dos factores controlables (PCL y PVA) afectan las respuestas (tamaño de partícula, potencial zeta, eficiencia de encapsulación y capacidad de carga).

El diseño experimental planteado fue un diseño factorial 2<sup>2</sup>, por lo que se realizaron 4 unidades experimentales para cada diseño, a las unidades experimentales en este trabajo también se les llama 4por el nombre de formulaciones, asociándoles las claves F1, F2, F3 y F4(en la tabla 15 podemos encontrar una matriz en la cual se muestra la clave y los niveles de cada factor). La evaluación del diseño experimental se llevó a cabo por duplicado, por lo que los datos presentados a continuación son la media de dichos resultados.

A continuación, en la tabla 32, encontraremos un compilado de los resultados del diseño experimental planteado para la formulación de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida.

Tabla 32. Resultados del Diseño Experimental para la formulación de Nanopartículas Poliméricas (n=2)				
Formulación	Tamaño de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	Eficiencia de encapsulación (%)	Capacidad de carga (%)
F1	387.4	-13.1	99.98	0.642
F2	459.8	-17.8	99.975	0.618
F3	322.7	-14.2	99.877	0.833
F4	368.5	-15.8	99.921	0.765

#### 9.3.1 Perfiles de liberación

Se evaluó por duplicado el perfil de liberación de las formulaciones o unidades experimentales propuestas en el diseño de experimentos. Este estudio se realizó durante 24 horas, en buffer de fosfatos a pH 6.8. Se realizaron muestreos a las 0.5,1,2,4,6,8,10,12,14 y 24 h. A continuación, se muestran gráficamente los perfiles de liberación de las formulaciones, los resultados los podemos encontrar en el anexo 2 y 3 para el primer y el segundo perfil respectivamente.

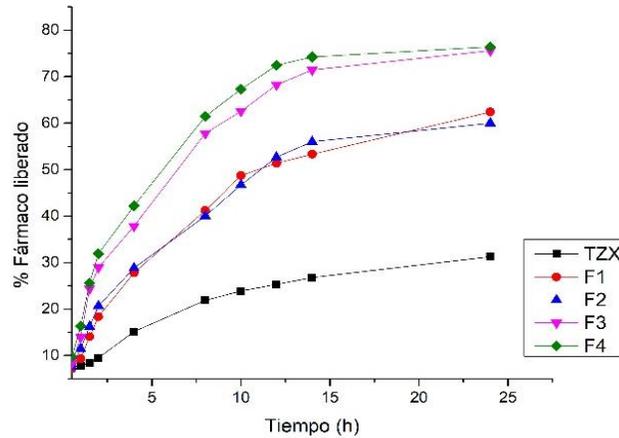


Figura 36. Primer perfil de liberación de las formulaciones del diseño de experimentos.

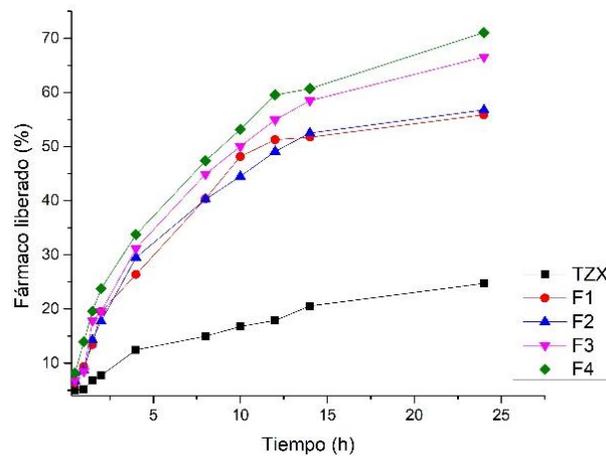


Figura 35. Segundo perfil de liberación de las formulaciones del diseño de experimentos.

Al analizar ambos gráficos de los perfiles de liberación se observa que las formulaciones de nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida superan fácilmente la liberación de tizoxanida pura. El fármaco puro (control) alcanzó un 31.25% de fármaco liberado en el primer perfil y 24.74% en el segundo, mientras que, la primera unidad experimental (F1) logró liberar 62.38% en el primer perfil y 55.87% en el segundo perfil, la segunda unidad experimental (F2) liberó 59.97% en el primer perfil y 56.78% en el segundo perfil, la tercera unidad experimental (F3) liberó 75.57% en el primer perfil y 66.55% en el segundo perfil, para finalizar, la cuarta unidad experimental (F4) liberó 76.39% en el primer perfil y 71.05% en el segundo perfil, convirtiéndose esta última en la unidad experimental que liberó un mayor porcentaje de fármaco en 24 h de todas las evaluadas en ambos perfiles.

### 9.3.2 Análisis de la influencia de los factores por cada respuesta

Para llevar a cabo el análisis del diseño experimental se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI con el cual, se obtuvieron los diagramas de Pareto y graficas de efectos principales, que nos permiten observar gráficamente el efecto de los factores y la interacción de los factores sobre cada una de las respuestas.



### 9.3.2.1 Tamaño de partícula

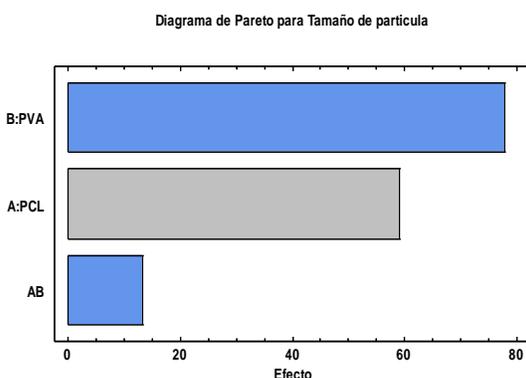


Figura 38. Diagrama de Pareto para tamaño de partícula.

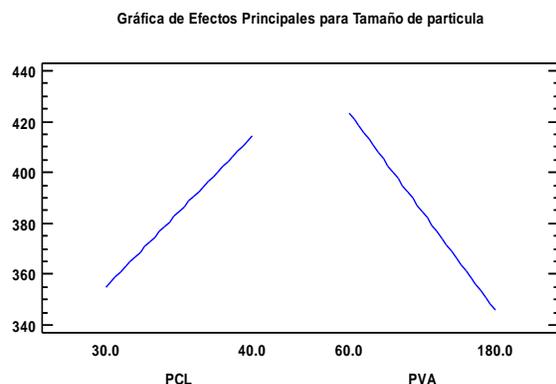


Figura 37. Gráfica de efectos principales para tamaño de partícula.

Al analizar las figuras 37 y 38, podemos observar que el PVA tiene gran influencia sobre el tamaño de partícula, generando que, a mayor cantidad de PVA, menor tamaño de partícula, lo cual es el objetivo que se busca en esta respuesta. En cuanto a PCL, podemos observar que al igual que con PVA, a mayor cantidad de PCL, menor tamaño de partícula, por lo que, para obtener una formulación con un tamaño de partícula menor, sería óptimo tener un nivel alto de PVA, y un nivel alto de PCL.

### 9.3.2.2 Potencial zeta

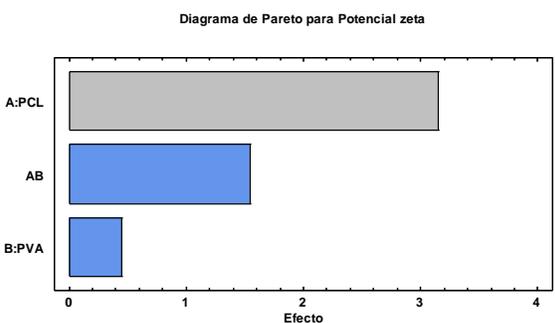


Figura 39. Diagrama de Pareto para potencial zeta.

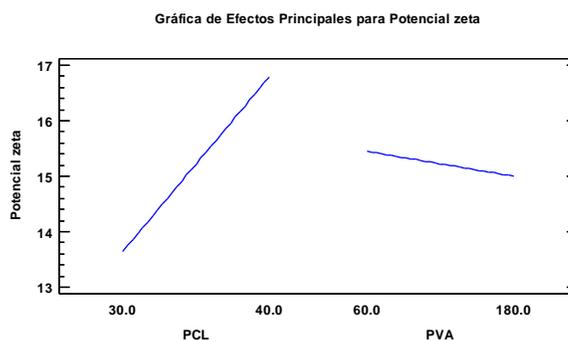


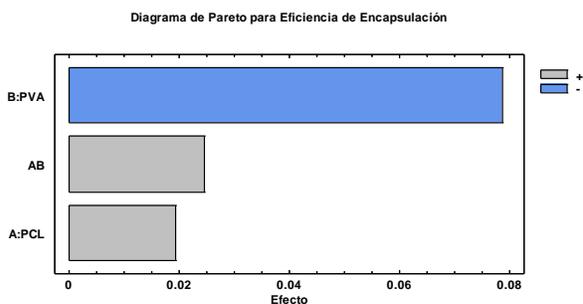
Figura 40. Gráfica de efectos principales para potencial zeta.

Al analizar las figuras 39 y 40 podemos observar que PCL es el componente que tiene mayor influencia sobre la potencial zeta, generando que a mayor cantidad de PCL, mayor potencial zeta, lo cual es el objetivo en esta respuesta, ya que un mayor potencial zeta (ya sea positivo o negativo) se traduce en una mayor estabilidad de la formulación. Esto es porque la potencial zeta es una medida de la carga eléctrica en la superficie de las partículas, y su magnitud determina la fuerza de repulsión entre partículas, por lo que, al tener gran magnitud, se genera una fuerte repulsión electrostática entre ellas, disminuyendo la agregación y generando una mayor estabilidad de la dispersión.

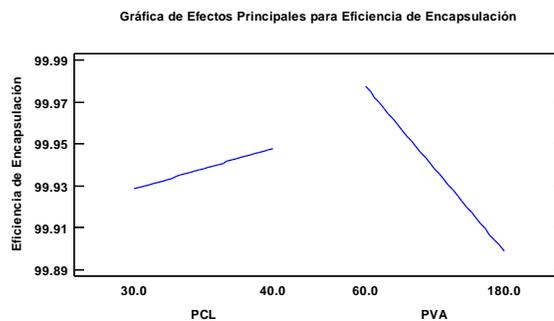
En cuanto al PVA, se observa que a diferencia de PCL, a mayor cantidad de PVA, hay un mayor potencial zeta, por lo que para obtener una formulación con un potencial zeta menor, sería recomendable que fuera un nivel alto de PCL y un nivel bajo de PVA.



