



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE
UN NANOSISTEMA POLIMÉRICO DE
NITAZOXANIDA CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTIVIRAL”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

QFB. SAMARIA CORTEZ NUÑEZ

CO-DIRECTORES DE TESIS:

Dra. ADRIANA VALLADARES MÉNDEZ

Dr. JESÚS RIVERA ISLAS

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2023

La realización del presente trabajo de tesis de maestría contó con financiamientos otorgados por el CONACYT, a través de una beca de posgrado con No. 792615 y del proyecto Ciencia de Frontera 2019 No. 1046617. Su desarrollo se llevó a cabo en el Laboratorio 4 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. Jesús Rivera Islas, la Dra. Adriana Valladares Méndez y con la asesoría del Dr. Julio César Rivera Leyva.



*Sigue tu voz en mí, el último abrazo me acompaña en los días malos,
como esas mariposas que me persiguen al caminar;
no es necesario decirte adiós, vives por siempre en mí.*

En memoria de Nahum y Pompoza



DEDICATORIAS

A Dios y a la Virgen de Guadalupe, por darme la fuerza y ser mi refugio, por darme pruebas que creí no superar, por nunca soltar mi mano. Por ser la guía y la luz de mi camino.

A dos personas que amaba y no lograron ver la culminación de este sueño; sin embargo, fueron y siguen siendo pilares importantes en mi vida, mi papá Nahum y mi hermosa abuelita Pompo. Aprendí tanto de ustedes, a esforzarme cada día, a ser gentil, honesta, a levantarme todos los días con una buena actitud a pesar de todo, a que la familia era demasiado importante y lo primero en todo, les agradezco por formar parte de mi vida y ayudarme a crecer de una manera feliz y sana. Los amo tanto, y creo que se los debí haber dicho más, ahora solo me queda seguir esforzándome todos los días por honrar todo eso bueno que me dejaron y me enseñaron. Gracias por su vida y su amor.

A la persona que me motiva a ser mejor cada día, la mujer que me brinda su amor y me acompaña, mi mamá. Tengo tanto que agradecerle que no terminaría de escribir, gracias por tu amor, por cada regaño y cada consejo, por todas las llamadas y mensajes para sentirnos cerquita a pesar de tantos kilómetros de distancia, por comprenderme a pesar de no pensar igual, aquí sigues apoyándome en cada locura y sueño que tengo, porque sé que si te digo que me iré al fin del mundo estarás ahí conmigo. Gracias por tu sonrisa, es mi favorita, quiero muchas cosas, pero lo principal es estar juntas siempre. Gracias porque a pesar de todos tus sufrimientos y adversidades, estabas siempre firme y fuerte como un roble que me da sombra en días soleados, como un refugio en la tempestad, gracias por esos abrazos tan cálidos que siempre necesito después de un largo tiempo sin vernos, por escucharme, por nunca rendirte y por crecer juntas. Eres una gran amiga y la mejor mamá, te amo, te admiro y todo lo que soy es por ti mi shosito hermoso.

A mis tíos: Elías, Juan y Tacho, por ser unos grandes amigos, hermanos y padres, por estar a mi lado, cuidarme, apoyarme, guiarme y sobretodo quererme. Por todas las aventuras juntos, por su apoyo durante este proceso y a lo largo de mi vida. A mi tío Robe, por nunca dejarnos solos. A mis tías; Mary, por su apoyo, oraciones y cariño. A Judith, otra madre para mí, por todo tu amor, tus cuidados, esas comidas en mis días pesados, nuestras largas pláticas y todo lo que hemos vivido juntas, esto también es tuyo.

A mis niños, Madai, Elian, Lila y Tachito, son la esperanza del mundo y de nuestra familia.

A dos personas especiales que me han apoyado y también cuidado, Javis y Yuli, mis tíos de corazón.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la confianza y el apoyo brindado con la beca N° 792615.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por albergarme durante estos dos años, por el orgullo de pertenecer a una gran institución.

A la Facultad de Farmacia por la oportunidad de desarrollarme como profesionista, por el uso de sus instalaciones, por los dos años que fue mi casa y por tan bonita experiencia.

A mis directores de tesis, el Dr. Jesús Rivera Islas, por su amistad y todo su apoyo, por los cafés, por las pláticas, por esas revisiones extensas que me ayudaron tanto, por su confianza y paciencia. A la Dra. Adriana Valladares Méndez por abrirme las puertas del laboratorio, por estar siempre pendiente del proceso, por su orientación y amistad.

Un agradecimiento especial al Dr. Julio Cesar Rivera Leyva, por ser parte fundamental de este proyecto, por toda su paciencia, por compartirme todos sus conocimientos, por el soporte, por la confianza y por su amistad.

A mis revisores de tesis, el Dr. Sergio Alcalá Alcalá, la Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, la Dra. Luz María Melgoza Contreras, la Dra. Mariana Ortiz Reynoso y la Dra. Adriana Valladares Méndez, por su tiempo y por todas las contribuciones realizadas para la mejora de mi trabajo.

A la bióloga Patricia Rueda del IBT por su apoyo técnico para la realización de mi metodología, por su amistad y consejos.

A mis amigos del Laboratorio 4, Dianita, Rosaura, Erick y Luna, por esas pláticas, por los buenos momentos compartidos, por hacer más amena esta experiencia.

Y muy en especial a mi familia, mi hermosa mamá, a mis tíos, tías y por aquellos que ya no están, mi papá Nahum, mi tío Noé, mis abuelos tacho y mi pompito, por cuidarme, por siempre quererme y apoyarme en cada descabellado sueño que tengo, los amo.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XII
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Hepatitis virales.....	3
2.1.1. Epidemiología de las hepatitis virales en México.....	3
2.2. Virus de la Hepatitis B.....	4
2.2.1. Hepatitis B.....	6
2.2.2. Prevalencia de la enfermedad en México.....	7
2.2.3. Tratamiento para hepatitis B.....	7
2.3. Virus de la Hepatitis C	8
2.3.1. Hepatitis C	11
2.3.2. Prevalencia en México.....	12
2.3.3. Tratamiento para hepatitis C	12
2.4. Nitazoxanida: Antecedentes y generalidades.....	15
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas de Nitazoxanida.....	16
2.4.2. Farmacocinética de Nitazoxanida.....	16
2.5. Actividad antiviral de Nitazoxanida	18
2.5.1. Nitazoxanida y el Virus de la Hepatitis B	18
2.5.2. Nitazoxanida y el Virus de la Hepatitis C.....	19
2.6. Biodisponibilidad oral y los factores implicados.....	21
2.6.1. Implicaciones de la solubilidad acuosa en los fármacos.....	21
2.6.2. Permeabilidad intestinal de los fármacos	23
2.7. Sistemas de liberación de fármacos basados en nanotecnología.....	25
2.8. Nanopartículas poliméricas.....	27
2.8.1. Nanopartículas poliméricas en el tratamiento de infecciones antivirales	28
2.8.2. Materiales poliméricos utilizados para la preparación de las PNPs.....	29



2.9.	Técnicas para elaborar sistemas de liberación de fármacos basados en PNPs .	30
2.10.	Caracterización de las PNPs	33
2.10.1.	Caracterización física y morfológica	34
2.10.2.	Características químicas y estructurales de las PNPs	35
2.10.3.	Carga de fármaco y eficiencia de encapsulación en las PNPs.....	37
2.11.	Liberación de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas.....	38
2.11.1.	Evaluación <i>in vitro</i> de la liberación de fármacos	39
2.12.	Permeabilidad de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas.....	39
2.12.1.	Evaluación de la permeabilidad intestinal por modelos tisulares <i>ex vivo</i>	41
3.	JUSTIFICACIÓN	42
4.	HIPÓTESIS	43
5.	OBJETIVOS	44
5.1.	Objetivo general.....	44
5.2.	Objetivos específicos	44
6.	EQUIPOS Y MATERIALES	45
6.1.	Materia prima	45
6.2.	Reactivos y material utilizado	45
6.3.	Equipos	46
6.4.	Software.....	46
7.	METODOLOGÍA	47
7.1.	Desarrollo del método analítico para la cuantificación de Nitazoxanida.....	47
7.1.1.	Preparación de soluciones.....	47
7.1.2.	Curva de cuantificación	48
7.1.3.	Longitud de onda de máxima absorción.....	48
7.1.4.	Condiciones cromatográficas para el desarrollo del método de cuantificación....	48
7.1.5.	Validación del método de cuantificación para Nitazoxanida	49
7.1.6.	Linealidad.....	49
7.1.7.	Precisión	50
7.1.8.	Exactitud	50
7.1.9.	Límite de detección y límite de cuantificación.....	51
7.1.10.	Selectividad/especificidad	51
7.2.	Selección de materias primas para la formulación de PNPs.....	52
7.3.	Diseño experimental para la preparación de PNPs optimizadas.....	52

7.4.	Preparación de las nanopartículas poliméricas	53
7.5.	Caracterización de las nanopartículas	54
7.5.1.	Tamaño de partícula e índice de polidispersión	54
7.5.2.	Potencia zeta.....	54
7.5.3.	Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga.....	54
7.5.4.	Espectroscopía Infrarroja	55
7.5.5.	Difracción de Rayos X de Polvos.....	55
7.5.6.	Calorimetría diferencial de barrido.....	55
7.6.	Estudio de liberación <i>in vitro</i>	55
7.7.	Estudio de permeabilidad.....	57
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
8.1.	Desarrollo del método analítico para la cuantificación de Nitazoxanida.....	59
8.1.1.	Determinación de la longitud de onda de máxima absorción.....	59
8.1.2.	Validación del método de cuantificación de NTZ	60
8.1.3.	Selectividad/especificidad	61
8.2.	Selección de materiales	62
8.3.	Caracterización y evaluación de las nanopartículas poliméricas por DoE.....	63
8.3.1.	Primer DoE	63
8.4.	Desarrollo, caracterización y evaluación de las PNPs del segundo DoE.....	67
8.4.1.	Caracterización física del segundo DoE	67
8.5.	Optimización del nanosistema polimérico de NTZ.....	71
8.6.	Caracterización fisicoquímica de las PNPs-NTZ optimizadas	73
8.6.1.	Espectroscopía Infrarrojo	73
8.6.2.	Difracción de rayos X de polvos.....	74
8.6.3.	Calorimetría diferencial de barrido.....	75
8.7.	Evaluación <i>in vitro</i> del perfil de liberación de las PNPs-NTZ optimizadas.....	76
8.7.1.	Evaluación <i>ex vivo</i> de las cinéticas de permeabilidad de las PNPs-NTZ optimizadas y de NTZ.....	77
9.	CONCLUSIONES	79
10.	PERSPECTIVAS	79
11.	REFERENCIAS	80
12.	ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del VHB ²³ -----4

Figura 2. Ciclo de replicación viral del VHB ²³ -----5

Figura 3. Estructura del VHC ³⁸ -----9

Figura 4. Ciclo de replicación del VHC ⁴¹ -----10

Figura 5. Estructura química de Nitazoxanida -----15

Figura 6. Proceso de hidrólisis por esterasas plasmáticas de Nitazoxanida a Tizoxanida (2-hidroxi-N-(5-nitrotiazol-2-il) benzamida).-----17

Figura 7. Metabolismo de nitazoxanida, tomada y adaptada de la referencia ⁶⁰ -----17

Figura 8. Mecanismo de NTZ contra VHB propuesto por Sekiba *et al* ⁸⁰ -----19

Figura 9. Mecanismo de NTZ contra VHC propuesto por Elazar *et al* ⁸³ -----20

Figura 10. Proceso de administración de un fármaco por vía oral y los factores que intervienen en su biodisponibilidad ⁹⁰ -----22

Figura 11. Sistema de clasificación biofarmacéutica -----23

Figura 12. Tránsito del fármaco a través del tracto gastrointestinal-----24

Figura 13. Nanoestructuras poliméricas, lipídicas e inorgánicas como sistemas de liberación de fármacos ¹⁰³ -----26

Figura 14. Estructuras de las nanopartículas poliméricas: nanocápsulas y nanoesferas ¹⁰⁵ -----27

Figura 15. Técnica de dispersión dinámica de la luz analizando tamaño de partícula por intensidad. -----34

Figura 16. Estado sólido de los fármacos -----36

Figura 17. Mecanismos de liberación de fármacos de las PNPs: (A) difusión a través de poros llenos de agua, (B) difusión a través de la matriz polimérica, (C) bomba osmótica, y (D) erosión ¹⁵⁴ -----38

Figura 18. Permeabilidad de las PNPs; a). placa de Peyer ileal y b). Tipos de transporte de las PNPs por los enterocitos: 1. Endocitosis dependiente de clatrina, 2. Endocitosis mediada por caveola, 3. Endocitosis independiente de clatrina y caveola, 4. Difusión pasiva, 5. Transporte paracelular, 6. Micropinositosis y 7. Fagocitosis. ¹⁵⁹ -----40

Figura 19. Representación de estudio de permeabilidad *ex vivo* con celdas de Franz (a) usando una membrana de intestino delgado (b). ¹⁶² -----41

Figura 20. Liberación *in vitro* de NTZ y PNPs-NTZ: A. Bolsas de diálisis con fármaco colocadas en el medio de liberación (buffer de fosfatos pH 6.8) y B. Sistema utilizado para el estudio de liberación *in vitro*. -----56

Figura 21. Estudio de permeabilidad *ex vivo*: A. Intestino delgado de cerdo, B. Cortes del intestino para utilizar en el estudio, C. Membrana de intestino de cerdo colocada en el compartimento receptor de la celda de Franz, D. Celda de Franz con membrana de intestino de cerdo cerrada herméticamente y E. Sistema utilizado en el estudio de permeabilidad. -----58

Figura 22. Espectro de absorción en UV-Visible de NTZ-----59

Figura 23. Serie de cromatogramas de los diferentes componentes de la formulación, NTZ y de nanopartículas cargadas con NTZ.-----62

Figura 24. Muestra de formulación optimizada de PNPs-NTZ (lote 4) posteriores a la liofilización 72



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos para hepatitis B	7
Tabla 2. Recomendaciones de tratamientos para hepatitis C crónica según el genotipo	14
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de nitazoxanida ⁷¹	16
Tabla 4. Nanosistemas poliméricos para los tratamientos de infecciones virales.....	28
Tabla 5. Técnicas para la preparación de nanopartículas poliméricas	31
Tabla 6. Técnicas para la caracterización de nanopartículas poliméricas.....	33
Tabla 7. Curva de cuantificación en el rango de 0.1-2 µg/mL.....	48
Tabla 8. Condiciones para el método de cuantificación de NTZ	49
Tabla 9. Concentraciones en nivel bajo, medio y alto para determinar precisión y exactitud	50
Tabla 10. Factores, niveles y respuestas establecidas para el diseño experimental	52
Tabla 11. Matriz del diseño experimental para la optimización de las nanopartículas.....	52
Tabla 12. Resultados de la evaluación de los parámetros de desempeño para la validación del método de cuantificación de NTZ por HPLC.	60
Tabla 13. Resultados de la caracterización física de las PNPs-NTZ de acuerdo con el primer DoE (n=2)	63
Tabla 14. Matriz del segundo DoE para la optimización de las PNPs-NTZ.....	67
Tabla 15. Resultados de la caracterización física de las PNPs-NTZ de acuerdo con el segundo DoE (n=2)	67
Tabla 16. Valores determinados para la optimización de las PNPs-NTZ.....	71
Tabla 17. Resultados de la caracterización física de las PNPs-NTZ optimizadas (n=3)	72
Tabla 18. Comparación del promedio de la permeabilidad aparente entre PNPs-NTZ y NTZ en solución	78
Tabla 19. Solubilidad en fracción molar de nitazoxanida en diferentes disolventes ¹⁶⁸	90
Tabla 20. Resultados del día 1 de linealidad	90
Tabla 21. Estadística de la regresión del día 1 de linealidad.....	91
Tabla 22. ANOVA de los datos del día 1 de la linealidad.....	91
Tabla 23. Resultados del día 2 de linealidad	92
Tabla 24. Estadística de la regresión lineal del día 2 de linealidad	93
Tabla 25. ANOVA de los datos del día 2 de linealidad	93
Tabla 26. Resultados de la precisión	94
Tabla 27. Resultados de la exactitud.....	94
Tabla 28. Límite de detección y cuantificación del método para cuantificar NTZ.....	95
Tabla 29. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales	96



ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curvas de calibración representativas de 2 días de evaluación de linealidad (r=3)	61
Gráfica 2. Diagrama de Pareto del tamaño de partícula	64
Gráfica 3. Diagrama de Pareto de la capacidad de carga de fármaco	64
Gráfica 4. Contorno de superficie de respuesta para el tamaño de partícula del 1er DoE	65
Gráfica 5. Contorno de superficie de respuesta para la capacidad de partícula del 1er DoE.....	65
Gráfica 6. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de las PNP-NTZ del 1er DoE (n=2)	66
Gráfica 7. Diagrama de Pareto del tamaño de partícula del segundo DoE.....	68
Gráfica 8. Diagrama de Pareto de la capacidad de carga del segundo DoE.....	68
Gráfica 9. Contorno de superficie de respuesta para el tamaño de partícula de las PNP-NTZ del 2do DoE	69
Gráfica 10. Contorno de superficie de respuesta para la capacidad de carga de las PNP-NTZ del 2do DoE	69
Gráfica 11. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de las PNP-NTZ bajo el 2do DoE (n=2)	70
Gráfica 12. Deseabilidad del diseño experimental (56.3%)	71
Gráfica 13. Espectros de IR de las materias primas y de la formulación de las PNP-NTZ	73
Gráfica 14. Difractogramas de las materias primas y de la formulación de PNP-NTZ.....	74
Gráfica 15. Termograma de las materias primas y de la formulación de PNP-NTZ.....	75
Gráfica 16. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de lotes optimizados de PNP-NTZ (n=3).....	76
Gráfica 17. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de las PNP-NTZ optimizadas (n=4)	77
Gráfica 18. Perfiles de permeabilidad de PNP-NTZ y NTZ en suspensión, media \pm DE (n=2).....	78
Gráfica 19. Curvas de calibración del día 2 para la evaluación de la linealidad (r=3)	92

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
ACN	Acetonitrilo
ADNccc	ADN circular covalentemente cerrado
ADNr	ADN circular relajado
ADV	Adefovir dipivoxil
AFM	Microscopía de fuerza atómica (siglas en inglés)
ALT	Alanino aminotrasferasa
ARNpg	ARN pregenómico
ARNt	ARN de transferencia
b	Intercepto
CC	Capacidad de carga
cm/s	Centímetro/segundo
C _{max}	Concentración máxima
CNQFBM	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos México, A.C.
CoV	Coronavirus
CV	Coefficiente de variación
DDB1	Proteína de unión al ADN específica de daños 1
DDS	Sistema de liberación de fármacos (siglas en inglés)
DE	Desviación estándar
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DoE	Diseño experimental
DRXP	Difracción de rayos X de polvos
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (siglas en inglés)
EE	Eficiencia de encapsulación
eIF2α	Factor de iniciación eucariótico 2α (siglas en inglés)
eIF2β	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (siglas en inglés)
ETV	Entecavir
FDA	Administración de alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (siglas en inglés)
GDP	Guanosin difosfato
GTP	Guanosin trifosfato
h	Hora
HB	Hepatitis por VHB
HBC	Hepatitis B Crónica
HBcAg	Antígeno del núcleo
HBeAg	Antígeno e
HBsAg	Antígeno de superficie
HBx	Proteína reguladora del VHB (siglas en inglés)
HC	Hepatitis por VHC
HCC	Hepatitis C Crónica
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (siglas en inglés)
IC	Intervalo de confianza
IFN α	Interferón alfa
IMC	Índice de masa corporal
IR	Espectroscopía Infrarroja (siglas en inglés)
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma (siglas en inglés)
Kb	Kilo base
LAM	Lamivudina
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
m	Pendiente
MeOH	Metanol
MERS	Síndrome respiratorio de Oriente medio (siglas en inglés)
Met-ARNt	Iniciador de metionina (siglas en inglés)

mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
MUI	Millones de unidades internacionales
mV	Milivoltios
NAs	Análogos de nucleótidos (siglas en inglés)
nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas
NTZ	Nitazoxanida
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Único marco de lectura abierto (siglas en inglés)
PCL	Policaprolactona
PCLA	Policaprolactona-co-ácido láctico
PDI	índice de polidispersión (siglas en inglés)
PEG	Poli(etilenglicol)
PEG-IFN-α	Interferón alfa pegilado
PEO-PPO	Propileno
pH	Potencial de hidrogeno
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil
PKR	Proteína quinasa dependiente del ARN de doble cadena
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólido
PNPs	Nanopartículas poliméricas
PO	Vía oral
PVA	Alcohol polivinílico
PZ	Potencial zeta
r	Coefficiente de correlación
r²	Coefficiente de determinación
RBV	Ribavirina
rpm	Revoluciones por minuto
RVR	Respuesta virológica rápida
RVS	Respuesta virológica sostenida
SARS	Síndrome respiratorio agudo grave (siglas en inglés)
SC	Subcutánea
SCB	Sistema de clasificación biofarmacéutica
SEM	Microscopía electrónica de barrido (siglas en inglés)
Ser51	Serina en la posición 51
Smc5/6	Complejo de cromosomas 5/6
SSA	Secretaría de salud de México
SUIVE	Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica
TBV	Telbivudina
TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
TEM	Microscopía electrónica de transmitancia (siglas en inglés)
TGI	Tracto gastrointestinal
TZX	Tizoxanida
USP	Farmacopea de los Estados Unidos (siglas en inglés)
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHE	Virus de la hepatitis E
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

La Nitazoxanida (NTZ), una tiazolida antiinfecciosa de amplio espectro utilizada para tratar infecciones parasitarias. En los últimos años, se ha descubierto que NTZ también muestra actividad contra múltiples virus, incluyendo el virus de la hepatitis B y C. Sin embargo, su eficacia terapéutica se ve comprometida debido a su baja solubilidad acuosa, lo que limita su biodisponibilidad para la administración oral.

Para abordar esta problemática ha cobrado gran auge el empleo de nanopartículas poliméricas (PNPs), que son sistemas de liberación de fármacos capaces de aumentar su biodisponibilidad oral. Estos sistemas son elaborados con polímeros biocompatibles y pueden cargar fármacos hidrofóbicos como la NTZ, lo cual mejoraría sus propiedades biofarmacéuticas.

En el presente estudio, se desarrollaron PNP's cargadas con NTZ, para su elaboración se siguió el método de emulsión simple/evaporación de disolvente. Para establecer condiciones de formulación se utilizó un diseño experimental (DoE) 2^2 , utilizando como factores la concentración del polímero (policaprolactona, PCL) y del estabilizante (alcohol polivinílico, PVA), como respuestas se utilizaron al tamaño de partícula (≤ 500 nm), el índice de polidispersión (PDI), la eficiencia de encapsulación (%EE), la capacidad de carga (%CC).

Se realizó un análisis estadístico a través del software *Statgraphics Centurion XVI*, obteniendo los siguientes valores de optimización: 30 mg de PCL y 1.5 % de PVA. Los lotes optimizados se caracterizaron, se evaluaron sus perfiles de liberación *in vitro* utilizando un buffer de fosfatos a pH 6.8 simulando condiciones intestinales y se evaluó su capacidad de permeabilidad utilizando un modelo *ex vivo* de intestino de cerdo. Para la cuantificación de las muestras de los diversos estudios se desarrolló y validó un método de cuantificación para NTZ por medio de HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), obteniendo un método analítico lineal ($r^2= 0.9993$), preciso (CV=0.47 %), exacto y específico para cuantificar NTZ. Así mismo, se realizó la evaluación del estado cristalino de NTZ y de las PNP's-NTZ por calorimetría diferencia del barrido (DSC) y difracción de rayos x de polvos (DRXP), se verificó la interacción entre los componentes de la formulación y de NTZ por infrarrojo (IR).

Obteniendo los siguientes resultados para la formulación optimizada de PNP-NTZ, un tamaño de partícula promedio de 360 ± 18 nm, un PDI de 0.171 ± 0.01 , un potencial zeta de -10 ± 1.2 mV, un %CC de 1 ± 0.2 % y un %EE del 96 ± 2.2 %. La caracterización física por DCS y DRXP, mostró que la NTZ al ser incorporada a las PNP, se encuentra en estado amorfo debido a que no se observa la señal característica de NTZ en el termograma o en el difractograma que corresponde al de las PNP-NTZ. Mientras que los estudios de IR confirmaron que no hay una interacción significativa entre los componentes de la formulación y NTZ, también se pudo determinar que NTZ se encontraba disperso en las PNP, debido a que se identificó su señal correspondiente dentro del espectro de las PNP-NTZ. Por otra parte, los perfiles de liberación de NTZ desde las PNP mostraron una liberación constante del 25 % del fármaco a las 72 h, mientras que la NTZ sin PNP sólo liberó el 5 % del fármaco en el mismo tiempo. En cuanto a la permeabilidad, se demostró que las moléculas de NTZ permean en mayores cantidades desde las PNP que sin el nanosistema, en donde las PNP-NTZ a 240 min transfiere una masa total de $6.5 \mu\text{g}$ y NTZ en suspensión de $3.1 \mu\text{g}$.

En conclusión, se logró el desarrollo de un nanosistema polimérico de PCL que permitió la encapsulación de NTZ, presentando resultados satisfactorios de acuerdo con los objetivos del proyecto.

ABSTRACT

Nitazoxanide (NTZ), a broad-spectrum anti-infective thiazolide used to treat parasitic infections. In recent years, NTZ has also been found to show activity against multiple viruses, including hepatitis B and C virus. However, its therapeutic efficacy is compromised due to its low aqueous solubility, which limits its bioavailability for oral administration.

To combat this problem, the use of polymeric nanoparticles (PNPs), which are drug delivery systems capable of improving the low solubility of drugs and increasing their oral bioavailability, has become increasingly popular. These systems are made from biocompatible polymers and can load hydrophobic drugs such as NTZ, which would improve their biopharmaceutical properties.

In the present study, NTZ-loaded PNPs were developed, for their elaboration the simple emulsion/solvent evaporation method was followed. An experimental design (DoE) 2^2 was used to establish formulation conditions, using as factors the concentration of the polymer (polycaprolactone, PCL) and the stabilizer (polyvinyl alcohol, PVA), as responses the particle size (≤ 500 nm), the polydispersity index (PDI), the encapsulation efficiency (%EE), and the loading capacity (%CC).

Statistical analysis was performed through *Statgraphics Centurion XVI* software, obtaining the following optimization values: 30 mg PCL and 1.5 % PVA. The optimized batches were characterized, there *in vitro* release profiles were evaluated using a phosphate buffer at pH 6.8 simulating intestinal conditions and their permeability capacity was evaluated using an *ex vivo* pig intestine model. For the quantification of the samples from the different studies, a quantification method for NTZ was developed and validated by means of HPLC (High Performance Liquid Chromatography), obtaining a linear ($r^2= 0.9993$), precise (CV=0.47 %), accurate and specific analytical method to quantify NTZ. The crystalline state of NTZ and PNPs-NTZ was also evaluated by scanning difference calorimetry (DSC) and powder X-ray diffraction (XRD), and the interaction between the components of the formulation and NTZ was verified by infrared (IR).

The following results were obtained for the optimized PNPs-NTZ formulation, an average particle size of 360 ± 18 nm, a PDI of 0.171 ± 0.01 , a zeta potential of -10 ± 1.2 mV, a %CC of 1 ± 0.2 % and a %EE of 96 ± 2.2 %. Physical characterization by DCS and XRD, showed

that NTZ when incorporated into PNP, is in an amorphous state since the characteristic NTZ signal is not observed in the thermogram or in the diffractogram corresponding to that of PNP-NTZ. While the IR studies confirmed that there is no significant interaction between the formulation components and NTZ, it could also be determined that NTZ was dispersed in the PNP, because its corresponding signal was identified within the spectrum of the PNP-NTZ. On the other hand, the release profiles of NTZ from PNP showed a constant release of 25 % of the drug at 72 h, while NTZ without PNP released only 5 % of the drug in the same time. Regarding permeability, NTZ molecules were shown to permeate in higher amounts from PNP than without the nanosystem, where PNP-NTZ at 240 min transferred a total mass of 6.5 μg and NTZ in suspension of 3.1 μg .

In conclusion, the development of a polymeric nanosystem of PCL that allowed the encapsulation of NTZ was achieved, presenting satisfactory results according to the objectives of the project.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la OMS, las hepatitis se definen como inflamaciones del hígado causadas por uno de los cinco virus de la hepatitis (A, B, C, D y E). A nivel mundial se calcula que aproximadamente 3.4 millones de casos sintomáticos son de tipo A, 292 millones son de tipo B, 71.1 millones son de tipo C, 23.9 millones de tipo D y 69.622 nuevos casos de tipo E. ¹

Las hepatitis víricas B y C son causadas por el virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC), respectivamente. En sus estados crónicos, se consideran entre las principales causas para desarrollar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. ^{2,3}

La terapia antiviral para la hepatitis B crónica (HBC) se basa en dos grupos, a) interferones en su forma estándar (IFN α) y pegilado (Peg IFN- α) administrados por vía subcutánea, que han reportado efectos secundarios graves como trastornos autoinmunes y del estado del ánimo y b) análogos de nucleos(t)idos (NAs) (lamivudina, entecavir, adenofovir, disoproxil fumarato y tenofovir) administrados por vía oral, que han reportado una baja tasa de eliminación sostenida del antígeno de superficie (HBsAg). ⁴⁻⁷

Para el caso de la hepatitis C crónica (HCC), el tratamiento consiste en una terapia combinada de Peg IFN- α y Ribavirina (RBV) por 24 o 48 semanas, asociados al Peg IFN- α con efectos secundarios y a RBV con resistencia sobre ciertos genotipos del virus. ^{4,8-10}

De acuerdo con Pisano y colaboradores¹¹, la terapia farmacológica ideal para la HBC debe presentar un aumento en la tasa de pérdida del HBsAg, supresión sostenida de la replicación del VHB o la eliminación del ADN circular covalentemente cerrado del VHB (ADNccc). Por su parte, Bidell y colaboradores¹² especifican que la terapia para HCC debe presentar un incremento de la tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) y un bajo índice de resistencia frente al VHC.

Por lo tanto, necesitamos encontrar nuevos agentes farmacológicos o investigar aquellos que ya se encuentren disponibles y puedan ser reposicionados en el uso terapéutico, cumpliendo con las condiciones más cercanas a la idealidad que se ha descrito.

La Nitazoxanida (NTZ), tiazolida antiinfecciosa de amplio espectro, se le han atribuido recientemente propiedades antivirales contra VHB y VHC en estudios *in vitro*. ¹³



Rossignol y colaboradores¹⁴ reportan que NTZ presenta una reducción considerable de HBsAg, antígeno e (HBeAg) y del ADNccc del VHB. Siendo esta la primera vez que se le ve implicado como un potencial uso para el tratamiento contra hepatitis.

Adicionalmente a su efecto contra el VHC, varios autores reportan que NTZ presenta una potente actividad antiviral contra múltiples genotipos contra los replicones portadores de mutaciones contra los inhibidores de la proteasa y a los nucleótidos.¹³⁻¹⁶

La NTZ se encuentra disponible comercialmente en formas de dosificación oral: tabletas de 500 mg y suspensión oral de 100 mg/ 5 mL.¹⁷ Sin embargo, NTZ presenta baja solubilidad acuosa y por ende baja biodisponibilidad, con reportes de efectos adversos como vómito, dolor abdominal y cefalea.¹⁸

La eficacia del tratamiento puede mejorarse mediante el uso de la nanotecnología aplicada a la industria farmacéutica, donde los nanoportadores de fármacos como las PNPs presentan entre sus ventajas propiciar una liberación controlada del fármaco, mejorar la biodisponibilidad, protección del fármaco, alta capacidad de carga del principio activo, disminución en dosis, tiempos de administración y una disminución de los efectos adversos.

19 20

Por esta razón, este proyecto plantea desarrollar un nanosistema polimérico que permita la encapsulación de NTZ con actividad antiviral contra VHB y VHC *in vitro*. Para ofrecer una nueva alternativa en la administración de fármacos antivirales, superando las desventajas asociadas, como la resistencia farmacológica, la necesidad de múltiples dosificaciones y efectos adversos, llevando así a obtener una formulación optimizada que permita una terapia eficaz optimizada y mejorada en el tratamiento de las infecciones causadas por VHB y el VHC.



