



Valdecilla
Instituto de
Investigación
Sanitaria **IDIVAL**

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

Tesis Doctoral

**NANOENCAPSULACIÓN PARA EL REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS EN
LEISHMANIASIS COMO MODELO DE ENFERMEDAD TROPICAL DESATENDIDA**

PhD Thesis

**Nanoencapsulation for drug repositioning in leishmaniasis as a model of
neglected tropical disease**

Directora

Mónica López Fanarraga

Tesis Doctoral presentada por **Javier Rodrigo Santamaría Aguirre**

Santander, 2023

Dña. Mónica López Fanarraga, Catedrática del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA: Que D. Javier Rodrigo Santamaría Aguirre ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Nanoencapsulación para el reposicionamiento de fármacos en leishmaniasis como modelo de enfermedad tropical desatendida”.

Considero que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria con mención Internacional. Por tanto, se emite la conformidad para que esta memoria sea presentada y tenga lugar, posteriormente, la correspondiente Lectura y Defensa.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Santander, a 13 de diciembre de 2023.

Fdo. Mónica López Fanarraga

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a:

- AEI and European Regional Development Fund, “Investing in your future”, Grant TED2021-129248B-I00.
- CA21111 “One Health drugs against parasitic vector-borne diseases in Europe and beyond (OneHealthdrugs)” COST action.
- The Spanish Nanomedicine network RED2022-134560-T MICIN/AEI/1013039/501100011033 “NanoCARE 2.0”.
- “Quinosomas” para el tratamiento de la Leishmaniasis como modelo de enfermedad olvidada. Proyecto de Innovación y Transferencia Regional. (INNVAL 17/11, IDIVAL).
- Universidad Central del Ecuador. Contrato de Beca y Devengamiento para el Programa de Doctorado (PhD.) en Biología Molecular y Biomedicina, impartido por la Universidad de Cantabria – España.

AGRADECIMIENTOS

Hemos sido moldeados por nuestras decisiones, acciones y omisiones, así como por los encuentros con otros seres; reuniones prolongadas o intensas que siempre contribuyen a definirnos. Me considero afortunado por haber compartido caminos con personas de las cuales he extraído lecciones invaluable. Mi más sincero agradecimiento desde lo más profundo de mi corazón, aunque sea imposible mencionar a todos, quiero dejar constancia de aquellos que han tenido un impacto significativo en este trabajo.

En primer lugar, expreso mi gratitud hacia Mónica López Fanarraga, la directora de este proyecto. Bajo su guía, he alcanzado niveles de aprendizaje que trascienden lo académico. Es un honor haber sido orientado por una científica de su nivel; su empatía, paciencia y consideración son ejemplos para seguir.

A Ana y Andrés, mis compañeros de doctorado, siempre recordaré su predisposición y desinteresada ayuda. Mi admiración y respeto hacia ambos, tanto su calidad científica como humana, les auguran un futuro brillante.

A Lorena, agradezco su precisa y oportuna forma de compartir conocimientos. Su disposición para hacerlo, mientras gestiona aspectos científicos y administrativos, es digna de admiración y replicación.

A Débora, no solo la caracteriza su empatía, sino también su experiencia, que la posiciona como la referencia a la cual todos acudimos. Su don de gentes y actitud positiva inspiran. Gracias por estar siempre dispuesta a apoyarnos.

A todos los que en el IDIVAL me han ayudado de alguna manera, con su experiencia, conocimiento y soporte, mi agradecimiento imperecedero: Rafael, Laura, David, Fidel, Lara, Judith.

Mi reconocimiento y admiración para Javier Carrión, un científico de primer nivel que comparte generosamente sus conocimientos y que me abrió las puertas de su laboratorio, permitiéndome obtener resultados cruciales.

Sin Ana Poveda, esta investigación simplemente no habría sido posible. Gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio, por hacerme parte de tus proyectos, por permitirme aprender y contribuir. Me esforzaré para estar a tu altura; eres un ejemplo para seguir.

¿Qué es una persona sin sus raíces? A mis padres, gracias por su esfuerzo, ejemplo, cariño y por estar siempre pendientes. Mis logros son mi homenaje.

Y, ¿qué sería de todo esto sin una razón de ser? El motor, el impulso y la fuerza provienen de mi esposa y de mi hijo. Jamás podré dimensionar los pesares que mis ausencias han representado para ella; solo el amor logra explicarlo todo. Me siento enormemente afortunado de tenerla a mi lado, de contar con su comprensión y apoyo incondicional. Hijo, eres el punto de inflexión en mi vida, es un privilegio y orgullo ser tu padre. Cada sacrificio, cada esfuerzo, tiene su razón de ser en ti. Esto es por y para ustedes.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> , Microscopía de fuerza atómica
CAS	<i>Chemical Abstracts Services</i> , Sistema de identificación de sustancias químicas
CIZ	Instituto de Investigación en Zoonosis, Universidad Central del Ecuador
CMC	Concentración Micelar Crítica
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> , Bromuro de cetiltrimetilamonio
DALYs	<i>Disability Adjusted Life Year</i> , Años de vida ajustados por discapacidad
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> , Dispersión de luz dinámica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DS	Desviación estándar
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> , Calorimetría diferencial de barrido
EE	Eficacia de encapsulamiento
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Agencia Europea de Medicamentos
ETD	Enfermedad Tropical Desatendida
FDA	<i>Food and Drug Agency</i> , Administración de Alimentos y Medicamentos
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i> , Balance Hidrofílico Lipofílico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografía líquida de alta eficacia
I&D	Investigación y Desarrollo
IC50	Concentración inhibitoria media, concentración de un fármaco para inhibir una actividad biológica en un 50 por ciento
LC	Leishmaniasis cutánea
LM	Leishmaniasis Mucocutánea
LV	Leishmaniasis Visceral
Me	Mediana
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i> , Iniciativa para la I&D de medicamentos antimaláricos
NLC	<i>Nano Lipid Carriers</i> , Lípidos nanoestructurados
NTD	<i>Neglected Tropical Diseases</i> , Enfermedades Tropicales Desatendidas
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Tampón fosfato salino
PDI	Polydispersity Index, Índice de polidispersión
PFA	Paraformaldehído
PHC	N palmitoil homocisteína
PoC	<i>Point of Care</i> , Punto de atención
RPM	Revoluciones por minuto
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , Microscopía Electrónica de Barrido
SFB	Suero fetal bovino

SLNP	<i>Solid Lipid Nanoparticles</i> , Nanopartículas sólido lipídicas
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> , Microscopía Electrónica de Transmisión
TOP	Topoisimerasa
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i> , Farmacopea de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
Resumen.....	xii
Abstract	xiv
1. Introducción	4
1.1 Enfermedades Tropicales Desatendidas	6
1.1.1 Leishmaniasis.....	6
1.1.2 Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis	12
1.1.3 Fármacos recomendados para el tratamiento de la leishmaniasis.....	14
1.2 Reposicionamiento de fármacos.....	19
1.3 Sistemas de Nanoencapsulación para administración de fármacos.....	21
1.3.1 Nanotubos de carbono.....	22
1.3.2 Nanopartículas de Oro	22
1.3.3 Nanotransportadores magnéticos	23
1.3.4 Quantum dots	23
1.3.5 Nanotransportadores de Sílice mesoporosa.....	23
1.3.6 Nanocristales de fármacos	24
1.3.7 Dendrímeros.....	24
1.3.8 Nanomicelas poliméricas	25
1.3.9 Liposomas.....	25
1.3.10 Niosomas.....	26
1.3.11 Nanoemulsiones.....	27
1.3.12 Lípidos nanoestructurados.....	28
1.3.13 Nanopartículas sólido lipídicas (SLNP)	29
2. Objetivos	46
3. Materiales y Métodos	50
3.1 Selección de sustancias leishmanicidas	50
3.1.1 Procesamiento de Bases de datos.....	50
3.1.2 Acoplamiento molecular	51
3.2 Determinación de la actividad leishmanicida	52

