

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Estructuras supramoleculares de niclosamida con β -ciclodextrina y polietilenglicol para el aumento de su solubilidad.

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

LIC. SEBASTIÁN ENRIQUE OROZCO TORRES

TUTORA: DRA. YARELI ROJAS AGUIRRE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX., abril 2024.



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Estructuras supramoleculares de niclosamida con β -ciclodextrina y polietilenglicol para el aumento de su solubilidad.

T E S I S PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

LIC. SEBASTIÁN ENRIQUE OROZCO TORRES



Jurado asignado

Presidenta	Dra. María Josefa Bernad Bernad
Vocal	Dra. Patricia Guadarrama Acosta
Vocal	Dra. María del Rosario Moya Hernández
Vocal	Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Secretaria	Dra. Norma Rodriguez Laguna

Sitio donde se realizó el trabajo

Grupo de Investigación en Materiales Supramoleculares y Nanomedicina (SupraMatLab). Laboratorio C-105, Departamento de Polímeros, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutora:

Dra. Yareli Rojas Aguirre

Sustenante:

Lic. Sebastián Enrique Orozco Torres

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser más que una institución educativa, sino mi segunda casa durante ocho años de formación.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por brindarme la oportunidad de crecer académicamente y desarrollar mis capacidades.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por su resplado a lo largo de mi trayectoria en el posgrado, por la beca de maestría (CVU 1177385), que me permitió dedicarme de lleno a mis estudios y avanzar en mi formación académica.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación (PAPIIT-IAT-IA200821), por su contribución al desarrollo de mi proyecto.

A la Dra. Yareli Rojas Aguirre por su invaluable orientación y guía durante la elaboración de mi investigación.

A mi jurado asignado; Dra. María Josefa Bernad Bernad (Facultad de Química, UNAM), Dra. Patricia Guadarrama Acosta (Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM), Dra. María del Rosario Moya Hernández (FES Cuautitlán, UNAM), Dr. Sergio Alcalá Alcalá (Universidad Autónoma del Estado de Morelos) y a la Dra. Norma Rodríguez Laguna (FES Cuautitlán, UNAM), que contribuyeron con sus comentarios y sugerencias en la evaluación de mi trabajo, su retroalimentación fue invaluable para enriquecer mi investigación.

No puedo dejar de reconocer el esfuerzo y dedicación de todos los docentes que me impartieron asignaturas durante mi etapa de maestría.

Al Dr. José Luis López Cervantes y al Dr. Arturo Antonio García Figueroa por el apoyo en las mediciones de tensión superficial y de densidad realizadas en colaboración con nuestro grupo de investigación.

A la M en C. Adriana Tejeda Cruz por su contribución con los difractogramas de rayos X de polvos, que fueron fundamentales para mi trabajo. Así como a la Ing. Karla Eriseth Reyes Morales por su valiosa asistencia técnica en la realización de los análisis térmicos.

A mis amigos del Laboratorio de Materiales Supramoleculares, a la M en C. Ana Sarét Ortega Galindo, al Q. Héctor Luis Valdés Negrín, a la c. Dra. Miguelina Beatríz Martínez Aguilera y a la Ing. María de los Ángeles Pérez Rodríguez, les agradezco sinceramente por su apoyo durante la maestría y sus valiosas contribuciones a este proyecto.

Finalmente, agradezco a mi familia y amigos por su apoyo a distancia durante mi estadía en la CDMX. Su aliento y ánimo fueron pilares fundamentales en este camino académico.

Dedicatorias

A Aida.

A Alan y Luis Manuel.

A Querétaro.

Contenido

Resumen	10
1. Marco teórico	11
1.1. La niclosamida	11
1.1.1. Reposicionamiento de la niclosamida	12
1.1.1.1. Niclosamida como potencial agente antiviral	12
1.1.1.2. Niclosamida como potencial agente antimicrobiano	13
1.1.1.3. Niclosamida como potencial agente anticancerígeno	13
1.1.2. Caracteristicas estructurales de niclosamida	14
1.2. Las ciclodextrinas y los complejos de inclusión	15
1.2.1. Las ciclodextrinas	15
1.2.2. Los complejos de inclusión	17
1.2.2.1. Estudio de solubilidad de fases	18
1.2.3. Los complejos de inclusion ternarios	19
2. Hipótesis	23
3. Objetivos	23
3.1. General	23
2 1 Específicos	
	24
4. Desarrollo experimental	25
4.1. Reactivos	25
4.2. Métodos generales	25
4.2.1. Preparación de las disoluciones amortiguadoras	25
4.2.2. Método analítico para la cuantificación de niclosamida	25
4.2.2.2. Cuantificación de niclosamida por espectroscopía UV	25
4.3. Determinación de la solubilidad intrínseca de niclosamida	26
4.4. Estudio de solubilidad de fases	26
4.5. Estudio de solubilidad de fases bajo la adición de polietilenglicol	27
4.6. Complejo de inclusión binario β-ciclodextrina/niclosamida	28
4.6.1. Determinación estequiométrica del complejo de inclusión binario	28
4.6.2. Obtención de los complejos de inclusión binarios	29
4.6.3. Preparación de la mezcla física binaria	30
4.6.4. Caracterizaciones por espectroscopía UV	30
4.6.4.1. Caracterización en solución de los complejo de inclusión binarios	30
4.6.4.2. Cuantificación de niciosamida en los complejos de inclusión binarios	31
4.6.5. Caracterización en estado solido de los complejos de inclusión binarios y la mezcia física binaria	51 21
4.6.5.2. Calorimetría diferencial de barrido	31
4.6.5.3. Análisis termogravimétrico	31
4.6.5.4. Difracción de rayos X de polvos	32
4.7. Complejo de inclusión ternario β-ciclodextrina/niclosamida/polietilenglicol	32
4.7.1. Obtención de los complejos de inclusión ternarios	32
4.7.2. Preparación de la mezcla física ternaria	34

4.7.3. Caracterización en solución	34
4.7.3.1. Espectroscopia de absorcion UV	34 24
4.8. Determinación del cambio de solubilidad de niclosamida en sistemas con exceso de β-	
ciclodextrina y polietilenglicol	34
4.8.1. Mezcla β-ciclodextrina/niclosamida	34
4.8.2. Mezda β-ciclodextrina/niclosamida/polietilenglicol	35
	30
4.9. Mediciones de tension superficial	37
5.Resultados y discusión	37
5.1. Solubilidad intrínseca de niclosamida	37
5.2. Estudio de solubilidad de fases	38
5.2.1. Sistema β-ciclodextrina y niclosamida o complejo de inclusión binario	38
5.3. Complejo de inclusión binario	41
5.3.1. Determinación de la estequiometría del complejo de inclusión binario	41
5.3.2. Caracterización por espectroscopía UV	42
5.3.2.1. Caracterización en solución de los complejos de inclusión binarios	42
5.3.2.2. Cuantificación niclosamida en los complejos de inclusión binarios	43
5.3.3. Caracterización en estado sólido	44
5.3.3.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier	44
5.3.3.2. Calorimetría diferencial de barrido	46
5.3.3. Análisis termogravimétrico	47
5.3.3.4. Difracción de rayos X de polvos	49
5.4. Complejos de inclusión ternarios	50
5.4.1. Estudio de solubilidad de fases en presencia de polietilenglicol	50
5.4.1.1. Constantes de estabilidad aparente	52
5.4.1.2. Solubilidad β-ciclodextrina/niclosamida en presencia de polietilenglicol	53
5.4.2. Aspecto visual de los complejos de inclusión ternarios	54
5.4.3. Cuantificación niclosamida en los complejos de inclusión ternarios	55
5.4.4. Interacciones moleculares entre β-ciclodextrina, niclosamida y polietilenglicol	55
6.4.4.1. CIT 1: βciclodextrina/polietilenglicol/niclosamida en mezcia EtUH/H ₂ U	56
5.4.4.2. CIT 2: pciclodextrina/polietilenglicol/niclosamida en H ₂ O	
5.4.4.5. CIT 5. periodextrina/niclosamida/polietilenglicol en H_2O	50 50
5.4.4.4. Cri 4. percodextima/necosanida/poneciengicor en m ₂ 0	
5.4.6. Caracterización en estado sólido complejo de inclusión ternario	01 62
5.4.6.1 Espectrosconía Infrarroia por Transformada de Fourier	62
5.4.6.2. Difracción de ravos X de polyos	
5.4.6.3. Calorimetría diferencial de barrido	65
5.4.6.4. Análisis termogravimétrico	66
5.5. Solubilidad de niclosamida en sistemas con exceso de β-ciclodextrina y polietilenglicol	67
5.5.1. Efecto de los excesos de β-ciclodextrina y polietilenglicol en la solubilidad de niclosamida en H ₂ C) 69
5.5.2. Efecto de los excesos de β-ciclodextrina y polietilenglicol en la solubilidad de niclosamida en PBS	5 71
5.5.3. Efecto de los excesos de β -ciclodextrina y polietilenglicol en la solubilidad de niclosamida en TBE	73
5.6. Mediciones de tensión superficial	77
5.6.1. Sistema polietilenglicol	77
5.6.2. Sistema β-ciclodextrina/niclosamida	79

5.6.3. Sistema polietilenglicol/niclosamida	
6. Conclusiones	
7. Bibliografía	
8. Anexos	94

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de NCL 11
Figura 2. Equilibrio solubilidad NCL
Figura 3. Interacciones inter e intramoleculares de NCL
Figura 4. Disposición espacial de la CD16
Figura 5. Representación de la molécula de β CD17
Figura 6. Formación de complejos de inclusión17
Figura 7. Perfiles de solubilidad de fases
Figura 8. Representación complejo de inclusión ternario
Figura 9. Diagrama de solubilidad de fases de β CD y NCL
Figura 10. Gráficos de VC del CIB $\beta\text{CD/NCL}.$
Figura 11. Espectros de absorción UV CIBs 42
Figura 12. Competencia EDTA-NCL en la interacción con βCD
Figura 13. Espectros infrarrojo CIB
Figura 14. Termogramas de flujo de calor CIB
Figura 15. Termogramas de pérdida de peso CIB 47
Figura 16. Difractogramas de rayos X CIB 49
Figura 17. Diagrama de solubilidad de fases en presencia de PEG
Figura 18. Apariencias de las formulaciones ternarias
Figura 19. Representación de posibles interacciones en CIT 1
Figura 20. Representación de posibles interacciones en CIT 2
Figura 21. Representación de posibles interacciones en CIT 3
Figura 22. Representación de posibles interacciones en CIT 4
Figura 23. Espectros de absorción UV CIT 61
Figura 24. Espectros infrarrojo CIT63
Figura 25. Difractogramas de rayos X CIT64
Figura 26. Termogramas de flujo de calor CIT65
Figura 27. Termogramas de pérdida de peso CIT 66

Figura 28. Cambio de solubilidad de NCL en sistemas con exceso en H_2O	9
Figura 29. Cambio de solubilidad de NCL en sistemas con exceso en PBS7	1
Figura 30. Cambio de solubilidad de NCL en sistemas con exceso en TBE7	3
Figura 31. Comparación cambio de solubilidad de NCL en sistemas con exceso en los tres medios. 7	5
Figura 32. Curvas de actividad superficial de PEG7	7
Figura 33. Representación del sistema PEG7	8
Figura 34. Curvas de actividad superficial del CIB βCD/NCL7	9
Figura 35. Curvas de actividad superficial del complejo PEG/NCL8	0
Figura 36. Representación del sistema PEG/NCL 8	1
Figura 37. Curvas de actividad superficial del CIT βCD/NCL/PEG8	2
Figura 38. Representación del sistema βCD/NCL/PEG8	3
Figura 39. Comparación mediciones de tensión superficial8	3
Figura S1. Diagrama de predominio de especies de NCL9	4
Figura S2. Curvas de densidad en función de la concentración de los sistemas	5

Índice de tablas

Tabla 1. Formulaciones de CITs con PEG
Tabla 2. Concentraciones de PEG empleadas para el estudio de solubilidad de fases 27
Tabla 3. Cantidades empleadas de cada disolución para el ensayo de VC 29
Tabla 4. CIBs formulados
Tabla 5. CITs formulados. 32
Tabla 6. Cantidad de β CD empleada para la mezcla β CD/NCL
Tabla 7. Cantidad de PEG empleada para la mezcla βCD/NCL/PEG
Tabla 8. Valores de solubilidad de NCL reportados. 37
Tabla 9. Resultados del estudio de solubilidad de fases de β CD y NCL
Tabla 10. Análisis de regresión lineal del diagrama de solubilidad de fases β CD y NCL 40
Tabla 11. Valores de $k_{1:1}\text{CIBs}$
Tabla 12. Cantidad de NCL en CIBs βCD/NCL
Tabla 13. Resultados del estudio de solubilidad de fases de β CD y NCL en presencia de PEG 50
Tabla 14. Análisis de regresión lineal del diagrama de solubilidad de fases β CD, NCL y PEG51
Tabla 15. Cantidad de NCL en CITs βCD/NCL/PEG55
Tabla S1. Valores de solubilidad de NCL obtenidos en H ₂ O 98
Tabla S2. Valores de solubilidad de NCL obtenidos en PBS 99
Tabla S3. Valores de solubilidad de NCL obtenidos en TBE 100

Resumen

La niclosamida ha surgido como un candidato prometedor en la búsqueda de fármacos de reposicionamiento, especialmente en aplicaciones antivirales, antibacterianas y anticancerígenas. Sin embargo, su aplicación se ve obstaculizada por su baja solubilidad, lo que limita su biodisponibilidad y, por lo tanto, su potencial terapéutico. En este contexto, se ha explorado la formación de complejos de inclusión como una estrategia para mejorar la solubilidad de la niclosamida.

En particular, la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas permite aumentar la solubilidad acuosa de fármacos insolubles, debido a su estructura molecular única, es decir su superficie hidrofílica y su cavidad hidrofóbica. Esta estructura confiere a las ciclodextrinas la capacidad de encapsular moléculas hidrofóbicas en su interior, creando un entorno más hidrofílico para el fármaco. Asimismo, se ha estudiado que agregar un tercer componente en los complejos de inclusión, da lugar a complejos de inclusión ternarios, que a comparación de las formulaciones CD/fármaco, aumentan la solubilidad y estabilidad de los complejos. Entre los compuestos que se han utilizado como agentes ternarios se encuentran los polímeros, ácidos carboxílicos, aminoácidos, metales o bases orgánicas.

En ese contexto, en el presente trabajo se estudió la formación de complejos de inclusión entre β -ciclodextrina y niclosamida para mejorar la solubilidad acuosa del fármaco. Se encontró que ocurre la formación del complejo de inclusión β -ciclodextrina/niclosamida, sin embargo, la cantidad de niclosamida complejada fue baja. Debido a la ineficiencia del complejo formado, se exploró la formación de un complejo de inclusión ternario en el que se agregó polietilenglicol como tercer componente. Para el complejo ternario se exploraron distintas estequiometrías para elegir aquella en la que se observara el mayor cambio en la solubilidad de niclosamida. De igual forma se exploró orden de adición de los componentes en la preparación del complejo ternario y se estudió el efecto del pH considerando la influencia de la ionización del fármaco en su solubilidad. Para el complejo ternario se encontró que, el orden de adición con el que se logró recuperar la mayor de niclosamida fue β -ciclodextrina, luego niclosamida y por último polietilenglicol. Se encontró que al aumento de pH ocasionó un mayor aumento de solubilidad.

Este trabajo proporciona una comprensión más profunda de cómo la formación de complejos de inclusión y complejos de inclusión ternarios puede mejorar la solubilidad de la niclosamida, lo que tiene importantes implicaciones para su aplicación clínica. Estos hallazgos podrían allanar el camino para el desarrollo de nuevas formulaciones de niclosamida con una mayor eficacia terapéutica y una mejor biodisponibilidad, lo que podría beneficiar a pacientes en una amplia gama de condiciones médicas.

1. Marco teórico

1.1. La niclosamida

La niclosamida (NCL) cuyo nombre por la IUPAC es 5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)-2hidroxibenzamida (Figura 1), surgió como un fármaco para tratar la teniasis humana en 1961 bajo el nombre comercial de Yomesan en Alemania Occidental (Pearson, 1985). Su uso como fármaco antihelmíntico fue aprobado en los Estados Unidos por la FDA en 1982 (Chen et al., 2018a).



Figura 1. Estructura química de NCL.

La NCL un fármaco de clase II según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés), lo cual significa que NCL presenta una baja solubilidad y alta permeabilidad (Dahan et al., 2009). En cuanto a la solubilidad, la NCL presenta dificultades para disolverse de una forma eficiente en los fluidos biológicos. Se han reportado valores de solubilidad acuosa en el rango de 6-13 µg/mL (Pardhi, 2017; Van Tonder, 2004). Su solubilidad en otros disolventes es de 6 mg/mL en EtOH y de 14 mg/mL en DMSO (Al-Hadiya, 2005). Por otro lado, una alta permeabilidad implicaría que podría atravesar fácilmente membranas biológicas, sin embargo, la absorción de NCL se ve limitada por su baja solubilidad, lo cual resulta en su actividad antiparasitaria en el intestino (Barbosa et al., 2019).

La solubilidad acuosa de NCL se describe mediante el siguiente equilibrio químico (Figura 2.), en el que las formas protonadas y disociadas de NCL corresponden a las concentraciones molares en equilibrio de ambas especies.



Figura 2. Equilibrio de la solubilidad de NCL en agua.

De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach se llega a la relación, en la que el valor donde existen cantidades equimolares de ambas especies corresponde al valor de la constante de acidez (Ka) de la NCL, el cual es de 7.58 x10⁻⁷ mol/L, el valor de pKa de NCL es de 7.12 (Needham, 2022).

1.1.1. Reposicionamiento de la niclosamida

El reposicionamiento de fármacos, es el proceso de identificar y desarrollar nuevas aplicaciones terapéuticas para fármacos aprobados existentes para su uso en otras condiciones médicas. En lugar de desarrollar un nuevo fármaco, el reposicionamiento busca aprovechar el conocimiento existente sobre la seguridad, la farmacocinética y, en algunos casos, el mecanismo de acción de los fármacos ya aprobados para tratar una enfermedad diferente (Pushpakom et al., 2018).

Dentro del contexto del reposicionamiento de fármacos, la NCL ha vuelto a ser objeto de estudio, de manera que se han investigado aplicaciones potenciales distintas a su actividad antiparasitaria, y ha mostrado respuesta preventiva, inhibitoria y anti proliferativa en líneas celulares relacionadas a infecciones virales, enfermedades microbianas y cancerígenas, respectivamente (MacDonald et al., 2006).

1.1.1.1. NCL como potencial agente antiviral

La NCL ha demostrado una amplia actividad antiviral contra diversas categorías de virus. Se ha investigado la actividad de NCL en los coronavirus, como el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV), el Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV) y el Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2), virus responsable de la enfermedad COVID-19. Se encontró que la actividad antiviral de NCL en SARS-CoV-2 es mediante la inhibición de la proliferación del virus al inducir su autofagia (Jin et al., 2022).

La NCL también ha presentado actividad antiviral en los preflavivirus transmitidos por mosquitos como el Virus del ZIKA, el Virus del Dengue (DENV) o el Virus de la Fiebre Amarilla (YFV). Con ZIKA se mostró que la NCL inhibió la activación de la caspasa-3 inducida por el ZIKA y ocasionó la muerte de las células huésped infectadas a concentraciones submicromolares (Shamim et al., 2021).

Otros virus en los que NCL ha presentado actividad antiviral son el virus de la hepatitis C (HCV), el virus del Ébola (EBOV) y el adenovirus humano (HAdV). Se ha estudiado la actividad de NCL en

el HCV y se observó que el fármaco inhibe la replicación del HCV mediante la modulación del proceso celular del huésped (Xu et al., 2020).

1.1.1.2. Niclosamida como potencial agente antimicrobiano

La NCL ha mostrado una actividad antimicrobiana significativa contra una amplia variedad de bacterias patógenas como *Mycobacterium tuberculosis, Bacillus anthracis* y *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), así como *Helicobacter pylor* (Tharmalingam, 2018). Lo que sugiere su potencial utilidad como tratamiento para infecciones resistentes a los antibióticos convencionales . En el caso de la tuberculosis, la NCL ha demostrado inhibir el crecimiento el *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria responsable de esta enfermedad (Chen et al., 2018b). La NCL también ha mostrado proteger las células expuestas a la toxina letal del ántrax, producida por la bacteria *Bacillus anthracis*. Uno de los posibles mecanismos de acción de la NCL podría ser la acidificación de los endosomas (Zhu et al., 2009).

En el caso del SARM, la NCL ha presentado actividad bacteriostática, es decir, inhibe el crecimiento de esta bacteria. Estudios han demostrado que la NCL prolonga la supervivencia de nemátodos infectados con SARM y también inhibe el crecimiento de otras bacterias grampositivas, como *Enterococcus faecium* (Kadri et al., 2018).

1.1.1.3. Niclosamida como potencial agente anticancerígeno

Se ha reportado que la NCL exhibe efectos inhibitorios sobre diversas vías de señalización intracelular, muchas de las cuales están asociadas con el desarrollo del cáncer. Esta característica la convierte en un potencial agente anticancerígeno, (Y. Li et al., 2014). Por ejemplo, la NCL inhibe la proliferación celular y la transición epitelial-mesenquimal en el caso del carcinoma adrenocortical. La NCL inhibe la vía de señalización Wnt/β-catenina sobreexpresada en cáncer de colon y de mama (Chen et al., 2018b). En el caso del cáncer de mama, además, suprime la señalización mTORC1. En el cáncer de ovario y osteosarcoma, así como en el cáncer de próstata, la NCL también inhibe la viabilidad celular (Naqvi et al., 2017).

La capacidad de NCL para inhibir múltiples vías de señalización intracelular relacionadas con el cáncer, la hacen un potencial candidato anticancerígeno. En contraste con los quimioterapéuticos comerciales, que al ser agentes citotóxicos afectan tanto a células cancerosas como a células sanas, la NCL actúa sobre vías específicas, lo que podría reducir los efectos adversos. Además, al ser un fármaco existente, su reposicionamiento podría ofrecer un tratamiento más económico y accesible que el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos.

A pesar de la actividad de la NCL, es primordial tener en cuenta que su insolubilidad es el principal obstáculo por vencer para reposicionar al fármaco como posible agente antiviral, antimicrobiano o anticancerígeno. De manera que incrementar su solubilidad acuosa, potencialmente mejoraría su perfil farmacocinético.

1.1.2. Características estructurales de niclosamida

La NCL presenta una estructura molecular que favorece una conformación casi plana y rígida debido a una serie de interacciones intermoleculares e intramoleculares. En primer lugar, la conformación casi plana del fármaco se debe a que la molécula se encuentra bloqueada a través de un puente de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno del grupo hidroxilo (-ÖH) y el hidrógeno del grupo amida (-NH) (Figura 3. – A) (Sanphui et al., 2012).

Entre las moléculas de NCL se forman puentes de hidrógeno intermoleculares entre el oxígeno del carbonilo (= \ddot{O}) de la amida y el hidrógeno del grupo hidroxilo (- $\ddot{O}H$), de manera que las moléculas de NCL se conectan a lo largo de un eje (Figura 3. – B). Además, las moléculas de NCL se estabilizan mediante interacciones dipolo-dipolo entre los grupos Cl y NO₂, como consecuencia de la carga negativa del cloro y la ligera carga positiva del nitro por la polaridad del enlace N-O.

Las moléculas de NCL también se estabilizan mediante las interacciones entre anillos aromáticos atribuidas a un apilamiento π - π , lo que favorece la formación de cadenas moleculares en capas (Figura 3. – C) (Vuai et al., 2021).



Figura 3. Interacciones de NCL. A) intramoleculares. B, C) intermoleculares.

La insolubilidad de la NCL en agua se atribuye a su estructura molecular. A pesar de que las moléculas de agua pueden establecer interacciones con los grupos funcionales presentes en la

NCL, como los grupos OH y NO₂, las interacciones inter e intramoleculares entre las propias moléculas de NCL son más fuertes y estables, lo que favorece la formación de una estructura molecular compacta y ordenada (Barbosa et al., 2019).