### 9.3.2.3 Eficiencia de encapsulación



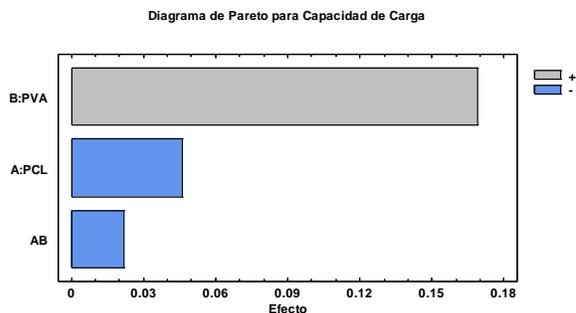
**Figura 41.** Diagrama de Pareto para eficiencia de encapsulación.



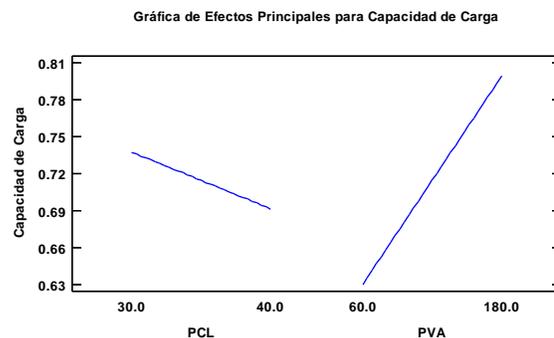
**Figura 42.** Gráfica de efectos principales para eficiencia de encapsulación

Al analizar las figuras 41 y 42 podemos observar que PVA es el componente que tiene mayor influencia sobre la eficiencia de encapsulación, generando que, a menor cantidad de PVA, mayor eficiencia de encapsulación, lo cual es el objetivo en esta respuesta. En cuanto a PCL, se observa que a mayor cantidad de PCL, mayor será la eficiencia de encapsulación. Sin embargo, en esta respuesta, hay que destacar que las diferencias son mínimas, ya que todas se mantienen por arriba del 99.89% de eficiencia de encapsulación, por lo que sin importar cual nivel PVA o PCL escojamos, obtendremos una respuesta aceptable en la eficiencia de encapsulación.

### 9.3.2.4 Capacidad de carga



**Figura 43.** Diagrama de Pareto para capacidad de carga.



**Figura 44.** Gráfica de efectos principales para capacidad de carga.

Al analizar las figuras 43 y 44, podemos observar que el PVA es el componente que tiene mayor influencia sobre la eficiencia de encapsulación, generando que, a mayor cantidad de PVA, se obtiene una mayor capacidad de carga, lo cual es el objetivo en esta respuesta. En cuanto a PCL, se observa que tiene el efecto contrario, pues a menor cantidad de PCL, mayor será la capacidad de carga de nuestra formulación. Teniendo esto en cuenta, una formulación con un nivel alto de PVA, y un nivel bajo de PCL, obtendrá una mayor capacidad de carga.

### 9.3.3 Optimización de la formulación

Al llevar a cabo el análisis del Diseño de Experimentos mediante el software Statgraphics XVI, se determinó que los valores óptimos para cada factor para obtener una respuesta optimizada se muestran en la tabla 33:



Tabla 33. Optimización de formulación				
Factores Optimizados (X1, X2)		Variable de respuesta a optimizar	Valor teórico	Valor experimental
PCL (mg)	PVA (mg)			
40	180	Tamaño (nm)	368.5	383.8
Deseabilidad		Potencial zeta (mV)	-15.8	-17.42
		EE (%)	99.921	99.992
0.57816		CC (%)	0.765	0.948

La formulación propuesta por el software se corresponde con la unidad experimental 4 o F4, la cual se tratará desde este punto como formulación optimizada o F OPT.

#### 9.4 Caracterización de la formulación optimizada

En este subtema, encontraremos los resultados de la caracterización de la formulación optimizada (F OPT), la cual fue caracterizada por medio de espectroscopia infrarroja, difractorio de rayos X de polvos, calorimetría diferencial de barrido y por su perfil de liberación.

##### 9.4.1 Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja es una técnica que permite identificar los grupos funcionales presentes en una muestra. Al obtener el espectro infrarrojo, se generan bandas asociadas a las vibraciones entre los átomos de las moléculas. Al analizar estas bandas en regiones específicas del espectro infrarrojo, es posible determinar los grupos funcionales presentes.

A continuación, encontraremos el espectro infrarrojo de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida, donde se pueden identificar las bandas asociadas a los grupos funcionales de cada componente de la formulación utilizada.

Esta asignación está basada en las tablas de los libros "Organic Spectroscopy" de Yadav<sup>42</sup> y "Spectrometric Identification of Organic Compounds" de Silverstein<sup>43</sup>. Además, se tomó como referencia los espectros en el artículo "Identification, characterization and cytotoxicity *in vitro* assay of nitazoxanide major degradation product" de Malesuik<sup>44</sup>.

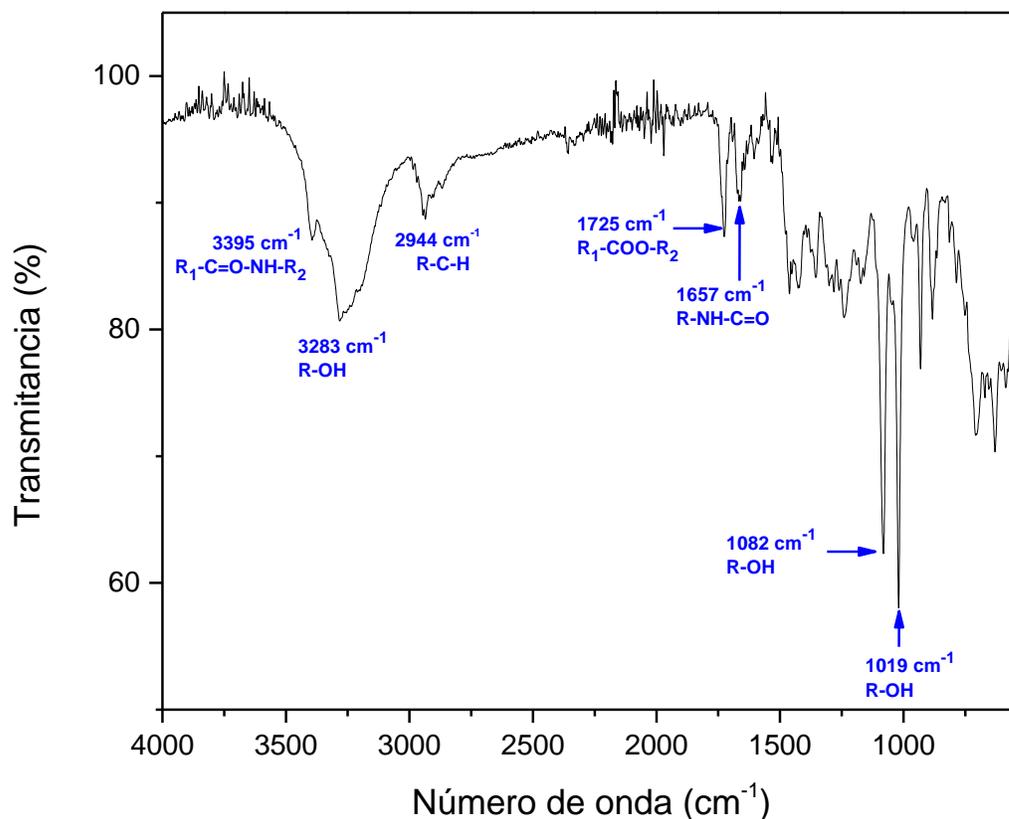
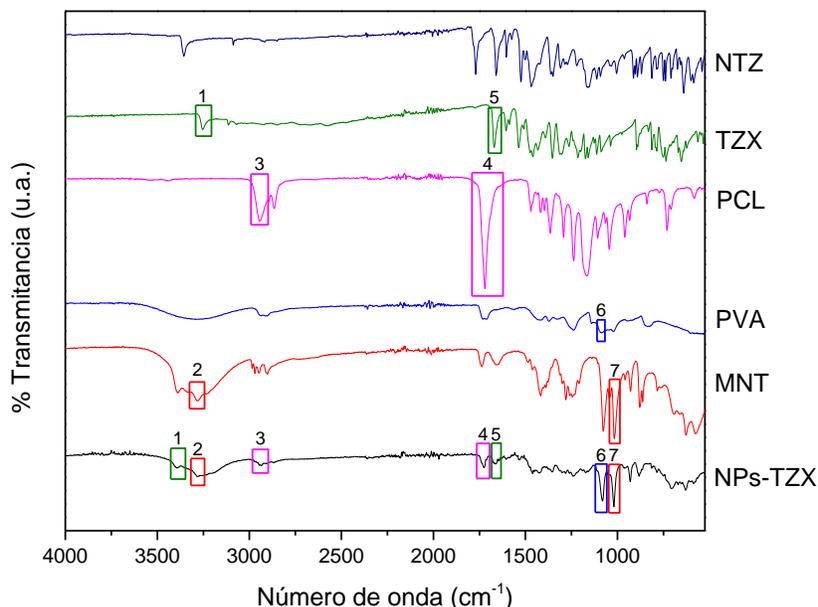


Figura 45. Espectro infrarrojo de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida.

Tabla 34. Interpretación de las bandas del espectro infrarrojo de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida

No.	Banda	Tipo de vibración molecular	Grupo funcional	Componente de la formulación
1	3395 cm <sup>-1</sup> (w, sh)	Tensión	Amida secundaria(R <sub>1</sub> -C=O-NH-R <sub>2</sub> )	Tizoxanida
2	3283 cm <sup>-1</sup> (m, br)	Tensión	Alcohol (R-OH)	Manitol
3	2944 cm <sup>-1</sup> (w, sh)	Tensión	Carbono saturado (R-C-H)	Policaprolactona
4	1725 cm <sup>-1</sup> (w, sh)	Tensión	Éster (R <sub>1</sub> -COO-R <sub>2</sub> )	Policaprolactona
5	1657 cm <sup>-1</sup> (w, sh)	Tensión	Amida (R-NH-C=O)	Tizoxanida
6	1082 cm <sup>-1</sup> (s, sh)	Tensión	Alcohol (R-OH)	Alcohol polivinílico
7	1019 cm <sup>-1</sup> (s, sh)	Tensión	Alcohol (R-OH)	Manitol

w: weak, m: medium, s: strong, v: variable, sh: sharp, br: broad



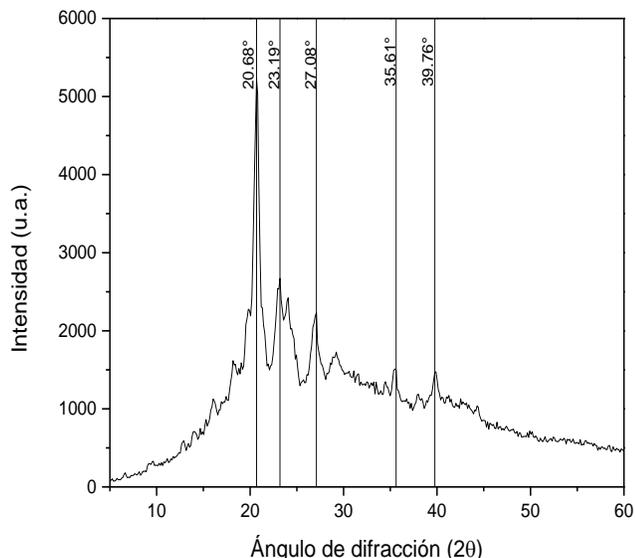
**Figura 46.** Espectros ATR-FT-IR apilados de las materias primas y las nanopartículas poliméricas. Los numerales indicados en la figura, se corresponden con los indicados en la tabla 30.