3.2.1	Actividad leishmanicida por contagio directo de promastigotes.....	52
3.2.2	Estudio de Viabilidad Mediante el Método de Fluorescencia	53
3.2.3	Estudio del Efecto Leishmanicida por Citometría de Flujo	54
3.2.4	Identificación de cambios morfológicos en promastigotes por efecto del delamanid.....	54
3.3	Desarrollo de la formulación de las nanopartículas sólido lipídicas (SLNP).....	55
3.3.1	Síntesis de SLNP.....	55
3.3.2	Caracterización de las SLNP sintetizadas	57
3.4	Estudios de la eficacia <i>in vitro</i> , <i>in cellulo</i> e <i>in vivo</i> de las SLNP	59
3.4.1	Actividad leishmanicida de las SLNP en promastigotes	59
3.4.2	Localización subcelular de las SLNP mediante TEM.....	60
3.4.3	Prueba de concepto de liberación <i>in cellulo</i>	61
3.4.4	Prueba de concepto de liberación transdermal.....	62
3.4.5	Actividad leishmanicida de las SLNP en amastigotes.....	63
3.4.6	Actividad leishmanicida de las SLNP <i>in vivo</i>	64
3.4.7	Tratamiento estadístico de resultados.....	65
4.	Resultados	70
4.1	Selección de sustancias leishmanicidas	70
4.1.1	Procesamiento de Bases de datos.....	70
4.1.2	Acoplamiento molecular	71
4.2	Determinación de la actividad leishmanicida	72
4.2.1	Actividad leishmanicida por contagio directo de promastigotes.....	72
4.2.2	Estudio de Viabilidad Mediante el Método de Fluorescencia	73
4.2.3	Estudio del Efecto Leishmanicida Mediante Citometría de Flujo	75
4.2.4	Identificación de cambios morfológicos en promastigotes por efecto del delamanid.....	76
4.3	Desarrollo de nanopartículas sólido-lipídicas (SLNP).....	79
4.3.1	Síntesis de SLNP.....	81
4.3.2	Caracterización de las SLNP sintetizadas	83
4.4	Eficacia de las SLNP <i>in vitro</i> , <i>in cellulo</i> e <i>in vivo</i>	91
4.4.1	Actividad leishmanicida de las SLNP en promastigotes	91
4.4.2	Captación celular de SLNP mediante TEM	93
4.4.3	Prueba de concepto de liberación <i>in cellulo</i>	94
4.4.4	Prueba de concepto de liberación transdermal.....	95
4.4.5	Actividad leishmanicida de las SLNP en amastigotes.....	98
4.4.6	Actividad leishmanicida de las SLNP <i>in vivo</i>	101

5. Conclusiones.....	110
6. Conclusions	114
7. Perspectivas futuras del estudio	118
7.1. Incorporación de las SLNP con delamanid en Formas Farmacéuticas	118
7.2. Investigación de la diana molecular del delamanid	118
7.3. Identificación de sustancias estructuralmente similares a delamanid con potencial actividad leishmanicida	119
7.4. Aplicación de las SLNP diseñadas a tratamientos combinados para leishmaniasis..	120
7.5. Aplicación de las SLNP diseñadas a otras ETD.....	120
7.6. Aplicación de las SLNP diseñadas a otros antibióticos.....	121
Referencias.....	126
Publicaciones.....	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recomendaciones para el tratamiento de leishmaniasis.....	17
Tabla 2. Resumen de los efectos secundarios de los fármacos recomendados para el tratamiento de leishmaniasis.....	18
Tabla 3. Clasificación y ejemplos de los componentes más usados para la síntesis de nanopartículas sólido lipídicas	32
Tabla 4. IC 50 de delamanid y prulifloxacinina determinada por el método de fluorescencia.	73
Tabla 5. IC 50 del delamanid para promastigotes de tres especies de <i>Leishmania</i> y citotoxicidad en dos líneas de macrófagos	75
Tabla 6. Fórmula de manufactura y fórmula porcentual de las SLNP.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de las leishmaniasis	9
Figura 2. Resumen esquemático de los principales aspectos de las Leishmaniasis.....	12
Figura 3. Representación esquemática de los tipos de estructuras para SLNP	29
Figura 4. Clasificación de los métodos de elaboración en el contexto de las SLNP	38
Figura 5. Esquema de elaboración de las SLNP por el método solvente antisolvente	57
Figura 6. Esquema del ensayo in vivo para determinar la actividad leishmanicida de las SLNP en modelo murino.....	65
Figura 7. Estructura de las seis sustancias seleccionadas por su alta actividad frente a tripanosomatideos y baja citotoxicidad.....	70
Figura 8. Estructura química de las sustancias con mayor afinidad frente a enzimas de interés.	71
Figura 9. Estructura química de las dos fluoroquinolonas adicionales incluidas.....	71
Figura 10. Actividad leishmanicida relativa de las sustancias seleccionadas, determinada por contejo de parásitos.....	73
Figura 11. Cambios morfológicos (A) y detención en la citocinesis (B) de promastigotes expuestos a delamanid. (C) parásitos sin tratamiento	76
Figura 12. Ácido alfa micólico	77
Figura 13. Ácido cis-9,10-metilenoctadecanoico	77
Figura 14. Cambios morfológicos observados en promastigotes tratados con nocodazol 5 μ M durante 72 horas.....	79
Figura 15. Estructura química de los componentes de las nanopartículas sólidas lipídicas, con sus parámetros fisicoquímicos más relevantes.	81
Figura 16. Esquema de la probable distribución de los componentes en un corte trasversal de SLNP dispersas en medio acuoso a pH fisiológico.....	82
Figura 17. Tamaño de partícula de 4 lotes de SLNP sintetizados	83
Figura 18. Índice de polidispersión de 4 lotes de SLNP	85
Figura 19. Potencial zeta de 3 lotes de SLNP	86
Figura 20. Estabilidad física de SLNP almacenadas a 4 °C durante 7 días	87
Figura 21. Imagen TEM de SLNP con nanopartículas de hierro encapsuladas en su interior.....	89
Figura 22. Eficiencia de encapsulamiento de delamanid en las SLNP	90
Figura 23. Perfil de disolución in vitro de SLNP en PBS pH 7,4	91
Figura 24. Actividad leishmanicida de SLNP por contejo de promastigotes	92
Figura 25. Imagen TEM de la captación celular de SLNP por macrófagos infectados con Leishmania.	94

Figura 26. Actividad leishmanicida de SLNP de delamanid frente a promastigotes.....	95
Figura 27. Microscopía confocal de piel después de la administración tópica de las SLNP Dm (0 horas)	96
Figura 28. Microscopía confocal de piel 2 horas después de la administración tópica de los SLNP Dm.	96
Figura 29. Microscopía confocal de piel 1 día después de la administración tópica de los SLNP Dm.	97
Figura 30. Actividad leishmanicida de SLNP frente a amastigotes	99
Figura 31. Fotografías representativas del estado de las lesiones a la semana sexta del estudio, dos semanas después de finalizada la administración de los tratamientos.	101
Figura 32. Actividad leishmanicida de SLNP evidenciada por la Progresión de la infección	102
Figura 33. Tendencias en la progresión de la infección.	103
Figura 34. Carga parasitaria de los individuos al final del estudio	104
Figura 35. Benzimidazoles aprobados con grupos funcionales relacionados al delamanid.	119
Figura 36. Estructura de la Miltefosina, leishmanicida análogo a los fosfolípidos.	120

Resumen

Las Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) afectan a más de mil millones de personas, principalmente en áreas empobrecidas, causando cerca de 200.000 muertes y generando consecuencias socioeconómicas significativas. A pesar de ello, no han recibido espacio suficiente en agendas y presupuestos públicos y privados. Las leishmaniasis, ETD distribuidas mundialmente, son provocadas por 22 especies de *Leishmania*, que tienen a más de 70 animales como reservorio, y son transmitidas por la picadura de más de 90 flebótomos. Se manifiestan en tres formas principales: leishmaniasis cutánea, visceral y mucocutánea, todas tratadas con fármacos de limitada efectividad, que además producen múltiples efectos adversos, algunos de ellos graves. El reposicionamiento de fármacos es un enfoque más eficiente, en términos de recursos y tiempo, que el desarrollo de nuevas moléculas para tratar ETD; más aún si está acoplado a la nanomedicina, la cual puede incrementar la efectividad y seguridad de los medicamentos. En este trabajo mostramos cómo la nanoencapsulación del fármaco reposicionado delamanid, en nanopartículas sólido lipídicas (SLNP), incrementa su actividad leishmanicida. En primera instancia, se seleccionó un grupo de sustancias mediante la revisión de bases de datos, artículos y estudios *in silico*. Estudios *in vitro* con promastigotes permitieron elegir al delamanid como el de mayor potencial. En base a sus características fisicoquímicas se desarrolló una formulación para SLNP y un proceso de síntesis, diseñado para que sea eficientemente aplicado con mínimo equipamiento. La efectividad de las SLNP se demostró en estudios *in vitro*, *in cellulo* e *in vivo*. El efecto del fármaco en la morfología y división del parásito sugieren al menos tres dianas moleculares que deberán ser estudiadas para comprender su mecanismo de acción. Pero, además, el nanosistema de entrega de fármacos desarrollado tiene el potencial de encapsular fármacos para el tratamiento de otras ETD, infecciones intracelulares, cáncer y otras afecciones. El proceso de síntesis está diseñado para que sea de fácil aplicación, potencialmente en todos los niveles de atención de la salud, contribuyendo a incrementar la accesibilidad de la nanomedicina al paciente.