Se han desarrollado diversas técnicas que han marcado una diferencia significativa para hacer frente al desafío planteado por la insolubilidad de los fármacos (Jatwani et al., 2012). Las técnicas utilizadas para superar la baja solubilidad de los fármacos se dividen en dos grupos; el primero corresponde a las técnicas de modificación en el pH del medio, formación de sales, cosolvencia y cocristalización; el segundo engloba las técnicas de modificación física, como lo es la reducción del tamaño de partícula, la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas, el uso de agentes tensoactivos, u otros enfoques más avanzados, como la utilización de micelas, nanopartículas o nanopartículas lipídicas, que amplían aún más las posibilidades para abordar la baja solubilidad de los fármacos (Kolhe & Chipade, 2012). Estas técnicas han demostrado ser eficaces en mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de un gran número de fármacos, lo que da lugar a nuevas posibilidades en el campo de la investigación farmacéutica (Vemula et al., 2010).

No es la excepción, ya que se han explorado diversas técnicas para aumentar su solubilidad. Por ejemplo, la encapsulación de NCL en nanopartículas poliméricas (Misra et al., 2015), el uso de acarreadores de sílica mesoporosa cargados con NCL (Pardhi et al., 2017), la preparación de una dispersión sólida amorfa de NCL con un copolímero PVP-co-VA (Jara et al., 2021), la preparación de nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con NCL (Rehman et al., 2018), la formación de cocristales de NCL (Sanphui et al., 2012), la formación de complejos de inclusión de NCL con hidroxipropil-β-ciclodextrina (Lodagekar et al., 2019), entre otros. La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas resulta una estrategia viable, relativamente simple, económica, ampliamente descrita y cuyo potencial sigue siendo necesario estudiar.

1.2. Las ciclodextrinas y los complejos de inclusión

1.2.1. Las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son una familia de oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de glucopiranosa unidas de forma covalente por enlaces glucosídicos a-1,4. Estos compuestos moleculares adoptan una forma de cono truncado debido a que sus unidades glucopiranosa tienen una conformación de silla ⁴C₁ (Szejtli, 1998), lo que ocasiona que los grupos hidroxilos (OH) primarios y secundarios se posicionen en bordes opuestos de la molécula. El borde en el que se ubican los grupos -OH secundarios es ligeramente más amplio, lo que resulta en la forma de cono truncado (Parmar et al., 2018). La presencia de los grupos -OH confiere a la superficie de las CDs un carácter hidrofílico a diferencia de su cavidad cuyo microambiente es hidrofóbico (Figura 4).



Figura 4. Representación de una CD y su disposición espacial en forma de cono truncado.

Las CDs varían en tamaño dependiendo del número de unidades de glucopiranosa que las componen. El número de glucopiranosas en el ciclo puede ser 6, 7 u 8, y se clasifican en aCD, β CD y γ CD, respectivamente. El diámetro de la cavidad de aCD es 5.0 Å, el de β CD es de 6.5 Å y el de γ CD es 8.0 Å. Como resultado de la naturaleza de su cavidad, estas moléculas pueden fungir como contenedores moleculares ya que tienen la capacidad de formar complejos de inclusión (CIs), los cuales son compuestos que se caracterizan por favorecer interacciones de tipo huésped-anfitrión (Davis & Brewster, 2004).

La cavidad de la CD a emplear debe ser afín a la molécula huésped. Es necesario considerar aspectos como su forma y tamaño para que la CD pueda albergar a la entidad, de manera que la interacción no esté impedida y que la molécula huésped pueda entrar sin limitaciones estéricas. La β CD tiene una cavidad de tamaño intermedio, lo que la hace más versátil para formar CIs con una amplia gama de fármacos de diferentes tamaños y formas (Szente et al., 2018). En la Figura 5 se representa la conformación y disposición espacial de la β CD con sus dimensiones.



1.2.2. Los complejos de inclusión

Los CIs CD/fármaco son asociaciones moleculares formadas entre la CD (molécula anfitriona) y el fármaco (molécula huésped) con un equilibrio dado por la constante de estabilidad aparente ($k_{1:1}$). Para que ocurra la formación del complejo, el fármaco se debe alojar en el interior de la cavidad de la CD (Figura 6). La formación de estos complejos es resultado de interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas (Loftsson et al., 2007).





El valor de esta constante $k_{1:1}$ indica la afinidad del fármaco por la cavidad de la CD. Mientras mayor sea su valor, mayor será la estabilidad del CI (Cheirsilp & Rakmai, 2017a). La $k_{1:1}$ se puede obtener al medir una propiedad particular del complejo en función de las concentraciones de fármaco y CD (Davis & Brewster, 2004).

1.2.2.1. Estudio de solubilidad de fases

Para determinar el tipo de CI formado y el valor de su $k_{1:1}$, se lleva a cabo un estudio de solubilidad de fases. Con el cual, a partir del valor de la pendiente del perfil de solubilidad del CI CD/fármaco, en conjunto con el valor de la solubilidad intrínseca del fármaco (S_0), la constante se puede determinar con la siguiente ecuación:

$$k_{1:1} = \frac{\text{pendiente}}{S_0(1-\text{pendiente})}$$
(1)

El estudio de solubilidad de fases desarrollado por Higuchi y Connors en 1965 es el enfoque más empleado para explorar el fenómeno de complejación (Challa et al., 2005). El estudio indica la dependencia de las fases de la concentración del fármaco disuelto en función a la concentración de la CD. Esto quiere decir que, dependiendo del tipo de CI, la concentración del fármaco disuelto variará conforme aumente la concentración de CD en la disolución (Figura 7).

Los CIs formados pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de curva que se obtenga en este estudio. Es posible obtener dos grupos de curvas: las curvas de tipo A indican la formación de CIs solubles, y las curvas de tipo B indican la formación de complejos insolubles (Higuchi & Connors, 1965).



Figura 7. Clasificación de perfiles de solubilidad de fases para CIs CD/fármaco.

Los grupos de curvas A y B a su vez se clasifican en los siguientes escenarios:

- Una curva de tipo A_L indica un aumento lineal en la concentración del fármaco respecto al aumento en la concentración de CD, corresponde a la formación de un CI CD/fármaco con estequiometría de primer orden, es decir 1:1.
- Una curva de tipo A_P exhibe una desviación positiva de la linealidad. Resulta de la formación de un CI CD/fármaco con estequiometría 2:1, 3:1, o mayor.
- Una curva de tipo A_N exhibe una desviación negativa de la linealidad. Podría resultar de la asociación del propio CI CD/fármaco o de una alteración en el disolvente al aumentar la concentración de CD.
- La obtención de una curva de tipo B_s resulta de la formación de un CI parcialmente soluble.
- Una curva de tipo B_I, indica la formación de un CI insoluble.

A pesar de ofrecer múltiples beneficios, las CDs pueden tener una capacidad limitada para formar Cls (Loftsson & Brewster, 2012). Es en este contexto que se hace necesario buscar alternativas para mejorar la capacidad de complejación de las CDs. Una de estas alternativas es el desarrollo de complejos de inclusión ternarios.

1.2.3. Los complejos de inclusión ternarios

Los complejos de inclusión ternarios (CITs) son sistemas supramoleculares formados por tres componentes, es decir, que un tercer componente se agrega a los CIs CD/fármaco. Entre los compuestos que se han utilizado como agentes ternarios se encuentran los polímeros, ácidos carboxílicos, aminoácidos, metales o bases orgánicas (Suvarna et al., 2022a).

Los tipos de interacciones que ocurren entre los agentes ternarios con las moléculas de fármaco y CDs para dar lugar a la formación de CITs dependen específicamente del agente ternario empleado y los componentes de los CIs. Estas interacciones pueden ser fuerzas como las de van der Waals, dipolo-dipolo, ión-dipolo, formación de quelatos, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas o puentes de hidrógeno (Ribeiro et al., 2003). En la Figura 8 se presenta un esquema de la formación de CITs empleando un polímero como agente ternario. Los polímeros desempeñan un papel crucial como agentes ternarios en la formación de CITs. Se ha reportado que interactúan con las CDs y mejoran sus capacidades de complejación, lo que permite disminuir la cantidad de CD necesaria para la formación de CIs (Suvarna et al., 2022a). A su vez, dan lugar a la formación de complejos polímero/fármaco, lo que también incrementa la solubilidad del fármaco en el medio (Loftsson et al., 1998). Las interacciones intermoleculares presentes en estos complejos son variadas y dependen de los grupos funcionales presentes en las entidades participantes, pudiendo incluir interacciones electrostáticas, como ión-ión (en el caso de la carboximetilcelulosa), ión-dipolo, dipolo-dipolo, así como fuerzas de van der Waals o puentes de hidrógeno (Rácz, 1989).



Figura 8. Representación de la formación de CITs entre fármacos, CDs y polímeros.

La carboximetilcelulosa (CMC), se ha utilizado en formulaciones ternarias con HPβCD y fármacos como econazol y oxazepam. La solubilidad del econazol en la formulación binaria fue de 5.03 mg/mL y se encontró que bajo la adición de CMC, la solubilidad del fármaco incrementó a 7.41 mg/mL, lo que representó un incremento de 1.47 veces. En el caso de oxazepam con la formulación binaria se alcanzó una solubilidad de 0.9 mg/mL y con la formulación ternaria la solubilidad resultó ser 1.42 mg/mL, el aumento de solubilidad al agregar CMC fue de 1.57 veces (Loftsson et al., 1994). De igual manera, esta investigación reportó el uso de polivinilpirrolidona (PVP) como agente ternario en formulación binaria se obtuvo una solubilidad de 1.36 mg/mL y con la formulación ternaria la solubilidad aumentó a 2.72 mg/mL, el incremento fue del doble. El segundo caso fue el de trimetoprima, en el que la solubilidad alcanzada con la formulación binaria fue 2.83 mg/mL y con la adición de PVP la solubilidad aumentó a 6.47 mg/mL. El cambio en la solubilidad de oxazepam representó un aumento de 2.29 veces.

Por otro lado, el polietilenglicol (PEG) es un poliéter sintético compuesto por unidades repetitivas de óxido de etileno [-(CH₂CH₂O)_n] y es característico por su estructura lineal, solubilidad en agua, biocompatibilidad, y no inmunogenicidad (D'souza & Shegokar, 2016). Es un polímero ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas, abarcando tanto PEG de bajo peso molecular en un rango de 200 a 2000 g/mol, y de peso molecular medio en el rango de 2000 a 20000 g/mol (Harris, 1992). El peso molecular del PEG influye en sus propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los PEGs con peso molécular por debajo de 1000 g/mol son líquidos a temperatura ambiente, en el rango de 1000 a 2000 g/mol son sólidos cristalinos duros (Thomas et al., 2014). El PEG es un polímero que se considera hidrofílico, no obstante, cuando su peso molecular es mayor a 4700 g/mol, adquiere un carácter anfifílico (Wu et al., 2014a), resultado de la hidrofobicidad de los grupos metileno (-CH₂) y la hidrofilicidad debida a la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos -Ö- y -CH₂ presentes en la cadena y las moléculas de H₂O del medio (Rincón-López et al., 2022).

El PEG se puede utilizar como excipiente en formulaciones farmacuéuticas. Por ejemplo, los PEG con peso molecular inferior a 1000 g/mol se han utilizado como agentes para suspender moléculas insolubles en medio acuoso o tambien se ha empleado en soluciones oftálmicas, por ejemplo como lubricante en gotas para los ojos (Nayak & Panigrahi, 2012).

La PEGilación es un proceso mediante el cual el PEG se conjuga a una entidad distinta, ya sea otra molécula como un fármaco o una proteína, o incluso a nanoestructuras, como nanopartículas, micelas, liposomas, entre otras (Knop et al., 2010). La versatilidad del PEG ha permitido que el polímero se utilice en el desarrollo de sistemas de liberación avanzados con varias funcionalidades, por ejemplo, para conjugar moléculas como ligandos de reconocimiento a acarreadores de fármacos (Almásy, 2022; Shi et al., 2021), en la formación de micelas poliméricas con conjugados PEGilados lípido/polímero/fármaco/proteína, en la formación de liposomas con fosfolípidos PEGilados que encapsulen fármacos, o en la síntesis de hidrogeles de PEG conjugado al fármaco (D'souza & Shegokar, 2016).

También se ha estudiado el uso de PEG como componente ternario en la formación de CITs y se ha reportado que PEG en CITs mejora la solubilidad del compuesto activo en comparación con las formulaciones binarias CD/fármaco correspondientes (Tabla 1).

Compuesto activo	CD	PEG	Cambio solubilidad compuesto activo
Fenofibrato (FEN) Uso: hipolipemiante (Patel & Vavia, 2006)	βCD	PEG 4000, PEG 6000	La formulación binaria βCD/FEN aumentó la solubilidad de FEN 7.2 veces. El aumento en la solubilidad de FEN con el complejo ternario formulado con PEG 4000 fue de 10.9 veces, mientras que el incremento alcanzado con el CIT con PEG 6000 fue de 11.2 veces.
Meloxicam (MEL) Uso: antiinflamatorio (Radia et al., 2012)	βCD	PEG 6000	El aumento alcanzado en la solubilidad de MEL con el complejo binario fue de 7 veces. Con el sistema ternario se logró aumentar la solubilidad de MEL 13.4 veces.
Diosmina (DSM) Uso: antioxidante (Anwer et al., 2014)	βCD	PEG 6000	Con el complejo βCD/DSM se logró un aumento de 3.7 veces en la solubilidad de la DSM. Con la formulación ternaria, se alcanzó un aumento de 5.4 veces en la solubilidad de la DSM.
Silimarina (SIL) Uso: varios (Ansari, 2015)	βCD	PEG 6000	Con la formulación binaria βCD/SIL, se logró incrementar la solubilidad de SIL 7.1 veces, mientras que, con el CIT la solubilidad de SIL aumentó 7.9 veces.
Enzalutamida (ENZ) Uso: antiandrógenos (Volkova et al., 2021)	HPβCD	PEG 6000	Al utilizar el sistema binario HPβCD/ENZ, la solubilidad de ENZ aumentó 4.3 veces. Con la formulación ternaria, el aumento alcanzado fue de 6.6 veces.

Tabla 1. Formulaciones de CITs en las que se utilizó PEG como agente ternario

Bajo este contexto, en esta tesis se investigó la formación de CIs de NCL con β CD como estrategia para aumentar la solubilidad de NCL. Durante la formación de los CIs se determinó cuál es el medio de trabajo en el que se recupera mayor cantidad de NCL en el CI, por lo que se evalúa la formación del CI en una mezcla EtOH/H₂O, y en un medio con pH básico.

Se utilizó PEG 5000 como agente ternario para explorar la formación de CITs con β CD y NCL. En esta etapa se investigaron cuáles son las condiciones experimentales adecuadas que conducen a la formación del CIT, por lo que, se evaluó la influencia del medio de trabajo y el orden de adición de los componentes que resulta en el CIT con mayor cantidad de NCL.

En una etapa posterior, se investigó cuál es el sistema con el que se logra modificar más la solubilidad de NCL. Se realizaron mezclas con excesos estequiométricos de β CD y PEG para formular los sistemas β CD/NCL y β CD/NCL/PEG. En esta serie de experimentos se evaluó la influencia del pH del medio en el cambio de solubilidad de NCL.

Asimismo, se investigó la relación entre los cambios en la tensión superficial del disolvente y los cambios en la solubilidad de NCL al utilizar los sistemas β CD/NCL y β CD/NCL/PEG, como una estrategia para determinar el posible mecanismo de solubilización de NCL.

2. Hipótesis

La formación de complejos de inclusión β -ciclodextrina/niclosamida aumentará la solubilidad de la NCL, debido a la inclusión de las moléculas de NCL en las cavidades de β CD.

La adición de PEG como agente ternario en un CIT β CD/NCL/PEG, podría incrementar la solubilidad acuosa del fármaco hidrofóbico NCL, resaltando así el potencial del uso del polímero en la formulación ternaria en comparación con CIs β CD/NCL.

3. Objetivos

3.1. General

Preparar complejos de inclusión binarios (CIBs) β CD/NCL y complejos de inclusión ternarios (CITs) β CD/NCL/PEG para determinar las condiciones experimentales óptimas en los que se favorece la formación de los complejos con mayor cantidad de NCL y conduzcan al aumento de su solubilidad.

3.2. Específicos

Para el CIB:

- Identificar el impacto de β CD en la solubilidad de NCL por medio de diagrama de solubilidad de fases de β CD/NCL.
- Preparar los CIBs de NCL con βCD por medio de técnicas de cosolvencia para mejorar la solubilidad acuosa de NCL.
- Explorar la variable de ionización de NCL en la preparación del CIB al formar el complejo en un medio con pH 8.7.
- Determinar la estequiometría de formación de los CIBs por medio del método de variaciones continuas.
- Caracterizar los CIBs mediante técnicas espectroscópicas y análisis térmicos como UV, FTIR, DRX, DSC y TGA.
- Evaluar el cambio en la solubilidad de NCL en CIB al utilizar mezclas con exceso estequiométrico de βCD y evaluar el efecto del pH del medio en los cambios de solubilidad del fármaco.

Para el CIT:

- Identificar el impacto de PEG en la solubilidad de NCL por medio de diagrama de solubilidad de fases de β CD/NCL/PEG.
- Preparar los CITs de βCD, NCL y PEG en H₂O y en la mezcla EtOH/H₂O e investigar la influencia del orden de adición de los componentes en la formulación de los CITs para mejorar la solubilidad acuosa de NCL.
- Caracterizar los CITs mediante técnicas espectroscópicas y análisis térmicos como UV, FTIR, DRX, DSC y TGA.
- Evaluar el cambio en la solubilidad de NCL en CIT al utilizar mezclas con excesos estequiométricos de βCD y PEG, y evaluar el efecto del pH del medio en los cambios de solubilidad del fármaco.
- Explorar los cambios la tensión superficial del medio al utilizar el sistema βCD/NCL/PEG como estrategia para determinar el mecanismo de solubilización de NCL.

4. Desarrollo experimental

4.1. Reactivos

La β -Ciclodextrina (β CD), la niclosamida (NCL), el polietilenglicol con peso molecular promedio de 5000 g/mol (PEG), los amortiguadores fosfato salino (PBS) y Tris-Borato-EDTA (TBE) se adquirieron de Sigma-Aldrich.

4.2. Métodos generales

4.2.1. Preparación de las disoluciones amortiguadoras

La disolución amortiguadora de PBS se realizó disolviendo una pastilla del amortiguador en 200 mL de H₂O. El potencial de hidrógeno medido para esta disolución fue de 7.4.

A su vez, la disolución amortiguadora de TBE se preparó disolviendo el contenido de un sobre de amortiguador TBE en 500 mL de H₂O. El potencial de hidrógeno medido para esta disolución fue de 8.6.

4.2.2. Método analítico para la cuantificación de niclosamida

4.2.2.1. Preparación de la curva de calibración

Se implementó un método cuantitativo por espectroscopía Ultravioleta (UV) para determinar la concentración de NCL en solución. Los espectros se obtuvieron empleando un UV-2600 de Shimadzu[®] en el rango 400-250 nm.

Primeramente, se realizó una disolución estándar de NCL a una concentración de 50 µg/mL en una mezcla EtOH/H₂O con relación 70:30. La curva de calibración de NCL se preparó a partir de la disolución estándar de NCL en un rango de concentraciones de 1 a 50 µg/mL (3-152.8 µM). Se identificó su longitud de onda (λ) de absorción máxima, una vez identificado, se empleó esta λ para la elaboración de la curva de calibración.

4.2.2.2. Cuantificación de niclosamida por espectroscopía UV

En los experimentos llevados a cabo, la concentración de NCL se cuantificó con relación a la curva de calibración. Previo a la lectura por UV a todas las muestras se les adicionó EtOH, en una la relación 70:30 con H₂O.

Para los experimentos efectuados en las disoluciones amortiguadoras de PBS y TBE, a las muestras se les agregó EtOH, en relación 70:30 con el medio amortiguador. La medición de las absorbancias se realizó con disoluciones blanco, compuestas por EtOH y el amortiguador correspondiente en la misma relación v/v.

Aquellas muestras cuyas absorbancias sobrepasaron el límite máximo de cuantificación, se diluyeron según el caso, siempre en la relación 70:30 EtOH y H₂O, PBS o TBE.

4.3. Determinación de la solubilidad intrínseca de niclosamida

La determinación de la solubilidad intrínseca (S_0) de la NCL se realizó en 3 medios distintos, los cuales fueron H₂O y las disoluciones amortiguadoras de PBS y TBE. El experimento consistió en disolver 6.5 mg (0.02 mmol) de NCL, en un volumen de 4 mL de cada medio. Posteriormente, las muestras se sonicaron durante 10 min a 37 °C. Después, se pusieron en un baño maría con agitación controlada CVP-110X de Scientific[®] a una velocidad de 100 rpm, a una presión de 776 hPa y temperatura controlada de 37 °C por un periodo de 72 horas. Posteriormente, las muestras se dejaron sedimentar durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de sedimentación, el sobrenadante se recuperó y se tomó una alícuota de 0.9 mL, a la cual se le añadió un volumen de 2.1 mL de EtOH. La absorbancia de las muestras se midió por espectroscopía UV, y se cuantificó la NCL. El experimento se llevó a cabo por duplicado para cada uno de los 3 medios.

4.4. Estudio de solubilidad de fases

El estudio de solubilidad de fases se llevó a cabo según la metodología reportada por Higuchi y Connors (Higuchi & Connors, 1965). Se prepararon disoluciones de β CD en un rango de concentraciones de 0.5 a 2.5 mM en un volumen de 4 mL. Posteriormente, a cada una de estas disoluciones se le añadió un exceso de NCL 2 veces respecto a la concentración más alta de β CD, dando lugar a una concentración de 5 mM de NCL. Las suspensiones resultantes se sonicaron por 10 min a una temperatura de 37 °C, y posteriormente se pusieron en un baño maría con agitación y temperatura controlada a 100 rpm y 37 °C por un periodo de 96 horas.

Al término de las 96 horas, se tomaron alícuotas de 0.9 mL de las suspensiones realizadas en H₂O, y se añadieron 2.1 mL de EtOH. Las mezclas resultantes se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.45 μ m. Posteriormente la absorbancia de las muestras se midió por espectroscopía UV. Las mezclas filtradas se diluyeron con una relación 1:10 v/v.

El estudio de solubilidad de fases también se llevó a cabo en PBS. En este caso, se siguió el mismo procedimiento, solamente que, en vez de H₂O, se utilizó la disolución amortiguadora de PBS a pH

7.4. Al igual que en el experimento realizado en H_2O , una vez filtradas las muestras, fue necesario diluir la serie en una relación 1:10 v/v previo a la cuantificación de NCL.

Este procedimiento igualmente se realizó para una serie elaborada en la disolución amortiguadora de TBE a pH 8.6. Para esta serie, las muestras se diluyeron con una relación 1:100 v/v.

Una vez obtenidas las absorbancias de NCL en las 3 series, se construyeron los diagramas de solubilidad de fases al graficar la solubilidad de NCL en función de las concentraciones de β CD correspondientes (Challa et al., 2005). Cada experimento se realizó por duplicado.

4.5. Estudio de solubilidad de fases bajo la adición de polietilenglicol

También se llevó a cabo un estudio de solubilidad de fases adicionando PEG al sistema β CD/NCL. Al igual que se describe en la Sección 4.4, se realizó una serie de disoluciones de β CD en un rango de concentraciones de 0.5 a 2.5 mM en un volumen de 4mL de H₂O. A cada disolución se le añadieron 6.5 mg (0.02 mmol) de NCL, lo que representa un exceso de 2 veces la concentración más alta de β CD en la serie, para así, dar lugar a una concentración de 5 mM de NCL en cada vial.