Al analizar las figuras 45 y 46 junto con la tabla 28, podemos observar que en el espectro infrarrojo de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida podemos encontrar bandas que muestran los componentes de la formulación optimizada. La banda a  $3395\text{ cm}^{-1}$ , se asocia con una amida secundaria, relacionada con la banda a  $3255\text{ cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo de tizoxanida en la figura 16. La banda a  $3283\text{ cm}^{-1}$  es asociada con un alcohol, esta banda se corresponde con la banda a  $3282\text{ cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo de MNT en la figura 19. La banda a  $2944\text{ cm}^{-1}$  está asociada con la tensión entre un hidrogeno y un carbono saturado, esta banda corresponde con la banda a  $2944\text{ cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo de PCL en la figura 17. La banda a  $1725\text{ cm}^{-1}$  está asociada con el carbonilo de un éster, esta banda corresponde con la banda a  $1721\text{ cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo de PCL en la figura 17. La banda a  $1657\text{ cm}^{-1}$  está asociada con el carbonilo de una amida, esta banda corresponde con la banda a  $1670\text{ cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo de TZX en la figura 16. La banda a  $1082\text{ cm}^{-1}$  está asociada con un alcohol, esta banda se corresponde con la banda a  $1087\text{ cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo de PVA en la figura 18. Para finalizar, la banda a  $1019\text{ cm}^{-1}$  está asociada con un alcohol, esta banda corresponde con la banda a  $1015\text{ cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo de MNT en la figura 19.

De estos resultados podemos concluir, que tizoxanida se encuentra presente dentro de la muestra, al igual que todas las otras materias primas utilizadas para la formulación de las nanopartículas poliméricas.

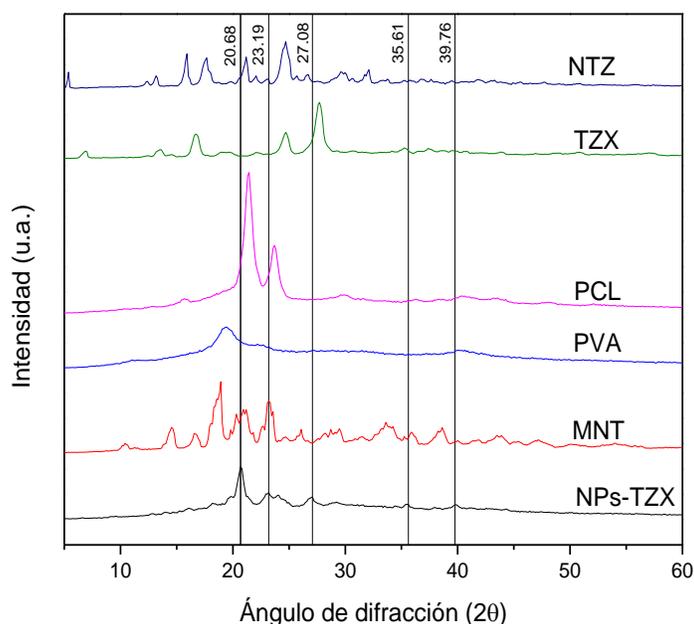
#### 9.4.4 Difractometría de Rayos X de Polvos

A continuación, se encuentra el difractograma de la muestra de la formulación optimizada de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida (figura 47), seguido de los difractogramas apilados de las materias primas (NTZ, TZX, PCL, PVA y MNT) y la formulación optimizada, el cual nos permite comparar los picos observados en los difractogramas para observar si se mantiene la cristalinidad de los componentes.



**Figura 47.** Diffractograma de nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida

Se observan picos definidos en 20.68°, 23.19°, 27.08, 35.61° y 39.76°. Los picos definidos son un indicador de la cristalinidad de los componentes de la muestra.



**Figura 48.** Diffractogramas apilados de las materias primas, fármacos y nanopartículas cargadas con tizoxanida.

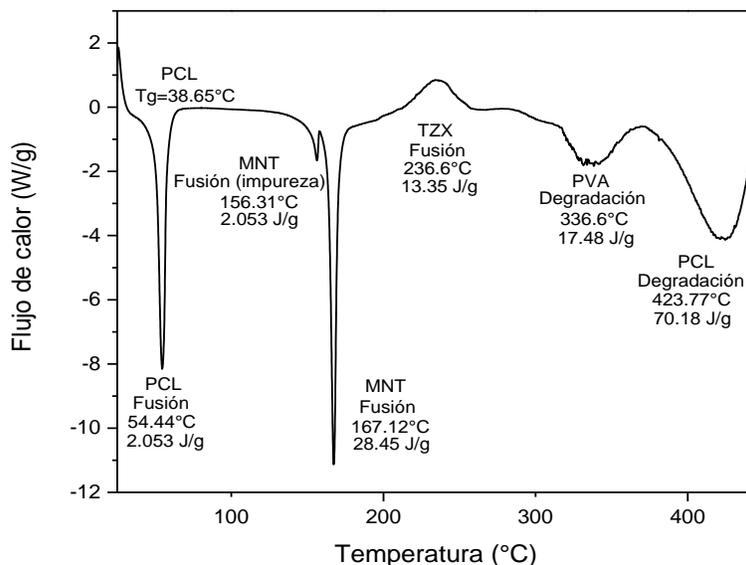
Al analizar la figura 48, podemos observar, que existen picos definidos en el diffractograma de las NPs-TZX que provienen de componentes de la formulación que mantienen su forma cristalina. La primera señal a 20.68° se correlaciona con una señal de MNT a 18.93° que podemos observar en la figura 26. La segunda señal a 23.18° se correlaciona con una señal de MNT a 21.19° que podemos observar en la figura 26. La tercera señal a 27.08° se correlaciona con una señal de TZX a 27.71° que podemos observar en la figura 23, aunque se observa un ligero desplazamiento a la izquierda en el diffractograma de la formulación optimizada. La cuarta señal a 35.61° se correlaciona con la señal a 33.61° de MNT que podemos observar en la figura 26. La quinta y última señal, se encuentra a 39.76° y se puede correlacionar con la señal a 38.63° de MNT que podemos observar en la figura 26. La mayoría de las señales que están presentes en la formulación optimizada se deben a MNT, probablemente debido a que este componente de la formulación es añadido al final, durante la liofilización, por



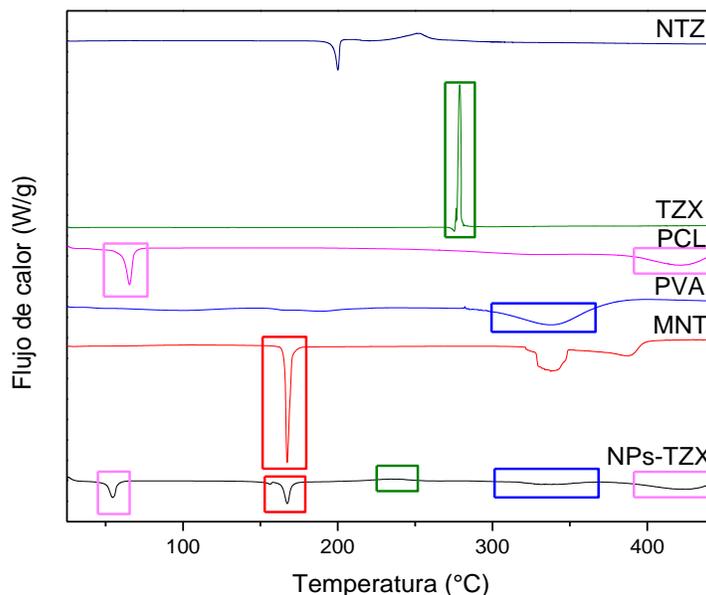
lo que, como tal, no forma parte de la matriz polimérica, si no que forma una mezcla física con las nanopartículas poliméricas.

**9.4.5 Calorimetría Diferencial de Barrido**

A continuación, se encuentra el termograma de la muestra de la formulación optimizada de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida (figura 49), seguido de los termogramas apilados de las materias primas (NTZ, TZX, PCL, PVA y MNT) y la formulación optimizada, el cual nos permite comparar los eventos térmicos observados en los termogramas.



**Figura 49.** Termograma de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida.



**Figura 50.** Termogramas apilados de las materias primas y la formulación final optimizada.

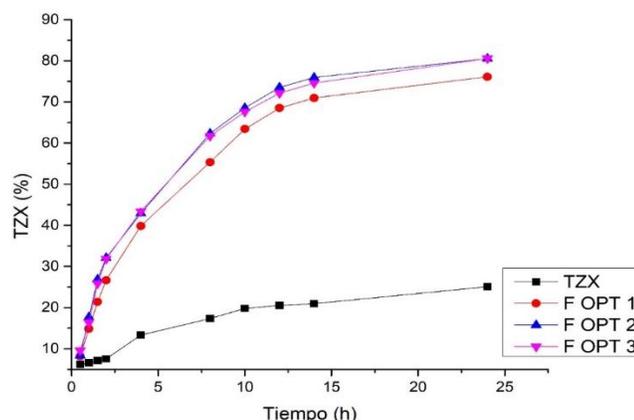
Al analizar las figuras 49 y 50, encontramos varios eventos térmicos que están presentes en la formulación optimizada y que se deben a las materias primas utilizadas para formular las



nanopartículas poliméricas. El primer evento térmico es la transición vítrea a 38.65 °C que corresponde con la transición vítrea mostrada por PCL a 40.28 °C. El segundo evento térmico es una fusión que ocurre a 54.44 °C y que corresponde con la fusión de PCL 65.48 °C. El tercer y el cuarto evento térmico que encontramos son fusiones que ocurre a 156.31 °C y 167.12 °C que corresponden con la fusión de MNT a 167.37 °C, sin embargo, por la forma en que se presentan, como una fusión en dos etapas, la primera presentado un pico muy pequeño, este evento pequeño posiblemente se deba a una impureza eutéctica presente en el MNT<sup>105</sup>. El quinto evento térmico es una fusión exotérmica que ocurre a 236.6 °C y que corresponde con la fusión exotérmica de TZX a 278 °C. El sexto evento térmico es una fusión que ocurre a 336.6 °C y que corresponde con la fusión de MNT a 337.58 °C. El séptimo evento térmico es una degradación que ocurre a 423.77 °C y que se corresponde con la degradación de PCL a 421.44 °C.