Abstract

Neglected Tropical Diseases (NTD) affect over a billion people, primarily in impoverished areas, causing approximately 200,000 deaths and leading to significant socio-economic consequences. Despite this, they have not received adequate attention in public and private agendas and budgets. Leishmaniasis, globally distributed NTD, are caused by 22 species of *Leishmania*, with over 70 animals serving as reservoirs, and are transmitted through the bites of over 90 sandflies. They manifest in three main forms: cutaneous, visceral, and mucocutaneous leishmaniasis—all treated with drugs of limited effectiveness, which also pose multiple and sometimes severe adverse effects. Drug repositioning proves to be a more efficient approach, both in terms of resources and time, than developing new molecules to address NTD, especially when coupled with nanomedicine, which can enhance the efficacy and safety of medications. This study demonstrates how the nanoencapsulation of the repositioned drug delamanid, using solid lipid nanoparticles (SLNP), increases its leishmanicidal activity. Initially, a group of substances was selected through the review of databases, articles, and *in silico* studies. *In vitro* studies with promastigotes led to the selection of delamanid as the most promising candidate. Based on its physicochemical characteristics, a formulation for SLNP and a synthesis process were developed, designed for efficient application with minimal equipment. The effectiveness of SLNP was demonstrated through *in vitro*, *in cellulo*, and *in vivo* studies. The drug's impact on the morphology and division of the parasite suggests at least three molecular targets that need further investigation to comprehend its mechanism of action. The developed drug delivery nanosystem has the potential to encapsulate drugs for treating other NTD, intracellular infections, cancer, and various conditions. The synthesis process is designed for easy application, potentially in all healthcare levels, contributing to increasing the accessibility of nanomedicine to patients.

INTRODUCCION

1. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida que afecta predominantemente a comunidades empobrecidas en zonas tropicales y subtropicales. Factores como la pobreza, la desnutrición, el acceso limitado a la atención médica y el desplazamiento de la población exacerban sus consecuencias [1,2]. La enfermedad, causada por varias especies de *Leishmania*, se propaga a través de la picadura de hembras de flebótomos infectados y puede manifestarse en una amplia gama de síntomas, desde pequeñas lesiones cutáneas persistentes hasta complicaciones mortales.

La leishmaniasis es endémica en más de 90 países de las regiones tropicales y subtropicales de Asia, África, América y el Mediterráneo. Pero los cambios en los patrones de temperatura y precipitaciones debidos al cambio climático están influyendo en el tamaño y la distribución de las poblaciones de vectores y reservorios [3]. El incremento de temperatura a nivel mundial está redistribuyendo las enfermedades antes exclusivamente tropicales, algunas desaparecerán de algunas zonas y emergerán en otras del hemisferio norte donde antes se veían solo en casos importados, la enfermedades tropicales desatendidas se están globalizando [4].

Se estima que cada año surgen alrededor de 1 millón de nuevos casos de leishmaniasis que generan consecuencias sanitarias, sociales y económicas devastadoras para millones de personas; los desafíos a los que se enfrentan se intensifican por los cambios demográficos, que conducen a una mayor vulnerabilidad a los altos costos de atención médica. No deben dejarse de lado la pérdida de productividad (bajo rendimiento, ausentismo laboral) [5], la discapacidad, el estigma [6] y la discriminación, originadas en la naturaleza de las lesiones. No obstante, la inversión pública y privada no ha sido suficiente y adecuada para el desarrollo e implementación de medidas de prevención y control [3].

Actualmente, el tratamiento de la leishmaniasis es un desafío principalmente en comunidades empobrecidas con acceso limitado a la atención médica regular. La selección de leishmanicidas depende de la forma clínica, que a su vez está influenciada por la especie del parásito y su ubicación geográfica. La eficacia del tratamiento seleccionado está determinada en gran medida por la toxicidad y los efectos adversos asociados, lo que afecta la aceptación del paciente. Los medicamentos utilizados

pueden ser costosos, ineficaces y, en ocasiones, asociados con una toxicidad significativa.

En las Américas, la Organización Panamericana de la Salud recomienda el uso de antimonioales pentavalentes, como el antimonioato de meglumina, administrados una vez al día durante un máximo de 30 días. Lamentablemente, los efectos adversos asociados, incluidas mialgias y artralgias, a menudo conducen al incumplimiento y contribuyen al desarrollo de cepas resistentes [7].

Lo anterior justifica la necesidad urgente de nuevas alternativas terapéuticas, sin embargo, el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos puede llegar a costar cientos o miles de millones de dólares, tomar decenas de años, con una tasa de éxito baja: es un proceso de alto riesgo y alta inversión, y al ritmo actual, no ha logrado satisfacer las necesidades de la sociedad [8]. El reposicionamiento de medicamentos es una estrategia de investigación que explora nuevas aplicaciones terapéuticas de medicamentos aprobados, ofreciendo importantes ahorros de tiempo y costos en comparación con el desarrollo tradicional de compuestos completamente nuevos [9].

Algunas de las moléculas seleccionadas para reposicionamiento pueden tener limitaciones en términos de solubilidad, biodisponibilidad, efectos adversos y dosificación, los cuales podrían mitigarse mediante el desarrollo de sistemas de nanoadministración [10,11]. Las nanopartículas lipídicas sólidas (SLNP) representan un nanosistema de encapsulación prometedor para la administración de fármacos, que ofrece numerosas ventajas: una mejor disolución y biodisponibilidad de fármacos hidrofóbicos y una liberación sostenida para efectos terapéuticos prolongados.

Además, proporcionan estabilidad mejorada, biocompatibilidad, administración dirigida, toxicidad reducida, protección contra la degradación enzimática y la capacidad de superar barreras biológicas, lo que los convierte en una plataforma versátil y prometedora para aplicaciones farmacéuticas. Estos nanosistemas podrían exhibir la capacidad de traducirse rápidamente en productos listos para el paciente, centrándose en minimizar la heterogeneidad derivada de las variaciones en los procesos de fabricación [12].

Para abordar eficazmente las enfermedades tropicales desatendidas, es esencial emplear métodos de fabricación de medicamentos eficientes y económicamente viables; específicamente, en el contexto de la nanomedicina aplicada al tratamiento de la leishmaniasis, el éxito del escalado de las SLNP del laboratorio a la industria depende del diseño de formulaciones y procesos de síntesis que requieran pocos recursos al tiempo que prioricen la responsabilidad ambiental [13–16].

En coherencia con lo expresado anteriormente, esta investigación estuvo enmarcada en la visión de esta tesis doctoral: *Desarrollar medicamentos seguros, efectivos, accesibles y de fácil manufactura a pequeña y gran escala para tratar Leishmaniasis y otras enfermedades tropicales olvidadas*, adoptando como estrategia la búsqueda de sinergias entre el reposicionamiento de fármacos y la Nanomedicina.

1.1 Enfermedades Tropicales Desatendidas

Se conoce como Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) a un grupo heterogéneo de 20 afecciones prevalecientes en áreas tropicales y subtropicales, que impactan a comunidades empobrecidas, principalmente a mujeres y niños. Conllevan consecuencias socioeconómicas, afectando a más de mil millones de personas. Su epidemiología es muy compleja y vinculada a condiciones ambientales. Muchas son transmitidas por vectores, tienen reservorios animales y sus agentes etiológicos tienen ciclos de vida complejos [17].

Además de ocasionar aproximadamente 200.000 muertes al año y una pérdida de 19 millones de años de vida ajustados por discapacidad (*disability-adjusted life year, DALYs*), que es la suma de los años de vida perdidos y los años vividos con discapacidad, estas enfermedades conllevan costos sustanciales para las comunidades. Estos, incluyen gastos directos en salud, la disminución de la productividad, y la reducción de los niveles socioeconómicos y educativos. Varias tienen otras consecuencias como discapacidad, estigmatización, exclusión social y discriminación, suponiendo una carga financiera considerable para los pacientes y sus familias. A pesar de todo lo anterior, las ETD han recibido poca atención y han estado prácticamente ausentes de la agenda de políticas de salud global [3].

1.1.1 Leishmaniasis.

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades provocadas por varias especies de protozoarios parásitos pertenecientes al género *Leishmania*. Son transmitidos a los seres humanos mediante la picadura de un flebótomo hembra infectado. Existen tres formas principales de la enfermedad: leishmaniasis cutánea (LC), la más común, leishmaniasis visceral (LV), la más grave, y leishmaniasis mucocutánea (LM), la más incapacitante. En la mayoría de los casos, las personas infectadas no

desarrollan síntomas a lo largo de su vida. Por ello, el término "leishmaniasis" se refiere a la condición clínica debida a una infección por *Leishmania*, no simplemente a estar infectado con el parásito. Más de mil millones de personas residen en zonas endémicas de leishmaniasis y están en riesgo; se estima que cada año surgen alrededor de 30.000 nuevos casos de LV y más de 1 millón de nuevos casos de LC [18][7].

1.1.1.1 Etiología

El agente etiológico es un protozoo pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, género *Leishmania*, el cual comprende 22 especies patógenas para el humano, agrupadas en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Es endémica en el sur de Europa: Grecia, Italia, Portugal, España y Turquía, donde se notifican alrededor de 700 casos humanos autóctonos en promedio anual; *Leishmania infantum* se identifica como el agente causal, siendo los perros domésticos los principales reservorios [19]. En las Américas se han identificado 15 especies de *Leishmania* con tropismos visceral, cutánea y mucoso.

