

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“Diseño y caracterización de sistemas auto-nanoemulsionantes de liberación de ingredientes farmacéuticos activos”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICAS

Presenta

LBT. Luz Araceli Reyna Lázaro

Dirigida por:

Dr. Enrique Morales Avila
Dra. Alejandra Ancira Cortez
Dra. Brenda Vianey Gibbens Bandala



Toluca, Estado de México, 2023

ABREVIATURAS

AD32	Valrubicina
ARN	Ácido ribonucleico
API	Principio farmacéutico activo
BCS	Sistema de clasificación biofarmacéutica
C _{máx}	Concentración máxima
CMC	Concentración micelar crítica
CTS	Quitosano
EC%	Porcentaje de eficiencia de carga
EE%	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
EPR	Efecto de retención y permeabilidad mejorada
GI	Gastrointestinal
HLB	Balace hidrófilo-lipófilo
LCI	Límites de detección instrumental
LDC	Conjugado de lípidos y fármacos
LDI	Límites de cuantificación instrumental
LFCS	Sistema de clasificación de formulaciones de lípidos
Log P	Logaritmo del coeficiente de partición
PDI	Índice de polidispersión
Pg-P	Glucoproteína-P
MTX	Metotrexato
NLC	Nanopartícula lipídica nanoestructurada
O/W	Emulsión aceite en agua
PpIX	Protoporfirina IX
RB	Rodamina B
SEDDS	Sistemas de entrega de fármacos auto-emulsionantes
SLN	Nanopartícula lipídica sólida
SMEDDS	Sistemas de entrega de fármacos auto-microemulsionantes
SNEDDS	Sistemas de entrega de fármacos auto-nanoemulsionantes
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
TFD	Terapia fotodinámica
TGI	Tracto gastrointestinal

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
Capítulo 1. Fundamentos teóricos	3
1.1 Sistemas nanoparticulados basados en lípidos	3
1.2 SNEDDS	5
1.3 DOX, AD32 y MTX como adyuvantes en el tratamiento de quimioterapia	11
1.3.1 Doxorubicina	11
1.3.2 Valrubicina	12
1.3.3 Metotrexato	12
1.4 Rodamina B y protoporfirina IX como agentes fotosensibilizantes	13
1.4.1 Rodamina B	13
1.4.2 Protoporfirina IX	14
Capítulo 2. Antecedentes	15
2.1. DOX, AD32, MTX, RB y PpIX en nanopartículas lipídicas	15
2.2 RB y PpIX en nanopartículas lipídicas	16
Capítulo 3. Justificación, planteamiento del problema y pregunta de investigación	19
3.1 Justificación	19
3.2 Planteamiento del problema	20
3.3 Pregunta de investigación	21
Capítulo 4. Hipótesis y objetivos	22
4.1 Hipótesis	22
4.2 Objetivos	22
4.2.1 Objetivo general	22
4.2.2 Objetivos específicos	22
Capítulo 5. Diseño metodológico	23
5.1 Materiales	23
5.2 Métodos experimentales	23
5.2.1 Curvas de calibración	23
5.2.2 Preparación de SNEDDS sin carga	24
A. Preparación de SNEDDS	26
B. Preparación de CTS@SNEDDS	26
5.2.3 Preparación de SNEDDS con carga	27
A. Preparación de SNEDDS-(DOX, AD32, MTX, RB y PpIX)	27
B. Preparación de CTS@SNEDDS -(DOX, AD32, MTX, RB y PpIX)	28
5.2.4 Caracterización fisicoquímica	29
A. Pruebas de estabilidad coloidal y de eficacia de emulsificación	29
B. Eficiencia de encapsulación y eficiencia de carga	29
C. Espectrofotometría UV-Vis	30
D. Espectroscopía FT-IR	30
E. Tamaño de partícula, PDI y potencial ζ	31
F. Morfología	31
G. Liberación de ingredientes farmacéuticos activos	31
5.2.5 Caracterización biológica <i>in vitro</i>	32
A. Cultivo celular	32
B. Estudio de la viabilidad celular	32

C. Evaluación de la internalización celular <i>in vitro</i>	32
5.2.6 Evaluación de la permeabilidad <i>ex vivo</i>	33
5.2.7 Pruebas estadísticas	34
Capítulo 6. Resultados y discusión de resultados	35
6.1 Curvas de calibración	35
6.2 Preparación de SNEDDS sin carga	37
6.3 Preparación de SNEDDS con carga	38
6.4 Caracterización fisicoquímica	40
6.4.1 Pruebas de estabilidad coloidal y de eficacia de emulsificación	40
I) Prueba de centrifugación	40
II) Prueba de congelación-descongelación	41
III) Prueba de calentamiento-enfriamiento	42
IV) Prueba en fluidos fisiológicos	43
6.4.2 Eficiencia de encapsulación y eficiencia de carga	44
6.4.3 Espectrofotometría UV-Vis	48
6.4.4 Espectroscopía FT-IR	51
6.4.5 Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial ζ	52
6.4.6 Morfología	56
6.4.7 Liberación de ingredientes activos	57
6.5 Caracterización biológica	61
6.5.1 Viabilidad celular	61
6.5.2 Evaluación de la internalización celular <i>in vitro</i>	65
6.8.3 Permeabilidad <i>ex vivo</i>	68
Capítulo 7. Conclusiones	71
Capítulo 8. Referencias	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de un sistema coloidal.	5
Figura 2. Interacciones entre los componentes de SNEDDS	6
Figura 3. Estructura de SNEDDS.....	7
Figura 4. Diagrama de proceso de elección de los componentes de la formulación.....	9
Figura 5. Estructura molecular de doxorubicina, valrubicina y metotrexato	11
Figura 6. Estructura molecular de rodamina B y protoporfirina IX	14
Figura 7. Gráficos de la optimización de los SNEDDS.	25
Figura 8. Procedimiento para la preparación de SNEDDS sin carga.	26
Figura 9. Procedimiento para la preparación de CTS@SNEDDS sin carga.....	27
Figura 10. Concentraciones de los componentes de los SNEDDS con carga.	28
Figura 11. Concentraciones de los componentes de los CTS@SNEDDS con carga.....	28
Figura 12. Gráficos de las curvas de calibración de los API.....	36
Figura 13. Fotos de los SNEDDS.....	37
Figura 14. Fotografías de SNEDDS cargados.....	39
Figura 15. % Transmitancia de la prueba de centrifugación.	40
Figura 16. % Transmitancia de la prueba de congelación y descongelación	41
Figura 17. % Transmitancia de estabilidad de calentamiento y enfriamiento.....	42
Figura 18. % Transmitancia de la prueba en fluidos fisiológicos simulados.	43
Figura 19. Eficiencia de atrapamiento y eficiencia de carga de DOX y AD32.....	45
Figura 20. Eficiencia de atrapamiento y eficiencia de carga de MTX	46
Figura 21. Eficiencia de atrapamiento y eficiencia de carga de RB y PpIX.	47
Figura 22. Espectros UV-Vis.	49
Figura 23. Espectro UV-Vis sin diluir.....	50
Figura 24. Espectro infrarrojo	52
Figura 25. Gráficos de distribución de los tamaños de SNEDDS.	55
Figura 26. Imágenes TEM de SNEDDS.....	57
Figura 27. Gráficos de liberación de los ingredientes farmacéuticos activos	59
Figura 28. Gráficos de viabilidad en células HCT-116.	63
Figura 29. Gráficos de viabilidad en células HCT-116 de PpIX.....	64
Figura 30. Diagramas de internalización en células HCT-116 con DOX	66
Figura 31. Diagramas de internalización en células HCT-116 con PpIX	67
Figura 32. Fotos de la histología con RB	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de fármacos que fueron potenciados gracias a SNEDDS.....	10
Tabla 2. DOX, AD32 y MTX cargados en nanopartículas lipídicas.	15
Tabla 3. RB y PpIX cargados en nanopartículas lipídicas.....	17
Tabla 4. Valores obtenidos de las curvas de calibración de los API.	35
Tabla 5. Tamaño y PDI de las muestras de SNEDDS.....	53
Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular a 10 μ M.	64

RESUMEN

Los fármacos quimioterapéuticos (doxorrubicina, valrubicina y metotrexato) y los agentes fotosensibilizantes (rodamina B y protoporfirina IX) son ingredientes farmacéuticos activos (API, por sus siglas en inglés Active Pharmaceutical Ingredient) altamente empleados en el tratamiento contra diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, sus efectos adversos son graves, y desafortunadamente sus características fisicoquímicas y toxicológicas limitan su administración oral, lo que reduce significativamente la respuesta a la terapia. La administración parenteral es la vía más utilizada y suelen observarse múltiples efectos que reducen la calidad de vida de los pacientes.

Para potenciar los efectos de estos agentes, se propuso que sean administrados y transportados en sistemas de entrega de fármacos auto-nanoemulsionantes (SNEDDS, por sus siglas en inglés in self-nanoemulsifying drug delivery systems), los cuales son vehículos que forman una emulsión nanométrica, que gracias a sus características permitieron optimizar el transporte, captación y liberación de los API mencionados.

En la presente investigación se caracterizaron fisicoquímica y biológicamente dos tipos de nanosistemas: SNEDDS simples (O/W), capaces de acarrear API, denotados como (API)SNEDDS y SNEDDS multifásicos (W/O/W), compuestos de un núcleo de quitosano (CTS) capaz de encapsular ARN (no caracterizado en este trabajo de tesis) y el API, CTS@(API)SNEDDS. Los SNEDDS obtenidos presentaron un tamaño promedio de partícula menor a 50 nm, de forma cuasiesférica bien definida. Se observó una eficiencia de atrapamiento entre 48 y 98 %, se observó la protección de los SNEDDS en el tracto gastrointestinal (pH 1.2), así como una mayor liberación del API en fluidos intestinales a pH 6.8. A una concentración de 10 μ M se observó el efecto sinérgico de los API en SNEDDS en la línea celular HCT-116, así como el aumento en la internalización celular, y se identificó que tiene un efecto de permeabilidad y retención aumentada, por lo que se concluye que estos sistemas son una nueva opción para la liberación de APIs para el tratamiento oral del cáncer.

ABSTRACT

Chemotherapeutic drugs (doxorubicin, valrubicin and methotrexate) and photosensitizing agents (rhodamine B and protoporphyrin IX) are active pharmaceutical ingredients (APIs) widely used in the treatment of various types of cancer. However, their toxic side effects are severe and, unfortunately, their physicochemical and toxicological characteristics limit their oral administration, which significantly reduces the response to therapy. Parenteral administration is the most used route and multiple effects are often observed that reduce the patients quality of life.

To enhance the effects of these agents, it was proposed the administration and transportation of APIs in self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS), which are vehicles that form a nanometric emulsion, which due to their intrinsic characteristics allowed optimizing transport, uptake and APIs release.

In the present investigation, two types of nanosystems were characterized physicochemically and biologically: simple SNEDDS (O/W) carrying API, denoted as (API)SNEDDS and multiphase SNEDDS (W/O/W), composed of a chitosan (CTS) carrying RNA and API (not characterized in this thesis work), CTS@(API)SNEDDS. The SNEDDS obtained presented an average particle size of less than 50 nm, quasispherical and well defined shape. An entrapment efficiency between 48 and 98 %, protection of the SNEDDS in the gastrointestinal tract (pH 1.2), as well as a higher release of the API in intestinal fluids at pH 6.8 was observed. At 10 μ M of API concentration in SNEDDS, synergistic effect was observed in HCT-116 cell line, also, an increase in cell internalization was identified. SNEDDS had an increased permeability and retention effect, so it is concluded that these systems are a new option for the release of APIs for the oral treatment of cancer.

Capítulo 1. Fundamentos teóricos

1.1 Sistemas nanoparticulados basados en lípidos

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la división anormal de las células del cuerpo, en las cuales pueden formarse tumores malignos. Los tratamientos adyuvantes, después de la cirugía, suelen ser quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica y la terapia fotodinámica (TFD) (Wong et al. 2019; Lee et al. 2021).

Desafortunadamente, en el tratamiento secundario se pueden producir diversas respuestas que limitan el ataque a la enfermedad, como la farmacorresistencia, baja concentración del Principio farmacéutico activo (API) en el sitio de interés, distribución no específica en tejidos sanos y una tasa de excreción rápida que se asocia con efectos adversos graves, como náuseas, alopecia, alteración de la mucosa de la boca, la faringe, médula ósea, toxicidad hepática, renal, cardíaca, entre otros (Aviral et al. 2011; González-Fernández et al. 2017; Jeught et al. 2018).

La nanotecnología se ha convertido en el pilar para la mejora en la respuesta terapéutica y disminución de la toxicidad. Los sistemas nanoparticulados son aquellos que miden menos de 100 nm, y se ha comprobado que pueden superar las limitaciones ocasionadas por la terapéutica convencional, gracias a sus propiedades fisicoquímicas únicas y sus modificaciones funcionales debido a su composición. Permiten generar tamaños y carga de superficie adecuados que interactúan con los sistemas biológicos, que permiten cargar fármacos lipofílicos e hidrofílicos, generar una liberación controlada y sostenida. También son biocompatibles o biodegradables, lo que genera un perfil de baja toxicidad (H. Li et al. 2023).

Cuando se desarrolla un sistema nanoparticulado, es importante considerar en el tipo de API por acarrear y la forma de administración. Las nanopartículas orgánicas de tipo lipídicas son los liposomas, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, solid lipid nanoparticle),

transportadores de lípidos nanoestructurados (NLC, nanostructured lipid carrier), conjugados de lípidos y fármacos (LDC, lipid drug conjugates) y nanoemulsiones, como los sistemas de entrega de fármacos auto-emulsionantes (SEDDS). El objetivo de este tipo de nanopartículas es aumentar la carga útil de API lipofílicos, sin embargo, también se puede hacer la carga de APIs hidrofílicos, como en los liposomas. Este tipo de nanopartículas en general presentan una producción fácil, purificación simple, liberación controlada de fármacos, vida útil de varios meses, absorción y disolución mejoradas de API, además, permiten generar terapias combinadas, como la quimio-inmunoterapia, quimio-radioterapia, quimio-terapia génica y la quimio-fotodinámica (AbouAitah et al. 2022).

El direccionamiento eficaz de los API se basa en el comportamiento de entrega pasivo o activo. La entrega pasiva dependerá de la concentración de las partículas, se basa principalmente en el tamaño reducido que permite la extravasación en los tejidos tumorales mientras que evita la precipitación o degradación temprana de los API, además, se ha descrito ampliamente el efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR, enhanced permeability and retention effect), el cual es un fenómeno que se caracteriza por la acumulación de API en la vasculatura del tumor.

La entrega activa está mediada por receptor, y se basa en generar nanopartículas multifuncionales que tengan en su superficie moléculas de direccionamiento, como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos o polisacáridos que permiten el reconocimiento y unión a las células cancerosas (Alavi and Hamidi 2019).

La eficacia de la terapia del cáncer depende entre otros factores, de la administración adecuada del principio activo. La ruta más común es la vía parenteral, sin embargo, esta puede acarrear inconvenientes a los pacientes que incluyen la dolencia relacionada con el acceso intravenoso, trombosis, extravasaciones e infecciones (Peltier et al. 2006; Aviral et al. 2011). La vía oral es la vía más favorable debido a su comodidad, y puede ser autoadministrable, sin embargo, los API se enfrentan a barreras fisiológicas y químicas que limitan su absorción, incluido un metabolismo previo a su paso a sistema circulatorio, inestabilidad a pH fisiológicos y/o baja solubilidad acuosa (El-Kattan and Varm 2012).

Es por ello que se han utilizado ampliamente sistemas lipídicos nanoparticulados para la entrega oral de diversos API, ya que funcionan como escudo. Para ello, las nanopartículas

deben evitar su degradación por acción del pH, y de enzimas digestivas como proteasas, lipasas y amilasas, para evitar la fuga temprana del API y precipite, además de pasar la mucosa intestinal (Salvo et al. 2015). Se ha demostrado que la matriz del nanovehículo lipídico evita la precipitación de los API, pueden difundir de manera efectiva a través de la barrera mucosa, pasar por diferentes vías (paracelular, transcelular o endocitosis) por las células del epitelio del intestino delgado hacia su transporte linfático, y de esta manera generar una mejora de la biodisponibilidad oral de los API (Borkar et al. 2016; Suchaoin and Bernkop-Schnürch 2017).

1.2 SNEDDS

El uso de formulaciones lipídicas para mejorar la absorción oral de APIs clase II y clase IV, según el Sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS), es decir, aquellos con baja solubilidad y además baja permeabilidad, respectivamente, han sido foco de atención desde hace ya muchos años (Mu, Holm, and Müllertz 2013). Los sistemas de entrega de fármacos auto-nanoemulsionantes (self-nanoemulsifying drug delivery systems, SNEDDS) son una alternativa efectiva para mejorar la biodisponibilidad de este tipo de APIs.

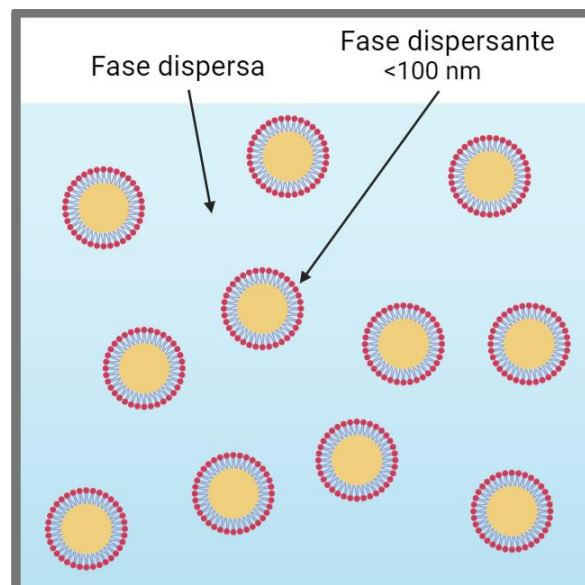


Figura 1. Fases de un sistema coloidal (emulsión).

Los SNEDDS son coloides (ver Figura 1), de tipo emulsiones de tamaño nanométrico (<100 nm). Se definen como mezclas isotrópicas de aceites, tensioactivos, cosolventes y el API (Krstić et al. 2018). Estos sistemas pueden formar espontáneamente (10 - 40 segundos) emulsiones de aceite en agua (O/W) en el fluido gastrointestinal (GI) que pueden interactuar con las membranas intestinales (Nasr, Gardouh, and Ghorab 2016; Mahmood and Bernkop-Schnürch 2019).

La formación y estabilidad del coloide está gobernada principalmente por el tensioactivo que debe tener un balance hidrofílico-lipofílico (HLB, por el inglés hydrophilic-lipophilic balance) >12 para la formación de las nanoemulsiones O/W. A cierta concentración, conocida como concentración micelar crítica (CMC), el tensioactivo altera la energía libre de Gibbs de la interfase, lo que disminuye la tensión interfacial generada entre la fase dispersa y fase dispersante (Figura 2). Se ha reportado que la entropía del sistema permite el autoensamblaje espontáneo (segundos), ya que genera interacciones hidrofóbicas entre los componentes (Nasr, Gardouh, and Ghorab 2016; Llera-Rojas et al. 2017). Dependiendo del tipo de tensioactivo, de su concentración, y de otros componentes que lo acompañan se define el tamaño de la nanopartícula.

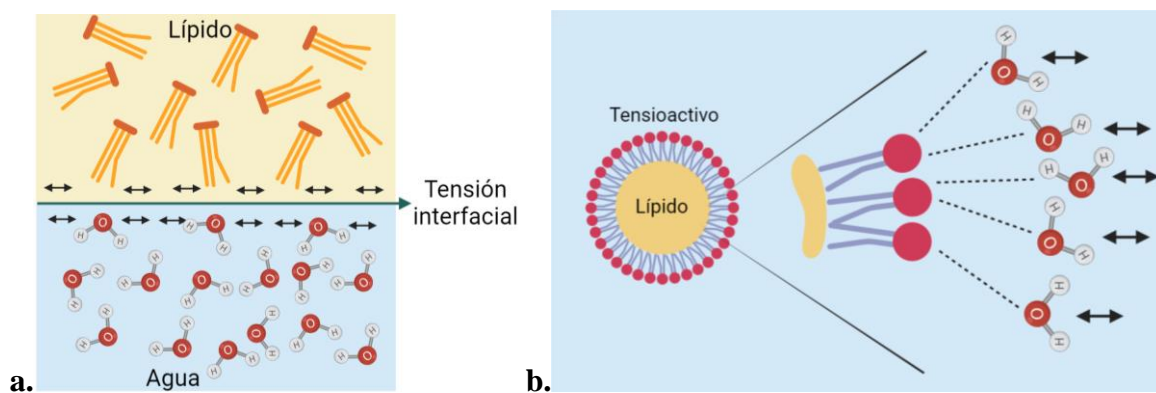


Figura 2. Interacciones entre los componentes de SNEDDS y el agua. **a.** El lípido y el agua son líquidos inmiscibles y tienen una alta tensión superficial, las moléculas alejadas de esta interaccionan de la misma manera en todas direcciones. **b.** El tensioactivo se sitúa en la interfase, disminuyendo tensión interfacial.

Entre las múltiples ventajas de los SNEDDS destacan aumentar la dispersabilidad de los API lipofílicos, evita el metabolismo de primer paso ya que su absorción es linfática, brinda protección al fármaco de precipitación y/o degradación en el tracto gastrointestinal (TGI) (Williams et al. 2012; Ye et al. 2019; Yin et al. 2021), permitiendo llegar al sitio de absorción deseado. El perfil de liberación de los fármacos en los SNEDDS es de tipo sostenida, primero se identifica una liberación rápida seguido de una fase estable, lo cual permite establecer un control de la absorción del API (Usmani et al. 2019; Kazi et al. 2020; Yin et al. 2021).

El Sistema de Clasificación de Formulaciones de Lípidos (LFCS) categoriza las formulaciones a base de lípidos en cuatro tipos diferentes según sus composiciones, las formulaciones tipo IIIB en la que se encuentran los SNEDDS comprenden de aceites (< 20 %), tensioactivos (20 % - 50 %) y cosolventes hidrofílicos (20 % - 50 %) (Mu, Holm, and Müllertz 2013; Cueto, Ortega, and Sotomayor 2019).

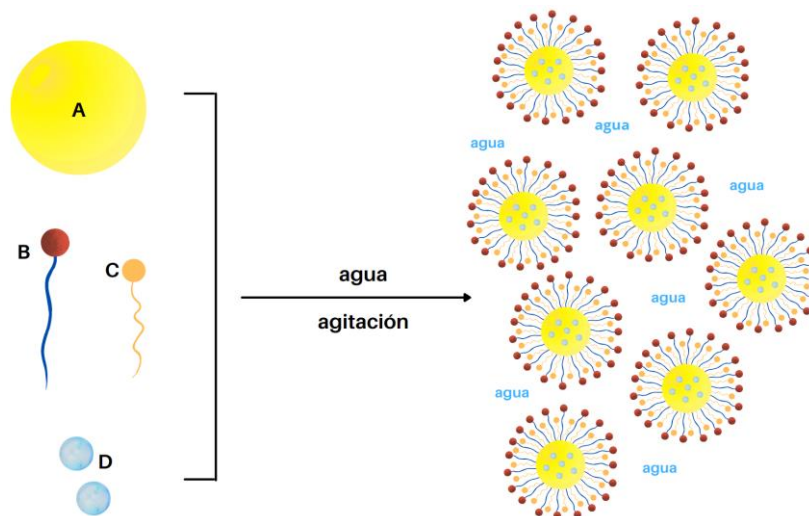


Figura 3. Estructura de SNEDDS. A: lípido; B: tensioactivo; C: cosolvente; D: API, al colocar la mezcla en agua bajo agitación se forman los nanosistemas.

La parte lipídica comprende al núcleo del sistema, permite al API lipofílico mantenerse disuelto, suelen ser triglicéridos de cadena media o larga, ácidos grasos o mezclas de ellos, como aceite de ricino, soja y oliva. Es por ello que los estudios de solubilidad entre el API y

el lípido es fundamental para obtener una alta carga del API (Bu et al. 2017; Cueto, Ortega, and Sotomayor 2019).

Los tensioactivos son estabilizadores del sistema, son moléculas anfipáticas que actúan como mediadores en las interfases aceite-agua (ver Figura 3). Son esencialmente ésteres de ácidos grasos, y se prefiere aquellos no iónicos. Los más utilizados son el Cremophor® EL (aceite de ricino polioxietileno) y los polisorbatos, como el Tween 80 (Benson and Pleiss 2014; Bu et al. 2017; Krstić et al. 2018). Una bondad de este excipiente es la inhibición moderada de las bombas de eflujo, principalmente de la Glucoproteína P (P-gp), resultando en un aumento en la biodisponibilidad oral (Tomaru et al. 2015; Murakami, Bodor, and Bodor 2020).

La inclusión del cosolvente a la formulación facilita el proceso de dispersión, evita la coalescencia, mejora la capacidad de solubilización del fármaco, incrementa la fluidez interfacial y permite reducir la concentración de tensioactivos lo que permite reducir efectos adversos, como irritación en el TGI. Los cosolventes más utilizados corresponden a los alcoholes o polioles de cadena corta, los cuales deben ser de carácter hidrofílico (Krstić et al. 2018; Cueto, Ortega, and Sotomayor 2019; Mohd Izham et al. 2019). En la tabla 1 se pueden observar algunos fármacos que fueron incorporados en estos sistemas nano acarreadores.

La formulación de los SNEDDS, en un sentido estricto, implica elaborar un modelado para la predicción termodinámica y estabilidad, entre los excipientes y el API, sin embargo debido a la complejidad de las formulaciones, en cuanto a las variables experimentales, se pueden hacer aproximaciones semi empíricas, que se evalúan empleando modelos de respuesta como los diagramas de fase ternarios.

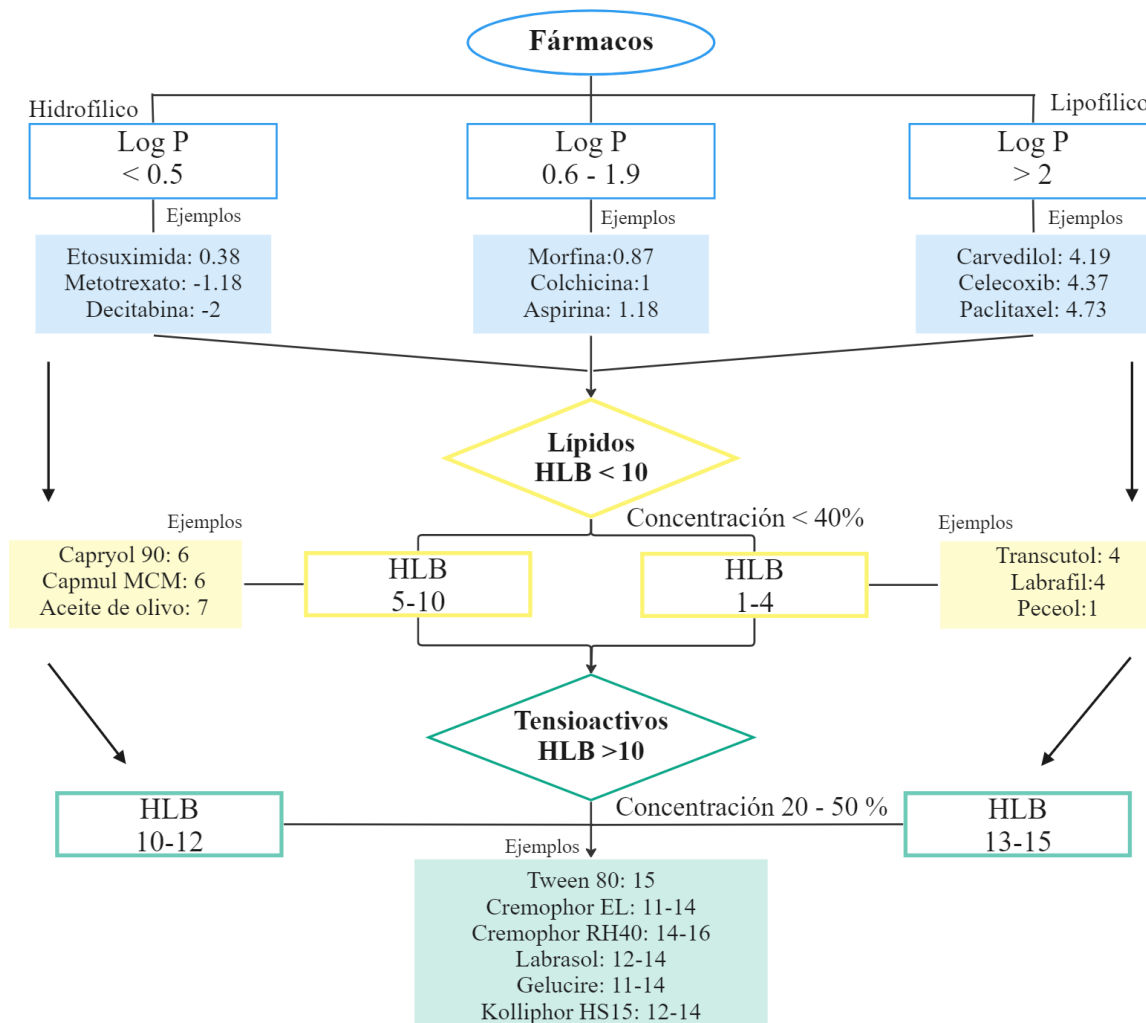


Figura 4. Diagrama de proceso de elección de los componentes de la formulación: ingredientes farmacéuticos activos, lípidos y tensioactivos, según la solubilidad, log P y HLB con ejemplos.