El siguiente paso consistió en la adición de PEG a cada vial de la serie. La cantidad de PEG añadida se calculó considerando un exceso de 3.5 veces respecto a la concentración molar de β CD en cada muestra de la serie. En la Tabla 2 se presentan las cantidades de PEG empleadas para cada muestra.

[βCD] (mM)	[PEG] (mM)
0.5	1.75
1.0	3.50
1.5	5.25
2.0	7.00
2.5	8.75

Tabla 2. Concentraciones molares de PEG con respecto a βCD

Las muestras resultantes se sonicaron por 10 min a una temperatura de 37 °C. Después, las suspensiones se agitaron en baño maría con agitación controlada a 100 rpm y 37 °C por un periodo de 96 horas.

Una vez finalizado el proceso de agitación, de cada suspensión se tomó una alícuota de 0.9 mL, y a cada una se le añadieron 2.1 mL de EtOH. Las mezclas resultantes se filtraron a través de una

membrana de nylon de 0.45 μ m y después se leyó su absorbancia por espectroscopía UV. Fue necesario diluir las mezclas en una relación 1:10 v/v.

En este experimento, también se utilizaron los dos medios amortiguadores PBS y TBE siguiendo el mismo procedimiento descrito en la Sección 1.4. Fue necesario diluir la serie realizada en PBS en una relación 1:10 v/v. Para el caso de la serie donde se empleó TBE, la relación de dilución fue 1:100 v/v.

Posterior a haber leído las absorbancias de NCL en las 3 series, se construyeron los diagramas de solubilidad de fases al graficar la solubilidad de NCL en función de las concentraciones de βCD correspondientes. Cada experimento se realizó por duplicado.

4.6. Complejo de inclusión binario β-ciclodextrina/niclosamida

4.6.1. Determinación estequiométrica del complejo de inclusión binario

Con el fin de obtener información sobre la estequiometría de formación del CIB β CD/NCL, se empleó el método de Job, también conocido como método de variaciones continuas (VC) (Gil & Oliveira, 1990). Esta técnica consiste en realizar una serie de disoluciones en las que se varía gradualmente la cantidad de los componentes, de forma que la suma de la concentración molar de ambos es constante a lo largo de la serie.

En el ensayo, primero se prepararon dos disoluciones de β CD y NCL con concentraciones equimolares (0.1 mM). Al realizar las disoluciones se utilizó como medio una mezcla EtOH/H₂O con una relación 70:30 v/v. Para el caso de la disolución de NCL, primero se añadió al fármaco en EtOH con la finalidad de disolverlo. Una vez preparadas las disoluciones, el experimento consistió en realizar una serie de mezclas variando los volúmenes de ambas disoluciones de manera que la fracción molar (*x*) de NCL aumentara de 0.0 a 1.0 de acuerdo con lo establecido en la Tabla 3. De esta manera, la suma de la concentración molar de ambos componentes es igual a 0.1 mM en toda la serie.

<i>x</i> de NCL	Volumen βCD (mL)	[βCD] (mM)	Volumen NCL (mL)	[NCL] (mM)
0	4.0	0.10	0.0	0.00
0.1	3.6	0.09	0.4	0.01
0.2	3.2	0.08	0.8	0.02
0.3	2.8	0.07	1.4	0.03
0.4	2.4	0.06	1.6	0.04
0.5	2.0	0.05	2.0	0.05
0.6	1.6	0.04	2.4	0.06
0.7	1.4	0.03	2.8	0.07
0.8	0.8	0.02	3.2	0.08
0.9	0.4	0.01	3.6	0.09
1.0	0.0	0.00	4.0	0.10

Tabla 3. Cantidades empleadas de cada disolución para el ensayo de VC.

Las muestras de la serie se sonicaron por 10 minutos, y se midió su absorbancia por espectroscopía UV. Para la formación del gráfico de VC, primero se calculó la diferencia de absorbancias entre la medición correspondiente a la formulación con x de NCL igual a 1.0, menos la de cada medición a lo largo de la serie. Los Δ de absorbancia calculados se multiplicaron por su x de NCL correspondiente, y el producto obtenido se graficó con respecto a la misma (Gil & Oliveira, 1990).

El estudio de VC también se realizó en las disoluciones amortiguadoras de PBS y TBE con propósito de obtener información sobre la estequiometría de formación del CIB βCD/NCL a pH 7.4 y 8.6, respectivamente. La serie de disoluciones también se realizó utilizando los volúmenes detallados en la Tabla 3. Después de sonicar y de leer la absorbancia de las muestras, se construyó el gráfico de VC.

4.6.2. Obtención de los complejos de inclusión binarios

Se prepararon 2 diferentes CIBs, en los cuales se modificó el pH del medio en el que se formó el CI (Tabla 4).

Nombre CIB	Complejo	Medio de formación			
CIB 1 βCD/NCL 1:2		EtOH/H₂O			
CIB 2	βCD/NCL 1:2	Disolución amortiguadora TBE			

Tabla 4. CIBs formulados.

En la preparación del CIB 1, primero se disolvieron 32.6 mg (0.1 mmol) de NCL en 10.5 mL de EtOH, y se preparó una segunda disolución en la cual se agregaron 56.1 mg (0.05 mmol) de β CD en 4.5 mL de H₂O. Posteriormente, se añadió gota a gota la disolución de NCL a la disolución de β CD bajo agitación magnética. La mezcla resultante se puso bajo agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente. La proporción final de disolventes una vez mezcladas las soluciones fue de 70:30 EtOH/H₂O.

La elaboración del CIB 2 consistió en mezclar 32.6 mg (0.1 mmol) de NCL en 10.5 mL de la disolución TBE y separadamente se disolvieron 56.1 mg (0.05 mmol) de β CD en 4.5 mL de la misma disolución. La suspensión de NCL se añadió gota a gota a la solución de β CD bajo agitación magnética. Esta mezcla se dejó en agitación magnética constante por 24 horas a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el tiempo de agitación, los CIBs se filtraron al vacío. El sólido remanente en el papel filtro se asume que fue NCL sin complejar. Los CIBs en sólido se recuperaron de las disoluciones resultantes por liofilización, las condiciones de presión y temperatura fueron 0.036 torr y -46 °C, respectivamente. El proceso tuvo una duración de 20 horas.

4.6.3. Preparación de la mezcla física binaria

La mezcla física binaria (MFB) se realizó mezclando β CD y NCL en la relación molar 1:2 de forma manual. Se añadieron 16.3 mg (0.05 mmol) de NCL y 28 mg (0.025 mmol) de β CD en un mortero y se trituró con un pistilo aplastando los componentes hasta obtener una mezcla homogénea.

4.6.4. Caracterizaciones por espectroscopía UV

4.6.4.1. Caracterización en solución de los complejos de inclusión binarios

Con la finalidad de inferir la formación de los CIBs, primero se identificó el espectro de absorción UV de NCL. Este procedimiento se realizó en la Sección 1.2.1.

Por otro lado, se disolvieron 15 mg de los dos CIBs formados en 4 mL de la mezcla EtOH/H₂O y se midió su absorbancia. Se investigó la λ de absorción máxima y se comparó a la del espectro de NCL.

4.6.4.2. Cuantificación de niclosamida en los complejos de inclusión binarios

Se utilizó la técnica de espectroscopía UV para obtener el espectro de absorción de NCL en los CIBs y cuantificar la cantidad de NCL presente. Para ello, se disolvieron por separado 15 mg de cada CI en 4 mL de la mezcla EtOH/H₂O y se midió su absorbancia.

4.6.5. Caracterización en estado sólido de los complejos de inclusión binarios y la mezcla física binaria

Se llevó a cabo la caracterización en estado sólido de los CIBs por medio de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y difracción de rayos X de polvos (DRXP). Adicionalmente se caracterizó la MFB por las mismas técnicas con la finalidad de compararla con los CIBs.

4.6.5.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier

Los espectros infrarrojo de βCD, NCL, los CIBs y de la MFB se obtuvieron empleando un espectrómetro de medio infrarrojo por Transformada de Fourier Nicolet 6700 de Thermo Fisher Scientific[®], se realizaron 32 barridos por muestra en un rango de 4000 a 500 cm⁻¹. Las muestras no requirieron de preparación previo al análisis.

4.6.5.2. Calorimetría diferencial de barrido

Para los termogramas de flujo de calor de β CD, NCL, los CIBs y de la MFB se empleó un equipo DSC 2910 de TA Instruments[®]. Las muestras se calentaron a una tasa de 10°C/min bajo una purga de N₂ en un intervalo de temperatura desde la temperatura ambiente hasta 450°C.

4.6.5.3. Análisis termogravimétrico

Los termogramas de pérdida de peso en función al cambio de temperatura de β CD, NCL, los CIBs y de la MFB se obtuvieron por un análisis termogravimétrico, empleando un equipo Q5000 de TA instruments[®]. Las muestras se calentaron a una velocidad de 10 °C/min bajo una purga de N₂ en un intervalo de temperatura de 25 a 450 °C.

4.6.5.4. Difracción de rayos X de polvos

Los difractogramas de β CD, NCL, los CIBs y de la MFB se obtuvieron bajo un rango de operación 20 de 5° a 40° a una velocidad de barrido de 4°/min. El equipo empleado para la obtención de los patrones de difracción fue un difractómetro de polvos Siemens[®] modelo D5000, con ánodo de cobalto, monocromador secundario de grafito y detector de centelleo.

4.7. Complejo de inclusión ternario β-ciclodextrina/niclosamida/polietilenglicol

4.7.1. Obtención de los complejos de inclusión ternarios

Los CITs consistieron en sistemas formulados por tres componentes: β CD, NCL y PEG. Para su preparación, se emplearon 28 mg (0.025 mmol) de β CD, 8.2 mg (0.025 mmol) de NCL y 875 mg (0.175 mmol) de PEG, equivalente a 7 veces la cantidad molar de β CD. Se realizaron cuatro formulaciones en las que se varió el orden de adición del fármaco y el polímero, así como el medio de trabajo para la elaboración del complejo. Los medios de trabajo empleados fueron H₂O y una mezcla EtOH/H₂O con proporción 70:30 v/v para la preparación de los complejos por método de cosolvencia.

Siguiendo dicho procedimiento, las formulaciones se realizaron de acuerdo con la siguiente tabla:

Nombre CIT	Orden de adición de componentes			Medio de
-	1°	2°	3°	trabajo
CIT 1	βCD	PEG	NCL	EtOH/H ₂ O
CIT 2	βCD	PEG	NCL	H ₂ O
CIT 3	βCD	NCL	PEG	EtOH/H ₂ O
CIT 4	βCD	NCL	PEG	H ₂ O

Tabla 5. CITs formulados.

Para el caso de las formulaciones en las cuales se empleó el método de cosolvencia, es decir, los CIT 1 y CIT 3 primero se disolvió la NCL en el un volumen de 5 mL de EtOH. De forma paralela la β CD se disolvió en 5 mL de H₂O y el PEG se disolvió en 5 mL H₂O.

En la formación del CIT 1 las disoluciones de β CD y de PEG se mezclaron en un vaso de precipitado de 50 mL y la mezcla resultante se puso bajo agitación magnética. Posteriormente se añadió la disolución de NCL de forma gradual bajo agitación a la mezcla β CD/PEG.

En la formación del CIT 3 se agregó la disolución de NCL en goteo bajo agitación a la disolución de βCD. Posteriormente se añadió la disolución de PEG.

La elaboración de las formulaciones CIT 2 y CIT 4 consistió en la preparación de una suspensión de NCL en 5 mL de H₂O y en la disolución de β CD en 5 mL de H₂O y de PEG en 5 mL H₂O.

Para la formación del CIT 2 primero se mezclaron bajo agitación magnética las disoluciones de β CD y PEG. Posteriormente bajo la misma agitación, se añadió la suspensión de NCL por goteo.

La formación del CIT 4 consistió en añadir gota a gota la suspensión de NCL a la disolución de βCD bajo agitación magnética y posteriormente se añadió al sistema la disolución de PEG.

Las 4 mezclas resultantes se agitaron magnéticamente por un periodo de 96 horas a temperatura ambiente.

Después de la agitación de las mezclas, se obtuvieron suspensiones que se filtraron al vacío a través de un filtro con tamaño de poro de 11 μ m. Los CITs en sólido se recuperaron de las disoluciones resultantes por liofilización, proceso que tuvo una duración de 20 horas.

Para los CITs se estimó de forma teórica la NCL complejada. La determinación se realizó por balance de masas como la resta de la masa de NCL añadida a cada formulación (NCL reactante) menos la retenida en el filtro:

$$NCL complejada = NCL reactante - NCL retenida en el papel filtro$$
 (2)

Para determinar el porcentaje de NCL complejada se estableció la relación de la ecuación 3:

% NCL complejada =
$$\frac{NCL \text{ complejada x 100}}{NCL \text{ reactante}}$$
 (3)

Con base en la masa de NCL complejada calculada de manera teórica se estimó la cantidad de fármaco en los CITs siguiendo la ecuación 4:

$$Fármaco en complejo = \frac{(niclosmida en el CIT)}{(masa total CIT)}$$
(4)

4.7.2. Preparación de la mezcla física ternaria

La mezcla física ternaria (MFT) se realizó mezclando β CD, NCL y PEG en la relación molar 1:1:7 de forma manual. Se añadieron 8.2 mg (0.025 mmol) de NCL, 28 mg (0.025 mmol) de β CD y 875 mg (0.175 mmol) de PEG en un mortero y se trituró con un pistilo aplastando los componentes hasta obtener una mezcla homogénea.

4.7.3. Caracterización en solución

4.7.3.1. Espectroscopía de absorción UV

Se cuantificó la NCL presente en cada CI por espectroscopía UV. Para realizar la cuantificación, se realizaron disoluciones de los 4 CITs formados disolviendo 50 mg de cada CIT en 4 mL de la mezcla EtOH/H₂O. La absorbancia de los CITs se investigó en el rango de 400-250 nm.

El CIT 3 se eligió para la caracterización en sólido al ser en el que se determinó la mayor cantidad de NCL.

4.7.4. Caracterización en estado sólido

Con el propósito de respaldar la formación del CIT, se llevó a cabo la caracterización del CIT 3 empleando las técnicas de caracterización FTIR, DSC, TGA y DRXP. Se utilizaron las condiciones de operación descritas en la Sección 4.6.5. Adicionalmente se caracterizó la MFT por las mismas técnicas con la finalidad de compararla con el CIT.

- 4.8. Determinación del cambio de solubilidad de niclosamida en sistemas con exceso de β-ciclodextrina y polietilenglicol
- 4.8.1. Mezcla β-ciclodextrina/niclosamida

El estudio del cambio de la solubilidad de NCL consistió en disolver una cantidad fija de NCL en una serie de disoluciones de β CD, en distintas relaciones estequiométricas. Para esto se consideraron cinco relaciones estequiométricas del CIB β CD/NCL: 1:1, 2:1, 3:1, 8:1, y 15:1. En las que la β CD se encuentra en exceso con respecto a NCL.

Primeramente, se realizaron las disoluciones de β CD de forma que, en cada vial de la serie existiera un exceso distinto a NCL. Las cantidades de β CD que se añadieron a la serie se presentan en la Tabla 6.

Relación molar CIB	n _{βCD} (mmol)	m _{βCD} (mg)
1:1	0.02	22.7
2:1	0.04	45.4
3:1	0.06	68.1
8:1	0.16	181.6
15:1	0.3	340.5

Tabla 6. Cantidad de β CD empleada para la mezcla β CD/NCL

El volumen de H₂O en el que se realizaron las disoluciones de β CD fue de 4 mL de H₂O, sin embargo, en el experimento se consideró la solubilidad de 18.5 mg/mL de β CD, por lo que, con la finalidad de disolver β CD, las formulaciones donde el exceso es de 8:1 y 15:1 se utilizó un volumen de 10 mL. La β CD se agregó de forma gradual al volumen de H₂O acompañado de agitación en el vórtex, posteriormente la serie de disoluciones de β CD se sonicó por 10 minutos a una temperatura de 37 °C para promover la solubilización de β CD.

Después de preparar las disoluciones de βCD, a cada vial se añadieron 6.5 mg (0.02 mmol) de NCL y las tres mezclas resultantes se pusieron en un baño maría con agitación y temperatura controlada a 100 rpm y 37 °C durante 48 horas. Dicho experimento se realizó por duplicado. Al transcurrir el tiempo de agitación, las muestras se centrifugaron a una velocidad de 10,000 rpm durante un periodo de 10 minutos y posteriormente, se tomó una alícuota de 0.9 mL del sobrenadante de cada muestra y se le añadieron 2.1 mL de EtOH. La absorbancia de las muestras se midió por espectroscopía UV para determinar el cambio en la solubilidad de NCL.

Este experimento se realizó también en los medios amortiguadores de PBS y TBE. Ambos experimentos se realizaron por duplicado.

4.8.2. Mezcla β-ciclodextrina/niclosamida/polietilenglicol

Se investigó el cambio en la solubilidad de NCL en los complejos β CD/NCL/PEG. En este estudio, primero se realizaron las disoluciones de β CD en H₂O empleando los excesos de β CD presentados en la Tabla 6, posteriormente, se añadieron 6.5 mg (0.02 mmol) de NCL en cada vial de la serie y por último se añadió PEG en un exceso 3.5 veces la cantidad de β CD. Por lo que, las cinco relaciones estequiométricas del CIT β CD/NCL/PEG investigadas fueron 1:1:3.5, 2:1:7, 3:1:10.5, 8:1:28, y 15:1:52.5. La cantidad de PEG añadida a cada vial de la serie se presenta en la Tabla 7. La determinación de solubilidad por cada condición estequiométrica se hizo por duplicado.
Relación molar CIT	n _{PEG} (mmol)	m _{PEG} (mg)
1:1:3.5	0.07	350
2:1:7	0.14	700
3:1:10.5	0.21	1050
8:1:28	0.56	2800
15:1:52.5	1.05	5250

Tabla 7. Cantidad de PEG empleada para la mezcla βCD/NCL/PEG

Una vez obtenidas las disoluciones del sistema β CD/NCL/PEG se sonicaron por 10 minutos a 37 °C y se agitaron en un baño maría con agitación a 100 rpm y 37 °C por un periodo de 48 horas. Al haber transcurrido el tiempo de agitación, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por un lapso de 10 minutos. Después, se tomó una alícuota de 0.9 mL del sobrenadante de cada muestra y se les añadieron 2.1 mL de EtOH. Finalmente, el aumento de solubilidad de NCL en este sistema se monitoreó por medio de la medición de absorbancia de las muestras por espectroscopía UV.

El cambio de solubilidad de NCL en el CIT β CD/NCL/PEG también se investigó en los medios de trabajo PBS y TBE por duplicado.

4.8.3. Mezcla polietilenglicol/niclosamida

Para identificar el efecto de la β CD en el aumento de la solubilidad de NCL en el CIT, se preparó un sistema compuesto únicamente por PEG y NCL.

Primero se realizó una serie de disoluciones de PEG en H₂O empleando las cantidades descritas en la Tabla 7, y se les añadieron 6.5 mg (0.02 mmol) de NCL. La serie de disoluciones se realizó por duplicado. Una vez agregados ambos componentes, las muestras se sonicaron por 10 minutos a 37 °C, posteriormente, se pusieron en un baño maría con agitación a una velocidad de 100 rpm y una temperatura de 37 °C por 48 horas.

Las suspensiones resultantes se centrifugaron por 10 minutos a 10,000 rpm y después se tomó del sobrenadante de cada muestra una alícuota de 0.9 mL, para finalmente añadir a cada una 2.1 mL de EtOH. Se monitoreó el aumento de solubilidad de NCL en cada muestra por espectroscopía UV.

Por último, el cambio de solubilidad de NCL en el sistema PEG/NCL, también se investigó en las disoluciones amortiguadoras PBS y TBE.

4.9. Mediciones de tensión superficial

Para las mediciones de tensión superficial dinámica se utilizó un tensiómetro óptico Theta Lite Attension[®]. Se realizaron mediciones de los siguientes sistemas:

- a) Sistema PEG: se preparó una disolución de PEG 0.105 mM. Se disolvieron 5250 mg (0.525 mmol) de PEG en 10 mL de H_2O .
- **b)** Sistema βCD/NCL: se preparó la formulación 15:1 realizada en la Sección 4.8.1.
- c) Sistema PEG/NCL: se preparó la formulación 52.5:1 realizada en la Sección 4.8.3.
- **d)** Sistema βCD/NCL/PEG: se preparó la formulación 15:1:52.5 realizada en la Sección 4.8.2.

Cada una de las cuatro muestras también se prepararon en PBS y TBE.

Para determinar el efecto en la tensión superficial de cada muestra, se colocó una gota de cada una de ellas en el tensiómetro. Las muestras se analizaron por un tiempo de 6 horas. Durante todo el experimento se monitoreó el volumen de la gota para verificar que se mantuviera constante. Posterior a la medición se obtuvieron los perfiles de tensión superficial de cada sistema con respecto al tiempo.

5. Resultados y discusión

5.1. Solubilidad intrínseca de niclosamida

En estudios anteriores, se ha investigado el valor de S_0 de NCL en agua. Es posible encontrar que se ha reportado un rango amplio de valores de solubilidad, ya que estos varían según la forma cristalina en la que se encuentra el fármaco. El valor de solubilidad promedio encontrado para NCL en su forma anhidra es de 9.4 µg/mL, mientras que el valor para NCL en forma de monohidrato es inferior a 1 µg/mL. La Tabla 8. presenta los valores de solubilidad de NCL reportados en literatura.

Forma fisicoquímica NCL	Solubilidad (µg/mL)	Referencia
Anhidra	13.32	(Van Tonder et al., 2004)
Anhidra	8	(Lodagekar et al., 2019)
Anhidra	6.86	(Pardhi et al. <i>,</i> 2017)
Monohidrato	0.61-0.95	(Van Tonder et al., 2004)

Tabla 8. Valores de solubilidad de NCL reportados.

De acuerdo con el estándar de referencia de la Farmacopea Europea, la NCL empleada en la sección experimental de este trabajo (CAS: 50-65-7; Producto: N3510) corresponde al fármaco en su forma anhidra.

En este trabajo se determinó el valor de S_0 de NCL en H₂O y en las disoluciones amortiguadoras PBS y TBE y se encontró que en H₂O la NCL tiene una S_0 de 1.64 ± 0.13 µg/mL (**0.0050 mM**). La S_0 en las disoluciones amortiguadoras de PBS y TBE fue de 1.71 ± 0.28 µg/mL (**0.0052 mM**) y 1.43 ± 0.12 µg/mL (**0.0043 mM**) respectivamente.

Al contrastar los valores de S_0 obtenidos con los previamente informados para NCL anhidra, es evidente que los valores de S_0 obtenidos resultaron inferiores a aquellos previamente reportados. En la Sección 5.3.3.2. se presenta que la NCL exhibe una leve presencia de humedad en su composición (Van Tonder et al., 2004). Esta hidratación posiblemente ocasiona un aumento de la insolubilidad de NCL, y causa que los valores de S_0 no se encuentren en el rango de valores reportados anteriormente.

5.2. Estudio de solubilidad de fases

5.2.1. Sistema β -ciclodextrina y niclosamida o complejo de inclusión binario CIB

Primeramente, se realizó el estudio de solubilidad de fases del sistema compuesto por β CD y NCL. Este estudio permitió determinar la dependencia de la solubilidad de NCL al aumentar la concentración de β CD. Los medios de trabajo en los que se realizó este estudio fueron H₂O, PBS y TBE. En la Tabla 9. se indican los valores de solubilidad de NCL obtenidos en el estudio al variar la concentración de β CD.