El parásito es digenético, es decir, durante su ciclo de vida se encuentra en dos formas: como promastigote, de entre 20 μm y 30 μm , extracelular y alargado, con un flagelo que le permite la movilidad en el intestino de los insectos vectores; y, como amastigote, de entre 2 μm y 5 μm , redondeado e intracelular. Esta forma parasitaria carece de flagelo y se multiplica en células del sistema mononuclear fagocítico, principalmente en macrófagos. Ambas formas se dividen por fisión binaria y, poseen una mitocondria única modificada, conocida como kinetoplasto.

1.1.1.2 Vectores

Los vectores son dípteros pequeños (< 5 mm) pertenecientes a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*. En las Américas, se reconocen cerca de 540 especies en tres géneros, siendo las que pertenecen al género *Lutzomyia* las que representan el mayor riesgo sanitario. Las hembras son hematófagas con actividad principalmente crepuscular y nocturna. Estos vectores predominan en las regiones tropicales y subtropicales, sus hábitats varían desde la selva húmeda hasta regiones muy áridas.

La biología de cada una de las diferentes especies es única y compleja, pero en todos los casos las larvas son terrestres o crecen en residuos orgánicos, pero nunca son acuáticas. A diferencia de los mosquitos, no tienen una etapa acuática en su ciclo de vida. Sin embargo, la humedad y la temperatura afectan su desarrollo, esto justifica que se distribuyan en áreas con temperaturas superiores a 15,6 °C, durante al menos tres meses al año. Esto corresponde a la mayor parte del mundo: desde la latitud 50° N hasta la latitud 40° S, estando ausentes solo en Nueva Zelanda y las islas del Pacífico [20].

1.1.1.3 Reservorios del parásito

Los reservorios son animales vertebrados que mantienen al parásito en la naturaleza, permiten que los vectores se infecten de ellos y perpetúan el ciclo de transmisión. Las leishmaniasis pueden ser zoonóticas, cuando los huéspedes reservorios son animales salvajes, comensales o animales domésticos, y antropozoonóticas, cuando el huésped reservorio es el ser humano. Los animales domésticos y salvajes infectados por *Leishmania* pueden o no presentar signos evidentes de infección, algunos, como el perro, pueden morir de la infección [21].

En las Américas, donde se considera que las leishmaniasis son zoonosis, los reservorios que se han identificado incluyen a los marsupiales, al oso perezoso, al oso hormiguero, al zorro y a varios roedores; siendo el perro el reservorio doméstico más importante [22].

1.1.1.4 Ciclo de vida de la Leishmaniasis

A continuación, se describe el ciclo de vida de la leishmaniasis tal como consta en una publicación de la OMS que contiene las opiniones conjuntas de un grupo internacional de expertos: *Operational manual on leishmaniasis vector control, surveillance, monitoring and evaluation* [23] de donde también se tomó la figura 1.

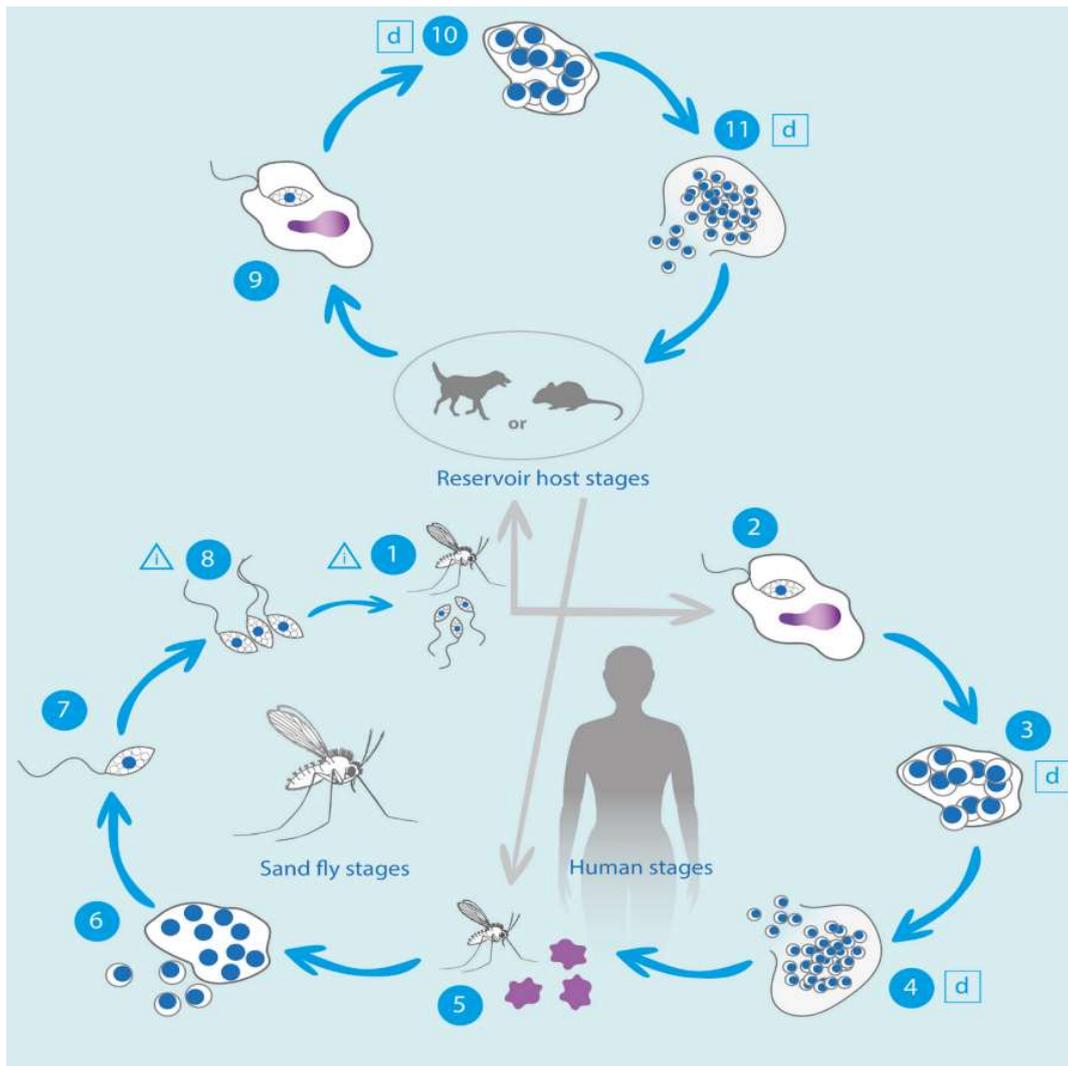


Figura 1. Ciclo de vida de las leishmaniasis

1. Un vector infectado se alimenta de sangre de un humano u hospedador reservorio (inocula promastigotes metacíclicos en la piel).
2. Los promastigotes son fagocitados por macrófagos (u otros tipos de células fagocíticas mononucleares).
3. Los promastigotes se transforman en amastigotes (la "d" indica que es una etapa donde se puede diagnosticar la enfermedad).
4. Los amastigotes se multiplican en células de varios tejidos e infectan otras células.
5. El vector se alimenta de sangre que contiene amastigotes.
6. Los amastigotes sobreviven dentro de la membrana peritrófica que se forma alrededor de la sangre ingerida.

7. Los amastigotes se transforman por diferentes etapas de promastigotes en el intestino del vector después de que la membrana peritrófica se descompone.
8. Los promastigotes atraviesan una serie de transformaciones y se multiplican en el intestino del vector; luego, los promastigotes metacíclicos (fase infecciosa) se desplazan hacia la parte anterior del intestino y la probóscide, listos para ser regurgitados por el vector durante su próxima toma de sangre.
9. Dentro del hospedador reservorio, los promastigotes son fagocitados por macrófagos (u otros tipos de células fagocíticas mononucleares).
10. Los promastigotes se transforman en amastigotes.
11. Los amastigotes se multiplican en células de varios tejidos e infectan otras células. Este proceso tarda de 7 a 14 días en completarse, dependiendo de la especie de *Leishmania* y de la mosca de arena.

1.1.1.5 Aspectos epidemiológicos

La epidemiología de la leishmaniasis depende de la especie del parásito, de las características de los lugares de transmisión, de la exposición y comportamiento de la población humana. La pobreza incrementa el riesgo de leishmaniasis: las deficiencias en la vivienda, gestión de desechos, alcantarillado, etc., pueden aumentar los lugares de cría de los vectores; el hacinamiento puede atraerlos; la formación de barrios marginales en zonas periurbanas, así como la migración forzada por factores económicos pueden exponer a la población. Además, las deficiencias nutricionales aumentan la probabilidad de que las formas clínicas se manifiesten.

La distribución irregular de los focos de transmisión discretos se debe a condiciones microecológicas que afectan al vector, al parásito y al reservorio; la tasa de transmisión guarda proporción inversa con la distancia al foco de transmisión, por la limitada dispersión de los flebótomos. Los cambios, naturales o inducidos, en las condiciones ecoepidemiológicas, aumentan o reducen la incidencia de la enfermedad.