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Hepatitis virales

Las hepatitis virales son enfermedades inflamatorias que afectan principalmente al hígado, que puede ser causadas por cinco virus filogenéticamente alejados entre sí, que se conocen como virus de la hepatitis A, B, C, D y E, ¹⁹ que presentan vías de transmisión, población susceptible y resultados sanitarios distintos.²⁰

Las manifestaciones clínicas de la hepatitis viral se agrupan según el grado de complejidad de la enfermedad y el agente viral. La hepatitis aguda abarca una enfermedad asintomática con tiempos de resolución de 4 u 8 semanas donde los pacientes pueden mantenerse sin tratamiento, normalmente se asocia con hepatitis A.²¹

Sin embargo, personas infectadas con el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC) pueden presentar infecciones a largo plazo denominadas hepatitis crónica, con una persistencia mínima de 6 meses. En algunos casos provoca cicatrizaciones en los tejidos (fibrosis), cicatrización irreversible (cirrosis) y carcinoma hepatocelular. ^{19,21}

En el mundo, las hepatitis virales se reportan como un problema de salud pública debido a que se estima que cada año mueren 1.4 millones de personas a causa de infecciones agudas, cáncer hepático y cirrosis asociada a las hepatitis. Del total de las muertes reportadas, el 47 % se atribuyen a VHB, el 48 % a VHC, el 5 % restante al Virus de la hepatitis A (VHA) y Virus de la hepatitis E (VHE). ²⁰

2.1.1. Epidemiología de las hepatitis virales en México

La Secretaría de Salud de México (SSA) ha reportado que de 1990 a 1999 existen un total de 217,513 casos de hepatitis virales en el país, de los cuales 85.3 % corresponde al VHA, 3.7 % a VHB y un 11 % no contaban con diagnóstico preciso. ²²

Del 2010 al 2020 se presentan un total de 3, 978 casos de hepatitis A con una tasa de incidencia nacional de 3.11 (por cada 100,000 habitantes), 7,746 casos de hepatitis B con una tasa de incidencia nacional de 0.28 (por cada 100,000 habitantes) y 1,366 casos de hepatitis C (por cada 100,000 habitantes). ²²



El Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) informa de casos por grupos de edad. La infección por el VHA se detecta principalmente en niños, mientras que el VHC es diagnosticada en mayor proporción en adultos entre 40 y 50 años. A pesar del programa de vacunación de recién nacidos que inició en el 2000, se reportan casos de VHB entre adolescentes y adultos en edades sexualmente activas coincidiendo con el incremento en la prevalencia del VHB en estos grupos de edad.²²

2.2. Virus de la Hepatitis B

El VHB (Figura 1) pertenece a la familia *Hepadnavirus* del género *Orthohepadnavirus*, el virión completo es denominado como partícula de Dane, con un diámetro aproximado de 42 nm. Presenta una doble envoltura; la capa externa o cápside se conforma por lipoproteínas donde se incrustan glicoproteínas o antígenos de superficie denominados S, M y L.²³

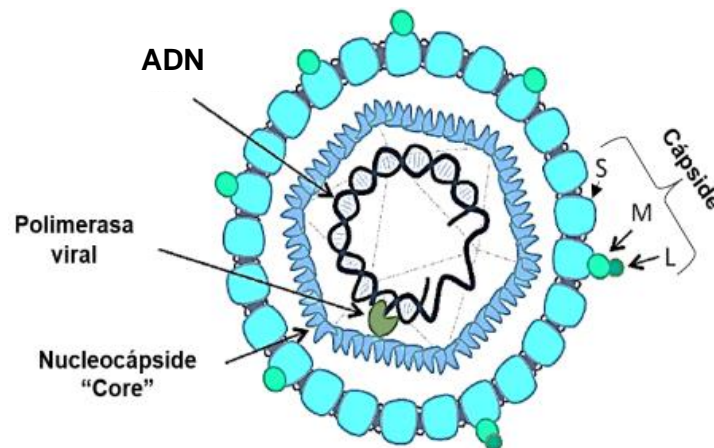


Figura 1. Estructura del VHB²³

El ADN del genoma viral tiene un tamaño de 3200 kb, es un ADN circular relajado (ADNr) de doble hélice con una hebra negativa completa y una hebra positiva incompleta, dentro de las células hepáticas (Figura 2) es reparado y sirve como molde para iniciar la transcripción del ARN pregenómico del VHB, proceso que es estimulado con la formación de un complejo de ligasas formado por la unión de la proteína reguladora X del VHB (HBx) y la proteína de unión a ADN específica de daños 1 (DDB1) que degrada al complejo de cromosomas 5/6 (Smc5/6), la transcripción del ARN del VHB da paso a la traducción de las diferentes proteínas virales, formando la nucleocápside de los viriones, son ensamblados y liberados a fuera de las células iniciando una infección localizada en el hígado.^{23 24}



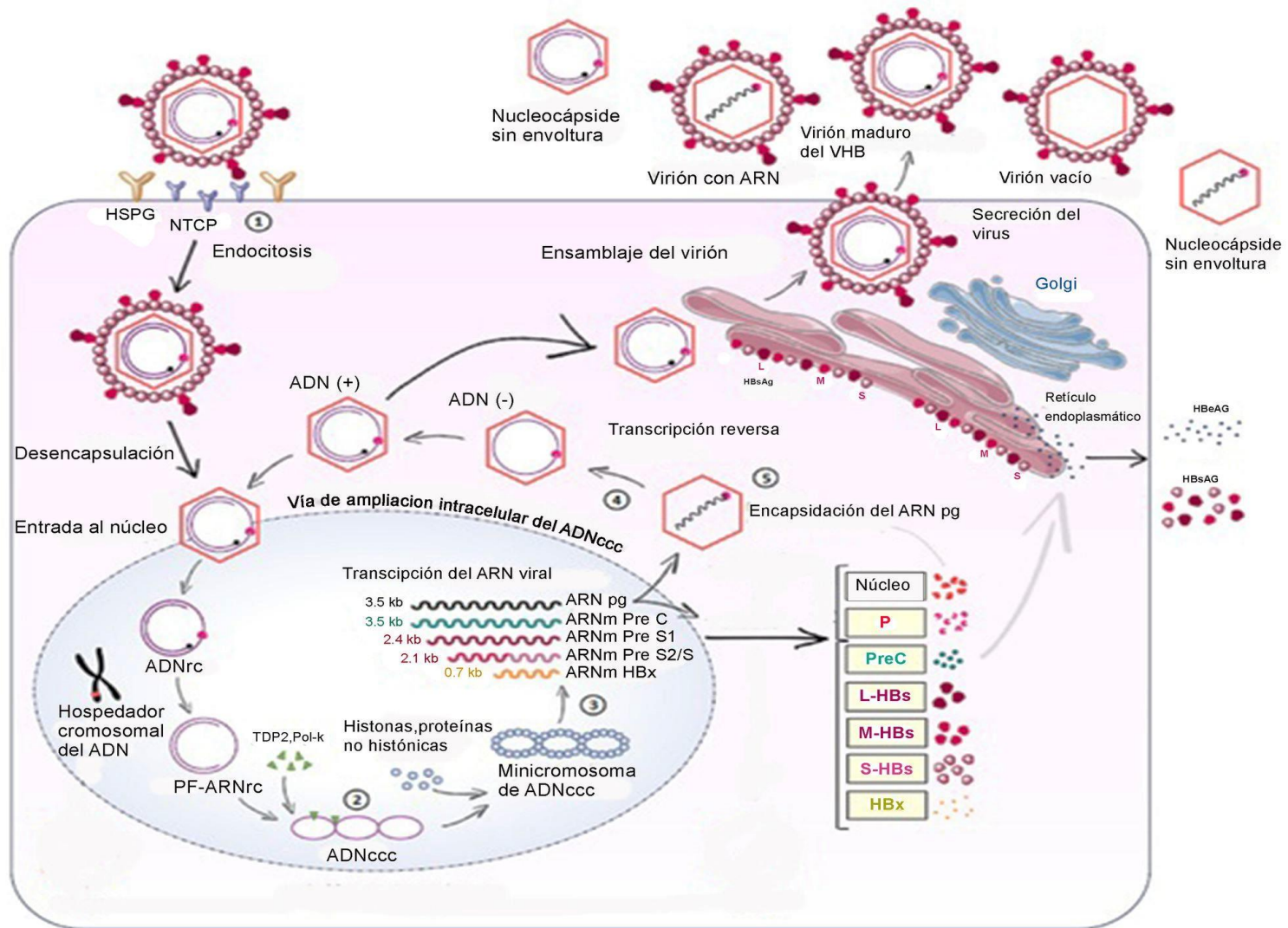


Figura 2. Ciclo de replicación viral del VHB²³

2.2.1. Hepatitis B

La hepatitis por VHB (HB) es una enfermedad infecciosa, capaz de producir una enfermedad aguda o crónica, que pueden ocasionar cirrosis y carcinoma hepatocelular.²⁵ El periodo de incubación puede durar entre 30 y 180 días, siendo HBsAg el primer marcador serológico en aparecer, seguido después del anticuerpo contra el antígeno del núcleo (HBcAg) predominante del tipo IgM. El HBeAg también puede ser detectado en la mayoría de los pacientes con infección aguda.²⁶

La progresión de HB aguda a crónica se determina por la edad al momento de la infección, el estado inmune del hospedero, el uso de inmunosupresores, la posible coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y factores ambientales como la ingesta de alcohol.²⁶

La manifestación de la infección aguda en adultos se resuelve en un 90 a 95 % del total de los casos, y sólo de un 5 a 10 % desarrolla infección crónica; en el caso de los niños, a temprana edad en aproximadamente un 50 % desarrollan cronicidad, y hasta un 90% de los recién nacidos de madres infectadas pueden evolucionar a casos crónicos si no se toman las medidas preventivas.²⁶

La infección crónica puede evolucionar a daño hepático progresivo hasta un 15 a 40 % de casos, con la posibilidad de desarrollar cirrosis e insuficiencia hepática y/o hepatocarcinoma requiriendo medicación y, posiblemente un trasplante de hígado que en última instancia conlleva a la muerte.²⁶

Las formas más comunes de transmisión del virus son por contacto sexual , por vía parenteral en personas que comparten agujas consciente o inconscientemente, por exposición de las mucosas a fluidos corporales como sangre y líquidos serosos positivos para el HBsAg proveniente de una persona con infección aguda o crónica y, a través de la madre hacia el hijo durante el parto; para estos, si la madre es positiva tanto para HBsAg o HBeAg, el riesgo perinatal puede ser del 70 % hasta 90 %; sin embargo, el riesgo se reduce a un 10 % menos si se inmuniza al recién nacido.²⁶



2.2.2. Prevalencia de la enfermedad en México

Se tienen evidencias que en México predominan los genotipos H y G del VHB, mientras que en otras partes del mundo predominan diferentes genotipos del VHB, en el continente asiático se encuentran los genotipos B y C, en Europa y Estados Unidos predomina el A y D, mientras que el F predomina en Centroamérica y Sudamérica.²²

Entre 2010 y 2020 se han presentado un promedio de 7,745 casos anuales de hepatitis B en México; observándose una tendencia a la baja entre 2010 y 2017. Sin embargo, en 2020 se tiene un registro de 369 casos. Dentro de los estados que reportan las tasas más altas en 2020, fueron Quintana Roo (0.81), Chihuahua (0.66) y Tamaulipas (0.60). Respecto al género, se tiene una mayor prevalencia en el sexo masculino del 75.3 % y un 24.7 % para el femenino. Por grupo de edad, el mayor número de casos y las tasas de incidencia más alta se presentaron en adultos de 25 a 44 años seguido de los adultos de 50 a 59 años.²⁷

2.2.3. Tratamiento para hepatitis B

Las metas terapéuticas para la infección por VHB son obtener una supresión sostenida de la replicación viral, remisión de la enfermedad y la posible erradicación del ADNccc.²⁵

Los pacientes candidatos a recibir tratamiento son aquellos con hepatitis crónica, con HBsAg positivo, elevadas cifras de Alanino-aminotransferasa (ALT) > 60 UI/L y alta carga viral > 10⁵ copias/mL durante un periodo de seis a doce meses.

Actualmente el tratamiento aprobado se basa en **interferones alfa (IFN α)** y **análogos de nucleótidos/nucleósidos (NAs)** que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos para hepatitis B

Tratamiento	Esquema de tratamiento	Duración del tratamiento (semanas)	Costo (pesos mexicanos)	Observaciones	Ref.
IFN α	IFN α 2b de 5 A 10 millones de unidades internacionales (MUI)/ 3 por semana por vía subcutánea (SC)	24	\$ 1,515.00	En pacientes HBeAg negativos presentan una elevada tasa de recidivas, que se pueden reducir prolongando la terapia a 96 semanas.	25,28,29
	Peg IFN-α 2 b 1.5 µg/Kg y Peg IFN-α 2 a 180 µg/semana	48	\$ 2,896.00 - \$ 3,194.00 \$ 2,960.00	La respuesta farmacológica para los genotipos A es del 60%, B del 42 %, C del 32 % y D del 28 %, una baja carga viral y una pérdida del 37 % del HBeAg.	25,28,29



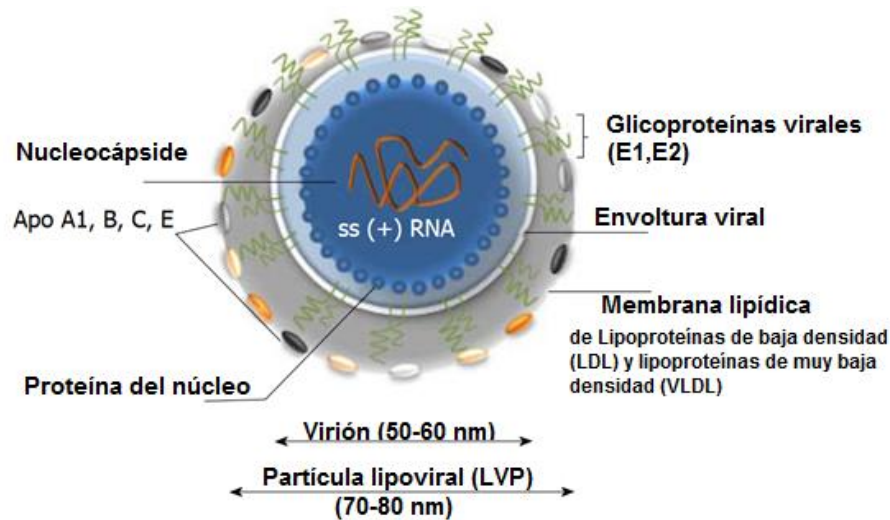
NAs	Lamivudina (LAM) 100 mg/día	52	\$ 4,348.00	Se reporta una mejora histológica, seroconversión del HBeAg, supresión del ADN del VHB y una normalización de la ALT, su principal desventaja es la resistencia genotípica por parte del VHB hacia LAM.	25,28,34
	Adefovir dipivoxil (ADV) 10 mg/día	52	\$ 241.00	El uso de 30 mg/día tiene una mayor eficacia; sin embargo, los pacientes presentaron nefrotoxicidad. El ADV presenta un menor índice de resistencia comparado a LAM.	25,28,34
	Entecavir (ETV) 0.5 mg/día	52	\$ 4,499.00	En pacientes resistentes a LAM la dosis incrementa a 1 mg/día. ETV ha presentado resistencia debido a mutaciones estructurales	25,28,35
	Telbivudina (TBV) 600 mg/día	48	\$ 4,348.00	Se ha reportado resistencia fenotípica a un año posterior al tratamiento de 6% en pacientes HBeAg positivos y un 3.5% en pacientes HBeAg negativos. A los dos años, la resistencia farmacológica alcanza un 22% en pacientes HBeAg positivos y 9% en negativos.	25,28,36
	Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) 300 mg/día	48	\$ 1,989.00	Reduce significativamente la carga viral en pacientes sin recibir tratamiento retroviral (naive) y resistentes a LAM, pero sumado a esto se ha reportado un deterioro agudo de la función renal por TDF.	25,28,37

Para el caso de los dos tipos de interferones no hay reportes de resistencia farmacológica, pero su administración SC y su perfil de efectos adversos como síntomas gripales, fatiga, alteraciones en el estado de ánimo, citopenia, trastornos autoinmunes en adultos, anorexia y pérdida de peso en niños, constituyen desventajas de adherencia terapéutica por parte del paciente.^{25,28,30-33}

2.3. Virus de la Hepatitis C

El VHC (Figura 3) pertenece a la familia *flaviviridae* y al género *hepacivirus*. El virión presenta un tamaño de 50 o 60 nm de diámetro de estructura pleomórfica, cuenta con una envoltura que está formada por una bicapa lipídica en la que se anclan dos proteínas de envoltura, E1 y E2, formando una partícula lipoviral de 70 a 80 nm de diámetro. Esta envoltura viral rodea a la nucleocápside, compuesta por múltiples copias de la proteína del núcleo o *core*.



Figura 3. Estructura del VHC ³⁸

La nucleocápside rodea al genoma viral, un ARN de aproximadamente 9.6 kb de longitud con una sola cadena en sentido positivo y un único marco de lectura abierto (ORF, *Open Reading Frame* por sus siglas en inglés) que codifica a una poliproteína precursora de 3000 aminoácidos, aproximadamente. Esta poliproteína es procesada tanto por proteasas virales como del huésped dando lugar a 3 proteínas estructurales (core, E1, E2), proteína p7 y otras 6 proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). ³⁸⁻⁴⁰

El material genético del VHC dentro de la célula hepática (Figura 4), es dirigido por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) hacia las subunidades ribosomales 40s iniciando la traducción de proteínas virales en el retículo endoplásmico rugoso que al madurar se unen a factores del huésped formando la red membranosa, donde se copia el ARN positivo en uno negativo que sirve como molde para la progenie de ARN genómico positivo. Estos moldes sirven para sintetizar nuevas proteínas y para iniciar con la encapsulación de nuevos viriones que, una vez ensamblados son liberados a través de la vía de secreción celular iniciando una nueva infección. ⁴¹⁻⁴⁴

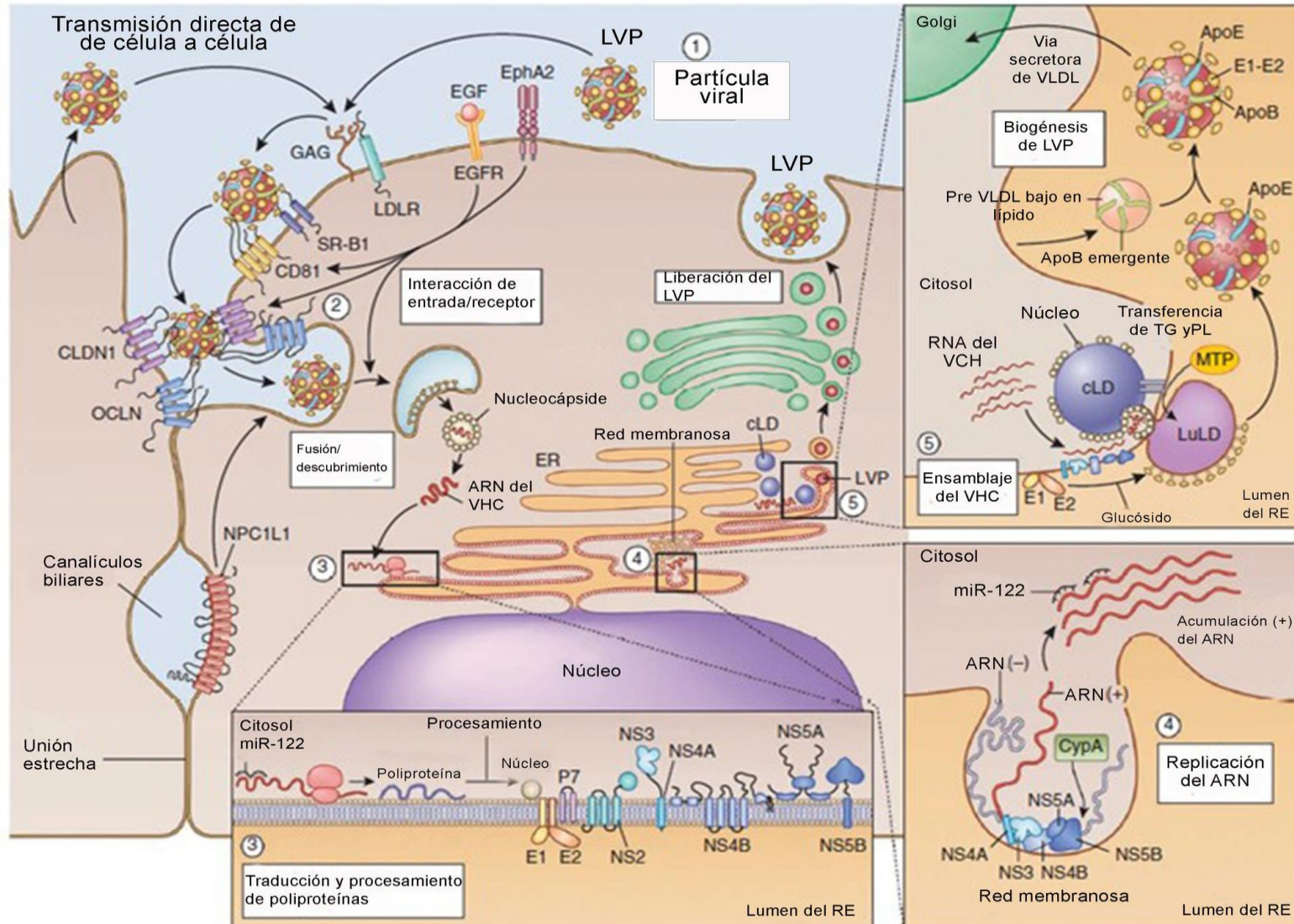


Figura 4. Ciclo de replicación del VCH ⁴¹

2.3.1. Hepatitis C

La hepatitis por VHC (HC) es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular. El VHC se transmite principalmente a través de la exposición a sangre infectada y a otros fluidos corporales. Entre los riesgos considerados para una posible infección están haber tenido una transfusión de sangre o sus componentes, recibir un trasplante de órganos antes de 1995, uso de drogas por vía intravenosa o intranasal, punciones accidentales al compartir agujas de jeringas contaminadas con sangre infectada por el VHC, practicarse tatuajes, piercing, perforaciones, acupuntura, manicure o podología con instrumentos no esterilizados o contaminados, personal de salud expuesto al contacto con sangre infectada por VHC, transmisión vertical (de madre a hijo durante el nacimiento) y por un contacto sexual en el caso de múltiples parejas hetero u homosexuales. ⁴⁵

Posterior a la exposición, la HC puede presentarse como infección aguda o crónica, la infección aguda se presenta como asintomática, menos del 25 % de los pacientes presentan ictericia. ⁴⁶

Del total de personas con infección aguda, entre un 15 a 45 % de las personas contagiadas presentan una resolución espontánea de la infección que ocurre generalmente en los primeros seis meses posteriores a la exposición. Entre el 25 y el 30 % de las personas con infección aguda pueden presentar síntomas como fiebre, ictericia y dolor abdominal. Alrededor del total de personas con infección aguda, del 60% al 80 % desarrollan una infección crónica. Entre los factores que determinan la progresión a una infección crónica está la adquisición del VHC en una edad avanzada (> 40 a 55 años), género masculino, posible coinfección con VIH, índice de masa corporal (IMC) elevado (> 25.0 kg/m²), consumo de alcohol, manifestaciones de esteatosis hepática, posible coinfección con VHB y VIH. ^{41,46}

La HCC se define como la persistencia del ARN del VHC en la sangre durante un periodo mayor a seis meses después del inicio de la infección aguda, alrededor del 55 % al 85 % de los pacientes con infección aguda desarrollan HCC. Aproximadamente de un 20 % al 30 % de los pacientes con HCC desarrollan cirrosis en un periodo de 10 a 30 años, estos pacientes pueden sufrir una descompensación hepática, carcinoma hepatocelular y/o muerte relacionada con daño hepático. ⁴⁷



2.3.2. Prevalencia en México

En México se estima que existen entre 400,000 a 1,400,000 personas infectadas por el VHC, de los cuales se estima que por lo menos 200,000 a 700,000 presenten una viremia activa y requieran tratamiento. ²²

Predominan los genotipos 1a y 1b del VHC, en una menor proporción el 2a y 3b. El genotipo 3a se encuentra con mayor frecuencia en la zona norte y sur del país, mientras que en occidente predomina el genotipo 1a seguido del 1b desde más de 10 años. Siendo el genotipo 1b el que mayor predomina en México y desafortunadamente los pacientes que presentan este genotipo son más resistentes al tratamiento con Peg IFN- α y RBV. ²²

En el periodo de 2010 a 2020 se estimó un promedio de 2,108 casos anuales de HC en México. Durante 2020, se registraron 1,366 casos de HC, con una tasa de incidencia nacional de 1.06 casos por cada 100,000 habitantes. Dentro de los estados que presentaron las tasas de incidencia más altas, en casos por cada 100,000 habitantes, se encontraron Baja California (5.31), Chihuahua (2.37) y Colima (2.29). Por grupo de edad, el mayor número de casos se reportó en el grupo de edad de 25 a 44 años; mientras que la tasa de incidencia más alta se reporta en el grupo de edad de 45 a 49 años. ²⁷

2.3.3. Tratamiento para hepatitis C

El objetivo principal con los tratamientos para la HCC es lograr una erradicación sostenida del VHC, conocida como respuesta virológica sostenida (RVS) que se define como la ausencia del ARN del VHC en plasma evaluado por un método con alta sensibilidad al finalizar el tratamiento y después de 12 semanas de haber concluido el tratamiento. ⁴⁸⁻⁵²

La RVS se considera como un parámetro importante, ya que se ha comprobado que está asociada con múltiples beneficios clínicos, entre ellos la erradicación de la infección viral a largo plazo, una mejora histológica debido a una regresión de la fibrosis en hígado, y a una tasa baja de complicaciones como cirrosis, insuficiencia hepática, carcinoma hepatocelular y una reducción del riesgo de mortalidad relacionada con daño hepático. ⁴⁸⁻⁵²

Debido a la alta diversidad genética y a la rápida tasa de mutación del VHC, no se dispone de una vacuna preventiva. Por lo tanto, durante más de una década se ha administrado IFN



α por vía SC con dosis de 3 MUI/ 3 veces por semana y RBV por vía oral (PO) de 800 a 1200 mg/día, considerada como terapia estándar para tratar HCC. ⁵³

Este tratamiento mejora la tasa de RVS hasta un 38 a 43%. Como la RVS depende en gran parte del genotipo del VHC, las personas infectadas con el genotipo 1 necesitan un tratamiento durante 48 semanas para alcanzar una RVS del 29 % y los infectados con los genotipos 2 y 3, necesitan un tratamiento de 24 semanas para alcanzar una tasa de RVS del 66 %. Actualmente, el tratamiento es Peg-IFN- α junto con RBV, logrando una RVS alrededor del 50 % para el genotipo 1 y del 80 % para los genotipos 2 y 3. ⁵³

El tratamiento se selecciona en función al genotipo del VHC de la infección:

- Genotipos 2a-2b, 3a-3d, 5a, 6a y mixtos: IFN α recombinante: 3 inyecciones SC de 3 MUI y RBV: PO 10 mg/Kg/día/semana, durante 24 semanas. ⁵³
- Genotipos 1a-1c y mixtos (1-4): IFN α recombinante: 3 inyecciones SC de 3 MUI y RBV: PO para personas \leq 75 kg requieren de 1000 mg/día/semana y para pacientes $>$ 75 kg requieren de 1,200 mg/día/semana durante 48 semanas. ⁵³

Sin embargo, el tratamiento con Peg-IFN- α /RBV ha presentado efectos adversos graves como; anemia, citopenia, neutropenia, insomnio, irritabilidad, ansiedad, psicosis, intentos de suicidio y trombocitopenia, por lo cual se ha optado por la búsqueda de otras terapias antivirales, las cuales se describen en la tabla 2. ⁵³⁻⁵⁵



Tabla 2. Recomendaciones de tratamientos para hepatitis C crónica según el genotipo

Genotipo	Esquema de tratamiento	Duración del tratamiento (semanas)	Costo (pesos mexicanos)	Ref.
1a	Ledipasvir 90 mg/día + sofosbuvir 400 mg/día	12	\$ 62,370.00/ 28 tabletas	53-55
	Paritaprevir 12.5 mg + ritonavir 50 mg + ombitasvir 75 mg + dasabuvir 250 mg/12 h + ribavirina 1000-1200 mg/día		\$166,638.00	
	Sofosbuvir 400 mg/día + simeprevir 150 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día		\$235,308.00/ 28 tabletas + \$35,355.00/7 cápsulas + \$1664.00/ 18 cápsulas	
1b	Ledipasvir 90 mg/día+ sofosbuvir 400 mg/día	12	\$ 62,370.00/ 28 tabletas	53-55
	Paritaprevir 12.5 mg + ritonavir 50 mg + ombitasvir 75 mg + dasabuvir 250 mg/12 h		\$166,638.00	
	Sofosbuvir 400 mg/día + simeprevir 150 mg/día		\$235,308.00/ 28 tabletas + \$35,355.00/7 cápsulas	
2	Sofosbuvir 400 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día	12	\$235,308.00/ 28 tabletas + \$1664.00/ 18 cápsulas	53-55
3	Sofosbuvir 400 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día	24	\$235,308.00/ 28 tabletas + \$1664.00/ 18 cápsulas	53-55
	Sofosbuvir 400 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día + Peg IFN- α 1.5 μ g/kg	12	\$235,308.00/ 28 tabletas + \$1664.00/ 18 cápsulas	
4	Ledipasvir 90 mg/día + sofosbuvir 400 mg/día	12	\$ 62,370.00/ 28 tabletas	53-55
	Paritaprevir 12.5 mg + ritonavir 50 mg + ombitasvir 75 mg + ribavirina 1000-1200 mg/día	12	\$166,638.00	
	Sofosbuvir 400 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día	24	\$235,308.00/ 28 tabletas + \$1664.00/ 18 cápsulas	
	Sofosbuvir 400 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día + Peg IFN- α 1.5 μ g/kg	12	\$235,308.00/ 28 tabletas + \$1664.00/ 18 cápsulas + \$5,100.00	
	Sofosbuvir 400 mg/día + simeprevir 150 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día	12	\$235,308.00/ 28 tabletas + \$35,355.00/7 cápsulas + \$1664.00/ 18 cápsulas	
5	Sofosbuvir 400 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día + Peg IFN- α 1.5 μ g/kg	12	\$235,308.00/ 28 tabletas + \$1664.00/ 18 cápsulas + \$5,100.00	53-55
	Peg IFN- α 1.5 μ g/kg + ribavirina 1000-1200 mg/día	48	\$5,100.00 + \$1664.00/ 18 cápsulas	
6	Ledipasvir + sofosbuvir 400 mg/día	12	\$ 62,370.00/ 28 tabletas	53-55
	Sofosbuvir 400 mg/día + ribavirina 1000-1200 mg/día+ Peg IFN- α 1.5 μ g/kg	24	\$235,308.00/ 28 tabletas + \$1664.00/ 18 cápsulas + \$5,100.00	



Debido a las desventajas planteadas en los tratamientos estandarizados tanto para HBC como para HCC, se propone emplear el reposicionamiento farmacéutico de Nitazoxanida, describiendo en la siguiente sección su actividad antiviral frente a el VHB y el VHC.

2.4. Nitazoxanida: Antecedentes y generalidades

La Nitazoxanida (NTZ) es una tiazolida antiinfecciosa de amplio espectro, con actividad contra bacterias anaerobias, protozoarios, helmintos y recientemente probada en virus como VHB, VHC, virus de localización gastrointestinal como Norovirus y Rotavirus; y virus respiratorios en particular influenza y coronavirus (CoV) como MERS y SARS.⁵⁶⁻⁶⁴

La NTZ (Figura 5) se sintetizó por primera vez a principios de la década de los 70's del siglo XX, a partir del andamiaje de la niclosamida, sustituyendo el anillo aromático nitrado por un nitrotiazol, un heterociclo de 5 átomos.^{65,66}

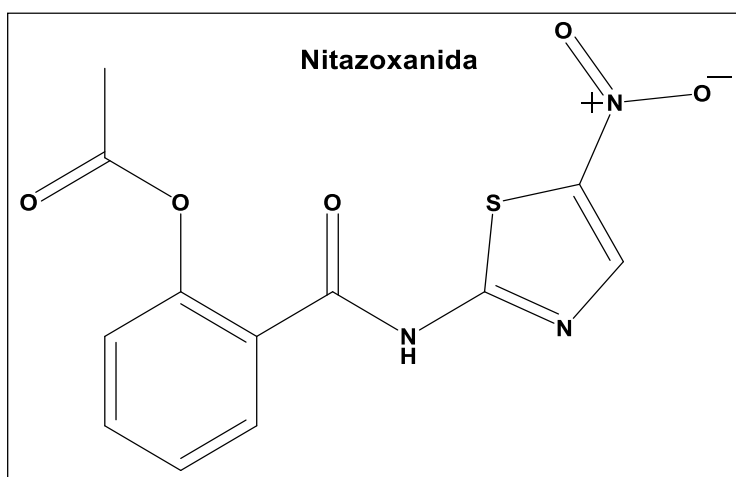


Figura 5. Estructura química de Nitazoxanida

Se autorizó su comercialización en 2004 por la *Food and Drug Administration* (FDA) como tratamiento para la diarrea y la enteritis causada por *Cryptosporidium spp* o *Giardia lamblia*, bajo el nombre comercial de Alinia ® por Romark Laboratories.⁶⁷

Se considera que NTZ *in vitro* actúa contra una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas obligadas y facultativas, así como cepas replicantes y no replicantes de *Mycobacterium tuberculosis*; también en estudios se determinó su actividad farmacológica

en el tratamiento de la enfermedad por *Clostridium difficile*. El mecanismo de acción de NTZ contra los organismos anaeróbicos es atribuido a una interferencia con las reacciones de transferencia de electrones dependientes de la enzima piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), que son esenciales para el metabolismo energético anaeróbico. ^{57,67,68}

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas de Nitazoxanida

Las propiedades fisicoquímicas de NTZ se muestran en la tabla 3, donde se observa que la molécula presenta una baja solubilidad acuosa, adicionalmente, NTZ presenta alta permeabilidad a través del epitelio intestinal, lo cual según los criterios establecidos por el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), coloca a NTZ dentro de la clase II. ^{60,69,70}

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de nitazoxanida ⁷¹

Características fisicoquímicas de Nitazoxanida	
Nombre IUPAC	2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida.
Fórmula química	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅ S
Peso molecular	307.3 g/mol
Punto de fusión	202 °C
Punto de ebullición	394 °C
Log P	1.63
pKa	8.3
Apariencia	Polvo cristalino de color amarillo
Solubilidad acuosa	7.5 µg/mL
Solubilidad en disolventes orgánicos	Acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), isopropanol, N, N-dimetilformamida (DMF), metanol y tolueno.

2.4.2. Farmacocinética de Nitazoxanida

La NTZ se administra por vía oral en presentación de tabletas de 500 mg o suspensión oral de 100 mg/mL, se absorbe parcialmente en el tracto gastrointestinal (TGI) en el epitelio del intestino delgado. La NTZ se encuentra en circulación sanguínea, donde en el plasma sufre hidrólisis por esterases plasmáticas dando paso a su metabolito activo, la tizoxanida (TZX) (Figura 6). ^{67,72,73}



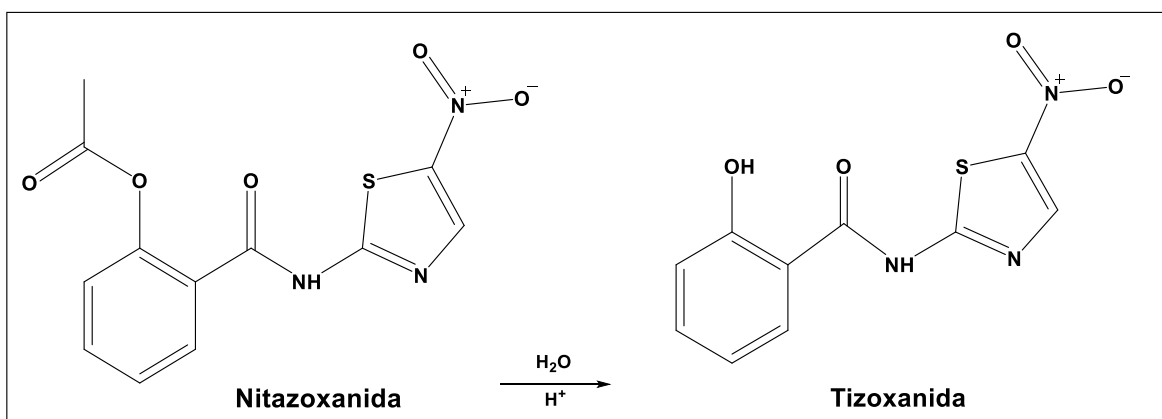


Figura 6. Proceso de hidrólisis por esterasas plasmáticas de Nitazoxanida a Tizoxanida (2-hidroxi-N-(5-nitrotiazol-2-il) benzamida).