En la Figura 4 se propone el proceso de elección de lípidos y tensioactivos en función de la solubilidad del API. Los API hidrofílicos (Log P menor a 0.5) no se suelen cargar en nanopartículas lipídicas, sin embargo, para aquellos ligeramente lipofílicos (Log P 0.6 y 1.9) se pueden utilizar lípidos con valor de HLB de 5-10 para disolverlos, y para APIs lipofílicos (Log P mayor a 2) lípidos con HLB entre 1 y 4. La elección del tensioactivo se basa principalmente en el valor de HLB del lípido, si el valor es bajo el HLB del tensioactivo es alto (mayor a 12), sin embargo, en la gran mayoría formulaciones lipídicas se utilizan tensioactivos con HLB entre 12 y 15, siendo Tween 80, Cremophor y Labrasol los

mayormente reportados.

Otro factor importante es la concentración de cada componente. Para emulsionar los lípidos en formulaciones de SNEDDS las concentraciones de tensioactivos suelen ser mayor a la del lípido, 20-50 % y < 40 %, respectivamente (Leichner et al. 2019; Cueto, Ortega, and Sotomayor 2019), además se adiciona el cosolvente en la formulación, la mezcla de tensioactivo y de cosolvente se suele reportar como Smix, la cual también permite disolver el API y facilitar la autoemulsificación.

Tabla 1. Ejemplos de fármacos que fueron potenciados gracias a SNEDDS.

API	Componentes de SNEDDS Lípido/Tensioactivo/Cosolvente	Mejoras	Ref.
Olmesartan	Capryol® 90 / Cremophor® RH40 / Transcutol® HP	Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) incrementada 1.72 y 2.77 veces, y biodisponibilidad relativa mejorada 1.44 y 2.09 veces respectivamente ^a	(Nasr, Gardouh, and Ghorab 2016)
Bruceine D	MCT / Solutol HS-15 / Propilenglicol	$C_{m\acute{a}x}$ aumentada más de 2 veces, biodisponibilidad relativa mejorada un 280 % ^b	(Dou et al. 2018)
Docetaxel	Capryol 90 / Cremophor® EL / Transcutol HP®	$C_{m\acute{a}x}$ exhibió un aumento dos veces mayor, biodisponibilidad relativa mejorada en aproximadamente dos veces ^c	(Cui, Zhao, et al. 2019)
Curcumina y piperina	Aceite de semilla negra / Imwitor® 988 / Transcutol® P / Cremophor® RH 40	Mejora significativa de la liberación de los fármacos en un 45 % y 51 % respectivamente ^d	(Kazi et al. 2020)
Genkwanin	Maisine® CC / Labrasol® ALF / Transcutol® HP	$C_{m\acute{a}x}$ aumentada más de 4.34 veces y biodisponibilidad relativa mejorada un 353.28 % ^e	(Yin et al. 2021)

a: Comparado con los productos convencionales comercializados de olmesartan y en suspensión.
 b: En comparación con bruceine D en suspensión.
 c: En comparación con docetaxel en suspensión.
 d: Parámetros comparados con curcumina y piperina puras en polvo.
 e: Parámetros comparados con genkwanin en suspensión.

1.3 DOX, AD32 y MTX como adyuvantes en el tratamiento de quimioterapia

1.3.1 Doxorrubicina

La doxorrubicina (DOX) pertenece al grupo de las antraciclinas, las cuales son antibióticos citostáticos ampliamente utilizados en la práctica oncológica, son derivados de la bacteria *Streptomyces peucetius* (Edwardson et al. 2015). Su fórmula química es $C_{27}H_{29}NO_{11}$ (Figura 5a), de peso molecular 543.52 g/mol y presenta baja permeabilidad (BCS de clase III). (Castro et al. 2006; Benival and Devarajan 2012; Brunton L, Chabner B 2019).

Su mecanismo de acción aún no está completamente elucidado, sin embargo, se sabe que el mecanismo principal consiste en intercalarse en las hebras de ADN estabilizando el complejo entre la enzima topoisomerasa II y el ADN, impidiendo la replicación de las células tumorales. También pueden formar radicales hidroxilo que oxidan las bases del ADN (Salazar-Mendiguchía et al. 2014; Brunton L, Chabner B 2019).

La DOX induce respuestas tanto en células tumorales como en células sanas, además de acumularse en diversos órganos, lo que contribuye a sus efectos adversos tóxicos, como la cardiotoxicidad (Barrett-Lee et al. 2009; Cardinale, Iacopo, and Cipolla 2020). También es común que se genere resistencia a DOX ya que es sustrato de la Glucoproteína-P (González-Fernández et al. 2017).

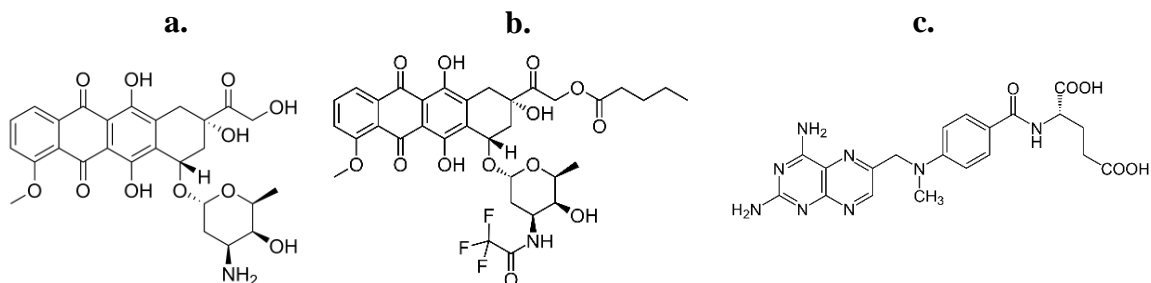


Figura 5. Estructura molecular de: **a.** doxorrubicina, **b.** valrubicina, **c.** metotrexato

1.3.2 Valrubicina

La valrubicina (AD32) es un fármaco quimioterapéutico análogo semisintético de DOX, presenta mayor permeabilidad que DOX debido a que es más lipofílica. Su fórmula molecular es $C_{34}H_{36}F_3NO_{13}$ (Figura 5b), tiene un peso molecular de 723.6 g/mol y es insoluble en agua; por lo que es un compuesto de clase II según el BCS. Ha sido usado para tratamientos contra cáncer de mama, ovario y próstata, así como antiinflamatorio, sin embargo, es mayormente usado para tratar el cáncer de vejiga, siendo su administración intravesicular (Hauge et al. 2012; Lacko et al. 2012; Johnson et al. 2017).

AD32 afecta la replicación, reparación del ADN, así como la síntesis de ARN y proteínas, además detiene la progresión del ciclo celular en la fase G2. AD32 es convertida intracitoplasmáticamente en *N*-trifluoroacetiladriamicina que interactúa con la topoisomerasa II, estabilizando el complejo de ADN-enzima. Además, AD32 al acumularse en el citoplasma puede inhibir a la proteína cinasa C debido a que se asemeja estructuralmente al diacilglicerol, un ligando natural de la proteína.

AD32 presenta limitaciones para su administración, como en pacientes con hipersensibilidad al aceite de ricino polioxilado que es necesario para mantener disuelto el fármaco, una administración intravenosa puede causar daño fetal y generar concentraciones citotóxicas, además, su escasa solubilidad acuosa ha limitado las rutas de administración (Onrust and Lamb 1999; Sharma, Zargar-Shoshtari, and Sexton 2015).

1.3.3 Metotrexato

El metotrexato (MTX), es un fármaco quimioterapéutico importante para el tratamiento de múltiples cánceres y trastornos autoinmunes. Su fórmula molecular es $C_{20}H_{22}N_8O_5$ (Figura 5c), tiene un peso molecular de 454.45 g/mol. Sus formas farmacéuticas son de administración oral y parenteral, sin embargo, es un fármaco altamente hidrófobo clasificado como un compuesto de clase IV según el BCS, y es químicamente inestable (Castro et al. 2006; D. S. Kim et al. 2019).

Es un fármaco que compite con el folato, una vez metabolizado puede inhibir diferentes enzimas, principalmente a la dihidrofolato reductasa, que está relacionada en la síntesis de purinas y pirimidinas, necesarias para la formación de ARN y ADN (Igualada Quintanilla,

Romero Candel, and Tejada Cifuentes 2016). Los efectos tóxicos del MTX se atribuyen a que es poco selectivo entre las células tumorales y las células normales que se dividen rápidamente, como las del epitelio intestinal y la médula ósea, por lo que los pacientes suelen presentar leucopenia, trombocitopenia, anemia, hemorragias, además de toxicidad hepática (Musmade et al. 2014; Brunton L, Chabner B 2019).

1.4 Rodamina B y Protoporfirina IX como agentes fotosensibilizantes

1.4.1 Rodamina B

La rodamina B (RB) es un fluoróforo que posee una fuerte emisión fluorescente, es una sal de cloruro perteneciente a la familia de los xantenos, con fórmula molecular $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ (Figura 6a) y peso molecular de 479.0 g/mol, y es altamente soluble en agua. Es ampliamente usado como colorante histológico, y como sonda fluorescente para el seguimiento *in vivo* y la obtención de imágenes de manera no invasiva (Tseng, Hu, and Chiu 2019; Craparo et al. 2021).

Actualmente ha sido empleada en terapias contra el cáncer; en la terapia fototérmica tiene un papel como sonda de detección de temperatura bajo la irradiación láser (Wang et al. 2020; Agabeigi et al. 2020), y en la TFD como un agente fotosensibilizante, ya que RB es capaz de generar especies reactivas de oxígeno citotóxicas que puede causar apoptosis, necrosis, autofagia y ferroptosis en las células cancerosas (Davies et al. 2016; Hu et al. 2021; Vadarevu et al. 2021).

Al ser administrado el API, idealmente debe dirigirse únicamente al tumor, sin embargo, como toda molécula no dirigida, RB puede migrar a otros tejidos generando citotoxicidad, que puede provocar intoxicación aguda. La RB absorbe en longitudes de onda de luz demasiado cortas para una penetración efectiva en el tejido (500–550 nm) lo que limita la ruta de administración, y la intensidad de la emisión fluorescente disminuye rápidamente (Tseng, Hu, and Chiu 2019; Wang et al. 2020; Zhu et al. 2019; Serbian et al. 2020; Macaşoi et al. 2020).

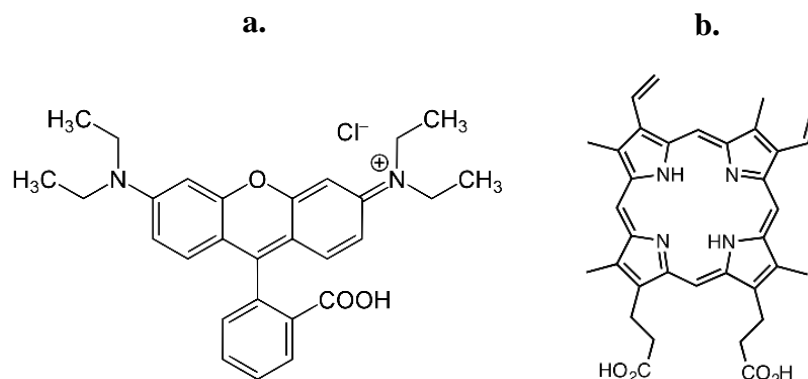


Figura 6. Estructura molecular de: **a.** rodamina B, **b.** protoporfirina IX

1.4.2 Protoporfirina IX

La protoporfirina IX (PpIX) es un precursor metabólico del hemo, PpIX interviene en procesos de transferencia de electrones, transporte de oxígeno y almacenamiento de iones metálicos. Su fórmula molecular es C₃₄H₃₄N₄O₄ (Figura 6b), y tiene peso molecular de 562.7 mg/mol. Es ampliamente usado en la TFD ya que es un fotosensibilizador cuyo rango de excitación y emisión es adecuado para tratar tanto tumores superficiales como profundos, también ha sido usado en cirugías guiadas por fluorescencia (Eshghi et al. 2013; Basoglu, Bilgin, and Demir 2016; Yoshioka et al. 2018).

Su biosíntesis comienza a partir del ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), por lo que también se ha reportado el uso de 5-ALA para generar acumulación selectiva de PpIX en células neoplásicas, sin embargo, aún existen incógnitas de este método de producción de PpIX y su comportamiento en células cancerosas. También este fotosensibilizador es químicamente inestable, tiene baja solubilidad acuosa y precipita en rangos de pH fisiológicos, por lo que su administración directa reduce su disponibilidad (Hoseini, Sazgarnia, and Sharifi 2019; Kiening and Lange 2022).

Todas las células contienen PpIX a concentraciones bajas que ayudan a su crecimiento, sin embargo, a concentraciones altas puede resultar en muerte celular tanto en células cancerosas como sanas, y el aumento en tejidos sanos puede causar fotosensibilidad de la piel, cálculos biliares y daño hepatobiliar (Eshghi et al. 2013; da Silva et al. 2021).

Capítulo 2. Antecedentes

2.1. DOX, AD32, MTX, RB y PpIX en nanopartículas lipídicas

La búsqueda para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos cuyas propiedades son limitantes y altamente tóxicas ha evolucionado de numerosas formas, y en los casos particulares de DOX, AD32 y MTX no son la excepción, actualmente existen estudios de una gran variedad de estos nanotransportadores lipídicos, como liposomas (Daeihamed et al. 2017), micelas (Hou et al. 2017), emulsiones (Tiwari and Amiji 2006; Karasulu et al. 2007; J.-E. Kim et al. 2014) y nanopartículas poliméricas (Benival and Devarajan 2012; Coutinho et al. 2020).

Como se puede observar en la tabla 2, diferentes formulaciones de SEDDS se han desarrollado a lo largo de los años. Benival et al. desarrollaron un sistema con DOX en un sistema auto-microemulsificante (SMEDDS, por el inglés self-microemulsifying drug delivery system), en el cual se observó un aumento de la biodisponibilidad oral en un modelo de roedores de más del 400 % en comparación con la solución de DOX (Benival and Devarajan 2015). Usmani et al. describen sistemas SNEDDS cargados con DOX y aceite de *Nigella sativa*. El estudio general mostró que su entrega conjunta inhibe la proliferación de células cancerosas hepáticas en más de un 60 % y reduce la cardiotoxicidad (Usmani et al. 2019).

Tabla 2. DOX, AD32 y MTX cargados en nanopartículas lipídicas.

API	Formulación	Tipo	Ref.
DOX	Capmul® MCM / TPGS ^a	SMEDDS ^b	(Benival and Devarajan 2015)
	Labrafil®, aceite <i>N. sativa</i> / Kolliphor® RH40 / glicerol	SNEDDS	(Usmani et al. 2019)
AD32	ApoA1 / FC / CE / PC ^c	rHDL	(Lacko et al. 2012; Shah et al. 2016; Johnson et al. 2017)
MTX	Oleato de etilo / Tween 80 / Propilen glicol	SMEDDS	(Bourkaib et al. 2013)
	Aceite de ricino / Tween 80 / Plurol® diisoesteárico	SMEDDS	(D. S. Kim et al. 2019)

a. TPGS: Succinato de *D*-alga-tocoferil polietilenglicol 1000

- b. Con un agente lipidizante Aerosol OT TM
c. FC: colesterol libre, CE: oleato de colesterol, PC: fosfatidilcolina

Bourkaib et al. mediante la inclusión de un protector de luz en un sistema SMEDDS cargado con MTX observaron el aumento de la biodisponibilidad oral y disminución de efectos adversos, lo que se atribuye al perfil de liberación sostenida del sistema (Bourkaib et al. 2013). Kim et al. desarrollaron una formulación sólida de SMEDDS con MTX para mejorar su biodisponibilidad oral y fotoestabilidad. El análisis farmacocinético demostró la formación de partículas estables y la liberación del fármaco mejorada, en comparación con el MTX no incorporado en los SMEDDS (D. S. Kim et al. 2019).

No se han reportado SEDDS-AD32, sin embargo, la nanotecnología es un área de rápida expansión en la terapéutica del cáncer. Lacko et al. desarrollaron nanopartículas rHDL/AD32 (lipoproteína de alta densidad, rHDL), las cuales mostraron una carga del fármaco del 92 % debido a que las rHDL ayudan a superar la baja solubilidad de AD32 (Lacko et al. 2012). Shah et al. observaron que el rendimiento de la fluorescencia de AD32 aumentó seis veces, lo que es una aplicación potencial para conocer su biodistribución (Shah et al. 2016). Johnson et al. evaluaron la eficacia de rHDL/AD32 en cáncer de mama triple negativo, observaron una mejora significativa en la muerte celular en AD32 transportada por rHDL en más de dos veces, en comparación con AD32 libre (Johnson et al. 2017).

2.2 RB y PpIX en nanopartículas lipídicas

Para RB, en el estudio de Charoenputtakun et al. desarrollaron nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y nanopartículas lipídicas nanoestructuradas (NLC) para el suministro dérmico de ATRA (ácido holo-transretinoico), las cuales se cargaron con RB para evaluar la distribución de las nanopartículas en la piel (Charoenputtakun et al. 2014). Qin et al. investigaron un tratamiento para cicatrices hipertróficas, formularon una nanopartícula lipídica cargada con acetónido de triamcinolona, observaron una permeabilidad del tejido dos veces mayor que las suspensiones comerciales, la RB se utilizó como marcador fluorescente para evaluar la profundidad de penetración (Qin et al. 2019). Topal et al. generaron SLN marcadas con RB como colorante fluorescente y ApoE como molécula de

direccionamiento, para mejorar la permeabilidad de donepezilo en la barrera hematoencefálica, se observó que la permeabilidad aumentó 3.2 veces en las SLN con ApoE en comparación con las no dirigidas (Topal et al. 2020) (Tabla 3).

Tabla 3. RB y PpIX cargados en nanopartículas lipídicas			
API	Formulación	Tipo	Ref.
RB	ATRA ^a / CP ^b / D-limoneno / Transcutol® P / BH ^c / Tween 20 / Tween 80	SLN	(Charoenputt akun et al. 2014)
	ATRA ^a / ácidos oleicos / CP ^b / D-limoneno, Transcutol® P / BHT ^c / Tween 20 / Tween 80	NLC	
	Fosfolípidos de soja / α -tocoferol / colato de sodio / Tween-80 / PLGA	Nanopartículas lipídicas	(Qin et al. 2019)
	Dynasan® 116 / Tween 80 / ApoE / DSPE-PEG ^c -avidina	SLN	(Topal et al. 2020)
PpIX	Fosfatidilcolina de huevo / PS ^f	Liposomas	(Przybylo et al. 2016)
	DPPC ^g / DSPE-PEG2000 ^h / nanopartículas de Fe ₃ O ₄	Magnetoliposomas	(Basoglu, Bilgin, and Demir 2016)
	POPC ⁱ / DPPE-PEG2000 ^j	Liposomas	(Figueira et al. 2020)
a. ATRA: ácido holo-transretinoico b. CP: palmitato de cetilo c. BHT: hidroxitolueno butilado d. PLGA, ácido poli(láctico-co-glicólico) e. DSPE-PEG: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] f. PS: (1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-L-serina]) g. DPPC: fosfolípidos 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina h. DSPE-PEG2000: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000](sal de amonio) i. POPC: palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina j. DPPE-PEG2000: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi- (polietilenglicol) -2000]			

Algunas estrategias para solucionar las limitantes sobre la PpIX han sido los liposomas, Przybylo et al, generaron liposomas de tipo LUV (por el inglés large unilamellar vesicles, grandes vesículas unilaminares), ellos determinaron que la PpIX en suspensión celular se cristalizaba, y al no ser biológicamente activa, los liposomas sin carga actuaban como un vehículo capaz de mantener en un estado disuelto a la PpIX y de internalizar a las células HeLa (Przybylo et al. 2016). Basoglu, et al. generaron magnetoliposomas que consisten en liposomas y nanopartículas magnéticas, que pueden usarse como agentes de contraste de imágenes, en concentraciones nanomolares la PpIX cargada en estos sistemas puede resultar

en la mejora de los efectos terapéuticos en comparación con 5-ALA (Basoglu, Bilgin, and Demir 2016). Figueira et al. desarrollaron LUV's para la entrega combinada de enfuvirtida y PpIX, que tienen la función de inhibir la fusión e inhibir la unión, respectivamente, del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, observaron que la actividad sinérgica de los API mejoraba significativamente, con comparación con los API en solución (Figueira et al. 2020) (Tabla 3).

La naturaleza de estos sistemas de administración mejora la solubilización de fármacos quimioterapéuticos, y de moléculas que permiten generar imágenes en tiempo real, así como la generación de muerte en células de cáncer, permiten aumentar la biodisponibilidad oral, mejorar parámetros farmacocinéticos, reducir los efectos tóxicos, pueden ser dirigidos, y además brinda una administración más cómoda para el paciente.

Capítulo 3. Justificación, planteamiento del problema y pregunta de investigación

3.1 Justificación

Los sistemas de entrega basados en lípidos han permitido el desarrollo de aplicaciones como vehículos de liberación modificada de APIs cuyas características fisicoquímicas, farmacocinéticas y tóxicas limitan el éxito de la terapia. Se ha reportado ampliamente que su uso mejora la dispersabilidad de los API lipofílicos al encontrarse mayormente disueltos en la fase lipídica, también mejoran la permeabilidad de compuestos hidrofílicos que no pueden atravesar fácilmente las membranas celulares.

Pueden ser administrados tanto de manera oral como intravenosa ya que han demostrado ser formas farmacéuticas seguras, estas últimas debido al conjunto de excipientes (lípidos sólidos, lípidos líquidos, tensioactivos y cosolventes) permite generar nanopartículas resistentes a la degradación en el tracto gastrointestinal evitando la precipitación y posible oxidación de los API, así como la formación de estructuras menores a 100 nm que pueden acceder por sistemas linfático y evitar así el efecto de primer paso.

Se pueden obtener nanopartículas de liberación controlada que permiten obtener efectos terapéuticos prolongados. La producción de este tipo de sistemas suele ser más simple, y se ha visto alta estabilidad en largos periodos de tiempo, la dispersabilidad de las nanopartículas lipídicas permite una entrega más eficiente de los API.

La administración oral de APIs para quimioterapia presenta desafíos importantes, esto debido a que la gran mayoría de los API presenta baja solubilidad acuosa, inestabilidad aparente a pH fisiológicos, fotosensibilidad, deficiente permeabilidad, efecto de primer paso extenso, eflujo por transportadores y escasa estabilidad gástrica, todo lo cual conduce a una mala biodisponibilidad y reducción de la respuesta terapéutica. Además, presentan poca selectividad, lo que conlleva a efectos adversos que comprometen la calidad de vida del paciente.

En consecuencia, se propone el desarrollo de sistemas de entrega de fármacos auto-nanoemulsionantes (SNEDDS) que fungirán como acarreadores y estabilizadores selectivos de los fármacos citostáticos ampliamente utilizados, doxorubicina, valrubicina y metotrexato (DOX, AM-32 y MTX), y de los agentes fotoestabilizantes rodamina B y protoporfirina IX (RB y PpIX). Su caracterización fisicoquímica y biológica permitirá evaluar su estabilidad y comportamiento de los API en los SNEDDS y en un sistema vivo.

La liberación sostenida y dirigida de estos transportadores nanométricos mejorará su dispersabilidad en medios acuosos, permitirá el paso a través de las membranas celulares, favorecerá la inhibición de la bomba de eflujo y la absorción por sistema linfático, aumentando así la biodisponibilidad oral de los fármacos, lo que resultaría en la reducción de los efectos adversos y la mejora de la capacidad antitumoral. Además, promovería la terapia oral, una forma de administración considerablemente más cómoda para el paciente. Este tipo de nanoacarreadores han sido ampliamente usados debido a su fácil producción, su baja o nula toxicidad y sus favorables resultados.

Es importante destacar que el producto del presente estudio es un concentrado de SNEDDS, o de diferentes SNEDDS cargados con distintos agentes quimioterapéuticos, cuya formulación fue optimizada de un estudio previo del grupo de investigación. Además, la propuesta de forma farmacéutica final (tabletas orodispersables, cápsulas, tabletas con recubrimiento entérico, etc.) será un estudio posterior.

3.2 Planteamiento del problema

Los API doxorubicina, valrubicina, metotrexato, rodamina B y protoporfirina IX, presentan propiedades fisicoquímicas que los vuelven inestables en el TGI, como baja solubilidad acuosa y sensibilidad aparente al pH. El logaritmo del coeficiente de partición (Log P) también es una limitante ya que aquellos con un valor mayor a 0 presentaran mayor facilidad para pasar la membrana, sin embargo, durante su transporte por el TGI pueden precipitar debido al medio acuoso, caso contrario, aquellos con valor de Log P menor a 0 pueden estar en estado soluble pero no atravesar las membranas celulares, debido a la hidrofobicidad de la misma. Además, los API en estado ionizado debido al pH gastrointestinal serán hidrosolubles por lo que su paso a través de la capa mucosa del TGI se verá limitada, lo que

resulta en una baja biodisponibilidad de los fármacos.

También son sustratos de proteínas que generan resistencia en las células como la Glucoproteína-P, pueden ser metabolizados por células intestinales antes de llegar al torrente sanguíneo y producir su efecto terapéutico, presentan efecto de primer paso extenso y alta unión a proteínas plasmáticas que limita su biodistribución.

En la quimioterapia se suelen presentar efectos adversos, ya que los APIs, presentan baja selectividad entre las células tumorales y las células sanas que se dividen rápidamente, lo que ocasiona alopecia, debilidad, náuseas, vómitos, fatigas, fiebres hasta daños hepáticos, cardíacos, pulmonares, renales, entre otros. Todos son factores clave que limitan la terapia, además, la vía de administración parenteral limita la mejora en la calidad de vida de los pacientes. Es necesario potenciar los beneficios terapéuticos de los APIs de amplio uso, por lo que cargarlos en los sistemas propuestos es una solución prometedora.

3.3 Pregunta de investigación

¿Los sistemas de entrega de fármacos auto-nanoemulsionantes (SNEDDS) serán un vehículo oral que permitirá la optimización en un modelo *in vitro* de distintos ingredientes farmacéuticos activos?

Capítulo 4. Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

Los SNEDDS serán un vehículo oral que optimizarán el transporte, la liberación y la captación específica de los agentes quimioterapéuticos, doxorubicina, valrubicina y metotrexato, así como de los agentes fotosensibilizantes rodamina B y protoporfirina IX.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo General

Diseñar y caracterizar fisicoquímica y biológicamente sistemas de entrega de fármacos auto-nanoemulsionantes (SNEDDS) de liberación de doxorubicina, valrubicina, metotrexato, rodamina B y protoporfirina IX.

4.2.2 Objetivos específicos

- I. Desarrollar una formulación para la óptima formación de SNEDDS y SNEDDS con quitosano (CTS@SNEDDS)
- II. Desarrollar SNEDDS y CTS@SNEDDS capaces de encapsular DOX, AD32, MTX, RB o PpIX.
- III. Caracterizar los nanosistemas fisicoquímicamente por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- IV. Evaluar la captación específica e internalización celular, así como, los efectos en la viabilidad celular y citotoxicidad de los nanosistemas SNEDDS.