La deforestación, la urbanización, la intrusión de áreas agrícolas acercan el ciclo de transmisión a la población: la tasa de infección de las leishmaniasis zoonóticas suele ser más elevada en los márgenes de los focos naturales. En algunos casos, sin embargo, la destrucción de hábitats naturales puede reducir la transmisión.

Estas circunstancias hacen que la leishmaniasis sea sensible al clima: las lluvias, la temperatura y la humedad, alteran la distribución y el tamaño de las poblaciones de vectores y reservorios. Además, pequeños cambios de temperatura pueden afectar el ciclo de los promastigotes en los flebótomos, posibilitando la transmisión en zonas previamente no endémicas. Por otra parte, la sequía, el hambre y las inundaciones producen migraciones y desplazamientos poblacionales hacia zonas con transmisión de la leishmaniasis [22].

1.1.1.6 Distribución geográfica

Las leishmaniasis están en los cinco continentes y son endémicas en 98 países o territorios. Entre 1998 y el 2019 se registró una tendencia general de aumento en el número de casos nuevos de LC, y una marcada disminución entre el 2019 y el 2020.

En el mundo, el 80% de la LV se concentra en Brasil, Etiopía, Eritrea, India, Kenia y Sudán. Más de 90% de los casos de LC ocurren en las Américas y el Mediterráneo Oriental. Por otra parte, la LM ocurre principalmente en las Américas: Bolivia, Brasil y Perú son los países con los registros más altos.

En las Américas se han registrado casos desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, con excepción de Chile. En el período 2001-2020 se registraron 1.067.759 casos de LC y LM, con un promedio anual de 53.387 y una tendencia decreciente. Brasil, Colombia y Perú son los países con más casos. En el mismo período se registraron 67.845 casos de LV, con un promedio anual de 3.392; el 96% se notificaron en Brasil, seguido por Paraguay, Colombia, Venezuela y Argentina. Si bien la tendencia también es a la disminución, el área geográfica se incrementa [22].

En el Ecuador se ha reportado leishmaniasis en todo el territorio, excepto el insular; la forma clínica mayoritaria es LC, no se han reportado hasta la fecha LV. En 2022 las provincias más afectadas fueron Morona Santiago, Esmeraldas y Pichincha. La tendencia, al igual que en otras regiones es que el número de casos reportados disminuyan [24]. La figura 2 resume en un esquema la información presentada hasta este punto.

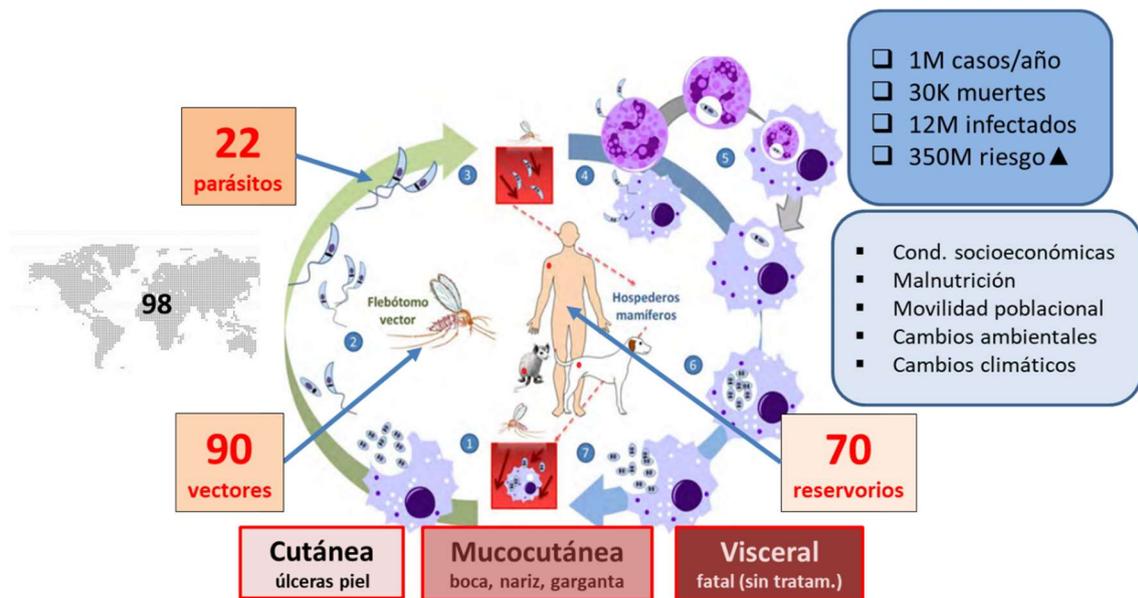


Figura 2. Resumen esquemático de los principales aspectos de las Leishmaniasis

1.1.2 Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis

1.1.2.1 Leishmaniasis visceral (LV)

Es la forma clínica más grave, si no se diagnostica o trata adecuadamente puede ocasionar la muerte. Cuando los parásitos y macrófagos infectados invaden hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos, infectan a los macrófagos locales causando fiebre constante o irregular, esplenomegalia leve, hepatomegalia, linfadenopatías, palidez mucocutánea causada por anemia grave, y pérdida de peso lenta y progresiva. Sin embargo, la mayoría de infectados no presenta ninguno de estos signos y síntomas. La LV afecta principalmente a niños menores de 5 años, puede asociarse con aspectos nutricionales, pacientes con comorbilidades previas y a otras condiciones de inmunosupresión, como infección por VIH y sida.

Los pacientes presentan plaquetopenia, infección de la médula ósea y secuestro de plaquetas en el bazo. La anorexia es un síntoma frecuente. Las manifestaciones menos frecuentes son la ictericia, el edema, alteraciones neurológicas y ataxia cerebelosa. La leucopenia, hipoalbuminemia, trombocitopenia e hipergammaglobulinemia hace a los pacientes más susceptibles a sangrados e infecciones oportunistas, lo que puede agravar la enfermedad y causar la muerte.

1.1.2.2 *Leishmaniasis Mucocutánea (LM)*

Surge como una metástasis, hemática o linfática, de una lesión cutánea, raras veces contigua o, por picadura directa. Frecuentemente aparece en los primeros 2 años después de haber cicatrizado la lesión cutánea; en algunos pacientes se puede presentar simultáneamente y, en otros, no hay evidencia de cicatrices previas, ni historial de enfermedad. No se cura espontáneamente, provoca destrucciones y mutilaciones graves, afectando la calidad de vida del paciente.

Inicialmente se afecta el tabique nasal con sensación de obstrucción nasal, prurito o dolor, presencia de costras, rinorrea o hemorragia. El eritema, el edema y la infiltración causan aumento de tamaño de la nariz, ocasionalmente hasta las mejillas. Se puede llegar a perforar el cartílago del tabique nasal e incluso destruirse todas las estructuras, causando una deformidad grave. El proceso puede extenderse al paladar y laringe, la úvula se hipertrofia y amputa. Algunos pacientes presentan disfonía, y luego afonía, que compromete su capacidad para comunicarse. En los casos fatales, la complicación terminal suele ser neumonía por broncoaspiración.

1.1.2.3 *Leishmaniasis Cutánea (LC)*

En su variante localizada, las lesiones pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, pero generalmente la mácula, dejada por la picadura del vector, evoluciona a pápula que se ulcera y luego forma una lesión redondeada en forma de cráter u ovalada típica, o bien evolucionan como lesiones nodulares. En ocasiones, se forma una costra bien adherida, que sangra con facilidad cuando se intenta desprenderla. Cuando se desprende se observa la úlcera típica: superficie limpia, rosada, tejido granuloso, forma redondeada, de bordes regulares y elevados, indolora y de base indurada. A veces, en las úlceras se producen infecciones secundarias con inflamación local, dolor y, en algunos casos, secreción purulenta. Los parásitos invaden vasos y ganglios linfáticos, con aparición de nódulos y adenopatías regionales en su trayecto. La úlcera puede curarse espontáneamente en semanas o meses, o, volverse crónica.

En su variante diseminada, las úlceras granulomatosas de bordes elevados dan lugar a varios cientos de lesiones papulares con apariencia de acné en diferentes zonas

del cuerpo. Después de las lesiones primarias, el parásito se disemina por la sangre o los vasos linfáticos, generando lesiones a distancia de las iniciales.

La variante difusa, rara pero grave, es una condición anérgica, en la que, por efecto directo del parásito o del sistema inmunitario, el hospedador no responde en forma adecuada ante la infección. Presenta lesiones numerosas, de tipo nodular y en forma de placas que la asemejan a la lepra, con gran contenido de parásitos. La respuesta al tratamiento es transitoria, en muchos casos pueden causar deformidades o mutilaciones.

Finalmente, la variante atípica, se ha descrito en Venezuela y Centroamérica, en infecciones con *Leishmania infantum*, se trata de lesiones circunscritas en forma de nódulos o placas, no ulceradas y crónicas [22] [21].