[βCD] (mM)	[NCL] (mM) en H ₂ O	[NCL] (mM) en PBS	[NCL] (mM) en TBE
S ₀	0.0050	0.0052	0.0043
0.5	0.0247 ± 0.0012	0.0342 ± 0.0013	0.0245 ± 0.0003
1.0	0.0277 ± 0.0039	0.0383 ± 0.0012	0.0257 ± 0.0002
1.5	0.0375 ± 0.0009	0.0399 ± 0.0001	0.0262 ± 0.0003
2.0	0.0477 ± 0.0001	0.0417 ± 0.0023	0.0273 ± 0.0001
2.5	0.0502 ± 0.0023	0.0447 ± 0.0008	0.0278 ± 0.0001

	Tabla 9.	Resultados de	l estudio de	e solubilidad	de fases d	de BCD v	/ NCL en H ₂ O	, PBS v TBE.
--	----------	---------------	--------------	---------------	------------	----------	---------------------------	--------------

En la Figura 9. se presentan los diagramas de solubilidad de fases de β CD en presencia del exceso de NCL en los tres medios de trabajo.



Figura 9. Diagrama de solubilidad de fases de β CD y NCL en **a**) H₂O, **b**) PBS, **c**) TBE. Las barras de error corresponden a DE con un n=2.

Los diagramas de solubilidad graficados en la Figura 9. corresponden a curvas de tipo A_L lo que indica la formación de CIs en los que hay un aumento lineal en la solubilidad de NCL en función de la concentración de β CD. Este tipo de curvas adicionalmente sugieren la formación de CIs con estequiometría 1:1.

Es posible observar que, en los tres escenarios la NCL presentó un aumento de solubilidad lineal, lo cual también indica que los CIs formados presentan una mayor solubilidad con respecto a NCL sola. El aumento de solubilidad a 2.5 mM de β CD fue distinto en los tres medios de trabajo; En H₂O, se logró un aumento de solubilidad de 10 veces; En PBS, la solubilidad aumentó 8.6 veces; Y en TBE, el aumento alcanzado fue de 6.5 veces.

A partir de la regresión lineal de los diagramas de la Figura 8. es posible obtener las ecuaciones de las rectas obtenidas en cada medio. En la Tabla 10. se presentan las ecuaciones, el valor de R² y de su pendiente correspondiente. R² es el coeficiente de correlación cuadrado y nos brindará el nivel de bondad de ajuste, es decir, la variabilidad que explica en el modelo de regresión. El valor de la pendiente brinda información sobre el cambio de la solubilidad a medida que aumenta la concentración de CD (Challa et al., 2005).

Medio	Ecuación recta	R ²	Pendiente
H₂O	Y = 0.1421X + 0.0162	0.9391	0.1421
PBS	Y = 0.0487X + 0.0324	0.9002	0.0487
TBE	Y = 0.0166X + 0.0238	0.9582	0.0167

Tabla 10. Análisis de regresión lineal del diagrama de solubilidad de fases.

Dada esta relación lineal en la complejación de una molécula de NCL por una molécula de β CD, es posible obtener las constantes de estabilidad aparente del CIB. Las $k_{1:1}$ se determinaron siguiendo la ecuación 1 mostrada en la Sección 2.2. con los valores de las pendientes de la Tabla 10. Los valores de S_0 empleados son los señalados para H₂O, PBS y TBE en la Sección 1.1. La Tabla 11. puntualiza los valores de $k_{1:1}$.

Tabla 11. Valores de $k_{1:1}$.			
Medio	k _{1:1} (mM⁻¹)	k _{1:1} (M⁻¹)	
H ₂ O	32.12	0.03212	
PBS	9.79	0.00979	
TBE	3.88	0.00388	

Las constantes de estabilidad aparente de los complejos formados son pequeñas, esto significa que hay una baja afinidad de NCL por la cavidad de β CD. Se han realizado estudios que investigan el efecto de la ionización del fármaco en las constantes de estabilidad aparente. En estos estudios se ha encontrado que las constantes de afinidad son menores conforme aumenta la ionización del fármaco, su forma desionizada puede tener una mayor propensión a formar interacciones hidrofóbicas con la cavidad de la ciclodextrina, lo que puede contribuir a la estabilidad del CI (Jambhekar & Breen, 2016). Un ejemplo es el de la complejación entre clorpromazina y β CD, en este se empleó el fármaco en su forma desionizada y en su forma catiónica y la $k_{1:1}$ resultó cuatro veces mayor en la forma desionizada (Boudeville & Burgot, 1995). Un segundo ejemplo es el de la complejación de fenitoína con β CD, se encontró que la $k_{1:1}$ fue tres veces mayor para el fármaco en su forma desionizada que en su forma aniónica (Loftsson & Olafsd, 1993).

A pesar de que los valores de $k_{1:1}$ obtenidos indican que no existe una interacción fuerte entre NCL y β CD, existe un aumento lineal en la solubilidad de NCL al incrementar la concentración de β CD, lo cual evidencia que sí existe una interacción entre el fármaco y la β CD.

Diversos estudios han investigado la complejación de NCL con 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD), de acuerdo con resultados publicados, el CI HPβCD/NCL ocurre en una estequiometría

1:1 con una $k_{1:1}$ de 747 M⁻¹ (Lodagekar et al., 2019), de acuerdo con estudios teóricos, la estequiometría del complejo HP β CD/NCL también podría ser 2:1, de forma que el fármaco se encuentra incluido en la cavidad de dos moléculas de HP β CD (Gatica et al., 2017). Tal y como se presenta en la Tabla 11, los valores de $k_{1:1}$ obtenidos en esta investigación son muy pequeños, esto podría ser resultado de la S_0 tan baja que presenta NCL (Loftsson et al., 2007). Cabe señalar que esta es la primera vez que se reporta un CI de NCL con β CD y la diferencia observada con respecto a los complejos previamente reportados con HP β CD podría deberse también a la solubilidad de β CD, que es menor a la de HP β CD y a su baja eficiencia de complejación en comparación también con HP β CD (Saokham et al., 2018).

5.3. Complejo de inclusión binario

5.3.1. Determinación de la estequiometría del complejo de inclusión binario

En la Figura 10. se presenta el gráfico de VC obtenido para los CIs en los tres medios de trabajo. Aquí, se muestra que el máximo de Δ Absorbancia*x corresponde a fracción de 0.5, lo que significa que la estequiometría del CI β CD/NCL es 1:1.

Tanto para la serie realizada en la mezcla EtOH/H₂O, así como para las que se realizaron en los medios amortiguadores PBS y TBE, se obtuvo la misma relación estequiométrica, mostrando que en los tres casos la NCL forma CIs en relación 1:1 con β CD, lo cual es congruente con lo previamente investigado para el CI HP β CD/NCL (Lodagekar et al., 2019).



Figura 10. Gráficos de VC del CIB β CD/NCL en **a)** H₂O/EtOH, **b)** PBS, **c)** TBE.

5.3.2. Caracterización por espectroscopía UV5.3.2.1. Caracterización en solución de los complejos de inclusión binarios

Al ser un oligosacárido cíclico compuesto por unidades de glucopiranosa, la βCD no contiene sistemas de dobles enlaces conjugados en su estructura, por lo que no presenta absorción en el rango UV del espectro. Sin embargo, puede afectar la manera en la que los compuestos con los que forma CIs absorben la luz y, en consecuencia, se puede detectar un cambio en las transiciones electrónicas del huésped al entrar en un ambiente apolar, lo cual provoca una modificación en la estabilidad en su estado excitado (Kiss et al., 2019).

Como resultado de la interacción CD-huésped durante la formación de CIs, se pueden presentar cambios espectrales en el huésped, tales como corrimientos hipsocrómicos o batocrómicos en su λ de máxima absorbancia, o cambios hipercrómicos o hipocrómicos en la intensidad de su absorción (Mura, 2014).

En la Figura 11. se presentan los espectros de absorción UV de NCL y los CIBs en un rango de 400-250 nm. La curva a) corresponde al espectro de NCL en la mezcla EtOH/H₂O 70:30, la cual tuvo una absorbancia máxima en λ 333 nm, debido a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (Akash & Rehman, 2019). Las curvas b) y c) corresponden a CIB formulado en la mezcla EtOH/H₂O y al CIB formulado en TBE respectivamente. En ambas curvas se puede ver el efecto que tiene la β CD en el espectro de NCL en la λ de máxima absorción. Así, es posible observar que la λ máxima presenta un corrimiento batocrómico a 337 nm, acompañado de un ensanchamiento de las señales. Ambos cambios pueden evidenciar una interacción entre NCL y β CD (Hu et al., 2012).



La espectroscopía UV también se utilizó para determinar de la cantidad de NCL en los CIBs formados. La NCL cuantificada en cada CIB se presenta en la Tabla 12.

Tabla 12. Cantidad de NCL en CIs β CD/NCL		
Clave complejo NCL por mg de CI (mg		
CIB 1	0.004	
CIB 2	0.0007	

De acuerdo con la información presentada, el CIB con mayor cantidad de NCL fue el CIB 1, correspondiente a la formulación realizada por el método de cosolvencia en la mezcla EtOH/H₂O. Así, los valores de la Tabla 12. indican que por cada miligramo de complejo hay presencia de 4 μ g de NCL.

En la formulación realizada en TBE, es decir, el CIB 2 evidenció una menor complejación de NCL por parte de β CD, en este, por cada miligramo de complejo únicamente 0.7 µg corresponden al fármaco. Estos resultados indican que el medio más favorable para la formación del CIB es la mezcla EtOH/H₂O.

Emplear EtOH para promover la disolución de NCL toma un papel clave en la formación del CIB, (Loftsson & Brewster, 2012). La razón de utilizar TBE fue desprotonar al fármaco. Una vez ionizado, las interacciones ion-dipolo al ser de mayor energía que las interacciones entre las propias moléculas de NCL promueven su solubilización (Needham, 2022). A diferencia de lo reportado por Boudeville & Burgot y Loftsson & Olafsd, en algunos casos, se ha reportado que los fármacos en su forma ionizada pueden aumentar su S_0 aparente lo que resulta en una complejación aumentada (Jambhekar & Breen, 2016).

El CIB 1 presentó casi seis veces más NCL que la formulación realizada en el medio TBE. Por lo tanto, estos resultados reflejan que la cosolvencia es un fenómeno que favorece la complejación de NCL y supera al de la ionización de NCL que también pudiera favorecer el proceso de complejación (Cheirsilp & Rakmai, 2017b). Además, es importante considerar que TBE contienen EDTA, que pudiera competir con NCL en la interacción con βCD, por lo que más moléculas de NCL quedarían sin complejar (Ferino-Pérez et al., 2023). En la Figura 12, se representan algunas de las posibles interacciones de la competencia EDTA-NCL con βCD.



Figura 12. Posible escenario de competencia EDTA-NCL en la interacción con βCD.

5.3.3. Caracterización en estado sólido

5.3.3.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier

En la Figura 13. se presentan los espectros infrarrojo obtenidos por FTIR para NCL, β CD, el CIB 1, el CIB 2 y la MFB en el rango de 450 a 4000 cm⁻¹.

El espectro de βCD presenta en 3290 cm⁻¹ una banda correspondiente al estiramiento simétrico de O-H, en 2920 cm⁻¹ hay señal originada por el estiramiento simétrico de C-H. La banda en 1640 corresponde a la vibración de flexión entre H-O-H. En el número de onda 1160 cm⁻¹ se registró una banda correspondiente a la flexión simétrica entre carbonos (C-C) del esqueleto del oligosacárido, en 1080 cm⁻¹ y 1020 cm⁻¹ se presentaron bandas debido a las vibraciones C-O (Aleem, 2008; Butt, 2023).

En el espectro de NCL, se presenta una banda en 3130 cm⁻¹ ocasionada por el estiramiento del grupo =C-H (Al-Hadiya, 2005). En 1650 cm⁻¹ hay una vibración correspondiente a la flexión del carbonilo del grupo amida (Jara et al., 2021). En 1565 cm⁻¹ se presenta una banda correspondiente a las vibraciones de estiramiento entre C-N y a la deformación entre N-H. En los números de onda 1520 y 1330 cm⁻¹ se presentan dos bandas ocasionadas por el estiramiento del enlace N=O. La banda en 1490 cm⁻¹ es ocasionada por los anillos aromáticos sustituidos por el grupo cloro. En la región comprendida entre 1270 y 1080 cm⁻¹ las bandas corresponden a vibraciones de deformación dentro del plano entre C-H, a su vez, la deformación fuera del plano se presenta en las bandas en la región entre 950 y 700 cm⁻¹. La señal en 675 cm⁻¹ corresponde a la flexión fuera del plano de los anillos aromáticos (Ma et al., 2017).



Figura 13. Espectros infrarrojo de a) βCD, b) NCL, c) CIB 1, d) CIB 2, e) MFB.

Al comparar los espectros de NCL y β CD con los de los CIBs, es posible observar que para el caso del CIB 1, no se observan la bandas de NCL en el rango 4000-1000 cm⁻¹ y se presenta una disminución en la transmitancia de las bandas entre 1000 y 500 cm⁻¹, lo cual puede indicar la formación de CIB. Para el caso del CIB 2, en primer lugar, se observa un ensanchamiento de la

banda asociada al estiramiento simétrico de O-H en 3160 cm⁻¹, que corresponde a las moléculas de trisaminometano, ácido bórico y EDTA forman puentes de hidrógeno (Brubach et al., 2005). En la región entre 1400 y 400 cm⁻¹ en el espectro de CIB 2 no se presentan señales de NCL, sin embargo, no necesariamente es indicativo de la formación del CIB. En 1050 y en 880 cm⁻¹ se asignan dos bandas como resultado del estiramiento asimétrico y simétrico de C-C-O de la molécula de trisaminometano (Smith, 2018).

Por último, el espectro de la MFB muestra una superposición de las señales de los espectros de NCL y β CD evidenciando que solamente por cosolvencia o la ionización del fármaco, en menor medida, se promueve la formación de CIB.

5.3.3.2. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido se utilizó como una técnica complementaria para corroborar la presencia de CIBs. En este caso la ausencia del evento endotérmico correspondiente al punto de fusión del fármaco en los termogramas de los CIBs será indicativo de la inclusión de NCL en la cavidad de β CD (Mura, 2015). En la Figura 14. se presentan las curvas de DSC.



Figura 14. Termogramas de a) βCD, b) NCL, c) MFB, d) CIB 1, e) CIB 2.

La curva a) corresponde a βCD, en la que se muestra un evento endotérmico amplio en el rango de 75 °C a 150 °C, que corresponde a la pérdida de moléculas de agua (Pralhad, 2004; Sathigari, 2009). Para la NCL, se presenta un pico endotérmico en 230 °C, que corresponde a la temperatura de fusión del fármaco (Van Tonder, 2004). Aproximadamente a 80 °C la NCL también presenta un ligero evento endotérmico atribuido a pérdida de moléculas de agua.

En el caso de los CIB 1 y CIB 2, los termogramas de flujo de calor no presentan eventos en el rango donde se esperaría la transición endotérmica de fusión de NCL. La desaparición de este pico en ambos termogramas es indicativa de la incorporación de NCL en la cavidad de βCD.

Para el caso de la MFB, correspondiente a la curva c), es posible observar que el evento de fusión de NCL permanece presente a la temperatura reportada.

5.3.3.3. Análisis termogravimétrico

En la Figura 15. se presentan las curvas de pérdida de peso de los compuestos al calentarlos hasta 500 °C.



Figura 15. Termogramas de pérdida de peso de a) βCD, b) NCL, c) MFB, d) CIB 1, e) CIB 2.

La curva de descomposición térmica de β CD muestra que en el rango de temperatura entre 75 a 100 °C hubo una pérdida de peso inicial de 15 % atribuida a la pérdida de moléculas de agua (N. Li & Xu, 2010), este comportamiento térmico de β CD sugiere que el compuesto sufre un proceso de deshidratación por debajo de 100 °C. Una segunda etapa de pérdida de peso tomó lugar de 310 a 330 °C debido a la descomposición térmica de β CD (Butt et al., 2023), proceso que ocurre abruptamente, reduciendo la masa remanente en un 75 %.

Para NCL se presentó un comportamiento estable en el intervalo de temperatura ambiente hasta 80 °C, a esta temperatura, hay una disminución de peso de 1 % atribuido a la evaporación de moléculas de agua en la NCL. Posteriormente, al seguir aumentando la temperatura la masa de NCL se mantuvo contante hasta 230° C. A 250 °C comienza la pérdida de peso del fármaco atribuido al proceso de degradación (Pardhi, 2017). Este evento de degradación tuvo lugar hasta los 350 °C, temperatura a la cual la masa remanente de NCL fue de 10 % del peso inicial.

Los CIBs mostraron un comportamiento distinto en cada formulación. En primer lugar, el CIB 1 presentó una pérdida de peso inicial de 7 % en el intervalo de temperatura de 25-60 °C atribuido a un proceso de deshidratación. El porcentaje de masa de dicho CIB permaneció constante hasta 300 °C, temperatura a la cual, comenzó el proceso de mayor pérdida de peso. A diferencia de NCL, cuya pérdida de peso comenzó a los 230 °C, esta diferencia en temperatura podría ser indicativo la inclusión con β CD. Dicho proceso tuvo lugar hasta 370 °C y la masa restante del CIB a esa temperatura fue de 35 % con respecto al peso inicial.

Para el caso del CIB 2, este comenzó a descomponerse gradualmente desde los 40 °C hasta los 200 °C, la descomposición se atribuye a la degradación del contenido de TBE en el complejo. Después presentó una ligera pérdida de peso hasta aproximadamente 260 °C. Posteriormente, a 284.9 °C comenzó un nuevo proceso de pérdida de peso, atribuido a la degradación de βCD.

La MFB presentó una pérdida de masa en el rango de 70 a 100 °C que corresponde a la pérdida de agua en la βCD. En un segundo proceso, de 200 a 260 °C la muestra presentó pérdida de masa atribuida a la degradación de NCL. Una tercer etapa de pérdida de masa tuvo lugar de 300 a 320 °C correspondientes a la descomposición de βCD. La presencia de los tres eventos en cuestión en la MFB muestra que el comportamiento de ambos componentes prevalece. Un caso distinto, es el de CIB 1, este solamente se presentó la degradación de βCD. El comportamiento del CIB 2, por otro lado, fue más similar al de la MFB.

5.3.3.4. Difracción de rayos X de polvos

La difracción de rayos X de polvos es otra herramienta que permite identificar la formación de Cls. En la Figura 16. se presentan los patrones de difracción de βCD, NCL, los CIBs y la MFB.



Figura 16. Difractogramas de rayos X de **a**) NCL, **b**) βCD, **c**) MFB, **d**) CIB 1, **e**) CIB 2.

El difractograma correspondiente a NCL muestra los picos de difracción en el rango de 5 a 30°, se presentaron picos de alta intensidad en 13.1, 13.84, 19.92, 23.5, 25.7, 26.6 y 26.8° mostrando la fase cristalina del fármaco (Al-Hadiya, 2005). La cristalinidad del fármaco es consecuencia del apilamiento paralelo de moléculas de NCL estabilizado por puentes de hidrógeno intermoleculares entre el hidrógeno donado por el grupo hidroxilo y aceptado por el oxígeno del grupo carbonilo (Sanphui, 2012; Van Tonder, 2004).

La βCD presentó un patrón de difracción cristalino típico (Aleem, 2008; Sathigari, 2009). La MFB mostró una superposición de los picos de difracción de βCD y NCL. Para el caso de los CIBs, es posible observar la amorfización de NCL, como resultado de su inclusión en la cavidad de βCD (Mura, 2015).

Debido a las bajas constantes de estabilidad aparente, y el aumento de solubilidad en tan baja proporción, se buscaron otras estrategias para favorecer la complejación de NCL. Para esto se formuló un complejo ternario, en el que, a la formulación βCD/NCL se agregó PEG como tercer componente.

Complejos de inclusión ternarios β-ciclodextrina/niclosamida/polietilenglicol 5.4.

5.4.1. Estudio de solubilidad de fases en presencia de polietilenglicol

Se llevó a cabo un segundo estudio de solubilidad de fases del sistema compuesto por βCD y NCL para investigar el efecto de PEG en la solubilidad de βCD/NCL. Para tal fin, se adicionó un exceso de 3.5 veces de PEG respecto a la concentración molar de βCD en cada muestra de la serie. En la Figura 17. se presentan los diagramas de solubilidad de fases de βCD/NCL obtenidos al emplear PEG como componente ternario. En la Tabla 13. se indican los valores de solubilidad de NCL obtenidos en el estudio al variar la concentración de βCD y PEG.



Figura 17. Diagrama de solubilidad de fases de β CD y NCL bajo la adición de PEG en a) H₂O, b) PBS, c) TBE. Las barras de error corresponden a DE con un n=2.

		1 1	1
[βCD] (mM)	[NCL] (mM) en H ₂ O	[NCL] (mM) en PBS	[NCL] (mM) en TBE
0.5	0.0447 + 0.0050	0.0107 \ 0.0000	0 0005 1 0 0004

Tabla 13. Resultados del estudio de solubilidad de fases de β CD y NCL en presencia de PEG.

0004
0005
0002
0009
0005

La Figura 17 indica que los diagramas de solubilidad obtenidos bajo la presencia de PEG son de tipo AL, correspondiente a la formación de CIs solubles y con estequiometria 1:1. A partir de estas curvas y su ecuación de la recta se determinó la pendiente para, a su vez, calcular las constantes de estabilidad aparente del CIT (Tabla 14), de la misma manera en que se hizo para CIB (Sección 6.2.1).

Medio	Ecuación recta	R ²	Pendiente	k _{1:1} (mM⁻¹)
H ₂ O	Y = 0.0837*X + 0.0400	0.8957	0.0837	18.22
PBS	Y = 0.1451*X + 0.0132	0.9663	0.1451	32.46
TBE	Y = 0.0452*X + 0.0207	0.9661	0.0452	10.83

Tabla 14. Análisis de regresión lineal del diagrama de solubilidad de fases y valores de $k_{1:1}$.

Las pendientes de las curvas de solubilidad presentadas en la Tabla 14. muestran que se tuvo un comportamiento distinto, en cuanto al aumento de solubilidad, entre los tres medios. De los tres escenarios, la pendiente de mayor valor es la que se obtuvo en el medio PBS, la cual fue 0.1451, seguida de la pendiente en H₂O, la cual fue 0.0837 y finalmente, el valor de 0.0452, correspondiente al medio TBE. Este comportamiento indica que en PBS la razón de cambio de la solubilidad es de mayor magnitud que la presentada en los medios H₂O y TBE.

Tal y como se presenta en la Figura 17., a la máxima concentración de β CD (2.5 mM), el medio en el que se alcanza la mayor solubilidad de NCL es H₂O, en el que se logró una solubilidad de 62.2 μ M. En segundo lugar, con el medio PBS se registró una solubilidad de 48.5 μ M y, en tercer lugar, con el medio TBE se alcanzó la menor solubilidad, la cual fue 32.1 μ M.

Si bien con PBS no se obtuvo la mayor solubilidad a la máxima concentración de β CD, este escenario representa el mayor aumento en la solubilidad de acuerdo con su razón de cambio entre concentraciones de β CD. Esto quiere decir que, a medida que aumenta la concentración de β CD, el cambio en la solubilidad será mayor y se esperaría que a una concentración determinada de β CD el valor de solubilidad iguale a la solubilidad observada en H₂O y que al seguir aumentando la concentración de β CD, la solubilidad supere, en algún punto a la que se alcanzaría en H₂O a concentraciones mayores de 2.5 mM.

Cuando el medio corresponde a TBE, se observa el menor cambio en la solubilidad de NCL en todo el rango de concentración de β CD estudiado en este experimento. Este comportamiento sugiere que TBE es el medio menos favorable para la formación del CI. Este resultado es distinto al esperado, ya que, como consecuencia del aumento de pH en el medio, se promueve la ionización de especies de NCL, lo que aumentaría las interacciones del propio fármaco con el medio, con β CD y PEG (Needham, 2022). Por otro lado, en el medio básico TBE, aumenta la concentración de iones hidroxilo (OH⁻), lo cual podría inducir un aumento en las interacciones

por puentes de hidrógeno entre PEG y los iones del medio (Rincón-López et al., 2022). Si esto ocurre, la interacción de PEG con moléculas de NCL se vería reducida, lo cual podría explicar el hecho de que el cambio en la solubilidad de NCL sea el más bajo.