Tras una administración oral de 500 mg de NTZ, dos veces al día durante siete días, TZX alcanza una concentración plasmática máxima (C_{max}) de 2 mg/L de 1 a 4 horas y se une en más del 99 % a proteínas plasmáticas; la vida media de eliminación de TZX en plasma es ~1.5 horas. Se ha reportado que TZX no inhibe las enzimas del citocromo P450, por lo que no se esperan interacciones farmacológicas.^{72,74}

La TZX en hígado sufre una conjugación con ácido glucurónico, transformándose en glucurónido tizoxanida (Figura 7). Diversos autores mencionan que la eliminación de la dosis de NTZ se da en dos terceras partes por heces y un tercio por orina, con una vida media de eliminación urinaria de 7.3 horas. En el caso de TZX esta se excreta por heces, orina y bilis, mientras que el glucurónido de tizoxanida se excreta por orina y bilis.^{67,72-75}

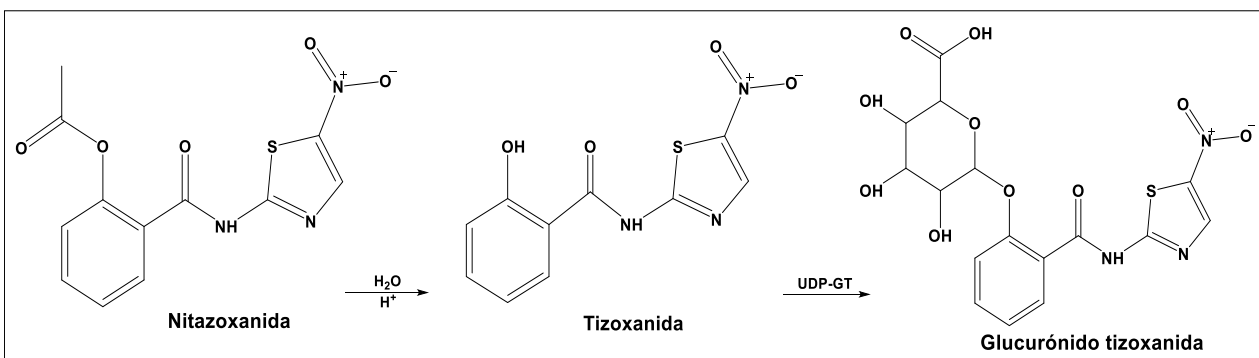


Figura 7. Metabolismo de nitazoxanida, tomada y adaptada de la referencia⁶⁰

2.5. Actividad antiviral de Nitazoxanida

A NTZ se le adjudican propiedades antivirales, debido a que suprime la replicación viral y activa a las proteínas intracelulares antivirales. NTZ y TZX, inhiben la replicación de un amplio rango de virus de ARN y ADN; presentan una acción contra dieciséis cepas de influenza (A/H1N1, H3N2, H3N2v, H3N8, H5N9, H7N1) y una cepa de influenza B. ^{61,76}

De igual forma se ha reportado la actividad contra el virus sincitial respiratorio, norovirus, dengue, fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, rotavirus e inclusive contra VIH, CoV SARS y MERS, por lo cual se le considera como un fármaco con actividad antiviral de amplio espectro. ^{61,76-79}

Su actividad antiviral también se ha comprobado contra VHB y VHC en un estudio que evaluaba la actividad de NTZ frente a la criptosporidiosis en pacientes con VIH que se encontraban coinfectados con VHB o VHC. ^{56,57,67}

En las siguientes subsecciones se abordarán específicamente las propiedades y efectos antivirales de NTZ frente a los VHB y VHC, así como su efecto terapéutico para HBC y HCC.

2.5.1. Nitazoxanida y el Virus de la Hepatitis B

El principal objetivo de la terapia contra HBC, es eliminar los productos virales como ADNccc del VHB y HBsAg debido a que estos permanecen por mayor tiempo en el organismo, condicionando la generación de complicaciones como cirrosis, daño hepático y CHC. Sin embargo, las terapias estandarizadas mencionados en el punto 2.2.3. no cumplen con este objetivo.

De acuerdo con Sekiba y colaboradores ⁸⁰, NTZ actúa contra el VHB (Figura 8) inhibiendo la transcripción viral por medio del bloqueo de la interacción entre HBx y DDB1; de tal manera se previene la degradación del Smc5/6 resultando en la supresión y niveles del ADNccc del VHB, la producción del ARN pregenómico (ARNpg), proteínas y antígenos virales. ^{80,81}

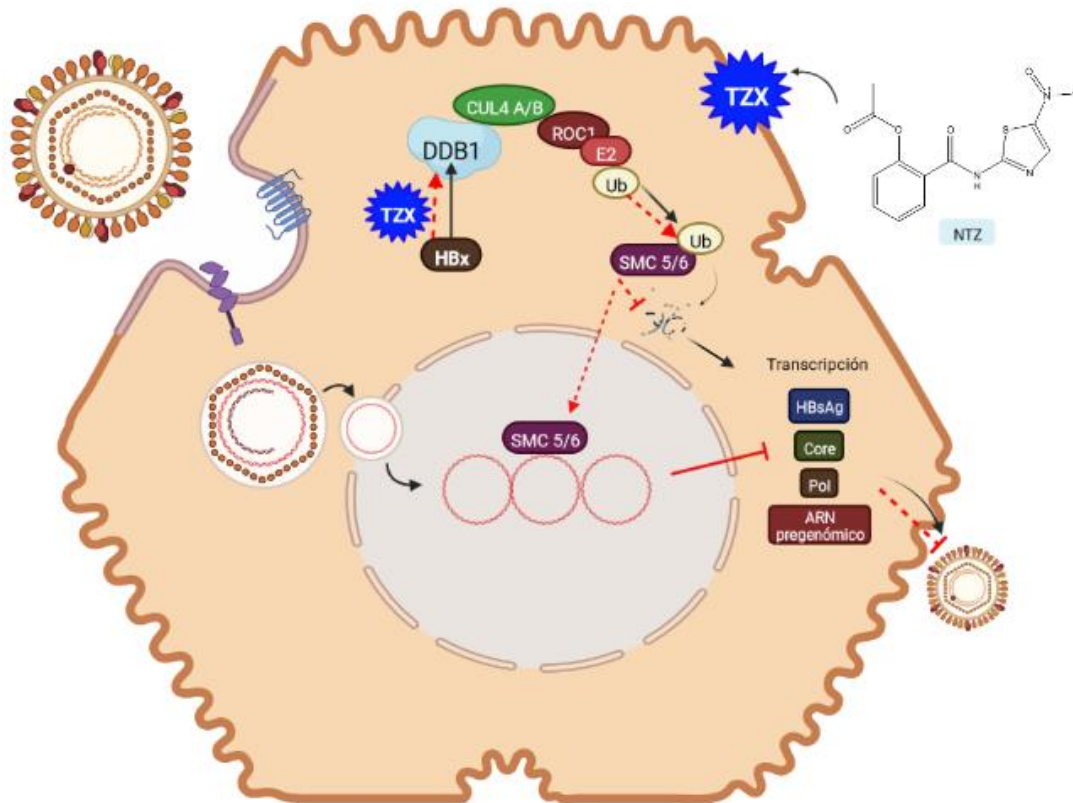


Figura 8. Mecanismo de NTZ contra VHB propuesto por Sekiba *et al*⁸⁰

Rossignol y Bréchet, realizaron un estudio clínico en el cual analizaron los niveles de reducción de los antígenos HBsAg y HBeAg en presencia de NTZ, obteniendo una reducción del 22 % al 33 % de los marcadores de la infección, mostrando también una eficacia sostenida a mediano plazo en un 89 % de los pacientes infectados.⁸²

2.5.2. Nitazoxanida y el Virus de la Hepatitis C

De acuerdo con Elazar y colaboradores¹⁵, NTZ actúa contra el VHC (Figura 9) por medio de la modulación de vías antivirales del paciente.

La NTZ 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.⁸³

Una vez fosforilada la PKR, fosforila la serina en la posición 51 (Ser51) de la subunidad α del factor de iniciación eucariótico 2 α (eIF2 α) el cual inhibe el intercambio de nucleótidos mediado por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (eIF2 β) que unido a guanosín 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. ⁸⁴⁻⁸⁶

Sin embargo, al ser inhibido el intercambio de nucleótidos no se presenta el cambio de guanosín difosfato (GDP) a GTP lo que imposibilita la síntesis de proteínas y, en consecuencia, se activa la inhibición de la traducción del ARN viral. ⁸³⁻⁸⁷

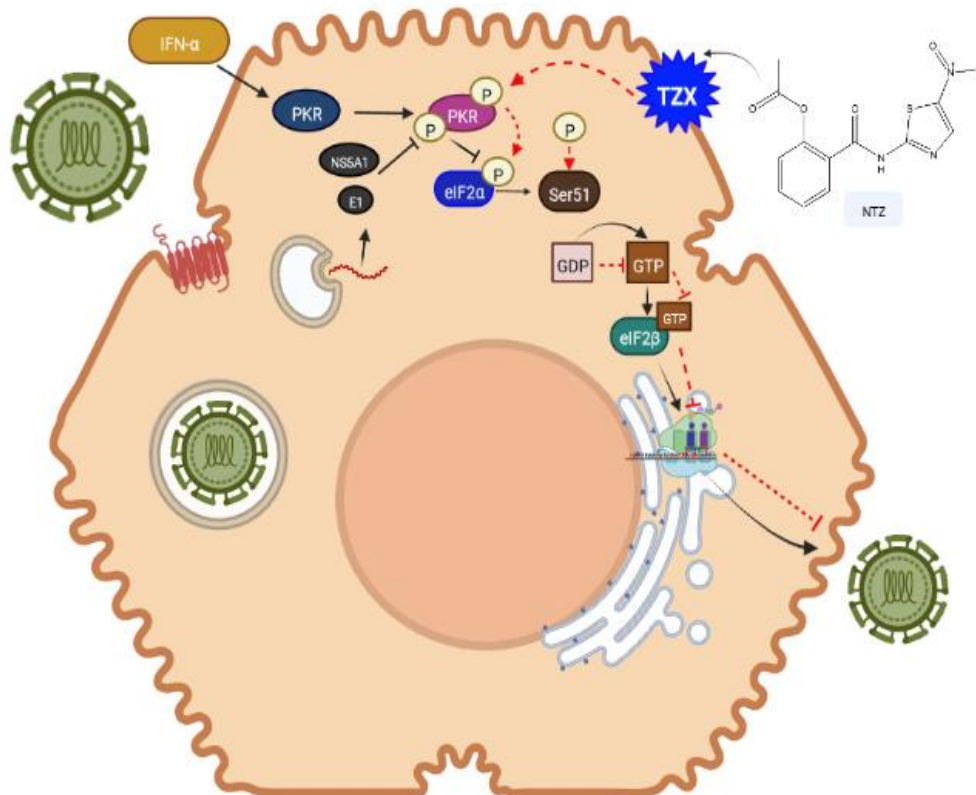


Figura 9. Mecanismo de NTZ contra VHC propuesto por Elazar *et al* ⁸³

Se tienen reportes de la actividad antiviral de NTZ en pacientes infectados por VHC, se evaluó su efecto en una administración concomitante con Peg IFN- α y RBV, donde se menciona que existe un aumento en las tasas de la respuesta virológica rápida (RVR) y en la RVS en comparación con el tratamiento estándar, sin la presencia de efectos adversos. ^{13,57}

También se describe la actividad de NTZ como de TZX contra múltiples genotipos del VHC, cepas resistentes a los inhibidores de la proteasa y a los NAs.^{13,15,83}

Por lo descrito anteriormente, se propone el uso de NTZ como agente antiviral eficaz ante VHB y VHC. Sin embargo, su limitada solubilidad acuosa, que resulta en baja biodisponibilidad, y las formas farmacéuticas convencionales en las que se comercializa NTZ condicionan su uso para tratar enfermedades virales en estado crónico debido a que se requieren dosis altas y tiempos de administración prolongados.

2.6. Biodisponibilidad oral y los factores implicados

Un gran número de fármacos que se comercializan son administrados por vía oral, una vía de administración que es práctica por ser de autoadministración con mínimas molestias, siendo una vía rentable y flexible.⁸⁸

Sin embargo, esta vía presenta diversos inconvenientes como una absorción deficiente, lo que afecta a la biodisponibilidad, que es definida por la NOM-177-SSA1-2015 como *“la fracción del fármaco que se absorbe a la circulación sistémica después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo”*.⁸⁹

Por lo cual, la biodisponibilidad oral depende del proceso de absorción de los fármacos para que este pueda llegar a circulación sistémica de manera inalterada. Existen varios factores que condicionan la absorción de los fármacos; siendo la solubilidad acuosa y la permeabilidad intestinal los principales factores implicados en el proceso de absorción.⁸⁸

2.6.1. Implicaciones de la solubilidad acuosa en los fármacos

La solubilidad acuosa del fármaco y su velocidad de disolución son factores esenciales que controlan la cantidad de absorción y la biodisponibilidad oral del fármaco y, por tanto, su efecto terapéutico.

Teniendo en cuenta que la solubilidad de los fármacos es un factor que limita su absorción, es necesario considerar que es lo que sucede con el fármaco cuando es administrado por vía oral (Figura 10), una vez ingerida la forma farmacéutica, el medicamento se desintegra en gránulos o agregados; a continuación, estos gránulos se rompen y se originan partículas más finas del principio activo, las cuales posteriormente se solubilizan en el TGI. Estando



en solución, el fármaco está en posibilidad de ser absorbido, por medio de un proceso de permeación y posteriormente llegar a circulación sanguínea. A este proceso se le conoce como biodisponibilidad oral, que para obtener un valor óptimo el fármaco debe presentar altos niveles de fármaco absorbido a través del TGI; sin embargo, la solubilidad y la permeabilidad son los factores que influyen en este paso. ^{90,91}

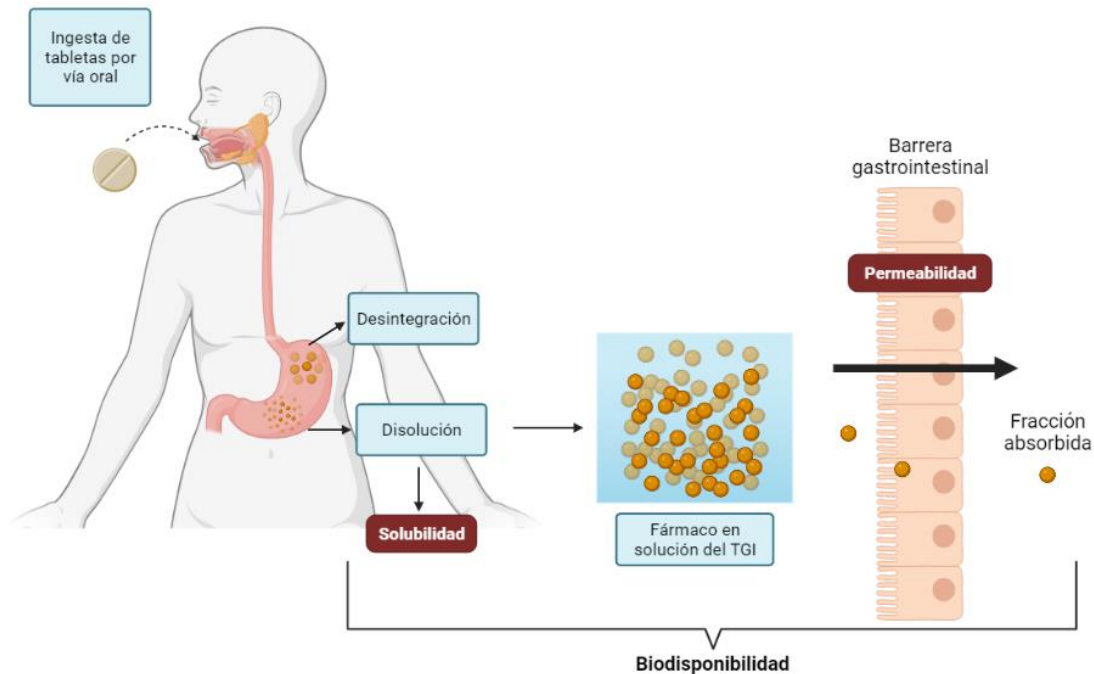


Figura 10. Proceso de administración de un fármaco por vía oral y los factores que intervienen en su biodisponibilidad ⁹⁰

Siendo la absorción intestinal el fundamento sobre el que se cimienta el SCB propuesto por Amidon y colaboradores, que tiene como objetivo predecir el desempeño *in vivo* de productos farmacéuticos a partir de mediciones *in vitro* de permeabilidad y solubilidad, agrupando a los fármacos en cuatro clases; I, II, III y IV con diferentes características (Figura 11). Se tiene un estimado de que los fármacos de clase II y IV con problemas de baja solubilidad presentan un 40 % y 70 % de todos los fármacos comercializados y un 90 % de las moléculas terapéuticas en desarrollo. ⁹¹

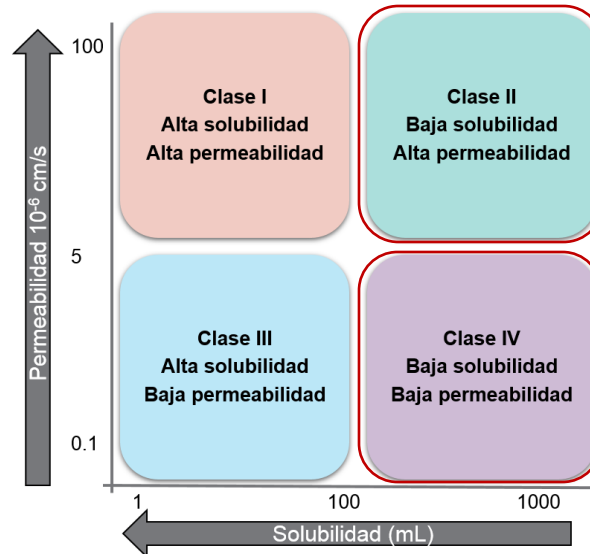


Figura 11. Sistema de clasificación biofarmacéutica

Por consecuencia a lo anterior, se considera que la baja solubilidad de los fármacos en los fluidos gastrointestinales es un factor de gran impacto sobre la eficacia terapéutica principalmente con los fármacos de la clase II; como la Nitazoxanida, donde la biodisponibilidad se puede aumentar con la mejora de la velocidad de disolución y la solubilidad de los fármacos en los fluidos gastrointestinales.

Existen características fisicoquímicas que afectan directamente la velocidad de disolución y la solubilidad acuosa de los fármacos. Estas características pueden ser modificadas para aumentar la solubilidad acuosa de los fármacos: el tamaño de partícula, el uso de cocristales, el uso de distintos polimorfos, etc.^{92,93}

Sin embargo, existe un segundo factor a considerar en el desarrollo farmacéutico, la permeabilidad, debido a que está implicada en la biodisponibilidad oral.

2.6.2. Permeabilidad intestinal de los fármacos

El tránsito del fármaco a través del TGI (Figura 12); después de ser administrado por vía oral, pasa al estómago que contiene un entorno ácido (pH 1.5-3.5) y una variedad de enzimas digestivas pero muy pocos fármacos se pueden absorber en este sitio. El intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) es el sitio principal para la absorción de fármacos, el cual tiene una gran superficie de 300 a 400 m², y está compuesto por microvellosidades

revestidas con células calciformes cuya función principal es secretar las glicoproteínas que forman el revestimiento mucoso del intestino delgado. ⁹⁴

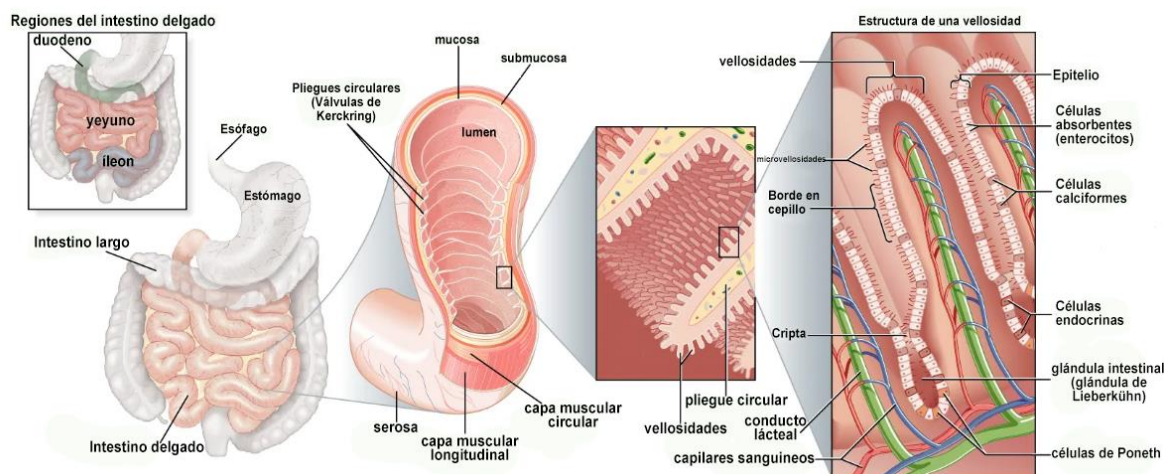


Figura 12. Tránsito del fármaco a través del tracto gastrointestinal

Esta mucosa es una capa rígida formada por el epitelio y la lámina propia, que es una fina capa de tejido situada directamente debajo de los enterocitos. La lámina propia está repleta de capilares, a través de los cuales la mayoría de las moléculas pueden pasar a la circulación sistémica, a este fenómeno se conoce como permeabilidad intestinal, el paso de nutrientes y fármacos a través de la membrana intestinal a circulación sistémica. ⁹⁴

Las moléculas del fármaco en solución pueden atravesar la membrana mucosa a través de varios mecanismos como; difusión pasiva que implica dos rutas diferentes, la ruta paracelular (los fármacos se difunden a través de los pequeños poros en las uniones estrechas entre los enterocitos) y la ruta transcelular (difusión de fármacos lipofílicos a través de los fosfolípidos de los enterocitos), mientras que el transporte de los fármacos también puede ser activo mediado por transportadores. Sin embargo, para que se dé el proceso de absorción, el fármaco debe encontrarse en su forma soluble para ser capaz de atravesar la barrera intestinal. ⁹⁴ Por lo cual, los fármacos con baja solubilidad acuosa pueden aumentar su absorción mejorando su velocidad de disolución; entre las técnicas que existen para mejorar estas características está la incorporación del fármaco en sistemas de administración basados en nanopartículas.

Los cuales, además de poder encapsular fármacos hidrofóbicos como la NTZ y controlar el perfil de liberación de los fármacos, también pueden facilitar el paso de los fármacos a través de la barrera mucosa. Por lo tanto, el desarrollo de nanosistemas de administración poliméricos puede mejorar la biodisponibilidad y la eficacia de los fármacos hidrofóbicos. ⁹⁵

2.7. Sistemas de liberación de fármacos basados en nanotecnología

Los sistemas de liberación de fármacos (DDS, *Drug Delivery Systems* por sus siglas en inglés) se definen como una formulación o dispositivo que permite incorporar sustancias terapéuticas que potencial y selectivamente alcanzan su sitio de acción.⁹⁶

Sin embargo, actualmente se están desarrollando nuevos sistemas de liberación de fármacos basados en nanotecnología, una ciencia cuyo primer reporte apareció en 1959 por el físico Richard Feynman quién introdujo el concepto de “Nanotecnología” refiriéndose a la construcción de un pequeño robot quirúrgico tragable. Siendo usado el concepto por primera vez en 1974 por el Dr. Norio Taniguchi, quien describió la capacidad de manipular materiales a niveles nanométricos.^{97,98}

Todo esto llevó al desarrollo y consolidación de la nanotecnología, que se basa en el control de la materia a una escala nanométrica (10^{-9} m) permitiendo la modificación y mejora de las propiedades fisicoquímicas de materiales y moléculas.⁹⁹

En particular, la nanotecnología aplicada en las ciencias farmacéuticas se conoce como nanotecnología farmacéutica, que tiene como objetivo desarrollar sistemas de liberación de fármacos a escala nanométrica denominados como nanopartículas (NPs), las cuales presentan tamaños de 10 a 1000 nm de diámetro, esta escala modifica el tamaño y las características superficiales de las NPs que le confieren ventajas en comparación a los DDS convencionales (comprimidos, inyectables, suspensiones, etc.).^{100,101}

Entre las ventajas que proporcionan las NPs a los fármacos están:

- Proteger a los fármacos de una degradación enzimática, química o inmunológica.
- Mejorar la estabilidad física y química de los fármacos.
- Aumenta el área superficial de los fármacos, mejorando su velocidad de disolución, su solubilidad acuosa y por tanto su biodisponibilidad oral.
- La capacidad de atravesar membranas biológicas como piel, mucosa intestinal, etc.
- Permitir una liberación prologada y dirigida hacia las células u órganos diana, disminuyendo efectos secundarios, tóxicos y manteniendo constante las concentraciones de fármaco en los sitios de acción, reduciendo la dosis y, por tanto, aumentando el índice terapéutico.

- Otra de las ventajas a considerar es la capacidad que tienen las NPs de adherir en su superficie moléculas que permitan mejorar sus aplicaciones farmacológicas y médicas. ^{97,101,102}

Las NPs son elaboradas por diversos materiales y tecnologías (Figura 13), clasificados de acuerdo con materiales poliméricos, lipídicos y metales e inorgánicas.¹⁰³

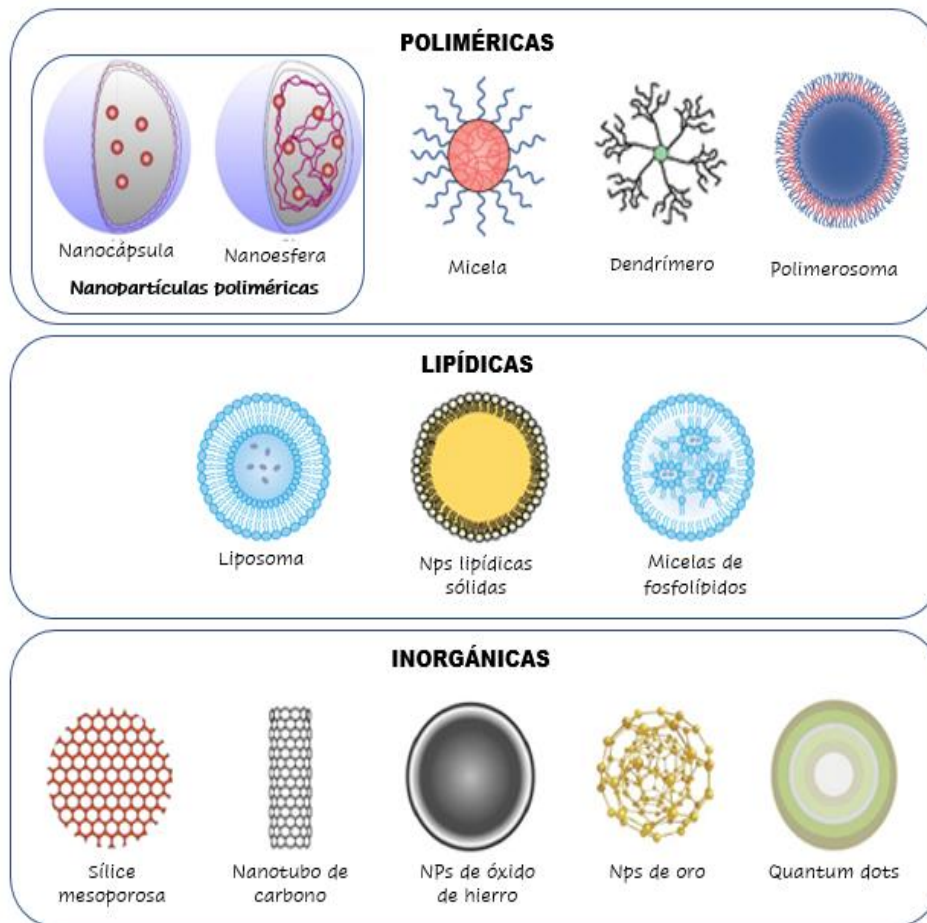


Figura 13. Nanoestructuras poliméricas, lipídicas e inorgánicas como sistemas de liberación de fármacos ¹⁰³

Por lo tanto, la nanotecnología ofrece múltiples aplicaciones, de acuerdo con el tipo de nanoestructura presentan diferentes ventajas y aplicaciones, en el caso de los materiales poliméricos estos son ampliamente utilizados en vías de administración oral y se tienen reportes de ser utilizados en tratamientos para infecciones virales, por lo cual en la siguiente sección serán descritas las características de las nanoestructuras poliméricas, en específico de las nanopartículas poliméricas.

2.8. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (PNPs) son partículas coloidales con tamaños menores a 1000 nm, de estructura sólida y aparentemente esféricas. Presentan propiedades como: estabilidad prolongada, alta capacidad de carga del fármaco y la capacidad de encapsular moléculas de fármaco tanto hidrófilas como hidrófobas para administrarse por vía oral, dérmica e inhalatoria. Dependiendo del método de preparación, se clasifican en dos formas, las nanocápsulas y nanoesferas (Figura 14).^{104,105}

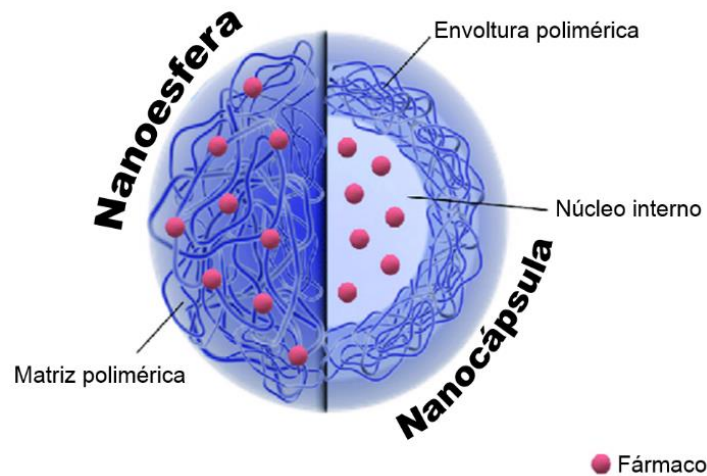


Figura 14. Estructuras de las nanopartículas poliméricas: nanocápsulas y nanoesferas¹⁰⁵

Las nanocápsulas, se consideran un sistema de depósito; compuestas por un núcleo en el que normalmente se disuelve el fármaco, rodeado por una envoltura polimérica que controla el perfil de liberación del fármaco desde el núcleo.¹⁰⁴

Mientras que las nanoesferas se consideran sistemas matriciales, basadas en una red polimérica continua en la que el fármaco puede retenerse en su interior o adsorberse en su superficie.¹⁰⁴

Las PNPs se forman a través de un proceso de autoensamblaje durante el cual los productos terapéuticos, como fármacos de bajo peso molecular y productos biológicos son encapsulados dentro del núcleo de las PNPs.¹⁰⁶

Para su elaboración se emplean polímeros naturales, semisintéticos o sintéticos, buscando que sean biodegradables, la elección de los polímeros y las condiciones de autoensamblaje brindan una considerable flexibilidad de diseño al permitir la modulación de las propiedades fisicoquímicas (tamaño, carga superficial e hidrofobicidad) y las propiedades de liberación (controlada).¹⁰⁶

2.8.1. Nanopartículas poliméricas en el tratamiento de infecciones antivirales

Las infecciones virales que, al ser consideradas como retos para la salud mundial, presentan desafíos en la utilidad clínica de las terapias antivirales, debido a que muchos fármacos antivirales presentan problemas como:¹⁰⁷

- a. Los medicamentos antivirales presentan una vida media corta, condicionando a la administración de dosis altas y tratamientos a largo plazo lo que complica la adherencia terapéutica de los pacientes.
- b. Los fármacos antivirales presentan problemas de baja solubilidad acuosa o baja permeabilidad condicionando una biodisponibilidad baja.
- c. La administración prolongada del medicamento promueve el surgimiento de cepas de virus resistentes.
- d. Dosis altas conllevan a la aparición de efectos secundarios graves.

El uso de PNP permite modificar las características tecnológicas de los fármacos que, al resolver los problemas de biodisponibilidad, toxicidad, aumentan los tiempos de residencia de los fármacos, reducen las dosis administradas, superando así los problemas de resistencia farmacológica. También se reporta la capacidad de llegar a los objetivos celulares específicos, reduciendo la presencia de efectos secundarios.^{108,109}

En la tabla 4, se muestran diferentes formulaciones que se han desarrollado a base de PNP para la encapsulación de diferentes fármacos antivirales como alternativas para los tratamientos de VHB, VHC y SARS-CoV2, siendo estos agentes causales de más relevancia e impacto en la salud pública.

Tabla 4. Nanosistemas poliméricos para los tratamientos de infecciones virales

Tipo de nanosistema	Fármaco	Virus	Ref.
Nanopartículas poliméricas de PLGA	Remdisivir	SARS-CoV 2	110
Nanopartículas poliméricas de PVP	Silibina	VHC	111
Nanopartículas poliméricas de PLGA-Albumina	Lamivudina	VHB	112
Nanopartículas poliméricas de PLGA	Ciclosporina A	VHC	113
Nanopartículas poliméricas de PEG-PLGA	Oligodesoxinucleótido de citosina fosfato guanósina	VHB	114



2.8.2. Materiales poliméricos utilizados para la preparación de las PNP

Los materiales poliméricos que se usan para preparar PNP deben cumplir con las siguientes características, deben ser biodegradables para que puedan ser fácilmente eliminados y sin desencadenar efectos secundarios, así como biocompatibles, es decir no tóxicos y no antigénicos.^{115,116}

Para seleccionar la matriz polimérica se deben considerar los siguientes factores: el tamaño de partícula del nanosistema, la solubilidad acuosa y permeabilidad del fármaco, la estabilidad del fármaco, la carga superficial, el perfil de liberación que se requiere obtener, la biodegradabilidad, biocompatibilidad y costo del polímero.¹¹⁷

Los polímeros más utilizados para preparar PNP son: el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), la policaprolactona (PCL), quitosano, alginato, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), diversos copolímeros como la policaprolactona-co-ácido láctico (PCLA) y copolímeros de óxido de etileno y propileno (PEO-PPO).¹¹⁷

La poli ϵ -caprolactona (PCL) es un poliéster alifático presenta características de biodegradabilidad y biocompatibilidad, además es no carcinogénica y debido a su baja temperatura de fusión de 64° C tiene propiedades viscoelásticas que la vuelven de fácil manipulación por lo que se pueden conseguir amplias formas y tamaños.^{118,119}

A temperatura ambiente, la PCL es poco soluble en agua en comparación del PLGA lo que permite la encapsulación de moléculas insolubles en agua entre sus redes poliméricas. Es soluble en diclorometano, benceno, cloroformo, 2-nitropropano, tetracloruro de carbono y ciclohexanona; ligeramente soluble en acetato de etilo, 2-butanona, acetonitrilo y dimetilformamida.^{118,119}

La PCL presenta una degradación hidrolítica por dos mecanismos: el primer mecanismo se da al penetrar el agua dentro de la matriz del polímero lo que provoca la escisión de la cadena polimérica. Este mecanismo muestra un patrón lineal de primer orden y predecible, que depende de la permeabilidad del agua y de la longitud del polímero. El segundo mecanismo se da solo cuando el polímero es altamente cristalino y presenta una longitud de cadena de bajo peso molecular, permitiendo que los pequeños fragmentos se difundan a través de la matriz del polímero; los productos finales de la



degradación son eliminados totalmente del organismo. Presenta propiedades de desintegración lenta, lo que permite diseñar formas farmacéuticas de liberación prolongada. ^{118,119}

2.9. Técnicas para elaborar sistemas de liberación de fármacos basados en PNP

La elección de la técnica a utilizar se basa en una serie de criterios como el tipo de disolvente a utilizar, las propiedades fisicoquímicas del principio activo, su tamaño y la carga del sistema nanométrico, así como la vía de administración a la que estará dirigida. ¹²⁰⁻¹²²

Actualmente se tiene registro de una variedad de técnicas que se describen en la tabla 5, utilizadas para la obtención de las PNP que se clasifican en dos amplias categorías; por dispersión de polímeros preformados como el PLA, PLGA, PCL, etc. Y por polimerización de monómeros, que se basa en utilizar sustancias como los polialquilcianoacrilatos, los cuales mecánicamente se polimerizan junto con el fármaco para obtener PNP cargadas.