1.1.3 Fármacos recomendados para el tratamiento de la leishmaniasis

El tratamiento de la leishmaniasis sigue siendo un desafío y depende todavía de compuestos con efectos secundarios tóxicos. Se necesitan con urgencia nuevos tratamientos para esta enfermedad. El hecho de que más de 20 especies de parásitos sean los causantes, hace muy difícil utilizar los mismos regímenes en todas las áreas geográficas [25].

La selección de la terapia farmacológica debe basarse en función de la forma clínica de la enfermedad, la edad y condición del paciente, la relación riesgo-beneficio del medicamento, su disponibilidad, el tipo de servicio de salud disponible para la administración y el seguimiento, entre otros factores. A continuación, se describen algunos de estos tratamientos.

1.1.3.1 Antimoniales pentavalentes

El antimoniato de meglumina y el estibogluconato de sodio son químicamente similares, su toxicidad y eficacia dependen del contenido de antimonio: la solución de antimoniato de meglumina contiene un 8,1% de Sb^{5+} , mientras que la de estibogluconato de sodio contiene un 10%. Se administran por inyección intramuscular o intravenosa en infusión (en 5–10 min) o inyección lenta con aguja fina para evitar el riesgo de trombosis. En los casos de leishmaniasis cutánea, el fármaco puede administrarse directamente en las lesiones.

Los efectos adversos más comunes son: anorexia, vómitos, náuseas, dolor abdominal, malestar, mialgias, artralgias, cefaleas, sabor metálico y letargo. La cardiotoxicidad y la muerte súbita son efectos adversos graves, pero infrecuentes. La elevación de las enzimas pancreáticas, hepáticas, la leucopenia, la anemia y la trombocitopenia también son frecuentes. Deben vigilarse la bioquímica sérica, el hemograma y el electrocardiograma. Se cambiará de fármaco en caso de que aparezcan efectos adversos graves: hepatotoxicidad o cardiotoxicidad. Debe garantizarse la calidad de los antimoniales pentavalentes puesto que los medicamentos de calidad subestándar pueden causar toxicidad grave y muerte.

1.1.3.2. Desoxicolato de anfotericina

La anfotericina B es un antibiótico poliénico administrado por infusión que genera frecuentemente reacciones como fiebre alta y escalofríos, así como tromboflebitis de la vena inyectada. La nefrotoxicidad también es común, y lleva a la interrupción frecuente del tratamiento. Efectos tóxicos infrecuentes, pero graves, son la hipopotasemia y la miocarditis. Este tratamiento debe administrarse siempre en un hospital para que el paciente pueda ser sometido a monitorización continua.

Se han utilizado también varias formulaciones lipídicas de anfotericina B, como la liposomal, el complejo lipídico de anfotericina B o la dispersión coloidal de anfotericina B, cuya eficacia es similar a la del desoxicolato de anfotericina B, pero con toxicidad significativamente menor. Se administran por infusión intravenosa durante 2 horas pudiendo producir fiebre, escalofríos y dolor de espalda. Se ha observado nefrotoxicidad o trombocitopenia transitorias. La mayoría de los ensayos clínicos se han realizado con una formulación liposomal de referencia; debería evaluarse la toxicidad, bioequivalencia y eficacia de todas las demás formulaciones lipídicas antes de utilizarlas en la clínica.

1.1.3.3. Paramomicina

Es un antibiótico aminoglucósido que se administra por vía intramuscular en dosis de hasta 20 mg/kg. El efecto adverso más frecuente es el dolor leve en el lugar de la inyección, en un 2% de los casos hay ototoxicidad reversible, la nefrotoxicidad es rara; se puede presentar hepatotoxicidad, manifestada por la elevación de las enzimas

hepáticas; también se han descrito casos de tetania. Está disponible una formulación tópica para la leishmaniasis cutánea.

1.1.3.4. Isetionato de pentamidina

Se administra preferentemente en infusión, la vía intramuscular es una alternativa. Presenta efectos adversos graves: diabetes mellitus, hipoglucemia grave, choque, miocarditis y nefrotoxicidad, por ello su uso está muy limitado.

1.1.3.5. Miltefosina

Un análogo de los fosfolípidos, desarrollado inicialmente como antineoplásico, es el único tratamiento oral disponible; produce frecuentemente efectos colaterales gastrointestinales tales como anorexia, náuseas, vómitos y diarrea, que suelen ser de corta duración. En ocasiones los efectos pueden ser graves y exigir la interrupción del tratamiento, se ha reportado alergia cutánea, elevación de las transaminasas hepáticas e insuficiencia renal. Es teratógena: no debe utilizarse en embarazadas ni en mujeres en edad de procrear en las que no se pueda garantizar anticoncepción adecuada durante y hasta 3 meses después del tratamiento [21]. A pesar de lo anterior, en comparación con otras opciones, tiene un perfil de seguridad favorable. Sin embargo, su uso se limita por la resistencia y eficacia variable contra diferentes parásitos [25].

La tabla 1 muestra las recomendaciones, para las Américas, de la Organización Panamericana de la Salud, OPS [22], para tratar la leishmaniasis en adultos no inmunodeprimidos; constan las vías de administración, dosis y los esquemas. El color verde representa una recomendación “fuerte” y el naranja una “condicional”.

Tipo	Substancia	Vía	Régimen
VISCERAL	Anfotericina B liposomal	Intravenosa	3 mg/kg/día (hasta 20 mg/Kg) 7 días
	Antimoniales pentavalentes	Intravenosa	20 mg de Sb ⁺⁵ /kg/día 20 días
	Anfotericina B desoxicolato	Intravenosa	1 mg/kg/día (hasta 50 mg/día) 14-21 días.
MUCOCUTANEA	Antimoniales pentavalentes + Pentoxiflina	Intravenosa o Intramuscular + Oral	20 mg de Sb ⁺⁵ /kg/día + 400 mg cada 8 h 30 días
	Antimoniales pentavalentes	Intravenosa o Intramuscular	20 mg de Sb ⁺⁵ /kg/día 30 días
CUTANEA	Antimoniales pentavalentes	Subcutánea (Intralesional)	3 a 5 infiltraciones / sesión Intervalo entre sesiones 3 a 7 días
	Paramomicina	Tópica	1 vez al día 20 días
	Miltefosina	Oral	2,5 mg/kg/día (hasta 150 mg / día) 28 días
	Isetionato de Pentamidina	Intramuscular	4 - 7 mg/kg/día 3 dosis cada 72 h
	Antimoniales pentavalentes	Intravenosa o Intramuscular	20 mg de Sb ⁺⁵ /kg/día 20 días

Tabla 1. Recomendaciones para el tratamiento de leishmaniasis

La tabla 2, compila los efectos secundarios, que requieren de atención médica, de los medicamentos recomendados para tratar la leishmaniasis [26].

ANFOTERICINA	<p>fiebre y escalofríos dolor de cabeza aumento o disminución de la micción latidos cardíacos irregulares calambres o dolor muscular náuseas dolor en el lugar de la inyección cansancio o debilidad inusual vómitos</p>	<p>disminución de la micción dolor de garganta y fiebre sangrado o hematomas inusuales diabetes/nivel alto de glucosa en sangre somnolencia piel enrojecida y seca aliento con olor frutal aumento de la sed aumento de la micción pérdida de apetito baja azúcar en la sangre ansiedad escalofríos sudores fríos piel fría y pálida dolor de cabeza aumento del hambre náuseas nerviosismo temblores presión arterial baja visión borrosa</p>	PENTAMIDINA
MILTEFOSINA	<p>dolor abdominal o de estómago hinchazón de cara, brazos, manos, piernas heces con sangre, negras o alquitranadas escalofríos o fiebre mareos picazón o sarpullido dolor en el escroto manchas rojas en la piel reducción volumen eyaculación diarrea o vómitos intensos sangrado o moretones inusuales cansancio o debilidad inusuales ojos o piel amarillos</p>		
MEGLUMINA ANTIMONIATO	<p>fiebre latidos cardíacos irregulares náuseas dolor en abdomen y espalda vómitos cambios en el color del rostro escalofríos tos o ronquera menor cantidad y frecuencia de micción dificultad respiración, opresión en el pecho desmayo o pérdida del conocimiento voz ronca hinchazón de los párpados erupción cutánea y/o picazón hinchazón de la cara cansancio o debilidad inusual</p>		
		<p>calambres abdominales o estomacales diarrea náuseas ototoxicidad hepatotoxicidad nefrotoxicidad</p>	PARAMOMICINA
		<p>dolor en el pecho latidos cardíacos irregulares somnolencia rubor desmayo convulsiones</p>	PENTOXIFILINA

Tabla 2. Resumen de los efectos secundarios de los fármacos recomendados para el tratamiento de leishmaniasis.

En resumen, las leishmaniasis son zoonosis complejas, lo que hace que su erradicación sea poco probable por lo que el enfoque debe estar en la eliminación (incidencia cero en una determinada área geográfica). Ninguno de los medicamentos actualmente disponibles para el tratamiento resulta satisfactorio; por ello se requieren nuevas opciones, especialmente aquellas diseñadas para adaptarse a los sistemas de salud rurales que cuentan con recursos limitados [27]. Estas alternativas deben ser versátiles en cuanto a su vía de administración, con el objetivo de ser administradas preferentemente fuera del entorno hospitalario (en los “*Point-of-care*” o PoC) y en esquemas de corta duración.