#### 9.4.6 Perfiles de liberación

Se realizaron los experimentos para obtener el perfil de liberación de la formulación optimizada por triplicado y con un control, el cual fue el fármaco puro (tizoxanida). Este estudio se realizó durante 24 horas, en buffer de fosfatos a pH 6.8. Se realizaron muestreos a las 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 24 h. A continuación, se muestran gráficamente los perfiles de liberación de la formulación optimizada, los resultados los podemos encontrar en el anexo 4.



**Figura 51.** Perfil de liberación de las formulaciones optimizadas

Al analizar los perfiles de liberación de la formulación optimizada y el fármaco puro podemos observar que el control alcanzo un 25.11% de fármaco liberado mientras que las formulaciones optimizadas (F OPT 1, F OPT 2 y FOPT 3) obtuvieron 76.12%, 80.54% y 79.08% respectivamente, que en promedio es un 79.08%. De este resultado podemos concluir que la formulación optimizada es capaz de liberar hasta tres veces más que fármaco que la tizoxanida pura en 24 h.

Con base en los resultados obtenidos del perfil de liberación de las formulaciones optimizadas de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida durante un período de 24 horas, se llevó a cabo un análisis de diferentes modelos cinéticos de liberación para determinar cuál es el que mejor se adecua a los datos obtenidos.

Después de tratar los datos y generar los modelos correspondientes, los cuales podemos observar en la tabla 35, se observó que el modelo de Higuchi presentó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) más cercano a la unidad, con un valor de 0.94. Esto indica que la liberación de la tizoxanida de la formulación optimizada se ajusta al modelo de Higuchi.



El modelo de Higuchi propone que la liberación de los fármacos que se adecuen a este modelo está controlada principalmente por procesos de difusión a través de una matriz polimérica<sup>106</sup>. Esto implica que la formulación desarrollada ofrece un mecanismo de liberación controlada, sostenida y gradual a lo largo del tiempo, lo cual es favorable para aplicaciones terapéuticas en enfermedades crónicas que requieran mantener las dosis durante largos periodos de tiempo, como lo puede llegar a ser el tratamiento de enfermos crónicos con hepatitis viral B o C.

Tabla 35. Modelos cinéticos de liberación									
Orden cero		Primer orden		Higuchi		Hixson-Crowell		Baker	
T (h)	% Lib	T (h)	Log %Lib	$\sqrt{T}$ ( $\sqrt{h}$ )	c	T (h)	$\sqrt[3]{\%Lib}$	$\sqrt{T^{-1}}$ ( $\sqrt{h^{-1}}$ )	%Lib
0.5	8.69	0.5	0.94	0.71	8.69	0.5	2.056	1.414	8.69
1	16.33	1	1.21	1.00	16.33	1	2.537	1.000	16.33
1.5	24.70	1.5	1.39	1.22	24.70	1.5	2.912	0.816	24.70
2	30.21	2	1.48	1.41	30.21	2	3.114	0.707	30.21
4	42.05	4	1.62	2.00	42.05	4	3.477	0.500	42.05
8	59.80	8	1.78	2.83	59.80	8	3.911	0.354	59.80
10	66.53	10	1.82	3.16	66.53	10	4.052	0.316	66.53
12	71.40	12	1.85	3.46	71.40	12	4.149	0.289	71.40
14	73.85	14	1.87	3.74	73.85	14	4.195	0.267	73.85
24	79.08	24	1.90	4.90	79.08	24	4.292	0.204	79.08
<b>R<sup>2</sup></b>	0.80	<b>R<sup>2</sup></b>	0.63	<b>R<sup>2</sup></b>	0.94	<b>R<sup>2</sup></b>	0.70	<b>R<sup>2</sup></b>	0.90

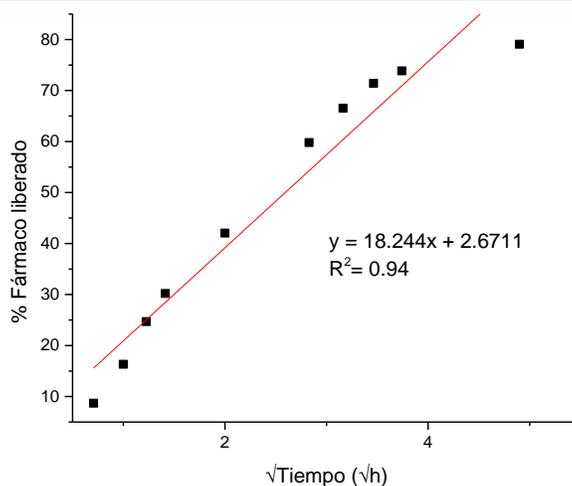


Figura 52. Cinética de liberación de la formulación optimizada con el modelo de Higuchi

En la actualidad, las enfermedades hepáticas representan un grave problema de salud pública en la población mexicana<sup>1</sup>, debido a su alta mortalidad y la resistencia generada por los virus en casos crónicos. En este contexto, el uso de terapias combinadas que actúen sobre el virus por múltiples vías se ha convertido en una estrategia prometedora para el tratamiento de estas enfermedades. Entre los fármacos en investigación, la nitazoxanida ha demostrado efectividad como antiviral para las hepatitis B y C.

El desafío del uso de nitazoxanida como tratamiento antiviral es su baja solubilidad acuosa, lo que resulta en una pobre biodisponibilidad, tal como se ha observado en estudios *in vivo* e *in vitro*. Esta limitación afecta significativamente la liberación del fármaco y, a menudo, requiere administrar altas



dosis (hasta 200 mg/kg de peso), lo cual puede generar reacciones adversas. Por lo tanto, es necesario buscar estrategias para mejorar la solubilidad acuosa y, en consecuencia, la biodisponibilidad de la nitazoxanida.

En este trabajo de investigación, hemos abordado este desafío mediante el desarrollo de una formulación innovadora: nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida. Los resultados obtenidos demuestran que esta formulación presenta una liberación *in vitro* hasta tres veces mayor en comparación con el fármaco no formulado. Estos hallazgos sugieren que una forma farmacéutica que contenga las nanopartículas optimizadas podría alcanzar el efecto terapéutico con dosis más bajas que las utilizadas actualmente.

Para respaldar la eficacia y seguridad de la formulación propuesta, es necesario llevar a cabo evaluaciones adicionales en cultivos celulares y realizar estudios preclínicos en animales. Estos estudios permitirán obtener información más detallada sobre el comportamiento de las nanopartículas en estudios *in vivo* y confirmar su potencial terapéutico.

En conclusión, este trabajo de investigación ha sentado las bases para mejorar la liberación de tizoxanida mediante la formulación de nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida para el potencial tratamiento de las enfermedades hepáticas. Es indispensable continuar con la investigación y realizar las pruebas pertinentes para consolidar la efectividad y la seguridad de esta estrategia terapéutica.

Este estudio tiene el potencial de mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes y contribuir en la lucha contra enfermedades de alta relevancia para la salud pública.



## 10. CONCLUSIONES

### 10.1 Conclusión general

Se desarrolló y caracterizó una formulación farmacéutica de nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con tizoxanida. La cual demostró una mejoría en su liberación con respecto a la tizoxanida sin formular.

### 11.2 Conclusiones particulares

- Se desarrolló un método de síntesis de tizoxanida por medio de hidrólisis ácida de nitazoxanida.
- Se desarrolló un método de obtención de nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con tizoxanida por medio de una metodología de emulsión y evaporación de solvente.
- Se optimizó la producción de las nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida por medio de un diseño experimental ( $2^2$ ).
- Se caracterizaron las nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con tizoxanida por Espectroscopia Infrarroja, difracción de rayos X de polvos, calorimetría de barrido y perfiles de liberación.



## 11. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de permeabilidad utilizando el modelo de celdas de Franz u otros métodos adecuados, para evaluar la capacidad de las nanopartículas formuladas en la penetración y liberación controlada del fármaco, proporcionando información valiosa sobre su comportamiento en sistemas biológicos.
- Evaluar la eficacia y seguridad del sistema de nanopartículas poliméricas en modelos in vivo, con el fin de obtener una visión más completa de su potencial terapéutico y su perfil de seguridad.
- Realizar el escalamiento de las nanopartículas optimizadas para producir gramos de la formulación para fines de investigación básica, asegurando la reproducibilidad y calidad del proceso.
- Formular los sistemas de nanopartículas en una forma farmacéutica adecuada que facilite su administración, por ejemplo, tabletas de liberación controlada.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

- (1) INEGI. *CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 20201, PRELIMINAR.*
- (2) Asrani, S. K.; Devarbhavi, H.; Eaton, J.; Kamath, P. S. Burden of Liver Diseases in the World. *J. Hepatol.* **2019**, *70* (1), 151–171. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2018.09.014>.
- (3) Deng, L.; Tang, H. Hepatitis B Virus Drug Resistance to Current Nucleos(t)ide Analogs: Mechanisms and Mutation Sites. *Hepatol. Res.* **2011**, *41* (11), 1017–1024. <https://doi.org/10.1111/J.1872-034X.2011.00873.X>.
- (4) Richman, D. D. Antiviral Drug Resistance. *Antiviral Res.* **2006**, *71* (2–3), 117–121. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2006.03.004>.
- (5) Allen, M. I.; Deslauriers, M.; Webster Andrews, C.; Tipples, G. A.; Walters, K. A.; Tyrrell, D. L. J.; Brown, N.; Condeary, L. D. Identification and Characterization of Mutations in Hepatitis B Virus Resistant to Lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatol. Baltim. Md* **1998**, *27* (6), 1670–1677. <https://doi.org/10.1002/HEP.510270628>.
- (6) Li, M. W.; Hou, W.; Wo, J. E.; Liu, K. Z. Character of HBV (Hepatitis B Virus) Polymerase Gene rtM204V/I and rtL180M Mutation in Patients with Lamivudine Resistance. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2005**, *6* (7), 664. <https://doi.org/10.1631/JZUS.2005.B0664>.
- (7) Angus, P.; Vaughan, R.; Xiong, S.; Yang, H.; Delaney, W.; Gibbs, C.; Brosgart, C.; Colledge, D.; Edwards, R.; Ayres, A.; Bartholomeusz, A.; Locarnini, S. Resistance to Adefovir Dipivoxil Therapy Associated with the Selection of a Novel Mutation in the HBV Polymerase. *Gastroenterology* **2003**, *125* (2), 292–297. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00939-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00939-9).
- (8) Sherman, M.; Yurdaydin, C.; Simsek, H.; Silva, M.; Liaw, Y.; Rustgi, V. K.; Sette, H.; Tsai, N.; Tenney, D. J.; Vaughan, J.; Kreter, B.; Hindes, R. Entecavir Therapy for Lamivudine-refractory Chronic Hepatitis B: Improved Virologic, Biochemical, and Serology Outcomes through 96 Weeks. *Hepatology* **2008**, *48* (1), 99–108. <https://doi.org/10.1002/hep.22323>.
- (9) Villet, S.; Pichoud, C.; Billioud, G.; Barraud, L.; Durantel, S.; Trépo, C.; Zoulim, F. Impact of Hepatitis B Virus rtA181V/T Mutants on Hepatitis B Treatment Failure. *J. Hepatol.* **2008**, *48* (5), 747–755. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2008.01.027>.
- (10) McPhee, F.; Hernandez, D.; Yu, F.; Ueland, J.; Monikowski, A.; Carifa, A.; Falk, P.; Wang, C.; Fridell, R.; Eley, T.; Zhou, N.; Gardiner, D. Resistance Analysis of Hepatitis C Virus Genotype 1 Prior Treatment Null Responders Receiving Daclatasvir and Asunaprevir. *Hepatology* **2013**, *58* (3), 902–911. <https://doi.org/10.1002/hep.26388>.
- (11) McPhee, F.; Friborg, J.; Levine, S.; Chen, C.; Falk, P.; Yu, F.; Hernandez, D.; Lee, M. S.; Chaniewski, S.; Sheaffer, A. K.; Pasquinelli, C. Resistance Analysis of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (7), 3670–3681. <https://doi.org/10.1128/AAC.00308-12>.
- (12) Krishnan, P.; Pilot-Matias, T.; Schnell, G.; Tripathi, R.; Ng, T. I.; Reisch, T.; Beyer, J.; Dekhtyar, T.; Irvin, M.; Xie, W.; Larsen, L.; Mensa, F. J.; Collins, C. Pooled Resistance Analysis in Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1 to 6 Infection Treated with Glecaprevir-Pibrentasvir in