123

Tabla 5. Técnicas para la preparación de nanopartículas poliméricas

Método de preparación	Vía de preparación	Características de las vías de preparación	Aplicaciones						
			Polímero utilizado	Fármaco cargado	Resultados de la caracterización			Año	Ref.
					Diámetro (nm)	Capacidad de carga (%)	Eficiencia de encapsulación (%)		
Dispersión de polímero preformado	Emulsión/Evaporación de disolvente	Se utilizan disolventes orgánicos parcialmente solubles en agua con baja toxicidad. Se utilizan estabilizadores para emulsión. Se utiliza una alta cantidad de agua para aumentar la miscibilidad del disolvente orgánico. El disolvente orgánico se elimina por evaporación. Útil para fármacos hidrofóbicos. Presenta una alta eficiencia de encapsulación del fármaco (>70%). Presenta dificultades en su escalamiento.	PLGA	Docetaxel	123.6 ± 9.5	0.56 ± 0.025	37.25 ± 1.6	2019	124
			mPEG-PCL	Indinavir	211.41	5.19	76.26	2019	125
			Quitosano Goma arábica	Curcumina	136.3 ± 3.9	3.57 ± 0.69	95.02 ± 0.03	2015	126
	Nanoprecipitación	Es un método rápido, utiliza disolventes orgánicos de baja toxicidad, reproducible y fácil de escalamiento. Entre las desventajas que presenta están el limitado uso para fármacos hidrofóbicos.	PLA-PEO	Paclitaxel	226 ± 1	2.66 ± 0.5	37.02 ± 1.5	2005	127
			PLC	Vitamina E	165	44	98	2012	128
	Salting-out	Se utilizan disolventes miscibles en agua (acetona, etanol, etc). Se utilizan agentes de salinización (electrolitos y no electrolitos). Uso exclusivo para fármacos lipofílicos. Se pueden suscitar incompatibilidades entre las sales y los fármacos.	PLGA	Sulfato de vincristina y clorhidrato de verapamilo	111.4 ± 2.35	N/D	55.35 ± 4.22 69.47 ± 5.34	2008	129
			PLGA	Verteporfina	370 ± 20	8.1 ± 0.03	81.6 ± 0.3	2005	130
	Diálisis	Se utilizan disolventes orgánicos miscibles en el cual se disuelve el polímero y se coloca dentro de un tubo de diálisis o membranas semipermeables. Entre las desventajas que presenta el método esta la poca solubilidad del polímero dentro de la membrana y su agregación. Y la posibilidad de una liberación prematura de la carga de fármaco debido a lo largo del proceso.	PLGA	Ácido polihidroxibutírico	508 ± 127	1.3	N/D	2009	131
			mPEG-PLGA	Alendronato	57.3 ± 2.2	9.7 ± 0.32	N/D	2007	132



Polimerización de monómero	Polimerización en emulsión	Método rápido y fácilmente escalable, se utilizan disolventes tóxicos, tensoactivos, monómeros e iniciadores que se eliminan de las partículas formadas.	Isobutilcianoacrilato	Ampicilina	56 ± 7	75 ± 5	N/D	1990	133
			Poli(etilcianoacrilato)	Insulina	500	85 ± 7.5	N/D	2002	134
	Polimerización en mini-emulsión	Se utilizan mezclas de monómeros, surfactantes, compuestos de bajo peso molecular como coestabilizadores y el uso de dispositivos como ultrasonidos para formar las PNPs.	Oligocaprolactona	Indometacina	244	92 ± 2	N/D	2003	135
			Poli (metacrilato de metilo-co-ácido acrílico)	Rivastigmina	58.3	N/D	95-78 ± 2.04	2021	136
	Polimerización en micro-emulsión	Son dispersiones isotrópicas y termodinámicamente estables de dos líquidos inmiscibles, estabilizadas por surfactantes. Presenta baja tensión interfacial, grande área interfacial y la capacidad de solubilizar líquidos inmiscibles.	Ácido Poli-L-láctico-poli(etilenglicol)	ARN de interferencia	200-700	2.3-5.1	70	2010	137
			Poli(metilmetakrilato-co-2-hidroxietilmetakrilato)	Curcumina	260	10 ± 5	95	2019	138
	Polimerización interfacial	Se utilizan dos monómeros o agentes reactivos que se disuelven en dos fases, una continua y una dispersa, donde la reacción se lleva a cabo en la interfaz de los dos líquidos. Es útil para encapsular ingredientes activos que puedan ser sensibles a la oxidación u otro tipo de degradación.	Isobutilcianoacrilato	Insulina	249 ± 32	N/D	90	1999	139

N/D: No determinado por los autores.

Sin embargo, al analizar las características, ventajas y desventajas que ofrecen los diferentes métodos para la elaboración de PNPs; y al considerar las propiedades fisicoquímicas de NTZ, el método por emulsión/evaporación de disolvente permite la encapsulación de fármacos hidrofóbicos como la NTZ en nanoesferas con una alta eficiencia de encapsulación, por lo cual en la siguiente sección se describirán las particularidades de este método.



2.10. Caracterización de las PNPs

La caracterización de las PNPs se centra en sus propiedades físicas, tamaño, morfología, área superficial, cristalinidad y estado de dispersión. Las cuales son evaluadas por diversos métodos analíticos que engloban técnicas microscópicas, de dispersión de luz, de difracción y espectroscópicas, las cuales se enlistan en la tabla 6.¹⁴⁰

Tabla 6. Técnicas para la caracterización de nanopartículas poliméricas

Técnica	Características fisicoquímicas analizadas
Dispersión de luz dinámica (DLS)	Distribución hidrodinámica del tamaño
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Tamaño y distribución de tamaños. Agregación de formas
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	Tamaño y distribución de tamaños. Heterogeneidad de formas Agregación de formas
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	Tamaño y distribución de tamaño Forma Estructura Agregación de formas
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Estado fisicoquímico y posibles interacciones entre el fármaco y polímero
Resonancia magnética nuclear (RMN)	Estructura Composición Pureza Cambio conformacional
Espectroscopía infrarrojo (IR)	Estructura y conformación de bioconjugados. Análisis de grupos funcionales
Espectroscopía de masas (MS)	Peso molecular Composición Estructura
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Contenido y liberación del fármaco <i>in vitro</i>

En las siguientes subsecciones se describirán a mayor detalle los parámetros descritos anteriormente y su importancia en la caracterización fisicoquímica de las PNPs.

2.10.1. Caracterización física y morfológica

2.10.1.1. Tamaño y distribución de las partículas

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño son parámetros relevantes de determinar debido a que se encuentran relacionados con la carga de fármaco, su liberación, distribución *in vivo*, orientación tisular y toxicidad.¹⁴⁰

Generalmente, las PNPs presentan tamaños promedio entre 100 y 500 nm. Se menciona que el tamaño de las partículas influye directamente en su distribución y adhesión en los vasos sanguíneos, los pulmones y el tracto gastrointestinal; así mismo su tamaño condiciona la liberación del fármaco, siendo las PNPs de menor tamaño las que presentan áreas superficiales mayores, en donde el fármaco se encontrará adherido a la superficie de la partícula generando una liberación rápida. Sin embargo, tienden a sufrir aglomeraciones durante su almacenamiento. En el caso de las PNPs con rangos de mayor tamaño, tienden a difundir en periodos de tiempo prolongados.

En el caso del rango de distribución de tamaño de las PNPs conocido como índice de polidispersión (PDI), nos indica el grado de homogeneidad del tamaño entre las partículas, en una escala de 0 a 1, donde 0 nos indica una población de partículas completamente homogéneas y 1 poblaciones con un alto grado de heterogeneidad, considerando un rango estándar ≤ 0.2 para poblaciones con una distribución de tamaño homogéneo.^{141,142}

La técnica por dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) es la más utilizada para analizar el tamaño y la distribución del tamaño de las partículas, presenta tiempos cortos de medición y bajos costos comparado con técnicas por microscopía avanzada.¹⁴³ En la figura 15, se puede observar un ejemplo de medición con la técnica de DLS.

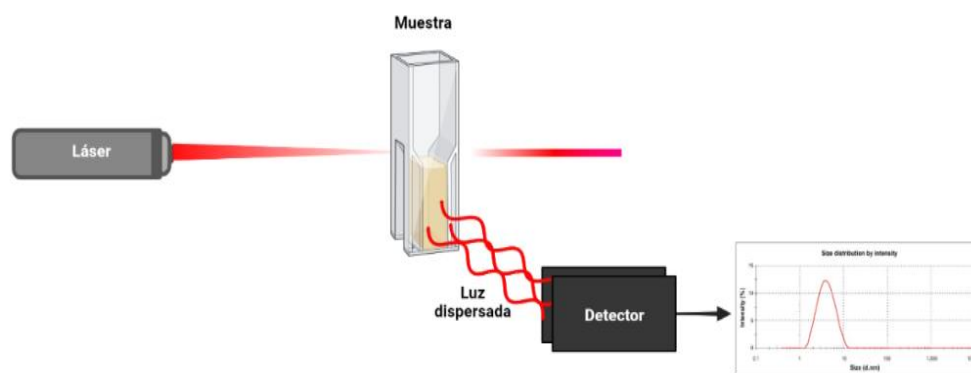


Figura 15. Técnica de dispersión dinámica de la luz analizando tamaño de partícula por intensidad.

2.10.1.2. Morfología

La morfología de las partículas puede afectar la adhesión celular, el transporte de las partículas, su destino intracelular, tiempo de circulación sistémico, biodistribución y toxicidad. Las PNPs de forma esférica son las más comunes; sin embargo, se pueden obtener otras morfologías (planas, cilíndricas, tubulares, cónicas o amorfas) dependiendo del polímero y de la composición de las NPs.¹⁴⁴ Elsabahy y colaboradores, mencionan que las PNPs de forma esférica presentan una mayor internalización celular comparada con las de forma cilíndrica.¹⁴⁵

La morfología de superficie de las PNPs se puede determinar generalmente por técnicas de imagen como la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés); siendo esta última la más utilizada y que tiene la capacidad de distinguir entre nanoesferas y nanocápsulas, así como determinar el grosor de la pared de la nanocápsula. Otra técnica utilizada para la determinación morfológica es la microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) la cual presenta información en alta resolución y una topografía compleja de la superficie de las nanopartículas.¹⁴²

2.10.2. Características químicas y estructurales de las PNPs

2.10.2.1. Carga electrostática superficial

La carga electrostática superficial de una nanopartícula es relevante debido a que determina sus interacciones electrostáticas con el medio circundante a la PNPs.

Un factor relacionado con la carga superficial es la estabilidad de los sistemas coloidales entre ellos las PNPs, siendo estimada por el potencial zeta (ζ), el cual mide de forma indirecta el potencial electrostático cerca de la superficie de una partícula, es decir el punto entre el plano de deslizamiento y la capa de Stern, indicando la magnitud de repulsión entre las partículas que se encuentran dispersas en un medio líquido.¹⁴⁴

El potencial zeta es analizado comúnmente por la técnica de DLS y medido en milivoltios (mV), donde magnitudes superiores a ± 60 mV son establecidas como una excelente estabilidad, magnitudes de ± 30 mV son consideradas como el estándar para las



suspensiones reportando una estabilidad aceptable, lo cual indica que no se generen agregaciones, floculaciones o precipitaciones en las formulaciones. También se reportan partículas con un potencial zeta entre ± 10 mV, haciendo referencia a partículas con carga neutra.¹⁴⁶ De acuerdo con Khan y colaboradores, se estima que las partículas con carga positiva son eliminadas más rápidamente y tienen una mayor captación reticuloendotelial comparadas con las que presentan cargas neutras o negativas.¹⁴⁷ Sin embargo, Chopra y colaboradores mencionan que las PNP con recubrimientos de quitosano que añaden carga positiva a la partícula, la cual presenta una atracción por las cargas negativas de la membrana celular, permitiendo un aumento en la permeabilidad de los fármacos con baja permeabilidad.¹⁴⁸ Por lo cual, se deben de tener en cuenta los siguientes factores que llegan a alterar al potencial zeta, entre ellos el pH del medio, la fuerza iónica, la concentración del tensioactivo (usado como estabilizador) y la temperatura a la cual están expuestas las PNP.¹⁴⁹

2.10.2.2. Cristalinidad e interacciones polímero-fármaco

En el estado sólido los fármacos, polímeros y excipientes, están estructurados por una red molecular cristalina. La cristalinidad es definida por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés) como *“una retícula cristalina perfectamente ordenada, en donde cada molécula ocupa su lugar esperado en la retícula. Mientras que el otro extremo es el estado amorfo, en el que un sólido contiene la mayor densidad posible de imperfecciones (defectos de diversas dimensiones), donde se pierde todo el orden de largo alcance y donde sólo permanece el orden de corto alcance, impuesto por las moléculas adyacentes más cercanas”*.¹⁵⁰

Siendo relevante analizar el estado físico de los fármacos y excipientes, por las características de baja solubilidad acuosa que presentan en estado cristalino, mientras que en estado amorfo presentan una mayor solubilidad (Figura 16).

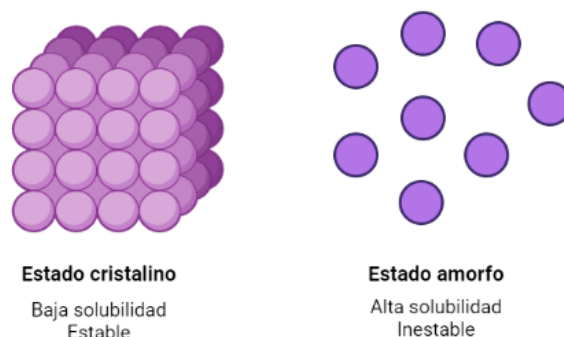


Figura 16. Estado sólido de los fármacos

Sin embargo, su inestabilidad física los conduce a retomar una forma cristalina, lo cual se pretende solucionar al incorporar a los fármacos en estado amorfo con polímeros de uso farmacéutico. El uso de técnicas físicas como la difracción de rayos X de polvos (DRXP) nos ayuda a determinar si existe la presencia de redes cristalinas en el fármaco.¹⁵¹

Cuando el polímero y el fármaco presentan una buena incorporación, estos generan fuerzas intermoleculares; considerando una interacción fuerte las cuales permiten que el material polimérico sea capaz de solubilizar al fármaco sin que este se cristalice, mientras que las interacciones más débiles propician una cristalización del fármaco. Para analizar estas interacciones se utilizan técnicas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y la espectroscopía Infrarroja (IR, por sus siglas en inglés).¹⁵¹

2.10.3. Carga de fármaco y eficiencia de encapsulación en las PNP

Se entiende como carga de fármaco a la cantidad de fármaco que se encuentra unido a una masa de polímero, manejando unidades de moles de fármaco por mg de polímero, o mg de fármaco por mg de polímero. Para ser determinada, es necesario disolver las PNP cargadas de fármaco en un disolvente orgánico en el cual la matriz polimérica sea soluble, dando como resultado una concentración total del fármaco dentro de la PNP, la cual es analizada por espectroscopia UV-Visible o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), y relacionada con la siguiente ecuación:^{152,153}

$$\text{Carga de fármaco (\%)} = \frac{\text{Cantidad de fármaco en una masa de PNP (mg)}}{\text{Masa total de las PNP (mg)}} \times 100$$

Por otra parte, la eficiencia de encapsulación hace referencia a la relación entre la cantidad de fármaco encapsulado o absorbido y la cantidad teórica de fármaco que es utilizado para las PNP. Siendo determinada a través de técnicas de separación como la ultracentrifugación, en donde se analiza el fármaco libre que se encuentre en el sobrenadante posterior a ser centrifugadas las PNP, y cuantificado por espectroscopia UV-Visible o HPLC, y relacionada con la siguiente ecuación:^{152,153}

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{Cantidad de fármaco en una masa de PNP (mg)}}{\text{Cantidad teórica de fármaco en las PNP (mg)}} \times 100$$



2.11. Liberación de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas

La liberación de fármacos es otro factor por considerar en el desarrollo de los nanosistemas poliméricos, debido a que los mecanismos de liberación del fármaco se relacionan con la estabilidad del fármaco, el desarrollo de la formulación y los resultados terapéuticos.

Kamaly y colaboradores, definen a la liberación de fármacos como el transporte de una molécula de fármaco desde una posición inicial en la matriz polimérica hasta la superficie exterior de la matriz y, por último, a como es liberado en un medio externo.¹⁵⁴

La velocidad de liberación del fármaco a partir de las PNPs depende de factores como:

- La solubilidad del fármaco
- El método de preparación
- pH del medio
- Temperatura
- La desorción del fármaco unido a la superficie o absorbido.
- La difusión del fármaco a través de la matriz de las PNPs
- El hinchamiento y la erosión de la matriz de las PNPs
- Una combinación de procesos de erosión y difusión

La liberación de fármacos se puede realizar de varias formas (Figura 17); de acuerdo con el tipo de PNPs que se desarrollen, en el caso de las nanoesferas el fármaco se libera al sufrir erosiones en la matriz polimérica que encapsula al fármaco. Presentando una rápida liberación de fármaco en forma de ráfaga, este efecto se relaciona con una débil unión entre el fármaco y la superficie de las PNPs, mientras que el fármaco mayormente unido es liberado de forma sostenida (liberación por degradación de la matriz).^{144,154}

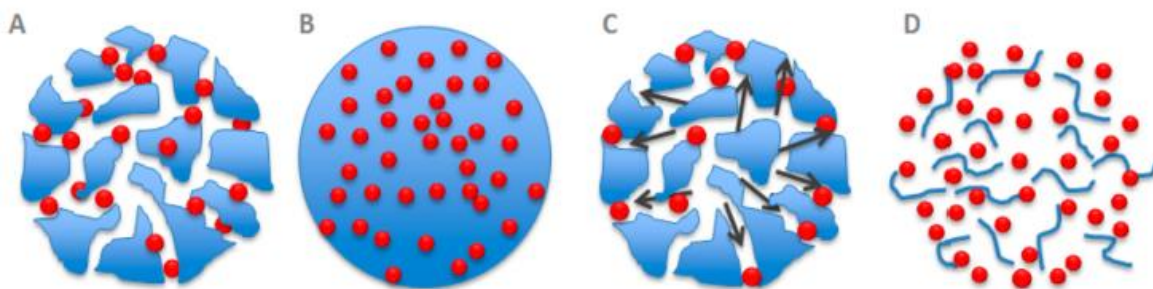


Figura 17. Mecanismos de liberación de fármacos de las PNPs: (A) difusión a través de poros llenos de agua, (B) difusión a través de la matriz polimérica, (C) bomba osmótica, y (D) erosión¹⁵⁴

En el caso de las nanocápsulas, la liberación está controlada por la difusión del fármaco a través de la capa polimérica; sin embargo, por la interacción iónica que existe entre el fármaco y el polímero se pueden formar complejos que llegan a inhibir la liberación del fármaco de la nanocápsula (liberación por difusión). También existen otros tipos de liberación, por estímulos externos (temperatura, pH, etc) y por bombeo osmótico. ^{144,154}

2.11.1. Evaluación *in vitro* de la liberación de fármacos

La evaluación del perfil de liberación de los fármacos en modelos *in vitro* permite determinar la cinética de liberación del fármaco y muestra una predicción del rendimiento en los sistemas *in vivo*. Para esto, se utilizan diversos métodos *in vitro* como: (a) bolsa de diálisis invertida, (b) difusión por bolsa de diálisis, (c) por centrifugación o ultra centrifugación, (d) agitación, y (e) por membrana biológica o artificial. ¹⁵⁵

El método de bolsa de diálisis se utiliza con más frecuencia para determinar los perfiles de liberación de los fármacos de nanosistemas poliméricos, este método se utiliza para evaluar el desarrollo de la formulación, facilitar el control de calidad y ayuda a tener una mejor correlación *in vitro-in vivo*. ¹⁵⁶

2.12. Permeabilidad de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas

La permeabilidad intestinal es considerada una propiedad intrínseca de los fármacos; sin embargo, el uso de nanosistemas poliméricos que son diseñados para la administración oral, permite proteger a los fármacos contra la degradación enzimática y ácida del TGI, mientras que por su tamaño las PNP presentan una gran área superficial que puede interactuar con las superficies intestinales, lo que aumenta la solubilidad del fármaco intralumen y mejora el transporte a través de la barrera gastrointestinal. ^{157,158}

Las PNP se enfrentan a diferentes barreras intestinales que dificultan su paso hacia la circulación sistémica o linfática, una de ellas es la capa de moco que recubre el epitelio intestinal. Dentro de los componentes de la capa de moco, se encuentran las mucinas unas glicoproteínas que forman la capa gelatinosa. ¹⁵⁹

Para que se pueda dar el transporte de las PNP deben adherirse a la capa del moco que es conocido como mucoadhesión y posteriormente se difunden a través de esta capa. En



donde, la mucoadhesión de las PNP's prolonga el tiempo de permanencia en la superficie de la mucosa, se debe considerar que si se presenta una adhesión fuerte las PNP's se pueden quedar atrapadas en la capa de moco y pueden ser eliminadas junto con la rápida eliminación del moco.¹⁵⁹

Otra de las barreras a las que se enfrentan las PNP's, es la capa de absorción que está formada por los enterocitos, las células M y las células calciformes, produciéndose la permeación intestinal de las PNP's por las vías paracelulares y transcelulares (Figura 18).

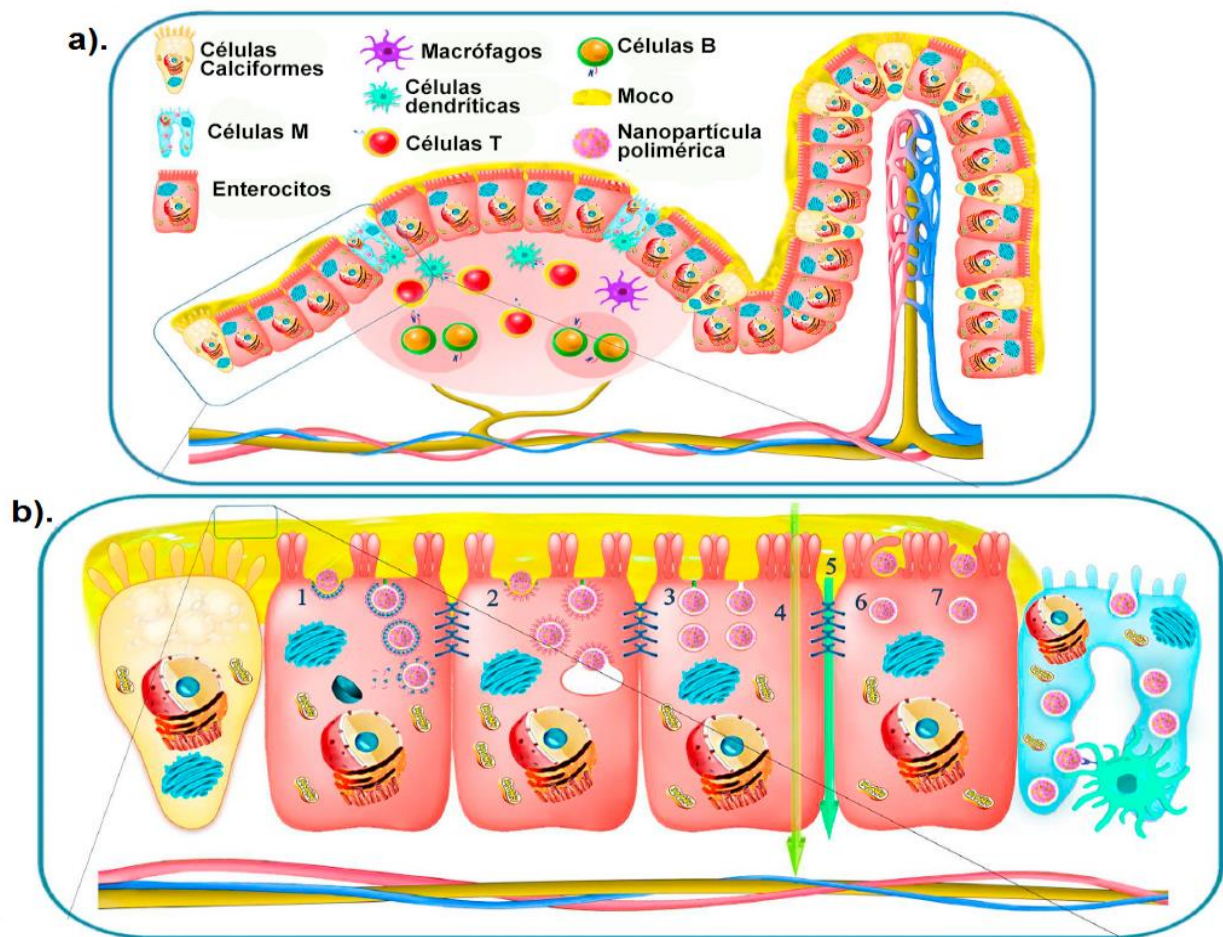


Figura 18. Permeabilidad de las PNP's; a). placa de Peyer ileal y b). Tipos de transporte de las PNP's por los enterocitos: 1. Endocitosis dependiente de clatrina, 2. Endocitosis mediada por caveola, 3. Endocitosis independiente de clatrina y caveola, 4. Difusión pasiva, 5. Transporte paracelular, 6. Micropinositosis y 7. Fagocitosis.¹⁵⁹

2.12.1. Evaluación de la permeabilidad intestinal por modelos tisulares *ex vivo*

Los estudios *ex vivo* se basan en experimentos realizados en tejidos que son extraídos de organismos vivos y se mantienen en un ambiente externo controlado para simular condiciones naturales. Al usar tejidos aislados se pretende tener un contacto cercano con la mucosa intestinal intacta con la posibilidad de disponer del epitelio intestinal con un entorno celular y con proteínas de transporte similares a los biológicos. Por lo tanto, este modelo permite una mayor interacción y comunicación cruzada entre los componentes celulares e imitando las condiciones *in vivo* de los organismos. ^{160,161}

Existen diferentes modelos *ex vivo* intestinales siendo el más usado lo modelos por difusión en los cuales se encuentran el método por celdas de Franz. Su uso se remonta desde el año 1975, son usadas tradicionalmente en estudios de permeabilidad cutánea. En la figura 19, se muestra una representación esquemática del modelo usado para evaluar la permeabilidad *ex vivo* por celdas de Franz usando una membrana de intestino delgado.

162,163

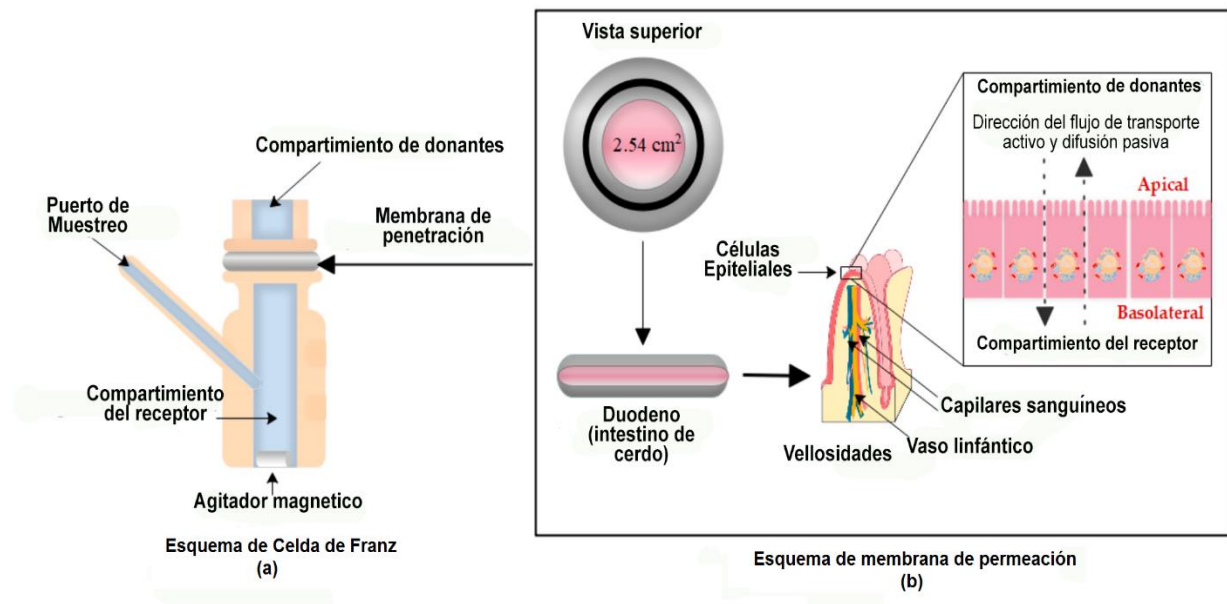


Figura 19. Representación de estudio de permeabilidad *ex vivo* con celdas de Franz (a) usando una membrana de intestino delgado (b). ¹⁶²

3. JUSTIFICACIÓN

Las hepatitis virales son enfermedades infectocontagiosas que causan inflamación y daño en el hígado, siendo las hepatitis B y C causadas por VHB y VHC; respectivamente, las que presentan un mayor problema de salud pública en el mundo. En el caso de México, durante el 2019 se tiene un estimado de 737 casos anuales de hepatitis B y un promedio de 2182 casos anuales de hepatitis C, que es preocupante debido a la transmisión del virus y el posterior desarrollo de la enfermedad. Teniendo en cuenta que las manifestaciones clínicas de las hepatitis B y C crónicas representan un alto riesgo, por su latencia, complicaciones a largo plazo (cirrosis hepática, insuficiencia hepática y cáncer de hígado); y que las terapias estandarizadas (interferones alfa, análogos de nucleótidos y antivirales de acción directa) presentan problemas de efectos adversos graves, resistencia farmacológica, baja respuesta terapéutica, y altos costos, se está optando por el reposicionamiento terapéutico de una molécula segura, efectiva y con bajos costos.

La Nitazoxanida (NTZ), una tiazolida antiinfecciosa de amplio espectro ha presentado en estudios *in vitro* actividad contra la replicación de VHB y VHC, y también de sus productos virales. Lo que se traduce en reducir el material genético de los virus, mostrando así alta efectividad y también la seguridad de no presentar a mediano o largo plazo resistencia farmacológica. Sin embargo, su baja solubilidad acuosa (7.5 µg/mL) y sus formas farmacéuticas comerciales (tabletas y suspensiones) ocasionan problemas de baja biodisponibilidad oral ($\leq 3\%$), requiriendo altas dosis, una administración frecuente y constante, comprometiendo su efectividad terapéutica.

Entre las estrategias que se usan en la modificación de fármacos con problemas de solubilidad acuosa, se encuentran los nanosistemas de liberación, específicamente las nanopartículas poliméricas, que son utilizadas en tratamientos de enfermedades crónicas debido a que sus características (tamaño de partícula nanométrico, alta carga de fármaco, modificación de superficie, etc) permiten al fármaco tener una mayor solubilidad acuosa, mayor tiempo de residencia, liberación controlada, etc. Lo que modificaría las propiedades farmacocinéticas del fármaco, obteniendo una mayor biodisponibilidad y, por tanto, mejores efectos terapéuticos, logrando así, generar y evaluar un nanosistema polimérico que permita la encapsulación de NTZ, que modifique sus propiedades de solubilidad acuosa y conserve sus características de fármaco altamente permeable, para obtener una alternativa efectiva e innovadora.



4. HIPÓTESIS

El nanosistema de liberación a base de nanopartículas poliméricas permitirá la encapsulación de Nitazoxanida, optimizando su solubilidad, velocidad de liberación y la velocidad de permeación en condiciones del TGI, logrando una liberación sostenida en ensayos *in vitro* y que el fármaco encapsulado sea más permeable que el fármaco puro en modelos *ex vivo*, resultado en una forma innovadora para su administración oral con una mayor biodisponibilidad de Nitazoxanida.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Desarrollar un nanosistema de liberación basado en nanopartículas poliméricas cargadas de Nitazoxanida, y caracterizar los perfiles de liberación *in vitro* y permeabilidad *ex vivo* como indicadores de una potencial alternativa en el tratamiento de las hepatitis crónicas por VHB y VHC.

5.2. Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones para el desarrollo de un método analítico por HPLC, para la cuantificación del principio activo: Nitazoxanida.
2. Realizar una revisión bibliográfica de los materiales como: polímeros, estabilizantes y disolventes para seleccionar los que serán utilizados en el proyecto.
3. Por medio de un diseño experimental se determinarán las condiciones óptimas (concentración de polímero y estabilizante) del proceso para la preparación de las PNPs por el método de emulsión simple/evaporación de disolvente para lograr un tamaño de partícula ≤ 500 nm, un PDI ≤ 0.2 y una capacidad de carga \geq a 1% (respecto a la relación polímero/fármaco).
4. Preparar las PNPs cargadas con NTZ por el método de emulsión simple/difusión de disolvente considerando los niveles óptimos del diseño experimental.
5. Caracterizar las PNPs cargadas con NTZ óptimas respecto a su morfología (por microscopía electrónica de barrido), tamaño de partícula, PDI y potencial zeta (por DLS), interacción polímero-fármaco (por DSC), capacidad de carga y eficiencia de encapsulación (por HPLC).
6. Llevar a cabo ensayos de liberación *in vitro* de NTZ a partir de las PNPs y de NTZ en polvo, para comparar sus perfiles de liberación.
7. Realizar pruebas de permeabilidad en modelos *ex vivo* de intestino de cerdo con la formulación optimizada de PNPs.

6. EQUIPOS Y MATERIALES

6.1. Materia prima

- Nitazoxanida, obtenida de tabletas de 500 mg de Farmacias del Ahorro ®.
- Alcohol polivinílico (PVA), Sigma-Aldrich ®.
- Policaprolactona (PCL), Sigma-Aldrich ®.
- Manitol (Ludiflash ®), BASF Pharma ®.

6.2. Reactivos y material utilizado

- Agua destilada y tridestilada
- Acetato de etilo (grado analítico)
- Acetato de amonio
- Acetonitrilo (grado analítico)
- Metanol (grado analítico)
- Ácido fosfórico
- Ácido acético
- Dimetilsulfóxido
- Fosfato monosódico monohidratado, Fermont ®.
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 1000 mL
- Matraces aforados de 10, 250, 500 y 1000 mL
- Matraz fondo de balón de 250 mL
- Probetas de 10, 50 y 100 mL
- Tubos falcón de 15 y 50 mL
- Agitadores magnéticos
- Puntas para micropipetas de 20, 200 y 1000 μ L
- Jeringas de insulina de 10 mL
- Membranas de filtración de 0.25 y 0.45 μ m
- Vidrios de reloj
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Bolsas de diálisis
- Microcubeta de cuarzo
- Embudo de separación



- Celda de plástico
- Celda capilar plegada DTS1070
- Columna agilent Zorbax CN de 4.6 x 250 mm.
- Celdas de Franz

6.3. Equipos

- Balanza analítica.
- Bomba de vacío, Millipore ®.
- Centrifuga (IBT).
- Centrifuga Minispin, eppendorf ®.
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Hitachi Elite LaChrom modelo L-2000 ®
- Micropipetas de 10, 200 y 1000 µL.
- Sistema de filtración, Millipore ®.
- Sonicador, Cole-Parmer ®.
- Parrilla de agitación.
- Vortex.
- Potenciómetro, Oakton pH700 ®.
- Parrilla de calentamiento y agitación.
- Rotaevaporador, Buchi ®.
- Zetasizer, Malvern ®.
- Espectrofotómetro.
- Ultraturrax, IKA ®.

6.4. Software

- Empower 3
- Malvern Zetasizer 7.1
- Statgraphics XVI
- Origin 2019



7. METODOLOGÍA

7.1. Desarrollo del método analítico para la cuantificación de Nitazoxanida

El objetivo principal del desarrollo de un método de cuantificación es determinar las concentraciones de NTZ provenientes de muestras que se obtienen de diferentes experimentos de lisis de PNPs-NTZ, liberación *in vitro* y permeabilidad *in vitro*, se desarrolló el método de cuantificación utilizando la técnica de HPLC con detector UV-Visible.

7.1.1. Preparación de soluciones

Solución stock de NTZ (1000 µg/mL)

Se tomó un peso equivalente a 10 mg de NTZ, posteriormente se disolvió con 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) en un matraz volumétrico de 10 mL, se agitó en un vortex y se aforó con 5 mL de metanol de grado analítico. Obteniendo una concentración final de 1000 µg/mL.