1.2 Reposicionamiento de fármacos

El proceso tradicional de descubrimiento y desarrollo de fármacos es un proceso costoso en términos de tiempo (12 a 17 años) y, de dinero (sobre 1000 millones de dólares). A pesar de las enormes inversiones, las posibilidades de que una molécula se comercialice suelen ser mínimas y, aun si llega al mercado, su destino durante su ciclo de vida es impredecible [28].

La razón de lo anterior está en la alta presión regulatoria a la que están sometidas las empresas farmacéuticas durante las cuatro etapas de la I&D de medicamentos: descubrimiento de las moléculas, estudios preclínicos, ensayos clínicos y seguimiento de la seguridad post comercialización; totalmente justificada para reducir los riesgos en cuanto a la seguridad y eficacia de los medicamentos [29][9].

La definición de original de Ashburn y Thor, del 2004: “El proceso de encontrar nuevos usos para medicamentos existentes” [30], ha sido ampliado para incluir sustancias activas que fracasaron en la fase clínica de su desarrollo debido a su toxicidad o eficacia insuficiente, así como a medicamentos retirados del mercado por motivos de seguridad. Sin embargo, no debería incluir sustancias que aún no hayan sido sometidas a investigación clínica; excluye también por su puesto, cualquier modificación estructural de la molécula [31].

El reposicionamiento de fármacos disminuye significativamente el tiempo hasta la comercialización, entre 3 y 12 años y, el coste se reduce, hasta en un 80% según algunos autores, e incrementa las posibilidades de introducción al mercado, hasta un 150%. El proceso regulatorio también se simplifica en algunos países, pero por

supuesto, cualquier cambio en la formulación, dosis o vía de administración requerirá un nuevo examen del perfil de seguridad [31].

Este enfoque también presenta desventajas, desde el punto de vista de una compañía farmacéutica, la principal es la débil propiedad intelectual, que puede reducir el retorno de la inversión. Como el fármaco ya fue patentado como una nueva entidad química, los medicamentos posteriores que lo contengan sólo pueden protegerse mediante una nueva solicitud de patente, posiblemente respaldada por un nuevo proceso de formulación [31].

Las estrategias para el reposicionamiento pueden ser *in silico* y experimentales, pero siempre requieren de una extensa revisión bibliográfica. La estrategia *in silico*, inicia con la evaluación de moléculas aprobadas frente a un *target* terapéutico usando herramientas computacionales; luego, una etapa, *in vitro* e *in vivo*, en la que se estudian vías fisiopatológicas específicas; y finalmente, una etapa de estudios clínicos.

En la estrategia experimental, por otro lado, se parte de moléculas de las que se tenga cierto conocimiento sobre su seguridad o mecanismo de acción; muchas de ellas están comercialmente disponibles o pueden obtenerse de programas de apoyo para la investigación. Una vez seleccionadas, se realizan ensayos *in vitro*, *in vivo* y clínicos [29] [9].

Existen varios ejemplos de la aplicación de ambas estrategias o de una combinación de ellas, vamos a citar algunas a modo ilustrativo. Se ha descubierto que el Itraconazol, aprobado principalmente como agente antifúngico, es inhibidor de la angiogénesis. El compuesto ya fue aprobado para ensayos de Fase 2 para investigar su eficacia como agente terapéutico de segunda línea en el tratamiento del cáncer de pulmón y cáncer de próstata. El Saracatinib, un fármaco de fallido como anticancerígeno, mostró una reversión sustancial de los síntomas en modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer y pasó a estudios Fase 1. La Talidomida es un ejemplo de una droga con un excepcionalmente pobre perfil toxicológico que fue reposicionada no una sino dos veces, en 1998 para tratar la lepra y en el 2006 para el mieloma múltiple [31][9].

En el ámbito de las enfermedades tropicales olvidadas encontramos múltiples ejemplos. En Malaria, son varios los antibióticos: doxiciclina se utiliza como profilaxis en combinación con otros medicamentos, por su actividad sobre esquizontes de este parásito, igualmente sucede con la clindamicina. Algunas sulfas, inicialmente indicadas para infecciones urinarias, como el cotrimoxazol se han usado exitosamente en esta enfermedad.

Varios de los medicamentos leishmanicidas aprobados, fueron reposicionados. La anfotericina B originalmente fue desarrollada como antifúngico; la paramomicina, es un antibiótico aminoglicósido, que aparte de su actividad frente a leishmania, se puede usar contra giardia y entoamebas. La miltefosina fue simultánea pero independientemente investigada como antineoplásico. El camino también se ha recorrido en sentido inverso: varios fármacos antiprotozoarios se han investigado para otras aplicaciones. Quinina, para lupus y artritis; cloroquina como antiamebiano; artemisinina como antimicrobiano y anticáncer, son algunos de ellos [32].

Tendría mucho sentido reposicionar fármacos para tres de las enfermedades tropicales olvidadas más comunes causadas por tripanosomatídeos: tripanosomiasis humana africana, chagas y leishmaniasis, que tienen dianas comunes. La secuenciación genómica de los tripanosomatídeos y los estudios bioinformáticos han demostrado la existencia de secuencias proteicas similares a las quinasas humanas y pueden usarse como posibles dianas.

En este contexto, milciclib y dinaciclib, inhibidores de las enzimas humanas, han mostrado actividad leishmanicida en el rango nanomolar [33]. Otro ejemplo son las estatinas que son potentes inhibidores de la producción de colesterol. Dado que el destino de las infecciones con *Leishmania spp.* depende de los niveles de colesterol del huésped, se han descubierto que muchos parásitos protozoarios, como *Plasmodium falciparum* y los *Trypanosoma cruzi* y varias *Leishmania spp.* son inhibidos por las estatinas [34].

Es importante señalar que la identificación de la diana y la comprensión del mecanismo de acción de una molécula, son cruciales para acelerar el descubrimiento de fármacos. Así, se abren oportunidades para identificar variaciones en los grupos funcionales que mejoren la potencia y la selectividad, y nos alertan sobre posibles efectos indeseables en el ser humano [35]; criterios válidos tanto para el desarrollo tradicional, como para el reposicionamiento de fármacos.

1.3 Sistemas de Nanoencapsulación para administración de fármacos

Desde que en la década del setenta Taniguchi acuñó el término Nanotecnología para describir la manipulación de la materia a nano escala [36], más específicamente: la separación, consolidación y deformación de materiales por átomos o moléculas [37], esta disciplina ha impactado muchas ciencias e ingenierías [38], una de ellas es la

Nanomedicina. Entendida como el diseño y aplicación de nanoplataformas para obtener mejores resultados terapéuticos y de diagnóstico, que con micro o macrosistemas [39], la Nanomedicina, utiliza extensivamente una gran variedad de nanotransportadores como sistemas de entrega de fármacos. A continuación, se repasan los principales sistemas usados para entrega de fármacos, la mayoría aún no han llegado a comercializarse.

1.3.1 Nanotubos de carbono

Son estructuras huecas en forma de tubo formadas por láminas de grafeno enrolladas; pueden tener pared simple múltiple. Su sección transversal puede tener entre 0,4 y 100 nm de diámetro, mientras que su longitud puede ser miles mil veces la del diámetro. Presentan múltiples ventajas para administrar fármacos, como peso ultraligero con alta superficie, y, propiedades químicas, térmicas, mecánicas y eléctricas propias. Su particular forma de aguja facilita el proceso de endocitosis mediante la penetración de las barreras biológicas. Los nanotubos funcionalizados son solubles en agua lo que incrementa el período de circulación en el suero. Por otro lado, los nanotubos de carbono no funcionalizados son tóxicos e insolubles en agua. Su estabilidad estructural, flexibilidad y superficie modificada han hecho que se usen con paclitaxel, mitomicina C, doxorubicina, metotrexato, etc. para atacar las células cancerosas [40]. De todas las nanoestructuras conocidas, es una de las más utilizadas en campos tecnológicos muy diversos, sin embargo, su toxicidad es un tema aún pendiente [41].

1.3.2 Nanopartículas de Oro

Se pueden obtener en diferentes formas: estrella, cilindro, prismas, "jaulas", "cáscaras", entre otras. Sus propiedades más destacables son las ópticas, gracias a ellas tienen aplicaciones en la generación de imágenes fotoacústicas y el RMN de superficie mejorada; se emplean además en la liberación fototermal de fármacos y en terapia génica. También se pueden adherir a su superficie enzimas, carbohidratos, fluoróforos, péptidos, péptidos, proteínas y genes, ayudando a superar las barreras biológicas, mejorando por tanto la internalización celular; sin embargo, la obtención de imágenes de células tumorales, es aún su mayor aplicación [40].