Phase 2 and 3 Clinical Trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, 62 (10). <https://doi.org/10.1128/AAC.01249-18>.

(13) Komatsu, T. E.; Boyd, S.; Sherwat, A.; Tracy, L. R.; Naeger, L. K.; O'Rear, J. J.; Harrington, P. R. Regulatory Analysis of Effects of Hepatitis C Virus NS5A Polymorphisms on Efficacy of Elbasvir and Grazoprevir. *Gastroenterology* **2017**, 152 (3), 586–597. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2016.10.017>.

(14) Summa, V.; Ludmerer, S. W.; McCauley, J. A.; Fandozzi, C.; Burlein, C.; Claudio, G.; Coleman, P. J.; Dimuzio, J. M.; Ferrara, M.; Di Filippo, M.; Gates, A. T.; Graham, D. J.; Harper, S.; Hazuda, D. J.; Huang, Q.; McHale, C.; Monteagudo, E.; Pucci, V.; Rowley, M.; Rudd, M. T.; Soriano, A.; Stahlhut, M. W.; Vacca, J. P.; Olsen, D. B.; Liverton, N. J.; Carroll, S. S. MK-5172, a Selective Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3/4a Protease with Broad Activity across Genotypes and Resistant Variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, 56 (8), 4161–4167. <https://doi.org/10.1128/AAC.00324-12>.

(15) Black S, P. I.; Ingravallo, P. Resistance Analysis of Virologic Failures in Hepatitis C Genotype 1-Infected Patients Treated With Grazoprevir + Elbasvir ± Ribavirin: The C-WORTHY Study. In *EASL - The International Liver Congress*; Association for the Study of the Liver: Vienna, Austria, 2015.

(16) Di Maio, V. C.; Cento, V.; Lenci, I.; Aragri, M.; Rossi, P.; Barbaliscia, S.; Melis, M.; Verucchi, G.; Magni, C. F.; Teti, E.; Bertoli, A.; Antonucci, F. P.; Bellocchi, M. C.; Micheli, V.; Masetti, C.; Landonio, S.; Francioso, S.; Santopaolo, F.; Pellicelli, A.; Calvaruso, V.; Gianserra, L.; Siciliano, M.; Romagnoli, D.; Cozzolongo, R.; Vecchiet, J.; Morisco, F.; Merli, M.; Brancaccio, G.; Di Biagio, A.; Loggi, E.; Mastroianni, C. M.; Pace Palitti, V.; Tarquini, P.; Puoti, M.; Taliani, G.; Sarmati, L.; Picciotto, A.; Vullo, V.; Caporaso, N.; Paoloni, M.; Pasquazzi, C.; Rizzardini, G.; Parruti, G.; Craxi, A.; Babudieri, S.; Andreoni, M.; Angelico, M.; Perno, C. F.; Ceccherini-Silberstein, F.; Mariani, R.; Iapadre, N.; Grimaldi, A.; Andreone, P.; Menzaghi, B.; Quirino, T.; Pisani, V.; Torti, C.; Bruzzone, B.; De Maria, A.; Marengo, S.; Nicolini, L. A.; Viscoli, C.; Casinelli, K.; Delle Monache, M.; Lichtner, M.; Aghemo, A.; Boccaccio, V.; Bruno, S.; Cerrone, M.; Colombo, M.; D'Arminio Monforte, A.; Danieli, E.; Donato, F.; Gubertini, G.; Lleo, A.; Mancon, A.; Monico, S.; Niero, F.; Russo, M. L.; Gnocchi, M.; Orro, A.; Milanesi, L.; Baldelli, E.; Bertolotti, M.; Borghi, V.; Mussini, C.; Gaeta, G. B.; Lembo, V.; Sangiovanni, V.; Di Marco, V.; Mazzola, A.; Petta, S.; D'Amico, E.; Cacciatore, P.; Consorte, A.; Pieri, A.; Polilli, E.; Sozio, F.; Antenucci, F.; Baiocchi, L.; Biliotti, E.; Biolato, M.; Carioti, L.; Cerasari, G.; Cerva, C.; Ciotti, M.; D'Ambrosio, C.; D'Ettore, G.; De Leonardis, F.; De Sanctis, A.; Di Paolo, D.; Furlan, C.; Gallo, P.; Gasbarrini, A.; Giannelli, V.; Grieco, S.; Lambiase, L.; Lattanzi, B.; Lula, R.; Malagnino, V.; Manuelli, M.; Miglioresi, L.; Milana, M.; Moretti, A.; Nosotti, L.; Palazzo, D.; Romano, M.; Sarrecchia, C.; Sforza, D.; Sorbo, M. C.; Spaziante, M.; Svicher, V.; Tisone, G.; Vespasiani-Gentilucci, U.; D'Adamo, G.; Mangia, A.; Maida, I.; Mura, M. S.; Falconi, L.; Di Giammartino, D. Multiclass HCV Resistance to Direct-Acting Antiviral Failure in Real-Life Patients Advocates for Tailored Second-Line Therapies. *Liver Int.* **2017**, 37 (4), 514–528. <https://doi.org/10.1111/LIV.13327>.

(17) Pilot-Matias, T.; Tripathi, R.; Cohen, D.; Gaultier, I.; Dekhtyar, T.; Lu, L.; Reisch, T.; Irvin, M.; Hopkins, T.; Pithawalla, R.; Middleton, T.; Ng, T.; McDaniel, K.; Or, Y. S.; Menon, R.; Kempf, D.; Molla, A.; Collins, C. In Vitro and In Vivo Antiviral Activity and Resistance Profile of the Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitor ABT-450. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59 (2), 988. <https://doi.org/10.1128/AAC.04227-14>.

(18) Kumada, H.; Chayama, K.; Lino Rodrigues, Jr.; Suzuki, F.; Ikeda, K.; Toyoda, H.; Sato, K.; Karino, Y.; Matsuzaki, Y.; Kioka, K.; Setze, C.; Pilot-Matias, T.; Patwardhan, M.; Vilchez, R. A.



Burroughs, M.; Redman, R. Randomized Phase 3 Trial of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir for Hepatitis C Virus Genotype 1b–Infected Japanese Patients with or without Cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **2015**, 62 (4), 1037. <https://doi.org/10.1002/HEP.27972>.

(19) Schnell, G.; Tripathi, R.; Beyer, J.; Reisch, T.; Krishnan, P.; Lu, L.; Dekhtyar, T.; Hall, C.; Vilchez, R. A.; Pilot-Matias, T.; Collins, C. Hepatitis C Virus Genotype 4 Resistance and Subtype Demographic Characterization of Patients Treated with Ombitasvir plus Paritaprevir/Ritonavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59 (11), 6807–6815. <https://doi.org/10.1128/AAC.01229-15>.

(20) Verbinnen, T.; Fevery, B.; Vijgen, L.; Jacobs, T.; De Meyer, S.; Lenz, O. In Vitro Activity of Simeprevir against Hepatitis C Virus Genotype 1 Clinical Isolates and Its Correlation with NS3 Sequence and Site-Directed Mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59 (12), 7548–7557. <https://doi.org/10.1128/AAC.01444-15>.

(21) Lenz, O.; Verbinnen, T.; Fevery, B.; Tambuyzer, L.; Vijgen, L.; Peeters, M.; Buelens, A.; Ceulemans, H.; Beumont, M.; Picchio, G.; De Meyer, S. Virology Analyses of HCV Isolates from Genotype 1-Infected Patients Treated with Simeprevir plus Peginterferon/Ribavirin in Phase IIb/III Studies. *J. Hepatol.* **2015**, 62 (5), 1008–1014. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.032>.

(22) Jensen, S. B.; Serre, S. B. N.; Humes, D. G.; Ramirez, S.; Li, Y. P.; Bukh, J.; Gottwein, J. M. Substitutions at NS3 Residue 155, 156, or 168 of Hepatitis C Virus Genotypes 2 to 6 Induce Complex Patterns of Protease Inhibitor Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59 (12), 7426. <https://doi.org/10.1128/AAC.01953-15>.

(23) Ali, A.; Aydin, C.; Gildemeister, R.; Romano, K. P.; Cao, H.; Özen, A.; Soumana, D.; Newton, A.; Petropoulos, C. J.; Huang, W.; Schiffer, C. A. Evaluating the Role of Macrocycles in the Susceptibility of Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitors to Drug Resistance. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8 (7), 1469. <https://doi.org/10.1021/CB400100G>.

(24) Barnard, R. J. O.; McHale, C. M.; Newhard, W.; Cheney, C. A.; Graham, D. J.; Himmelberger, A. L.; Strizki, J.; Hwang, P. M. T.; Rivera, A. A.; Reeves, J. D.; Nickle, D.; DiNubile, M. J.; Hazuda, D. J.; Mobashery, N. Emergence of Resistance-Associated Variants after Failed Triple Therapy with Vaniprevir in Treatment-Experienced Non-Cirrhotic Patients with Hepatitis C-Genotype 1 Infection: A Population and Clonal Analysis. *Virology* **2013**, 443 (2), 278–284. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2013.05.013>.