Capítulo 5. Diseño metodológico

5.1 Materiales

El clorhidrato de doxorubicina (DOX) (PM: 580) fue adquirida de Químicos Cayman, la valrubicina (AD32) (PM: 723.64), el metotrexato (MTX) (PM: 454.44), la rodamina B (RB) (MW 479.01), la sal disodio de protoporfirina IX (PpIX) (PM: 606.62), el quitosano de bajo peso molecular (PM: ~50,000), la solución de DAPI, el Kit II de proliferación celular (XTT) se adquirieron de Sigma-Aldrich, el Labrafil[®] M 1944 CS (mono-, di- triglicéridos y PEG-6 (PM 300) mono – y diésteres de ácido oleico (C18:1) se adquirió de Gatefossé. El Cremophor[®] RH 40 (aceite de ricino hidrogenado polioxietileno-40) se adquirió de Avanti Polar Lipids, el PHOSPHOLIPON[®] 90 G (fosfatidilcolina de aceite de soya) fue adquirida de Lipoid, el medio de cultivo DMEM fue obtenido de Gibco[™], las células HCT-116 fueron adquiridas de ATCC.

5.2 Métodos experimentales

5.2.1 Curvas de calibración

Se realizaron curvas de calibración de los API en solución acuosa para conocer sus concentraciones. Primero se realizaron barridos de cada molécula desde 200 nm a 800 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermoscientific Genesys 50) para identificar la longitud de onda (λ) de trabajo, las cuales fueron las siguientes: DOX a 480 nm, AD32 a 496 nm, MTX a 302 nm, RB a 554 nm y PpIX a 470 nm. Se determinaron los límites de detección instrumental (LDI) y los límites de cuantificación instrumental (LCI) utilizando como matriz los SNEDDS sin carga, los cuales se calcularon por las siguientes fórmulas (Quino, Israel, Ramos 2007):

$$\text{LDI} = \frac{(\text{Desviación estándar}) (3)(\text{Concentración del estándar alto o bajo})}{\text{Promedio del estándar alto o bajo}}$$

$$\text{LCI} = 3.3 (\text{LDI})$$

En la determinación de los estándares se utilizaron SNEDDS diluidos en agua (1:100) y el valor de absorbancia obtenido a la longitud de onda de cada API se multiplicó por cinco para el estándar bajo y por diez para el alto, debido a que la señal leída para los API sea cinco o diez veces la desviación estándar del blanco. Se realizaron las soluciones de los estándares con el API y la matriz (1:100), y se realizaron al menos tres lecturas de la siguiente manera: blanco, estándar bajo, matriz, estándar alto, y matriz. Se realizaron las lecturas a la λ correspondiente, y se obtuvieron promedios y desviaciones estándar para determinar los límites.

Después, se realizaron las curvas con mínimo 8 niveles de concentración por duplicado, se realizaron series de diluciones evitando los límites obtenidos, y se obtuvieron los análisis de regresión lineal (R^2) y las ecuaciones de la recta correspondientes ($y = mx + b$).

5.2.2 Preparación de SNEDDS sin carga

Se prepararon dos tipos de SNEDDS: SNEDDS simples, que constó de una emulsión O/W (ver Figura 8), la cual se refiere en este documento como SNEDDS, y SNEDDS multifásicos, en la cual se generó una emulsión W/O/W (ver Figura 9), la cual se denota como CTS@SNEDDS. CTS refiere a quitosano (por el inglés, chitosan), ambos se prepararon de acuerdo con la formulación obtenida por el grupo de investigación.

Para ello primero se realizó un cribado de lípidos, tensioactivos y cosolventes que formaron sistemas coloidales azules-translúcidos en agua, a partir de las concentraciones empleadas, se optimizó la formulación de SNEDDS mediante la evaluación de las variables dependientes: tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial ζ y grado de hemólisis (citotoxicidad), en el software Design-Expert 11 con un diseño D-optimal.

La mezcla consistió en $A + B + C = 100\%$, donde A era el cosolvente (PHOSPHOLIPON[®] 90G en etanol), B era el lípido (Labrafil[®] M 1944 CS) y C el tensioactivo (Cremophor[®] RH 40). A las concentraciones A: 50-10 %, B: 40-15 % y C: 75-35 %. Se realizaron análisis de medias (ANOVA) para determinar si las variables independientes (los excipientes) generaban una significancia estadística en las variables de respuesta.

Los datos de predicción indicaron un tamaño de 30 nm, un PDI de 0.28 y un porcentaje de hemólisis de 7.9 %. Se identificó una amplia dispersión de los datos obtenidos con los datos de predicción en el potencial ζ por lo que esta variable no fue útil para la optimización. Se observó que a mayor concentración de excipiente lipídico el tamaño de partícula fue mayor, y cuando las proporciones de tensioactivo y lípido aumentan, se disminuye el tamaño de partícula. Se observó que se obtienen valores bajos de PDI cuando la concentración de tensioactivo es mayor. El excipiente que presentó mayor grado de hemólisis fue el lípido, seguido del tensioactivo y por último el cosolvente. De esta manera se determinó que las proporciones de los excipientes son: de lípido el 39 %, de tensioactivo el 40 % y de cosolvente el 21 % (Figura 7), con la formación de SNEDDS de tamaños de 26.38 nm, PDI de 0.25, y porcentaje de hemólisis de 5.12 ± 0.18 %, valores cercanos a las predicciones.

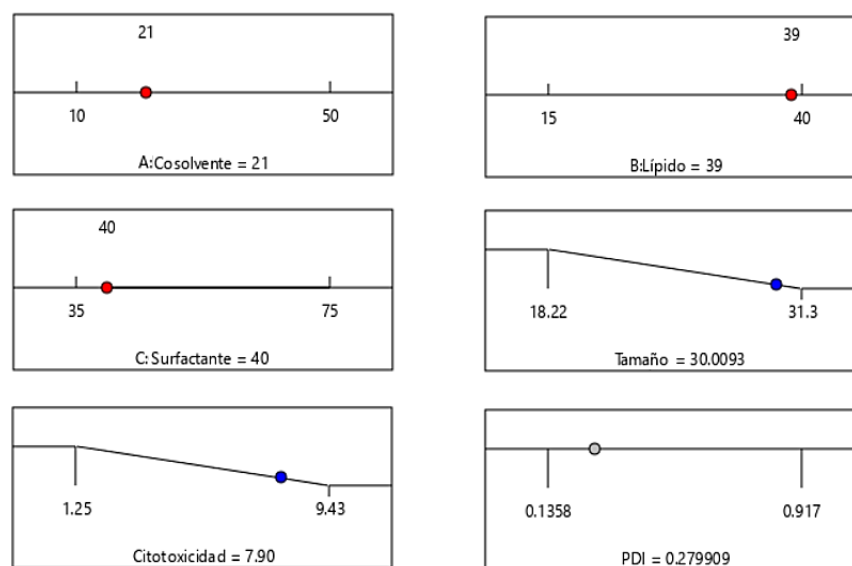


Figura 7. Gráficos de la optimización de los SNEDDS por Design-Expert 11. Obtenido de la tesis de maestría de Morales, A. 2022, (Morales 2022).

El objetivo de la preparación y caracterización de ambos fue conocer el comportamiento de la nanopartícula con y sin el CTS, el cual funge como polímero capaz de cargar ARN, el cual se conoce como poliplejo, además de identificar si el CTS produjo cambios para la carga de los API. Los componentes de ambos nanosistemas son los mismos, y la secuencia de

preparación es similar. Los análisis UV-Vis, Infrarrojo (IR), tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI, por el inglés Polydispersity Index), y los estudios *in vitro* en células HCT-116 (línea celular de cáncer de colon) fueron realizados con CTS@SNEDDS.

A. Preparación de SNEDDS sin carga

Para la preparación de SNEDDS se colocaron 390 μL de lípido (Labrafil[®] M 1944 CS), 400 μL de tensioactivo (Cremophor[®] RH 40), el cual debe calentarse a 40 ± 5 $^{\circ}\text{C}$ para poder ser agregado a la mezcla, ya que es un compuesto sólido a temperatura ambiente, y 210 μL de cosolvente (PHOSPHOLIPON[®] 90 G al 0.25 % p/v en etanol, y filtrada en poro de 0.22 μm) para formar 1 mL de la mezcla de componentes, y se mezclaron en vórtex por diez minutos. Después 200 μL de la mezcla formada se agregó gota a gota en agua destilada en agitación (Figura 8). Los SNEDDS se forman en menos de 30 segundos.

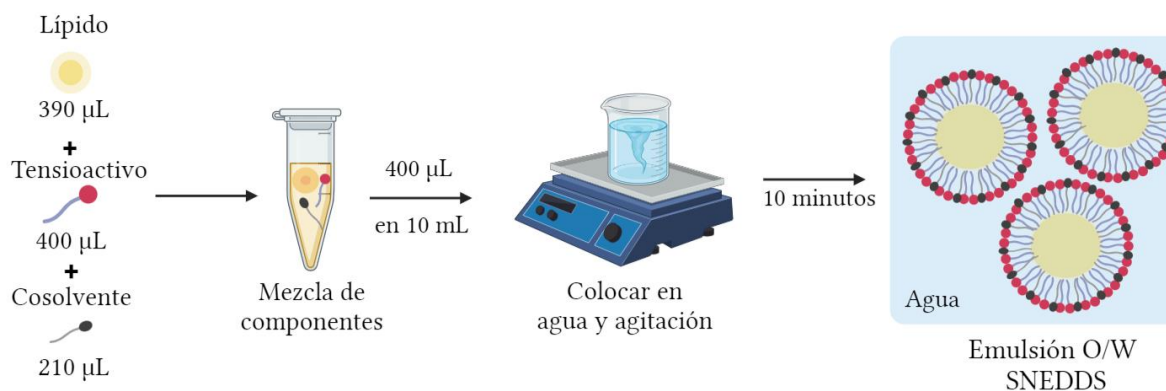


Figura 8. Procedimiento para la preparación de SNEDDS sin carga.

La mezcla de componentes sobrante se almacenó en condiciones de congelación (-4°C) para su uso posterior, en el cual se descongelaba y se volvía a mezclar en vórtex por 10 minutos y las propiedades de los SNEDDS se mantuvieron constantes.

B. Preparación de CTS@SNEDDS

Primero se realizó la preparación de la solución de 0.25 % (p/v) de CTS de bajo peso molecular en ácido acético 1 % (v/v), la solución se centrifugó a 4 000 rpm por 10 minutos, se ajustó su pH a 5.5 con NaOH 0.1M, y se filtró en una membrana de poro 0.22 μM .

Para la preparación de CTS@SNEDDS, primero se preparó el poliplejo (en este trabajo, sin ARN), para ello se colocaron 20 μL de la solución de CTS y 80 μL del cosolvente (PHOSPHOLIPON[®] 90 G al 0.25 % (p/v) en etanol), y se mezclaron en vórtex. Después se generó la primera emulsión W/O, se colocaron 148 μL de lípido (Labrafil[®] M 1944 CS), y se mezcló en vórtex. Posteriormente se agregaron 152 μL de tensioactivo (Cremophor[®] RH 40), y se mezcló en vórtex. El volumen final de la formulación son 400 μL , los cuales se agregaron gota a gota en 10 mL de agua destilada en agitación con una barra magnética, para formar los CTS@SNEDDS, es decir la segunda emulsión (Figura 9). Los SNEDDS se formaron en menos de 30 segundos, sin embargo, se mantiene la agitación por diez minutos.

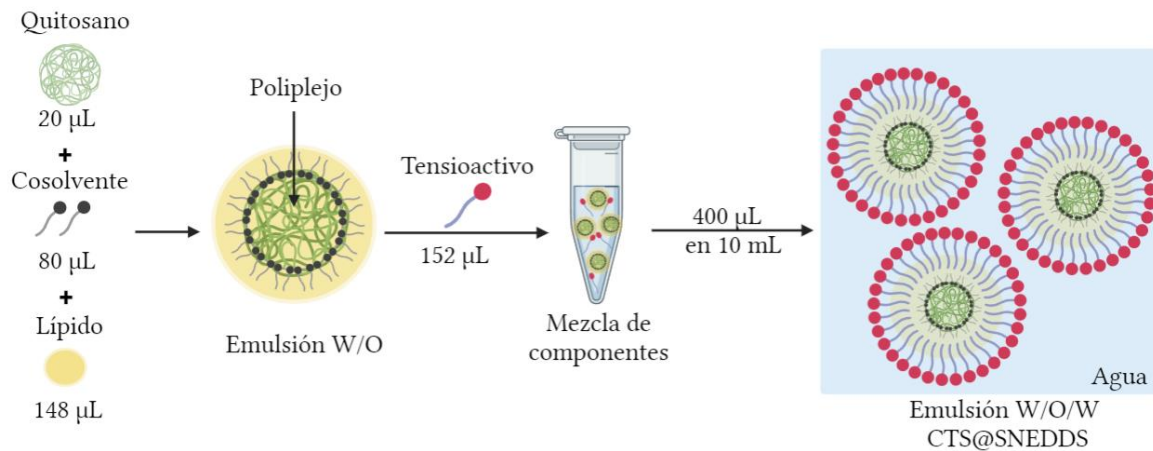


Figura 9. Procedimiento para la preparación de CTS@SNEDDS sin carga

5.2.3 Preparación de SNEDDS con carga

Para la formación de los complejos, las concentraciones finales se definieron de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de los fármacos como su solubilidad, así como en los resultados de eficiencia de atrapamiento. Para los CTS@SNEDDS con carga se modificó la concentración de API en función del volumen final de la mezcla de componentes, de tal manera que las concentraciones finales son 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para DOX y MTX, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para AD32, 37.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para RB, y 32.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para PpIX en ambos tipos de SNEDDS.

A. Preparación de SNEDDS-(DOX, AD32, MTX, RB o PpIX)

El proceso para preparar SNEDDS con carga, es la misma descrita en 5.2.2, sección A, sin

embargo, el API en polvo se agrega a la mezcla de componentes y se agita en vórtex hasta disolver completamente. Las cantidades de API por mL de componentes se puede observar en la Figura 10.

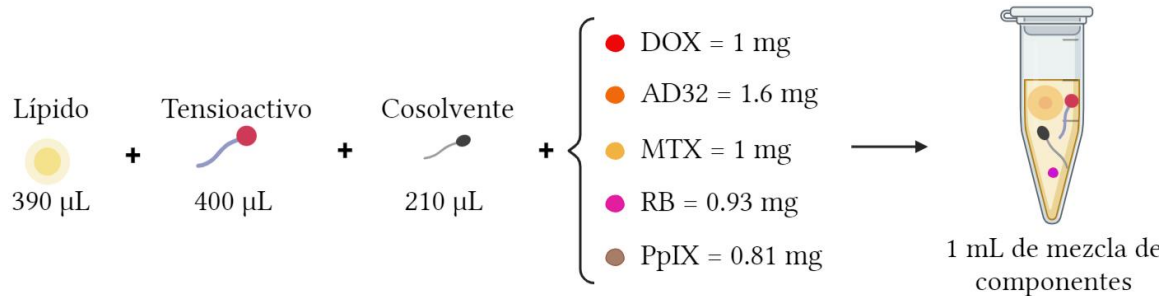


Figura 10. Concentraciones de los componentes de los SNEDDS con carga de API.

B. Preparación de CTS@SNEDDS -(DOX, AD32, MTX, RB o PpIX)

El proceso para producir CTS@SNEDDS con carga el API en polvo se disuelve primero en el lípido, y después se agrega a la mezcla de quitosano y cosolvente para generar la primera emulsión. Los pasos siguientes son los mismos descritos en 5.2.2 sección B, de esta manera el API se mantiene dentro de las nanopartículas. Las cantidades de API para CTS@SNEDDS se puede observar en la Figura 11. Es importante mencionar que la PpIX no fue posible cargarla en este tipo de SNEDDS multifásicos.

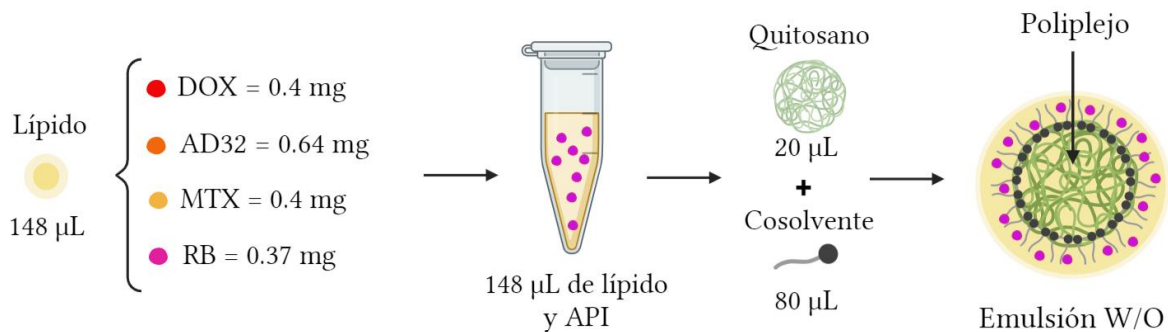


Figura 11. Concentraciones de los componentes de los CTS@SNEDDS con carga de API.

5.2.4 Caracterización fisicoquímica

A. Pruebas de estabilidad coloidal y de eficacia de emulsificación

Se realizaron cuatro pruebas de estabilidad de los SNEDDS sin carga con el objetivo de conocer su comportamiento bajo diferentes condiciones:

- I) Prueba de centrifugación: se tomó 1 mL de SNEDDS de reciente preparación (menos de 1 h) sin carga y sin diluir. Se sometieron a centrifugación (3,500 rpm) a diferentes tiempos: 15, 30, 45 y 60 minutos. Se midió el porcentaje de transmitancia (% T) al inicio del ciclo y al término del tiempo de centrifugación, y se evaluó su aspecto físico (n=3).
- II) Prueba de congelación-descongelación: se tomó 1 mL de SNEDDS de reciente preparación (menos de 1 h) sin carga y sin diluir. Se midió su (% T) inicial, y se sometieron a congelamiento (-4 °C) por 48 horas, junto con su grupo control a temperatura ambiente (~19 °C). Al término del ciclo de congelamiento, se descongelaron, y se evaluó su aspecto físico y el (% T), se realizaron tres ciclos (n=3).
- III) Prueba de calentamiento-enfriamiento: se utilizó 1 mL de SNEDDS sin cargar de reciente preparación sin diluir, y se midió a temperatura ambiente (~19 °C) el (% T). Se colocaron en calentamiento (45 °C) y enfriamiento (4 °C) por 48 horas cada uno, junto con su grupo control a temperatura ambiente, siendo así un ciclo. Se midió el (% T) después al inicio y final de cada ciclo, y se realizaron seis ciclos en total (n=3).
- IV) Prueba en fluidos fisiológicos: se prepararon fluidos gástricos simulados (FGS) y fluidos intestinales simulados (FIS) (Benival and Devarajan 2015). Para preparar la solución de FGS se agregó cloruro de sodio, ácido clorhídrico, pepsina y se ajustó el pH a 1.2. Para la solución de FIS, se utilizó fosfato monobásico de potasio, hidróxido de sodio, pancreatina y se ajustó el pH a 6.8. Después se colocaron 0.5 mL de SNEDDS sin carga en 4.5 mL de cada fluido (dilución 1:10) y se incubó por dos horas en FGS y por seis horas en FIS, para simular el tiempo de permanencia en el TGI. Se centrifugaron las muestras a 3,600 rpm por 15 minutos para realizar la lectura del (% T) antes y después de la incubación (n=3, y el control fue incubación en agua destilada).

B. Eficiencia de encapsulación y eficiencia de carga

La Eficiencia de encapsulación (% EE) y la Eficiencia de carga (% EC) pueden ser medidos por dos métodos, directo e indirecto, el primero consta del rompimiento de la partícula para

conocer la concentración del API dentro de ella, y la segunda es la medición del API fuera de la nanopartícula, por lo que es necesario separar los SNEDDS cargados del agua con el API no incorporado en el sistema para la correcta medición por UV-Vis. En este proyecto, se llevó a cabo el segundo método.

Se agregaron diferentes concentraciones de API en polvo a la mezcla de componentes y se generaron los SNEDDS simples. Se centrifugaron a 3,000 rpm por 20 minutos en tubos con membrana de 30,000 MWCO para obtener el API libre, y se determinó la concentración por UV-Vis a las longitudes de onda de lectura de cada API. La % EE y % EC se determinaron por las siguientes fórmulas (Trujillo-Nolasco et al. 2019):

$$\% EE = \frac{\text{API agreado} - \text{API libre}}{\text{API libre}} \times 100$$

$$\% EC = \frac{\text{API agreado} - \text{API libre}}{\text{Masa de los SNEDDS}} \times 100$$

C. Espectrofotometría UV-Vis

Se realizaron barridos de 200 nm a 800 nm con una resolución de 0.5 nm de los API, de los componentes de los SNEDDS y CTS@SNEDDS, de los SNEDDS y CTS@SNEDDS con y sin carga, en un espectrofotómetro Thermoscientific Genesys 50. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico para cuantificar el API en los SNEDDS, realizando diluciones hasta 1:1000, principalmente para la lectura de los componentes de la formulación, pero sin llegar a los límites de detección obtenidos, con el fin de comparar los espectros de las distintas muestras. Los espectros se normalizaron, es decir, se dividieron las absorbancias obtenidas a cada longitud de onda por el valor de absorbancia más alto, designado como 1.

D. Espectroscopía FT-IR

En un portaobjetos se colocaron gotas de 5 µL de las muestras CTS@SNEDDS vacíos y CTS@SNEDDS con carga hasta secar (aproximadamente 5 gotas), y se cubrieron para evitar contaminación. Los espectros FT-IR de las muestras se analizaron en un espectrómetro PerkinElmer System 2000 con plataforma ATR (Pike Technologies), mediante la aplicación de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FT-

IR). Los espectros se adquirieron con 40 escaneos, en un rango operativo de 4000-400 cm^{-1} y una resolución de 0.4 cm^{-1} .

E. Tamaño de partícula, PDI y potencial ζ

Se analizaron los tamaños de partícula, el índice de polidispersión (PDI) de CTS@SNEDDS con y sin carga, así como el tamaño, potencial ζ y PDI de SNEDDS sin carga. Se realizó por dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un analizador Nanotracs Wave, modelo MN401. Los análisis se realizaron con una longitud de onda de 657 nm a 20 °C, corriente de 15,79 mA, campo eléctrico de 14.35 V/cm y tiempo de muestreo de 128 μs . Las muestras se analizaron en una dilución 1:10.

F. Morfología

La morfología de los SNEDDS sin carga fue analizada mediante Microscopio Electrónico de Transmisión en el microscopio JEOL JEM 2010 HT operando a 200 kV. Las muestras fueron colocadas en una rejilla de cobre TEM recubierta de carbono (Formvar/Carbon samples) en una dilución 1:50. Se colocó una gota de $\sim 3 \mu\text{L}$ de la preparación, se cubrió la muestra para evitar contaminación del ambiente, y se dejó evaporar. Las muestras fueron analizadas después de 24 horas.

G. Liberación de ingredientes farmacéuticos activos

La liberación de los API desde los SNEDDS se realizó exponiendo los SNEDDS a diferentes valores de pH, el API liberado se extrajo por el método de diálisis. Para ello se colocó dentro de la membrana de diálisis hidratada (14,000 Da MWCO) 1 mL de SNEDDS cargados de reciente preparación en 5 mL de medio con pH 1.2 y pH 6.8 (misma preparación que FGS y FIS, sin enzimas) en tubos de vidrio con tapa.

Se realizaron las diálisis por triplicado para cada evaluación de los tiempos 0, 1, 3, 6, 9, 24 y 48 horas. Después de cada periodo, se tomó una muestra del medio exterior se analizó por UV-Vis a la longitud de onda respectiva de cada API y se determinó el modelo cinético, para proponer el mecanismo de liberación.

5.2.5 Caracterización biológica *in vitro*

A. Cultivo celular

Las células HCT-116 de cáncer de colon se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) el cual contiene alto contenido de glucosa, y fue suplementado con suero fetal bovino al 15 %, con antimicóticos y antibióticos (anfotericina B, estreptomycin y penicilina) al 1 %, y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂.

B. Estudio de la viabilidad celular

Se llevo a cabo por el ensayo colorimétrico XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) y el reactivo de acoplamiento de electrones. El estudio permitió medir la actividad metabólica de las células HCT-116 control y después de ser tratadas con CTS@SNEDDS con y sin carga.

Se incubaron 15,000 células/pozo en placas de 96 pozos y se incubaron por 24 horas, después se agregaron concentraciones de 0.1, 1, 4, 8 y 10 µM de API en solución, CTS@SNEDDS sin carga y CTS@SNEDDS con carga, y se incubaron por 24 horas. Se retiró el medio y se realizaron lavados con PBS 1X a 37 °C, se agregó 50 µL de XTT y 1 µL del reactivo de acoplamiento por pozo, y se incubó por 24 horas. Se midió la absorbancia en un lector de placa a 450 nm y 690 nm. En el análisis de resultados se realizó la diferencia entre ambas longitudes de onda para eliminar la lectura del plástico (690 nm) de la placa de 96 pozos. Se tomó como viabilidad del 100 % al control negativo. Las muestras se realizaron por triplicado. Se determinó la concentración letal 50 (CL50) mediante análisis Probit.

C. Evaluación de la internalización celular *in vitro*

Las células HCT-116 se sembraron en placas de 6 pozos con 5x10⁵ células/pozo con un cubreobjetos en el fondo, y se incubaron durante 24 horas. Las células se trataron con 1 µM de API en solución y de los CTS@SNEDDS con carga de DOX y PpIX durante 24 horas. Posteriormente se realizaron las fijaciones en los portaobjetos. Las placas con las células y los tratamientos se lavaron delicadamente dos veces con PBS 1X a 37 °C, luego se colocó 1 mL de paraformaldehído al 2 % y se incubó durante 15 minutos. Después se retiró el paraformaldehído, y se añadió 50 µL de DAPI 300 nM durante 5 minutos y se colocó un

cuadro de parafilm. Finalmente, se colocó el cubreobjetos sobre el portaobjetos con 30 μ L de medio de montaje, de manera que las células estuvieran en contacto con el medio de montaje.

Las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) de DOX fueron 480 nm y 590 nm, y para PpIX a 405 nm y 630 nm, respectivamente, bajo el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti con el objetivo de 60x. También se determinaron los porcentajes de internalización celular en un lector de placa de fluorescencia VICTOR Nivo TM de (PerkinElmer) a las mismas longitudes de onda. Se retiró el sobrenadante después de la incubación con los tratamientos y se colocó en una placa de 96 pozos limpia, los valores obtenidos se restaron a las concentraciones de tratamiento iniciales, los análisis se realizaron por triplicado.

5.2.6 Evaluación de la permeabilidad *ex vivo*

Se utilizaron ratones hembra los cuales se obtuvieron de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. Los ratones se mantuvieron a una temperatura y humedad constantes, bajo periodos de luz:oscuridad de 12:12 y se alimentaron ad libitum. El bienestar animal y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo bajo Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

El estudio de permeabilidad se realizó mediante el método del saco intestinal no evertido usando como guía el procedimiento de Veja-Rojas et al. 2021 (Vega-Rojas et al. 2021). Los animales se sacrificaron, y enseguida se diseccionó el intestino delgado. Se obtuvieron secciones de 4 cm de largo del duodeno, yeyuno e íleon, y se lavaron con solución fría de Krebs-Ringer. Se obtuvo uno de los extremos con cuidado de no romper el intestino y de manera que no hubiese salida de las muestras de SNEDDS o solución.

Se agregó 500 μ L de solución de rodamina B o rodamina B en los SNEDDS que fueron preparados en solución de Krebs-Ringer. Se cerró cuidadosamente el otro extremo y se colocó el saco intestinal en un tubo de vidrio con tapa con medio Krebs-Ringer y se mantuvo bajo agitación suave por 30 minutos (Figura 12). Después se retiraron los nudos y la muestra, y los tejidos se almacenaron en formaldehído al 10 % en PBS para los cortes histológicos longitudinales, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Las laminillas fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX43 con el filtro de 500-700

nm. Los parámetros del microscopio se mantuvieron a un tiempo de exposición de 31.25 ms, de saturación 44, brillo 0 y contraste 2. Las muestras se realizaron por duplicado.

5.2.7 Pruebas estadísticas

Los análisis de datos estadísticos se informaron como la media \pm desviación estándar (DE). Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron y evaluaron mediante pruebas ANOVA seguidas de la comparación de medias de Bonferroni utilizando el software OriginPro, estableciendo la significancia estadística en $p < 0.05$.