Tal y como ha sido mencionado, con el medio PBS se logró el mayor cambio en solubilidad de NCL entre las distintas concentraciones de βCD. De acuerdo con el diagrama de predominio de especies de NCL (Figura **S1**), a un pH neutro de 7.4, aproximadamente el 70 % de las moléculas de NCL se encuentran en su forma ionizada, lo que favorecería las interacciones ion-dipolo con las moléculas de H₂O. Al valor de pH 7.4 mencionado, los grupos donadores (-CH₂) y aceptores (-O-) de puentes de hidrógeno de PEG quedan disponibles para interaccionar con los grupos (-OH y -NH) en las moléculas ionizadas de NCL, lo que daría lugar al aumento de solubilidad observado en el estudio. La contribución de estos dos aspectos dará como resultado el incremento en la solubilidad de NCL en este medio.

Los resultados presentados sugieren que, en el rango de concentración de βCD estudiado, el medio más conveniente para la formación del CIT sería H₂O, ya que en este medio se alcanza la mayor solubilidad de NCL. Debido a su peso molecular de 5000 g/mol, el PEG presenta un comportamiento anfifílico (Wu et al., 2014b). De esta manera, PEG es capaz de interaccionar por puentes de hidrógeno con las moléculas de H₂O por medio de sus grupos (-O-), y, por otro lado, podría interactuar por medio de sus grupos (-CH₂) en las cadenas y los anillos aromáticos de NCL.

5.4.1.1. Constantes de estabilidad aparente

La $k_{1:1}$ es un parámetro que nos da una estimación de la afinidad entre el huésped y el anfitrión en un CI. En la Tabla 14 se presentan los valores de $k_{1:1}$ obtenidos. En todos los casos, los valores de k son mayores que los observados en CIB. El aumento en la afinidad entre NCL y β CD, con respecto a CIB, podría ser el resultado de la interacción de tipo huésped-anfitrión entre NCL y la cavidad de β CD cuando PEG está presente. El polímero podría actuar como facilitador para que NCL entre en el interior de la cavidad de β CD, al evitar que las moléculas de NCL interaccionen entre sí, esto es posible por interacciones como puentes de hidrógeno, o fuerzas de van der Waals entre PEG y NCL. En PBS el valor de $k_{1:1}$ fue el mayor de los 3 sistemas, es decir 32.5 mM⁻¹. La mayor afinidad en PBS es esperada debido a que el valor de $k_{1:1}$ depende de la pendiente obtenida en el estudio y, al ser la pendiente de mayor valor, también se estima que en PBS la afinidad entre NCL y la cavidad de β CD sea mayor. Es debido a esta mayor afinidad que el aumento de solubilidad en los intervalos de concentraciones de β CD sería el mayor en los tres sistemas, si hablamos solamente de la interacción de NCL con la cavidad de β CD. Para el diagrama obtenido en TBE, bajo la adición del polímero se presentó el mismo comportamiento de aumento en el valor de $k_{1:1}$ que en PBS. En este escenario, la $k_{1:1}$ pasó de 3.88 mM⁻¹ a 10.83 mM⁻¹, lo que también indicaría una mayor afinidad de NCL y β CD. En este caso, el incremento se puede deber a que un 90% de NCL se encuentra ionizada y es justamente la especie ionizada la que formaría el CI con la cavidad de β CD.

Resulta interesante observar que la $k_{1:1}$ de CIT en agua fue de 18.22 mM⁻¹, mientras que en CIB fue de 32.12 mM⁻¹. Esta disminución de la afinidad de NCL a la cavidad de β CD podría ser resultado de la posible formación de CIs entre β CD y PEG o bien de la interacción entre PEG y NCL que evitaría la interacción entre NCL y la cavidad de β CD. Cabe mencionar que, aunque la $k_{1:1}$ de CIT en agua es menor a la de CIB, la solubilidad alcanzada a la máxima concentración de β CD en CIT fue de 62.2 μ M y la de CIB fue 50.2 μ M, lo cual podría sugerir que PEG interactúa con NCL y favorece su solubilidad. Es decir, que el aumento de solubilidad no es necesariamente el resultado de la formación de un complejo de inclusión β CD/NCL.

5.4.1.2. Solubilidad β-ciclodextrina/niclosamida en presencia de polietilenglicol

Con relación al aumento de la solubilidad de NCL en los CITs, en el diagrama de solubilidad de fases en presencia de PEG realizado en H₂O se observa un aumento en la solubilidad de NCL de 12.4 veces, cuando la concentración de β CD es de 2.5 mM, respecto a S_0 , mientras que, con el sistema sin polímero el aumento registrado fue de 10 veces. Esto quiere decir que, si se comparan ambos sistemas, la adición de PEG representa un aumento de 1.2 veces en la solubilidad de NCL.

De igual manera, a la concentración máxima de β CD estudiada, se observa que en el medio amortiguador PBS, el aumento de solubilidad de NCL respecto al valor de S_0 fue 8.6 veces en el complejo binario mientras que en el sistema ternario fue de 9.3 veces al adicionar PEG en el sistema. Es decir, que la adición del polímero representa un aumento de 1.1 veces el incremento alcanzado con β CD en el estudio de solubilidad de fases sin PEG.

El cambio en la solubilidad de NCL registrado en el medio amortiguador TBE fue de 6.5 veces respecto a S_0 en el estudio sin PEG a una concentración de 2.5 mM de β CD. Cuando se adicionó el polímero al sistema, se alcanzó un incremento en solubilidad de NCL de 7.5 veces. Es decir, un aumento de 1.1 veces la solubilidad de NCL cuando se utiliza PEG, una magnitud similar a la observada cuando el diagrama de solubilidad, en presencia de PEG, se realiza en H₂O.

Al comparar la Tabla 9. y la Tabla 13. es posible decir que, en un mismo rango de concentración de β CD, el aumento en la solubilidad de NCL es ligeramente mayor en presencia de PEG. Es importante hacer notar que cuando el medio es H₂O, la solubilidad de NCL es prácticamente la misma (47 μ M) en el caso de CIT a 1 mM de β CD y de CIB a con 2 mM de β CD, por lo que, bajo

estas condiciones, PEG permite disminuir la cantidad utilizada de β CD para lograr un mismo efecto en la solubilidad de NCL.

Una vez que identificamos que la presencia de PEG sí influye en la solubilidad de del sistema β CD/NCL, entonces se procedió a preparar los CITs. Antes de ello, se realizaron algunas pruebas para determinar la influencia del medio de preparación y el orden de adición de los componentes.

5.4.2. Aspecto visual de los complejos de inclusión ternarios

La exploración de los sistemas ternarios β CD/NCL/PEG se realizó en el laboratorio de manera que se evaluaron las cuatro formulaciones de CITs descritas en la Tabla 5. Se evaluó el orden de adición de los componentes y el medio de preparación. Cabe recordar que la cantidad de PEG utilizada fue de 875 mg (0.175 mmol), equivalente a 7 veces la cantidad molar de β CD. El aspecto visual que presentaron las suspensiones de los CITs previo a su recuperación por filtrado y liofilización fue distinto en las cuatro formulaciones. En la Figura 18. se presentan fotografías representativas para comunicar el aspecto visual de los CITs.



Figura 18. Apariencias de las formulaciones **A)** CIT 1, **B)** CIT 2, **C)** CIT 3 y **D)** CIT 4 formados con los componentes β CD, NCL y PEG.

Como se mencionó en la Sección 4.7.1., el orden de adición de componentes durante la formación del CIT 1 fue β CD, PEG y NCL y el medio de trabajo fue la mezcla EtOH/H₂O. En esta primer formulación se observa que la suspensión adquirió tonalidad amarilla clara. Al transcurrir 4 horas, el CIT no exhibió ninguna separación de fases o formación de precipitados.

En el CIT 2 el orden de adición fue el mismo que en el CIT 1, sin embargo, en este caso, estos componentes se suspendieron en H₂O únicamente. En la Figura 18. – B se observa que también presenta tonalidad amarillo claro. A diferencia de CIT 1, al estar en reposo durante 4 horas, se observó la formación de cristales de NCL en el fondo del vaso de precipitado.

En la Figura 18. – C se presenta a CIT 3, en el cual el orden de adición fue β CD, NCL, PEG. El medio de trabajo en el que se realizó esta formulación fue la mezcla EtOH/H₂O. Al igual que el CIT 1, tras un reposo de 4 horas no se formó ningún precipitado. Un aspecto importante es que esta suspensión mostró un color blanco a diferencia de las otras formulaciones que presentaron una tonalidad amarilla clara.

Finalmente, en el CIT 4 se repitió el orden de adición β CD, NCL, PEG seguido en el CIT 3, pero, únicamente en un medio acuoso. El aspecto del CIT 4 se presenta en la Figura 18. – D. En reposo de 4 horas, el CIT presentó la formación de un precipitado uniforme de color blanco. Sin embargo, en las paredes del vaso se presentó una acumulación de NCL de color amarillo con consistencia más dura. Se puede inferir entonces que el orden de adición y el medio es un factor determinante para formar un CIT en el que se favorezca la solubilidad de NCL.

5.4.3. Cuantificación niclosamida en los complejos de inclusión ternarios

El porcentaje de NCL complejada respecto a la cantidad de NCL añadida inicialmente en cada formulación se presenta en la Tabla 15. De igual manera, se presenta la cantidad de NCL determinada por espectroscopía UV en las cuatro formulaciones de CITs lo cual corresponde con la relación presentada en la ecuación 4.

Tabla 15. NCL presente en caua uno de los Cris.			
Formulación	NCL complejada (%)	NCL por mg CIT (mg)	
CIT 1	54.9	3.7×10^{-4}	
CIT 2	2.4	5.9×10^{-5}	
CIT 3	85.4	9.5×10^{-4}	
CIT 4	17.1	2.5×10^{-4}	

Tabla 15. NCL presente en cada uno de los CITs

Como se presenta en la Tabla 15. el CIT 3 fue la formulación en la que se determinó la mayor cantidad de NCL. En este CIT se encontró que por cada miligramo de complejo hay presencia de 0.95 µg de NCL.

5.4.4. Interacciones moleculares entre β CD, NCL y PEG

En esta sección discutiremos las posibles interacciones que ocurren en el sistema compuesto por β CD, NCL y PEG, con la finalidad explicar el comportamiento observado, en los experimentos anteriores.

5.4.4.1. **CIT 1**: 6ciclodextrina/polietilenglicol/niclosamida en mezcla EtOH/H₂O

El CIT en su formulación 1 tiene la posibilidad de presentar varias interacciones moleculares. Una representación esquemática de estas interacciones se propone en la Figura 19. en la que se pueden observar cinco distintos casos.



Figura 19. Representación de posibles interacciones en CIT 1. Las moléculas de NCL sin complejar se presentan en naranja; en amarillo formando CI; y en azul formando complejo de no inclusión con β CD.

Si se considera que en primer lugar se añadió β CD seguida de PEG, podría ocurrir la formación de un complejo de inclusión en el que el PEG entra en la cavidad de β CD, como si fuera el caso de la formación de un polirotaxano (Suvarna et al., 2022b). Un segundo escenario, corresponde igualmente a la interacción entre β CD y PEG, sólo que dado por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (-OH) presentes en la superficie de la β CD y los oxígenos o los metilenos en la cadena del PEG (Loftsson et al., 1996)

El escenario tres, correspondería a la formación de CIs entre β CD y NCL, una vez que se ha adicionado NCL al sistema. Al emplear la mezcla EtOH/H₂O como medio de trabajo, se favorecería la solvatación de las moléculas de NCL, permitiendo que estas interaccionen con la cavidad de β CD.

En un cuarto escenario, se podría dar la formación de un complejo de no inclusión (Messner et al., 2010a) o agregado, en el que interaccionen los grupos -OH en la superficie de la β CD con los grupos -OH o -NH en las moléculas de NCL en forma de un puente de hidrógeno. La formación de estos complejos de no inclusión consecuentemente podría resultar en un aumento en la solubilidad de las moléculas huésped (De Jesus et al., 2012), lo cual podría explicar el aumento de la solubilidad de NCL en este CIT.

El quinto escenario correspondería a la interacción entre NCL y las cadenas de PEG por medio de la formación de puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno pueden estar formados por los grupos donadores de puentes de hidrógeno (HBDs por sus siglas en inglés) en NCL (-OH y -NH) y los grupos aceptores de puentes de hidrógeno (HBAs por sus siglas en inglés) en PEG (metilenos -CH₂), o por los HBAs de NCL (-OH y -NH) y los HBDs en las cadenas de PEG (-O-).

De acuerdo con la información presentada en la Tabla 15. La cantidad de NCL presente en esta formulación de CIT corresponde a 0.37 µg de fármaco por cada miligramo de CIT. Este fue el segundo CIT con mayor contenido de NCL de los 4 CIT preparados.

5.4.4.2. CIT 2: βciclodextrina/polietilenglicol/niclosamida en H₂O

En este caso, la NCL formaría clústeres de moléculas de NCL apiladas de forma antiparalela estabilizadas por interacciones de tipo π - π por la interacción entre los anillos fenilo o por interacciones de tipo catión- π entre el grupo nitro y un anillo fenilo como se ha reportado previamente (Sanphui et al., 2012).

Así mismo, las moléculas de H₂O podrían formar puentes de hidrógeno con la superficie de estos clústeres de NCL, lo que resultaría en un clúster de NCL estable y difícil de romper (Vuai et al., 2021). En la Figura 20 se representan las posibles interacciones que ocurrirían en esta formulación del CIT.

De esta manera, el primer escenario corresponde a la formación del clúster de moléculas de NCL (discutido en el párrafo anterior) en el que las moléculas de NCL permanecerían en ese acomodo. En un segundo escenario, podrían formarse CIs entre β CD y las cadenas de PEG o bien, estos dos componentes podrían interactuar a través de la formación de puentes de hidrógeno (sección 1.1.4.1).



Figura 20. Representación de posibles interacciones en CIT 2. Las moléculas de NCL sin complejar se presentan en naranja.

Esta hipótesis podría explicar el hecho de que CIT 2 es el que menos NCL contiene, por cada miligramo de CIT, únicamente 0.059 µg corresponden al fármaco (ver Tabla 15).

5.4.4.3. CIT **3**: βciclodextrina/niclosamida/polietilenglicol en mezcla EtOH/H₂O

El caso de la formulación 3, es el más destacable en función al porcentaje de NCL complejada que resultó ser de 85.36 %. También es la formulación en la que se determinó la mayor cantidad de NCL, es decir, 0.95 µg de fármaco por cada miligramo de complejo. El orden de adición y el medio de trabajo empleados en esta formulación resultaron ser los más apropiados para la recuperación de mayor cantidad de NCL en el sólido. En la Figura 21. se presenta el esquema de las interacciones propuestas para este sistema.

En un primer escenario, podría ocurrir la formación de un CI β CD/NCL. El EtOH en la mezcla favorece la solvatación de las moléculas de NCL. Al solvatar las moléculas de NCL, el EtOH crea un entorno propicio para la interacción entre la NCL y la β CD por un fenómeno de cosolvencia. El segundo escenario, podría corresponder a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos -OH y -NH de la NCL y los grupos hidroxilo de β CD, lo cual daría lugar a la formación de un complejo de no inclusión o agregado. Un tercer escenario correspondería a las interacciones entre un CI β CD/NCL y otra molécula de fármaco. Un ejemplo podría ser una interacción dipolodipolo entre el grupo nitro de una molécula de NCL y el grupo cloro de otra (Sanphui et al., 2012).

Las interacciones NCL-NCL son más fuertes que las interacciones NCL-disolvente y β CD-NCL. Mientras que estos clústeres de NCL se encuentran en formación, la adición de PEG tomaría un rol principal, en el que el polímero compite o "se interpone" entre las moléculas de NCL, y daría lugar a interacciones NCL-PEG y favorecería las interacciones de inclusión y no inclusión NCL- β CD, en un cuarto escenario.



Figura 21. Representación de posibles interacciones en CIT 3. Las moléculas de NCL sin complejar se presentan en naranja; en amarillo formando CI; y en azul formando complejo de no inclusión con βCD.

5.4.4.4. **CIT 4**: βciclodextrina/niclosamida/polietilenglicol en H₂O

Al igual que en la formulación 3, en el CIT 4 primero se agregó β CD, seguido de NCL y PEG, sin embargo, el medio de trabajo empleado fue H₂O. En esta, se estimaron 0.17 µg de NCL de complejada por miligramo de complejo.

De acuerdo con la Tabla 15. a diferencia con el CIT 2, el cual también se realizó en medio acuoso, se puede observar un aumento de casi 15 % en la cantidad de fármaco complejado. Este aumento con respecto a la formulación 2, tiene lugar en el orden de adición. En este caso, los resultados muestran que agregar PEG después de NCL, es más conveniente que agregar primero PEG y luego NCL. En la formulación 2, PEG interacciona primero con H₂O y β CD, de manera que al incorporar NCL sucesivamente, las moléculas de fármaco permanecen en forma de clústeres de NCL (Figura 20), lo que ocasiona la formación de cristales de NCL.

Por otro lado, en el caso del CIT 4, al agregar PEG al sistema β CD/NCL, el polímero debe establecer interacciones que requieran de menos energía. De forma que resulta más favorable la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de H₂O en el medio circundante, que interaccionar con NCL. En este segundo caso, cuando se añade PEG al sistema, el polímero compite con β CD/NCL por interaccionar con las moléculas de H₂O, lo que resulta en la precipitación del CIB β CD/NCL.

En ambos casos en los que se empleó H₂O como medio de trabajo, ocurrió la formación de precipitados, lo cual remarca la necesidad de la estrategia de cosolvencia. Adicionalmente, el papel de PEG como tercer componente es fundamental, ya que, las interacciones NCL-PEG podrían impedir la formación subsecuente de clústeres de moléculas de NCL. En la Figura 22. se proponen las posibles interacciones en el sistema correspondiente al CIT 4.



Figura 22. Representación de posibles interacciones en CIT 4. Las moléculas de NCL sin complejar se presentan en naranja; en amarillo formando CI; y en azul formando complejo de no inclusión con βCD.

En un primer escenario las moléculas de NCL se encuentran apiladas en forma de clúster, un fenómeno reportado previamente cuando NCL está en agua (Sanphui, 2012; Vuai, 2021). En esta formulación, la adición subsecuente de PEG ayudaría a que las moléculas de NCL no se sigan agrupando en clústeres de NCL.

La presencia de las moléculas de NCL que no se encuentran formando clústeres, podría dar lugar a un segundo escenario en el que se forme un CI β CD/NCL por medio de la interacción directa entre las moléculas de NCL y las cavidades de β CD. Un tercer escenario sería el de la formación de un complejo de no inclusión con β CD, por medio de la interacción por puentes de hidrógeno entre los grupos -OH de la superficie de β CD con los grupos -OH y -NH de las moléculas de NCL. La formación de otro complejo de no inclusión entre una molécula de NCL formando un CI con β CD y otra molécula de NCL sería un cuarto escenario.

Los resultados obtenidos de la cantidad de NCL recuperada en cada formulación, así como, el aspecto visual de las muestras y el análisis llevado a cabo para explicar las interacciones en cada CIT indican que el medio de formulación de la muestra toma un rol principal en la complejación del fármaco. También, que el orden de adición es un factor importante para formar el complejo ternario. De acuerdo con los hallazgos en cantidad de NCL recuperada en la formulación 3, y el análisis realizado en cuanto a orden de adición de componentes y medio de formulación de la mezcla, se eligió la metodología realizada para obtener CIT 3 para preparar este sistema y continuar su investigación.

5.4.5. Caracterización en solución del complejo de inclusión ternario

Al igual que los CIBs, también se investigó el fenómeno de complejación del CIT elegido por medio de espectroscopía UV, con base en los corrimientos en la λ de máxima absorción. En la Figura 23-I. se presentan los espectros de absorción UV de NCL y del CIT. La curva del espectro de NCL tuvo una absorbancia máxima en λ 333 nm. La curva correspondiente al espectro de absorción del CIT presentó un corrimiento batocrómico a 338 nm. Este fenómeno sugiere que existe una interacción entre β CD y NCL. En la formación del CI, NCL interacciona dentro de la cavidad de β CD y forma puentes de hidrógeno (Figura 23- II).



Figura 23 -I. Espectros de absorción de a) NCL, b) CIT. – II. Interacción entre βCD y NCL.

En el sistema binario β CD/NCL, la λ de absorción máxima de NCL fue en 337 nm y en el CIT β CD/NCL/PEG el valor de λ fue 338 nm, ambos valores de λ no presentan una diferencia significativa. Es conocido que el PEG no presenta una absorción en el rango UV (Sionkowska, 2006), por lo que no es de esperarse interferencia de PEG en la medición. Las interacciones entre PEG y NCL a diferencia de las discutidas entre β CD y NCL, no modifican el estado electrónico de NCL como el ocasionado dentro de la cavidad. Al comparar ambos complejos, y propiamente con la λ de NCL que fue 333 nm, se infiere la presencia de CIs entre NCL y β CD (Mura, 2014).

5.4.6. Caracterización en estado sólido del complejo de inclusión ternario

Se llevó a cabo la caracterización del CIT 3. Adicionalmente se caracterizó la MFT por las mismas técnicas con la finalidad de compararla con el CIT.

5.4.6.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

En la Figura 24. se presentan los espectros infrarrojo obtenidos por FTIR para β CD, NCL, PEG, el CIT y la MFT en el rango de 450 a 4000 cm⁻¹.

En la sección 5.3.3.1 se presenta el análisis de los espectros infrarrojo por Transformada de Fourier correspondientes a β CD y NCL. A manera de recordatorio, el espectro de β CD presenta en 3290 cm⁻¹ una banda correspondiente al estiramiento simétrico de O-H, en 2920 cm⁻¹ hay una banda originada por el estiramiento simétrico de C-H (Aleem et al., 2008). En el número de onda 1160 cm⁻¹ se registró una banda correspondiente a la flexión simétrica entre carbonos (C-C) del esqueleto del oligosacárido (Butt et al., 2023), en 1080 cm⁻¹ y 1020 cm⁻¹ se presentaron bandas debido a las vibraciones C-O.

En el espectro de NCL, hay una vibración en 1650 cm⁻¹ correspondiente a la flexión del carbonilo de la amida (Jara et al., 2021), en la región comprendida entre 1610 y 1415 cm⁻¹ hay bandas de transmisión correspondientes a la estructura de los anillos aromáticos en la molécula. Las bandas de transmisión en 1520 y 1330 cm⁻¹ tienen su origen en el estiramiento simétrico del grupo (NO₂). En la región comprendida entre 1270 y 1080 cm⁻¹ las bandas corresponden a vibraciones de deformación dentro del plano entre C-H, la transmisión en 675 cm⁻¹ corresponde a la flexión fuera del plano de los anillos aromáticos (Ma, 2017).

En el espectro de PEG, se presentan bandas prominentes en 2880 y 1150 cm⁻¹ debido al estiramiento respectivo de C-H y C-C (Ge, 2020; Ma, 2017). Las bandas de transmisión en 1460 y 1340 cm⁻¹ tienen lugar debido a vibraciones dentro del plano entre C-H presentes en los grupos metileno (-CH₂) de las cadenas de PEG (Qin, 2019). Es posible observar vibraciones de

estiramiento entre C-O en tres regiones diferentes del espectro, con máximos de transmisión en 1240, 1100, y 1060 cm⁻¹ (Ge, 2020). Las bandas presentes en 597 y 841 cm⁻¹ corresponden a la flexión dentro del plano de C-O-C (Qin, 2019).



Figura 24. Espectros infrarrojo de a) βCD, b) NCL, c) PEG, d) CIT, e) MFT.

Para el CIT se observan las mismas bandas de transmisión que para el espectro de PEG con un ligero corrimiento de la banda en 957 cm⁻¹ a 949 cm⁻¹ y la disminución en la intensidad de la vibración de estiramiento C-O en 1050 cm⁻¹. No hay presencia de las bandas de transmisión correspondientes a las vibraciones de NCL ni β CD.