(25) Gane, E. J.; Schwabe, C.; Hyland, R. H.; Yang, Y.; Svarovskaia, E.; Stamm, L. M.; Brainard, D. M.; McHutchison, J. G.; Stedman, C. A. Efficacy of the Combination of Sofosbuvir, Velpatasvir, and the NS3/4A Protease Inhibitor GS-9857 in Treatment-Naïve or Previously Treated Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 or 3 Infections. *Gastroenterology* **2016**, 151 (3), 448-456.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.05.021>.

(26) Harrington, P. R.; Komatsu, T. E.; Deming, D. J.; Donaldson, E. F.; O'Rear, J. J.; Naeger, L. K. Impact of Hepatitis C Virus Polymorphisms on Direct-Acting Antiviral Treatment Efficacy: Regulatory Analyses and Perspectives. *Hepatology* **2018**, 67 (6), 2430–2448. <https://doi.org/10.1002/HEP.29693>.

(27) Gao, M.; Nettles, R. E.; Belema, M.; Snyder, L. B.; Nguyen, V. N.; Fridell, R. A.; Serrano-Wu, M. H.; Langley, D. R.; Sun, J. H.; O'Boyle, D. R.; Lemm, J. A.; Wang, C.; Knipe, J. O.; Chien, C.; Colonno, R. J.; Grasela, D. M.; Meanwell, N. A.; Hamann, L. G. Chemical Genetics Strategy Identifies



an HCV NS5A Inhibitor with a Potent Clinical Effect. *Nature* **2010**, 465 (7294), 96–100. <https://doi.org/10.1038/NATURE08960>.

(28) Everson, G. T.; Sims, K. D.; Rodriguez-Torres, M.; Hézode, C.; Lawitz, E.; Bourlière, M.; Loustaud-Ratti, V.; Rustgi, V.; Schwartz, H.; Tatum, H.; Marcellin, P.; Pol, S.; Thuluvath, P. J.; Eley, T.; Wang, X.; Huang, S. P.; McPhee, F.; Wind-Rotolo, M.; Chung, E.; Pasquinelli, C.; Grasela, D. M.; Gardiner, D. F. Efficacy of an Interferon- and Ribavirin-Free Regimen of Daclatasvir, Asunaprevir, and BMS-791325 in Treatment-Naive Patients with HCV Genotype 1 Infection. *Gastroenterology* **2014**, 146 (2), 420–429. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2013.10.057>.

(29) Zeuzem, S.; Ghalib, R.; Reddy, K. R.; Pockros, P. J.; Ari, Z. B.; Zhao, Y.; Brown, D. D.; Wan, S.; DiNubile, M. J.; Nguyen, B. Y.; Robertson, M. N.; Wahl, J.; Barr, E.; Butterton, J. R. Grazoprevir-Elbasvir Combination Therapy for Treatment-Naive Cirrhotic and Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1, 4, or 6 Infection: A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* **2015**, 163 (1), 1–13. <https://doi.org/10.7326/M15-0785>.

(30) Manns, M.; Samuel, D.; Gane, E. J.; Mutimer, D.; McCaughan, G.; Buti, M.; Prieto, M.; Calleja, J. L.; Peck-Radosavljevic, M.; Müllhaupt, B.; Agarwal, K.; Angus, P.; Yoshida, E. M.; Colombo, M.; Rizzetto, M.; Dvory-Sobol, H.; Denning, J.; Arterburn, S.; Pang, P. S.; Brainard, D.; McHutchison, J. G.; Dufour, J.-F.; Van Vlierberghe, H.; van Hoek, B.; Forn, X. Ledipasvir and Sofosbuvir plus Ribavirin in Patients with Genotype 1 or 4 Hepatitis C Virus Infection and Advanced Liver Disease: A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 2 Trial. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, 16 (6), 685–697. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00052-9).

(31) Zhou, N.; Hernandez, D.; Ueland, J.; Yang, X.; Yu, F.; Sims, K.; Yin, P. D.; McPhee, F. NS5A Sequence Heterogeneity and Mechanisms of Daclatasvir Resistance in Hepatitis C Virus Genotype 4 Infection. *J. Infect. Dis.* **2016**, 213 (2), 206. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIV379>.

(32) Feld, J. J.; Kowdley, K. V.; Coakley, E.; Sigal, S.; Nelson, D. R.; Crawford, D.; Weiland, O.; Aguilar, H.; Xiong, J.; Pilot-Matias, T.; DaSilva-Tillmann, B.; Larsen, L.; Podsadecki, T.; Bernstein, B. Treatment of HCV with ABT-450/r–Ombitasvir and Dasabuvir with Ribavirin. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370 (17), 1594–1603. [https://doi.org/10.1056/NEJMOA1315722/SUPPL\\_FILE/NEJMOA1315722\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA1315722/SUPPL_FILE/NEJMOA1315722_DISCLOSURES.PDF).

(33) Krishnan, P.; Tripathi, R.; Schnell, G.; Reisch, T.; Beyer, J.; Irvin, M.; Xie, W.; Larsen, L.; Cohen, D.; Podsadecki, T.; Pilot-Matias, T.; Collins, C. Resistance Analysis of Baseline and Treatment-Emergent Variants in Hepatitis C Virus Genotype 1 in the AVIATOR Study with Paritaprevir-Ritonavir, Ombitasvir, and Dasabuvir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59 (9), 5445. <https://doi.org/10.1128/AAC.00998-15>.

(34) Poordad, F.; Pol, S.; Asatryan, A.; Buti, M.; Shaw, D.; Hézode, C.; Felizarta, F.; Reindollar, R. W.; Gordon, S. C.; Pianko, S.; Fried, M. W.; Bernstein, D. E.; Gallant, J.; Lin, C. W.; Lei, Y.; Ng, T. I.; Krishnan, P.; Kopecky-Bromberg, S.; Kort, J.; Mensa, F. J. Glecaprevir/Pibrentasvir in Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1 or 4 and Past Direct-Acting Antiviral Treatment Failure. *Hepatology* **2018**, 67 (4), 1253–1260. <https://doi.org/10.1002/HEP.29671/SUPPINFO>.

(35) Feld, J. J.; Jacobson, I. M.; Hézode, C.; Asselah, T.; Ruane, P. J.; Gruener, N.; Abergel, A.; Mangia, A.; Lai, C.-L.; Chan, H. L. Y.; Mazzotta, F.; Moreno, C.; Yoshida, E.; Shafran, S. D.; Towner, W. J.; Tran, T. T.; McNally, J.; Osinusi, A.; Svarovskaia, E.; Zhu, Y.; Brainard, D. M.; McHutchison, J. G.; Agarwal, K.; Zeuzem, S. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6



Infection. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (27), 2599–2607. [https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512610/SUPPL\\_FILE/NEJMoa1512610\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512610/SUPPL_FILE/NEJMoa1512610_DISCLOSURES.PDF).

(36) Lawitz, E. J.; Dvory-Sobol, H.; Doehle, B. P.; Worth, A. S.; McNally, J.; Brainard, D. M.; Link, J. O.; Miller, M. D.; Mo, H. Clinical Resistance to Velpatasvir (GS-5816), a Novel Pan-Genotypic Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (9), 5368. <https://doi.org/10.1128/AAC.00763-16>.

(37) Korba, B. E.; Montero, A. B.; Farrar, K.; Gaye, K.; Mukerjee, S.; Ayers, M. S.; Rossignol, J.-F. Nitazoxanide, Tizoxanide and Other Thiazolides Are Potent Inhibitors of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Replication. *Antiviral Res.* **2008**, *77* (1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.08.005>.

(38) Rossignol, J. F.; Keeffe, E. B. Thiazolides: A New Class of Drugs for the Treatment of Chronic Hepatitis B and C. *Future Microbiol.* **2008**, *3* (5), 539–545. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.5.539>.

(39) Wang, X.-Y.; Chen, H.-S. Emerging Antivirals for the Treatment of Hepatitis B. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (24), 7707–7717. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7707>.

(40) Dubreuil, L.; Houcke, I.; Mouton, Y.; Rossignol, J. F. In Vitro Evaluation of Activities of Nitazoxanide and Tizoxanide against Anaerobes and Aerobic Organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40* (10), 2266–2270. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.10.2266>.

(41) Sood, S.; Maddiboyina, B.; Rawat, P.; Garg, A. K.; Foudah, A. I.; Alam, A.; Aldawsari, H. M.; Riadi, Y.; Singh, S.; Kesharwani, P. Enhancing the Solubility of Nitazoxanide with Solid Dispersions Technique: Formulation, Evaluation, and Cytotoxicity Study. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2020**, *32* (4), 477–487. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1844506>.

(42) Kumar, S.; Dilbaghi, N.; Saharan, R.; Bhanjana, G. Nanotechnology as Emerging Tool for Enhancing Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. **2012**. <https://doi.org/10.1007/s12668-012-0060-7>.

(43) J.F. Rossignol, R. C. Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-Benzamido Nitrothiazoles. *Chem Abstr* **1975**, *83*, 28216.

(44) Rajoli, R. K. R.; Pertinez, H.; Arshad, U.; Box, H.; Tatham, L.; Curley, P.; Neary, M.; Sharp, J.; Liptrott, N. J.; Valentijn, A.; David, C.; Rannard, S. P.; Aljayoussi, G.; Pennington, S. H.; Hill, A.; Boffito, M.; Ward, S. A.; Khoo, S. H.; Bray, P. G.; O'Neill, P. M.; Hong, W. D.; Biagini, G. A.; Owen, A. Dose Prediction for Repurposing Nitazoxanide in SARS-CoV-2 Treatment or Chemoprophylaxis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2021**, *87* (4), 2078–2088. <https://doi.org/10.1111/BCP.14619>.

(45) Zhao, Z.; Xue, F.; Zhang, L.; Zhang, K.; Fei, C.; Zheng, W.; Wang, X.; Wang, M.; Zhao, Z.; Meng, X. The Pharmacokinetics of Nitazoxanide Active Metabolite (Tizoxanide) in Goats and Its Protein Binding Ability in Vitro. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2010**, *33* (2), 147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01119.x>.

(46) Shakya, A.; Bhat, H. R.; Ghosh, S. K. Update on Nitazoxanide: A Multifunctional Chemotherapeutic Agent. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2018**, *15* (3), 201–213. <https://doi.org/10.2174/1570163814666170727130003>.

(47) Hoffman, P. S.; Sisson, G.; Croxen, M. A.; Welch, K.; Harman, W. D.; Cremades, N.; Morash, M. G. Antiparasitic Drug Nitazoxanide Inhibits the Pyruvate Oxidoreductases of *Helicobacter Pylori*,



Selected Anaerobic Bacteria and Parasites, and Campylobacter Jejuni. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51 (3), 868–876. <https://doi.org/10.1128/AAC.01159-06/ASSET/419479E7-E2CB-48A0-972B-DD0038DB2B58/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0030763570009.JPEG>.