Capítulo 6. Resultados y discusión de resultados

6.1 Curvas de calibración

La aplicación de métodos analíticos es fundamental en estudios si se cuenta con analitos que deben identificarse y cuantificarse (Quino, Israel, Ramos 2007). Debido al propósito del análisis, la construcción de las curvas de calibración fue fundamental para determinar la concentración de los API en los métodos desarrollados. Se identificaron las bandas de absorbancia de los analitos, los límites de detección y cuantificación instrumental, se generaron curvas de calibración y se obtuvo la ecuación de regresión lineal de mínimos cuadrados, datos que pueden observarse en la Tabla 4 y Figura 12.

Tabla 4. Valores obtenidos de las curvas de calibración de los API.				
API	LDI^a	LCI^b	Ecuación	R²
DOX	0.027	4.80	$y = 0.0165x + 0.0076$	0.9998
AD32	0.009	2.09	$y = 0.013x + 0.0046$	0.9995
MTX	0.002	0.16	$y = 0.0374x + 0.0131$	0.9998
RB	0.008	0.21	$y = 0.11x - 0.0115$	0.9987
PpIX	0.001	0.31	$y = 0.0435x - 0.0086$	0.9977
a: Límite de detección Instrumental en unidades de absorbancia. b: Límite de cuantificación instrumental en unidades de concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$).				

Los límites de detección y cuantificación son de importancia debido a que se elimina la señal que puede generar el ruido de la matriz (SNEDDS), y de esta manera se precisa que las lecturas posteriores son valores obtenidos del analito. Las curvas de calibración obtenidas tienen valores de $R^2 > 0.99$, esto indica que los datos se ajustan a la línea de regresión. Las ecuaciones obtenidas se utilizaron para calcular la concentración de los APIs, en la ecuación de la recta se despeja “x”, que representa el valor de la concentración, y “y” es el valor de la absorbancia obtenida del equipo.

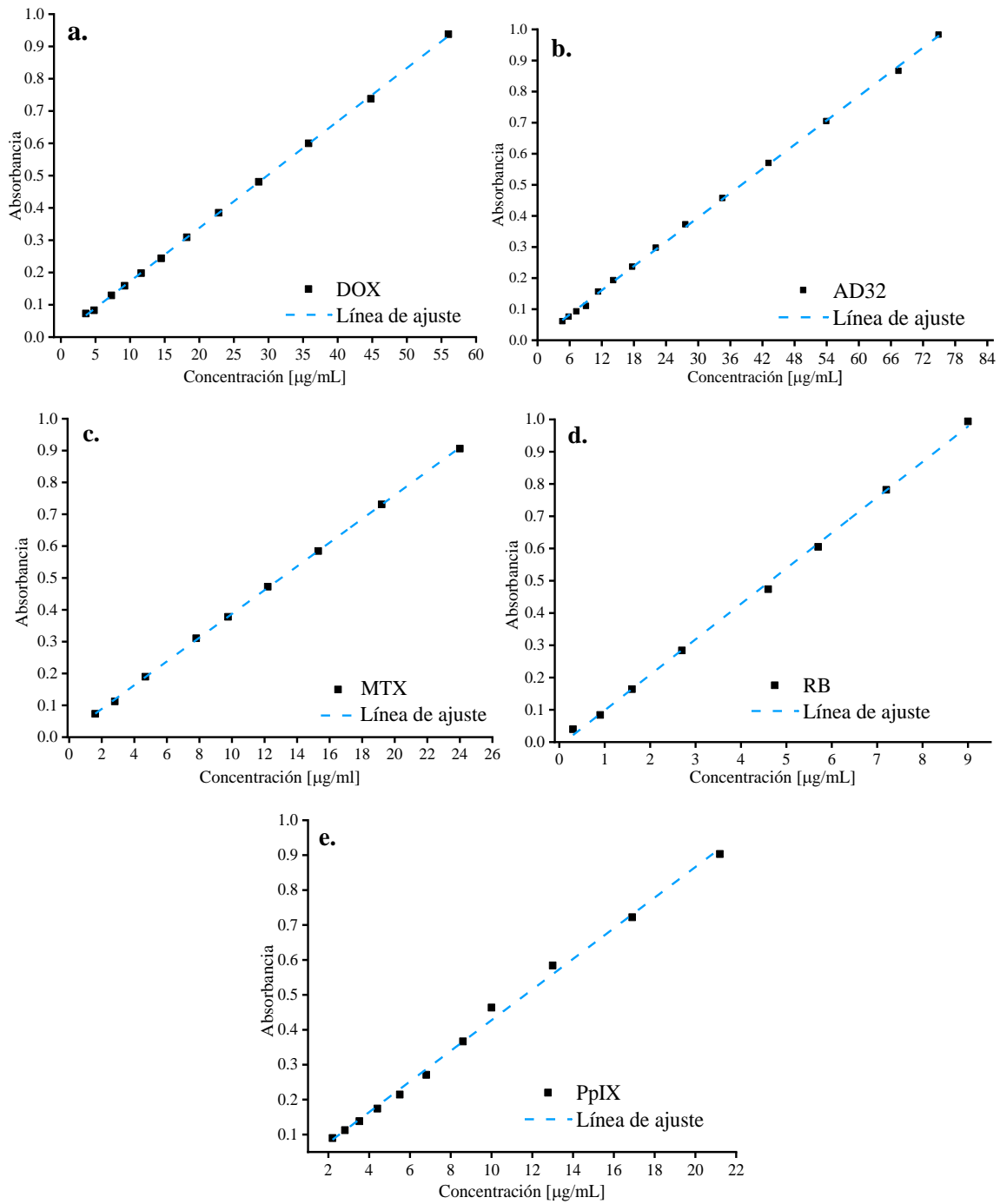


Figura 12. Gráficos de las curvas de calibración de los API y su línea de ajuste. **a.** DOX, **b.** AD32, **c.** MTX, **d.** RB, **e.** PpIX.

6.2 Preparación de SNEDDS sin carga

Los SNEDDS son sistemas que tienen la capacidad de autoformarse en nanoemulsiones O/W cuando entran en contacto con el líquido gastrointestinal. La mezcla de aceite, tensioactivo y cosolvente adecuada en la formulación permite generar un sistema ordenado. La función de cada componente es fundamental para su formación, así como definir su capacidad de entrega del API en las células. Por lo que los componentes adecuados y sus cantidades son claves.

Para definirlos se suelen realizar pruebas de solubilidad del API y los componentes, se selecciona aquellos que generen mayor solubilidad, después se realizan diagramas de fase ternario con diferentes proporciones de los componentes, que permite identificar las zonas en las que se generan las nanopartículas. Para optimizar las formulaciones de SNEDDS se suelen realizar pruebas de estabilidad coloidal y se clasifican según su apariencia y por el tiempo de emulsificación. Después, se realizan pruebas de caracterización que definen la calidad de la nanopartícula. Actualmente, con el objetivo de reducir el número de experimentos y errores se utilizan software que permiten generar formulaciones a partir de los efectos que los componentes pueden tener en ciertas variables, como tamaño, PDI, (% T), Potencial ζ y hemólisis (F. Li et al. 2016; Shrivastava et al. 2022).

El equipo de investigación formuló y optimizó CTS@SNEDDS adecuados para la carga de ARN, por lo que el objetivo de este proyecto fue caracterizar SNEDDS y CTS@SNEDDS capaces de cargar API de diferentes características fisicoquímicas.

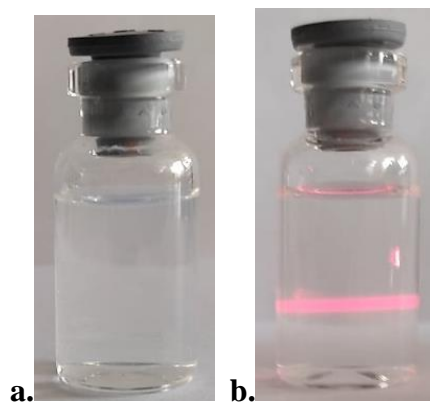


Figura 13. Fotos de los SNEDDS. **a.** SNEDDS de reciente preparación, **b.** SNEDDS en el cual se coloca un láser para evidenciar el Efecto Tyndall.

La autoformación de ambos SNEDDS comienza cuando la mezcla de componentes tiene contacto con el agua en movimiento, por lo que los SNEDDS se obtienen en cuestión de segundos. Esto es debido a que el tensioactivo tiene un HLB de 14-16, el cual permite emulsionar al Labrafil® (HLB de 4).

La apariencia final fue de un sistema coloidal azul-translucido, sin floculaciones o coalescencia visible (Figura 13a). En la formación de CTS@SNEDDS, el sistema coloidal, inicialmente, se tornó blanco indicando que se formó una emulsión (W/O), ya que el poliplego (sin ARN) y el cosolvente fungen como la fase acuosa y el Labrafil® el lípido exterior. Al agregar el tensioactivo, y agregar la mezcla en agua se forma la emulsión doble (W/O/W). En ambos tipos de SNEDDS se puede observar el efecto Tyndall, una característica común de los sistemas coloidales, en el cual las nanopartículas dispersan la luz (Figura 13b) (Williams et al. 2012).

Si la nanoemulsión no se formaba adecuadamente, se observaba blanca o con alta cantidad de espuma. Lo anterior debido a que se agregaron de manera inadecuada los componentes de la formulación, particularmente del tensioactivo, el cual ha sido reportado que relaciones menores del mismo y mayores de lípido impiden la nanoemulsificación (Dou et al. 2018).

La estructura de las nanopartículas sería la siguiente: las cadenas de tensioactivo junto con el cosolvente etanólico en los SNEDDS simples se encuentran en el exterior y en el interior el núcleo lipídico (Figura 8), mientras que para los SNEDDS híbridos (W/O/W) el cosolvente se encuentra en el núcleo junto con el polímero que estarán rodeados del lípido para generar la primera emulsión, y en el exterior el tensioactivo que tendrá contacto con el agua para formar la emulsión multifásica (Figura 9).

6.3 Preparación de SNEDDS con carga

Los SNEDDS son ampliamente usados debido a su potencial para acarrear y liberar ingredientes farmacéuticos activos pocos solubles en agua y/o poco permeables, aumentando así su biodisponibilidad oral. La principal justificación es que los API estarán predisueltos en la mezcla de componentes, lo que evita el paso de disolución, y la posible precipitación del API. Se han comparado las formulaciones comerciales de fármacos con baja

biodisponibilidad oral con los SNEDDS y los resultados obtenidos son la mejora en parámetros como protección del fármaco del ambiente del TGI, permeabilidad en la mucosa, absorción linfática, que evita el metabolismo de primer paso, y lo que lleva al aumento de la concentración plasmática de los API (Ashfaq et al. 2022).



Figura 14. Fotografías de SNEDDS cargados con los API. **a.** (DOX)SNEDDS, **b.** (AD32)SNEDDS, **c.** (MTX)SNEDDS, **d.** (RB)SNEDDS, **e.** (PpIX)SNEDDS.

Cuando se agregó el API, se observó el color característico del fármaco en el sistema coloidal, se tornó rojo con DOX, naranja con AD32, amarillo con MTX, rosa con RB, y café con PpIX, junto con la característica translúcida, ver Figura 14. Debido a las pruebas de eficiencia de encapsulación se conocieron las concentraciones de los API que la formulación de SNEDDS puede acarrear. Se observó cómo los API liposolubles que se encuentran afuera de los SNEDDS precipitan, como es el caso de AD32 y PpIX, y se comprobó como los SNEDDS confieren protección contra diversos factores como luz y pH.

Se lograron producir CTS@SNEDDS con carga, manteniendo las mismas características de los demás sistemas, con la única diferencia de que al cargar la molécula de sal disodio de PpIX los SNEDDS multifásicos no se forman. Esto posiblemente se debe a que la sal disodio de PpIX es altamente soluble en ácidos, diversos autores han reportado la disolución de esta molécula en este tipo de solventes para cargarlos en nanopartículas (Gutiérrez Fuentes et al. 2007; Basoglu, Bilgin, and Demir 2016). La PpIX al ser adicionada a la formulación (en cualquier fase de preparación) atrapa las moléculas de ácido acético presentes en la solución

de quitosano, haciendo que el polímero no se encuentre disuelto y precipite, por lo cual posiblemente se formen únicamente SNEDDS simples. Por lo que únicamente se utilizó PpIX en SNEDDS simples en este proyecto.

6.4 Caracterización fisicoquímica

6.4.1 Pruebas de estabilidad coloidal y de eficacia de emulsificación

Las pruebas de estabilidad coloidal son estudios que permiten conocer el comportamiento de los sistemas nanoparticulados bajo diferentes parámetros, como temperatura, movimiento, pH y enzimas, ya que las muestras pueden verse perturbadas en sus propiedades, y limitar su producción, manejo y almacenamiento. Se realizaron cuatro pruebas de los SNEDDS O/W sin carga, las cuales permitieron identificar las condiciones de almacenamiento, y la calidad de las nanopartículas.

Se midió el (% T) de una muestra diluida (1:10), de reciente preparación y sin centrifugar. Se encontró un promedio de 96.2 %, valores similares (97.34 %, y 97.3 %) a los reportados por otros equipos de investigación (M. Ahmad et al. 2017; Alshahrani et al. 2018).

I) Prueba de centrifugación

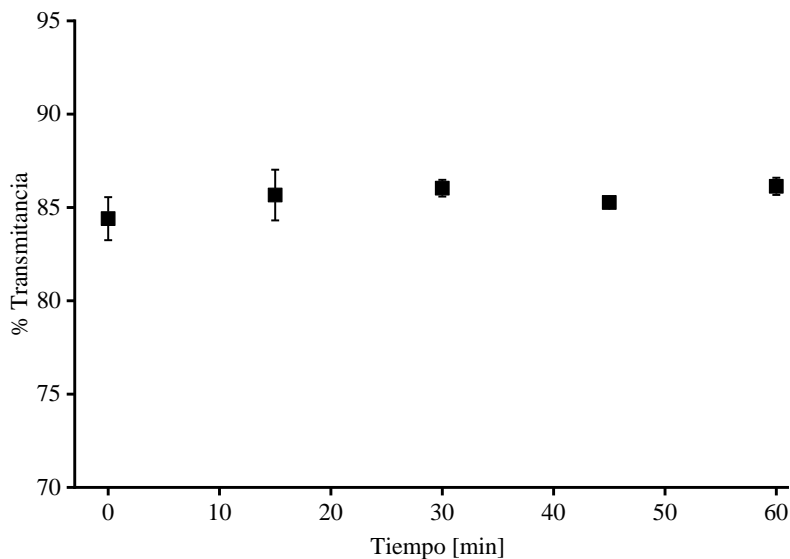


Figura 15. Gráfico de % Transmitancia (% T) contra tiempo de la prueba de centrifugación.

El aspecto físico de las muestras se mantuvo a lo largo de los periodos de centrifugación, no se observaron floculaciones o cambios de fase. Se realizó un análisis ANOVA entre los resultados de % T y el grupo control sin centrifugar, obteniéndose resultados entre 84 y 86 % (muestras sin diluir). No se encontraron diferencias significativas entre las muestras centrifugadas a diferentes tiempos ($p < 0.05$), lo que indica estabilidad a la prueba de centrifugación (Figura 15).

II) Prueba de congelación-descongelación

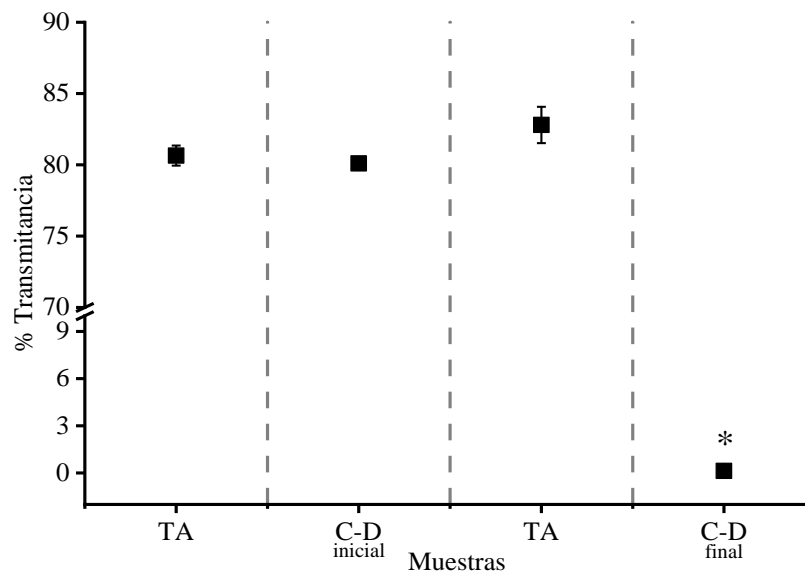


Figura 16. Gráfico de % Transmitancia de la prueba de congelación y descongelación. TA, temperatura ambiente, C-D, congelación–descongelación, *, diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C-D inicial y C-D final.

Las pruebas se realizaron sin diluir, por lo que el (% T) disminuye, sin embargo, se mantienen valores $>$ a 80%. En la prueba de congelación y descongelación se observó que después de la descongelación se presentó pérdida de la integridad de los SNEDDS (Figura 16). El sistema coloidal cambió su apariencia a una sustancia lechosa y turbia, el (% T) cambió de 80.1 ± 0.43 % a 0.13 ± 0.32 %, lo que indica el aumento en el tamaño de las partículas.

Esto posiblemente es debido a que en la etapa de congelación se formen cristales de hielo entre las partículas coloidales. Tarsitano et al. observaron este mismo efecto, utilizaron Labrafil® M2125 y Phospholipon® 90G, observaron que al congelar se aumentaba drásticamente el tamaño de las nanopartículas hasta >1000 nm; también agregaron crioprotectores (glucosa y manosa) y realizaron un congelamiento rápido, concluyeron que aunque se coloque la misma concentración de crioprotector, la pérdida de estabilidad de los sistemas dependerá de los tipos de componentes en la formulación (Tarsitano et al. 2022). Un comportamiento observado por Usmani et al, en las formulaciones de SNEDDS en las que no se adicionó y las que tenían mayor cantidad de cosolvente no pasaron la prueba (Usmani et al. 2019). Se concluye que los SNEDDS presentados no deben almacenarse bajo congelación (-4 °C).

III) Prueba de calentamiento-enfriamiento

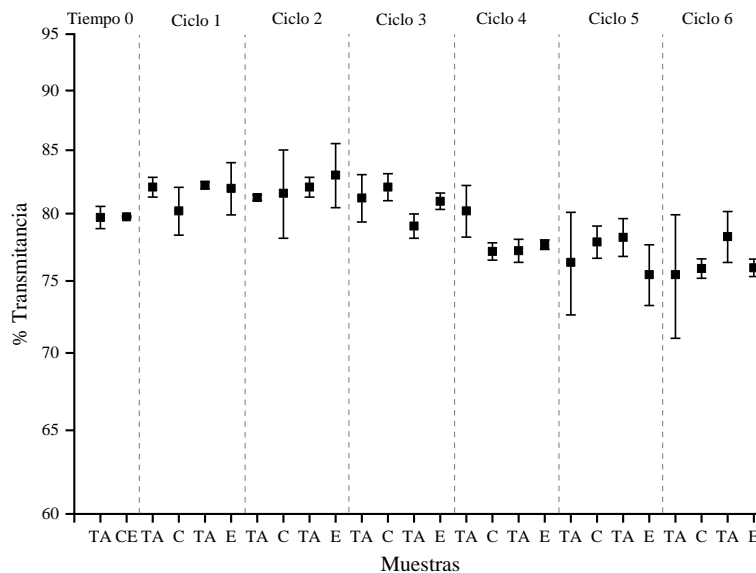


Figura 17. Gráfico de % Transmitancia de estabilidad de calentamiento y enfriamiento. TA, Temperatura ambiente, CE, calentamiento-enfriamiento, C, calentamiento, E, enfriamiento.

Se completaron los seis ciclos correspondientes de calentamiento y enfriamiento junto con el grupo control, la cual fue a temperatura ambiente. No se observaron cambios en la apariencia de los coloides, y en el (% T) no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$)

(Figura 17). Los (% T) se mantuvieron entre 75 % y 82 %, valores obtenidos de SNEDDS sin diluir. Por lo que se los sistemas son estables a temperaturas de 4 °C a 45 °C. También se observó que los SNEDDS son estables a temperatura ambiente por más de 24 días, y que pueden ser estables a la temperatura corporal.

IV) Prueba en fluidos fisiológicos

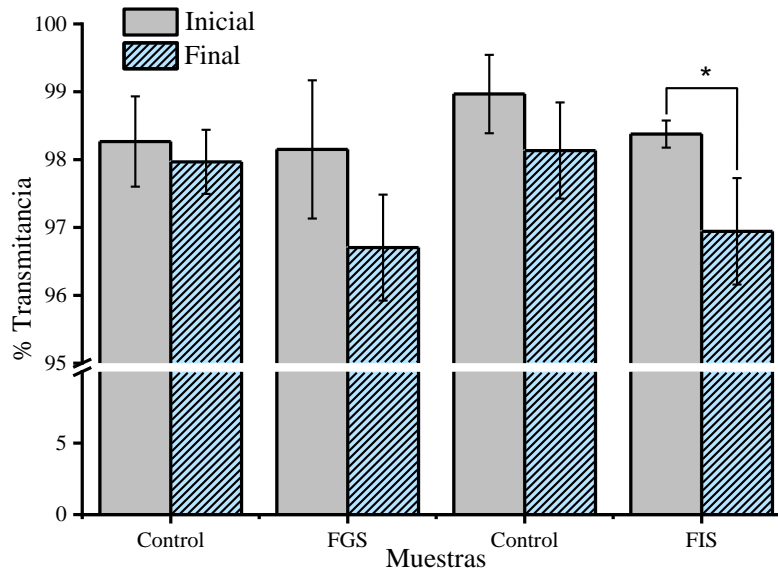


Figura 18. Gráfico de % Transmitancia contra tiempo de la prueba en fluidos fisiológicos simulados. FGS, Fluidos gastrointestinales simulados, FIS, Fluidos gastrointestinales simulados, * diferencia significativa ($p < 0.05$).

Las pruebas de estabilidad en fluidos fisiológicos a los que estuvieron expuestas las nanopartículas ayudaron a conocer si las nanopartículas son capaces de mantener su estructura y de esta manera proteger a los API de esas condiciones. El (% T) de todas las muestras fue mayor al 95 %. En las muestras incubadas en FGS no se identificaron diferencias significativas entre el antes y después ($p < 0.05$), caso contrario de FIS, en el cual se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 18). Esto posiblemente es debido a que los ésteres de ácidos grasos de polioxietileno de los tensioactivos son hidrolizados por las enzimas pancreáticas.

Se ha reportado que Cremophor[®] RH 40 se hidroliza a una extensión inferior del 6.1 %, el cual es un valor menor en comparación con el tensioactivo polisorbato 80 (14.4 %), esto es debido que también se ha investigado que el Cremophor[®] RH40 es un inhibidor de las lipasas, ya que puede bloquear la unión de lipasa-colipasa causada por las cadenas PEG o debido a una interacción directa con el tensioactivo unido a la superficie lipídica que genera complejos inactivos de enzima-tensioactivo (Christiansen, Backensfeld, and Weitschies 2010; Chen et al. 2020). Probablemente se obtuvieron diferencias entre el antes y después de la incubación en FIS por la acción enzimática, sin embargo, los cambios si bien significativos, son mínimos debido al potencial inhibidor de RH40. Por lo que los SNEDDS resisten tanto pH ácidos y enzimáticos del estómago, como del intestino.

6.4.2 Eficiencia de encapsulación y eficiencia de carga

La eficiencia de encapsulación (% EE) es esencial para determinar qué porcentaje del API agregado se encuentra en las nanopartículas, así como la eficiencia de carga (% EC) que ayuda a conocer el porcentaje de API cargado por unidad de masa de la nanopartícula. Para maximizar los valores de ambos, el tamizaje y selección de los componentes es un factor importante, ya que la base es la solubilidad del API en ellos. Además, mayor solubilidad de los fármaco en el lípido indica que se coloca menos lípido en la formulación, lo que requiere menor cantidad de tensioactivo y cosolvente para emulsionar, los cuales en altas cantidades pueden generar irritaciones en el TGI, y a nivel celular la pérdida de la fluidez en la membrana y su posible ruptura (Khan et al. 2022).

En estos nanosistemas, no se determinó la solubilidad de los API debido a que la formulación se optimizó para la carga de ARN, y no es el objetivo de este proyecto cambiar la formulación, sin embargo, al contar con ingredientes farmacéuticos activos de características fisicoquímicas distintas se obtuvieron datos enriquecedores sobre la calidad y capacidad de la formulación para cargar APIs.

DOX es una molécula lipofílica, sin embargo, la sal ácida ($C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$) es hidrofílica, su solubilidad en agua cambia de aproximadamente 2.6 mg/mL (DOX) a 10 mg/mL (DOX•HCl). Como se puede observar en la Figura 19a, la % EE de DOX fue de 76.50 ± 1.6 % a

una concentración final en los SNEDDS simples formados de 40 $\mu\text{g/mL}$ con un % EC de $0.079 \pm 0.0016 \%$.

Se logró disolver 1 mg de DOX en un mililitro de la mezcla de componentes. Usmani et al, lograron disolver hasta 2 mg en su formulación de SNEDDS, ellos utilizaron Labrafil® M 1944 CS y Kolliphor RH40 como lípido y cosolvente, en los cuales reportan una solubilidad de $14.09 \pm 2.703 \text{ mg/mL}$, y $34.32 \pm 2.512 \text{ mg/mL}$, respectivamente. Ellos también agregan otro aceite (*Nigellia Sativa*) y utilizan glicerol como solvente (solubilidad de DOX fue de $14.758 \pm 2.758 \text{ mg/mL}$), que posiblemente permitió disolver mayor cantidad de DOX (Usmani et al. 2019). Esto indica que probablemente DOX se mantuvo mayormente soluble en el tensioactivo y cosolvente que, en la fase lipídica, y de utilizarse esta formulación en un futuro, utilizar DOX sin HCl aumentaría la carga del API.

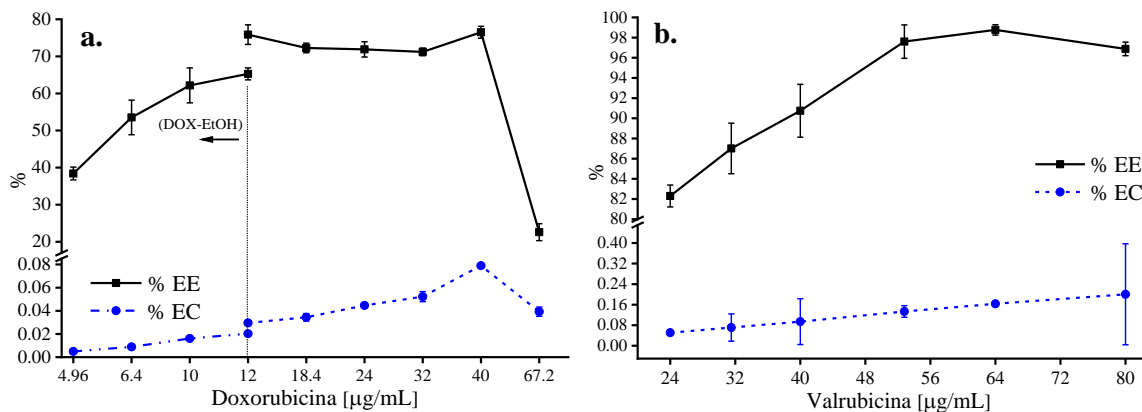


Figura 19. Gráficos de Eficiencia de atrapamiento y eficiencia de carga. **a.** DOX en SNEDDS simples, se señala como DOX-EtOH a los valores obtenidos con DOX predisuelta en etanol, **b.** AD32 en SNEDDS.

También se realizaron pruebas agregando el fármaco en un estado predisuelto (etanol) para conocer los cambios en la carga de este, se logró observar cómo disminuye la capacidad cuando se agrega de esa manera en comparación con agregar el fármaco directamente a la mezcla de componentes. Esto probablemente se debe a la solvatación del fármaco en el etanol, además, agregar el etanol fungiría como cosolvente, lo que implica la modificación

de la formulación de SNEDDS. Los valores obtenidos para 12 $\mu\text{g/mL}$ predisuelto en etanol fue de $65.28 \pm 1.62 \%$ y a la misma concentración, pero con el fármaco en polvo fue de $75.86 \pm 2.63 \%$, los cuales son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Un valor cercano al antes mencionado es el de su análogo, AD32, en el cual se agregó 1.6 mg/ mL, valor similar, también reportado por Lacko et al, quienes desarrollaron partículas lipídicas (rHDL) con carga de 2 mg/ mL (Lacko et al. 2012). AD32 presenta solubilidad en agua de 0.0325 mg/ mL, por lo que es más afín a los componentes de esta formulación. La concentración final de AD32 en los SNEDDS fue de 64 $\mu\text{g/ mL}$ con una % EE de $98.76 \pm 0.51 \%$ y % EC de $0.1635 \pm 0.005 \%$ (Figura 19b), valores más altos obtenidos de los cinco APIs utilizados.