La MFT presentó un espectro infrarrojo en el que se puede observar la superposición de bandas de transmisión presentes en los espectros infrarrojo de NCL y PEG. Las bandas de transmisión en 1650 cm⁻¹, 1600 cm⁻¹, y 1510 cm⁻¹ corresponden a vibraciones de la molécula de NCL. La primera corresponde a la vibración del grupo carbonilo, y las últimas corresponden a la estructural de los anillos aromáticos. El resto de las bandas de transmisión están asociadas a las vibraciones de PEG.

De acuerdo con el contraste presentado entre el CIT y la MFT. Con FTIR no es posible identificar la formación del CIT, las bandas identificadas corresponden a las interacciones presentes durante el proceso de formación del CIT (Mane et al., 2022).

5.4.6.2. Difracción de rayos X de polvos

En la Figura 25. se presentan los patrones de difracción de NCL, β CD, PEG, el CIT y la MFT. El difractograma correspondiente a la NCL se muestran los picos de difracción del fármaco en el rango de 5 a 30° de acuerdo con los resultados presentados en la sección 5.3.3.4. Tal y como se discutió, este patrón ya se ha reportado previamente para el fármaco. De igual manera la β CD presentó un patrón de difracción cristalino típico (Sathigari, 2009).



Figura 25. Difractogramas de rayos X de **a**) NCL, **b**) βCD, **c**) PEG, **d**) CIT, **e**) MFT.

En los patrones de difracción del CIT y la MFT no es posible observar los patrones de difracción de β CD y NCL, y únicamente se observa el patrón de difracción de PEG (c), el cual es de mayor intensidad y con picos en 19.42 y 23.74° correspondiente a los planos (1,2,0) y (1,3,0) del cristal triclínico de PEG (Qin, 2019).

A partir de los resultados observados por esta técnica no es posible concluir sobre posibles interacciones entre los componentes β CD y NCL con PEG que diferencíen CIB y CIT.

5.4.6.3. Calorimetría diferencial de barrido

Se investigó la interacción entre los componentes del CIT por medio del análisis de eventos térmicos en los termogramas de flujo de calor obtenidos por calorimetría diferencial de barrido. En la Figura 26. se presentan las curvas de DSC de βCD, NCL, PEG, el CIT y la MFT correspondientes a los termogramas de flujo de calor de las muestras en el rango de 20 °C hasta 250 °C.



Figura 26. Termogramas de flujo de calor de **a**) βCD, **b**) NCL, **c**) PEG, **d**) MFT, **e**) CIT.

En el termograma de flujo de calor de βCD, se muestra un evento endotérmico amplio entre las temperaturas de 75 °C y 150 °C, este evento se debe a la pérdida de moléculas de agua (Pralhad, 2004; Sathigari, 2009). En el caso de NCL, esta presenta un evento endotérmico en 230 °C, el cual corresponde a la temperatura a la que NCL alcanza su punto de fusión (Van Tonder, 2004). El termograma de PEG reveló una transición endotérmica en 58° C presentada por el proceso de fusión de PEG (Qi, 2014; Qin, 2019).

Al analizar los termogramas del CIT y la MFB, es posible observar que, los eventos térmicos presentados por ambas muestras corresponden a la fusión de PEG. Sin embargo, el evento endotérmico en la mezcla física ocurrió a la misma temperatura que en PEG, a diferencia del CIT, en el que el PEG presentó el evento de fusión a 51 °C. Esta diferencia de temperatura indica que en el CIT los componentes interaccionan de forma distinta a la MFT. Tanto en la mezcla física como en el CIT, la ausencia del evento de fusión de NCL puede deberse a la cantidad relativa de NCL con respecto a PEG, que es mínima.

5.4.6.4. Análisis termogravimétrico

En análisis termogravimétrico realizado a NCL, β CD, PEG, el CIT y la MFT, se mostró la degradación de cada compuesto al aumentar la temperatura. En la Figura 27. se presentan las curvas de pérdida de peso de los compuestos al calentarlos desde una temperatura aproximada de 27°C hasta 500°C.



Figura 27. Termogramas de pérdida de peso de **a**) βCD, **b**) NCL, **c**) PEG, **d**) MFT, **e**) CIT.

Para β CD se observa que en el rango de temperatura entre 75 a 100 °C hubo una pérdida de peso inicial de 15 % atribuida a agua (N. Li & Xu, 2010), este comportamiento térmico de β CD sugiere que el compuesto sufre un proceso de deshidratación por debajo de 100 °C. Una segunda etapa de pérdida de peso tomó lugar de 310 a 330 °C debido a la descomposición térmica de β CD (Butt et al., 2023), proceso que ocurre abruptamente, reduciendo la masa remanente 75 %.

Tal y como se discutió en la sección 5.3.3.3. la curva de descomposición térmica de NCL muestra un comportamiento estable en el intervalo de temperatura ambiente hasta los 80 °C, temperatura a la cual la masa de la muestra disminuye 1 % resultado de la evaporación de moléculas de agua en el fármaco. Al seguir con el aumento de temperatura, la masa de NCL se mantuvo constante hasta 230°C, a esta temperatura, el fármaco comienza a perder masa, lo cual es atribuido a un proceso de fusión (Pardhi et al., 2017). Este evento tuvo lugar hasta los 350°C, temperatura a la cual la masa remanente de NCL fue de 10 % del peso inicial.

Se encontró que el perfil de degradación de PEG es gradual, el cual tiene lugar de 200 a 390°C (Babinot et al., 2011), rango en el que, la masa de la muestra disminuye en 95 %. El CIT presenta una degradación térmica a temperatura más alta con respecto a PEG, esta tuvo lugar de 290 a 415°C. Al comparar la degradación de PEG a las curvas de pérdida de peso del CIT y de la MFT, es posible observar que las últimos dos son diferentes a la curva de polímero, ya que, su degradación térmica ocurre a temperaturas más altas. Este fenómeno es indicativo de una interacción molecular distinta, en la que los tres componentes toman presencia, como lo podría ser el caso de la formación del complejo ternario.

Al comparar CIT y la MFT también es posible observar que, el CIT tiene un perfil de degradación más alto, lo cual también es indicativo de la formación del complejo, puesto que, los CIs tienden a ser más estables que los agregados como resultado de que las interacciones en los CIs suelen ser más fuertes (Mura, 2015).

5.5. Solubilidad de niclosamida en sistemas con exceso de β-ciclodextrina y polietilenglicol

En la Sección 5.4. se demostró que el sistema ternario es conveniente para promover la solubilidad de NCL y se identificó que para preparar el sistema ternario, el orden de adición y el medio son aspectos fundamentales para lograr el mayor aumento de solubilidad de NCL. Además, a partir de observaciones realizadas de los CITs en función de su apariencia y de la cantidad de NCL en cada formulación, se establecieron algunos postulados para explicar las interacciones entre β CD, NCL y PEG.

A pesar de que la mezcla EtOH/H₂O resultó ser el mejor medio para obtener el sistema ternario, la cantidad de NCL contenida en las formulaciones es mínima y no se puede determinar el cambio en la solubilidad del fármaco cuando esta como CIT. Por lo tanto, para determinar el impacto de un sistema ternario en la solubilidad de NCL se exploró otra manera de preparar el CIT.

En este sentido, se realizaron mezclas del sistema ternario β CD/NCL/PEG. Para ello, se suspendió NCL a una concentración fija (5mM) en las disoluciones de β CD preparadas con las cantidades indicadas en la Tabla 6 en los medios H₂O, PBS y TBE, de manera que también se investigó el efecto de la ionización del fármaco en el aumento de su solubilidad de NCL. Posteriormente, se adicionó PEG en las suspensiones, de acuerdo con las cantidades presentadas en la Tabla 7. El orden de adición seguido para la preparación de las mezclas fue el que se presentó en la Sección 6.4.4.3. en la preparación del CIT 3 β CD/NCL/PEG. La cantidade de PEG correspondió inicialmente a la de CIT 3, y posteriormente se escalaron las cantidades de β CD y PEG de forma que se exploraron otros excesos estequiométricos en la solubilización de NCL. Las cinco relaciones estequiométricas de la mezcla ternaria β CD/NCL/PEG investigadas fueron 1:1:3.5, 2:1:7, 3:1:10.5, 8:1:28, y 15:1:52.5. Los excesos de PEG se establecieron en relación de 3.5 veces la estequiometría de β CD.

Para evaluar la influencia de PEG en la solubilidad de NCL también se prepararon las mezclas PEG/NCL a diferentes estequiometrías. Los excesos de PEG empleados en este estudio fueron los utilizados en el sistema ternario, por lo que, las mezclas del sistema PEG/NCL realizadas tuvieron las siguientes estequiometrías: 3.5:1, 7:1, 10.5:1, 28:1, 52.5:1.

Dado que en la Sección 5.3.2.2. se observó que la cantidad de NCL en las formulaciones de CIB fue baja (en el orden de μ g), tampoco fue posible determinar el cambio en la solubilidad de NCL al estar en CIB. Entonces, en este estudio se aprovechó también para explorar el cambio de solubilidad de NCL al emplear excesos de β CD a una concentración de NCL fija (5mM) en mezclas del sistema binario. De esta manera, se evaluó el efecto del exceso de β CD en la solubilización de NCL. Las relaciones estequiométricas del sistema β CD/NCL exploradas en estos experimentos fueron 1:1, 2:1, 3:1, 8:1 y 15:1.

A continuación se presentan los resultados de los estudios en los que se investigó el efecto en la solubilidad de NCL al emplear las mezclas de los sistemas binario y ternario, así como de la mezcla PEG/NCL. En el estudio, fue posible observar el efecto de los excesos estequiométricos de β CD o de PEG en la solubilidad de NCL en las mezclas β CD/NCL y PEG/NCL, respectivamente, así como el efecto de los excesos estequiométricos de β CD y PEG en la solubilidad del fármaco en la mezcla β CD/NCL/PEG. El estudio se realizó para los tres sistemas mencionados en cada medio de trabajo: H₂O, PBS y TBE. Primero se evaluó el exceso de β CD, posteriormente, el exceso de PEG, y finalmente, los excesos de β CD y PEG en conjunto.

5.5.1. Efecto de los excesos de β -ciclodextrina y polietilenglicol en la solubilidad de niclosamida en H₂O

En la Figura 28. se presentan los cambios de solubilidad de NCL obtenidos con las mezclas de los sistemas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG. Los cambios de solubilidad de NCL referidos en el presente análisis se establecieron respecto al valor de S_0 (Tabla S1).



Figura 28. Cambio de solubilidad de NCL en sistemas βCD/NCL, PEG/NCL, βCD/NCL/PEG en H₂O.

Se registraron cambios de solubilidad de NCL con las cinco estequiometrías de la mezcla β CD/NCL. Para la mezcla con relación 1:1, se alcanzó una solubilidad de NCL de 1.82 µg/mL, significa que se aumentó en un 11 % la solubilidad de NCL (Tabla S1). Con la estequiometría 15:1 se logró aumentar la solubilidad de NCL a 2.34 µg/mL, lo cual constituye una diferencia de 0.7 µg/mL, este cambio representa un aumento de 42.8 % en la solubilidad de NCL.

Con base en este comportamiento, al aumentar la proporción de β CD en la mezcla con NCL, se observa una dependencia directa en el aumento de la solubilidad del fármaco. Por lo que, es posible afirmar que se presenta el mismo comportamiento de aumento lineal en la solubilidad de NCL, al presentado con el CIB β CD/NCL en la Sección 5.2.1.

Con el sistema correspondiente a la mezcla PEG/NCL, se registraron cambios en la solubilidad de NCL a medida que se varió el exceso de PEG. Es posible observar que, con los excesos de PEG de 3.5:1, 7:1 y 10.5:1, la solubilidad de NCL en la mezcla no se ve modificada respecto a S_0 . Al mezclar NCL con excesos de 28:1 y 52.5:1 de PEG, se logró aumentar la solubilidad de NCL en 12 y 21 %, respectivamente. Si bien estos resultados denotan que el sistema PEG/NCL favorece la solubilización del fármaco, es necesario utilizar un exceso grande de polímero para lograr alcanzar un cambio susbstancial de solubilidad, de forma que no sería conveniente por las cantidades de polímero requeridas.

El aumento de solubilidad de NCL en la mezcla PEG/NCL podría suceder como resultado de las interacciones postuladas en la Sección 5.4.4., en la que se hipotetiza que podrían ocurrir interacciones de tipo puente de hidrógeno entre los hidrógenos de los (-CH₂) en las cadenas de PEG y los grupos donadores de puentes de hidrógeno (-OH, =O, -NH) en NCL. Otra posible interacción, sería en la que las cadenas hidrocarbonadas del PEG, orientan sus secciones menos polares (-CH₂) hacia las moléculas de NCL y se agrupen por similitud de polaridades, de manera que los grupos hidrofílicos en las cadenas de PEG (-CH₂, -Ö-) se orienten hacia la solución y aumenten la solubilidad aparente de NCL al formar puentes de hidrógeno con el medio.

El uso de la mezcla β CD/NCL/PEG en todas sus relaciones estequiométricas promovió un aumento en la solubilidad de NCL. Desde la estequiometría con relación 1:1:3.5 se alcanzó una solubilidad de 2.04 µg/mL, este cambio representa un incremento de 24.5 % en la solubilidad de NCL. Si se comparan las estequiometrías 2:1:7 de la mezcla β CD/NCL/PEG con la que se logró aumentar la solubilidad de NCL en 59 %, y la estequiometría 15:1 de la mezcla β CD/NCL con la que se logró aumentar 42.8 % la solubilidad de NCL, es posible evidenciar que la adición de PEG en la mezcla ternaria permitió disminuir el exceso de β CD de 15 a sólo 2 y aún así aumentar la solubilidad de NCL en 16 %.

El mayor aumento de solubilidad de NCL alcanzado con la mezcla β CD/NCL/PEG se registró con la estequiometría 15:1:52.5, con la que se alcanzó una solubilidad de 4.22 µg/mL, lo cual representa un aumento de 158.1 % con respecto al valor de S_0 . Este aumento se debe a que las interacciones discutidas en la Sección 5.4.4. que ocurren al adicionar PEG favorecen la solubilización de NCL.

Si bien el incremento más significativo en solubilidad de NCL es el que se registró con la estequiometría 15:1:52.5 de la mezcla β CD/NCL/PEG, las formulaciones con estequiometría 2:1:7 y 3:1:10.5 son las más destacables en función de los excesos de β CD y de PEG empleados en consideración con los valores de solubilidad de NCL alcanzados. Con estas estequiometrías se incrementó la solubilidad de NCL en 59 y 87.2 %, respectivamente.

5.5.2. Efecto de los excesos de β -ciclodextrina y polietilenglicol en la solubilidad de niclosamida en PBS

También se prepararon mezclas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG en PBS para estudiar el efecto de los excesos de β CD y PEG en la solubilidad de NCL. La razón fue investigar si la ionización del fármaco promueve el aumento en su solubilidad. Se espera que el aumento en el número de especies de NCL ionizadas favorezca interacciones ión-dipolo con el medio y consecuentemente ocurra un mayor aumento en solubilidad de NCL en comparación con las mezclas en H₂O.

En la Figura 29. se presenta la gráfica de cambio en la solubilidad de NCL del estudio realizado en el medio de trabajo PBS. Los cambios de solubilidad de NCL referidos en el presente análisis se establecieron respecto al valor de S_0 (Tabla S2).



Figura 29. Cambio de solubilidad de NCL en sistemas βCD/NCL, PEG/NCL, βCD/NCL/PEG en PBS.

Primeramente, se evaluó la mezcla β CD/NCL. En este caso, los valores de solubilidad de NCL alcanzados con las primeras estequiometrías (1:1, 2:1 y 3:1) se encuentran en el rango del valor de S_0 (1.71±0.28), de manera que la solubilidad del fármaco en la mezcla no se ve modificado respecto a S_0 . Con las relaciones estequiométricas 8:1 y 15:1 se alcanzaron valores de solubilidad de NCL de 2.27 y 3.44 µg/mL, lo cual representa respectivamente un aumento de 32.8 y 101.8%.
Al igual que en el medio H₂O, con la mezcla β CD/NCL se observó una relación de aumento de solubilidad del fármaco a medida que aumenta el exceso de β CD, este comportamiento tambien se observó al estudiar el cambio de solubilidad del CIB β CD/NCL en PBS. Los valores de solubilidad registrados con la mezcla β CD/NCL en PBS son ligeramente inferiores a los registrados en H₂O para las primeras cuatro estequiometrías, es hasta la estequiometría 15:1 en la que la ionización de especies de NCL a pH 7.4 favorece la solubilización de NCL en comparación de H₂O.

Posteriormente, se prosiguió a investigar el uso de la mezcla PEG/NCL. Se observó que en las cinco estequiometrías del sistema, el PEG aumentó ligeramente la solubilidad de NCL como consecuencia de las interacciones discutiudas en la Sección 5.5.1. entre PEG-NCL. Este fenómeno adicionalmente podría ocurrir debido a la ionización de especies de NCL a pH 7.4, lo que favorece interacciones ión-dipolo con las moléculas de H₂O.

El mayor aumento en la solubilidad de NCL en el medio PBS fue el que se observó con la estequiometría 52.5:1. La solubilidad de NCL registrada fue 3.70 μ g/mL, lo que representa un aumento de 116.4 %. Con esta misma estequiometría de la mezcla PEG/NCL en H₂O se logró incrementar la solubilidad de NCL en 21.3% a un valor final de 1.99 μ g/mL. Esta diferencia en el porcentaje de aumento en la solubilidad, es resultado de la ionización del fármaco a pH 7.4, lo cual favorece la solubilidad de NCL en el sistema.

El estudio en el que se investigó el cambio en la solubilidad del fármaco con la mezcla β CD/NCL/PEG, se registraron incrementos en la solubilidad de 14.4, 37.8, 141.9, 174.8 % con las estequiometrías 1:1:3.5, 2:1:7, 3:1:10.5 y 8:1:28, respectivamente. Es de importancia mencionar que al emplear la estequiometría 15:1:52.5, el valor solubilidad de NCL registrado fue 17.35 μ g/mL, lo cual representa un aumento de 917.3 %.

Al comparar la solubilidad de NCL alcanzada con la estequiometría 15:1:52.5 de la mezcla β CD/NCL/PEG en PBS, con la misma estequiometría de esta mezcla en H₂O, es posible observar una diferencia de 759.2 % en el aumento de solubilidad. Posiblemente el pH influye al promover las interacciones de tipo ión-dipolo, sin embargo, el aumento en solubilidad de NCL ocurre en conjunto con los excesos de β CD y PEG empleados, en este estudio se ha identificado que los excesos estequiométricos en la mezcla y la ionización de NCL ocasionan el aumento en solubilidad.

5.5.3. Efecto de los excesos de β -ciclodextrina y polietilenglicol en la solubilidad de niclosamida en TBE

En este estudio se empleó el medio TBE con el objetivo de aumentar la ionización del fármaco y promover el aumento de su solubilidad sin la necesidad de utilizar los excesos estequiométricos de βCD y PEG descritos en las secciones anteriores.

En la Figura 30. se presentan los resultados obtenidos de los experimentos de cambio de solubilidad de NCL en el medio de trabajo TBE.



Figura 30. Cambio de solubilidad de NCL en sistemas βCD/NCL, PEG/NCL, βCD/NCL/PEG en TBE.

Se observa que en el caso del sistema β CD/NCL, a comparación de sus contrapartes en H₂O y PBS, se registró un mayor aumento en la solubilidad de NCL en toda la serie. La formulación 3:1 alcanzó una solubilidad de 4.30 µg/mL, superior a cualquier valor registrado con el sistema β CD/NCL en H₂O y PBS. Este valor de solubilidad de 4.30 µg/mL representa un aumento de 201.8 % respecto al valor de *S*₀ (Tabla S3). Estos resultados muestran que, aumentar el pH del medio de trabajo repercute en el aumento de la solubilidad del fármaco, lo que hace posible utilizar un menor cantidad de β CD

Una menor cantidad de β CD en la mezcla resultaría en un menor aumento de solubilidad. Sin embargo, los resultados muestran que utilizar una menor cantidad de β CD sin que disminuya la

solubilidad de NCL, es posible, debido al posible aumento en las interacciones de tipo ión-dipolo entre las moléculas del fármaco y el medio, que se favorecerían a pH 8.7. De esta forma, el resultado global es de aumento en la solubilidad de NCL.

Al igual que en H₂O y PBS, con la mezcla PEG/NCL se registró un aumento ligero en la solubilidad de NCL en las estequiometrías presentadas. Los valores de solubilidad de NCL alcanzados con las formulaciones 28:1 y 52.5:1 fueron 2.14 y 2.44 µg/mL, lo cual representó un aumento de 49.6 y 70.6 % respectivamente. El aumento de solubilidad de NCL alcanzado con esta mezcla es resultado de las interacciones que podrían ocurrir entre PEG y el fármaco en el medio TBE.

En el medio básico TBE, aumenta la concentración de iones hidroxilo (OH⁻), lo cual podría inducir un aumento en las interacciones por puentes de hidrógeno entre PEG y los iones del medio (Rincón-López et al., 2022). Si esto ocurre, la interacción de PEG con moléculas de NCL se vería reducida, lo cual explica que el aumento de solubilidad sea menor en comparación con el registrado en PBS, medio en el que la concentración de iones OH⁻ es menor.

La mezcla con la que se logró el mayor aumento de solubilidad de NCL fue el sistema β CD/NCL/PEG. Con la relación estequiométrica 2:1:7 se registró una solubilidad de 12.23 µg/mL, lo cual representó un aumento de 757.9 %. Con la estequiometría 3:1:10.5 se alcanzó una solubilidad de 31.18 µg/mL, este cambio en solubilidad equivale a un aumento de 2087.7 %.

Al realizar una comparación de los porcentajes de aumento de solubilidad alcanzados con la estequiometría 3:1:10.5 de la mezcla βCD/NCL/PEG en TBE (2087.7 %), y los porcentajes alcanzados con la misma relación estequiométrica en los medios H₂O y PBS, se observa que en H₂O el aumento de solubilidad de NCL registrado fue de 87.2 %, mientras que en PBS fue 141.9 %. De esta manera es posible afirmar que el aumento del pH del medio favorece la solubilización de NCL y en consecuencia, las proporciones estequiométricas de los componentes de las mezclas ternarias disminuyen, lo cual es conveniente para optimizar la cantidad de βCD y PEG en la mezcla.

Los mayores aumentos de solubilidad se obtuvieron con las estequiometrías 8:1:28 y 15:1:52.5, con los que se registaron valores de solubilidad de 35.29 y 38.70 μ g/mL. Estos aumentos en la solubilidad de NCL representaron un incremento de 2376.5 y 2666.3 %, respectivamente. Estas estequiometrías con mayor exceso de β CD y PEG, son con las que se logró aumentar en mayor medida la solubilidad de NCL.

De acuerdo con la hipótesis planteada inicialmente, se corrobora que el uso del sistema ternario compuesto por β CD, PEG y NCL favorece la solubilidad del fármaco, y que, además el pH influye en la solubilización de NCL.

La mezcla con la que se logró incrementar en mayor medida la solubilidad de NCL fue la mezcla β CD/NCL/PEG con excesos estequiométricos 15:1:52.5. Con esta formulación, el aumento en la solubilidad del fármaco fue de 2666.3 %. Sin embargo, las cantidades de componentes son bastante altas por lo que las estequiometrías más favorables son 2:1:7 y 3:1:10.5 en el medio TBE.

La Figura 31 resume las osbervacviones previamente discutidas, en la que se comparan los valores de solubilidad de NCL registrados con la relación estequiométrica más alta de cada mezcla, en los tres medio de trabajo.





En el primer grupo de barras correspondiente a la mezcla β CD/NCL, es posible observar que el aumento de solubilidad de NCL se registró en los medios de trabajo en el orden TBE > PBS > H₂O. El aumento alcanzado en TBE representó 4.3 veces más que en agua y 2.9 veces más que en PBS. El cambio en la solubilidad de NCL presentado en los tres medios de trabajo, refleja el efecto de aumentar el pH, con el que, aumenta el porcentaje de especies ionizadas de NCL y se favorecerían interacciones ión-dipolo entre el fármaco y las moléculas de H₂O circundantes.