(48) Zhao, F.; Xie, X.; Tan, X.; Yu, H.; Tian, M.; Lv, H.; Qin, C.; Qi, J.; Zhu, Q. The Functions of Hepatitis B Virus Encoding Proteins: Viral Persistence and Liver Pathogenesis. *Front. Immunol.* **2021**, 12, 3208. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.691766/BIBTEX>.

(49) Sekiba, K.; Otsuka, M.; Ohno, M.; Yamagami, M.; Kishikawa, T.; Suzuki, T.; Ishibashi, R.; Seimiya, T.; Tanaka, E.; Koike, K. Inhibition of HBV Transcription From cccDNA With Nitazoxanide by Targeting the HBx–DDB1 Interaction. *CMGH* **2019**, 7 (2), 297–312. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.010>.

(50) Scheel, T. K. H.; Rice, C. M. Understanding the Hepatitis C Virus Life Cycle Paves the Way for Highly Effective Therapies. *Nat. Med.* 2013 197 **2013**, 19 (7), 837–849. <https://doi.org/10.1038/nm.3248>.

(51) CNQFB. *Guía de Validación de Métodos Analíticos*; 2002.

(52) Batist, G.; Barton, J.; Chaikin, P.; Swenson, C.; Welles, L. Myocet (Liposome-Encapsulated Doxorubicin Citrate): A New Approach in Breast Cancer Therapy. <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.3.12.1739> **2005**, 3 (12), 1739–1751. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.12.1739>.

(53) Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Karydas, A. G.; Ithakissios, D. S. PLGA–mPEG Nanoparticles of Cisplatin: In Vitro Nanoparticle Degradation, in Vitro Drug Release and in Vivo Drug Residence in Blood Properties. *J. Controlled Release* **2002**, 79 (1–3), 123–135. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00530-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00530-2).

(54) Yunes, P.; Masoud, F.; Majid, M. Recent Advances on Liposomal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Biomedical Applications. *Nanomedicine, and Biotechnology* 45 (4), 788–799. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1282496>.

(55) WANG, Z.; DONG, J.; ZHAO, Q.; YING, Y.; ZHANG, L.; ZOU, J.; ZHAO, S.; WANG, J.; ZHAO, Y.; JIANG, S. Gold Nanoparticle-Mediated Delivery of Paclitaxel and Nucleic Acids for Cancer Therapy. *Mol. Med. Rep.* **2020**, 22 (6), 4475. <https://doi.org/10.3892/MMR.2020.11580>.

(56) Poostforooshan, J.; Belbekhouche, S.; Shaban, M.; Alphonse, V.; Habert, D.; Bousserhine, N.; Courty, J.; Weber, A. P. Aerosol-Assisted Synthesis of Tailor-Made Hollow Mesoporous Silica Microspheres for Controlled Release of Antibacterial and Anticancer Agents. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12 (6), 6885–6898. [https://doi.org/10.1021/ACSAMI.9B20510/SUPPL\\_FILE/AM9B20510\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACSAMI.9B20510/SUPPL_FILE/AM9B20510_SI_001.PDF).

(57) Liu, Z.; Chen, K.; Davis, C.; Sherlock, S.; Cao, Q.; Chen, X.; Dai, H. Drug Delivery with Carbon Nanotubes for In Vivo Cancer Treatment. *Cancer Res.* **2008**, 68 (16), 6652–6660. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1468>.

(58) Barone, P. W.; Baik, S.; Heller, D. A.; Strano, M. S. Near-Infrared Optical Sensors Based on Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nat. Mater.* 2004 41 **2004**, 4 (1), 86–92. <https://doi.org/10.1038/nmat1276>.



- (59) Mc Carthy, D. J.; Malhotra, M.; O'Mahony, A. M.; Cryan, J. F.; O'Driscoll, C. M. Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from in-Vitro Models towards Therapeutic Significance. *Pharm. Res.* **2015**, *32* (4), 1161–1185. <https://doi.org/10.1007/S11095-014-1545-6>.
- (60) Ruth J. Lancheros; José Ángel Beleño; Carlos Arturo Guerrero; Rubén Darío Godoy-Silva. Producción de Nanopartículas de PLGA Por El Método de Emulsión y Evaporación Para Encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Univ. Sci.* **2014**, *19* (2), 161–168.
- (61) Ghorbani, H.; Mehr, F.; Pazoki, H.; Rahmani, B. Synthesis of ZnO Nanoparticles by Precipitation Method. *Orient. J. Chem.* **2015**, *31* (2), 1219–1221. <https://doi.org/10.13005/ojc/310281>.
- (62) Kao, Y. Y.; Chiung, Y. M.; Chen, Y. C.; Cheng, T. J.; Liu, P. S. Zinc Oxide Nanoparticles Interfere With Zinc Ion Homeostasis to Cause Cytotoxicity. *Toxicol. Sci.* **2012**, *125* (2), 462–472. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFR319>.
- (63) Guerrero, S. E. P.; Benitez, R. B.; Villa, R. A. S.; Corredor, J. A. G. Síntesis de Nanopartículas de Óxido de Hierro Usando Extracto Acuoso de Eucalyptus Grandis. *DYNA* **2021**, *88* (216), 220–226. <https://doi.org/10.15446/dyna.v88n216.89031>.
- (64) Sagadevan, S.; Vennila, S.; Marlinda, A. R.; Al-Douri, Y.; Rafie Johan, M.; Anita Lett, J. Synthesis and Evaluation of the Structural, Optical, and Antibacterial Properties of Copper Oxide Nanoparticles. *Appl. Phys.* **2019**, *1258* **2019**, *125* (8), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S00339-019-2785-4>.
- (65) Tewes, F.; Munnier, E.; Antoon, B.; Ngaboni Okassa, L.; Cohen-Jonathan, S.; Marchais, H.; Douziech-Eyrolles, L.; Soucé, M.; Dubois, P.; Chourpa, I. Comparative Study of Doxorubicin-Loaded Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles Prepared by Single and Double Emulsion Methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66* (3), 488–492. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2007.02.016>.
- (66) de la Caridad Esquivel-Figueroa, R.; María Mas-Diego, S. Síntesis Biológica de Nanopartículas de Plata: Revisión Del Uso Potencial de La Especie Trichoderma Biological Synthesis of Silver Nanoparticles: Review of Potential Use of Trichoderma Species. *33* (2), 2224–5421.
- (67) Byrappa, K.; Ohara, S.; Adshiri, T. Nanoparticles Synthesis Using Supercritical Fluid Technology – towards Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (3), 299–327. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.09.001>.
- (68) Miranda-Guardiola, R. del C.; Carrillo-Pedraza, E. S.; Sosa-Blanco, C. A.; Bustos-Martinez, D.; Rodríguez-Cantu, M. E. Proceso de Obtención de Nanopartículas de Carbono Por Medio de Pirólisis de Biomasa Con Deposición Química de Vapor | CIETT UANL. <http://ciett.uanl.mx/index.php/portafolio/proceso-de-obtencion-de-nanopartículas-de-carbono-por-medio-de-pirólisis-de-biomasa-con-deposicion-quimica-de-vapor/> (accessed 2022-11-22).
- (69) Pérez-Tijerina, E.; Gracia Pinilla, M.; Mejía-Rosales, S.; Ortiz-Méndez, U.; Torres, A.; José-Yacamán, M. Highly Size-Controlled Synthesis of Au/Pd Nanoparticles by Inert-Gas Condensation. *Faraday Discuss* **2008**, *138*, 353–362. <https://doi.org/10.1039/B705913M>.
- (70) Eshel, G.; Levy, G. J.; Mingelgrin, U.; Singer, M. J. Critical Evaluation of the Use of Laser Diffraction for Particle-Size Distribution Analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2004**, *68* (3), 736–743. <https://doi.org/10.2136/SSSAJ2004.7360>.



- (71) Kippax, P. *Measuring Particle Size: Using Modern Laser Diffraction Techniques | PCI Magazine*. <https://www.pcimag.com/articles/82955-measuring-particle-size-using-modern-laser-diffraction-techniques> (accessed 2022-11-22).
- (72) Gómez-Gaete, C. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS. **2014**.
- (73) Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24* (12), 1113–1128. <https://doi.org/10.3109/03639049809108571>.
- (74) Mohamed, R. M.; Yusoh, K. A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL). *Adv. Mater. Res.* **2016**, *1134*, 249–255. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/AMR.1134.249>.
- (75) Paxton, N. C.; Ren, J.; Ainsworth, M. J.; Solanki, A. K.; Jones, J. R.; Allenby, M. C.; Stevens, M. M.; Woodruff, M. A. Rheological Characterization of Biomaterials Directs Additive Manufacturing of Strontium-Substituted Bioactive Glass/Polycaprolactone Microfibers. *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *40* (11), 1900019. <https://doi.org/10.1002/MARC.201900019>.
- (76) Leluk, K.; Sobczyk, K.; Borowczak, M. Polycaprolactone – New Insight into Classic Material. *E3S Web Conf.* **2018**, *44*, 00094. <https://doi.org/10.1051/E3SCONF/20184400094>.
- (77) Ramanujam, R.; Sundaram, B.; Janarthanan, G.; Devendran, E.; Venkadasalam, M.; John Milton, M. C. Biodegradable Polycaprolactone Nanoparticles Based Drug Delivery Systems: A Short Review. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* **2018**, *15* (3), 679–685. <https://doi.org/10.13005/BBRA/2676>.
- (78) Wang, Y.; Rodriguez-Perez, M. A.; Reis, R. L.; Mano, J. F. Thermal and Thermomechanical Behaviour of Polycaprolactone and Starch/Polycaprolactone Blends for Biomedical Applications. *Macromol. Mater. Eng.* **2005**, *290* (8), 792–801. <https://doi.org/10.1002/MAME.200500003>.
- (79) Park, G.-J. Design of Experiments. *Anal. Methods Des. Pract.* **2007**, 309–391. [https://doi.org/10.1007/978-1-84628-473-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-84628-473-1_6).
- (80) Politis, S. N.; Colombo, P.; Colombo, G.; Rekkas, D. M. Design of Experiments (DoE) in Pharmaceutical Development. <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672> **2017**, *43* (6), 889–901. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>.
- (81) R. Cavier, J. F. R. Etude de Diverses Associations d'anthelminthiques Chez La Souris. *Rev Méd Vét* **1982**, *133*, 779–783.
- (82) Rossignol, J. F. Nitazoxanide: A First-in-Class Broad-Spectrum Antiviral Agent. *Antiviral Res.* **2014**, *110*, 94–103. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2014.07.014>.
- (83) Rocco, P. R. M.; Silva, P. L.; Cruz, F. F.; Melo, M. A. C.; Tierno, P. F. G. M. M.; Moura, M. A.; de Oliveira, L. F. G.; Lima, C. C.; Dos Santos, E. A.; Junior, W. F.; Fernandes, A. P. S. M.; Franchini, K. G.; Magri, E.; de Moraes, N. F.; Gonçalves, J. M. J.; Carbonieri, M. N.; Dos Santos, I. S.; Paes, N. F.; Maciel, P. V. M.; Rocha, R. P.; de Carvalho, A. F.; Alves, P. A.; Proença-Módena, J. L.; Cordeiro, A. T.; Trivella, D. B. B.; Marques, R. E.; Luiz, R. R.; Pelosi, P.; e Silva, J. R. L. Early Use of Nitazoxanide in Mild COVID-19 Disease: Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Eur. Respir. J.* **2021**, *58* (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.03725-2020>.