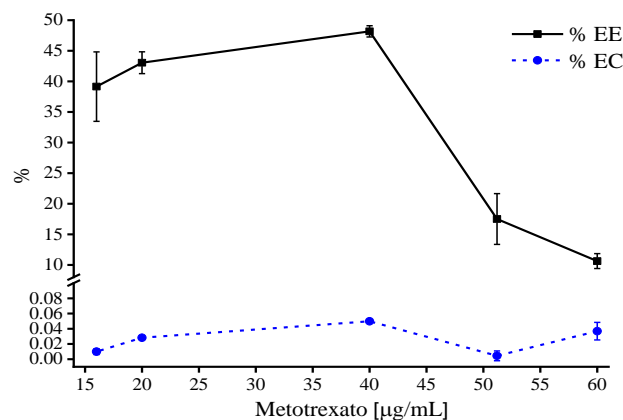


Figura 20. Gráficos de Eficiencia de atrapamiento y eficiencia de carga del metotrexato en SNEDDS simples (O/W).

Se considera que un factor importante es la solubilidad del fármaco, el MTX es un fármaco clase IV, sin embargo, tiene un log P de -1.8, por lo que tiene mayor solubilidad acuosa (1 mg/mL) que lipídica. Esto puede explicar la baja carga del MTX.

Se logró disolver 1 mg en la formulación, la cual posiblemente sea debido a los tensioactivos y cosolventes, por lo que el fármaco mayormente se encontrará en las zonas hidrofílicas de los SNEDDS. D.S Kim et al, reportaron SMEDDS de aceite de ricino, Tween[®] 80 y Plurol[®] diisoesteárico, ellos disolvieron 100 mg de MTX en 1 mL de la mezcla, sin embargo, el API

presentó mayor solubilidad en los tensioactivos ($>300 \mu\text{g/mL}$) y cosolventes ($> 900 \mu\text{g/mL}$), que en el lípido ($74.40 \mu\text{g/mL}$), además, la formulación constaba de una relación de volumen de 30/70/10, es decir, que la gran cantidad de MTX se disolvió gracias al tensioactivo (D. S. Kim et al. 2019). El MTX presentó una % EE de $48.17 \pm 0.91 \%$ y una % EC de $0.028 \pm 0.0007 \%$ a $40 \mu\text{g/mL}$ (Figura 20).

Con el objetivo de conocer si el estado de ionización del MTX pudiese estar alterando la carga en los SNEDDS, se realizaron pruebas utilizando como factor el pH, ya que el MTX es un ácido débil, y posiblemente al estar en un estado ionizado el MTX disminuya su encapsulamiento. Se realizó el análisis teórico para conocer los estados de disociación. Sus pKa son, $\text{pKa}_1 = 3.5$ (ácido carboxílico, $\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^-$), $\text{pKa}_2 = 8.8$ (aminas, $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$), y $\text{pKa}_3 = 9.2$ (aminas, $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$), después de medir el pH de los SNEDDS con carga de MTX (pH de 6-6.7), y utilizando el analizador CurTiPot (Potentiometric Titration Curves, https://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot_.html), aparentemente en el rango de pH de 5.8 y 7.2 no hay cambios significativos en las especies químicas. Por lo que se enfatiza que el parámetro más importante es la solubilidad de los API para este tipo de sistemas SNEDDS.

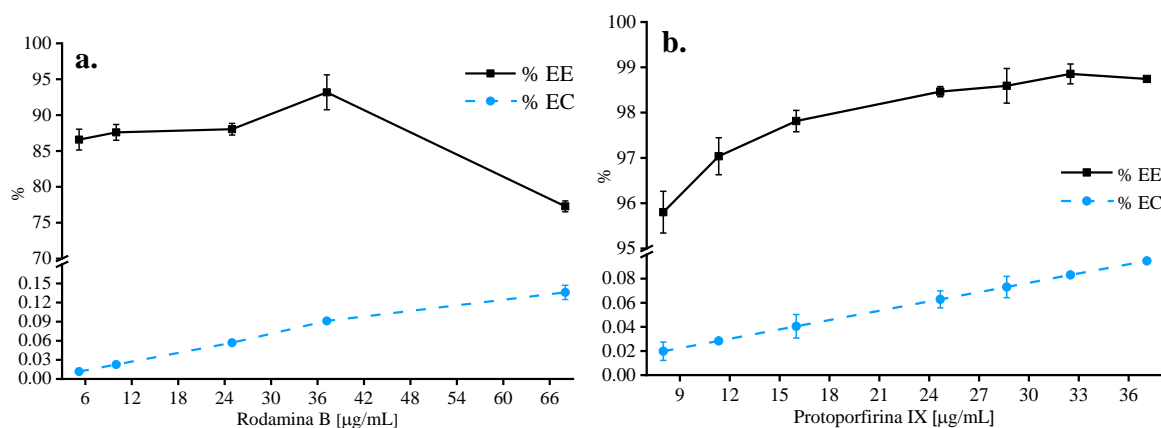


Figura 21. Gráficos de Eficiencia de atrapamiento y eficiencia de carga. **a.** Rodamina B en SNEDDS simples, **b.** Protoporfirina IX en SNEDDS.

Se identificó que el % EE de Rodamina B en los SNEDDS fue del $93.17 \pm 2.43\%$ a una concentración de $37.2 \mu\text{g/mL}$, y su % EC de $0.091 \pm 0.0006 \%$ (Figura 21a). La Rodamina B,

tiene un valor de Log P de 1.95, es decir que es mayormente soluble en agua, es probable que por esa razón la concentración final sea menor, sin embargo, el valor de % EE es alta, por lo que la RB es afín a los componentes de la formulación. Se logró disolver 0.93 mg, valor cercano reportado por Topal et al, quienes disolvieron 1 mg de RB en el lípido de SLN (Topal et al. 2020). No se han reportado SNEDDS con agentes fotosensibilizantes, sin embargo, diversos estudios demuestran que aumentar la liposolubilidad de RB permite una mejor biodisponibilidad (Mottram et al. 2012).

La sal disodio de PpIX utilizada es más hidrosoluble (Log P 1.37) que la PpIX (Log P 7.33), es por ello que se disolvió 0.81 g/mL del API en los componentes de la formulación, los cuales constan tanto de zonas hidrofílicas como lipofílicas. Przybylo et al, agregaron 0.1 mg/mL de PpIX en fosfatidilcolina para formar liposomas (Przybylo et al. 2016), esto indica que la carga de PpIX suele ser baja para este tipo de moléculas. Además, se debe tomar en consideración que las nanopartículas cargadas con agentes fotosensibilizantes no deben causar ningún efecto o daño cuando no están siendo irradiadas (da Silva et al. 2021).

El % EE fue de 98.85 ± 0.21 % y % EC de 0.083 ± 0.0018 % a 32.5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21b), esto es la concentración de API más baja, pero con una alta capacidad de encapsulación. La sal disodio de PpIX es soluble en metanol y en ácidos fuertes como el HCl, sin embargo, como se demostró que la carga disminuye al predisolverse, se mantuvo utilizando el polvo del API.

Todos los valores de % EC son pequeños, estos valores indican el porcentaje del API que cabe en el nanosistema, es decir, en un SNEDDS. Los sistemas tienen un tamaño de partícula menor a 35 nm, esto podría explicar los porcentajes obtenidos. También se determinó que siempre habrá fármaco en el medio debido al gradiente de concentración que se crea por la difusión pasiva entre las nanopartículas y el agua.

6.4.3 Espectrofotometría UV-Vis

Al incidir luz a una longitud de onda (λ) específica a una muestra, se produce un cambio en sus niveles de energía, los electrones de la sustancia cambian a un estado de mayor energía, generando transiciones electrónicas debido a la luz absorbida. Entonces la espectroscopia UV-Vis brinda información sobre la posición de electrones y enlaces químicos.

En los espectros UV-Vis se observan bandas de absorción de las transiciones electrónicas, las longitudes de onda más cortas son más energéticas y las longitudes de onda más largas son menos energéticas, es decir, que si en el espectro se observan bandas de absorción en 200 nm se necesita mayor energía para producir una transición electrónica cuando se compara con una banda de absorción a 800nm, es por ello que se observan en diferentes λ las bandas de absorción características de las sustancias.

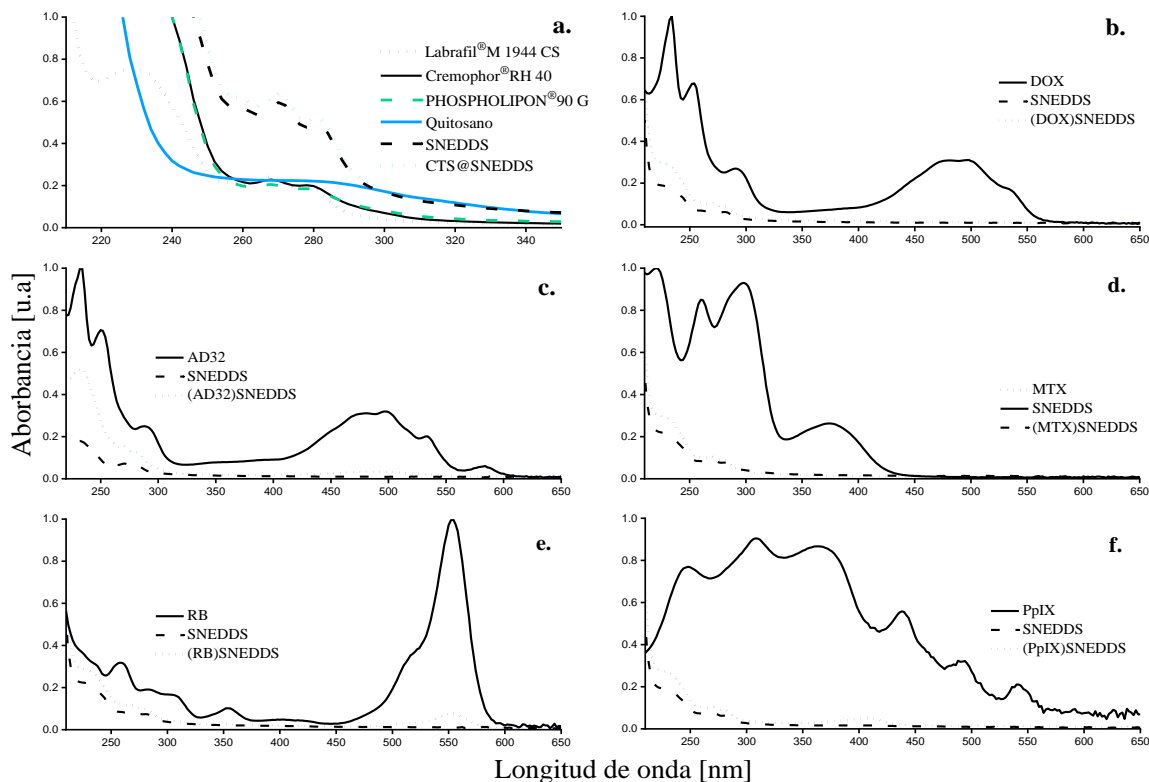


Figura 22. Espectros UV-Vis de los API en solución, SNEDDS sin carga y los (API)SNEDDS. **a.** Componentes de la formulación, **b.** DOX, **c.** AD32, **d.** MTX, **e.** RB, **f.** PpIX.

Las soluciones fueron diluidas en 1:100 y normalizadas. Los componentes de los SNEDDS y CTS@SNEDDS tienen bandas de absorción desde 200 nm hasta 280 nm. El quitosano presenta transiciones en 218 nm, el lípido en 206 nm, 234 nm, 268 nm y 278 nm, el tensioactivo en 204 nm, 268 nm y 280 nm y el cosolvente en 204 nm, 268 nm y 278 nm. Los SNEDDS tienen bandas de absorción en 262 nm, 272 nm y 284 nm, esto confirma la formación de las nanopartículas debido al movimiento de las bandas de absorción presentes

en los compuestos individuales. Las transiciones de los múltiples alcanos de los SNEDDS son $\sigma \rightarrow \sigma^*$ a una λ de 135 nm, C-O se encuentran a una λ de 177-184 nm con transiciones $n \rightarrow \sigma^*$, y los alquenos presentan transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ a una λ de 204 nm, estos no son visibles en los espectros presentados. A las λ de 262 nm, 272 nm y 284 nm se presentan transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de los grupos carbonilo (Figura 22a).

Los componentes de la formulación generan espectros superpuestos, es posible que por esta razón en los espectros de los SNEDDS generados solo se observe el ligero movimiento de las bandas y no la combinación de las mismas, comportamiento reportado anteriormente (Kamberi and Tran 2012; Mabrouk, Hamed, and Mansour 2021).

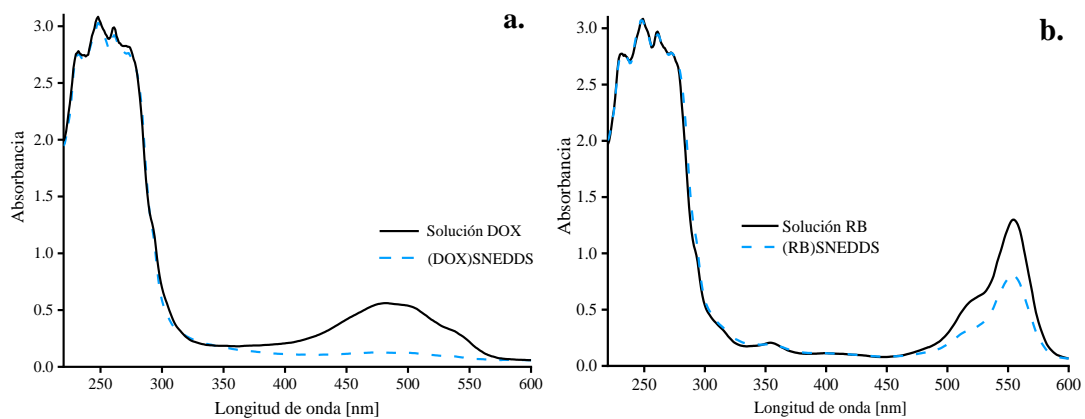


Figura 23. Espectro UV-Vis. **a.** Solución de DOX y (DOX)SNEDDS, **b.** Solución de RB y (RB)SNEDDS.

Se observaron las bandas de absorción características de los agentes terapéuticos en solución: DOX a 480 nm, AD32 a 496 nm, MTX a 302 nm, mismas que se seleccionaron para que la matriz de SNEDDS no interfiriera con la lectura del API, RB a 554 nm, y PpIX a 470 nm.

Se observó la difusión total o parcial de las bandas de absorción características de cada API, y las bandas de los SNEDDS se mantuvieron, esto es en parte debido al coeficiente de extinción molar (ϵ) de los mismos, por ejemplo, el de la rodamina B es de $106\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y el de Doxorubicina es $500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, por lo que es posible ver su banda de absorción (Figura 23), comportamiento reportado por Rout, et al. en el cual utilizaron el fotosensibilizador Azul de toluidina O (TBO) en nanopartículas lipídicas, ellos observaron como el TBO aumenta de

manera correspondiente con la concentración de fotosensibilizador (Rout, Liu, and Wu 2017). Sin embargo, esto es solo visible si se analiza fuera del rango dinámico del instrumento.

Se propone que debido a que los API se encuentran en el núcleo de los nanosistemas no es posible obtener información de los mismos, por interferencia del Labrafil[®], la fosfatidilcolina y el Cremophor[®] RH 40, así como la posibilidad de que se disperse la luz por burbujas generadas por el tensioactivo. Otra posible explicación se basa en el funcionamiento del equipo de UV-Vis, al incidir la luz y tener contacto con los SNEDDS, la luz se dispersa, (efecto Tyndall), y la luz que fue transmitida y detectada no es necesariamente toda la luz que fue absorbida, sin embargo, el instrumento lo interpreta de esta manera. Esto se debe a que los SNEDDS son sistemas coloidales de tamaño de partícula menor a 35 nm, es decir, son más pequeños que la longitud de onda de la luz emitida, esto se conoce como dispersión de Rayleigh. Los espectros de absorción de (API)SNEDDS y CTS@(API)SNEDDS no presentaron diferencias (no mostrado en este trabajo).

6.4.4 Espectroscopía FT-IR

Al irradiar una molécula con momento dipolar permanente, con radiación infrarroja generará un cambio en la energía vibracional de sus enlaces que puede generar vibraciones de flexión (δ) en el plano o fuera del plano, y de estiramientos (st) o llamados de tensión que pueden ser simétricos o asimétricos, con esta información se puede obtener la estructura e identidad de la molécula, así como interacciones moleculares.

En el espectro FTIR de los SNEDDS sin carga (Figura 24) se identificaron bandas correspondientes al Cremophor[®] RH40. En 723 cm^{-1} por la flexión de enlaces en C-H_2 , en 1458 cm^{-1} por flexión en enlaces C-H , en 2928 cm^{-1} , 2855 cm^{-1} y 3006 cm^{-1} por estiramiento en enlaces C-H de la cadena hidrocarbonada, en 848 cm^{-1} , 950 cm^{-1} y 990 cm^{-1} por la flexión de enlaces $\text{CH}=\text{CH}$, en 1295 cm^{-1} por flexión en el plano en los enlaces del grupo $\text{CH}=\text{}$ del alqueno, en 1100 cm^{-1} , 1247 cm^{-1} , y 1349 cm^{-1} por estiramiento asimétrico de los enlaces C-O del alcohol, y por flexión en el plano de los enlaces O-H del alcohol, en 1636 cm^{-1} , y 1736 cm^{-1} por estiramiento en los enlaces de C=O de los grupos éster, y en 3465 cm^{-1} por estiramiento en enlaces OH .

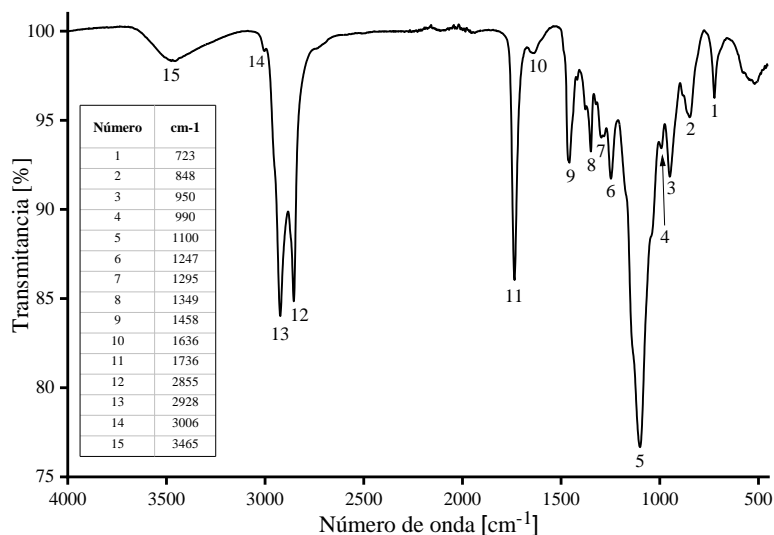


Figura 24. Espectro infrarrojo de SNEDDS O/W sin carga, se indica el número de onda de las bandas.

No se observaron bandas de otros compuestos, debido a que el tensioactivo solo se encontraba en el exterior, en contacto con el agua, y todos los demás componentes en el interior de la nanopartícula. El espectro infrarrojo de CTS@SNEDDS no presentó cambios con respecto al de SNEDDS simples. Además, las bandas características de los API no se observaron en los SNEDDS con carga, (no mostrado en este trabajo), esto indica que se encuentran dentro de la partícula ya que los SNEDDS provocan la protección de los bandas de absorción del API y no se ven, y que al agregar el API no hay cambios en la naturaleza de los SNEDDS (Sun et al. 2019; Hosseini et al. 2019; Shrivastava et al. 2022).

6.4.5 Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial ζ

Los diámetros hidrodinámicos e índices de polidispersión (PDI) de los SNEDDS se determinaron por dispersión dinámica de luz. Las nanopartículas se mueven continuamente al azar debido a las colisiones con las moléculas de disolvente, es por ello que la luz laser que se incide se dispersa en diferentes intensidades en el tiempo. Al generarse el análisis de las diferentes intensidades de las fluctuaciones se obtiene la velocidad del movimiento

browniano y por lo tanto el tamaño de partícula. Si las partículas se mueven rápidamente es un indicativo de partículas pequeñas, por lo que se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Se utiliza la relación de Stokes-Einstein, la cual establece que el coeficiente de difusión traslacional de una partícula depende de su tamaño, de la temperatura y viscosidad del medio, pero resulta independiente de la densidad y composición de la partícula.

Muestra	Tamaño (nm)	PDI
CTS@SNEDDS	27.25	0.27
CTS@(DOX)SNEDDS	27.64	0.39
CTS@(AD32)SNEDDS	25.02	0.36
CTS@(MTX)SNEDDS	25.68	0.62
CTS@(RB)SNEDDS	24.31	0.18
(PpIX)SNEDDS	28.95	0.52

La importancia del tamaño de partícula en sistemas dirigidos contra tumores es muy importante para la adecuada captación celular y entrega del API. Gracias a los tamaños <100 nm de los sistemas nanoparticulados resulta en un efecto de permeación y retención aumentada, debido a cambios en la vasculatura y arquitectura en el tumor, este efecto es altamente primordial para nanopartículas pasivas. Se ha reportado que el rango óptimo en las nanopartículas debe ser de 10 a 60 nm, independientemente de su composición. Un tamaño mayor a este tiene alta susceptibilidad de ser eliminado por el sistema reticuloendotelial, y partículas menores a ese rango se ven limitadas para unirse a los ligandos de las células por lo que no podrán acceder de manera efectiva a las células (Hoshyar et al. 2016).

Como se puede ver en la Figura 25 y Tabla 5, los tamaños de los CTS@SNEDDS con y sin carga son menores a 30 nm. Se estima que las nanopartículas se absorban en intestino delgado, y puedan acceder al sistema linfático y de esta manera mejorar parámetros farmacocinéticos, como también puedan llegar al colon como SNEDDS por el flujo del TGI. Se ha mencionado que el tamaño óptimo de la nanopartícula depende del sitio de acción deseado, por lo que el tamaño de nanopartícula obtenido en el presente trabajo es el adecuado. Garg et al. reportaron SNEDDS con tamaño de partículas menor a 32 nm, ellos observaron

que los SNEDDS ayudan a generar una mejor entrega del API, respecto al API en solución (Garg et al. 2017).

El PDI provee información sobre la distribución de tamaños de la muestra, los valores que se obtienen son de 0 a 1, aquellos cercanos a 1 indican que la muestra es polidispersa, es decir que se presentan diferentes tamaños, y si es un valor cercano a 0, la muestra es monodispersa. Los resultados obtenidos de PDI para CTS@SNEDDS sin carga y con carga de DOX, AD32, y RB, así como (PpIX)SNEDDS son inferiores o igual a 0.5 (Tabla 5), esto señala que las nanoemulsiones tienen una distribución de tamaño monomodal. Sin embargo, CTS@(MTX)SNEDDS presenta un valor de PDI de 0.62, es decir que la distribución de tamaños es más irregular que en los demás sistemas.

Hay pocos factores que afectan el PDI, principalmente se pueden producir durante el proceso de producción o en la concentración de componentes, debido a que CTS@(MTX)SNEDDS fue generado de la misma manera que los demás, se puede suponer que para esta muestra en particular la concentración de tensioactivo fue ligeramente mayor (como es reportado en el estudio de Morales, A. 2022, en la cual menciona que el Cremophor[®] RH40 es el principal factor para la obtención de un valor PDI alto, seguido del cosolvente (Morales 2022). Se puede suponer que las nanopartículas cumplen con las características predichas, y se puede garantizar que los sistemas tienen una distribución homogénea de tamaño de nanopartículas. (Lancheros et al. 2014; Mujica Álvarez, Matiacevich, and Bustos 2019)

El potencial ζ es una medida de la carga efectiva de la superficie de las partículas coloidales, permite conocer la energía potencial de superficie que existe entre las partículas en suspensión. Una nanopartícula tiene un potencial de superficie definido por su composición, esta se neutraliza con los contraiones del medio, a esta zona se le denomina capa de Stern, externo a esta capa existe una región en la cual la distribución de iones es difusa, conocida como capa de Gouy-Chapman, el potencial ζ se obtiene en el límite de la capa de Stern y la capa difusa.

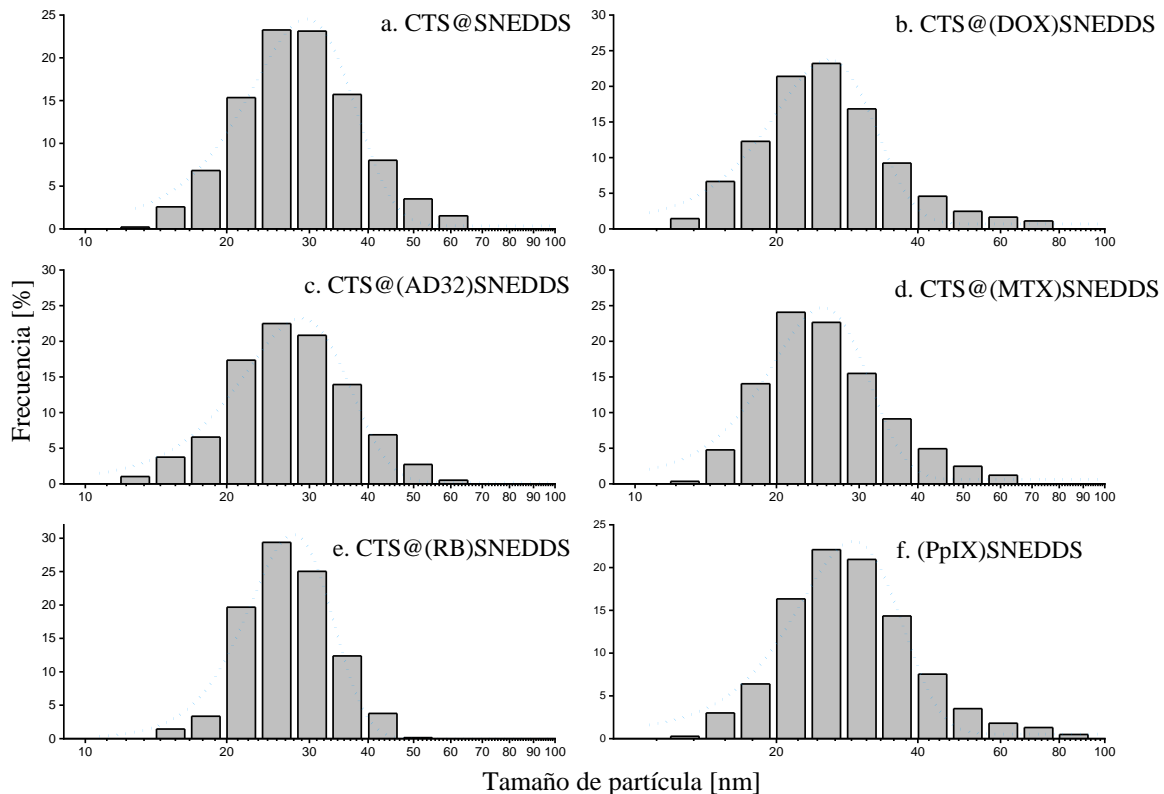


Figura 25. Gráficos de distribución de los tamaños de SNEDDS sin carga. **a.** CTS@SNEDDS sin carga, **b.** CTS@(DOX)SNEDDS, **c.** CTS@(AD32)SNEDDS, **d.** CTS@(MTX)SNEDDS, **e.** CTS@(RB)SNEDDS, **f.** (PpIX)SNEDDS.

La medida se basa en la dispersión de luz electroforética, se aplica un campo eléctrico que hace que las partículas se muevan continuamente (movilidad electroforética), y se incide un láser en la muestra. Con los datos de la dispersión del rayo láser, la longitud de onda del rayo, el ángulo al cual la luz dispersada es detectada, y el campo eléctrico son utilizados para determinar la movilidad electroforética, la cual es sustituida en la ecuación de aproximación de Smoluchowski para finalmente obtener el ζ (Tibaquira et al. 2007).