Al igual que la mezcla β CD/NCL, la mezcla β CD/NCL/PEG presentó la misma tendencia en cambio de solubilidad en el orden TBE > PBS > H₂O. Como es posible observar en el tercer grupo de barras, el cambio de solubilidad fue mayor en este sistema. En TBE se registró un aumento 9.3 veces mayor con respecto a agua y 2.2 veces con respecto a PBS.

Al realizar una comparacion de los sistemas βCD/NCL y βCD/NCL/PEG, la mezcla ternaria en H₂O registró una solubilidad de NCL 1.8 veces mayor a la mezcla binaria. En PBS el aumento en solubilidad de NCL fue 5 veces mayor el registrado con la mezcla ternaria que con la mezcla binaria. Por último, en TBE el aumento en solubilidad registrado con la mezcla ternaria fue 3.9 veces mayor al alcanzado con la mezcla binaria. Al comparar ambos sistemas, es posible afirmar que las interacciones discutidas en la Sección 5.4.4. que ocurren al adicionar PEG favorecen la solubilización de NCL.

La mezcla PEG/NCL, a diferencia de los dos sistemas anteriores no condujó un cambio sustancial en la solubilidad de NCL, lo cual muestra que, el aumento de solubilidad de NCL podría estar dado por una acción sinérgica entre βCD con PEG y no sólo por PEG.

Los CITs a diferencia de los CIBs, proporcionan una mayor estabilidad en la estructura global del sistema (Messner et al., 2010b). El mecanismo mediante el cual los polímeros promueven la estabilización el sistema depende de la estructura de los CIBs, debido a que pueden interaccionar de distintas formas con los complejos (Faucci & Mura, 2001). Estas interacciones pueden ocurrir por medio de fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, o fuerzas de dispersión de London (Ribeiro et al., 2003).

La formación de CITs ha sido ampliamente estudiada y es de interés el mecanismo en la que ocurre esta formación (Mane, 2022; Suvarna, 2022). El argumento que comparten estas investigaciones es que el papel de los polímeros en los sistemas ternarios es estabilizar los CIs mediante la interacción con las CDs y las moléculas huésped durante la formación del complejo por medio de puentes de hidrógeno, lo que ocasiona un aumento en la solubilidad (Crestani De Miranda et al., 2011). El PEG es un polímero que ya se ha reportado como componente ternario en la formulación de CITs. De acuerdo con investigaciones previas, se ha empleado PEG 6000 en conjunto con β CD para la formación de CITs solubles de silibinina y diosmina. En ambas investigaciones se ha determinado que la adición de PEG en los CIBs ha resultado en un aumento en la solubilidad de los compuestos mencionados (Ansari, 2015; Anwer, 2014).

En este estudio, se decidió investigar el papel del PEG como agente ternario en el sistema con β CD y NCL. De acuerdo con los resultados presentados, el uso de PEG en el complejo β CD/NCL/PEG permitió mejorar la solubilidad de NCL. Se ha reportado que PEG es una molécula que presenta actividad superficial (Rego et al., 2017). Al estar en solución migra a la interfáz liquido-aire y disminuye la tensión superficial del disolvente (Singh et al., 2017). Debido a que el mayor aumento de solubilidad de NCL ocurre cuando se añade PEG como agente ternario, y que PEG es una molécula superficialmente activa, en el presente estudio se investigó si existe una relación entre el cambio en la solubilidad de NCL y el abatimiento de la tensión superficial en el medio como posible mecanismo de solubilización de NCL.

5.6. Mediciones de tensión superficial

Uno de los métodos empleados para aumentar la solubilidad de fármacos es el uso de agentes tensoactivos. El mecanismo mediante el cual ocurre el aumento de solubilidad es que la disminución en la tensión superficial (σ) entre el fármaco y el disolvente, mejora la mojabilidad del fármaco (Thorat et al., 2011).

Al abatirse la tensión superficial, las moléculas del fármaco se dispersan más facilmente, lo que puede aumentar su solubilidad. Se ha estudiado que algunos polímeros como la hidroxietil celulosa (HEC), la polivinilpirrolidona (PVP) o el PEG, abaten la tensión superficial del medio a medida que aumenta su concentración, por lo que se han denominado surfactantes poliméricos (Manglik et al., 2001).

En esta sección se presentan los resultados de las mediaciones de tensión superficial dinámica de los sistemas PEG, β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG. Como referencia se incluyen las curvas de tensión superficial de β CD y NCL en cada una de las gráficas. Los medios en los que se realizaron las mediciones fueron H₂O, PBS y TBE.

5.6.1. Sistema polietilenglicol

En la Figura 32 se presentan las curvas de actividad superficial del PEG en los tres distintos medios de trabajo.



Figura 32. Curvas de actividad superficial de PEG en H₂O, PBS y TBE.

De acuerdo con los resultados presentados, el rango de abatimiento de tensión superficial ocasionado por PEG en los tres medios fue de 10.7-13.2 mN/m, con respecto a la tensión superficial del agua (72.8 mN/m). La disminución de la tensión superficial ocasionada por PEG no cambia en función del medio. Es decir, no hay influencia del pH en la actividad superficial de PEG.

Es posible observar que en el medio TBE a tiempos cortos en el intervalo de 0 a 100 minutos el descenso es gradual. Este fenómeno puede deberse a que PEG se haya plegado de una manera distinta y provocara un cambio el coeficiente de difusión, sin embargo, el abatimiento fue el mismo al equilibrio.

El efecto que tiene el PEG estudiado en reducir la tensión superficial del medio se debe a su comportamiento como surfactante polimérico. Se ha reportado que, pesos moleculares mayores a 4700 g/mol, confieren al PEG un carácter anfifílico (Wu et al., 2014a). La anfifilícidad de PEG es resultado de la hidrofobicidad de los grupos metileno (-CH₂) y la hidrofilicidad debida a la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos -Ö- y -CH₂ presentes en la cadena y las moléculas de H₂O del medio (Rincón-López et al., 2022).

El PEG es soluble en agua debido a su capacidad de formar puentes de hidrógeno. Al ser una molécula anfifílica, el PEG en solución adopta una conformación de resorte (Rego, 2017), de forma que las regiones menos polares de la cadena se orientan hacia el interior del resorte y los grupos capaces de formar puentes de hidrógeno hacia el seno de la solución (Figura 33.– A). La disminución de la tensión superficial ocurre como resultado de la adsorción del PEG en la interfaz líquido-aire (Singh et al., 2017). Al adsorberse en la interfaz, el polímero se desenrolla adaptando una conformación lineal (Figura 33.– B). Por lo tanto, esta podría ser una razón del aumento de solubilidad de NCL en los sistemas PEG/NCL.



Figura 33. Representación del sistema PEG en solución. A) Conformación de resorte. B) Conformación lineal.

5.6.2. Sistema β-ciclodextrina/niclosamida



En la Figura 34. se presentan las curvas de actividad superficial del sistema βCD/NCL.

Figura 34. Curvas de actividad superficial del CIB βCD/NCL en H₂O, PBS y TBE.

El valor de tensión superficial para β CD es 72 mN/m, mientras que para NCL es de 64.9 mN/m. La β CD por sí sola no presenta actividad superficial, sin embargo, el sistema β CD/NCL en H₂O resultó en un valor de 67.8 mN/m. De esta forma es posible decir que, la actividad superficial en el sistema la confiere NCL.

Además de la exploración de la formación de CIs por técnicas espectroscópicas, se han empleado cambios en las propiedades fisicoquímicas para investigar si un fármaco se ha incluido en la cavidad de la CD (Kundu et al., 2017). Se ha estudiado la formación de CIBs por medio de cambios en la tensión superficial del medio y se ha encontrado que la formación de algunos CIBs resulta la disminución de la tensión superficial del disolvente (Süle et al., 2009). Con base en lo anterior, el abatimiento en la tensión superficial ocasionado por este sistema podría respaldar la formación del CIB.

El caso del sistema β CD/NCL en los medios de trabajo PBS y TBE, mostraron que la tensión superficial disminuye a 64 mN/m. Al aumentar el porcentaje de ionización de NCL se genera un complejo con mayor actividad superficial. En ambos medios existe un mayor número de interacciones debido a la presencia de iones, lo que se refleja en la disminución en la tensión superficial. Si bien este comportamiento toma presencia al aumentar el pH, no es posible distinguir un cambio entre ambos amortiguadores, de forma que podría deberse a que exista una saturación en la formación del complejo.

Es posible observar que, para el caso de la curva del sistema β CD/NCL en H₂O el cambio en la tensión superficial ocurre de forma gradual, a comparación de los sistemas en medios amortiguadores donde la pendiente es más pronunciada. El cambio en la tensión superficial del sistema en PBS y TBE ocurre de manera inmediata por lo que, estos dos sistemas tienen mayor actividad superficial, y les es más fácil desplazarse a la interfaz líquido-aire, que al sistema en H₂O. El cambio gradual en H₂O es resultado de que ya sea en bulto, o en la superficie, el sistema se rearregla de forma que le toma tiempo alcanzar el valor en equilibrio.

5.6.3. polietilenglicol/niclosamida

El caso del sistema PEG/NCL es destacable ya que, este fue el sistema que presentó mayor actividad en superficie. En la Figura 35. se presentan las curvas de tensión superficial del sistema PEG/NCL en H₂O, en PBS y en TBE.



Figura 35. Curvas de actividad superficial complejo PEG/NCL.

Los valores de tensión superficial alcanzados en los distintos medios fueron 53.5 mN/m en H₂O, 49.4 mN/m en TBE y 47.7 mN/m en PBS. Los valores de tensión superficial registrados por el abatimiento ocasionado por PEG y NCL fueron 61.2 y 64.9 mN/m, respectivamente. De forma que el sistema PEG/NCL logra disminuir más la tensión superficial.

En la Figura 36. se representa en un esquema las interacciones inter e intramoleculares de NCL, así como aquellas que podrían ocurrir en el sistema PEG/NCL.



Figura 36. Representación esquemática de interacciones de NCL y del sistema PEG/NCL.

Las interacciones NCL-NCL son la razón del por qué este fármaco es tan insoluble. Tal y como se mencionó en la Sección 1.1.2, la NCL tiene interacciones intermoleculares e intramoleculares que la hacen muy insoluble. La magnitud de la fuerza total de estas interacciones NCL-NCL impide que las moléculas de H₂O no puedan interaccionar con los clústeres del fármaco.

La disminución de tensión superficial alcanzada con el sistema PEG/NCL es la mayor respecto a los otros sistemas. En este caso, PEG favorece la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, pero, también interacciona con moléculas de fármaco, si bien PEG no logra romper las interacciones intermoleculares de NCL, evita la formación de más clústeres de NCL, por lo que, se generan interacciones con el mismo PEG. Estas nuevas interacciones ocurren cuando PEG se acomoda de forma que sus regiones menos polares interactúan con NCL, y los hidrógenos de los grupos metileno se orientan al exterior para formar puentes de hidrogeno con el medio, de esta forma, ocurre la formación de un nuevo agregado.

Al aumentar el pH del medio, las interacciones intermoleculares NCL-NCL disminuyen debido a que incrementa la cantidad de especies de NCL ionizadas. Esta ionización favorece interacciones NCL-PEG, como la formación de puentes de hidrógeno entre el oxígeno o el nitrógeno de la amida en NCL con los metilenos en PEG. La ionización afecta las interacciones intermoleculares entre NCL-NCL, y favorece interacciones NCL-PEG, como resultado, se vuelve un agregado más hidrofóbico relativo a PEG y ocasiona un aumento en la actividad superficial.

La tensión superficial disminuye más en el medio PBS que en el medio TBE, este comportamiento no presenta correlación con el aumento en solubilidad de NCL. En el medio es TBE, la ionización de más del 95% de especies de NCL desfavorecen en cierta medida las interacciones con PEG y en cambio las moléculas de NCL optan por ir directamente a la solución, es decir, al seno

volumétrico. En PBS 70% de las especies de NCL se encuentran ionizadas, este podría ser el punto de ionización más optimo, en el que la actividad superficial del complejo es la mayor.

5.6.4. βciclodextrina/niclosamida/polietilenglicol

El sistema ternario β CD/NCL/PEG, presentó menor actividad superficial que el sistema PEG/NCL. El valor de tensión superficial promedio de los tres medios fue 55.4 mN/m. En general todo el sistema aumenta su solubilidad y este fenómeno resulta independiente del pH. En la Figura 37. se presentan las curvas de tensión superficial del sistema β CD/NCL/PEG en los tres medios de trabajo.



Figura 37. Curvas de actividad superficial CIT βCD/NCL/PEG.

En la Figura 38. se presenta un esquema del sistema β CD/NCL/PEG, en el que se representan las interacciones de NCL con β CD y con PEG discutidas en la Sección 5.4.4.3. De acuerdo con esta discusión, las interacciones NCL-NCL, son más fuertes que las interacciones NCL-disolvente y β CD-NCL. El PEG en el sistema "se interpone" entre las moléculas de NCL y da lugar a interacciones NCL-PEG. Al disminuir las interacciones NCL-NCL, el sistema se vuelve menos hidrofóbico y disminuye su actividad superficial. La disminución en la hidrofobicidad al adicionar PEG, también ocurre como resultado de la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos de hidrógeno en las cadenas de PEG orientados hacia el exterior del sistema y las moléculas de H₂O del medio.



Figura 38. Representación esquemática del sistema CIT βCD/NCL/PEG.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de actividad superficial y aumento de solubilidad de NCL, en la presente sección se explora la relación entre ambos fenómenos. En la Figura 39. se presenta un gráfico en el que se compara la solubilidad de NCL registrada al emplear los sistemas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG contra la actividad superficial de los mismos en H₂O, PBS y TBE.



Figura 39. Comparación de actividad superficial de los sistemas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG en los tres medios de trabajo.

De acuerdo con el gráfico presentado se establecen los siguientes postulados:

- El abatimiento de la tensión superficial ocurre mayoritariamente con el sistema PEG/NCL.
 Sin embargo, este no es el sistema con el que se produce el mayor cambio en la solubilidad de NCL.
- El sistema βCD/NCL es con el que se produce el menor cambio en la tensión superficial.
 Este sistema es más soluble a comparación del sistema PEG/NCL, y ocasiona un aumento en solubilidad de NCL superior al sistema PEG/NCL.
- El sistema βCD/NCL/PEG es el que presenta el mayor aumento de solubilidad de NCL. Sin embargo, en este sistema el cambio en la tensión superficial es menos significativo al sistema PEG/NCL
- La incorporación de βCD resulta en que el sistema βCD/NCL/PEG aumente su hidrofilicidad a comparación del sistema PEG/NCL. De manera que este es el sistema con el que se alcanzó el mayor aumento de solubilidad de NCL.
- El aumento en la solubilidad en el sistema βCD/NCL/PEG, no modifica la tensión superficial del disolvente con respecto al agua (más cercana a H₂O).
- Entre más hidrofóbico es el sistema, tendrá una mayor actividad superficial y por lo tanto la solubilidad sería menor, como lo es en el caso del sistema PEG/NCL. De manera opuesta, un sistema más hidrofílico tendrá una menor actividad superficial y aumentará su solubilidad, como lo es en el caso del sistema βCD/NCL/PEG.
- Si se compara el cambio de tensión superficial que ejerce PEG con respecto a βCD o NCL en H₂O, entonces se observa que la contribución en actividad superficial de los componentes sigue el orden PEG > NCL > βCD.
- Los diferentes valores de pH del medio no influyen en el cambio de tensión superficial

A diferencia de la hipótesis inicial, se rechaza que el abatimiento en la tensión superficial del medio es la razón de que ocurra una mayor solubilidad de NCL. No se logró establecer hasta el momento una relación entre el cambio en la tensión superficial y el cambio en la solubilidad de NCL. Sin embargo, se observó que las interacciones de NCL con βCD o con PEG son las que ocasionan que el sistema se vuelva más hidrofóbico y disminuya la tensión superficial del medio.

6. Conclusiones

- Por medio del estudio de solubilidad de fases del sistema βCD/NCL fue posible establecer que la βCD ocasiona un aumento lineal en la solubilidad de NCL, lo cual significa que da origen a un complejo soluble en el intervalo de concentraciones de βCD estudiado.
- Se prepararon los CIBs βCD/NCL y se encontró que cuando el CIB se prepara por cosolvencia en la mezcla EtOH/H₂O, se obtiene una mayor cantidad de NCL complejada en comparación con el CIT preparado en el medio con pH 8.7. Este resultado muestra que el medio de preparación tiene un impacto significativo en la formación de los CIBs, lo que puede tener implicaciones importantes para su aplicación en la mejora de la solubilidad de NCL.
- La inclusión de la NCL en la cavidad de βCD se corroboró por medio de las técnicas de caracterización espectroscópicas y térmicas realizadas a CIB βCD/NCL, lo cual es indicativo de que existe una interacción entre el fármaco y la cavidad de βCD. Sin embago, las bajas cantidades de NCL complejada obtenidas con los CIBs, demuestran que la preparación de la formulación binaria no es eficiente, por lo que se tomó la decisión de preparar los CITs.
- El estudio de solubilidad de fases bajo la adición de PEG demostró que el polímero aumenta la cantidad de NCL solubilizada en el CIB βCD/NCL, estos hallazgos respaldan la hipótesis propuesta en la que se indicó que el uso de PEG como agente ternarió incrementaría la solubilidad acuosa de NCL.
- Se prepararon los CITs y se encontró que cuando el orden de adición de los componentes fue primero βCD, posteriormente NCL y por último PEG, se recuperó la mayor cantidad de NCL. Asimismo, se determinó que cuando el CIT se prepara en la mezcla EtOH/H₂O la cantidad de NCL recuperada es mayor a cuando se realiza en H₂O.
- La evaluación del cambio en la solubilidad de NCL al utilizar las mezclas de los sistemas βCD/NCL y βCD/NCL/PEG con excesos estequiométricos de βCD y NCL reveló que el uso de la mezcla βCD/NCL/PEG ocasionó el mayor incremento de solubilidad de NCL. Se observó que el pH del medio en el que se realizaron las mezclas influyó significativamente en los cambios de solubilidad de NCL. Se encontró que los mayores incrementos en la solubilidad de NCL se lograron a un pH 8.7, en segundo lugar a pH 7.4, y por último a pH 5.9. Esta tendencia sugiere que un aumento en el pH del medio conduce a una mayor solubilización de NCL, probablemente debido al incremento en las interacciones ión-dipolo.

Con base en los resultados obtenidos de las mediciones de tensión superficial, se encontró que el mayor abatimiento en tensión superficial sucede con el sistema NCL/PEG, sin embargo este no es el sistema en el que presenta el mayor cambio en la solubilidad, por otro lado, el sistema βCD/NCL/PEG es con el que aumenta más la solubilidad de NCL, no obstante, este sistema no es el que modifica más la tensión superficial. De acuerdo con los resultados, hasta el momento no hay evidencia que indique que los cambios en la tensión superficial tengan una relación con el cambio en la solubilidad de NCL.

7. Bibliografía

- Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2019). Essentials of pharmaceutical analysis. In *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7
- Aleem, O., Kuchekar, B., Pore, Y., & Late, S. (2008). Effect of β-cyclodextrin and hydroxypropyl βcyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 47, Issue 3, pp. 535– 540). https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.02.006
- Al-Hadiya, B. M. H. (2005). Niclosamide: Comprehensive Profile. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, *32*, 67–96. https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32002-8
- Almásy, L., Artykulnyi, O. P., Petrenko, V. I., Ivankov, O. I., Bulavin, L. A., Yan, M., & Haramus, V.
 M. (2022). Structure and Intermolecular Interactions in Aqueous Solutions of Polyethylene Glycol. *Molecules*, 27(8). https://doi.org/10.3390/molecules27082573
- Ansari, M. (2015). Investigations of polyethylene glycol mediated ternary molecular inclusion complexes of silymarin with beta cyclodextrins. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(9), 026–031. https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50905
- Anwer, M. K., Jamil, S., Ansari, M. J., Al-Shdefat, R., Ali, B. E., Ganaie, M. A., Abdel-Kader, M. S., & Shakeel, F. (2014). Water soluble binary and ternary complexes of diosmin with βcyclodextrin: Spectroscopic characterization, release studies and anti-oxidant activity. *Journal of Molecular Liquids*, 199, 35–41. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.08.012
- Babinot, J., Renard, E., & Langlois, V. (2011). Controlled synthesis of well defined poly(3-hydroxyalkanoate)s-based amphiphilic diblock copolymers using click chemistry. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 212(3), 278–285. https://doi.org/10.1002/macp.201000562
- Barbosa, E. J., Löbenberg, R., de Araujo, G. L. B., & Bou-Chacra, N. A. (2019). Niclosamide repositioning for treating cancer: Challenges and nano-based drug delivery opportunities. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 141, pp. 58–69). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.004
- Boudeville, P., & Burgot, J.-L. (1995). A New pH-metric Methodology for the Determination of Thermodynamic Inclusion Constants of GuestlCyclodextrin Complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *84*(9), 1083–1089.