- (84) Demetzos, C. Pharmaceutical Nanotechnology: Fundamentals and Practical Applications. *Pharm. Nanotechnol. Fundam. Pract. Appl.* **2016**, 1–203. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0791-0/COVER>.
- (85) Hasnain, M. S.; Ahmad, S. A.; Chaudhary, N.; Minhaj, M. A.; Nayak, A. K. Degradation and Failure of Dental Composite Materials. *Appl. Nanocomposite Mater. Dent.* **2019**, 107–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813742-0.00006-7>.
- (86) Tomalia, D. A.; Fréchet, J. M. J. Discovery of Dendrimers and Dendritic Polymers: A Brief Historical Perspective\*. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2002**, 40 (16), 2719–2728. <https://doi.org/10.1002/POLA.10301>.
- (87) Svenson, S. Clinical Translation of Nanomedicines. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2012**, 16 (6), 287–294. <https://doi.org/10.1016/J.COSSMS.2012.10.001>.
- (88) Maubert, M.; Soto, L.; León, A. M.; Flores, J. NANOTUBOS DE CARBONO-LA ERA DE LA NANOTECNOLOGÍA.
- (89) Barenholz, Y. Doxil® — The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned. *J. Controlled Release* **2012**, 160 (2), 117–134. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.03.020>.
- (90) Hong, S.; Choi, D. W.; Kim, H. N.; Park, C. G.; Lee, W.; Park, H. H. Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharm. 2020 Vol 12 Page 604* **2020**, 12 (7), 604. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12070604>.
- (91) İnal, T. G.; Gürsoy, R. N.; Oner, L. Nanocrystal Technology For Oral Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs Nanocrystal Technology View Project.
- (92) Thirivikraman, G.; Athirasala, A.; Twohig, C.; Boda, S. K.; Bertassoni, L. E. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dent. Clin.* **2017**, 61 (4), 835–856. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2017.06.003>.
- (93) Miele, E.; Spinelli, G. P.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S. Albumin-Bound Formulation of Paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the Treatment of Breast Cancer. *Int. J. Nanomedicine* **2009**, 4 (1), 99–105. <https://doi.org/10.2147/IJN.S3061>.
- (94) Wang, Y. X. J. Current Status of Superparamagnetic Iron Oxide Contrast Agents for Liver Magnetic Resonance Imaging. *World J. Gastroenterol.* **2015**, 21 (47), 13400. <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I47.13400>.
- (95) Etheridge, M. L.; Campbell, S. A.; Erdman, A. G.; Haynes, C. L.; Wolf, S. M.; McCullough, J. THE BIG PICTURE ON SMALL MEDICINE: THE STATE OF NANOMEDICINE PRODUCTS APPROVED FOR USE OR IN CLINICAL TRIALS. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, 9 (1), 1. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2012.05.013>.
- (96) Keeffe, E. B.; Rossignol, J. F. Treatment of Chronic Viral Hepatitis with Nitazoxanide and Second Generation Thiazolides. *World J. Gastroenterol. WJG* **2009**, 15 (15), 1805. <https://doi.org/10.3748/WJG.15.1805>.
- (97) Rossignol, J.-F. O.; Stachulski, A. V. Syntheses and Antibacterial Activities of Tizoxanide, an N-(Nitrothiazolyl)Salicylamide, and Its O-Aryl Glucuronide6. **1999**.



- (98) CNQFB. *Guía de Validación de Métodos Analíticos*; 2002.
- (99) Santa Cruz, B. FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD NITAZOXANIDA, 2017. <https://datasheets.scbt.com/sds/eghs/es/sc-212397.pdf>.
- (100) Abbasalipourkabar, R.; Fallah, M.; Sedighi, F.; Maghsood, A. H.; Javid, S. Nanocapsulation of Nitazoxanide in Solid Lipid Nanoparticles as a New Drug Delivery System and in Vitro Release Study. *J. Biol. Sci.* **2016**, 16 (4), 120–127. <https://doi.org/10.3923/jbs.2016.120.127>.
- (101) Leitner, J.; Jurik, S. DSC Study and Thermodynamic Modelling of the System Paracetamol–o-Acetylsalicylic Acid. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2017**, 130 (3), 1735–1740. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6404-3>.
- (102) Zapata, D. A. Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad del medio ambiente. **2012**.
- (103) QUIMIPUR. FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD ALCOHOL POLIVINILICO, 2016. <https://quimipur.com/pdf/alcohol-polivinilico-rev-5.pdf>.
- (104) Roth. FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD D-MANITOL, 2022. <https://www.carlroth.com/medias/SDB-8883-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyMzQ4MTJ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oZGMvaDY4LzkwNjEwNjYwMTQ3NTAucGRmfDQ5MjMyNDk2NTQxNDFIN2VjYzQwM2JjMmQ3MTVvKMTczM2I3OTI2NDNhNmUyY2JIMTk1OTgyOWIwN0DcxNjZjZTQ>.
- (105) Schawe J; R. Riesen; J. Widmann; M. Schubnell. Interpreting DSC Curves Part 1: Dynamic Measurements. [https://www.eng.uc.edu/~beaucag/Classes/Characterization/DSCParts/Artifacts%20in%20DSC%20Usercom\\_11.pdf](https://www.eng.uc.edu/~beaucag/Classes/Characterization/DSCParts/Artifacts%20in%20DSC%20Usercom_11.pdf).
- (106) DASH, S.; PADALA NARASIMHA MURTHY; LILAKANTA NATH; PRASANTA CHOWDHURY. KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *ACP* 67 (3), 217–223.

## 13. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de linealidad (áreas)									
Concentración (µg/mL)	Áreas						Promedio	DE	CV
	Día 1			Día 2					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0.5	244926	245644	245494	246888	246687	244526	245694.2	938.9604	0.38
1	448041	452140	453435	460171	455014	447220	452670.2	4769.813	1.05
5	2382678	2363766	2356749	2369827	2357215	2324350	2359098	19541.78	0.83
10	4656215	4634292	4631813	4621593	4618430	4556129	4619745	33880.53	0.73
15	6957357	6940981	6937834	6898799	6875942	6696577	6884582	96887.02	1.40
20	9482584	9413673	9532462	9317059	9311050	9136150	9365496	142701.3	1.52
<b>Pendiente (m)</b>	470826.4	467941.7	472304.4	463141.2	462708.4	452871.6			
<b>Ordenada al origen (b)</b>	-12626.6	-8083.31	-27648.6	10427.52	5809.192	13677.41			
<b>Coefficiente de correlación lineal (R)</b>	0.999865	0.999913	0.999759	0.999941	0.999928	0.999849			
<b>Coefficiente de determinación (R<sup>2</sup>)</b>	0.999729	0.999827	0.999519	0.999881	0.999857	0.999699			

Anexo 2. Resultados del primer perfil de liberación de las formulaciones del diseño experimental					
Tiempo (h)	TZX (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)
0.5	7.59	7.12	7.51	8.30	9.69
1	7.70	9.29	11.47	13.89	16.29
1.5	8.39	14.00	16.22	24.37	25.57
2	9.50	18.35	20.64	28.96	31.90
4	15.11	27.79	28.80	37.82	42.17
8	21.87	41.18	39.98	57.79	61.45
10	23.88	48.71	46.67	62.56	67.29
12	25.26	51.36	52.67	68.23	72.43
14	26.77	53.30	55.99	71.44	74.24
24	31.25	62.38	59.97	75.57	76.39

Anexo 3. Resultados del segundo perfil de liberación de las formulaciones del diseño experimental					
Tiempo (h)	TZX (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)
0.5	4.96	6.37	6.74	6.81	8.12
1	5.16	9.36	8.64	8.46	13.95
1.5	6.74	13.42	14.32	17.81	19.58
2	7.71	19.51	17.77	19.51	23.79
4	12.46	26.37	29.51	31.19	33.75
8	14.97	40.36	40.27	44.92	47.37
10	16.75	48.16	44.49	50.04	53.19
12	17.86	51.26	49.12	54.96	59.54
14	20.54	51.75	52.51	58.47	60.69
24	24.74	55.87	56.78	66.55	71.05

Anexo 4. Resultados del perfil de liberación de las formulaciones optimizadas				
Tiempo (h)	TZX (%)	F OPT 1 (%)	F OPT 2 (%)	F OPT 3 (%)
0.5	6.20	8.16	8.35	9.57
1	6.57	14.86	17.68	16.43
1.5	7.11	21.39	26.86	25.87
2	7.54	26.67	32.11	31.85
4	13.37	39.85	42.91	43.39
8	17.33	55.37	62.33	61.71
10	19.80	63.42	68.58	67.58
12	20.56	68.53	73.53	72.14
14	20.98	70.97	75.96	74.61
24	25.11	76.12	80.54	80.57




F-07824

**El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos  
México, A. C.**

**y la Universidad Internacional de las Américas, San José, Costa Rica**

Otorgan la presente

## CONSTANCIA



a: **Erick Humberto Salgado Bahena, Samaria Cortes Núñez, Rosaura Jiménez Vásquez, Adriana Valladares Méndez, Julio Cesar Rivera Leyva, Jesús Rivera Islas.**

Por su participación como **PONENTES** del trabajo titulado:  
**“Desarrollo y validación de un método de cuantificación de tizoxanida por HPLC/UV-VIS”**

en el **XXX Congreso de Educación Químico Farmacéutica Biológica**  
**y a la XXVI Reunión de Estudiantes de Farmacia,**  
realizado los días 22 al 25 de marzo de 2022.

Ciudad de México, a 25 de marzo de 2022

  
**Dr. Ricardo Sancho Calvo**  
Director de Farmacia de la UIA.

  
**DAR Juan José Díaz Esquivel**  
Presidente Comisión de Educación del CNQFBM, A.C.

  
**DESS Rodolfo Cruz Rodríguez**  
Presidente Comisión de Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia del CNQFBM, A.C.

  
**QFB María Catalina Díaz Gutiérrez**  
Presidente Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.

CRC's = Créditos para el Refrendo de la Certificación (0.6 Crc's por hora de capacitación), avalado por la Subcomisión de Educación Continua del COMECEP. Registro de Idoneidad DGP-SEP: SEP/DGP/CP089/17.

NOTA: Para ser válida en términos de certificación, esta constancia deberá estar impresa, contar con el sello del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. y cuando menos, una firma autógrafa.