El valor de potencial ζ permite determinar la fuerza de repulsión entre los SNEDDS, y de esta manera determinar si la suspensión es susceptible a la agregación, floculación o coagulación. Los SNEDDS se encuentran en agua, por lo que el valor del potencial ζ es una buena aproximación del potencial de superficie. El potencial ζ encontrado de SNEDDS fue

de 20.5 mV. Los valores elegidos para deducir la estabilidad de sistemas nanoparticulados son ± 30 mV. Sin embargo, se han reportado valores similares al obtenido en diversos artículos, y demuestran que los SNEDDS son estables (Yin et al. 2021). Hay muchos factores que afectan el potencial ζ , como el pH, la temperatura, la concentración, la fuerza iónica de la solución, y la viscosidad, por lo que es necesario determinar en un futuro la variable que permita aumentar el potencial ζ (Tibaquira et al. 2007).

6.4.6 Morfología

La morfología de los SNEDDS se obtuvo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). El microscopio emplea un haz de electrones que colisionan con la muestra, los cuales pueden absorberse o dispersarse en función del grosor y de la composición de la muestra, los electrones incidentes son conducidos y modulados por unas lentes hacia al detector y se forman imágenes. Las nanopartículas orgánicas, como los SNEDDS, son difíciles de observar mediante TEM debido a su bajo contraste, ya que están compuestos principalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno, es decir, de elementos muy ligeros, que interactúan débilmente con el haz de electrones (Arnould et al. 2018). Los SNEDDS se prepararon en rejillas de cobre TEM recubiertas de carbono.

Los SNEDDS (Figura 26) se observan cuasiesféricos ligeramente irregulares, con una superficie lisa y bien definidos. Se observan diferentes tamaños de partícula < 50 nm, esto concuerda con los valores de PDI determinados por dispersión dinámica de luz que, si bien son datos hidrodinámicos, se puede inferir en el comportamiento de los SNEDDS. Se observan nanopartículas sobrepuestas, esto es probablemente debido a su aglomeración durante el proceso de secado. Shrivastava et al. 2022, reportaron imágenes de microscopía electrónica de barrido de la estructura cristalina de fármacos y de los SNEDDS con carga, en estos últimos no se observaron cristales de fármaco lo que demostró su encapsulación (Shrivastava et al. 2022).

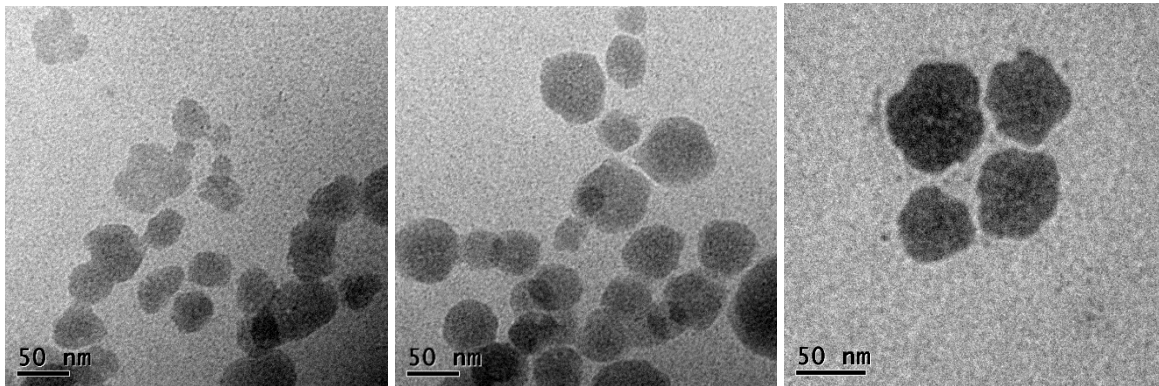


Figura 26. Imágenes de SNEDDS simples obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión.

6.4.7 Liberación de ingredientes activos

El primer proceso farmacocinético que define la entrega de los ingredientes farmacéuticos activos es la liberación. Las formas farmacéuticas han ido desarrollándose de tal manera que la concentración eficaz en sangre pueda ser inmediata, retardada, prolongada o sostenida, para mejorar y facilitar el tratamiento a los pacientes. La velocidad y el lugar son los principales factores que definen el tipo de liberación. Para sistemas orales cuyo objetivo es que el API sea absorbido en Intestino delgado, la liberación debe realizarse hasta que el fármaco llegue al sitio, por lo que la forma farmacéutica debe ser gastrorresistente, como las cápsulas de recubrimiento entérico.

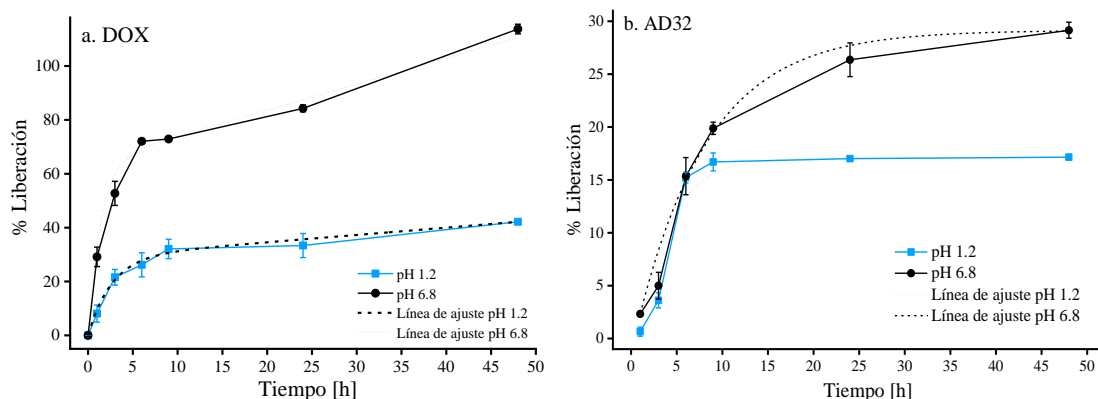
Las nanopartículas exhiben propiedades químicas y biológicas que permiten el encapsulamiento de ingredientes farmacéuticos activos y administración con mayor precisión con una liberación controlada, lo que evita menores fluctuaciones plasmáticas. Algunos mecanismos de liberación propuestos en sistemas nanoparticulados son por difusión, por solvente, por reacciones químicas (pH, enzimas, etc.) y liberación controlada por estímulos (luz, temperatura, ultrasonido, etc.) (Patra et al. 2018).

Los perfiles de liberación de los API de los SNEDDS se determinaron mediante el método de diálisis, el cual es ampliamente utilizado en sistemas nanoparticulados. Se basa en medir el API desde el compartimento donante (donde se encuentran los SNEDDS) al aceptor, es decir, el API que difunde a través de la membrana. Debido a la exposición de SNEDDS a fluidos gastrointestinales e intestinales, se optó por que los medios de liberación fuesen a pH

1.2 y pH 6.8, sin enzimas. De esta manera se permite conocer si existen fugas tempranas de los API en el estómago, e inferir si el fármaco se encontrará disponible para su absorción en las siguientes secciones del TGI.

La liberación general observada de los API consta de una liberación rápida inicial desde la primera hora hasta las 9 horas, seguido de una liberación sostenida, hasta las 24 horas a pH 1.2, el máximo de liberación de DOX fue el 33.35 %, de AD32 fue 17.01 %, de MTX fue 60.69 %, de RB el 58 % y el 46.45 % de PpIX. A pH 6.8 a las 24 horas se liberó más del 80 % y a las 48 horas más del 95 % de todos los API, con excepción de AD32, cuya liberación máxima a las 48 horas fue de 29.14 % (ver Figura 27), esto posiblemente se deba a su alta lipofiliidad y compatibilidad con el Labrafil, AD32 podría haber estado altamente unido a los ácidos grasos del lípido, este tipo de perfil de liberación ha sido reportado anteriormente en moléculas modificadas para aumentar su carga en el lípido de SNEDDS.

A partir de los perfiles se puede inferir que el proceso de liberación se basa en la difusión simple a favor del gradiente de concentración desde el medio donante al aceptor, seguido de la degradación de la partícula (Cui, Zhang, et al. 2019). La mayor liberación a pH 6.8 puede atribuirse a una menor difusividad del API a través de la membrana debido al gran peso molecular del tensioactivo, lo que permite mantener a los API en un estado mayormente disuelto en la cámara donante (Incecayir 2015; Bernkop-Schnürch and Jalil 2018).



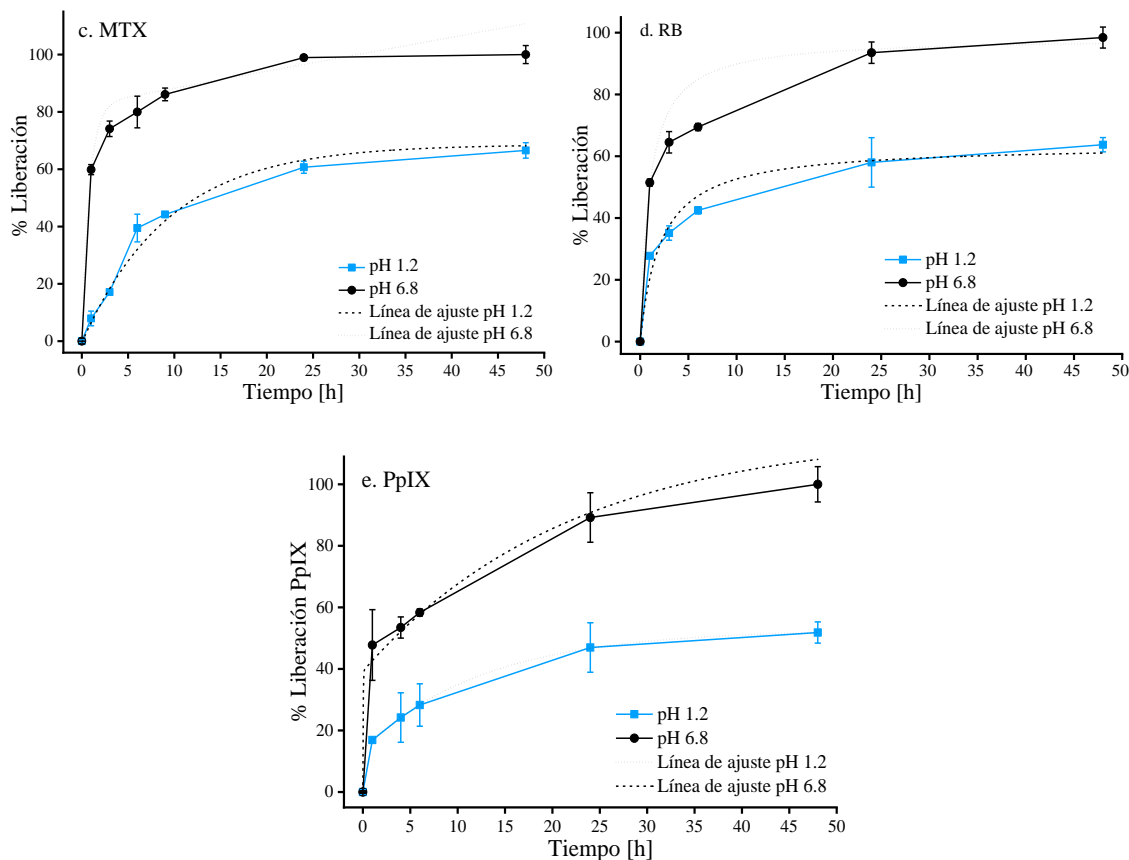


Figura 27. Gráficos de liberación de los ingredientes farmacéuticos activos de los SNEDDS simples a pH 1.2 y pH 6.8. **a.** (DOX)SNEDDS, **b.** (AD32)SNEDDS, **c.** (MTX)SNEDDS, **d.** (RB)SNEDDS, **e.** (PpIX)SNEDDS.

La liberación de AD32 a pH 1.2 y pH 6.8 se ajusta a un modelo exponencial (R^2 de 0.949 y 0.994, respectivamente), en el cual la liberación del API es constante respecto al tiempo, similar a una liberación de tipo sostenida. Como se mencionó, debido a la baja solubilidad de AD32, el porcentaje de liberación fue menor al 30 %, esto sugiere que se sobrepasaron los límites de solubilidad de AD32 ($32 \mu\text{g/mL}$) y el fármaco no atravesó la membrana debido a su precipitación, así como de la formación de micelas con el API, el cual podría estar dentro de las mismas y de esta manera no puede atravesar la membrana.

El modelo de liberación para DOX es Shah tanto a pH 1.2 (R^2 de 0.982) como a pH 6.8 (R^2 de 0.995), igual que para la liberación de MTX a pH 1.2 (R^2 de 0.983) y de PpIX a pH 6.8 (R^2 de 0.999). Este modelo explica una función de decaimiento exponencial combinada con

una función lineal, es decir, el API se liberó de manera constante hasta aproximadamente las 9 horas, el API detectado en el medio receptor seguramente se encontraba en una zona alejada del núcleo lipídico y se encontraban mayormente en el tensioactivo, además, los API con mayor afinidad a este, pueden pasar la barrera interfacial más rápidamente, de esta manera migraron hacia la zona más hidrofílica, y después hubo una liberación dependiente del tiempo, por lo que se propone que sea por la posible degradación de la partícula.

En la liberación de MTX a pH 6.8 (R^2 de 0.998), de RB a pH 1.2 y pH 6.8 (R^2 de 0.991 y 0.995, respectivamente), y de PpIX a pH 1.2 (R^2 de 0.996) el modelo ajustado es de una función de crecimiento exponencial de dos fases con parámetros constantes de tiempo (ExpGro2), posiblemente a que la primer liberación detectada a 1 hora fue alta e inmediata, por las características fisicoquímicas de los API, seguido de una liberación constante tanto por sus características combinadas como a la degradación de los SNEDDS.

La liberación del API es dependiente tanto de la solubilidad del API y del comportamiento de los SNEDDS, se propone que el burst inicial se debe a la posición de los API en los SNEDDS, entre más hidrofílico sea el API mayor porcentaje será liberado primero, posteriormente, los SNEDDS comienzan a degradarse antes de las 9 horas, en el cual el API puede moverse a la fase acuosa o quedarse atrapado en las micelas que se forman por los componentes libres.

El comportamiento de liberación en los SNEDDS es similar en todos los API, se presentó una mayor liberación a pH 6.8 que a pH 1.2, perfil observado por otros autores, ellos mencionan que las diferencias en el porcentaje de la liberación se debe a las características fisicoquímicas de las moléculas en los SNEDDS, así como de la interacción de las mismas con los componentes de la formulación, como se mencionó anteriormente (U. Ahmad et al. 2018; Cui, Zhao, et al. 2019). También se observó como la PpIX en solución formó agregados en soluciones a pH 1.2, sin embargo, bajo el mismo pH pero cargado en los SNEDDS, no precipitó. Esto apoya la propuesta de que pueden cargarse moléculas tanto hidrofílicas como lipofílicas en sistemas SNEDDS, que brindan protección a los API en entornos severos de jugo gástrico, y fungen como vehículos de entrega adecuados.

6.5 Caracterización biológica

6.5.1 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo con XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) y el reactivo de acoplamiento de electrones. La sal de tetrazolio de XTT se escinde en formazán, un producto soluble en agua, por la enzima succinato-tetrazolio reductasa que se encuentra en las mitocondrias, y es dependiente del potencial redox celular. Se correlaciona la producción de formazán (mediante valores de absorbancia) con las células metabólicamente activas, entre mayores valores de absorbancia mayor supervivencia celular.

La línea celular HCT-116 se utilizó como modelo para conocer el efecto de los API en solución, CTS@SNEDDS vacíos y con carga de API. Se agregaron concentraciones de 0.1, 1, 4, 8 y 10 μM de los tratamientos y se incubaron por 24 horas (ver Figura 28). En todos los tratamientos, con excepción de PpIX, se encontró que a concentraciones de 0.1 y 1 μM no se produjo muerte celular.

En la viabilidad celular a concentraciones de 4 μM se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la solución de DOX y CTS@(DOX)SNEDDS, $67.10 \pm 1.25 \%$ y $90.92 \pm 0.04 \%$, respectivamente. La muerte celular producida por la solución de DOX fue mayor ya que se encuentra disponible y puede acceder al núcleo de las células, caso contrario de la DOX en los SNEDDS, la cual primero debe ser liberada de los SNEDDS para realizar su mecanismo de acción. Efecto contrario con CTS@(API)SNEDDS de AD32 ($82.84 \pm 1.73 \%$), MTX ($92.65 \pm 3.93 \%$) y RB ($64.81 \pm 0.91 \%$), que generan muerte celular probablemente por efecto de los SNEDDS ya que a la misma concentración de las soluciones de API no hubo diferencias en la viabilidad celular (AD32 de $100 \pm 0.14\%$, MTX de $100 \pm 1.78 \%$ y RB de $100 \pm 0.29 \%$).

A concentraciones de 8 μM se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la solución de DOX y CTS@(DOX)SNEDDS, $62.90 \pm 2.99 \%$ y $20.70 \pm 1.66 \%$, respectivamente, así como entre la solución de AD32 ($100 \pm 0.14\%$) y cargada en SNEDDS ($66.26 \pm 0.11 \%$) y de la solución de MTX ($100 \pm 2.52 \%$) y en los SNEDDS ($58.23 \pm 2.59 \%$). Se observó que el comportamiento de CTS@SNEDDS y CTS@(API)SNEDDS generan

muerte celular dependientes de la concentración, a mayor concentración, mayor muerte celular.

A 10 μ M, DOX en solución (tabla 6) presentó una supervivencia celular de 57.93 ± 1.25 %, y de CTS@(DOX)SNEDDS de 7.60 ± 0.04 %, la disminución del efecto de la DOX en la solución probablemente es debido a la expulsión del fármaco (6.8.2 Evaluación de la internalización celular *in vitro*). A la misma concentración, la viabilidad celular de CTS@(AD32)SNEDDS fue de 65.5 ± 0.40 %, y de la solución fue de 100 ± 1.44 %, fue posible observar una menor muerte celular de AD32 en SNEDDS, esto es en concordancia con los datos de liberación, ya que AD32 estará posiblemente atrapado en las micelas formadas después de la degradación de los SNEDDS, así como de la posible precipitación del activo libre por la alta liposolubilidad.

La supervivencia celular de CTS@(MTX)SNEDDS a 10 μ M fue de 29.84 ± 1.53 % y de la solución de MTX fue de 99 ± 2.34 %, se puede observar la baja permeabilidad de la solución de MTX al ser un fármaco clase IV, sin embargo, aumenta gracias al vehículo. De CTS@(RB)SNEDDS de 17.62 ± 0.19 % y de la solución de 98 ± 0.24 %, en todos se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Es importante mencionar que al administrar sistemas nanoparticulados no deben generar citotoxicidad si no se inducen al láser (Craparo et al. 2021), debido a la viabilidad celular observada, en futuras investigaciones se deben utilizar concentraciones menores a 10 μ M de RB en SNEDDS para su aplicación en terapia fotodinámica.

Se ha propuesto que los tensioactivos en las nanopartículas pueden generar aberturas en las uniones intercelulares y de esta manera aumentar la permeabilidad de los API, sin embargo, en altas concentraciones pueden destruir la integridad de la membrana y romperla. Esta disrupción puede explicar los porcentajes de muerte celular que se observaron en SNEDDS sin carga a 10 μ M se obtuvieron valores de 43.6 ± 1.62 %, 91.39 ± 0.40 %, 57.92 ± 2.09 %, 51.42 ± 1.15 % y 47.65 ± 0.81 %, para DOX, AD32, MTX, RB y PpIX, respectivamente. Sin embargo, se menciona que debido a la dilución a la que serán sometidos los SNEDDS en el TGI este fenómeno podría minimizarse (Gürsoy and Çevik 2014). También puede atribuirse a lo reportado en la tesis de Morales A, 2022, que a mayor porcentaje de lípido Labrafil[®], menor hemocompatibilidad, es decir, mayor citotoxicidad (Morales 2022).

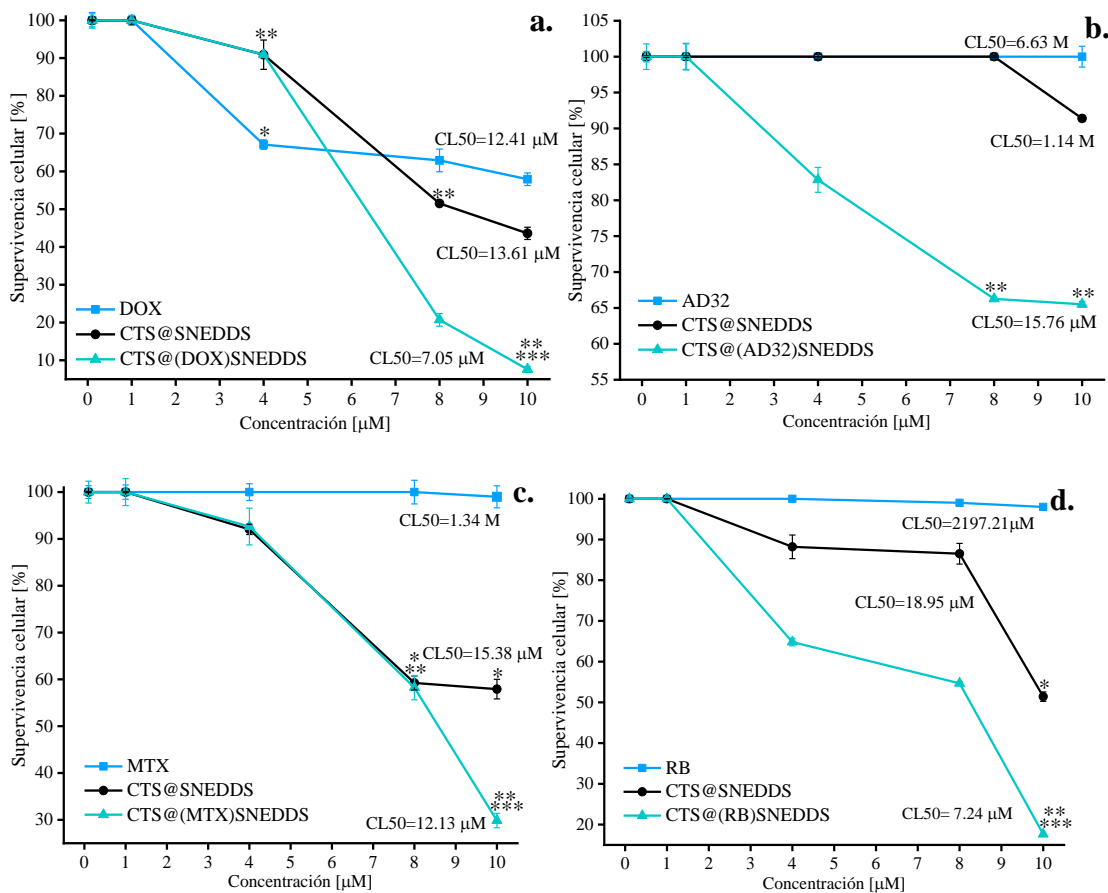


Figura 28. Gráficos de viabilidad en células HCT-116 a 24 h de los API en solución, SNEDDS sin carga y SNEDDS con carga **a.** DOX, **b.** AD32, **c.** MTX, **d.** RB. *, diferencia significativa entre el API en solución y CTS@SNEDDS, **, diferencia significativa entre API en solución y CTS@(API)SNEDDS, ***, diferencia significativa entre CTS@SNEDDS y CTS@(API)SNEDDS. Diferencias significativas a $p < 0.05$.

En todos los tratamientos con CTS@(API)SNEDDS la concentración letal 50 (CL50) es menor que el API en solución y los CTS@SNEDDS, los valores de SNEDDS con carga fueron desde 7.05 µM a 15.76 µM, y de SNEDDS sin carga de 13.61 µM a 1.14 M, y de los API en solución de 12.41 µM a 6.63 M (sin tomar en cuenta PpIX). Esto indica que se necesita menor cantidad de API para matar a la mitad de las células HCT-116 en 24 horas. De estos resultados se puede observar claramente el efecto sinérgico de los SNEDDS y de los API, ya que CTS@(API)SNEDDS en todos los tratamientos presentó mayor muerte

celular, esto indica que estos vehículos mejoran la entrega y liberación de los API de diferentes características fisicoquímicas.

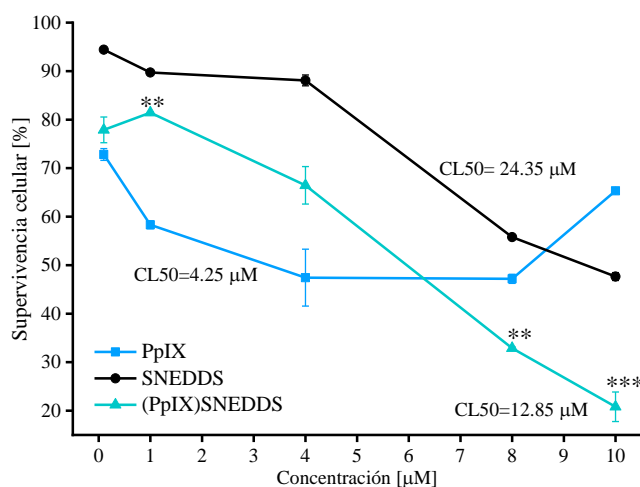


Figura 29. Gráficos de viabilidad en células HCT-116 de PpIX en solución, CTS@SNEDDS y (PpIX)SNEDDS. *, diferencia significativa entre el API en solución y CTS@SNEDDS, **, diferencia significativa entre API en solución y CTS@(API)SNEDDS, ***, diferencia significativa entre CTS@SNEDDS y CTS@(API)SNEDDS. Diferencias significativas a $p < 0.05$.

En lo que respecta a la PpIX (Figura 29) la viabilidad celular al administrar SNEDDS ($94.42 \pm 0.17\%$ a $0.1 \mu\text{M}$ y $47.65 \pm 0.81\%$ a $10 \mu\text{M}$) y (PpIX)SNEDDS ($77.89 \pm 2.64\%$ a $0.1 \mu\text{M}$ y $20.81 \pm 3.04\%$ a $10 \mu\text{M}$) fue dependiente de la dosis, como se mencionó anteriormente, sin embargo, la viabilidad celular de la solución de PpIX disminuyó a concentraciones de 1 a $8 \mu\text{M}$ ($58.31 \pm 0.80\%$ y $47.18 \pm 0.93\%$, respectivamente), y después a $10 \mu\text{M}$ presentó un porcentaje de viabilidad celular de $65.33 \pm 0.25\%$, es decir, aumentó.

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular de las soluciones de API, SNEDDS sin carga y SNEDDS con carga a $10 \mu\text{M}$.

API	Solución de API (%)	SNEDDS sin carga (%)	SNEDDS con carga (%)
DOX	57.93 ± 1.25	43.6 ± 1.62	7.60 ± 0.04
AD32	100 ± 1.44	91.39 ± 0.40	65.5 ± 0.40
MTX	99 ± 2.34	57.92 ± 2.09	29.84 ± 1.53
RB	98 ± 0.24	51.42 ± 1.15	17.62 ± 0.19
PpIX	65.33 ± 0.25	47.65 ± 0.81	20.81 ± 3.04

Se ha demostrado que PpIX, independiente del mecanismo de muerte celular por oxígeno singlete de la terapia fotodinámica, induce apoptosis en células de cáncer de colon humano mediante la inhibición de p53 (proteína supresora de tumores) mediante a la unión de su dominio *N*-terminal p53, de esta manera activa la muerte celular independiente y dependiente de p53, y por la inducción de la condensación de la cromatina. Se ha reportado que las concentraciones de PpIX y el número de células son factores clave para producir muerte celular o favorecer la proliferación, así como a altas concentraciones de PpIX se puede producir la expulsión de la molécula al medio (Eshghi et al. 2013; Sznarkowska et al. 2018).

6.5.2 Evaluación de la internalización celular *in vitro*

La internalización celular indica la capacidad de los API de atravesar la membrana celular y generar su mecanismo de acción. Características fisicoquímicas como bajo log P y el estado de ionización limitan el paso de los APIs. Por lo que se estudió si los SNEDDS son capaces de atravesar las membranas celulares y entregar los API de manera eficiente.

Se tiñeron las células HCT-116 con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) después de los tratamientos con solución y CTS@(API)SNEDDS. El DAPI se utiliza ampliamente para identificar células sanas ya que se une a los grupos de Adenina-Timina de la molécula de ADN, esta molécula es impermeable a las membranas, por lo que solo puede acceder en células comprometidas, sin embargo, el tinte puede ingresar a las células vivas cuando se usa a concentraciones altas, lo que seguramente sucedió, ya que se observó el DAPI tanto en células sanas como dañadas (Jiang et al. 2018).