Solución de trabajo de NTZ

- **100 µg/mL:** Se tomó una alícuota de 1 mL con una micropipeta de la solución stock y se diluyó con 10 mL de metanol que se utiliza como parte de la fase móvil. Y se agitó con vortex.
- **10 µg/mL:** Se tomó una alícuota de 100 µL de la solución stock y se aforó a 10 mL con acetonitrilo utilizado en la fase móvil, y se agitó con vortex.

Buffer de acetato de amonio a 12 mM

Se utilizó un buffer de acetato de amonio para realizar nuevas condiciones del método analítico para la cuantificación de NTZ. Para preparar un litro de buffer, se pesaron un total de 0.9249 g de acetato de amonio que corresponde a la concentración de 12 mM en un volumen de 1000 mL de agua tridestilada previamente filtrada, a la solución se agregó el 0.1 % v/v (1 mL) de dietilamina y fue ajustada a un pH de 4.0 con ácido acético.



7.1.2. Curva de cuantificación

Se preparó una curva de cuantificación de NTZ, utilizando una solución de trabajo de NTZ con una concentración de 10 µg/mL y para el aforo se utilizó acetonitrilo (ACN) siguiendo las condiciones de la tabla 7.

Tabla 7. Curva de cuantificación en el rango de 0.1-2 µg/mL

Puntos de la curva de calibración	Concentración (µg/mL)	Volumen de alícuota tomado de la solución de trabajo de NTZ a 10 µg/mL (µL)	Volumen de aforo con ACN (µL)	Volumen final (mL)
1	0.1	10	990	1
2	0.25	25	975	1
3	0.50	50	950	1
4	0.75	75	925	1
5	1	100	900	1
6	1.5	150	850	1
7	2	200	800	1

7.1.3. Longitud de onda de máxima absorción

Se realizó un barrido en la región UV-Visible en el rango de 200 a 500 nm para determinar la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) de NTZ, utilizando un espectrofotómetro UV-Visible.

7.1.4. Condiciones cromatográficas para el desarrollo del método de cuantificación

El análisis cuantitativo de NTZ se realizó por la técnica de HPLC, utilizando un cromatógrafo Hitachi Elite LaChrom modelo L-2000 con detector UV-Visible. En la tabla 8, se muestran las condiciones cromatográficas para la obtención del método de cuantificación.



Tabla 8. Condiciones para el método de cuantificación de NTZ

Fase estacionaria: Columna	Agilent Zorbax CN (5 μ m, 4.6 x 250 mm)
Fase móvil	ACN:Buffer de acetato de amonio (0.1% v/v de dietilamina a pH 4.0) 45:55
Volumen de inyección	25 μ L
Flujo	1 mL/min
Longitud de onda	347 nm
Rango de cuantificación	0.1-2 μ g/mL
Temperatura	Ambiente
Tiempo de corrida	8 min

7.1.5. Validación del método de cuantificación para Nitazoxanida

Para validar el método de cuantificación se revisaron la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C (CNQFBM) y la NOM-177-SSA1-2013, las cuales establecen los parámetros de desempeño que se deben analizar para el desarrollo de la validación de un método analítico, considerando para este trabajo los siguientes: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y especificidad.

7.1.6. Linealidad

Se conoce como la capacidad del método analítico de obtener respuestas proporcionales a la concentración del analito de una muestra dentro de un intervalo de trabajo determinado. Para su evaluación se prepararon curvas de cuantificación por triplicado por dos días, con siete niveles de concentración establecidas en el punto 7.1.2. de acuerdo con lo establecido en la guía de validación de métodos analíticos del CNQFBM. Y posteriormente se analizaron por HPLC con las condiciones del punto 7.1.4. los datos obtenidos se analizaron en el software Microsoft Excel y Origin Pro, determinando el coeficiente de correlación (r),



coeficiente de determinación (r^2), el intercepto (b) y el intervalo de confianza de la pendiente (m).

7.1.7. Precisión

De acuerdo con la guía de validación del CNQFBM, se refiere a la relación o concordancia entre los resultados analíticos, cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a diferentes proporciones de la muestra. Se evaluó la repetibilidad del método, mismas condiciones analíticas y mismo analista. Se utilizó la solución stock y la solución de trabajo a una concentración de 10 µg/mL especificadas en el punto 7.1.1. Se prepararon tres niveles en punto bajo, medio y alto de acuerdo con las condiciones de la tabla 9 con cinco réplicas por cada nivel durante dos días diferentes. Y se analizaron con las condiciones cromatográficas del punto 7.1.4. Los datos obtenidos se analizaron en el software Microsoft Excel, se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 9. Concentraciones en nivel bajo, medio y alto para determinar precisión y exactitud

Nivel de concentración	Concentración (µg/mL)	Volumen de alícuota tomado de la solución de trabajo de NTZ a 10 µg/mL (µL)	Volumen de aforo con ACN (µL)	Volumen final (mL)
Bajo	0.3	30	970	1
Medio	0.9	90	910	1
Alto	1.75	175	825	1

7.1.8. Exactitud

Hace referencia a la semejanza entre un valor obtenido empleando el método desarrollado y el valor de referencia que fue calculado como porcentaje de recobro. Se utilizaron las concentraciones de la tabla 8, se evaluaron por cinco replicas cada nivel. Para determinar los porcentajes de recobro se utilizó la siguiente ecuación, reportándose el coeficiente de variación del porcentaje de recobro obtenido:

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



7.1.9. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) hace referencia a la concentración mínima del analito en una muestra, la cual es detectada pero no necesariamente puede ser cuantificada. Para su evaluación se siguió lo establecido en la guía de validación del CNQFBM, en base a la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen. De la curva de calibración se determinaron los valores de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza de la pendiente (IC (b_1)), la ordenada al origen (b_0) y se calculó su desviación estándar (Sb_0); obteniendo el LD con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times Sb_0}{b_1}$$

El límite de cuantificación (LC) se refiere a la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud. Para su estimación se tomó en cuenta la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen, determinándose la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza de la pendiente (IC (b_1)), a ordenada al origen (b_0) y se calculó la desviación estándar de la ordenada al origen (Sb_0) estimándose el LD con la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10 \times Sb_0}{b_1}$$

7.1.10. Selectividad/especificidad

Se establece como la capacidad de medir de forma precisa y específica el analito de interés en presencia de otros componentes. Para lo cual se analizaron los diferentes componentes de la fase móvil, los polímeros PCL y PVA en suspensión con acetato de etilo en una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Así como el buffer de fosfatos a pH 6.8 utilizado en los estudios de liberación y diferentes blancos de cada solvente utilizado, se realizaron corridas analíticas con las condiciones mencionadas en el punto 7.1.4.



7.2. Selección de materias primas para la formulación de PNPs

Se llevó a cabo una consulta bibliográfica para determinar los disolventes y polímeros a utilizar para la formulación de las PNPs de acuerdo con su solubilidad, toxicidad y biocompatibilidad.

7.3. Diseño experimental para la preparación de PNPs optimizadas

Se realizó un diseño experimental (DoE) 2² para la optimización de las nanopartículas, fue analizado mediante el Software *Statgraphics Centurion XVI*. En la tabla 10, se muestran los factores y niveles utilizados, así como las variables de respuesta que se evaluaron.

Tabla 10. Factores, niveles y respuestas establecidas para el diseño experimental

Factores		Niveles	
		Bajo	Alto
X1	PCL (mg)	30	60
X2	PVA (%)	0.5	4
Respuestas evaluadas			
Y1	Tamaño de partícula (nm)		
Y2	Índice de polidispersión		
Y3	Potencial zeta (mV)		
Y4	Eficiencia de encapsulación (%)		
Y5	Capacidad de carga (%)		
Y6	Liberación (%/h)		

En la tabla 11, se establece la matriz del DoE en la cual se especifican los valores a utilizar para cada formulación.

Tabla 11. Matriz del diseño experimental para la optimización de las nanopartículas

N° de experimento	Formulación	PCL (mg)	PVA (%)
1	F1	30	0.5
2	F2	30	4
3	F3	60	0.5
4	F4	60	4
5	F1	30	0.5
6	F2	30	4
7	F3	60	0.5
8	F4	60	4



7.4. Preparación de las nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas se prepararon por el método de emulsión simple/ difusión de disolvente. Como primera etapa, se preparó una mezcla de acetato de etilo y agua destilada en una proporción (1:3), se saturaron las fases por agitación magnética en un embudo de separación a temperatura ambiente por 5 minutos, se dejó reposar por 10 minutos para dar paso a la separación entre la fase orgánica (acetato de etilo) de la fase acuosa (agua destilada).

Posterior a ello, se prepararon dos soluciones, la solución 1 consiste en 6 mL de fase orgánica en la que se encuentran disueltos 10 mg de NTZ y la PCL, la cual fue pesada de acuerdo con las cantidades establecidas en el DoE de la tabla 11 y se mantuvo en agitación magnética a 40° C durante 10 minutos.

La solución 2 se preparó con 9 mL de la fase acuosa en la que se disolvió el PVA como estabilizador según la concentración requerida para cada formulación descritos en la tabla 11, se mantuvo en agitación magnética a 40°C por 10 minutos.

Posteriormente, se homogenizaron la solución 1 y 2 en un Ultra turrax ® a 12 000 rpm durante 10 minutos. Se obtuvo una nanosuspensión, a la cual se le añadieron 16 mL de agua destilada. Posterior a esto, se evaporó el acetato de etilo en un rotavapor a 40°C a 90 rpm durante 15 minutos.

De la nanosuspensión obtenida se tomó una alícuota de 100 µL para medir el tamaño de partícula, el índice de polidispersión y potencial zeta.

Finalmente, se centrifugó la nanosuspensión de un volumen final de 25 mL en tubos falcón de 50 mL, en una centrifuga a 11 000 rpm durante una hora y media a 20° C, se decantó el sobrenadante y se guardó para su posterior cuantificación en el HPLC.

El pellet recobrado se resuspendió en 10 mL de agua destilada y se agregó un crioprotector, por cada 10 mL de nanopartículas resuspendidas se agregaron 100 mg de D-manitol para su almacenamiento y posterior liofilización.

Previo a la liofilización, se congelaron las muestras a -70°C con hielo seco, la liofilización de las muestras congeladas se realizó en las siguientes condiciones a -40°C al vacío por aproximadamente 24 horas. Una vez liofilizadas, se pesaron 10 mg de cada formulación para estudios de liberación y 10 mg para la lisis de nanopartículas.



7.5. Caracterización de las nanopartículas

7.5.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersión

Para la determinación del tamaño de partícula y la distribución de las partículas, se tomó una alícuota de 1 mL de la nanosuspensión previo a la centrifugación, de la cual se tomaron 20 µL y se añadió a 1 mL de agua destilada obteniendo una concentración 1:100, el volumen final se transfirió a una celda de 1 cm de grosor con un ángulo fijo de 90°. Las muestras fueron analizadas por DLS con un equipo Zetasizer nano ZS90, con tres réplicas de trece lecturas por cada muestra, empleando el software Zetasizer de Malvern en la versión 7.1.

7.5.2. Potencia zeta

Para la determinación del potencial zeta, se tomó una alícuota de 1 mL de la nanosuspensión previo a la centrifugación, de la cual se tomaron 20 µL y se añadió a 1 mL de agua destilada obteniendo una concentración 1:100, el volumen final se transfirió a una celda capilar plegada DTS1070. Las muestras fueron analizadas por DLS por un equipo Zetasizer nano ZS90, con tres réplicas de trece lecturas por cada muestra, empleando el software Zetasizer de Malvern en la versión 7.1.

7.5.3. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga

Para evaluar la eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (CC) del fármaco en las nanopartículas, se pesaron 10 mg del material liofilizado de cada formulación, se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL con 1.5 mL de acetato de etilo, se colocaron bajo agitación constante durante 24 horas en un vortex. Posterior a ello, se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm en una centrifuga mini spin durante 15 minutos. Posteriormente, se filtraron las muestras en una membrana de nylon de 0.25 µm para su análisis por HPLC para cuantificar la concentración de NTZ presentes en las muestras.

La EE y la CC se calcularon con las siguientes formulas:

$$\% EE = \frac{\text{Peso total de NTZ} - \text{Fármaco libre}}{\text{Peso total de NTZ}} \times 100$$

$$\% CC = \frac{\text{Peso total de NTZ} - \text{Fármaco libre}}{\text{Peso total de la formulación de PNPs Secas}} \times 100$$



7.5.4. Espectroscopía Infrarroja

Para la obtención de los espectros de IR se utilizó un espectrofotómetro de Infrarrojo Thermo Scientific Nicolet 6700 en un intervalo de 4000 a 350 cm^{-1} con sonda ATR. Se utilizó una muestra de aproximadamente 1 mg de materias primas y nanopartículas para su comparación.

7.5.5. Difracción de Rayos X de Polvos

El análisis se realizó en un equipo BRUKER D8-ADVANCE con un detector LynxEye ($\lambda_{\text{Cu-K}\alpha 1} = 1.5406\text{\AA}$), a temperatura ambiente en un rango de ángulo $2\theta = 5-40$. El análisis requiere aproximadamente 50 mg de muestra que puede ser recuperada al final de este. Los sólidos obtenidos y las materias primas se analizan por DRXP y se compararon directamente utilizando el software ORIGIN®.

7.5.6. Calorimetría diferencial de barrido

Los análisis DSC, se llevaron a cabo en un equipo TA DSC Q 2000. La muestra de 3 mg aproximadamente se coloca en una charola de aluminio y se someten a un rango de temperatura de 0 a 400 °C. Inicialmente se estabiliza el horno a 25 °C y posteriormente se calienta a una velocidad de calentamiento de 20°C/min, con un flujo de nitrógeno de 50 mL/min como gas de purga. Los sólidos obtenidos de la preparación se analizan esta técnica y se comparan contra las materias primas.

7.6. Estudio de liberación *in vitro*

El estudio de liberación de NTZ se determinó por el método de diálisis modificado a partir del estudio de la referencia 164. Se realizó por duplicado utilizando las nanopartículas formuladas con la matriz experimental y NTZ en solución.

Para el estudio de liberación (Figura 20), se tomó un peso equivalente a 10 mg de nanopartículas de NTZ y 10 mg de NTZ pura, la masa fue colocada en una bolsa de diálisis de 7 cm de largo y resuspendida en 2 mL de buffer de fosfatos a pH 6.8. Posterior a esto,



las bolsas de diálisis se cerraron herméticamente. Para el medio de disolución, se preparó un volumen de 80 mL de solución buffer de fosfatos a pH 6.8 simulando condiciones intestinales, volumen que fue vertido en vasos de precipitado de 100 mL a los cuales se les colocó un agitador magnético y se situaron dentro de un baño termostático a una temperatura de 37 °C con agitación constante de aproximadamente 100 rpm. Posteriormente, las bolsas de diálisis se sumergieron dentro de los vasos de precipitado (tiempo cero) y se inició con el muestreo, tomando alícuotas de 1 mL del medio del vaso de precipitado de cada formulación en intervalos de tiempo establecidos: 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 10, 12, 23 y 24 horas, posterior a su evaluación se optó por un reajuste en el DoE y en el tiempo de liberación para observar un mayor comportamiento en la cinética, estableciendo un tiempo de 1, 2, 4, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60 y 72 horas. Después de cada muestra, se repuso el volumen tomado con medio nuevo de manera inmediata para mantener las condiciones sink.



Figura 20. Liberación *in vitro* de NTZ y PNP-NTZ: A. Bolsas de diálisis con fármaco colocadas en el medio de liberación (buffer de fosfatos pH 6.8) y B. Sistema utilizado para el estudio de liberación *in vitro*.

El medio de liberación extraído se filtró y analizó por el método de HPLC descrito en el punto 7.1.4. Los resultados se reportan con el perfil de liberación en gráficos del porcentaje de fármaco liberado vs tiempo.

7.7. Estudio de permeabilidad

Para realizar el estudio de permeación *ex vivo* de las PNPs-NTZ optimizadas y de NTZ en suspensión se utilizaron celdas de Franz con un área de difusión de 2.835 cm²; así mismo, se utilizó una membrana biológica de intestino delgado proveniente de cerdos sacrificados en rastros, el intestino fue lavado previamente y colocado en solución salina (Figura 21 A).

Se realizaron cortes circulares del intestino de cerdo, con diámetros similares al de los compartimentos de la celda de Franz (Figura 21 B). Posteriormente, en el compartimento receptor se colocaron 6 mL de buffer de fosfatos a pH 6.8, un agitador magnético y sobre el compartimento receptor, se situó la membrana de intestino de cerdo para llevar a cabo la difusión del fármaco entre los compartimentos de la celda (Figura 21 C). Posterior a esto, los compartimentos de la celda fueron sujetados por un sistema a presión que permite una hermeticidad del sistema (Figura 21 D). En la parte del compartimento donador, se colocó la suspensión de las PNPs-NTZ, que fue preparada pesando 10 mg de los lotes optimizados de las PNPs de NTZ (r=4) y resuspendidos en tubos Eppendorf con 2 mL de buffer de fosfatos a pH 6.8 y adicionados en el compartimento donador. Para evaluar la permeabilidad de NTZ en suspensión, se pesaron 10 mg de NTZ y solubilizada en 500 µL de ACN, esta solución se aforó con 4.5 mL de buffer de fosfatos a pH 6.8, obteniendo un volumen de 5 mL que se adicionaron en los compartimentos receptores de las celdas (r=4).

Una vez preparadas las celdas se cerraron los compartimentos donadores y se colocaron en el sistema de permeabilidad que consiste en un baño de agua a 37 °C con una agitación magnética constante de 100 rpm y una gradilla para mantener a las celdas suspendidas (Figura 21 E). El estudio se mantuvo durante 4 horas con tiempos de muestreo distribuidos en: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos, en los cuales fueron tomadas alícuotas de 500 µL del compartimento receptor por el conducto de muestreo y colocando instantáneamente el mismo volumen con medio nuevo para mantener las condiciones. Las alícuotas se centrifugaron y analizaron con las condiciones cromatográficas del punto 7.1.4.

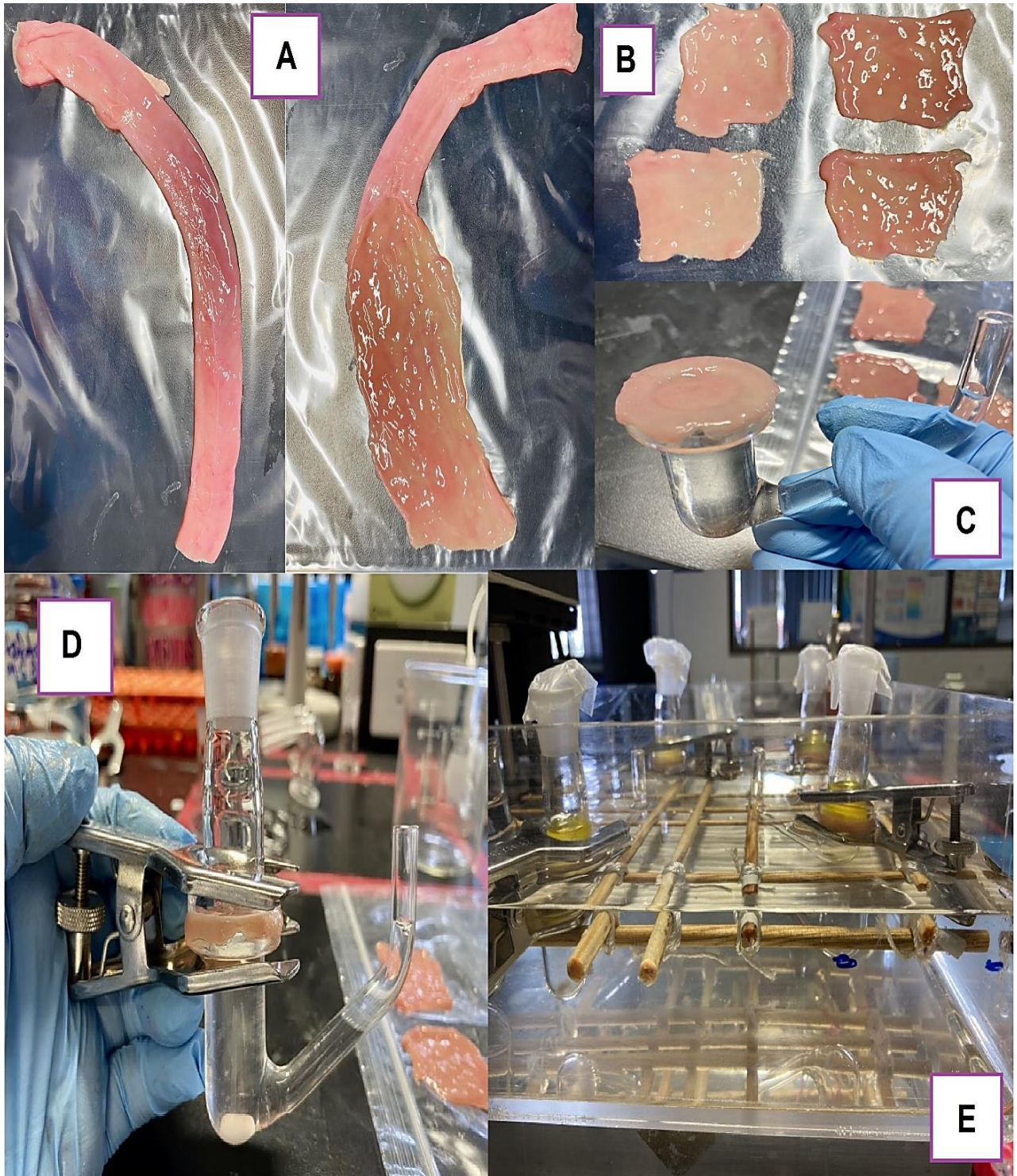


Figura 21. Estudio de permeabilidad *ex vivo*: A. Intestino delgado de cerdo, B. Cortes del intestino para utilizar en el estudio, C. Membrana de intestino de cerdo colocada en el compartimento receptor de la celda de Franz, D. Celda de Franz con membrana de intestino de cerdo cerrada herméticamente y E. Sistema utilizado en el estudio de permeabilidad.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Desarrollo del método analítico para la cuantificación de Nitazoxanida

8.1.1. Determinación de la longitud de onda de máxima absorción

En la Figura 22, se muestra el barrido de NTZ en la región UV-Visible en un rango de 200 a 500 nm analizado con la curva de cuantificación del punto 7.1.2., indicando que NTZ presenta una longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}) a 347 nm. Malesuik y colaboradores ¹⁶⁵, reportan que NTZ disuelta en ACN absorbe en un λ_{\max} a 345 nm, esto es verificado por Sachan y colaboradores ¹⁶⁶, que obtuvieron una λ_{\max} de 328 nm para NTZ disuelta en una mezcla de metanol: agua (50:50).

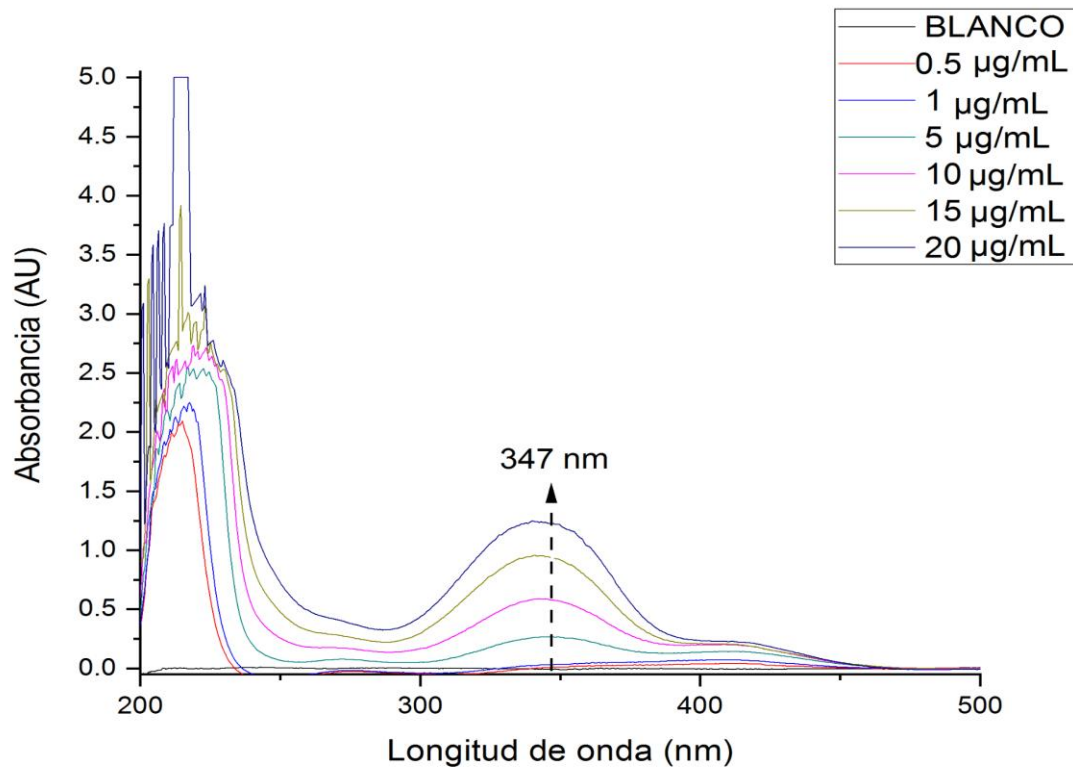


Figura 22. Espectro de absorción en UV-Visible de NTZ

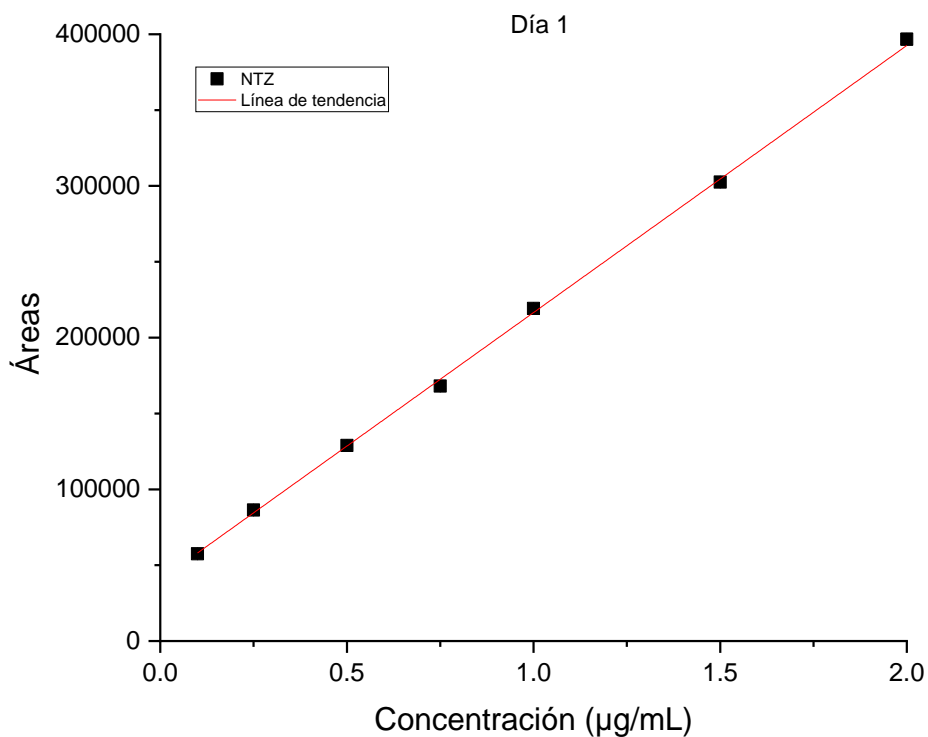
8.1.2. Validación del método de cuantificación de NTZ

Tomando como referencia los criterios de aceptación establecidos en la guía de validación del CNQFBM se observa que en la tabla 12, el parámetro de linealidad con datos tomados del día 1 representativo a 3 días (gráfica 1) cumple con el criterio establecido, así mismo se considera dentro de los criterios a los parámetros de precisión y exactitud. En el caso del límite de detección, el analito puede ser verificado en concentraciones menores que el rango de la curva también puede ser cuantificado con precisión y exactitud en el rango más bajo de la curva de calibración.

Tabla 12. Resultados de la evaluación de los parámetros de desempeño para la validación del método de cuantificación de NTZ por HPLC.

Parámetro		Especificación	Resultado	
Linealidad	Coefficiente de correlación (r)	≥ 0.99	0.9993	
	Coefficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98	0.9986	
	IC (m)	$m \neq 0$	177295	
			Valor mínimo ($\alpha=0.05$)	175892.55
			Valor máximo ($\alpha=0.05$)	178697.40
Error debido a la regresión	$\leq 2\%$	1.70 %		
Precisión	Coefficiente de variación	$\leq 2\%$	0.47 %	
Exactitud	Coefficiente de variación del recobro	$\leq 2\%$	Nivel bajo	2.30 %
			Nivel medio	1.12 %
			Nivel alto	1.42 %
Límite de detección (LD)		$\mu\text{g/mL}$	0.048	
Límite de cuantificación (LQ)		$\mu\text{g/mL}$	0.146	

Por tanto, el método para cuantificar NTZ cumple con los requerimientos necesarios y asegura ser confiable y efectivo para los fines de este proyecto.



Gráfica 1. Curvas de calibración representativas de 2 días de evaluación de linealidad ($r=3$)

8.1.3. Selectividad/especificidad

Para determinar la selectividad del método para la cuantificación de NTZ se analizaron muestras blanco de los materiales y disolventes utilizados por HPLC. En la figura 23, 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, el método es específico para la cuantificación de NTZ sin interferencia alguna.

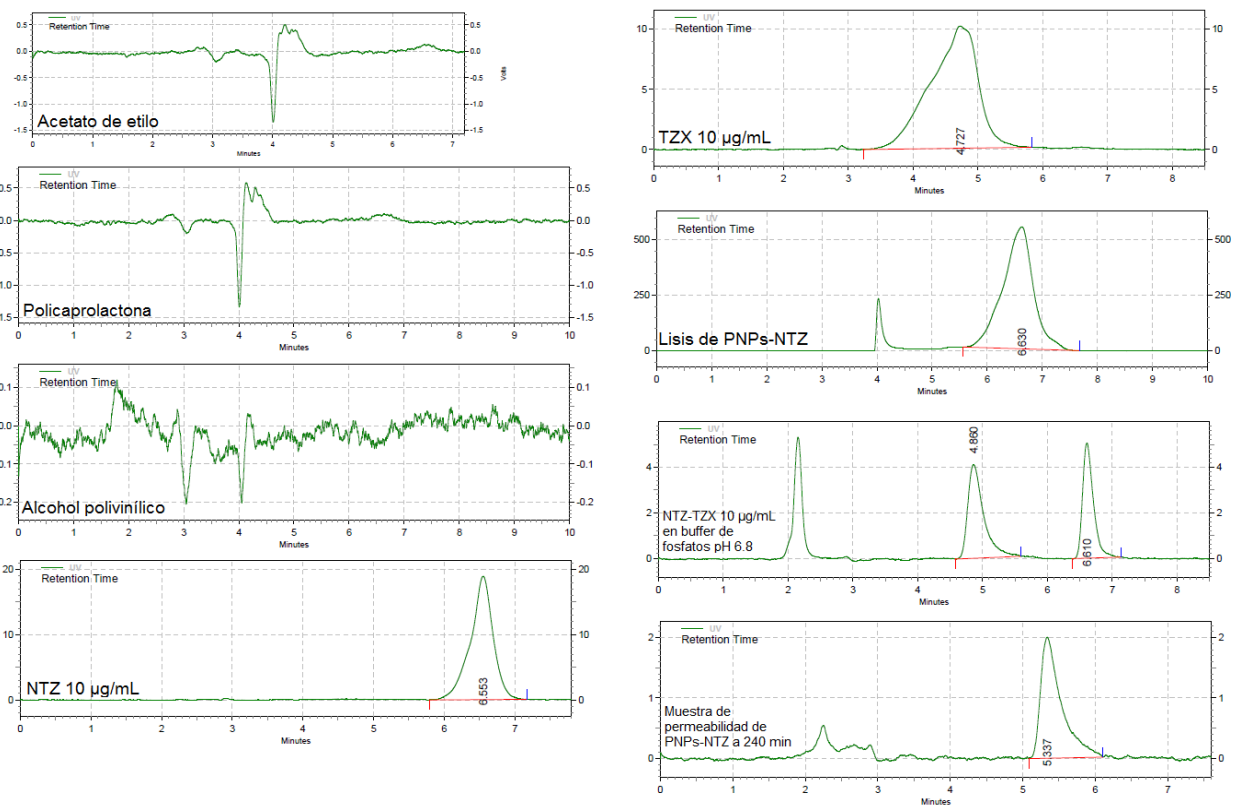


Figura 23. Serie de cromatogramas de los diferentes componentes de la formulación, NTZ y de nanopartículas cargadas con NTZ.

8.2. Selección de materiales

Para la selección de los materiales a utilizar se realizó una consulta bibliográfica, donde se analizaron diferentes polímeros, considerándose a la policaprolactona (PCL) por costo, accesibilidad, biodegradabilidad y sus características de biocompatibilidad para formar la matriz polimérica de la nanopartícula. Y al alcohol polivinílico (PVA), como estabilizador de la nanosuspensión.

Se realizó una consulta bibliográfica de la solubilidad del fármaco en diferentes disolventes orgánicos que se muestran en el anexo 1, optando por el acetonitrilo como el disolvente polar que presentó una mejor solubilidad en fracción molar de 2.011×10^{-3} , y se utilizó para las determinaciones analíticas. Se eligió acetato de etilo como disolvente para las pruebas de preformulación, debido a que el polímero a utilizar es ligeramente soluble en este solvente, presenta un mejor perfil toxicológico al respecto a otros solventes utilizados en la preparación de las PNP's, por lo que es considerado para las aplicaciones biomédicas.

8.3. Caracterización y evaluación de las nanopartículas poliméricas por DoE

8.3.1. Primer DoE

8.3.1.1. Caracterización física del primer DoE

De acuerdo con los factores y niveles establecidos en el DoE planteado en el punto 7.3 para la formulación de PNPs de NTZ por el método de emulsión simple/difusión de disolvente, se evaluaron las respuestas de tamaño, índice de polidispersión, potencial zeta, eficiencia de encapsulación, capacidad de carga y el porcentaje de fármaco liberado a 24 horas.

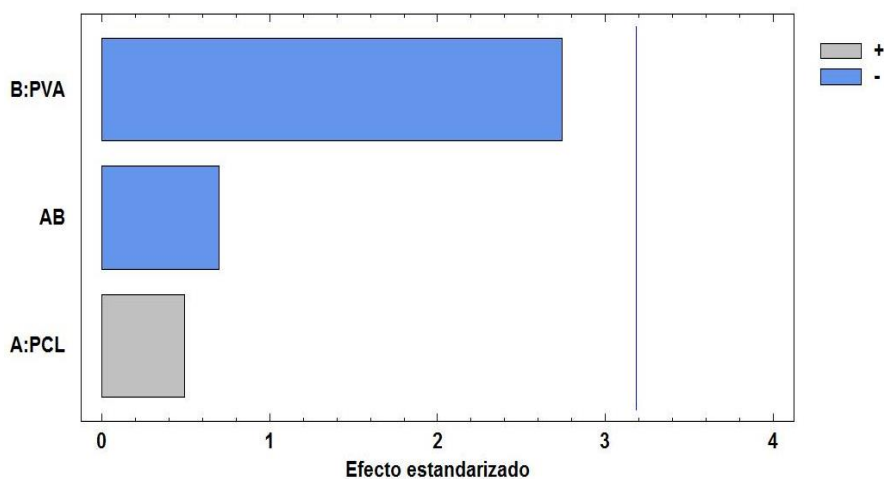
En la tabla 13, se muestra los resultados obtenidos, se puede observar que el tamaño de partícula varía desde 463 a 1003, en las diferentes formulaciones, mientras en el PDI se mantiene entre 0.346 a 0.380 en las formulaciones 1 a 3, la formulación 4 muestra un PDI menor a los demás (0.118). De esto se puede mencionar que las formulaciones 1, 2 y 4 muestran partículas de tamaño nanométrico mientras que la formulación 3 presenta partículas mayores que una micra. Los valores de PDI en general indican que la dispersión de tamaños en todas las formulaciones es muy homogénea. Los valores de potencial Z indican que las formulaciones de PNPs son estables. La capacidad de carga de estas formulaciones fue menor al 1 %, mientras que la eficiencia de carga fue mayor al 90 para todas ellas.