- Brubach, J. B., Mermet, A., Filabozzi, A., Gerschel, A., & Roy, P. (2005). Signatures of the hydrogen bonding in the infrared bands of water. *Journal of Chemical Physics*, *122*(18). https://doi.org/10.1063/1.1894929
- Butt, H., Minhas, M. U., Khan, K. U., Sohail, M., Khalid, I., Rehmani, S., & Suhail, M. (2023). Crosslinking polymerization of beta-cyclodextrin with acrylic monomers; characterization and study of drug carrier properties. *Polymer Bulletin*, *80*(2), 1893–1914. https://doi.org/10.1007/s00289-022-04130-4
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., & Khar, R. K. (2005). Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. *AAPS PharmSciTech*, 6(2), 329–357. http://www.aapspharmscitech.org
- Cheirsilp, B., & Rakmai, J. (2017a). Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biology, Engineering and Medicine, 2*(1). https://doi.org/10.15761/bem.1000108
- Cheirsilp, B., & Rakmai, J. (2017b). Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biology, Engineering and Medicine, 2*(1). https://doi.org/10.15761/bem.1000108
- Chen, W., Mook, R. A., Premont, R. T., & Wang, J. (2018a). Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. In *Cellular Signalling* (Vol. 41, pp. 89–96). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.04.001
- Chen, W., Mook, R. A., Premont, R. T., & Wang, J. (2018b). Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. In *Cellular Signalling* (Vol. 41, pp. 89–96). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.04.001
- Crestani De Miranda, J., Elyan, T., Martins, A., Veiga, F., & Gomes Ferraz, H. (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. In *Article Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 47, Issue 4).
- Dahan, A., Miller, J. M., & Amidon, G. L. (2009). Prediction of solubility and permeability class membership: Provisional BCS classification of the world's top oral drugs. In *AAPS Journal* (Vol. 11, Issue 4, pp. 740–746). https://doi.org/10.1208/s12248-009-9144-x
- Davis, M. E., & Brewster, M. E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceutics: Past, present and future. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 3, Issue 12, pp. 1023–1035). https://doi.org/10.1038/nrd1576
- De Jesus, M. B., Fraceto, L. F., Martini, M. F., Pickholz, M., Ferreira, C. V., & De Paula, E. (2012). Non-inclusion complexes between riboflavin and cyclodextrins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(6), 832–842. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01492.x
- D'souza, A. A., & Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 13, Issue 9, pp. 1257–1275). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485
- Faucci, M. T., & Mura, P. (2001). Effect of water-soluble polymers on naproxen complexation with natural and chemically modified β-cyclodextrins. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(9), 909–917. https://doi.org/10.1080/03639045.2020.12098150
- Ferino-Pérez, A., Portorreal, Q., Gamboa-Carballo, J. J., Minofar, B., Gaspard, S., & Jaúregui-Haza, U. J. (2023). Competitive formation of molecular inclusion complexes of chlordecone and βhexachlorocyclohexane with natural cyclodextrins: DFT and molecular dynamics study. *Journal of Molecular Modeling*, 29(6). https://doi.org/10.1007/s00894-023-05600-w

- Gatica, E., Natera, J., Pajares, A., Gambetta, C., Sancho, M. I., Massad, W. A., & García, N. A. (2017). Cyclodextrine-nanoencapsulation of niclosamide: Water solubility and meaningful enhancement of visible-light—Mediated sensitized photodegradation of the drug. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 348, 295–304. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.08.015
- Ge, J., Wang, Y., Wang, H., Mao, H., Li, J., & Shi, H. (2020). Thermal properties and shape stabilization of epoxidized methoxy polyethylene glycol composite PCMs tailored by polydopamine-functionalized graphene oxide. *Solar Energy Materials and Solar Cells, 208.* https://doi.org/10.1016/j.solmat.2019.110388
- Gil, V. M. S., & Oliveira, N. C. (1990). On the Use of the Method of Continuous Variations. *Journal* of Chemical Education, 67(6), 473–478. https://pubs.acs.org/sharingguidelines
- Harris, J. M. (1992). Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol). In *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry* (pp. 1–14). https://doi.org/doi:10.1007/978-1-4899-0703-5_1
- Higuchi, T., & Connors, K. (1965). Phase-solubility techniques. Adva Anal Chem Instr, 4, 212–217.
- Hu, L., Zhang, H., Song, W., Gu, D., & Hu, Q. (2012). Investigation of inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl- β-cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1719–1724. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.057
- Jambhekar, S. S., & Breen, P. (2016). Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: Solubilization, binding constant, and complexation efficiency. In *Drug Discovery Today* (Vol. 21, Issue 2, pp. 363–368). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.016
- Jara, M. O., Warnken, Z. N., & Williams, R. O. (2021). Amorphous solid dispersions and the contribution of nanoparticles to in vitro dissolution and in vivo testing: Niclosamide as a case study. *Pharmaceutics*, *13*(1), 1–15. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010097
- Jatwani, S., Chand Rana, A., Singh, G., & Aggarwal, G. (2012). An overview on solubility enhancement techniques for poorly soluble drugs and solid dispersion as an eminent strategic approach. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(4), 942–956. www.ijpsr.com
- Jin, G.-W., Choi, G., Sanoj Rejinold, N., Piao, H., Ryu, Y. B., Kwon, H.-J., Lee, I. C., & Choy, J.-H. (2022). Orally administered niclosamide-based organic/inorganic hybrid suppresses SARS-CoV-2 infection. *BioRxiv*, 2022(07). https://doi.org/10.1101/2022.07.19.500639
- Kadri, H., Lambourne, O. A., & Mehellou, Y. (2018). Niclosamide, a Drug with Many (Re)purposes. *ChemMedChem*, 13(11), 1088–1091. https://doi.org/10.1002/cmdc.201800100
- Kiss, E., Szabó, V. A., & Horváth, P. (2019). Simple circular dichroism method for selection of the optimal cyclodextrin for drug complexation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 95(3–4), 223–233. https://doi.org/10.1007/s10847-019-00938-2
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., & Schubert, U. S. (2010). Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. In *Angewandte Chemie International Edition* (Vol. 49, Issue 36, pp. 6288–6308). https://doi.org/10.1002/anie.200902672
- Kolhe, S., & Chipade, M. (2012). Solubility and Solubilization Techniques-A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1(1), 129–150. www.ijpcsonline.com

- Kundu, M., Saha, S., & Roy, M. N. (2017). Evidences for complexations of β-cyclodextrin with some amino acids by 1H NMR, surface tension, volumetric investigations and XRD. *Journal* of Molecular Liquids, 240, 570–577. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.123
- Li, N., & Xu, L. (2010). Thermal analysis of β-cyclodextrin/Berberine chloride inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 499(1–2), 166–170. https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.10.014
- Li, Y., Li, P. K., Roberts, M. J., Arend, R. C., Samant, R. S., & Buchsbaum, D. J. (2014). Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. In *Cancer Letters* (Vol. 349, Issue 1, pp. 8–14). Elsevier Ireland Ltd. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.003
- Lodagekar, A., Borkar, R. M., Thatikonda, S., Chavan, R. B., Naidu, V. G. M., Shastri, N. R., Srinivas, R., & Chella, N. (2019). Formulation and evaluation of cyclodextrin complexes for improved anticancer activity of repurposed drug: Niclosamide. *Carbohydrate Polymers*, 212, 252–259. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.041
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2012). Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. In *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 101, Issue 9, pp. 3019– 3032). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/jps.23077
- Loftsson, T., Fri, H., & ttir, riksdó. (1998). The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of i-cyclodextrin. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 163).
- Loftsson, T., Fribriksdbttir, H., Sigurisard6ttir ', A. M., & Ueda, H. (1994). The effect of watersoluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. *International Journal of Pharmaceutics*, *110*, 169–177.
- Loftsson, T., FriOriksd, H., & Guc, runn K. (1996). The effect of water-soluble polymers on aqueous solubility of drugs. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 127).
- Loftsson, T., Hreinsdóttir, D., & Másson, M. (2007). The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, *57*(1–4), 545–552. https://doi.org/10.1007/s10847-006-9247-2
- Loftsson, T., & Olafsd, B. J. (1993). Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 1).
- Ma, R., Ma, Z. G., Zhen, C. L., Shen, X., Li, S. L., Li, L., Zheng, Y. F., Dong, D. L., & Sun, Z. J. (2017).
 Design, synthesis and characterization of poly (methacrylic acid-niclosamide) and its effect on arterial function. *Materials Science and Engineering C*, 77, 352–359. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.161
- MacDonald, M. L., Lamerdin, J., Owens, S., Keon, B. H., Bilter, G. K., Shang, Z., Huang, Z., Yu, H., Dias, J., Minami, T., Michnick, S. W., & Westwick, J. K. (2006). Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nature Chemical Biology*, 2(6), 329–337. https://doi.org/10.1038/nchembio790
- Mane, P. T., Wakure, B. S., & Wakte, P. S. (2022). Ternary inclusion complex of docetaxel using βcyclodextrin and hydrophilic polymer: Physicochemical characterization and in-vitro anticancer activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(12), 150–161. https://doi.org/10.7324/JAPS.2022.121216
- Manglik, R. M., Wasekar, V. M., & Zhang, J. (2001). Dynamic and equilibrium surface tension of aqueous surfactant and polymeric solutions. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 25(1–2), 55–64. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0894-1777(01)00060-7

- Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., & Loftsson, T. (2010a). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 387, Issues 1–2, pp. 199–208). https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.035
- Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., & Loftsson, T. (2010b). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 387, Issues 1–2, pp. 199–208). https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.035
- Misra, S. K., Jensen, T. W., & Pan, D. (2015). Enriched inhibition of cancer and stem-like cancer cells via STAT-3 modulating niclocelles. *Nanoscale*, 7(16), 7127–7132. https://doi.org/10.1039/c5nr00403a
- Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 101, pp. 238–250). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.022
- Mura, P. (2015). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 113, pp. 226–238). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.058
- Naqvi, S., Mohiyuddin, S., & Gopinath, P. (2017). Niclosamide loaded biodegradable chitosan nanocargoes: An in vitro study for potential application in cancer therapy. *Royal Society Open Science*, *4*(11). https://doi.org/10.1098/rsos.170611
- Nayak, A. K., & Panigrahi, P. P. (2012). Solubility Enhancement of Etoricoxib by Cosolvency Approach. *ISRN Physical Chemistry*, *2012*, 1–5. https://doi.org/10.5402/2012/820653
- Needham, D. (2022). The pH Dependence of Niclosamide Solubility, Dissolution, and Morphology: Motivation for Potentially Universal Mucin-Penetrating Nasal and Throat Sprays for COVID19, its Variants and other Viral Infections. *Pharmaceutical Research*, 39(1), 115–141. https://doi.org/10.1007/s11095-021-03112-x
- Pardhi, V., Chavan, R. B., Thipparaboina, R., Thatikonda, S., Naidu, V. G. M., & Shastri, N. R. (2017). Preparation, characterization, and cytotoxicity studies of niclosamide loaded mesoporous drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1–2), 202–214. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.007
- Parmar, V., Patel, G., & Abu-Thabit, N. Y. (2018). Responsive cyclodextrins as polymeric carriers for drug delivery applications. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications: Volume 1: Types and Triggers* (pp. 555–580). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00024-2
- Patel, A. R., & Vavia, P. R. (2006). Effect of hydrophilic polymer on solubilization of fenofibrate by cyclodextrin complexation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 56(1–2), 247–251. https://doi.org/10.1007/s10847-006-9091-4
- Pearson, R. D. (1985). Niclosamide Therapy for Tapeworm Infections. *Annals of Internal Medicine*, *102*(4), 550–551. http://annals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/journals/aim/19620/
- Pralhad, T., & Rajendrakumar, K. (2004). Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *34*(2), 333–339. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00529-6
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., & Pirmohamed, M. (2018). Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. In *Nature Reviews Drug Discovery*

(Vol. 18, Issue 1, pp. 41–58). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168

- Qi, G. Q., Liang, C. L., Bao, R. Y., Liu, Z. Y., Yang, W., Xie, B. H., & Yang, M. B. (2014). Polyethylene glycol based shape-stabilized phase change material for thermal energy storage with ultralow content of graphene oxide. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, *123*, 171–177. https://doi.org/10.1016/j.solmat.2014.01.024
- Qin, Y., Zhu, Y., Luo, X., Liang, S., Wang, J., & Zhang, L. (2019). End group modification of polyethylene glycol (PEG): A novel method to mitigate the supercooling of PEG as phase change material. *International Journal of Energy Research*, 43(2), 1000–1011. https://doi.org/10.1002/er.4356
- Rácz, I. (1989). Drug formulation. John Wiley and Sons.
- Radia, O., Rogalska, E., & Moulay-Hassane, G. (2012). Preparation of meloxicamβcyclodextrinpolyethylene glycol 6000 ternary system: Characterization, in vitro and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Development and Technology*, 17(5), 632–637. https://doi.org/10.3109/10837450.2011.565347
- Rego, A. C. B., de Melo, J. F., Neto, A. O. W., & Fonseca, J. L. C. (2017). Coil Interpenetration, Segment Aggregation and Adsorption of PEG at Water/Air Interface. *Journal of Surfactants and Detergents*, 20(4), 977–983. https://doi.org/10.1007/s11743-017-1959-3
- Rehman, M. U., Khan, M. A., Khan, W. S., Shafique, M., & Khan, M. (2018). Fabrication of Niclosamide loaded solid lipid nanoparticles: in vitro characterization and comparative in vivo evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(8), 1926–1934. https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1396996
- Ribeiro, L. S. S., Ferreira, D. C., & Veiga, F. J. B. (2003). Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β-cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *20*(3), 253–266. https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00199-4
- Rincón-López, J., Ramírez-Rodríguez, N. J., Luviano, A. S., Costas, M., López-Cervantes, J. L., García-Figueroa, A. A., Domínguez, H., Mendoza-Cruz, R., Guadarrama, P., López-Morales, S., & Rojas-Aguirre, Y. (2022). Experimental and theoretical studies of pegylated-β-cyclodextrin: A step forward to understand its tunable self-aggregation abilities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 67. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102975
- Sanphui, P., Kumar, S. S., & Nangia, A. (2012). Pharmaceutical cocrystals of niclosamide. *Crystal Growth and Design*, *12*(9), 4588–4599. https://doi.org/10.1021/cg300784v
- Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., & Loftsson, T. (2018). Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 5). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules23051161
- Sathigari, S., Chadha, G., Lee, Y. H. P., Wright, N., Parsons, D. L., Rangari, V. K., Fasina, O., & Babu,
 R. J. (2009). Physicochemical characterization of efavirenz-cyclodextrin inclusion complexes.
 AAPS PharmSciTech, 10(1), 81–87. https://doi.org/10.1208/s12249-008-9180-3
- Shamim, K., Xu, M., Hu, X., Lee, E. M., Lu, X., Huang, R., Shah, P., Xu, X., Chen, C. Z., Shen, M., Guo, H., Chen, L., Itkin, Z., Eastman, R. T., Shinn, P., Klumpp-Thomas, C., Michael, S., Simeonov, A., Lo, D. C., ... Huang, W. (2021). Application of niclosamide and analogs as small molecule inhibitors of Zika virus and SARS-CoV-2 infection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 40. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127906

- Shi, L., Zhang, J., Zhao, M., Tang, S., Cheng, X., Zhang, W., Li, W., Liu, X., Peng, H., & Wang, Q. (2021). Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. In *Nanoscale* (Vol. 13, Issue 24, pp. 10748–10764). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/d1nr02065j
- Singh, R., Chauhan, S., & Sharma, K. (2017). Surface Tension, Viscosity, and Refractive Index of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) in Aqueous Solution Containing Poly(ethylene glycol) (PEG), Poly(vinyl pyrrolidone) (PVP), and Their Blends. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 62(7), 1955–1964. https://doi.org/10.1021/acs.jced.6b00978
- Sionkowska, A. (2006). The influence of UV light on collagen/poly(ethylene glycol) blends. *Polymer Degradation and Stability*, *91*(2), 305–312. https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.05.012
- Süle, A., Szente, L., & Csempesz, F. (2009). Enhancement of drug solubility in supramolecular and colloidal systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(2), 484–494. https://doi.org/10.1002/jps.21437
- Suvarna, P., Chaudhari, P., & Lewis, S. A. (2022a). Cyclodextrin-Based Supramolecular Ternary Complexes: Emerging Role of Ternary Agents on Drug Solubility, Stability, and Bioavailability. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, *39*(5), 1–50. www.begellhouse.com
- Suvarna, P., Chaudhari, P., & Lewis, S. A. (2022b). Cyclodextrin-Based Supramolecular Ternary Complexes: Emerging Role of Ternary Agents on Drug Solubility, Stability, and Bioavailability. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, *39*(5), 1–50. www.begellhouse.com
- Suvarna, P., Chaudhari, P., & Lewis, S. A. (2022c). Cyclodextrin-Based Supramolecular Ternary Complexes: Emerging Role of Ternary Agents on Drug Solubility, Stability, and Bioavailability. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, *39*(5), 1–50. www.begellhouse.com
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Review*, *98*(5).
- Szente, L., Singhal, A., Domokos, A., & Song, B. (2018). Cyclodextrins: Assessing the impact of cavity size, occupancy, and substitutions on cytotoxicity and cholesterol homeostasis. *Molecules*, 23(5). https://doi.org/10.3390/molecules23051228
- Tharmalingam, N., Port, J., Castillo, D., & Mylonakis, E. (2018). Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat Helicobacter pylori. *Scientific Reports, 8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-22037-x
- Thomas, A., Müller, S. S., & Frey, H. (2014). Beyond poly(ethylene glycol): Linear polyglycerol as a multifunctional polyether for biomedical and pharmaceutical applications. In *Biomacromolecules* (Vol. 15, Issue 6, pp. 1935–1954). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/bm5002608
- Thorat, Y. S., Gonjari, I. D., & Hosmani, A. H. (2011). Solubility enhancement techniques: a review on conventional and novel approaches. *IJPSR*, *2*(10). www.ijpsr.com
- Van Tonder, E. C., Maleka, T. S. P., Liebenberg, W., Song, M., Wurster, D. E., & De Villiers, M. M. (2004). Preparation and physicochemical properties of niclosamide anhydrate and two monohydrates. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(2), 417–432. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.09.035
- Vemula, V. R., Lagishetty, V., & Lingala, S. (2010). Solubility Enhancement Techniques. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 5(1), 41–51.

- Volkova, T. V., Drozd, K. V., & Surov, A. O. (2021). Effect of polymers and cyclodextrins on solubility, permeability and distribution of enzalutamide and apalutamide antiandrogens. *Journal of Molecular Liquids*, *322*. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114937
- Vuai, S. A. H., Sahini, M. G., Onoka, I., Kiruri, L. W., & Shadrack, D. M. (2021). Cation-π interactions drive hydrophobic self-assembly and aggregation of niclosamide in water. *RSC Advances*, *11*(52), 33136–33147. https://doi.org/10.1039/d1ra05358b
- Wu, J., Zhao, C., Lin, W., Hu, R., Wang, Q., Chen, H., Li, L., Chen, S., & Zheng, J. (2014a). Binding characteristics between polyethylene glycol (PEG) and proteins in aqueous solution. *Journal* of Materials Chemistry B, 2(20), 2983–2992. https://doi.org/10.1039/c4tb00253a
- Wu, J., Zhao, C., Lin, W., Hu, R., Wang, Q., Chen, H., Li, L., Chen, S., & Zheng, J. (2014b). Binding characteristics between polyethylene glycol (PEG) and proteins in aqueous solution. *Journal* of Materials Chemistry B, 2(20), 2983–2992. https://doi.org/10.1039/c4tb00253a
- Xu, J., Shi, P. Y., Li, H., & Zhou, J. (2020). Broad Spectrum Antiviral Agent Niclosamide and Its Therapeutic Potential. In ACS Infectious Diseases (Vol. 6, Issue 5, pp. 909–915). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00052
- Zhu, P. J., Hobson, J. P., Southall, N., Qiu, C., Thomas, C. J., Lu, J., Inglese, J., Zheng, W., Leppla, S. H., Bugge, T. H., Austin, C. P., & Liu, S. (2009). Quantitative high-throughput screening identifies inhibitors of anthrax-induced cell death. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *17*(14), 5139–5145. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.054

8. Anexos

Los medios de trabajo en los que se realizaron los experimentos son H₂O y las disoluciones amortiguadoras de PBS y TBE. En la Figura S1, se presenta un diagrama de predominio de especies para NCL, en el que se muestra la relación de especies de NCL protonadas e ionizadas en función al valor del pH en el medio.



Figura S1. Diagrama de predominio de especies de NCL a distintos valores de pH de disolución.

En la Figura S2, se presentan las curvas de densidad de los sistemas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG en función del logaritmo del rango de concentraciones estudiadas.



Figura S2. Curvas de densidad en función del logaritmo de la concentración de los sistemas β CD/NCL en H₂O, PEG/NCL en H₂O y β CD/NCL/PEG en los tres medios de trabajo.

Para la determinación de la concentración de agragación crítica (CAC) se calcularon la primera, segunda y tercera derivada de las curvas de densidad de los sistemas, y se tomó el valor de la CAC a la concentración en la que la tercera derivada fue igual a cero (Figura S3).



 β CD/NCL/PEG en H₂O

Figura S3. Primera, segunda y tercera derivada de la densidad del sistema β CD/NCL/PEG en función a la concentración de β CD/PEG.

En la Figura S4, se ilustra la relación que existe entre la tendencia a formar agregados por los sistemas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG, y el máximo aumento de solubilidad que se alcanzó con estos sistemas. Adicionalmente, se presentan los valores de CAC para cada sistema estudiado.



Figura S4. Solubilidad de NCL en función de la formación de agregados en los sistemas.

H ₂ O						
	Solubilidad (µg/mL)				Respecto S₀	
	n 1	n 2	Promedio	DE	Δ (µg/mL)	%个
So	1.73	1.54	1.64	0.13		
βCD/NCL 1:1	1.75	1.88	1.82	0.09	0.18	11.0
βCD/NCL 2:1	2.03	1.90	1.97	0.09	0.33	20.2
βCD/NCL 3:1	2.11	1.98	2.05	0.09	0.41	25.1
βCD/NCL 8:1	2.15	2.43	2.29	0.20	0.66	40.1
βCD/NCL 15:1	2.28	2.39	2.34	0.08	0.70	42.8
PEG/NCL 3.5:1	1.37	1.35	1.36	0.01	-0.28	-17.1
PEG/NCL 7:1	1.48	1.37	1.43	0.08	-0.21	-12.8
PEG/NCL 10.5:1	1.51	1.71	1.61	0.14	-0.03	-1.8
PEG/NCL 28:1	1.87	1.82	1.85	0.04	0.21	12.8
PEG/NCL 52.5:1	2.01	1.96	1.99	0.04	0.35	21.3
βCD/NCL/PEG 1:1:3.5	2.11	1.96	2.04	0.11	0.40	24.5
βCD/NCL/PEG 2:1:7	2.36	2.84	2.60	0.34	0.97	59.0
βCD/NCL/PEG 3:1:10.5	3.12	3.00	3.06	0.08	1.43	87.2
βCD/NCL/PEG 8:1:28	3.65	3.01	3.33	0.45	1.70	103.7
βCD/NCL/PEG 15:1:52.5	3.79	4.65	4.22	0.61	2.59	158.1

Tabla S1. Valores de solubilidad de NCL obtenidos con los sistemas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG en H₂O (n=2)

PBS						
	Solubilidad (µg/mL)				Respecto S₀	
	n 1	n 2	Promedio	DE	Δ (µg/mL)	%个
So	1.91	1.51	1.71	0.28		
βCD/NCL 1:1	0.70	0.63	0.67	0.05	-1.04	-61.0
βCD/NCL 2:1	1.34	1.43	1.39	0.06	-0.32	-18.8
βCD/NCL 3:1	1.57	1.70	1.64	0.09	-0.07	-4.1
βCD/NCL 8:1	2.47	2.06	2.27	0.29	0.56	32.8
βCD/NCL 15:1	3.80	3.08	3.44	0.51	1.74	101.8
PEG/NCL 3.5:1	1.40	1.43	1.42	0.02	-0.29	-16.9
PEG/NCL 7:1	2.26	1.95	2.11	0.22	0.40	23.4
PEG/NCL 10.5:1	2.39	2.67	2.53	0.20	0.82	47.9
PEG/NCL 28:1	2.83	2.72	2.78	0.08	1.07	62.6
PEG/NCL 52.5:1	3.78	3.61	3.70	0.12	1.99	116.4
βCD/NCL/PEG 1:1:3.5	1.51	2.39	1.95	0.62	0.25	14.4
βCD/NCL/PEG 2:1:7	2.67	2.03	2.35	0.45	0.65	37.8
βCD/NCL/PEG 3:1:10.5	4.30	3.95	4.13	0.25	2.42	141.9
βCD/NCL/PEG 8:1:28	4.93	4.44	4.69	0.35	2.98	174.8
βCD/NCL/PEG 15:1:52.5	17.79	16.9	17.35	0.63	15.64	917.3

Tabla S2. Valores de solubilidad de NCL obtenidos con los sistemas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG en PBS (n=2)

ТВЕ						
	Solubilidad (µg/mL)				Respecto S₀	
	n 1	n 2	Promedio	DE	Δ (µg/mL)	%个
So	1.51	1.34	1.43	0.12		
βCD/NCL 1:1	2.00	2.18	2.09	0.13	0.67	46.7
βCD/NCL 2:1	2.51	2.73	2.62	0.16	1.20	83.9
βCD/NCL 3:1	4.27	4.33	4.30	0.04	2.88	201.8
βCD/NCL 8:1	5.42	5.35	5.39	0.05	3.96	277.9
βCD/NCL 15:1	10.56	9.66	10.11	0.64	8.69	609.5
PEG/NCL 3.5:1	1.67	1.64	1.66	0.02	0.23	16.1
PEG/NCL 7:1	1.98	1.82	1.90	0.11	0.47	32.9
PEG/NCL 10.5:1	2.03	1.84	1.94	0.13	0.51	35.7
PEG/NCL 28:1	2.21	2.06	2.14	0.11	0.71	49.6
PEG/NCL 52.5:1	2.48	2.40	2.44	0.06	1.01	70.6
βCD/NCL/PEG 1:1:3.5	5.03	6.83	5.93	1.27	4.51	316.1
βCD/NCL/PEG 2:1:7	12.62	11.83	12.23	0.56	10.80	757.9
βCD/NCL/PEG 3:1:10.5	29.62	32.73	31.18	2.20	29.75	2087.7
βCD/NCL/PEG 8:1:28	34.98	35.60	35.29	0.44	33.87	2376.5
βCD/NCL/PEG 15:1:52.5	40.14	38.70	39.42	1.02	38.00	2666.3

Tabla S3. Valores de solubilidad de NCL obtenidos con los sistemas β CD/NCL, PEG/NCL y β CD/NCL/PEG en TBE (n=2)