Se identificó una mayor fluorescencia de DOX cargada en los SNEDDS, no se presentan cambios en la morfología celular, como condensación nuclear, fragmentación o contracción de la cromatina indicaciones de apoptosis (Figura 30a), lo que correspondió con los resultados de porcentaje de viabilidad celular.

Los valores a 1 μ M en la solución de DOX y CTS@(DOX)SNEDDS fueron de 82.87 ± 0.19 % y 89.718 ± 0.34 %, respectivamente (Figura 30b), no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, sin embargo, la pequeña diferencia en la

intensidad de fluorescencia es visible. A $10\mu\text{M}$ la solución de DOX tuvo un porcentaje de internalización de $33.58 \pm 1.84\%$ y CTS@(DOX)SNEDDS de $69.06 \pm 0.46\%$, valores significativamente diferentes ($p < 0.05$), los cuales corresponden con la viabilidad celular obtenida, se observó mayor porcentaje de muerte celular a $10\mu\text{M}$ en SNEDDS cargados que en la solución. También se identificó la posible inhibición de la Glucoproteína P (P-gp) gracias a los SNEDDS, ya que a mayor concentración de DOX el porcentaje de internalización fue menor, comportamiento significativamente diferente ($p < 0.05$) con DOX en solución, esto indica la posible expulsión del fármaco al medio.

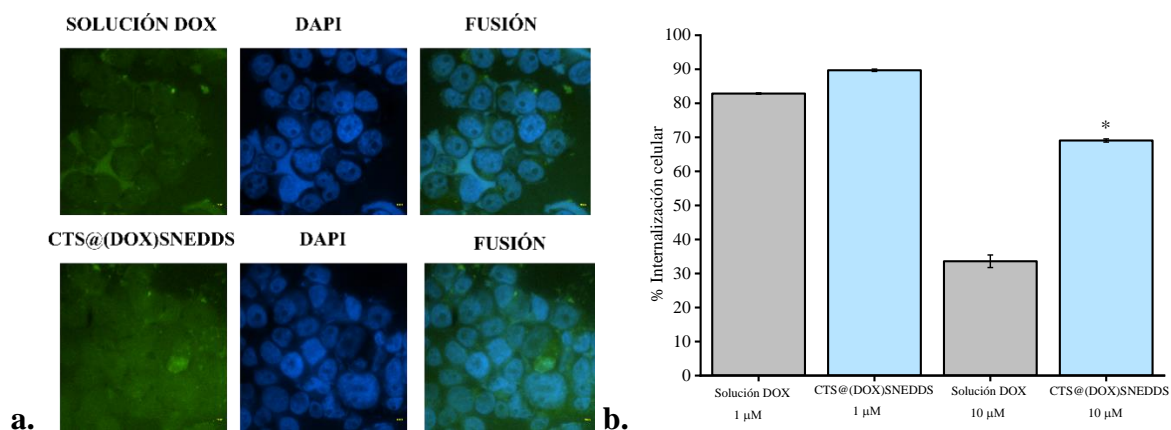


Figura 30. Diagramas de internalización en células HCT-116. **a.** fotografías de microscopia de fluorescencia tratados con la solución de DOX y CTS@(DOX)SNEDDS teñidos con DAPI, **b.** gráfica de porcentaje de internalización celular con tratamientos de solución de DOX y CTS@(DOX)SNEDDS a $1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$,*, diferencia significativa a $p < 0.05$.

Las propiedades descritas en los inhibidores de la P-gp son tener un log P mayor a 2.92, debe de tener más de 18 números de átomos, debe tener anillos aromáticos y ser capaces de formar interacciones hidrófobas con la proteína. Se ha demostrado que los tensioactivos tienen la capacidad de inhibir a la P-gp, las múltiples relaciones asociadas se basan principalmente en su valor HLB y CMC del tensioactivo, ya que pueden generar cambios en el acomodo del colesterol en la membrana celular y alteración la bicapa de fosfolípidos, lo que está relacionado con el funcionamiento de la P-gp (Apte 2010; Klepsch, Vasanthanathan, and Ecker 2014).

Tomaru, et al. observaron el efecto inhibitor dependiente de la dosis del Cremophor® EL, el máximo efecto inhibitor se evaluó en la región que el metabolismo del fármaco y la permeabilidad de la membrana no estaban saturados (Tomaru et al. 2015). En tejidos tumorales se ha visto que el incremento en la expresión de P-gp conlleva a la resistencia a múltiples fármacos, lo que limita las terapias contra el cáncer, por lo que el efecto inhibitor de los SNEDDS es un indicativo de la posible mejora en la terapia oral contra el cáncer.

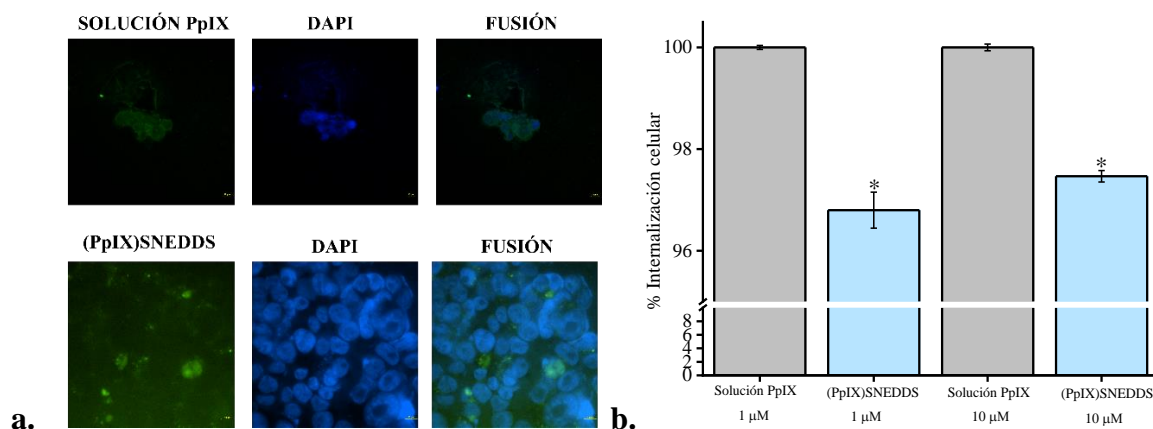


Figura 31. Diagramas de internalización en células HCT-116. **a.** fotografías de microscopía de fluorescencia tratados con la solución de PpIX y (PpIX)SNEDDS teñidos con DAPI, **b.** gráfica de porcentaje de internalización celular con tratamientos de solución de PpIX y (PpIX)SNEDDS a 1 μM y 10 μM, *, diferencia significativa a $p < 0.05$.

PpIX en solución presentó menor fluorescencia que CTS@(DOX)SNEDDS y también se observó muerte celular en la solución a 1 μM (Figura 31a), esto indicó la liberación controlada de los SNEDDS, por lo que causan menos daños a concentraciones bajas de PpIX.

Los resultados se relacionan con la viabilidad celular, en el cual la PpIX en solución a concentraciones bajas (1 a 8 μM) causan muerte celular y a concentraciones altas (10 μM) proliferación celular, y los SNEDDS cargados con PpIX tienen un efecto dependiente de la dosis, a dosis más altas mayor muerte celular. No se cuantificó PpIX en el medio (Figura 30b) por lo que en ambas concentraciones el porcentaje de internalización fue del 100 %, mientras que en los SNEDDS fue de 96.79 ± 0.35 % para 1 μM y 97.46 ± 0.11 % para 10 μM, en ambos fue mayor al 96 % por lo que también podría conferirse la inhibición de la

salida de la PpIX por tensioactivos, además del efecto sinérgico de los SNEDDS para acumularse y dañar células de cáncer.

6.8.3 Permeabilidad *ex vivo*

La barrera intestinal permite la absorción de nutrientes y evita el paso de sustancias dañinas mediante la regulación en las uniones estrechas, la integridad del tejido epitelial, incluidos enterocitos, células de Paneth y células caliciformes, y la mucosa que está compuesta de mucina y componentes del sistema inmunológico, como anticuerpos. La permeabilidad intestinal es el paso de moléculas desde la luz (apical) del intestino hacia el lado basolateral para su paso a través de los vasos sanguíneos o linfáticos (Schoultz and Keita 2020).

La membrana intestinal consta de varias capas y diferentes tipos de células, esto genera que moléculas hidrofílicas presenten baja permeabilidad debido que no pueden pasar las membranas del intestino delgado, y las moléculas lipofílicas pueden pasar más fácilmente, pero pueden precipitar en el medio acuoso de la luz del intestino, también las sustancias pueden degradarse al pH gástrico o debido a su estado de ionización no pueden atravesar las membranas celulares, todas estas barreras disminuyen la biodisponibilidad oral de los API. Es por ello que los desarrollos de sistemas que puedan pasar las membranas del intestino delgado junto con el API han ido en aumento.

En las fotografías se observó mayor intensidad de fluorescencia desde la capa mucosa, hacia el tejido epitelial, pasando por las criptas, la lámina propia, las capas submucosa, muscular y serosa con (RB)SNEDDS (Figura 32), esto indica el paso a través de las múltiples capas del intestino delgado gracias a los SNEDDS, también se pudo observar la retención de las nanopartículas en la mucosa, y la protección de los SNEDDS al rápido apagamiento de RB. Se identificó mayor permeabilidad en las primeras secciones del Intestino delgado (duodeno y yeyuno), se ha reportado que la permeabilidad de los SNEDDS en las siguientes secciones del intestino hasta el colon es muy similar, además de ser mayor que los API en solución (Cui, Zhao, et al. 2019; Yin et al. 2021).

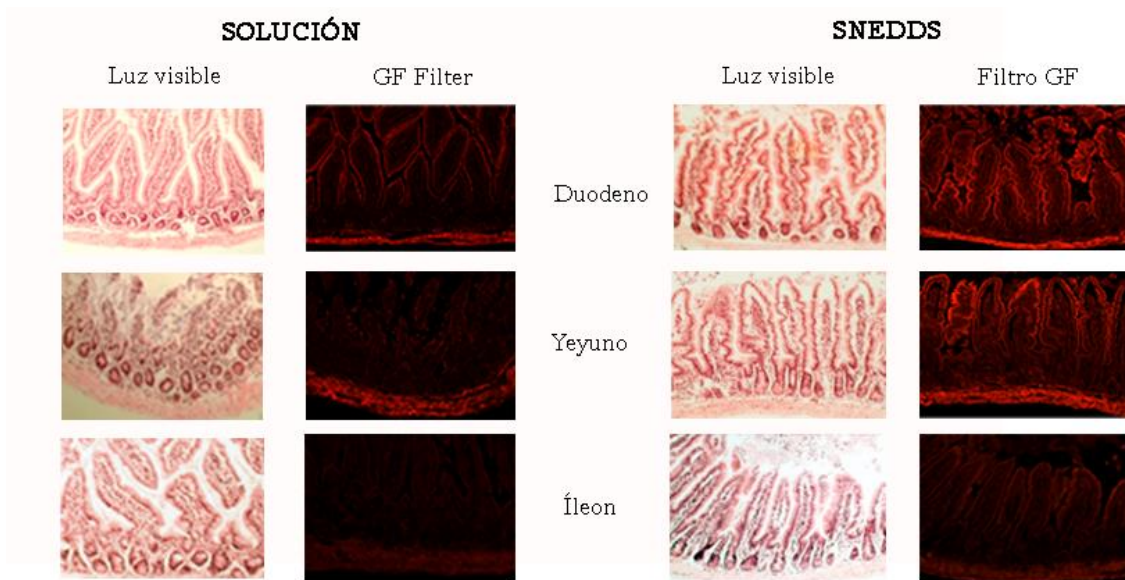


Figura 32. Fotos de la histología de las secciones del duodeno, yeyuno e íleon del intestino delgado de ratón bajo luz visible y fluorescencia después de ser tratados con RB en solución y (RB)SNEDDS.

Los SNEDDS demostraron ser capaces de atravesar las barreras biológicas del intestino delgado, esto puede deberse a múltiples factores, como el efecto sinérgico de los componentes presentes en la formulación, el efecto del tensioactivo al generar aberturas entre las uniones celulares, también puede disminuir la fuerza de unión de la mucosa al reducir la interacción entre las fibras de mucina y aumentar el tamaño de los poros de la mucosidad, a su gran poder de retención y bioadhesión, y a su reducido tamaño (<50 nm) que permite pasar fácilmente a través de la pared intestinal desde la mucosa hasta la capa muscular.

Se ha reportado que la profundidad de penetración dentro de la luz intestinal gracias a los SNEDDS es el doble que la solución del API, 30 μm para SNEDDS, y 15 μm para la solución, con tamaños de partícula de 92.5 ± 3.98 nm (Sandhu et al. 2015; Karavasili et al. 2020; Shrivastava et al. 2022).

Los diferentes mecanismos propuestos para el paso de las membranas de las células intestinales de los SNEDDS son variados, se ha reportado la absorción en los enterocitos por la formación de micelas mixtas procedentes de la lipólisis y la subsiguiente formación de

quilomicrones para su paso a sistema linfático, por difusión pasiva, endocitosis, paso a través de las células M de las placas de Peyer y por vía paracelular (paso a través de las uniones estrechas y los espacios intercelulares) (Cui, Zhang, et al. 2019; Ye et al. 2019).

RB en solución presentó fluorescencia más débil en el epitelio y en la capa mucosa, esto puede deberse a que el potencial de la membrana plasmática dentro del citoplasma representa una barrera menor a la entrada de cationes y iones híbridos (-30 a -60 mV), como las rodaminas (Mottram et al. 2012). RB es una molécula que puede atravesar las membranas de manera rápida, sin embargo, de esta manera no es posible ser utilizada como marcador, ya que los tintes fluorescentes no deben apagarse o eliminarse rápidamente si se pretende que representen comportamientos en las terapias al detectar las señales fluorescentes, y no puede administrarse mayor agente debido a la toxicidad que puede presentar (Zhu et al. 2019).

Capítulo 7. Conclusiones

El desarrollo de sistemas nanoparticulados lipídicos se basan en la incorporación de agentes terapéuticos con diferentes características fisicoquímicas como baja solubilidad, baja permeabilidad o fotosensibilidad, ya que estos nanosistemas permiten mantener al API en un estado mayormente disuelto, evitan su precipitación en el tracto gastrointestinal y mejoran su paso a través de los tejidos del intestino delgado.

Los SNEDDS son emulsiones simples de aceite en agua (O/W), y los CTS@SNEDDS son emulsiones multifásicas de agua/aceite/agua (W/O/W), que son capaces de transportar ARN (la carga de ARN no fue determinado para este trabajo de tesis), y los CTS@(API)SNEDDS que pueden cargar ingredientes farmacéuticos activos.

Los SNEDDS han demostrado ser sistemas que aumentan la biodisponibilidad oral de fármacos terapéuticos desafiantes, es por ello que el número de investigaciones basados en ellos ha tenido un gran crecimiento. En este proyecto se caracterizaron fisicoquímica y biológicamente SNEDDS, CTS@SNEDDS y CTS@(API)SNEDDS, las moléculas modelo fueron tres agentes citotóxicos utilizados ampliamente para quimioterapia (doxorrubicina, valrubicina y metotrexato), y dos moléculas fotosensibilizantes utilizadas en terapias fotodinámicas (rodamina B y protoporfirina IX), de esta última no se tienen reportes de ser cargadas en sistemas autoemulsionantes, por lo que este proyecto es el primer reporte de su desarrollo.

Se conocieron las eficiencias de encapsulación de DOX, AD32, MTX, RB y PpIX, los cuales se incorporaron en SNEDDS, la eficiencia de carga se identificó desde el 45% hasta el 98%. Se identificó que no existen interacciones entre los componentes y los API, así como la estructura cuasiesférica de las nanopartículas. Se observó el tamaño de partícula, el cual se mantuvo menor a los 30 nm, los SNEDDS tienen un índice de polidispersión menor a 0.5 y un potencial ζ de 20.5 mV, valores que han sido reportados como estables en este tipo de nanosistemas.

También se comprobó que los SNEDDS mantienen sus cualidades bajo diferentes condiciones de movimiento, temperatura y fluidos fisiológicos. Se conocieron las condiciones de almacenamiento de estos sistemas orales. Los SNEDDS mostraron una

liberación de los API mayor a pH 6.8 (intestino delgado) demostrando protección a pH 1.2 (tracto gastrointestinal), así como su capacidad para mantener al fármaco libre y disponible para su absorción.

Se observó en más de dos veces la muerte celular en CTS@SNEDDS con API que en la solución de API en células HCT-116, debido a su efecto sinérgico, en congruencia con los resultados de internalización celular (mayor muerte celular-mayor internalización celular). Se identificaron las concentraciones de SNEDDS con RB y PpIX para su aplicación para terapia fotodinámica ($< 4 \mu\text{M}$). Se observaron las imágenes de fluorescencia de los SNEDDS con carga y de las soluciones, así como su relación con los valores de internalización celular, también se observó el efecto de inhibición de la glucoproteína-P causada por los tensioactivos. Los SNEDDS mostraron mayor permeabilidad en el duodeno y yeyuno del intestino delgado en modelos murinos, y se identificó el paso de los SNEDDS desde la mucosa hasta la capa serosa.

La caracterización fisicoquímica de los SNEDDS formulados representan el primer paso de una larga cadena de investigaciones detalladas posteriores que permitirán el desarrollo de terapias orales contra el cáncer. Una forma de administración más cómoda para los pacientes.

Capítulo 8. Referencias

- AbouAitah, Khaled, Ahmed A. F. Soliman, Anna Swiderska-Sroda, Amr Nassrallah, Julita Smalc-Koziorowska, Stanislaw Gierlotka, and Witold Lojkowski. 2022. "Co-Delivery System of Curcumin and Colchicine Using Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles Promotes Anticancer and Apoptosis Effects." *Pharmaceutics* 14 (12): 2770. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122770>.
- Agabeigi, Reza, Seyed Hossein Rasta, Mohammad Rahmati-Yamchi, Roya Salehi, and Effat Alizadeh. 2020. "Novel Chemo-Photothermal Therapy in Breast Cancer Using Methotrexate-Loaded Folic Acid Conjugated Au@SiO₂ Nanoparticles." *Nanoscale Research Letters* 15 (1): 62. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-3295-1>.
- Ahmad, Mohammad, - Sahabjada, Juber Akhtar, Arshad Hussain, - Badaruddeen, Md Arshad, and Anuradha Mishra. 2017. "Development of a New Rutin Nanoemulsion and Its Application on Prostate Carcinoma PC3 Cell Line." *EXCLI Journal* 16: 810–23. <https://doi.org/10.17179/excli2016-668>.
- Ahmad, Usama, Juber Akhtar, Satya Prakash Singh, Badruddeen, Farhan Jalees Ahmad, Sahabjada Siddiqui, and Wahajuddin. 2018. "Silymarin Nanoemulsion against Human Hepatocellular Carcinoma: Development and Optimization." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46 (2): 231–41. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1324465>.
- Alavi, Mehran, and Mehrdad Hamidi. 2019. "Passive and Active Targeting in Cancer Therapy by Liposomes and Lipid Nanoparticles." *Drug Metabolism and Personalized Therapy* 34 (1). <https://doi.org/10.1515/dmpt-2018-0032>.
- Alshahrani, Saad M., Abdullah S. Alshetaili, Ahmed Alalawi, Bader B. Alsulays, Md. Khalid Anwer, Ramadan Al-Shdefat, Faisal Imam, and Faiyaz Shakeel. 2018. "Anticancer Efficacy of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Sunitinib Malate." *AAPS PharmSciTech* 19 (1): 123–33. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0826-x>.
- Apte, Shireesh. 2010. "Selecting Surfactants for the Maximum Inhibition of the Activity of the Multi Drug Resistance Efflux Pump Transporter, P-Glycoprotein: Conceptual Development." *J. Excipients and Food Chem.* 1 (3): 51–59.
- Arnould, Amandine, Fanny Caputo, Maria Bacia, Isabelle Texier, Marie Escude, Delphine Boutry, Aurelien Auger, Romain Soulas, and Jean-Francois Damlencourt. 2018. "Contrast Enhancement for Lipid NanoParticles (LNPs) Characterization Using Transmission Electron Microscopy (TEM)." *Microscopy and Microanalysis* 24 (S1): 314–15. <https://doi.org/10.1017/S1431927618002064>.
- Ashfaq, Mehran, Shahid Shah, Akhtar Rasool, Muhammad Hanif, Hafeez Ullah Khan, Ahmed Khames, Mohamed A. Abdelgawad, et al. 2022. "Enhancement of the Solubility and Bioavailability of Pitavastatin through a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)." *Pharmaceutics* 14 (3): 482. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030482>.
- Aviral, Jain, Jain Abhisek, Gulbake Arvind, Hurkat Pooja, and K. Jain Sanjay. 2011. "Solid Tumors:

- A Review.” *Int J Pharm Pharm Sci* 3 (5): 45–51.
- Barrett-Lee, P.J., J.M. Dixon, C. Farrell, A. Jones, R. Leonard, N. Murray, C. Palmieri, C.J. Plummer, A. Stanley, and M.W. Verrill. 2009. “Expert Opinion on the Use of Anthracyclines in Patients with Advanced Breast Cancer at Cardiac Risk.” *Annals of Oncology* 20 (5): 816–27. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn728>.
- Basoglu, Harun, Mehmet Dincer Bilgin, and Mustafa Muammer Demir. 2016. “Protoporphyrin IX-Loaded Magnetoliposomes as a Potential Drug Delivery System for Photodynamic Therapy: Fabrication, Characterization and in Vitro Study.” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 13 (March): 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.12.010>.
- Benival, Derajram M., and Padma V. Devarajan. 2012. “Lipomer of Doxorubicin Hydrochloride for Enhanced Oral Bioavailability.” *International Journal of Pharmaceutics* 423 (2): 554–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.035>.
- . 2015. “In Situ Lipidization as a New Approach for the Design of a Self Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) of Doxorubicin Hydrochloride for Oral Administration.” *Journal of Biomedical Nanotechnology* 11 (5): 913–22. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1978>.
- Benson, Sven P., and Jürgen Pleiss. 2014. “Molecular Dynamics Simulations of Self-Emulsifying Drug-Delivery Systems (SEDDS): Influence of Excipients on Droplet Nanostructure and Drug Localization.” *Langmuir* 30 (28): 8471–80. <https://doi.org/10.1021/la501143z>.
- Bernkop-Schnürch, Andreas, and Aamir Jalil. 2018. “Do Drug Release Studies from SEDDS Make Any Sense?” *Journal of Controlled Release* 271 (February): 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.027>.
- Borkar, Nrupa, René Holm, Mingshi Yang, Anette Müllertz, and Huiling Mu. 2016. “In Vivo Evaluation of Lipid-Based Formulations for Oral Delivery of Apomorphine and Its Diester Prodrugs.” *International Journal of Pharmaceutics* 513 (1–2): 211–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.024>.
- Bourkaib, Nadia, Jianping Zhou, Jing Yao, Zhengjie Fang, and Omar Mezghrani. 2013. “Combination of β -Cyclodextrin Inclusion Complex and Self-Microemulsifying Drug Delivery System for Photostability and Enhanced Oral Bioavailability of Methotrexate: Novel Technique.” *Drug Development and Industrial Pharmacy* 39 (6): 918–27. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.718785>.
- Brunton L, Chabner B, Knollmann B. 2019. *Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica*. 13e ed. McGraw-Hill.
- Bu, Pengli, Yue Ji, Silpa Narayanan, Damon Dalrymple, Xingguo Cheng, and Abu T.M. Serajuddin. 2017. “Assessment of Cell Viability and Permeation Enhancement in Presence of Lipid-Based Self-Emulsifying Drug Delivery Systems Using Caco-2 Cell Model: Polysorbate 80 as the Surfactant.” *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (March): 350–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.018>.
- Cardinale, Daniela, Fabiani Iacopo, and Carlo Maria Cipolla. 2020. “Cardiotoxicity of

- Anthracyclines.” *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 7 (March). <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00026>.
- Castro, Inéz, Eduardo Echarri, Francisco Ferriols, Ana García, Julio Martínez, María Oliveras, and Emilia de Puig. 2006. *Medicamentos Citostáticos*. 4ta ed. España: RAÍZ, TG.
- Charoenputtakun, Ponwanit, Boonnada Pamornpathomkul, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, and Tanasait Ngawhirunpat. 2014. “Terpene Compositated Lipid Nanoparticles for Enhanced Dermal Delivery of All-Trans-Retinoic Acids.” *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 37 (7): 1139–48. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00015>.
- Chen, Mei-chun, Tian-tian Liu, Jie-ping Wang, Yan-ping Chen, Qing-xi Chen, Yu-jing Zhu, and Bo Liu. 2020. “Strong Inhibitory Activities and Action Modes of Lipopeptides on Lipase.” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35 (1): 897–905. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1734798>.
- Christiansen, Anne, Thomas Backensfeld, and Werner Weitschies. 2010. “Effects of Non-Ionic Surfactants on in Vitro Triglyceride Digestion and Their Susceptibility to Digestion by Pancreatic Enzymes.” *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41 (2): 376–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.07.005>.
- Coutinho, Ana J., Sofia A. Costa Lima, Carlos M.M. Afonso, and Salette Reis. 2020. “Mucoadhesive and PH Responsive Fucoidan-Chitosan Nanoparticles for the Oral Delivery of Methotrexate.” *International Journal of Biological Macromolecules* 158 (September): 180–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.233>.
- Craparo, Emanuela Fabiola, Teresa Musumeci, Angela Bonaccorso, Rosalia Pellitteri, Alessia Romeo, Irina Naletova, Lorena Maria Cucci, Gennara Cavallaro, and Cristina Satriano. 2021. “MPEG-PLGA Nanoparticles Labelled with Loaded or Conjugated Rhodamine-B for Potential Nose-to-Brain Delivery.” *Pharmaceutics* 13 (9): 1508. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091508>.
- Cueto, Yeimy L., Wilfrido L. Ortega, and Reinaldo G. Sotomayor. 2019. “Sistemas de Entrega de Fármacos Autoemulsificables: Una Plataforma de Desarrollo Alternativa Para La Industria Farmacéutica Colombiana.” *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 48 (2): 260–313. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n2.82696>.
- Cui, Weiping, Shenwu Zhang, Hanqing Zhao, Cong Luo, Bingjun Sun, Zhenbao Li, Mengchi Sun, Qing Ye, Jin Sun, and Zhonggui He. 2019. “Formulating a Single Thioether-Bridged Oleate Prodrug into a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System to Facilitate Oral Absorption of Docetaxel.” *Biomaterials Science* 7 (3): 1117–31. <https://doi.org/10.1039/C8BM00947C>.
- Cui, Weiping, Hanqing Zhao, Chen Wang, Yao Chen, Cong Luo, Shenwu Zhang, Bingjun Sun, and Zhonggui He. 2019. “Co-Encapsulation of Docetaxel and Cyclosporin A into SNEDDS to Promote Oral Cancer Chemotherapy.” *Drug Delivery* 26 (1): 542–50. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1616237>.
- Daeihamed, Marjan, Azadeh Haeri, Seyed Nasser Ostad, Masoud Faghieh Akhlaghi, and Simin Dadashzadeh. 2017. “Doxorubicin-Loaded Liposomes: Enhancing the Oral Bioavailability by