Tabla 13. Resultados de la caracterización física de las PNPs-NTZ de acuerdo con el primer DoE (n=2)

DoE	Formulación	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	CC (%)	EE (%)
1	1	816	0.346	-5.67	0.8	98.9
	2	495	0.380	-8.44	0.2	98.9
	3	1003	0.349	-10.63	0.7	99.2
	4	463	0.118	-10.76	0.2	98.5

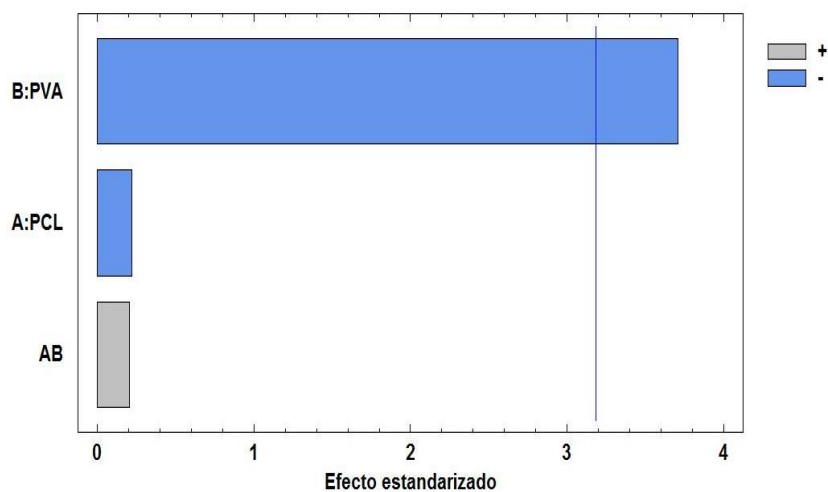


En el gráfico 2, se observa el diagrama de Pareto para el tamaño de partícula el cual no muestra significancia entre los factores evaluados; sin embargo, el tamaño de la barra (azul) indica que, si se manipula el PVA, el tamaño de partícula puede verse afectado más que si se manipula el polímero PCL.



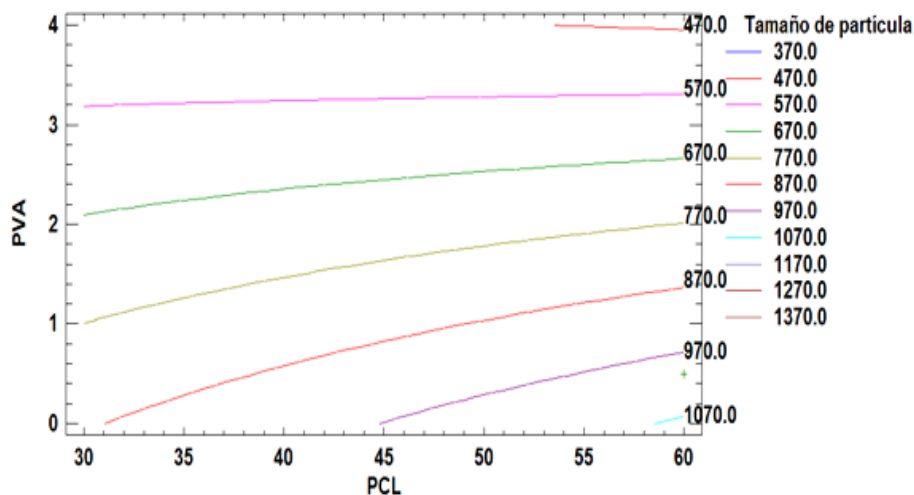
Gráfica 2. Diagrama de Pareto del tamaño de partícula

En el gráfico 3, se observa en el diagrama de Pareto que el PVA tiene un efecto significativo en la capacidad de carga del fármaco, también se puede visualizar que en la variable del PVA tiene un efecto negativo, esto quiere decir que las respuestas tienen a disminuir si hay un aumento en el factor.



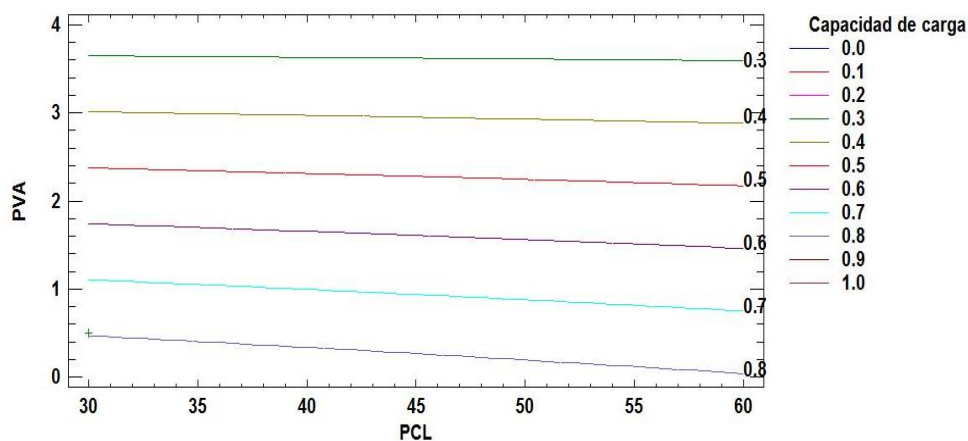
Gráfica 3. Diagrama de Pareto de la capacidad de carga de fármaco

Para optimizar el tamaño de partícula que es esencial para el desarrollo del nanosistema polimérico, se evaluó el efecto de los factores a través del contorno de superficie. En la gráfica 4, se observa que para obtener un tamaño de partícula ≤ 500 nm, el PVA debe tomar valores mayores a 3 % en la formulación, mientras que la PCL podría manejarse con un contenido de peso entre 40 y 60 mg.



Gráfica 4. Contorno de superficie de respuesta para el tamaño de partícula del 1er DoE

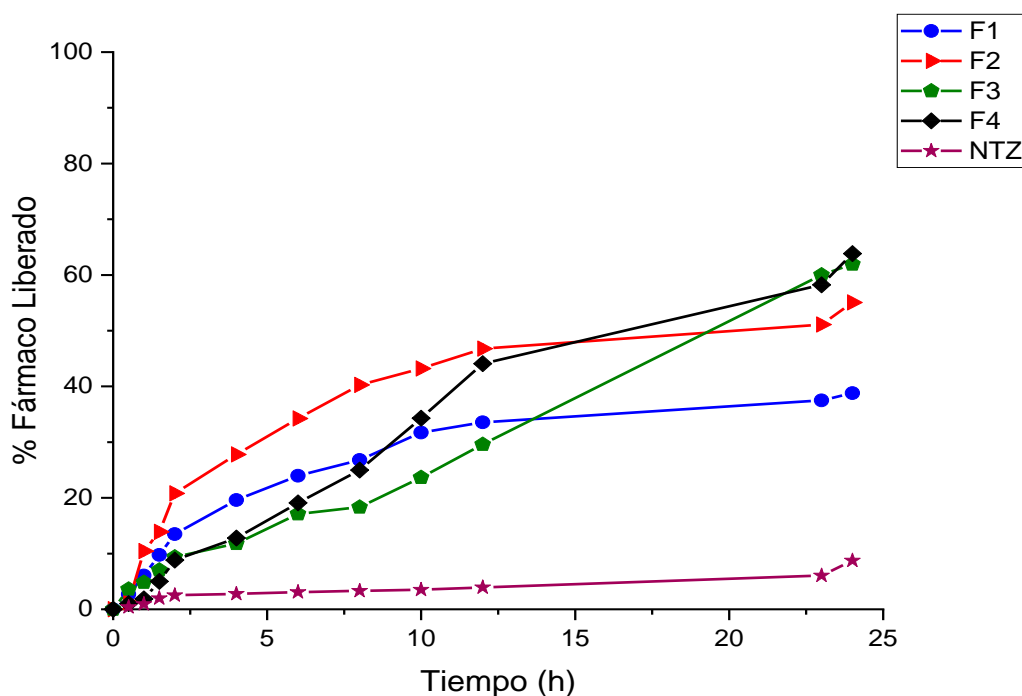
En la gráfica 5, se observa el contorno de superficie de respuesta para la optimización de la capacidad de carga de las PNPs, al incrementar el % de PVA la respuesta disminuye, de forma que considerando lo relacionado al tamaño de partícula, un contenido de 2 a 3 % de PVA, la capacidad de carga predicha en la superficie de respuesta se encontraría entre un 0.5 a 0.7 %, manteniendo la formulación a nivel de nanopartículas.



Gráfica 5. Contorno de superficie de respuesta para la capacidad de partícula del 1er DoE

8.3.1.2. Evaluación *in vitro* del perfil de liberación del primer DoE

La liberación de NTZ a partir de las formulaciones de PNPs-NTZ con el primer DoE se muestran en la gráfica 6, comparando las cuatro formulaciones (n=2) contra NTZ en solución en las mismas condiciones experimentales, en donde se puede observar que las cuatro formulaciones a base de PNPs mostraron un mejor perfil de liberación en comparación al de NTZ en solución que a las 6 horas mostró del 3 % de fármaco liberado. Así mismo se observa que a las 6 horas se tiene un porcentaje liberado del 58 % y 27 % para la formulación 2 y 4. A 24 h, la formulación 2 presentaba un 89 % de fármaco liberado, la formulación 4 un 73 % y la NTZ en solución solamente presentó un 9 % de fármaco liberado.



Gráfica 6. Perfiles de liberación *in vitro* de las PNPs-NTZ del 1er DoE (n=2)

De los resultados obtenidos en el primer diseño, se puede concluir que para mantener la máxima capacidad de carga (entre 0.5 y 0.7 %) de las nanopartículas, el PVA debe mantenerse en un intervalo de 2 a 3 %, lo cual garantizaría un tamaño de partícula a nivel nanométrico, entre 500 y 700 nm. Por estas razones se propuso manejar un segundo diseño 2², evaluando el efecto de los factores PVA y PCL.

8.4. Desarrollo, caracterización y evaluación de las PNPs del segundo DoE

De acuerdo con la determinación de las evaluaciones del primer DoE, se estableció el segundo DoE mostrado en la tabla 14, para el análisis de las siguientes respuestas: tamaño de partícula en niveles nanométricos (≤ 500 nm) y una CC en un porcentaje aproximado del 1 % en relación con el peso de cada formulación y que mantenga una liberación sostenida al menos durante 72 h.

Tabla 14. Matriz del segundo DoE para la optimización de las PNPs-NTZ

N° de experimento	Formulación	PCL (mg)	PVA (%)
1	F1	30	1
2	F2	30	3
3	F3	40	1
4	F4	40	3
5	F1	30	1
6	F2	30	3
7	F3	40	1
8	F4	40	3

8.4.1. Caracterización física del segundo DoE

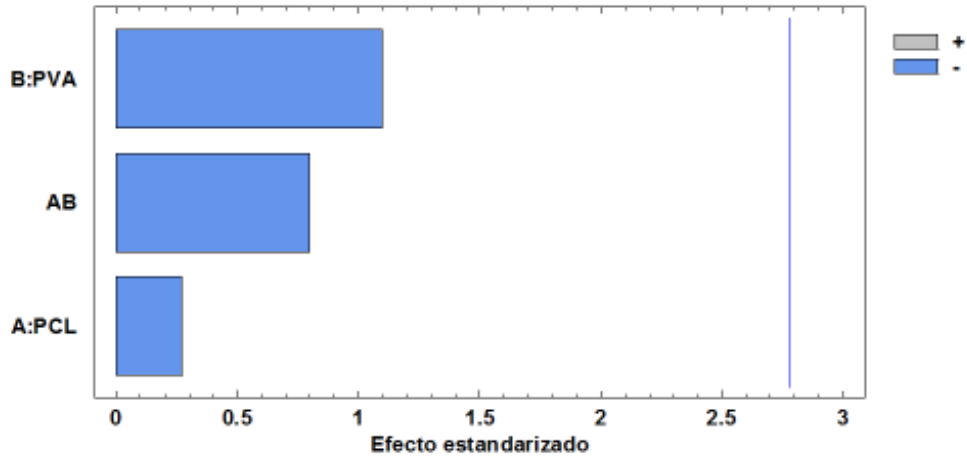
En la tabla 15, se muestran los resultados de la caracterización física de las formulaciones de PNPs obtenidas en el segundo DoE, en el cual se observa que los tamaños de partícula para cada formulación presentan una homogeneidad de tamaños que varían entre 516 nm a 605 nm. para el caso de los PDI muestran intervalos de 0.315 a 0.426, el potencial zeta presento valores entre -11.0 mV a -15.4 mV. Para el caso de la CC, se presentaron porcentajes del 0.7 % a 1.5 % y la EE se mantuvo con valores estables del > 90 %.

Tabla 15. Resultados de la caracterización física de las PNPs-NTZ de acuerdo con el segundo DoE (n=2)

DoE	Formulación	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	CC (%)	EE (%)
2	1	580	0.426	-14.7	1.5	98.3
	2	605	0.329	-15.4	1.4	98.8
	3	566	0.419	-11.7	0.7	99
	4	516	0.315	-11.0	0.7	97.7

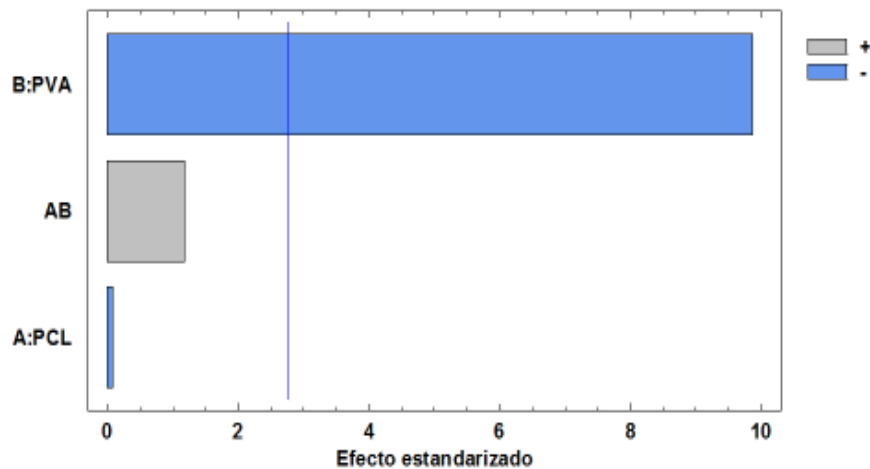


En el gráfico 7, se observa el diagrama de Pareto para el tamaño de partícula que corresponde al segundo DoE, en el cual se observa que los factores no presentan significancia como en el primer DoE; sin embargo, la tendencia se repite ya que el PVA tiene un mayor efecto sobre el tamaño de partícula el cual puede modificarse si se incrementa o disminuye.



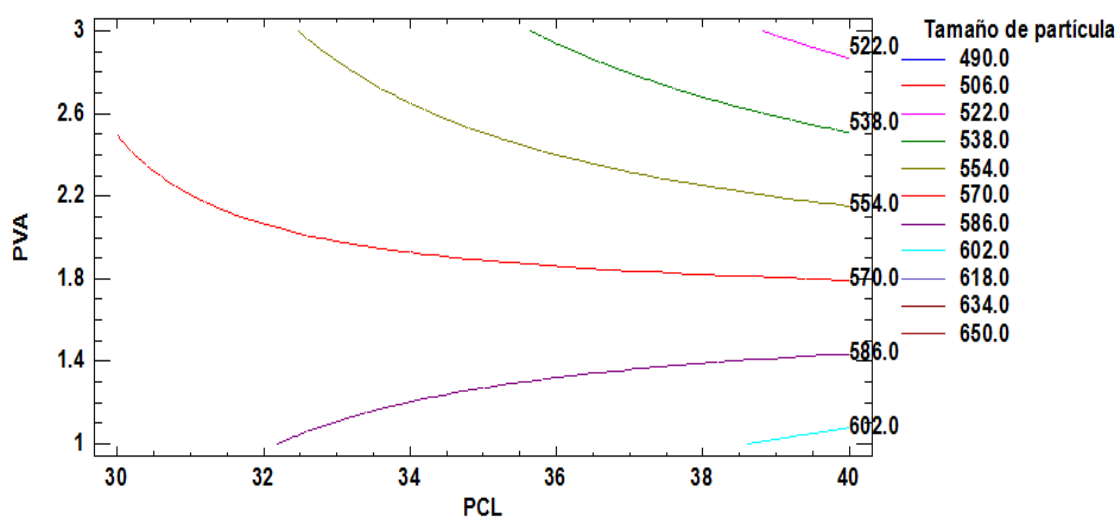
Gráfica 7. Diagrama de Pareto del tamaño de partícula del segundo DoE

Con respecto al efecto de los factores en la capacidad de carga, se puede observar en el gráfico 8, que el PVA sigue manteniendo un efecto significativo en la respuesta, lo que tiene relación con los datos obtenidos en el primer DoE.



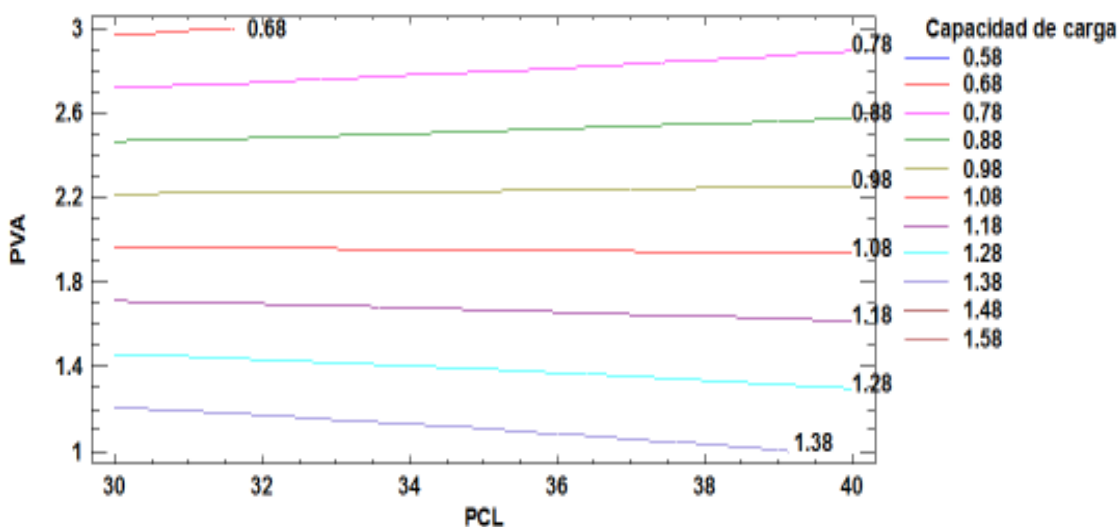
Gráfica 8. Diagrama de Pareto de la capacidad de carga del segundo DoE

La superficie de respuesta del gráfico 9, muestra que el tamaño de partícula se encuentra a niveles nanométrico entre 520 y 600 nm, mientras el PVA se mantiene entre 1 y 3 %. Por dichas razón, se considera que el intervalo mencionado garantiza un tamaño de partícula nanométrico (< a 600 nm). La PCL mostró poco efecto, con lo que el intervalo analizado de 30 a 40 mg garantiza que la formulación se mantenga a nivel nanométrico.



Gráfica 9. Contorno de superficie de respuesta para el tamaño de partícula de las PNP's-NTZ del 2do DoE

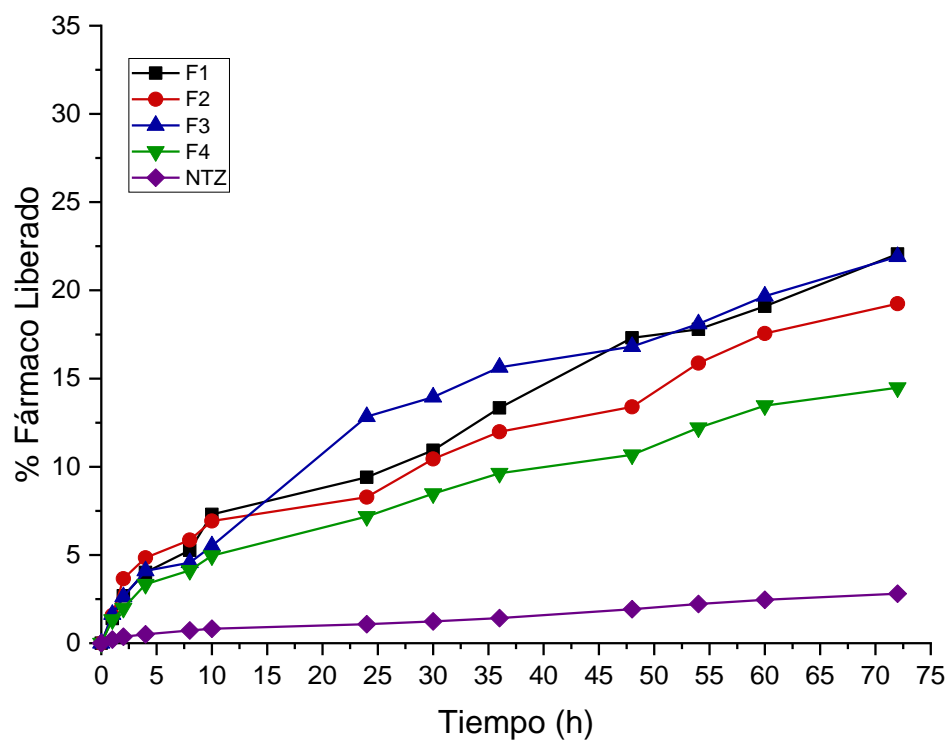
En el gráfico 10, se aprecia nuevamente que el incremento del PVA en la formulación disminuye la capacidad de carga, mientras que la PCL presenta poco efecto. Con los nuevos niveles de PVA (1 a 3 %) se alcanzó una CC entre 0.56 a 1.3 %.



Gráfica 10. Contorno de superficie de respuesta para la capacidad de carga de las PNP's-NTZ del 2do DoE

8.4.2. Evaluación *in vitro* del perfil de liberación del segundo DoE

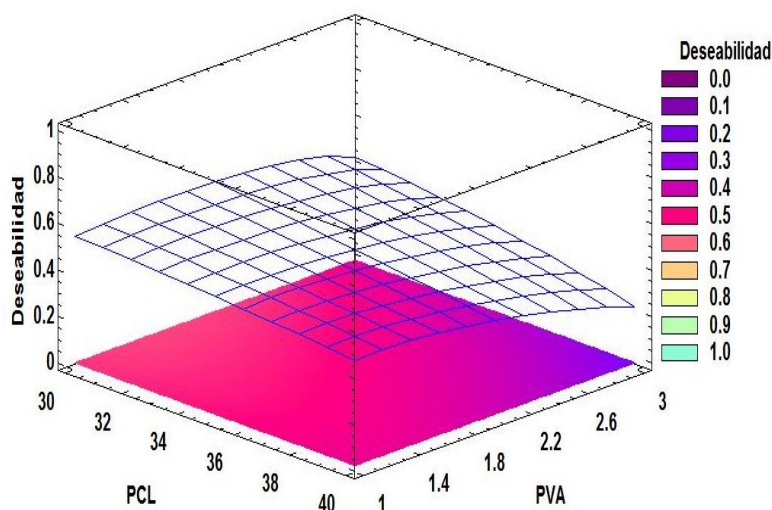
En la gráfica 11, se muestran los perfiles de liberación de las formulaciones de PNPs-NTZ basados en el segundo DoE. Mostrando que las formulaciones 1 a 4 presentan mejores liberaciones sostenidas a las 72 h de su evaluación con un % de fármaco liberado del 20 % para la formulación 1 y 3, un 15 % para la 2, y un 12 % para la formulación 4; en comparación de la liberación del 2.5 % de NTZ en solución.



Gráfica 11. Perfiles de liberación *in vitro* de las PNPs-NTZ bajo el 2do DoE (n=2)

8.5. Optimización del nanosistema polimérico de NTZ

De acuerdo con los resultados obtenidos y el análisis del DoE, se realizó la optimización de los valores que serán utilizados para la formulación de las PNPs, mostrando una deseabilidad del 56.3 % que se observa en la gráfica 12, indicándonos que nuestro diseño es aceptable y regular.



Gráfica 12. Deseabilidad del diseño experimental (56.3%)

En la tabla 16, se muestran los valores óptimos para cada factor y una relación entre los valores teóricos que se esperan para las respuestas optimizadas y los valores obtenidos durante las diferentes evaluaciones. Se excluyeron de los criterios de optimización al % EE y el potencial zeta, debido a que no mostraban variabilidad en los resultados obtenidos.

Tabla 16. Valores determinados para la optimización de las PNPs-NTZ

Factores Optimizados (X1-X2)		Variable de respuesta a optimizar	Valor teórico
PCL (mg)	PVA (%)		
30	1.6	Tamaño (nm)	575.86
		PDI	0.424
		CC (%)	1.19
		Fármaco liberado (%)	22

En la tabla 17, se muestran los resultados de la caracterización física y evaluación *in vitro* de los lotes optimizados de PNPs-NTZ (n=3), observando que los tamaños de partícula son de 370 ± 5 nm, el PDI mostró rangos ≤ 0.182 , mostrando una homogeneidad en la distribución de las partículas, una CC del 1 %, y una EE ≥ 90 % de fármaco liberado. En la figura 24, se muestra el resultado de la formulación optimizada del lote 4, observando que posterior a la liofilización obtenemos un polvo fino de color amarillo que se utilizó para evaluar su capacidad de liberación *in vitro* y permeabilidad *ex vivo*.

Tabla 17. Resultados de la caracterización física de las PNPs-NTZ optimizadas (n=3)

Lote	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	CC (%)	EE (%)
1	370	0.182	-11.4	0.7	92.7
2	329	0.183	-8.64	1.3	98.4
3	365	0.169	-10.4	1.04	97.7
4	377	0.152	-11.7	0.9	95.7

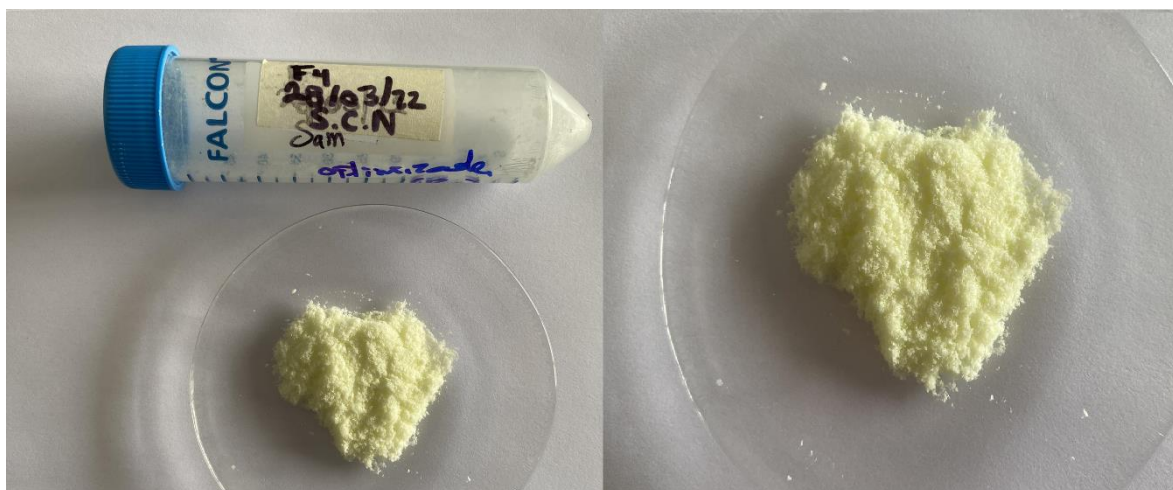
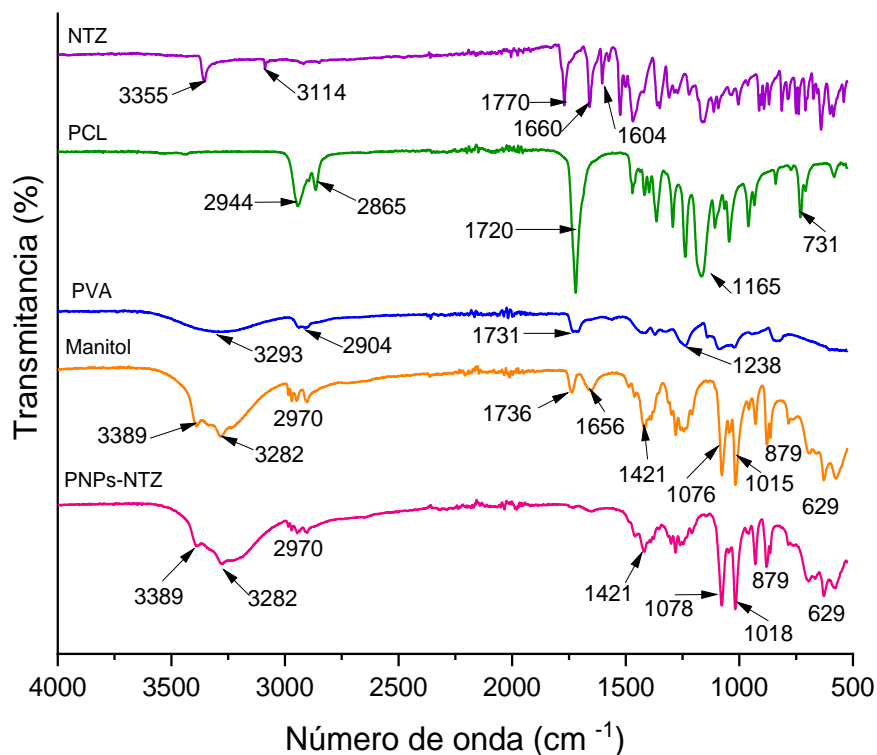


Figura 24. Muestra de formulación optimizada de PNPs-NTZ (lote 4) posteriores a la liofilización

8.6. Caracterización fisicoquímica de las PNPs-NTZ optimizadas

8.6.1. Espectroscopía Infrarrojo

En la gráfica 13, se muestran los espectros de las diferentes materias primas que se utilizaron para formular y de las PNPs-NTZ posterior a su liofilización, se observan diversos picos en cada espectro que nos indican una vibración característica de cada muestra. En el caso de las materias primas, la NTZ tiene una banda característica a 1770 cm^{-1} que nos indica la presencia de un carbonilo de éster, Sachan y colaboradores¹⁶⁶, comparten la similitud de las bandas en el espectro de NTZ.

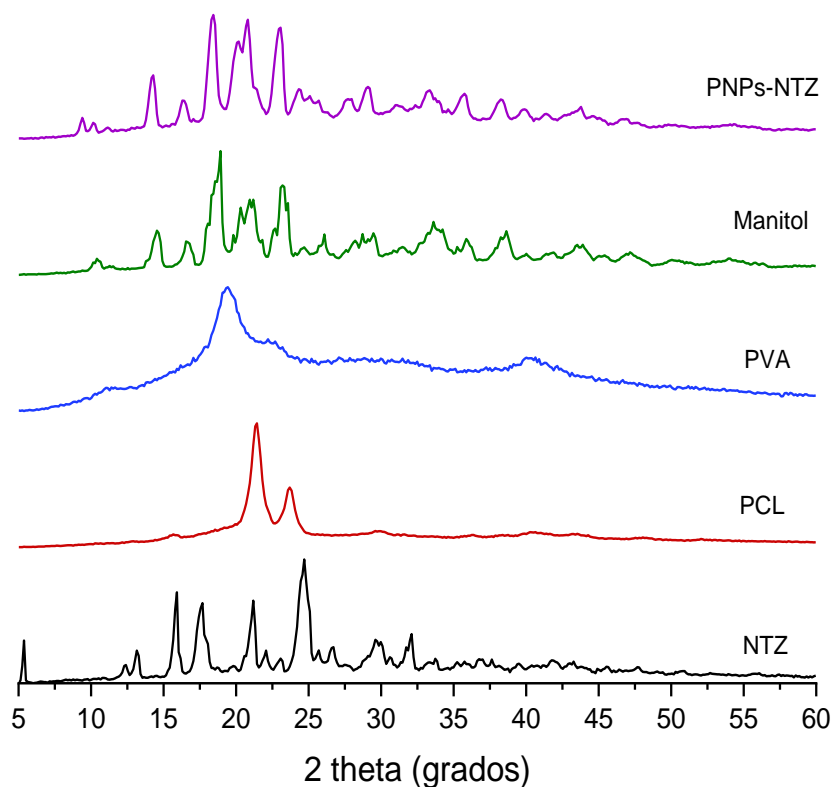


Gráfica 13. Espectros de IR de las materias primas y de la formulación de las PNPs-NTZ

Respecto a PCL y PVA, las bandas de PCL se presentan en 2944 y 1720 cm^{-1} , el PVA tiene vibraciones entre 3293 - 1238 cm^{-1} . Un dato característico que se pudo observar fue el espectro de manitol que se utilizó como crioprotector en el proceso de liofilizado y sus bandas se observan entre 3389 cm^{-1} y 629 cm^{-1} . En el caso del espectro de las PNPs-NTZ, presentan un espectro similar al de manitol lo que dificulta distinguir las bandas de NTZ dentro de la formulación de las PNPs-NTZ.

8.6.2. Difracción de rayos X de polvos

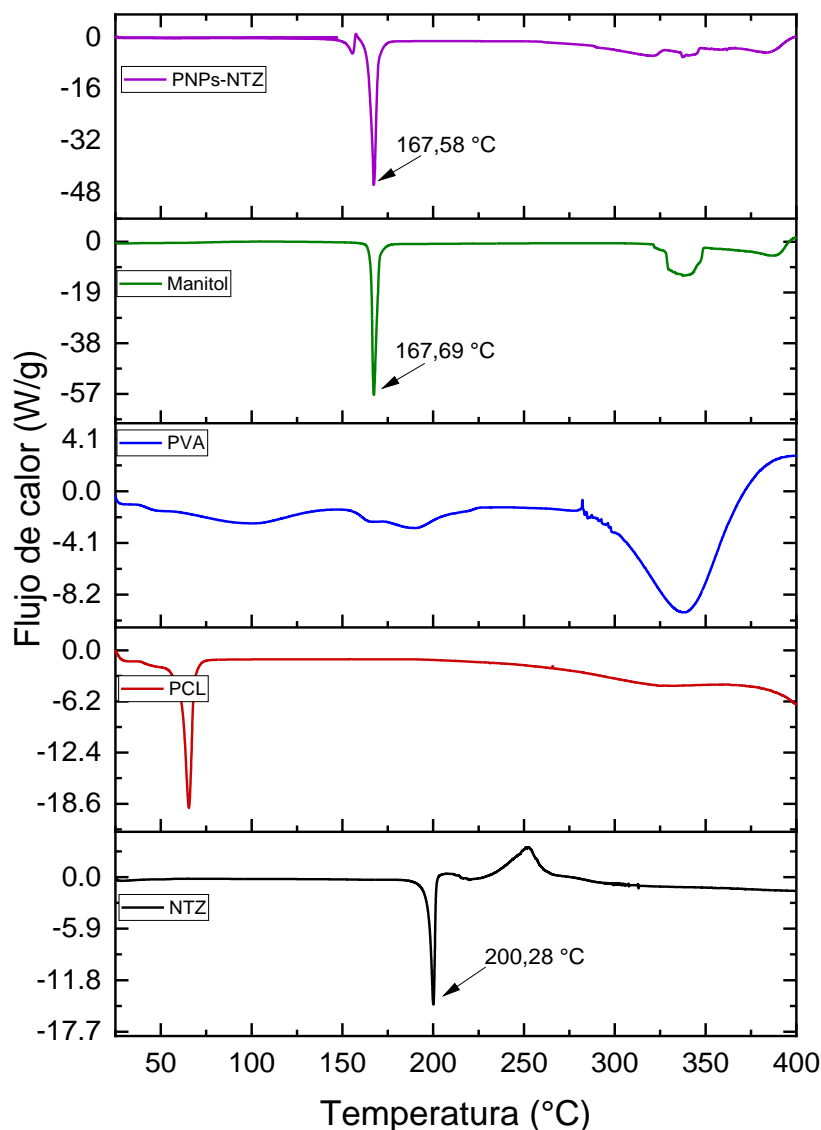
Los diferentes difractogramas de NTZ en su forma pura, PCL, PVA, manitol y la formulación de PNPs cargadas con NTZ se muestran en la gráfica 14. En el difractograma de NTZ (negro) se observan distintos picos relevantes en ángulos de difracción de $24,70^\circ$ y $31,98^\circ$ que indican que el fármaco se encuentra en su forma cristalina, esto mismo señala Schan y colaboradores¹⁶⁶ que al analizar los patrones de difracción de la NTZ en su forma pura observan picos grandes en ángulos similares de $25,02^\circ$ y $31,50^\circ$. Al comparar los patrones de difracción de NTZ pura (negro) y la formulación de PNPs con NTZ (morado), este se encuentra con mayores similitudes al patrón de manitol (verde) debido a que las muestras se caracterizaron con el material liofilizado y, por tanto no se logra visualizar la presencia de los demás componentes de la formulación; sin embargo, también al no visualizarse señales de NTZ pura en el patrón de las PNPs-NTZ se predice que se ha internalizado la NTZ en forma amorfa dentro de la matriz del polímero.



Gráfica 14. Difractogramas de las materias primas y de la formulación de PNPs-NTZ

8.6.3. Calorimetría diferencial de barrido

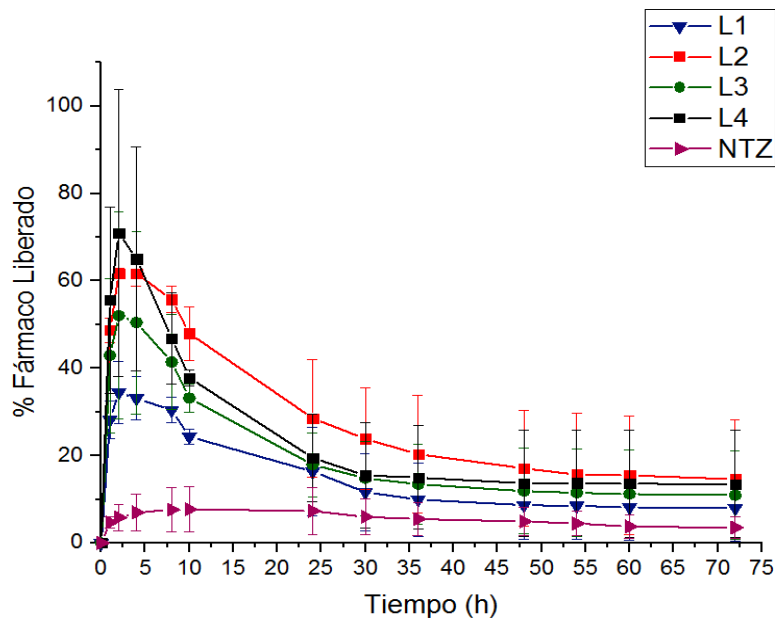
En la gráfica 15, se muestran los termogramas de las materias primas utilizadas, así como de la formulación de PNP con NTZ optimizadas. En el caso del termograma de NTZ (negro) mostró un pico endotérmico de fusión a 200,28 °C que corresponde a la forma cristalina del fármaco, este fenómeno también lo observaron Sood y colaboradores¹⁶⁷ que nos muestran una fusión de NTZ a 202,1 °C. En cuanto al comportamiento térmico de la formulación de PNP con NTZ (morado), se observó un pico endotérmico a 167,58 °C, similar al obtenido en el termograma de manitol (verde). Así mismo, se observa la ausencia de alguna otra señal adicional en la zona de fusión que corresponde a NTZ sugiriendo que el fármaco no se encuentra en su forma cristalina y no interacciona significativamente con los polímeros.



Gráfica 15. Termograma de las materias primas y de la formulación de PNP-NTZ

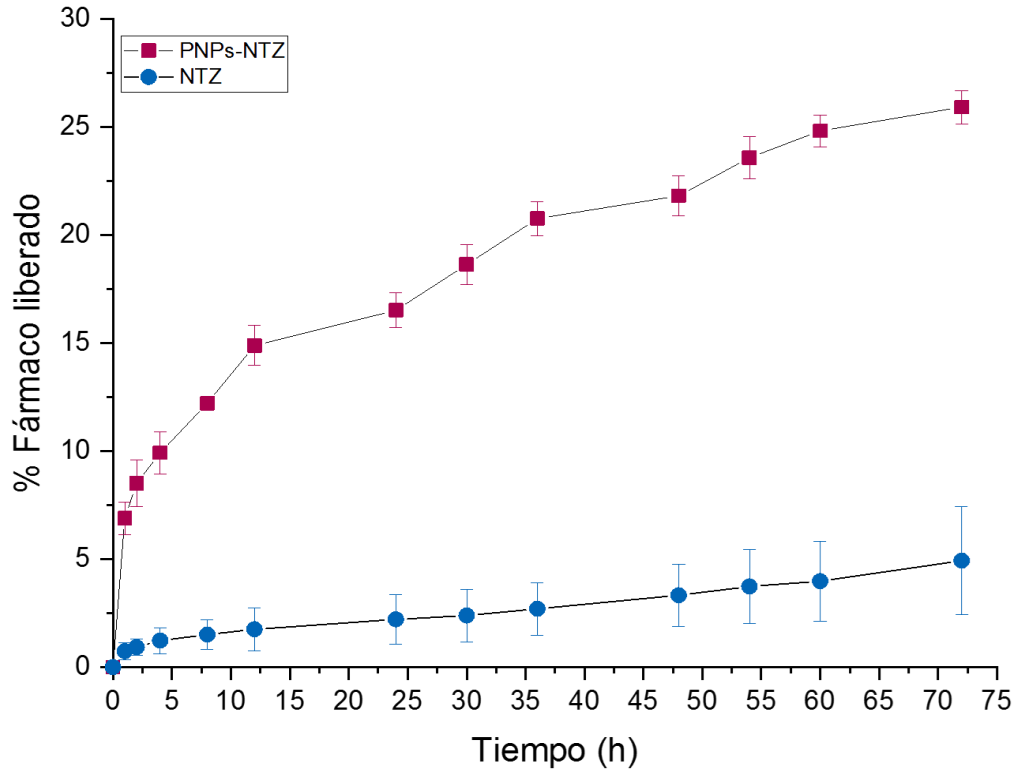
8.7. Evaluación *in vitro* del perfil de liberación de las PNP-NTZ optimizadas

En la gráfica 16, se muestran los perfiles de liberación de los lotes (n=3) de las PNP-NTZ optimizadas. Mostrando perfiles de liberación diferentes a los antes reportados, en donde las formulaciones de PNP-NTZ, liberaron a las 2.5 h un % de fármaco liberado del 50 % para el lote 2 y 4, manteniendo una cinética de liberación de fármaco constante entre el 20 % y 25 % de las 35 h a las 72 h. Estos perfiles comparados a los de NTZ en solución presentan un cambio en la solubilidad acuosa de NTZ.



Gráfica 16. Perfiles de liberación *in vitro* de lotes optimizados de PNP-NTZ (n=3)

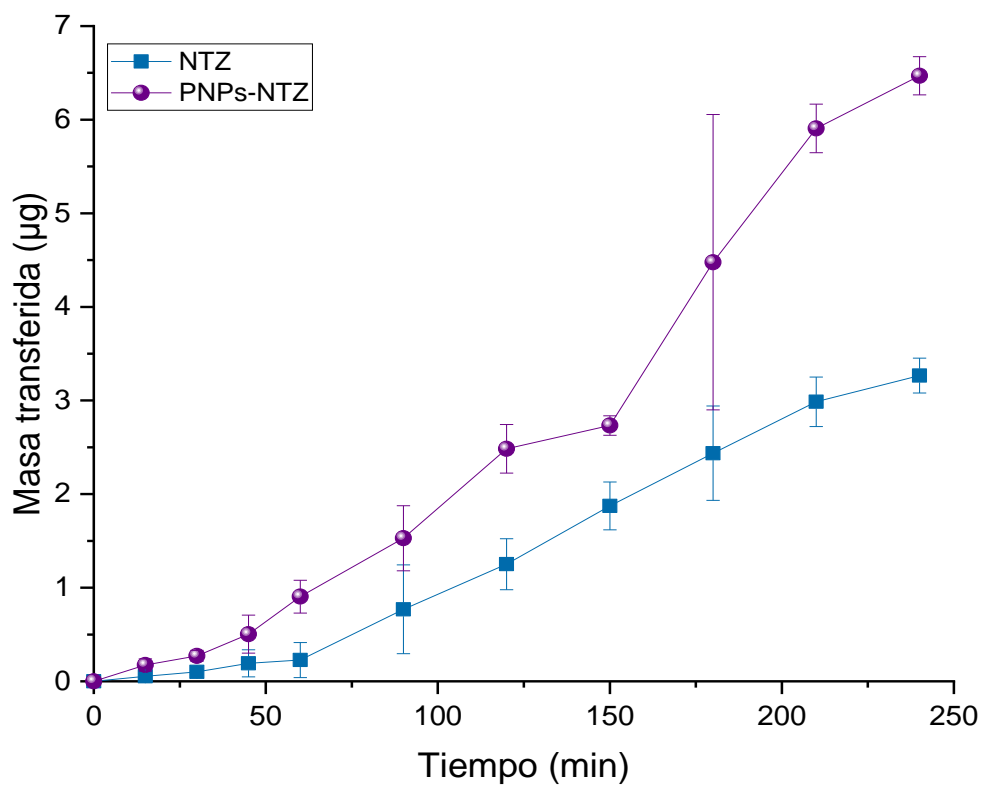
Se evaluaron cuatro réplicas de un lote optimizado y liofilizado para corroborar las cinéticas de liberación, representando los perfiles de liberación en la gráfica 17, en donde podemos observar que la cinética de incremento se vuelve a visualizar, lo que nos puede indicar que en el estudio pasado de la gráfica 16, el fármaco presentó una rápida solubilización lo que llevó a una saturación en el medio propiciando una precipitación del fármaco. Sin embargo, podemos determinar que el mayor % de fármaco liberado se encuentra en el rango de 20 y 25 % que corresponden a las cinéticas constantes del gráfico 17, lo que hace referencia que las PNP-NTZ liberan un 2 % de la masa de fármaco cargado en las PNP de acuerdo con el %CC obtenido que corresponde al 1 % de la relación masa de fármaco/ polímero en un periodo de 72 h, esto comparado con la NTZ en suspensión muestra un efecto favorable en la solubilidad acuosa de NTZ.



Gráfica 17. Perfiles de liberación *in vitro* de las PNP-s-NTZ optimizadas (n=4)

8.7.1. Evaluación *ex vivo* de las cinéticas de permeabilidad de las PNP-s-NTZ optimizadas y de NTZ

Al analizar las pruebas de permeabilidad de NTZ en suspensión y de las PNP-s-NTZ, se puede observar en la gráfica 18 que la formulación de PNP-s-NTZ tiene una mayor permeabilidad de 2.5 μg de masa transferida a 120 min, mientras que NTZ en suspensión presenta una permeabilidad de 1.2 μg de masa transferida. Al término del estudio a los 240 min, las PNP-s-NTZ transfiere una masa de 6.5 μg y la NTZ en suspensión transfiere una masa total de 3.1 μg . La diferencia entre las constantes de permeabilidad se puede verificar en la tabla 20, en donde el promedio de las constantes de las PNP-s-NTZ es de 4.22×10^{-05} cm/s y las de NTZ es de 8.38×10^{-06} cm/s, esto se verificó con el análisis estadístico de una prueba t que muestra los resultados entre las dos muestras observado que existe una diferencia significativa entre ellas con una $p= 0.0025$.



Gráfica 18. Perfiles de permeabilidad de PNP-NTZ y NTZ en suspensión, media ± DE (n=2)

Tabla 18. Comparación del promedio de la permeabilidad aparente entre PNP-NTZ y NTZ en solución

Permeabilidad aparente (cm/s)		
Réplicas	PNPs-NTZ	NTZ
1	4.08×10^{-05}	7.37×10^{-06}
2	4.36×10^{-05}	9.4×10^{-06}
Promedio	4.22×10^{-05}	8.38×10^{-06}

9. CONCLUSIONES

- Fue posible establecer condiciones cromatográficas adecuadas para la cuantificación de NTZ y cumpliendo con la validación del método siendo este lineal, preciso, exacto y específico de acuerdo con la guía de validación del CNQFBM.
- Se obtuvieron los valores para la optimización de las PNPs cargadas con NTZ
- Se evaluaron las PNPs-NTZ, obteniendo un tamaño de partícula de 370 ± 5 nm, un PDI de 0.180 ± 7 , un potencial zeta de -11 ± 3 mV, una CC del 1 ± 3 % y una EE del 98 ± 0.4 %.
- Se obtuvieron perfiles de liberación *in vitro* del 25 % de fármaco liberado a 72 h a partir de las PNPs, reflejando una mejora en la solubilidad acuosa de NTZ.
- El estudio de permeabilidad demostró que el nanosistema de PNPs-NTZ presenta una mayor permeabilidad en comparación de la NTZ en suspensión, donde el promedio de las constantes de permeabilidad de las PNPs-NTZ es de 4.22×10^{-05} cm/s y para NTZ en suspensión de 8.38×10^{-06} cm/s, lo cual nos indica que el nanosistema ha incrementado la capacidad de permear de la NTZ.

10. PERSPECTIVAS

- Proponer estudios de caracterización fisicoquímica de la formulación de PNPs-NTZ sin liofilizar esperando ver la presencia del material polimérico y también realizar microscopías electrónicas para corroborar la morfología y el tamaño de las partículas.
- Realizar pruebas de pegilación a las PNPs-NTZ optimizadas, para mejorar las características de estabilidad de las PNPs y disminuir una posible degradación enzimática.
- Realizar pruebas de encapsulación del IFN- α en las PNPs-NTZ pegiladas, para establecer una coadministración con dos fármacos que presentan una sinergia farmacéutica con características antivirales.



11. REFERENCIAS

- (1) Razavi, H. Global Epidemiology of Viral Hepatitis. *Gastroenterol Clin North Am* **2020**, *49* (2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.001>.
- (2) Fung, J.; Lai, C. L.; Yuen, M. F. Hepatitis B and C Virus-Related Carcinogenesis. *Clinical Microbiology and Infection* **2009**, *15* (11), 964–970. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03035.x>.
- (3) Lin, J.; Wu, J.-F.; Zhang, Q.; Zhang, H.-W.; Cao, G.-W. Virus-Related Liver Cirrhosis: Molecular Basis and Therapeutic Options. *World J Gastroenterol* **2014**, *20* (21), 6457–6469. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6457>.
- (4) Cowan, M. L.; Thomas, H. C.; Foster, G. R. Therapy for Chronic Viral Hepatitis: Current Indications, Optimal Therapies and Delivery of Care. *Clinical Medicine* **2011**, *11*, 184–189.
- (5) Fung, J.; Lai, C. L.; Seto, W. K.; Yuen, M. F. Nucleoside/Nucleotide Analogues in the Treatment of Chronic Hepatitis b. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**, *66* (12), 2715–2725. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr388>.
- (6) Dienstag, J. L. Benefits and Risks of Nucleoside Analog Therapy for Hepatitis B. *Hepatology* **2009**, *49* (SUPPL. 5). <https://doi.org/10.1002/HEP.22920>.
- (7) Van Bömmel, F.; Berg, T. Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B. *Intervirolgy* **2014**, *57* (3–4), 171–180. <https://doi.org/10.1159/000360945>.
- (8) Lauer, G. M.; Walker, B. D. Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* **2001**, *345*, 41–52.
- (9) Ichael, M.; Ried, W. F.; Hiffman, I. L. S.; Ajender, K. R.; Eddy, R.; Oleman, C.; Mith, S.; Eorge, G.; Arinos, M.; Ernando, F.; Onçales, L. G.; Iampiero, G.; Arosi, C.; Humeaux, A. D.; Ntonio, A.; Raxi, C.; Oseph, J.; Offman, H. Peg-Interferon Alfa-2a Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* **2002**, *347* (13).
- (10) Strahotin, C. S.; Babich, M. Hepatitis C Variability, Patterns of Resistance, and Impact on Therapy. *Adv Virol* **2012**, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/267483>.
- (11) Pisano, M. B.; Giadans, C. G.; Flichman, D. M.; Ré, V. E.; Preciado, M. V.; Valva, P. Viral Hepatitis Update: Progress and Perspectives. *World J Gastroenterol* **2021**, *27* (26), 4018–4044. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i26.4018>.
- (12) Bidell Milena McLaughlin John Faragon Caroline Morse Nimish Patel, M. R.; Bidell Á C Morse Á N Patel, M. R.; McLaughlin, M.; Faragon, J. Desirable Characteristics of Hepatitis C Treatment Regimens: A Review of What We Have and What We Need. *Infect Dis Ther* **2016**, *5*, 299–312. <https://doi.org/10.1007/s40121-016-0118-x>.
- (13) 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>.
- (14) 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>.
- (15) Keeffe, E. B.; Rossignol, J. F. Treatment of Chronic Viral Hepatitis with Nitazoxanide and Second Generation Thiazolides. *World J Gastroenterol* **2009**, *15* (15), 1805–1808. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1805>.
- (16) 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>.
- (17) Romark, L. C. Alinia (Nitazoxanide), **2016**.
- (18) Ahirrao, S. P.; Rathi, K. S.; Koli, D. B.; Kshirsagar, S. J.; Pawar, S. Solubility Enhancement of Nitazoxanide Using Solid Dispersion. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science* **2018**, *5* (4), 1674–1687. <https://doi.org/10.21276/irjps.2018.5.4.6>.



- (19) Razavi, H. Global Epidemiology of Viral Hepatitis. *Gastroenterol Clin North Am* **2020**, *49* (2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.001>.
- (20) OMS. *Estrategia Mundial Del Sector de La Salud Contra Las Hepatitis Víricas 2016-2021: Hacia El Fin de Las Hepatitis Víricas*; **2016**.
- (21) Echevarría-Mayo, J. M. Etiology and Pathogenesis of Viral Hepatitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2006**, *24* (1), 45–56. <https://doi.org/10.1157/13083375>.
- (22) Panduro, A.; Escobedo Meléndez, G.; Fierro, N. A.; Ruiz Madrigal, B.; Alfonso Zepeda-Carrillo, E.; Sc, M.; Román, S. Epidemiología de Las Hepatitis Virales En México. *Salud Publica Mex* **2011**, *53* (1), s37–s45.
- (23) Tsukuda, S.; Watashi, K. Hepatitis B Virus Biology and Life Cycle. *Antiviral Res* **2020**, *182*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104925>.
- (24) Nicolás, D.; González, G.; Moreno, D.; Alegre, F.; García-González, N. *Virología, Epidemiología y Mecanismos de Transmisión Del VHB Virology, Epidemiology and Transmission Mechanisms of Hepatitis B Virus*; 2004; Vol. 27.
- (25) Cubides, I. COLUMNA DE HÍGADO: Hepatitis Por Virus B. *Rev Colomb Gastroenterol* **2007**, *22*, 111–117.
- (26) Toro Montoya, A. I.; Carlos, J.; Gutiérrez, R. Hepatitis B. *Medicina y Laboratorio* **2011**, *17*, 311–329.
- (27) Alomía, J. L.; Nucamendi, G.; Gutiérrez, J. J.; Macías, H.; Vargas, M. Informe Epidemiológico Anual de Vigilancia Epidemiológica de Hepatitis Virales, México 2019. *Dirección General de epidemiología* **2019**.
- (28) Ortega Quiroz, R.; Garzón, M. A. Tratamiento de La Hepatitis B. *Rev Colomb Gastroenterol* **2009**, *24* (1), 21–32.
- (29) Cabezas-Sánchez, C.; Rodríguez-Piazzze, L.; Seas-Ramos, C.; Cabrera-Cabrejos, C. Guía de Práctica Clínica Para El Diagnóstico y Tratamiento de La Hepatitis Crónica Por El Virus de La Hepatitis B. *Rev. Gastroenterol* **2011**, *31* (2), 151–168.
- (30) Woo, A. S. J.; Kwok, R.; Ahmed, T. Alpha-Interferon Treatment in Hepatitis B. *Ann Transl Med* **2017**, *5* (7). <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.69>.
- (31) Perrillo, R. Benefits and Risks of Interferon Therapy for Hepatitis B. *Hepatology* **2009**, *49* (SUPPL. 5). <https://doi.org/10.1002/hep.22956>.
- (32) Terrault, N. A.; Lok, A. S. F.; McMahon, B. J.; Chang, K. M.; Hwang, J. P.; Jonas, M. M.; Brown, R. S.; Bzowej, N. H.; Wong, J. B. Update on Prevention, Diagnosis, and Treatment of Chronic Hepatitis B: AASLD 2018 Hepatitis B Guidance. *Hepatology* **2018**, *67* (4), 1560–1599. <https://doi.org/10.1002/hep.29800>.
- (33) Hoofnagle, Jay. H.; Di Bisceglie, Adrian. M. The Trearment of Chronic Viral Hepatitis. *N Engl J Med* **1997**, *336* (5), 347–356.
- (34) Mateos, L. S.; Tato, M.; Moreira, V. Resistencia Del Virus de La Hepatitis B a Lamivudina y Adefovir En Un Paciente Con Hepatitis Crónica B y Antígeno e Negativo. *Gastroenterol Hepatol.* **2006**, *29* (2), 71–73.
- (35) Jardi, R.; Rodriguez-Frias, F.; Schaper, M.; Ruiz, G.; Elefsiniotis, I.; Esteban, R.; Buti, M. Hepatitis B Virus Polymerase Variants Associated with Entecavir Drug Resistance in Treatment-Naive Patients. *J Viral Hepat* **2007**, *14* (12), 835–840. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2007.00877.x>.
- (36) Wang, C. C.; Lin, C. L.; Hsieh, T. Y.; Tseng, K. C.; Peng, C. Y.; Su, T. H.; Yang, S. S.; Hsu, Y. C.; Chen, T. M.; Kao, J. H. Efficacy and Resistance to Telbivudine Treatment in Chronic Hepatitis B Patients with Favorable Predictors: A Multicenter Study in Taiwan. *Hepatol Int* **2016**, *10* (2), 294–301. <https://doi.org/10.1007/s12072-015-9662-9>.
- (37) Toledo-Rojas, R.; Cobelo-Casas, C.; García-González, I.; Torres-De Rueda, Á.; López-Jiménez, V.; Martín-Reyes, G.; Aranda-Lara, P.; Frutos-Sanz, M. Á.; Hernández-Marrero, D. Deterioro Agudo de Función Renal Por Tenofovir. *Nefrologia Sup Ext* **2012**, *3* (4), 73–78. <https://doi.org/10.3265/NefroPlus.pre2010.Oct.10669>.



- (38) Morozov, V. A.; Lagaye, S. Hepatitis C Virus: Morphogenesis, Infection and Therapy. *World J Hepatol* **2018**, *10* (2), 186–212. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i2.186>.
- (39) Koutsoudakis, G.; Forns, X.; Pérez-del-Pulgar, S. Biología Molecular Aplicada Del Virus de La Hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* **2013**, *36* (4), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.11.005>.
- (40) Chiquete, E.; Sánchez, Laura. V.; Panduro, A. Virus de La Hepatitis C. *Investigación en Salud* **2005**, *7* (1), 19–25.
- (41) Scheel, T. K. H.; Rice, C. M. Understanding the Hepatitis C Virus Life Cycle Paves the Way for Highly Effective Therapies. *Nat Med* **2013**, *19* (7), 837–849. <https://doi.org/10.1038/nm.3248>.
- (42) Moradpour, D.; Penin, F.; Rice, C. M. Replication of Hepatitis C Virus. *Nat Rev Microbiol* **2007**, *5* (6), 453–463. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1645>.
- (43) Bartenschlager, R.; Lohmann, V. Replication of Hepatitis C Virus. *Journal of General Virology* **2015**, *81*, 1631–1648.
- (44) Bartenschlager, R.; Cosset, F. L.; Lohmann, V. Hepatitis C Virus Replication Cycle. *J Hepatol* **2010**, *53* (3), 583–585. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.04.015>.
- (45) Kershenobich, D.; Dehesa, M.; Aguilar, L. Ma.; Aguilar, R.; Ariza, A. La Hepatitis C Como Un Problema de Salud Pública En México. *Salud pública de méxico* **2011**, *53* (1), s61–s67.
- (46) Thomas, D. L.; Seeff, L. B. Natural History of Hepatitis C. *Clin Liver Dis* **2005**, *9* (3), 383–398. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2005.05.003>.
- (47) Lingala, S.; Ghany, M. G. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am* **2015**, *44* (4), 717–734. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.07.003>.
- (48) Diago, M. Treatment of Hepatitis C Virus Infection: Current Status and Perspectives. *Gastroenterol Hepatol* **2008**, *31* (9), 596–605. <https://doi.org/10.1157/13128300>.
- (49) Morisco, F.; Granata, R.; Stroffolini, T.; Guarino, M.; Donnarumma, L.; Gaeta, L.; Loperto, I.; Gentile, I.; Auriemma, F.; Caporaso, N. Sustained Virological Response: A Milestone in the Treatment of Chronic Hepatitis C. *World J Gastroenterol* **2013**, *19* (18), 2793–2798. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i18.2793>.
- (50) Girón-González, J. A.; Márquez, M. J.; Márquez, M.; Corchado, S.; Soto, M. J.; Martín-Aspas, A.; Montes De Oca, M.; Guerrero, F.; Fernández-Gutiérrez, C. La Valoración de RNA Del Virus de La Hepatitis C Realizada a Las 12 Semanas de Finalizar El Tratamiento Predice La Respuesta Viroológica Sostenida En Enfermos Con Coinfección Por VIH y VHC. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2012**, *30* (1), 15–17. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.07.005>.
- (51) Mahale, P.; Engels, E. A.; Li, R.; Torres, H. A.; Hwang, L. Y.; Brown, E. L.; Kramer, J. R. The Effect of Sustained Virological Response on the Risk of Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* **2018**, *67* (3), 553–561. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313983>.
- (52) Pearlman, B. L.; Traub, N. Sustained Virologic Response to Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Cure and so Much More. *Clinical Infectious Diseases* **2011**, *52* (7), 889–900. <https://doi.org/10.1093/cid/cir076>.
- (53) Munir, S.; Saleem, S.; Idrees, M.; Tariq, A.; Butt, S.; Rauff, B.; Hussain, A.; Badar, S.; Naudhani, M.; Fatima, Z.; Ali, M.; Ali, L.; Akram, M.; Aftab, M.; Khubaib, B.; Awan, Z. Hepatitis C Treatment: Current and Future Perspectives. *Virol J* **2010**, *7*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-296>.
- (54) Guía de Práctica Clínica. *Diagnóstico y Tratamiento de Hepatitis C*; México, 2010.
- (55) Aiza-Haddad, I.; Ballesteros-Amozurrutia, A.; Borjas-Almaguer, O. D.; Castillo-Barradas, M.; Castro-Narro, G.; Chávez-Tapia, N.; Chirino-Sprung, R. A.; Cisneros-Garza, L.; Dehesa-Violante, M.; Flores-Calderón, J.; Flores-Gaxiola, A.; García-Juárez, I.; González-Huezo, M. S.; González-Moreno, E. I.; Higuera-de la Tijera, F.; Kershenobich-Stalnikowitz, D.; López-Méndez, E.; Malé-Velázquez, R.; Marín-López, E.; Mata-Marín, J. A.; Méndez-Sánchez, N.; Monreal-Robles, R.; Moreno-Alcántar, R.; Muñoz-Espinosa, L.; Navarro-Alvarez, S.; Pavia-Ruz, N.; Pérez-Ríos, A. M.; Poo-Ramírez, J. L.; Rizo-Robles, M. T.; Sánchez-Ávila, J. F.; Sandoval-Salas, R.; Torre, A.; Torres-Ibarra, R.; Trejo-Estrada, R.; Velarde-Ruiz Velasco, J. A.; Wolpert-Barraza, E.; Bosques-Padilla, F. The Mexican Consensus on the Treatment



- of Hepatitis C. *Rev Gastroenterol Mex* **2018**, 83 (3), 275–324. <https://doi.org/10.1016/j.rgmex.2017.11.001>.
- (56) Singer, M. V.; Pfützer, R. H.; Kiefer, F. Nitazoxanide: Beyond Parasites Toward a Novel Agent for Hepatitis C. *Gastroenterology* **2009**, 136 (3), 757–760. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.018>.
- (57) 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>.
- (58) Shi, Z.; Wei, J.; Deng, X.; Li, S.; Qiu, Y.; Shao, D.; Li, B.; Zhang, K.; Xue, F.; Wang, X.; Ma, Z. Nitazoxanide Inhibits the Replication of Japanese Encephalitis Virus in Cultured Cells and in a Mouse Model. *Virology Journal* **2014**, 11 (10), 1–10.
- (59) Anderson, V. R.; Curran, M. P.; Alam, S.; Young, J. D. Nitazoxanide A Review of Its Use in the Treatment of Gastrointestinal Infections. *Drugs* **2007**, 67 (13), 1947–1967.
- (60) Hemphill, A.; Mueller, J.; Esposino, M. Nitazoxanide, a Broad-Spectrum Thiazolide Anti-Infective Agent for the Treatment of Gastrointestinal Infections. *Expert Opin Pharmacother* **2006**, 7 (7), 953–964. <https://doi.org/10.1517/14656566.7.7.953>.
- (61) Romero-Cabello, R.; Romero-Feregrino, R.; Romero-Feregrino, R.; Amancio Chassin, O. Uso de Nitazoxanida En Infecciones Virales. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica* **2021**, 34 (2), 94–99. <https://doi.org/10.35366/100548>.
- (62) Silva, M.; Espejo, A.; Pereyra, M. L.; Lynch, M.; Thompson, M.; Taconelli, H.; Baré, P.; Pereson, M. J.; Garbini, M.; Crucci, P.; Enriquez, D.; de, D. Efficacy of Nitazoxanide in Reducing the Viral Load in COVID-19 Patients. *medRxiv* **2021**, 1–17. <https://doi.org/10.1101/2021.03.03.21252509>.
- (63) Jasenosky, L. D.; Cadena, C.; Mire, C. E.; Borisevich, V.; Haridas, V.; Ranjbar, S.; Nambu, A.; Bavari, S.; Soloveva, V.; Sadukhan, S.; Cassell, G. H.; Geisbert, T. W.; Hur, S.; Goldfeld, A. E. The FDA-Approved Oral Drug Nitazoxanide Amplifies Host Antiviral Responses and Inhibits Ebola Virus. *iScience* **2019**, 19, 1265–1276. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.07.003>.
- (64) Dang, W.; Xu, L.; Ma, B.; Chen, S.; Yin, Y.; Chang, K. O.; Peppelenbosch, M. P.; Pan, Q. Nitazoxanide Inhibits Human Norovirus Replication and Synergizes with Ribavirin by Activation of Cellular Antiviral Response. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, 62 (11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00707-18>.
- (65) Elazar, M.; Liu, M.; McKenna, S. A.; Liu, P.; Gehrig, E. A.; Puglisi, J. D.; Rossignol, J. F.; Glenn, J. S. The Anti-Hepatitis C Agent Nitazoxanide Induces Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 α Via Protein Kinase Activated by Double-Stranded RNA Activation. *Gastroenterology* **2009**, 137 (5), 1827–1835. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.056>.
- (66) Montero, A. Thizoxanide (2-Hydroxy-N-(5-Nitro-2-Thiazolyl)Benzamide) Inhibits Hepatitis C Virus Replication Through Modulation of NS5A Hyperphosphorylation, Georgetown University, Washington, D.C, **2012**.
- (67) 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>.
- (68) 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>.
- (69) Salas-Zúñiga, R.; Rodríguez-Ruiz, C.; Höpfl, H.; Morales-Rojas, H.; Sánchez-Guadarrama, O.; Rodríguez-Cuamatzi, P.; Herrera-Ruiz, D. Dissolution Advantage of Nitazoxanide Cocrystals in the Presence of Cellulosic Polymers. *Pharmaceutics* **2020**, 12 (1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010023>.
- (70) Bharti, C.; Nagaich, U.; Pandey, J.; Jain, S.; Jain, N. Development of Nitazoxanide-Loaded Colon-Targeted Formulation for Intestinal Parasitic Infections: Centre Composite Design-Based Optimization and Characterization. *Futur J Pharm Sci* **2020**, 6 (1). <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00130-1>.
- (71) 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.; Aljayyousi, 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>.
- (72) Fox, L. M.; Saravolatz, L. D. Nitazoxanide: A New Thiazolide Antiparasitic Agent. *Clinical Infectious Diseases* **2005**, *40*, 1173–1180.
- (73) Matysiak-Budnik, T.; Mégraud, F.; Heyman, M. In-Vitro Transfer of Nitazoxanide across the Intestinal Epithelial Barrier. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *54* (10), 1413–1417. <https://doi.org/10.1211/002235702760345518>.
- (74) Anderson, V. R.; Curran, M. P.; Alam, S.; Young, J. D. Nitazoxanide A Review of Its Use in the Treatment of Gastrointestinal Infections. *Drugs* **2007**, *67* (13), 1947–1967.
- (75) Center for drug evaluation and research. *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Reviews*; **2004**.
- (76) Haffizulla, J.; Hartman, A.; Hoppers, M.; Resnick, H.; Samudrala, S.; Ginocchio, C.; Bardin, M.; Rossignol, J. F. Effect of Nitazoxanide in Adults and Adolescents with Acute Uncomplicated Influenza: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 2b/3 Trial. *Lancet Infect Dis* **2014**, *14* (7), 609–618. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70717-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70717-0).
- (77) Piacentini, S.; La Frazia, S.; Riccio, A.; Pedersen, J. Z.; Topai, A.; Nicolotti, O.; Rossignol, J. F.; Santoro, M. G. Nitazoxanide Inhibits Paramyxovirus Replication by Targeting the Fusion Protein Folding: Role of Glycoprotein-Specific Thiol Oxidoreductase ERp57. *Sci Rep* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28172-9>.
- (78) Lokhande, A. S.; Devarajan, P. V. A Review on Possible Mechanistic Insights of Nitazoxanide for Repurposing in COVID-19. *Eur J Pharmacol* **2021**, *891*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173748>.
- (79) Rossignol, J. F. Nitazoxanide, a New Drug Candidate for the Treatment of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Infect Public Health* **2016**, *9* (3), 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.04.001>.
- (80) 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>.
- (81) Lishan, S. Disruption of HBx-DDB1 by NTZ: New Mechanistic Insight Into an Old Drug With Broad Anti-Infective Activities. *Celular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **2019**, *7* (2), 289–290. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.013>.
- (82) Rossignol, J. F.; Bréchet, C. A Pilot Clinical Trial of Nitazoxanide in the Treatment of Chronic Hepatitis B. *Hepatol Commun* **2019**, *3* (6), 744–747. <https://doi.org/10.1002/hep4.1339>.
- (83) Khattab, M. A. Targeting Host Factors: A Novel Rationale for the Management of Hepatitis C Virus. *World J Gastroenterol* **2009**, *15* (28), 3472–3479. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.3472>.
- (84) Dey, M.; Velyvis, A.; Li, J. J.; Chiu, E.; Chiovitti, D.; Kay, L. E.; Sicheri, F.; Dever, T. E. Requirement for Kinase-Induced Conformational Change in Eukaryotic Initiation Factor 2 α (EIF2 α) Restricts Phosphorylation of Ser51. *PNAS* **2011**, *108* (11), 4316–4321. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014872108/-/DCSupplemental>.
- (85) Nika, J.; Rippel, S.; Hannig, E. M. Biochemical Analysis of the EIF2 $\beta\gamma$ Complex Reveals a Structural Function for EIF2 α in Catalyzed Nucleotide Exchange. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (2), 1051–1056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007398200>.
- (86) Kapp, L. D.; Lorsch, J. R. GTP-Dependent Recognition of the Methionine Moiety on Initiator tRNA by Translation Factor EIF2. *J Mol Biol* **2004**, *335* (4), 923–936. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.025>.
- (87) Montero, A. Nitazoxanide (2-Hydroxy-N-(5-Nitro-2-Thiazolyl)Benzamide) Inhibits Hepatitis C Virus Replication Through Modulation of NS5A Hyperphosphorylation, Georgetown University, Washington, D.C, **2012**.
- (88) Aungst, B. J. Optimizing Oral Bioavailability in Drug Discovery: An Overview of Design and Testing Strategies and Formulation Options. *J Pharm Sci* **2017**, *106* (4), 921–929. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.12.002>.