- Modulation of Physicochemical Characteristics.” *Nanomedicine* 12 (10): 1187–1202. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0007>.
- Davies, Kellie S., Michelle K. Linder, Mark W. Kryman, and Michael R. Detty. 2016. “Extended Rhodamine Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer Cells.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24 (17): 3908–17. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.033>.
- Dou, Yao-Xing, Jiang-Tao Zhou, Tong-Tong Wang, Yan-Feng Huang, Ping Chen, You-Liang Xie, Zhi-Xiu Lin, Jian-Shen Gao, Zi-Ren Su, and Hui-Fang Zeng. 2018. “Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Bruceine D: A New Approach for Anti-Ulcerative Colitis.” *International Journal of Nanomedicine* Volume 13 (September): 5887–5907. <https://doi.org/10.2147/IJN.S174146>.
- Edwardson, Derek, Rashmi Narendrula, Simon Chewchuk, Kyle Mispel-Beyer, Jonathan Mapletoft, and Amadeo Parissenti. 2015. “Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines.” *Current Drug Metabolism* 16 (6): 412–26. <https://doi.org/10.2174/1389200216888150915112039>.
- El-Kattan, Ayman, and Manthena Varm. 2012. “Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability.” In *Topics on Drug Metabolism*. InTech. <https://doi.org/10.5772/31087>.
- Eshghi, Hossein, Ameneh Sazgarnia, Mohammad Rahimizadeh, Neda Attaran, Mehdi Bakavoli, and Samaneh Soudmand. 2013. “Protoporphyrin IX–Gold Nanoparticle Conjugates as an Efficient Photosensitizer in Cervical Cancer Therapy.” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 10 (3): 304–12. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.02.003>.
- Figueira, Tiago N., Marco M. Domingues, Françoise Illien, Iris Cadima-Couto, Toni Todorovski, David Andreu, Sandrine Sagan, Miguel A. R. B. Castanho, Astrid Walrant, and Ana Salomé Veiga. 2020. “Enfuvirtide-Protoporphyrin IX Dual-Loaded Liposomes: In Vitro Evidence of Synergy against HIV-1 Entry into Cells.” *ACS Infectious Diseases* 6 (2): 224–36. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00285>.
- Garg, Varun, Puneet Kaur, Sachin Kumar Singh, Bimlesh Kumar, Palak Bawa, Monica Gulati, and Ankit Kumar Yadav. 2017. “Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems for Oral Delivery of Polypeptide-k: Formulation, Optimization, in-Vitro and in-Vivo Antidiabetic Evaluation.” *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 109 (November): 297–315. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.08.022>.
- González-Fernández, Yolanda, Ederne Imbuluzqueta, Marta Zalacain, Faustino Mollinedo, Ana Patiño-García, and María J. Blanco-Prieto. 2017. “Doxorubicin and Edelfosine Lipid Nanoparticles Are Effective Acting Synergistically against Drug-Resistant Osteosarcoma Cancer Cells.” *Cancer Letters* 388 (March): 262–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.012>.
- Gürsoy, R. Neslihan, and Özge Çevik. 2014. “Design, Characterization and in Vitro Evaluation of SMEDDS Containing an Anticancer Peptide, Linear LyP-1.” *Pharmaceutical Development and Technology* 19 (4): 486–90. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.795170>.
- Gutiérrez Fuentes, R., J. F. Sánchez Ramírez, J. L. Jiménez Pérez, J. A. Pescador Rojas, E. Ramón-

- Gallegos, and A. Cruz-Orea. 2007. "Thermal Diffusivity Determination of Protoporphyrin IX Solution Mixed with Gold Metallic Nanoparticles." *International Journal of Thermophysics* 28 (3): 1048–55. <https://doi.org/10.1007/s10765-007-0225-8>.
- Hauge, E., H. Christiansen, C. Rosada, E. de Darkó, T.N. Dam, and K. Stenderup. 2012. "Topical Valrubicin Application Reduces Skin Inflammation in Murine Models." *British Journal of Dermatology* 167 (2): 288–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10964.x>.
- Hoseini, Mehdi, Ameneh Sazgarnia, and Soheil Sharifi. 2019. "Effect of Environment on Protoporphyrin IX: Absorbance, Fluorescence and Nonlinear Optical Properties." *Journal of Fluorescence* 29 (3): 531–40. <https://doi.org/10.1007/s10895-019-02366-4>.
- Hoshyar, Nazanin, Samantha Gray, Hongbin Han, and Gang Bao. 2016. "The Effect of Nanoparticle Size on in Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction." *Nanomedicine* 11 (6): 673–92. <https://doi.org/10.2217/nmm.16.5>.
- Hosseini, Seyed Mostafa, Roghayeh Abbasalipourkabir, Farid Azizi Jalilian, Sara Soleimani Asl, Abbas Farmany, Ghodrattollah Roshanaei, and Mohammad Reza Arabestani. 2019. "Doxycycline-Encapsulated Solid Lipid Nanoparticles as Promising Tool against *Brucella Melitensis* Enclosed in Macrophage: A Pharmacodynamics Study on J774A.1 Cell Line." *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 8 (1): 62. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0504-8>.
- Hou, Jian, E. Sun, Zhen-Hai Zhang, Jing Wang, Lei Yang, Li Cui, Zhong-Cheng Ke, Xiao-Bin Tan, Xiao-Bin Jia, and Huixia Lv. 2017. "Improved Oral Absorption and Anti-Lung Cancer Activity of Paclitaxel-Loaded Mixed Micelles." *Drug Delivery* 24 (1): 261–69. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1245370>.
- Hu, Shiqi, Haiping Jiang, Jianqiang Zhu, Jinqiang Wang, Shunhao Wang, Jianbin Tang, Zhuxian Zhou, Sijin Liu, and Youqing Shen. 2021. "Tumor-Specific Fluorescence Activation of Rhodamine Isothiocyanate Derivatives." *Journal of Controlled Release* 330 (February): 842–50. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.057>.
- Igualada Quintanilla, Jesús, Gregorio Romero Candel, and Francisco Tejada Cifuentes. 2016. "Metotrexato: Toxicidad Pulmonar, Hepática y Hematológica." *Rev Clin Med Fam* 9 (3): 159–66.
- Incecayir, T. 2015. "The Effects of Surfactants on the Solubility and Dissolution Profiles of a Poorly Water-Soluble Basic Drug, Carvedilol." *Pharmazie* 70 (12): 784–90. <https://doi.org/10.1691/ph.2015.5081>.
- Jeught, Kevin Van der, Han-Chen Xu, Yu-Jing Li, Xiong-Bin Lu, and Guang Ji. 2018. "Drug Resistance and New Therapies in Colorectal Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 24 (34): 3834–48. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i34.3834>.
- Jiang, Feng, Jin-Yong Zhou, Dan Zhang, Ming-Hao Liu, and Yu-Gen Chen. 2018. "Artesunate Induces Apoptosis and Autophagy in HCT116 Colon Cancer Cells, and Autophagy Inhibition Enhances the Artesunate-induced Apoptosis." *International Journal of Molecular Medicine*, June. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3712>.

- Johnson, Rebecca, Nirupama Sabnis, Xiangle Sun, Ruhani Ahluwalia, and Andras Lacko. 2017. "SR-B1-Targeted Nanodelivery of Anti-Cancer Agents: A Promising New Approach to Treat Triple-Negative Breast Cancer." *Breast Cancer: Targets and Therapy* Volume 9 (June): 383–92. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S131038>.
- Kamberi, Marika, and Thu-Ngoc Tran. 2012. "UV-Visible Spectroscopy as an Alternative to Liquid Chromatography for Determination of Everolimus in Surfactant-Containing Dissolution Media: A Useful Approach Based on Solid-Phase Extraction." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 70 (November): 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.05.038>.
- Karasulu, H. Yeşim, Bülent Karabulut, Erdem Göker, Tamer Güneri, and Franz Gabor. 2007. "Controlled Release of Methotrexate from W/O Microemulsion and Its In Vitro Antitumor Activity." *Drug Delivery* 14 (4): 225–33. <https://doi.org/10.1080/10717540601067760>.
- Karavasili, Christina, Ioannis I. Andreadis, Maria P. Tsantarliotou, Ioannis A. Taitzoglou, Paschalina Chatzopoulou, Dimitrios Katsantonis, Constantinos K. Zacharis, Catherine Markopoulou, and Dimitrios G. Fatouros. 2020. "Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) Containing Rice Bran Oil for Enhanced Fenofibrate Oral Delivery: In Vitro Digestion, Ex Vivo Permeability, and In Vivo Bioavailability Studies." *AAPS PharmSciTech* 21 (6): 208. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01765-2>.
- Kazi, Mohsin, Ahmad A. Shahba, Saad Alrashoud, Majed Alwadei, Abdelrahman Y. Sherif, and Fars K. Alanazi. 2020. "Bioactive Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (Bio-SNEDDS) for Combined Oral Delivery of Curcumin and Piperine." *Molecules* 25 (7): 1703. <https://doi.org/10.3390/molecules25071703>.
- Khan, Arshad Ali, Akhtar Atiya, Safia Akhtar, Yogesh Yadav, Kamal A. Qureshi, Mariusz Jaremko, and Syed Mahmood. 2022. "Optimization of a Cefuroxime Axetil-Loaded Liquid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System: Enhanced Solubility, Dissolution and Caco-2 Cell Uptake." *Pharmaceutics* 14 (4): 772. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040772>.
- Kiening, Martin, and Norbert Lange. 2022. "A Recap of Heme Metabolism towards Understanding Protoporphyrin IX Selectivity in Cancer Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (14): 7974. <https://doi.org/10.3390/ijms23147974>.
- Kim, Dong Shik, Jung Hyun Cho, Jong Hyuck Park, Jung Suk Kim, Eon Soo Song, Jaewook Kwon, Bhupendra Raj Giri, et al. 2019. "Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) for Improved Oral Delivery and Photostability of Methotrexate." *International Journal of Nanomedicine* Volume 14 (July): 4949–60. <https://doi.org/10.2147/IJN.S211014>.
- Kim, Ji-Eon, In-Soo Yoon, Hyun-Jong Cho, Dong-Hwan Kim, Young-Hee Choi, and Dae-Duk Kim. 2014. "Emulsion-Based Colloidal Nanosystems for Oral Delivery of Doxorubicin: Improved Intestinal Paracellular Absorption and Alleviated Cardiotoxicity." *International Journal of Pharmaceutics* 464 (1–2): 117–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.016>.
- Klepsch, Freya, Poongavanam Vasanthanathan, and Gerhard F. Ecker. 2014. "Ligand and Structure-Based Classification Models for Prediction of P-Glycoprotein Inhibitors." *Journal of Chemical Information and Modeling* 54 (1): 218–29. <https://doi.org/10.1021/ci400289j>.

- Krstić, Marko, Đorđe Medarević, Jelena Đuriš, and Svetlana Ibrić. 2018. "Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) and Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS) as Lipid Nanocarriers for Improving Dissolution Rate and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs." In *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, 473–508. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813687-4.00012-8>.
- Lacko, Andras, Sabnis, Nair, Israel, and McConathy. 2012. "Enhanced Solubility and Functionality of Valrubicin (AD-32) against Cancer Cells upon Encapsulation into Biocompatible Nanoparticles." *International Journal of Nanomedicine*, February, 975. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28029>.
- Lancheros, Ruth J., José Ángel Beleño, Carlos Arturo Guerrero, and Rubén Darío Godoy-Silva. 2014. "Producción de Nanopartículas de PLGA Por El Método de Emulsión y Evaporación Para Encapsular N-Acetilcisteína (NAC)." *Universitas Scientiarum* 19 (2). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-2.pnpm>.
- Lee, Dong Joon, Vinayak Juvekar, Hyo Won Lee, Eun Seo Kim, Choong-Kyun Noh, Sung Jae Shin, and Hwan Myung Kim. 2021. "Cancer-Targeted Azo Dye for Two-Photon Photodynamic Therapy in Human Colon Tissue." *Analytical Chemistry* 93 (50): 16821–27. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03429>.
- Leichner, Christina, Randi Angela Baus, Max Jelkmann, Melanie Plautz, Jan Barthelmes, Sarah Dünnhaupt, and Andreas Bernkop-Schnürch. 2019. "In Vitro Evaluation of a Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) for Nasal Administration of Dimenhydrinate." *Drug Delivery and Translational Research* 9 (5): 945–55. <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00634-1>.
- Li, Fei, Jinyang Shen, Jianping Bi, Hongli Tian, Ye Jin, Yuan Wang, Xiaolin Yang, Zhonglin Yang, and Junping Kou. 2016. "Preparation and Evaluation of a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System Loaded with Akebia Saponin D–Phospholipid Complex." *International Journal of Nanomedicine* Volume 11 (September): 4919–29. <https://doi.org/10.2147/IJN.S108765>.
- Li, Haonan, Qiang Luo, Hu Zhang, Xuelei Ma, Zhongwei Gu, Qiyong Gong, and Kui Luo. 2023. "Nanomedicine Embraces Cancer Radio-Immunotherapy: Mechanism, Design, Recent Advances, and Clinical Translation." *Chemical Society Reviews* 52 (1): 47–96. <https://doi.org/10.1039/D2CS00437B>.
- Llera-Rojas, Viridiana Gisela, Alicia Del Real L., Néstor Mendoza-Muñoz, Luz María Melgoza-Contreras, and David Quintanar-Guerrero. 2017. "Feasibility of Obtaining in Situ Nanocapsules through Modified Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems. A New Manufacturing Approach for Oral Route Administration." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 43 (6): 925–31. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1285308>.
- Mabrouk, Mokhtar M., Nouran A. Hamed, and Fotouh R. Mansour. 2021. "Spectroscopic Methods for Determination of Critical Micelle Concentrations of Surfactants; a Comprehensive Review." *Applied Spectroscopy Reviews*, July, 1–29. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1955702>.
- Macaşoi, Ioana, Ioana Pavel, Alina Moacă, Ştefana Avram, Vlad David, Dorina Coricovac, Alexandra Mioc, et al. 2020. "Mechanistic Investigations of Antitumor Activity of a Rhodamine

- B-oleanolic Acid Derivative Bioconjugate.” *Oncology Reports* 44 (3): 1169–83. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7666>.
- Mahmood, Arshad, and Andreas Bernkop-Schnürch. 2019. “SEDDS: A Game Changing Approach for the Oral Administration of Hydrophilic Macromolecular Drugs.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 142 (March): 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.001>.
- Mohd Izham, Mira Nadiyah, Yazmin Hussin, Muhammad Nazirul Mubin Aziz, Swee Keong Yeap, Heshu Sulaiman Rahman, Mas Jaffri Masarudin, Nurul Elyani Mohamad, Rasedee Abdullah, and Noorjahan Banu Alitheen. 2019. “Preparation and Characterization of Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System Loaded with Citraland Its Antiproliferative Effect on Colorectal Cells In Vitro.” *Nanomaterials* 9 (7): 1028. <https://doi.org/10.3390/nano9071028>.
- Morales, Aideé. 2022. “Desarrollo y Caracterización de Un Sistema Auto-Nanoemulsionante de Liberación de SiRNA.” Universidad Autónoma del Estado de México. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/137918>.
- Mottram, Laurie F, Safiyah Forbes, Brian D Ackley, and Blake R Peterson. 2012. “Hydrophobic Analogues of Rhodamine B and Rhodamine 101: Potent Fluorescent Probes of Mitochondria in Living *C. Elegans*.” *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 8 (December): 2156–65. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.243>.
- Mu, Huiling, René Holm, and Anette Müllertz. 2013. “Lipid-Based Formulations for Oral Administration of Poorly Water-Soluble Drugs.” *International Journal of Pharmaceutics* 453 (1): 215–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.054>.
- Mujica Álvarez, Javiera, Silvia Matiacevich, and Rubén Bustos. 2019. “Estudios de Las Condiciones Óptimas Para Maximizar Estabilidad Física y Oxidativa de Un Ingrediente Vitamínico Nanoencapsulado.” *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología* 12 (23): 1. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.23.67653>.
- Murakami, Teruo, Erik Bodor, and Nicholas Bodor. 2020. “Modulation of Expression/Function of Intestinal P-Glycoprotein under Disease States.” *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 16 (1): 59–78. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1701653>.
- Musmade, Kranti P., Praful B. Deshpande, Prashant B. Musmade, M. Naseer Maliyakkal, A. Ranjith Kumar, M. Sreenivasa Reddy, and N. Udupa. 2014. “Methotrexate-Loaded Biodegradable Nanoparticles: Preparation, Characterization and Evaluation of Its Cytotoxic Potential against U-343 MGa Human Neuronal Glioblastoma Cells.” *Bulletin of Materials Science* 37 (4): 945–51. <https://doi.org/10.1007/s12034-014-0030-5>.
- Nasr, Ali, Ahmed Gardouh, and Mamdouh Ghorab. 2016. “Novel Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (S-SNEDDS) for Oral Delivery of Olmesartan Medoxomil: Design, Formulation, Pharmacokinetic and Bioavailability Evaluation.” *Pharmaceutics* 8 (3): 20. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030020>.
- Onrust, Susan V., and Harriet M. Lamb. 1999. “Valrubicin.” *Drugs & Aging* 15 (1): 69–75. <https://doi.org/10.2165/00002512-199915010-00006>.

- Patra, Jayanta Kumar, Gitishree Das, Leonardo Fernandes Fraceto, Estefania Vangelie Ramos Campos, Maria del Pilar Rodriguez-Torres, Laura Susana Acosta-Torres, Luis Armando Diaz-Torres, et al. 2018. "Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects." *Journal of Nanobiotechnology* 16 (1): 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- Peltier, Sandra, Jean Michel Oger, Frédéric Lagarce, William Couet, and Jean Pierre Benoît. 2006. "Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability after Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules." *Pharmaceutical Research* 23 (6): 1243–50. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0022-2>.
- Przybylo, Magdalena, Daria Glogocka, Jerzy W. Dobrucki, Kaja Fraczowska, Halina Podbielska, Marta Kopaczynska, Tomasz Borowik, and Marek Langner. 2016. "The Cellular Internalization of Liposome Encapsulated Protoporphyrin IX by HeLa Cells." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (March): 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.01.028>.
- Qin, Zhenmiao, Feng Chen, Demei Chen, Yong Wang, Yinfeng Tan, and Junfeng Ban. 2019. "Transdermal Permeability of Triamcinolone Acetonide Lipid Nanoparticles." *International Journal of Nanomedicine* Volume 14 (April): 2485–95. <https://doi.org/10.2147/IJN.S195769>.
- Quino, Israel, Ramos, Oswaldo y GuisbertElvir. 2007. "DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION INSTRUMENTAL (LDI) Y LIMITE DE CUANTIFICACION INSTRUMENTAL (LCI) EN ELEMENTOS TRAZA DE AGUA SUBTERRANEA." *Revista Boliviana de Química* 24: 53–57. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339669010>.
- Rout, Bishakh, Chi-Hsien Liu, and Wei-Chi Wu. 2017. "Photosensitizer in Lipid Nanoparticle: A Nano-Scaled Approach to Antibacterial Function." *Scientific Reports* 7 (1): 7892. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07444-w>.
- Salazar-Mendiguchía, Joel, José González-Costello, Josep Roca, Albert Ariza-Solé, Nicolás Manito, and Ángel Cequier. 2014. "Anthracycline-Mediated Cardiomyopathy: Basic Molecular Knowledge for the Cardiologist." *Archivos de Cardiología de México* 84 (3): 218–23. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2013.08.006>.
- Salvo, Eloísa, Carmen Alonso, Cristina Pardo, Maite Casado, and María Vicario. 2015. "Función Barrera Intestinal y Su Implicación En Enfermedades Digestivas." *Rev Esp Enferm Dig* 107 (11): 686–96.
- Sandhu, Premjeet Singh, Sarwar Beg, Farhad Mehta, Bhupinder Singh, and Piyush Trivedi. 2015. "Novel Dietary Lipid-Based Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Paclitaxel with p-Gp Inhibitor: Implications on Cytotoxicity and Biopharmaceutical Performance." *Expert Opinion on Drug Delivery* 12 (11): 1809–22. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1060219>.
- Schoultz, Ida, and Åsa V. Keita. 2020. "The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability." *Cells* 9 (8): 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>.
- Serbian, Immo, Sophie Hoenke, Oliver Kraft, and René Csuk. 2020. "Ester and Amide Derivatives of Rhodamine B Exert Cytotoxic Effects on Different Human Tumor Cell Lines." *Medicinal*

- Chemistry Research* 29 (9): 1655–61. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02591-8>.
- Shah, Sunil, Rahul Chib, Sangram Raut, Jaclyn Bermudez, Nirupama Sabnis, Divya Duggal, Joseph D. Kimball, Andras G. Lacko, Zygmunt Gryczynski, and Ignacy Gryczynski. 2016. “Photophysical Characterization of Anticancer Drug Valrubicin in RHDN Nanoparticles and Its Use as an Imaging Agent.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 155 (February): 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.12.007>.
- Sharma, Pranav, Kamran Zargar-Shoshtari, and Wade J. Sexton. 2015. “Valrubicin in Refractory Non-Muscle Invasive Bladder Cancer.” *Expert Review of Anticancer Therapy* 15 (12): 1379–87. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1115350>.
- Shrivastava, Nupur, Ankit Parikh, Rikeshwer Prasad Dewangan, Largee Biswas, Anita Kamra Verma, Saurabh Mittal, Javed Ali, Sanjay Garg, and Sanjula Baboota. 2022. “Solid Self-Nano Emulsifying Nanoplatfrom Loaded with Tamoxifen and Resveratrol for Treatment of Breast Cancer.” *Pharmaceutics* 14 (7): 1486. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071486>.
- Silva, Darlan Barbosa da, Carolina Loureiro da Silva, Nathalia Nossi Davanzo, Rodrigo da Silva Souza, Rodrigo José Correa, Antonio Claudio Tedesco, and Maria Bernadete Riemma Pierre. 2021. “Protoporphyrin IX (PpIX) Loaded PLGA Nanoparticles for Topical Photodynamic Therapy of Melanoma Cells.” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 35 (September): 102317. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102317>.
- Suchaoin, Wongsakorn, and Andreas Bernkop-Schnürch. 2017. “Nanocarriers Protecting toward an Intestinal Pre-Uptake Metabolism.” *Nanomedicine* 12 (3): 255–69. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0331>.
- Sun, Jingyu, Yunhe Zhou, Yajuan Su, Sheng Li, Jingmei Dong, Qing He, Yang Cao, Tianfeng Lu, and Lili Qin. 2019. “Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticle Supplementation Ameliorates Physical Fatigue by Improving Mitochondrial Quality Control.” *Crystals* 9 (11): 559. <https://doi.org/10.3390/cryst9110559>.
- Sznarkowska, Alicja, Anna Kostecka, Anna Kawiak, Pilar Acedo, Mattia Lion, Alberto Inga, and Joanna Zawacka-Pankau. 2018. “Reactivation of TAp73 Tumor Suppressor by Protoporphyrin IX, a Metabolite of Aminolevulinic Acid, Induces Apoptosis in TP53-Deficient Cancer Cells.” *Cell Division* 13 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s13008-018-0043-3>.
- Tarsitano, Martine, Maria Chiara Cristiano, Antonia Mancuso, Antonella Barone, Daniele Torella, and Donatella Paolino. 2022. “Lipid-Based Formulations Containing Labrafil M2125-CS: A Deep Investigation on Nanosystem Stability.” *Nanomanufacturing* 2 (1): 41–52. <https://doi.org/10.3390/nanomanufacturing2010003>.
- Tibaquira, JE, J Moran, T Otanicar, and JD Posner. 2007. “Mediciones De Potential Zeta De Microspferas De Vidrio En Glicol De Etileno Y En Soluciones Tampon De Fosfato.” *Scientia et Technica* 3 (35): 219–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.22517/23447214.5399>.
- Tiwari, Sandip B., and Mansoor M. Amiji. 2006. “Improved Oral Delivery of Paclitaxel Following Administration in Nanoemulsion Formulations.” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6 (9): 3215–21. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.440>.

- Tomaru, Atsuko, Mariko Takeda-Morishita, Kazuya Maeda, Hirokazu Banba, Kozo Takayama, Yuji Kumagai, Hiroyuki Kusuhara, and Yuichi Sugiyama. 2015. "Effects of Cremophor EL on the Absorption of Orally Administered Saquinavir and Fexofenadine in Healthy Subjects." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 30 (3): 221–26. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2015.01.002>.
- Topal, Gizem Rüya, Mária Mészáros, Gergő Porkoláb, Anikó Szecskó, Tamás Ferenc Polgár, László Siklós, Mária A. Deli, Szilvia Veszeka, and Asuman Bozkir. 2020. "ApoE-Targeting Increases the Transfer of Solid Lipid Nanoparticles with Donepezil Cargo across a Culture Model of the Blood–Brain Barrier." *Pharmaceutics* 13 (1): 38. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010038>.
- Trujillo-Nolasco, R. Maydelid, Enrique Morales-Avila, Blanca E. Ocampo-García, Guillermina Ferro-Flores, Brenda V. Gibbens-Bandala, Alondra Escudero-Castellanos, and Keila Isaac-Olive. 2019. "Preparation and in Vitro Evaluation of Radiolabeled HA-PLGA Nanoparticles as Novel MTX Delivery System for Local Treatment of Rheumatoid Arthritis." *Materials Science and Engineering: C* 103 (October): 109766. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109766>.
- Tseng, Mei-Hui, Cho-Chun Hu, and Tai-Chia Chiu. 2019. "A Fluorescence Turn-on Probe for Sensing Thiodicarb Using Rhodamine B Functionalized Gold Nanoparticles." *Dyes and Pigments* 171 (December): 107674. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107674>.
- Usmani, Afreen, Anuradha Mishra, Md Arshad, and Asif Jafri. 2019. "Development and Evaluation of Doxorubicin Self Nanoemulsifying Drug Delivery System with Nigella Sativa Oil against Human Hepatocellular Carcinoma." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 47 (1): 933–44. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1581791>.
- Vadarevu, Hemapriyadarshini, Ridhima Juneja, Zachary Lyles, and Juan L. Vivero-Escoto. 2021. "Light-Activated Protoporphyrin IX-Based Polysilsesquioxane Nanoparticles Induce Ferroptosis in Melanoma Cells." *Nanomaterials* 11 (9): 2324. <https://doi.org/10.3390/nano11092324>.
- Vega-Rojas, Lineth Juliana, Ivan Luzardo-Ocampo, Juan Mosqueda, Dulce María Palmerín-Carreño, Antonio Escobedo-Reyes, Alejandro Blanco-Labra, Konisgmar Escobar-García, and Teresa García-Gasca. 2021. "Bioaccessibility and In Vitro Intestinal Permeability of a Recombinant Lectin from Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius*) Using the Everted Intestine Assay." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (3): 1049. <https://doi.org/10.3390/ijms22031049>.
- Wang, Xiao-Hui, Xue-Qiao Chen, Hong-Shang Peng, Xiao-Fei Wei, Xiao-Juan Wang, Kun Cheng, Yuan-An Liu, and Wei Yang. 2020. "Facile Synthesis of Polypyrrole–Rhodamine B Nanoparticles for Self-Monitored Photothermal Therapy of Cancer Cells." *Journal of Materials Chemistry B* 8 (5): 1033–39. <https://doi.org/10.1039/C9TB02274K>.
- Williams, Hywel D., Philip Sassene, Karen Kleberg, Jean-Claude Bakala-N’Goma, Marilyn Calderone, Vincent Jannin, Annabel Igonin, et al. 2012. "Toward the Establishment of Standardized In Vitro Tests for Lipid-Based Formulations, Part 1: Method Parameterization and Comparison of In Vitro Digestion Profiles Across a Range of Representative Formulations."

Journal of Pharmaceutical Sciences 101 (9): 3360–80. <https://doi.org/10.1002/jps.23205>.

- Wong, Kar En, Siew Ching Ngai, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee, Bey-Hing Goh, and Lay-Hong Chuah. 2019. “Curcumin Nanof formulations for Colorectal Cancer: A Review.” *Frontiers in Pharmacology* 10 (March). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00152>.
- Ye, Jingyi, Huiyi Wu, Chuanli Huang, Wanting Lin, Caifeng Zhang, Bei Huang, Banyu Lu, Hongyu Xu, Xiaoling Li, and Xiaoying Long. 2019. “Comparisons of in Vitro Fick’s First Law, Lipolysis, and in Vivo Rat Models for Oral Absorption on BCS II Drugs in SNEDDS.” *International Journal of Nanomedicine* Volume 14 (July): 5623–36. <https://doi.org/10.2147/IJN.S203911>.
- Yin, Hua-Feng, Chun-Ming Yin, Ting Ouyang, Shu-Ding Sun, Wei-Guo Chen, Xiao-Lin Yang, Xin He, and Chun-Feng Zhang. 2021. “Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Genkwanin: A Novel Approach for Anti-Colitis-Associated Colorectal Cancer.” *Drug Design, Development and Therapy* Volume 15 (February): 557–76. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S292417>.
- Yoshioka, Ema, Vipin Shankar Chelakkot, Maria Licursi, Suzette G Rutihinda, Jayoti Som, Leena Derwish, Justin J King, et al. 2018. “Enhancement of Cancer-Specific Protoporphyrin IX Fluorescence by Targeting Oncogenic Ras/MEK Pathway.” *Theranostics* 8 (8): 2134–46. <https://doi.org/10.7150/thno.22641>.
- Zhu, Yan-Hua, Ji-Long Wang, Hou-Bing Zhang, Malik Ihsanullah Khan, Xiao-Jiao Du, and Jun Wang. 2019. “Incorporation of a Rhodamine B Conjugated Polymer for Nanoparticle Trafficking Both in Vitro and in Vivo.” *Biomaterials Science* 7 (5): 1933–39. <https://doi.org/10.1039/C9BM00032A>.