- (89) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. "Que Establece Las Pruebas y Procedimientos Para Demostrar Que Un Medicamento Es Intercambiable. Requisitos a Que Sujeta Los Terceros Autorizados Que Realicen Las Pruebas de Intercambiabilidad. Requisitos Para Los Estudios de Biocomparabilidad. Requisitos a Que Deben Sujeta Los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalaria Que Realicen Las Pruebas de Biocomparabilidad."; **2013**.
- (90) Hua, S. Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. *Front Pharmacol* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00524>.
- (91) Bhalani, D. V.; Nutan, B.; Kumar, A.; Singh Chandel, A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines* **2022**, *10* (9). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>.
- (92) Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm* **2012**, *2012*, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>.
- (93) Rodriguez-Aller, M.; Guillarme, D.; Veuthey, J. L.; Gurny, R. Strategies for Formulating and Delivering Poorly Water-Soluble Drugs. *J Drug Deliv Sci Technol* **2015**, *30*, 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.05.009>.
- (94) B. Shekhawat, P.; B. Pokharkar, V. Understanding Peroral Absorption: Regulatory Aspects and Contemporary Approaches to Tackling Solubility and Permeability Hurdles. *Acta Pharm Sin B* **2017**, *7* (3), 260–280. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.09.005>.
- (95) Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *Journal of Controlled Release* **2001**, *70*, 1–20.
- (96) Kewal, J. Chapter 1: Drug Delivery Systems-An Overview. In *Drug Delivery Systems*; **2008**; Vol. 437, pp 1–49.
- (97) Alpturk, O.; Sengel-Turk, C. T. Chapter 2: Nanoparticles: General Aspects and Applications. In *Drug Delivery Approaches and Nanosystems*; **2018**; Vol. 1, pp 34–48.
- (98) Mendoza, G.; Rodríguez-López, J. L. La Nanociencia y La Nanotecnología: Una Revolución En Curso. *Perfiles Latinoamericanos* **2007**, *29*, 161–186.
- (99) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Advances and Challenges of Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems. *Expert Opin Drug Deliv* **2007**, *4* (6), 621–633. <https://doi.org/10.1517/17425247.4.6.621>.
- (100) Irache, J. M. Nanomedicina: Nanopartículas Con Aplicaciones Médicas. *An. Siste. Sanit. Navar* **2008**, *31* (1), 7–10.
- (101) Varshney, H. M.; Mohan, S. "Nanotechnology" Current Status in Pharmaceutical Science: A Review. *International Journal of Therapeutic Applications* **2012**, *6*, 14–24.
- (102) Yaqoob, A. A.; Ahmad, H.; Parveen, T.; Ahmad, A.; Oves, M.; Ismail, I. M. I.; Qari, H. A.; Umar, K.; Mohamad Ibrahim, M. N. Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Front Chem* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00341>.
- (103) Rojas-Aguirre, Y.; Aguado-Castrejón, K.; González-Méndez, I. La Nanomedicina y Los Sistemas de Liberación de Fármacos: ¿la (r)Evolución de La Terapia Contra El Cáncer? *Educacion Quimica* **2016**, *27* (4), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>.
- (104) Zielińska, A.; Carreiró, F.; Oliveira, A. M.; Neves, A.; Pires, B.; Venkatesh, D. N.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Eder, P.; Silva, A. M.; Santini, A.; Souto, E. B. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* **2020**, *25* (3731), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.
- (105) Gagliardi, A.; Giuliano, E.; Venkateswararao, E.; Fresta, M.; Bulotta, S.; Awasthi, V.; Cosco, D. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Front Pharmacol* **2021**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>.



- (106) Pridgen, E. M.; Alexis, F.; Farokhzad, O. C. Polymeric Nanoparticle Technologies for Oral Drug Delivery. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2014**, *12* (10), 1605–1610. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.06.018>.
- (107) Lembo, D.; Donalizio, M.; Civra, A.; Argenziano, M.; Cavalli, R. Nanomedicine Formulations for the Delivery of Antiviral Drugs: A Promising Solution for the Treatment of Viral Infections. *Expert Opin Drug Deliv* **2018**, *15* (1), 93–114. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1360863>.
- (108) Chakravarty, M.; Vora, A. Nanotechnology-Based Antiviral Therapeutics. *Drug Deliv Transl Res* **2021**, *11* (3), 748–787. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00818-0>.
- (109) Lembo, D.; Cavalli, R. Nanoparticulate Delivery Systems for Antiviral Drugs. *Antivir Chem Chemother* **2010**, *21* (2), 53–70. <https://doi.org/10.3851/IMP1684>.
- (110) Wu, J.; Wang, H.; Li, B. Structure-Aided ACEI-Capped Remdesivir-Loaded Novel PLGA Nanoparticles: Toward a Computational Simulation Design for Anti-SARS-CoV-2 Therapy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2020**, *22* (48), 28434–28439. <https://doi.org/10.1039/d0cp04389c>.
- (111) Liu, C.-H.; Lin, C.-C.; Hsu, W.-C.; Chung, C.-Y.; Lin, C.-C.; Jassey, A.; Chang, S.-P.; Tai, C.-J.; Tai, C.-J.; Shields, J.; Richardson, C. D.; Yen, M.-H.; Lin, L.-T. Highly Bioavailable Silibinin Nanoparticles Inhibit HCV Infection. *Hepatology* **2016**, *66* (10), 1853–1861. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312019>.
- (112) Dhoke, D. M.; Basaiyye, S. S.; Khedekar, P. B. Development and Characterization of L-HSA Conjugated PLGA Nanoparticle for Hepatocyte Targeted Delivery of Antiviral Drug. *J Drug Deliv Sci Technol* **2018**, *47*, 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.06.006>.
- (113) Jyothi, K. R.; Beloor, J.; Jo, A.; Nguyen, M. N.; Choi, T. G.; Kim, J. H.; Akter, S.; Lee, S. K.; Maeng, C. H.; Baik, H. H.; Kang, I.; Ha, J.; Kim, S. S. Liver-Targeted Cyclosporine A-Encapsulated Poly (Lactic-Co-Glycolic) Acid Nanoparticles Inhibit Hepatitis C Virus Replication. *Int J Nanomedicine* **2015**, *10*, 903–921. <https://doi.org/10.2147/IJN.S74723>.
- (114) Lv, S.; Wang, J.; Dou, S.; Yang, X.; Ni, X.; Sun, R.; Tian, Z.; Wei, H. Nanoparticles Encapsulating Hepatitis B Virus Cytosine-Phosphate-Guanosine Induce Therapeutic Immunity against HBV Infection. *Hepatology* **2014**, *59* (2), 385–394. <https://doi.org/10.1002/HEP.26654>.
- (115) Liechty, W. B.; Kryscio, D. R.; Slaughter, B. V.; Peppas, N. A. Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **2010**, *1*, 149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847>.
- (116) Kwon, G. S.; Furgeson, D. Y. Biodegradable Polymers for Drug Delivery Systems. In *Biomedical Polymers*; Elsevier Inc., **2007**; pp 83–110. <https://doi.org/10.1533/9781845693640.83>.
- (117) Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res* **2009**, *26* (5), 1025–1058. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>.
- (118) Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The Return of a Forgotten Polymer - Polycaprolactone in the 21st Century. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2010**, *35* (10), 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>.
- (119) Sinha, V. R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan, A. Poly-ε-Caprolactone Microspheres and Nanospheres: An Overview. *Int J Pharm* **2004**, *278* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044>.
- (120) Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine* **2006**, *2* (1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>.
- (121) Ahlin Grabnar, P.; Kristl, J. The Manufacturing Techniques of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles from Preformed Polymers. *J Microencapsul* **2011**, *28* (4), 323–335. <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.569763>.
- (122) Zielinska, A.; Carreiró, F.; Oliveira, A. M.; Neves, A.; Pires, B.; Nagasamy Venkatesh, D.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Eder, P.; Silva, A. M.; Santini, A.; Souto, E. B. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* **2020**, *25* (16). <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.



- (123) Rao, J. P.; Geckeler, K. E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2011**, *36* (7), 887–913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>.
- (124) Rafiei, P.; Haddadi, A. A Robust Systematic Design: Optimization and Preparation of Polymeric Nanoparticles of PLGA for Docetaxel Intravenous Delivery. *Materials Science and Engineering C* **2019**, *104*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109950>.
- (125) Kurd, M.; Malvajerd, S. S.; Rezaee, S.; Hamidi, M.; Derakhshandeh, K. Oral Delivery of Indinavir Using MPEG-PCL Nanoparticles: Preparation, Optimization, Cellular Uptake, Transport and Pharmacokinetic Evaluation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2019**, *47* (1), 2123–2133. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1616553>.
- (126) Udornpormongkol, P.; Chiang, B. H. Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles for Enhanced Anti-Colorectal Cancer Applications. *J Biomater Appl* **2015**, *30* (5), 537–546. <https://doi.org/10.1177/0885328215594479>.
- (127) Jie, P.; Venkatraman, S. S.; Min, F.; Freddy, B. Y. C.; Huat, G. L. Micelle-like Nanoparticles of Star-Branched PEO-PLA Copolymers as Chemotherapeutic Carrier. *Journal of Controlled Release* **2005**, *110* (1), 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.011>.
- (128) Khayata, N.; Abdelwahed, W.; Chehna, M. F.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation of Vitamin e Loaded Nanocapsules by the Nanoprecipitation Method: From Laboratory Scale to Large Scale Using a Membrane Contactor. *Int J Pharm* **2012**, *423* (2), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.016>.
- (129) Song, X.; Zhao, Y.; Wu, W.; Bi, Y.; Cai, Z.; Chen, Q.; Li, Y.; Hou, S. PLGA Nanoparticles Simultaneously Loaded with Vincristine Sulfate and Verapamil Hydrochloride: Systematic Study of Particle Size and Drug Entrapment Efficiency. *Int J Pharm* **2008**, *350* (1–2), 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.034>.
- (130) Konan-Kouakou, Y. N.; Boch, R.; Gurny, R.; Allémann, E. In Vitro and in Vivo Activities of Verteporfin-Loaded Nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2005**, *103* (1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.023>.
- (131) Chiellini, E.; Errico, C.; Bartoli, C.; Chiellini, F. Poly(Hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *J Biomed Biotechnol* **2009**, *2009*. <https://doi.org/10.1155/2009/571702>.
- (132) Choi, S. W.; Kim, J. H. Design of Surface-Modified Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Bone. *Journal of Controlled Release* **2007**, *122* (1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.06.003>.
- (133) Seijo, B.; Fattal, E.; Roblot-Treupel, L.; Couvreur, P. Design of Nanoparticles of Less than 50 Nm Diameter: Preparation, Characterization and Drug Loading. *Int J Pharm* **1990**, *62*, 1–7.
- (134) Radwan, M. A.; Aboul-Enein, H. Y. The Effect of Oral Absorption Enhancers on the in Vivo Performance of Insulin-Loaded Poly(Ethylcyanoacrylate) Nanospheres in Diabetic Rats. *J Microencapsul* **2002**, *19* (2), 225–235. <https://doi.org/10.1080/02652040110081406>.
- (135) Rajot, I.; Bône, S.; Graillat, C.; Hamaide, T. Nonionic Nanoparticles by Miniemulsion Polymerization of Vinyl Acetate with Oligocaprolactone Macromonomer or Miglyol as Hydrophobe. Application to the Encapsulation of Indomethacin. *Macromolecules* **2003**, *36* (20), 7484–7490. <https://doi.org/10.1021/ma0343434>.
- (136) Mangia, L. H. R.; Ferraz, H. C.; Souza, R. S. D.; Pereira, M. C. S.; Pinto, J. C. In Situ Encapsulation of Rivastigmine in TAT-Functionalized P(MMA-Co-AA) Nanoparticles through Miniemulsion Polymerization. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2021**, *624*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126776>.
- (137) Ge, J.; Jacobson, G. B.; Lobovkina, T.; Holmberg, K.; Zare, R. N. Sustained Release of Nucleic Acids from Polymeric Nanoparticles Using Microemulsion Precipitation in Supercritical Carbon Dioxide. *Chemical Communications* **2010**, *46* (47), 9034–9036. <https://doi.org/10.1039/c0cc04258g>.
- (138) Sobh, R. A.; Nasr, H. E.; Moustafa, A. B.; Mohamed, W. S. Tailoring of Anticancer Drugs Loaded in MWCNT/Poly(MMA-Co-HEMA) Nanosphere Composite by Using in Situ Microemulsion Polymerization. *J Pharm Investig* **2019**, *49* (1), 45–55. <https://doi.org/10.1007/s40005-018-0390-8>.



- (139) Aboubakar, M.; Puisieux, F.; Couvreur, P.; Deyme, M.; Vauthier, C. Study of the Mechanism of Insulin Encapsulation in Poly(isobutylcyanoacrylate) Nanocapsules Obtained by Interfacial Polymerization. *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, *47* (4), 568–576.
- (140) Katmis, A.; Fide, S.; Karaismailoglu, S.; Derman, S. Synthesis and Characterization Methods of Polymeric Nanoparticles. *Characterization and Application of Nanomaterials* **2018**, *1*. <https://doi.org/10.24294/can.v1i4.791>.
- (141) Lu, X. Y.; Wu, D. C.; Li, Z. J.; Chen, G. Q. Polymer Nanoparticles. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier B.V., **2011**; Vol. 104, pp 299–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3>.
- (142) Sundar, S.; Kundu, J.; Kundu, S. C. Biopolymeric Nanoparticles. *Sci Technol Adv Mater* **2010**, *11* (1), 014104. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014104>.
- (143) Cuadros-Moreno, A.; Casañas Pimentel, R.; San Martín-Martínez, E.; Yañes Fernandez, J. Dispersión de Luz Dinámica En La Determinación de Tamaño de Nanopartículas Poliméricas I. INTRODUCCIÓN. *Am. J. Phys. Educ* **2014**, *8* (4).
- (144) Lu, X. Y.; Wu, D. C.; Li, Z. J.; Chen, G. Q. Polymer Nanoparticles. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier B.V., **2011**; Vol. 104, pp 299–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3>.
- (145) Elsabahy, M.; Wooley, K. L. Design of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Delivery Applications. *Chem Soc Rev* **2012**, *41* (7), 2545–2561. <https://doi.org/10.1039/c2cs15327k>.
- (146) Mahmood, S.; Mandal, U. K.; Chatterjee, B.; Taher, M. Advanced Characterizations of Nanoparticles for Drug Delivery: Investigating Their Properties through the Techniques Used in Their Evaluations. *Nanotechnol Rev* **2017**, *6* (4), 355–372. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0050>.
- (147) Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, *12* (7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- (148) Chopra, S.; Mahdi, S.; Kaur, J.; Iqbal, Z.; Talegaonkar, S.; Ahmad, F. J. Advances and Potential Applications of Chitosan Derivatives as Mucoadhesive Biomaterials in Modern Drug Delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *58* (8), 1021–1032. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.8.0002>.
- (149) Lin, P. C.; Lin, S.; Wang, P. C.; Sridhar, R. Techniques for Physicochemical Characterization of Nanomaterials. *Biotechnol Adv* **2014**, *32* (4), 711–726. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>.
- (150) USP. (696) Characterization of Crystalline Solids by Microcalorimetry and Solution Calorimetry. In *The United States Pharmacopeial*; **2012**; pp 1–3.
- (151) Crucho, C. I. C.; Barros, M. T. Polymeric Nanoparticles: A Study on the Preparation Variables and Characterization Methods. *Materials Science and Engineering C* **2017**, *80*, 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>.
- (152) Castro, K. C. de; Costa, J. M.; Campos, M. G. N. Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles: A Review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2022**, *71* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436>.
- (153) Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *Journal of Controlled Release* **2001**, *70*, 1–20.
- (154) Kamaly, N.; Yameen, B.; Wu, J.; Farokhzad, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev* **2016**, *116* (4), 2602–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.
- (155) Abhishek, G.; Visht, S.; Sharma, P. K.; Kumar, N. Formulation, Characterization and Application on Nanoparticle: A Review. *Der Pharmacia Sinica* **2011**, *2* (2), 17–26.
- (156) D'Souza, S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics* **2014**, *2014*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/304757>.



- (157) Ensign, L. M.; Cone, R.; Hanes, J. Oral Drug Delivery with Polymeric Nanoparticles: The Gastrointestinal Mucus Barriers. *Adv Drug Deliv Rev* **2012**, *64* (6), 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009>.
- (158) Lundquist, P.; Artursson, P. Oral Absorption of Peptides and Nanoparticles across the Human Intestine: Opportunities, Limitations and Studies in Human Tissues. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *106*, 256–276. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.07.007>.
- (159) Babadi, D.; Dadashzadeh, S.; Osouli, M.; Daryabari, M. S.; Haeri, A. Nanoformulation Strategies for Improving Intestinal Permeability of Drugs: A More Precise Look at Permeability Assessment Methods and Pharmacokinetic Properties Changes. *Journal of Controlled Release* **2020**, *321*, 669–709. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.041>.
- (160) Nunes, R.; Silva, C.; Chaves, L. Tissue-Based in Vitro and Ex Vivo Models for Intestinal Permeability Studies. In *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based in Vitro Culture Models*; Elsevier, **2015**; pp 203–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100094-6.00013-4>.
- (161) Xu, Y.; Shrestha, N.; Pr eat, V.; Beloqui, A. An Overview of in Vitro, Ex Vivo and in Vivo Models for Studying the Transport of Drugs across Intestinal Barriers. *Adv Drug Deliv Rev* **2021**, *175*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.005>.
- (162) S anchez, A. B.; Calpena, A. C.; Mallandrich, M.; Clares, B. Validation of an Ex Vivo Permeation Method for the Intestinal Permeability of Different BCS Drugs and Its Correlation with Caco-2 in Vitro Experiments. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (12). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11120638>.
- (163) Schaaf, C. R.; Gonzalez, L. M. Use of Translational, Genetically Modified Porcine Models to Ultimately Improve Intestinal Disease Treatment. *Front Vet Sci* **2022**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.878952>.
- (164) Bohrey, S.; Chourasiya, V.; Pandey, A. Polymeric Nanoparticles Containing Diazepam: Preparation, Optimization, Characterization, in-Vitro Drug Release and Release Kinetic Study. *Nano Converg* **2016**, *3* (1). <https://doi.org/10.1186/s40580-016-0061-2>.
- (165) Malesuik, M. D.; Paim, C. S.; Eva, E.; Schapoval, S.; Steppe, M. Development of a Simple, Rapid and Validated Spectrophotometric Method for Nitazoxanide in Pharmaceutical Formulation and Comparison with HPLC. *Quim. Nova* **2010**, *33* (3), 739–742.
- (166) Sachan, A. K.; Gupta, A.; Kumari, K.; Ansari, A. Formulation and Characterization of Microspheres of Nitazoxanide by Chemical Crosslinking Method. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* **2018**, *8* (5), 190–199. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i5.1850>.
- (167) 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>.
- (168) Zhang, H.; Shi, Y.; Wang, H. Solubility Determination of Nitazoxanide in Twelve Organic Solvents from T = 273.15 to 313.15 K. *J Chem Eng Data* **2020**, *65* (7), 3645–3651. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00254>.

12. ANEXOS

Anexo 1. Datos bibliográficos para verificar la solubilidad de NTZ en diferentes disolventes

Tabla 19. Solubilidad en fracción molar de nitazoxanida en diferentes disolventes ¹⁶⁸

Disolvente	Solubilidad de nitazoxanida
N-metil-2-pirrolidona (NMP)	1.127×10^{-1}
N-dimetilformamida (DMF)	1.043×10^{-1}
1,4-dioxano	3.107×10^{-2}
Acetato de etilo	3.990×10^{-3}
Acetonitrilo	2.011×10^{-3}
Isopropanol	5.801×10^{-4}
n-propanol	5.250×10^{-4}
Metanol	3.340×10^{-4}
Tolueno	2.910×10^{-4}

Anexo 2. Datos de la prueba de linealidad y su análisis estadístico

Tabla 20. Resultados del día 1 de linealidad

Concentración de NTZ (µg/ml)	Áreas	Factor respuesta	Promedio	DE	%CV
0.1	58618	586180	574897	9828	1.70960115
0.1	56820	568200			
0.1	57031	570310			
0.25	87501	350004	345263	5375	1.556693614
0.25	84856	339424			
0.25	86590	346360			
0.5	131738	263476	257944	5055	1.959890236
0.5	126782	253564			
0.5	128396	256792			
0.75	170678	227571	224123	3470	1.548353374
0.75	165473	220631			
0.75	168126	224168			
1	223597	223597	219296	3742	1.706495534
1	217507	217507			
1	216784	216784			
1.5	307000	204667	201710	3525	1.747493976
1.5	303982	202655			



1.5	296714	197809			
2	403361	201681	198379	3408	1.717684865
2	389749	194875			
2	397163	198582			
Promedio del %CV					1.706601821

Tabla 21. Estadística de la regresión del día 1 de linealidad

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999340393
Coefficiente de determinación R²	0.998681221
R² ajustado	0.998611811
Error típico	4298.55448
Observaciones	21

Tabla 22. ANOVA de los datos del día 1 de la linealidad

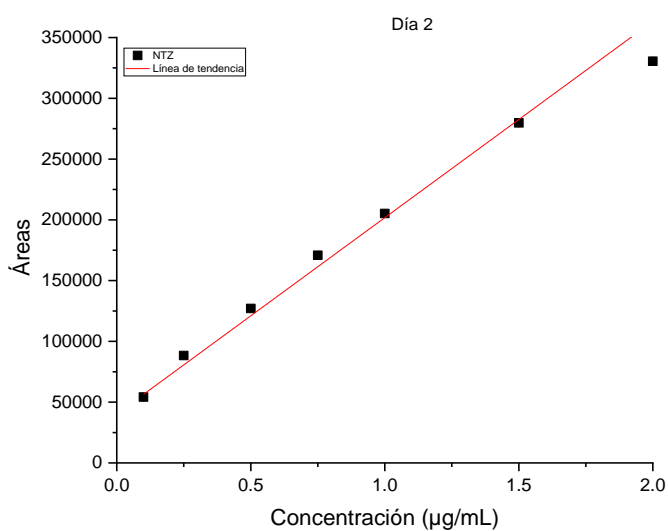
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	2.6586E+11	2.6586E+11	14388.2623	7.9204E-29	
Residuos	19	351073842	18477570.6			
Total	20	2.6621E+11				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	39712.75686	1593.38976	24.9234418	5.6372E-16	36377.7538	43047.76
Variable X 1	177294.9785	1478.06068	119.951083	7.9204E-29	174201.362	180388.595



Tabla 23..Resultados del día 2 de linealidad

Concentración de NTZ (µg/MI)	Áreas	Factor respuesta	Promedio	DE	%CV
0.1	54757	547570	541913	5009	0.92432403
0.1	53804	538040			
0.1	54013	540130			
0.25	87490	349960	353401	4069	1.1513203
0.25	88088	352352			
0.25	89473	357892			
0.5	127668	255336	254167	3700	1.45577734
0.5	128571	257142			
0.5	125012	250024			
0.75	173298	231064	227727	4407	1.93502076
0.75	172039	229385			
0.75	167049	222732			
1	205688	205688	205205	3779	1.84143804
1	208719	208719			
1	201208	201208			
1.5	273875	182583	186551	3462	1.85588253
1.5	283441	188961			
1.5	282162	188108			
2	330937	165469	165256	2519	1.52429043
2	325275	162638			
2	335324	167662			
Promedio del %CV					1.52686478



Gráfica 19. Curvas de calibración del día 2 para la evaluación de la linealidad (r=3)

Tabla 24. Estadística de la regresión lineal del día 2 de linealidad

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.994933236
Coefficiente de determinación R²	0.989892144
R² ajustado	0.989360152
Error típico	9819.762687
Observaciones	21

Tabla 25. ANOVA de los datos del día 2 de linealidad

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	1.79426E+11	1.7943E+11	1860.726021	2.0096E-20	
Residuos	19	1832127045	96427739.2			
Total	20	1.81258E+11				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	52499.35766	3639.99325	14.4229272	1.0952E-11	44880.7642	60117.9511
Variable X 1	145650.5185	3376.531609	43.1361336	2.00959E-20	138583.357	152717.68

Anexo 3. Datos utilizados en las pruebas de precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación

Tabla 26. Resultados de la precisión

Concentración (µg/mL)	Área	Factor respuesta	Promedio	DE	%CV
0.3	59724	199080	199454	466.2418702	0.23375858
0.3	59792	199307			
0.3	59993	199977			
0.9	167455	186061	187688	1431.925665	0.76292963
0.9	169882	188758			
0.9	169420	188244			
1.75	287656	164375	163621	713.5988316	0.43612925
1.75	286181	163532			
1.75	285173	162956			
Promedio del %CV					0.47760582

Tabla 27. Resultados de la exactitud

Nivel bajo			
Conc. (µg/mL)	Área	Conc. Recuperada (µg/mL)	%Recobro
0.3	53999	0.30890613	102.968709
0.3	52221	0.29879365	99.5978822
0.3	51529	0.29485785	98.2859516
0.3	52926	0.30280338	100.934459
0.3	54512	0.31182385	103.941282
Promedio	53037.4	0.30343697	101.145657
DE	1230.173687	0.00699669	2.33222892
CV	2.319445687	2.30581223	2.30581223
Nivel medio			
Conc. µg/mL	Área	Conc. Recuperada µg/mL	%Recobro
0.9	162797	0.92770129	103.077921
0.9	160378	0.91394308	101.549231
0.9	159410	0.90843752	100.937503
0.9	158041	0.90065126	100.072362
0.9	161218	0.91872063	102.08007
Promedio	160368.8	0.91389076	101.543418
DE	1799.675721	0.01023576	1.13730709
CV	1.12221063	1.1200205	1.1200205

Nivel alto			
Conc. $\mu\text{g/mL}$	Área	Conc. Recuperada $\mu\text{g/mL}$	%Recobro
1.75	294227	1.67521731	95.7267036
1.75	291821	1.66153304	94.9447454
1.75	290628	1.65474778	94.5570163
1.75	296816	1.68994241	96.5681375
1.75	301164	1.71467192	97.9812525
Promedio	294931.2	1.67922249	95.9555711
DE	4215.656497	0.0239768	1.37010284
CV	1.429369459	1.42785127	1.42785127

Tabla 28. Límite de detección y cuantificación del método para cuantificar NTZ

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	ÁREAS			Promedio
	C1	C2	C3	
0.1	54757	53804	54013	54191.33333
0.25	87490	88088	89473	88350.33333
0.5	127668	128571	125012	127083.6667
0.75	173298	172039	167049	170795.3333
1	205688	208719	201208	205205
1.5	273875	283441	282162	279826
2	330937	325275	335324	330512
m	144365.9539	144434.6516	148150.9501	145650.52
b	53297.24018	54126.51786	50074.31492	52499.36
r	0.99562137	0.992459972	0.996885447	0.9949889
r²	0.991261912	0.984976795	0.993780595	0.9900064
			DE m	2165.7097
			DE b	2140.6890
			DE b/m	0.0147
			LD	0.0485
			LQ	0.1470

Anexo 4. Análisis estadístico de prueba t para el estudio de permeabilidad

Tabla 29. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>PNPs-NTZ</i>	<i>NTZ</i>
Media	4.21861E-05	8.38372E-06
Varianza	3.75157E-12	2.07002E-12
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	2.9108E-12	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	19.81258285	
P(T<=t) una cola	0.001268914	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.002537828	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Samaria Cortez Nuñez

Título de la tesis:

“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NANOSISTEMA POLIMÉRICO DE
NITAZOXANIDA CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIVIRAL”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Adriana Valladares Méndez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

21 de agosto de 2023

Fecha



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

ADRIANA VALLADARES MENDEZ | Fecha:2023-08-20 14:23:46 | Firmante

GXNPaS7M3HLumU21fWbbifikaUtMd8+jZhVOVttJQZPzihiXTEfQOUTumCRPgcVQir+LjqtBURON2ulD7k64aCce0U/ds/7sLEfEknztvEKLgUHHUE453Lpj1YsQ6mRy/NF9iyE
kmb/+t8LHt23zGgtOPVLXUjZM2xC7JBa5irxHnSljELg6P3FwnirzTS3vWBqCg6/J44X/7TYIX6Tmh61d7CWMZOd4d+RA3hwXAzsjaYRg+R3p4kwmnncm1Kj1167jzfdUkpNZ
SmHGAn+vW41/0u4UQrF3IsKK+NZvldUhrWnuOYpGHw8vqx+CdRatSzZ2PKr4jHdNaKjv87kSQ==

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



[ea9oF7gGE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ITQ1O4VI0vjYhNHpcMYoqGQ1ZCAGGqXM>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Samaria Cortez Nuñez

Título de la tesis:

“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NANOSISTEMA POLIMÉRICO DE
NITAZOXANIDA CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIVIRAL”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Luz María Melgoza Contreras

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

21 de agosto de 2023

Fecha



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

LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS | Fecha:2023-08-20 12:20:05 | Firmante

korQFeS22KH+WizHNOoufHvpA5RK5w/ckmjF9+aSqd/P2ao1+5XgSY0Y5ZrjRPIUbU5R+3l9fGH7luzHQNwKE2uV4oUt7F5cBn5kPbb1cqpNFLYKinr431PQt6hZTCb69uZbxgEh1twE3IHt+iyzOnsIIoazO/pqN+ne+41+z06pXnLVFExGDUx8rSof00zA/VHSiDI3NdAfc3elbobmTkgPi/CAObpINPgf/6hmGMYNwFe3u7sCw2aasZy8an69JhoasCikERTUMx0Mm6ngMX45J4P0MJbHGaHkMnL0d8bTKnTPwKaf53Yj0U80dXqhJbNS3eY6y56JhlgYeq2g==

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



25pHEdhk4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Kwn9Awo0J2dZyglQYirfGLLzmTdmpzYh>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Samaria Cortez Nuñez

Título de la tesis:

“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NANOSISTEMA POLIMÉRICO DE
NITAZOXANIDA CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIVIRAL”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Jessica Nayeli Sánchez Carranza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

21 de agosto de 2023

Fecha



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

JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA | Fecha:2023-08-24 15:49:45 | Firmante

nYkTvPvUOrPzTsh26kDN2au/KamhmESy4bX6dT3S0X3WnfixQdM6n6azUaCRwaD4q4BUNfSVYUtCBryz0JeBXvLj1kBcXbz/jrCUfrNNDTNp0DMvW1yIWvBHFtLNVcki5IwL
uerbAS52D4EN4EOFuLgKwad+eWa6K4GEuT6biFezTc2JKZR2oGOps85Cm8AR+VNczeloi8j/ISmofhGu10HU90dHAUABd6JnJe4JErUCW3Kz95pfsbZo72usls/tRfm+7Gv
bNugOOxaQdV4sZoabkG3LP14T54WNp5bNWG1BQVQtjQO4Pg0Hm/tLsdoCgHAT1m74BVgCY187+uGA==

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



YLz4SExPG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/BH9253WlfjQ672mZocgR734ebZLmmIEi>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Samaria Cortez Nuñez

Título de la tesis:

“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NANOSISTEMA POLIMÉRICO DE
NITAZOXANIDA CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIVIRAL”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Alcalá Alcalá

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

21 de agosto de 2023

Fecha



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

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-08-21 10:39:24 | Firmante

Um2gDHkln3AeD3dbAAUIQ6JVTk18nBo5olbANckph8RE94RoAqFm0aM6WbuGSU8nGLU2g9GAV7vcXxz0nNF3mZvcVKoaCwI9Y66rAztIYiIKOK7fDsFTZ5KX/W3BU4EXSEhftShOriZp7YeXB6TXO5LqfN3q4yJbgre2DfNGDiaAiCUV6kWiDI4pupVCeITOcc6LnHtwBzqTQuqyF+CZab785iLkgNB/FZv6TAdCK2YJw4PmTaTjbJbB9xobhxGJEti+PP8d+/XQIT452tB+kB46wDUQIBwfvWIMFd/NFwz22PAi86u3fsyqaYAsBvd3eE6HGSvCCslpWE+CA==

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



M8baHpyhU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/K34VH7EWxAbBHnXMcAJQvBHCgxba1zbG>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Samaria Cortez Nuñez

Título de la tesis:

“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NANOSISTEMA POLIMÉRICO DE
NITAZOXANIDA CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIVIRAL”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Mariana Ortiz Reynoso

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

21 de agosto de 2023
Fecha



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

MARIANA ORTIZ REYNOSO | Fecha:2023-08-21 10:40:52 | Firmante

WPSbKSI2XHgQpNz+E/g7i+cGPSEZVGZuwbqewxWOU24t/x7GKoFi3dm6M8VEraLK1syUZ+XvBgHQiBOlbaLMnJ1yS4vwZq1hp69xf4oJuuytbUwW8CJnHNesMs6RQ3no
CDI5EK0O4RApaE96i0n9TtMDLcGKkcjDB4i06ShhCM1eWSpFOsZBU62GEihe1pDQ7HA8s2Vrh30xgZIT3ePblqOKcWBOVqww1bEuPw7KmQRACvLBrefNbfPVKkaO4ji
0vUTo5fbj6J5f8Oa4HvpZTR5O8gWI2AtWv0llm2LlEPQmZrGfX+dPYBtt8RmqprkFkBwtDeR9sRA0a+JYU4g==

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



S3wQg6aLo

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/awDPWYw6Xy7cE1tySe5LZXarvwJjc2AV>