1.3.3 Nanotransportadores magnéticos

Un nanoportador magnético consta de un núcleo metálico de hematita, maghemita, nanoferritas o magnetita. Se utilizan para direccionar drogas a las células cancerosas, para terapia génica y como sensores, por funcionalización de su superficie. Presentan hipertermia por la acción de campos magnéticos alternantes, con aplicaciones en liberación de drogas bajo demanda o por el efecto localizado del incremento de temperatura; sin embargo, existen problemas en la penetración de los campos magnéticos a zonas profunda de los modelos animales. Recubiertas de polímero han sido usadas para obtener imágenes debido a su resonancia magnética. Nanoportadores magnéticos con paclitaxel, mostraron una mayor penetración en las células tumorales y una liberación controlada del fármaco con mayor citotoxicidad. Se han aplicado también combinando la terapia con el diagnóstico, en el cáncer [42].

1.3.4 Quantum dots

Son nanocristales de elementos como Se, Zn, Te, Cd, In, As, o P; emiten luz dependiendo de su tamaño desde el UV cercano hasta el infrarrojo: las de diámetro cercano a 2 nm emiten fluorescencia azul, mientras que los de 5 nm, la emiten roja; estas propiedades ópticas permiten su uso en la obtención de imágenes celulares.

Para disminuir el efecto tóxico de algunos metales y no metales, por ejemplo, el cadmio del quantum dot de CdSe, se recubrió con capas de ZnS; lo cual, además, incrementó su acumulación en tejido vascular en ratones. Se pueden usar también como sistemas de entrega de fármacos, por ejemplo, la modificación de su superficie permitió la unión péptidos anticáncer y una mayor internalización celular. También se han empleado vehiculizando ARN de interferencia (ARNi) en estudios de supresión génica. Son eficientes marcadores fluorescentes que se utilizan en sistemas de entrega de fármacos para monitorear su metabolismo [43].

1.3.5 Nanotransportadores de Sílice mesoporosa

Su principal característica es la extensa área superficial que presentan por la presencia de poros en toda su estructura, que permiten la incorporación de fármacos

hidrofóbicos e hidrofílicos. El tamaño y la forma de los poros es muy variado y dependiente del proceso de síntesis [44]. Además, de presentar una alta capacidad de carga, así como, estabilidad química y térmica, entre sus principales ventajas están la biodegradabilidad y biocompatibilidad [45]. Se han usado en estudio contra el cáncer transportando camptotecina y metotrexato. Hay numerosos estudios clínicos en curso para el tratamiento de estas y otras enfermedades.

1.3.6 Nanocristales de fármacos

La obtención de nanocristales mejora la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos debido a una mayor relación entre la superficie de la partícula y su volumen; las mejores tasas de disolución asociadas impactan positivamente en su biodisponibilidad. La aplicación de esta tecnología permitiría rehabilitar fármacos con problemas de solubilidad o permeabilidad, que habían sido dejados de lado. De entre todas las nanopartículas, estas se destacan como las de mayor carga de principio activo, teóricamente el 100 %, aunque en la práctica siempre se requiere de surfactantes u otros estabilizantes [46]. Fármacos, como resveratrol, glibenclamida, quercetina, apigenina, curcumina, entre otros, se han usado para producir nanocristales [47].

1.3.7 Dendrimeros

Son macromoléculas tridimensionales de arquitectura radial, con varios puntos de ramificación, que al multiplicarse le hacen alcanzar dimensiones nanométricas; su naturaleza puede ser orgánica o inorgánica, pero los grupos periféricos o terminales pueden ser funcionalizados [48]. La solubilidad de los dendrimeros depende de los grupos terminales, si son hidrófilos pueden hacerlo soluble en agua. Pueden transportar una variedad de moléculas debido a su estructura tridimensional, a sus grupos terminales y numerosos espacios internos. Los dendrimeros pueden aumentar la solubilidad del fármaco, aumentar el tiempo de circulación sanguínea, mantener concentraciones del fármaco superiores a la dosis terapéutica mínima en plasma, proteger los fármacos de posibles daños ambientales y modificar la liberación del fármaco [49].

A diferencia de los polímeros, los dendrimeros se sintetizan en condiciones muy controladas, lo que da lugar a compuestos monodispersos con estructuras ramificadas

muy regulares y masas moleculares exactas. Se utilizan varios métodos para su síntesis, pero en general, empiezan con moléculas centrales multifuncionales a las que se añade un grupo reactivo dando como resultado el dendrímero de primera generación; luego, la nueva región periférica de la molécula se activa y sufre reacciones con otros monómeros [50]. La investigación para aplicarlos como sistemas de entregas de fármacos es muy activa en quimioterapéuticos.

1.3.8 Nanomicelas poliméricas

La principal característica es su formación espontánea a partir del autoensamblaje de copolímeros de bloques anfifílicos en solución acuosa. En solución acuosa diluida, las moléculas anfifílicas están separadas, si se agregan más moléculas al sistema, mayor es la adsorción de ellas en la interfaz hasta que se produce su agregación debido a la saturación de la solución, punto en el que se alcanza la Concentración Micelar Crítica (CMC). Las micelas son estables a concentraciones superiores a la CMC, mientras que se observa un desmontaje del sistema por debajo de la misma [51].

Los fármacos pueden encapsularse en las micelas durante su formación o en un paso posterior, dependiendo de sus características fisicoquímicas, y terminan alojándose cerca de la superficie o en el núcleo interno, en función de estas [52].

1.3.9 Liposomas

Los liposomas están entre las nanomedicinas de las que se dispone más información en cuanto a su seguridad, eficacia y manufactura a escala industrial. De un total de más de 2300 estudios clínicos realizados con liposomas, registrados en la librería Nacional de Medicina a la fecha, más de 500 fueron concluidos y disponen de resultados [53], así mismo, desde la aprobación del *Doxyl*, a mediados de la década de los noventa, más de una docena de medicamentos liposomales, sin considerar los productos genéricos, están aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) o la EMA (European Medicines Agency) y se comercializan [54].

Los liposomas son vesículas esféricas constituidas por lípidos y fosfolípidos que forman una bicapa, los unilamelares, o una serie concéntrica de múltiples bicapas, los multilamelares, que encierran un compartimento acuoso central. Su tamaño va desde

unas decenas de nm hasta la escala micrométrica, la bicapa de fosfolípidos tiene un espesor de entre 4 a 5 nm [55].

Los métodos de fabricación comúnmente utilizados son los de hidratación de película fina, inyección de etanol y doble emulsión. El principal problema asociado es la carga de fármaco, es muy importante definir la etapa del proceso en la que se realizará. La carga pasiva implica colocar películas lipídicas sobre un sustrato seguida de hidratación para formar liposomas. En la de carga activa, el fármaco se incorpora después de la preparación del liposoma, generalmente por gradientes de pH dependiendo del pKa del fármaco [56].

Son adecuados para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas utilizando las vías de administración ocular, oral, pulmonar, transdérmica y parenteral [54]. Presentan ventajas significativas como alta biocompatibilidad, baja inmunogenicidad, biodegradabilidad, vida media prolongada del fármaco, posibilidad de administración dirigida, menor toxicidad sistémica, protección de moléculas sensibles, mejor biodisponibilidad, entre otras [56]. En contraparte, pueden tener una baja estabilidad química pues los fosfolípidos pueden oxidarse o hidrolizarse, su estabilidad física también suele ser reto durante su desarrollo y elaboración, los fármacos pueden difundir hacia el exterior del liposoma, y, no menos importante, sus costos de producción y distribución son elevados [57].

1.3.10 Niosomas

Son sistemas de entrega autoensamblables, esféricos, vesiculares, uni- o multi lamelares, similares a los liposomas, pero tienen como componente principal los surfactantes no iónicos. Ofrecen algunas ventajas: mayor estabilidad química y física que los liposomas, grupos funcionales hidrofílicos en la superficie, fácilmente modificables, menos tóxicos y más biocompatibles porque no tienen carga superficial. Al igual que los liposomas, pueden encapsular fármacos hidrofílicos y lipofílicos, mejorando su biodisponibilidad, se pueden administrar por vías oral, parenteral, transdermal, ocular y pulmonar. Por otro lado, comparten algunas desventajas como el escape del fármaco desde el interior y los costos de producción elevados [58].

Se preparan por hidratación de película fina y por métodos de inyección, con éter, pero también evaporación de fase inversa, microfluidización, fluidos supercríticos, entre otros [59]. Las propiedades fisicoquímicas de los niosomas dependen del tipo y

cantidad de los surfactantes y de los principales aditivos (colesterol y derivados), de la temperatura de hidratación, y del tipo de fármacos [60].

1.3.11 Nanoemulsiones

Una emulsión es una mezcla de dos o más líquidos inmiscibles, con una fase que se mantiene dispersa en otra, la fase continua, gracias a la presencia de surfactantes que disminuyen la tensión interfacial. Las nanoemulsiones son emulsiones transparentes debido a que la fase dispersa tiene diámetros de gota de 20 a 200 nm. El menor tamaño de gota trae consigo una mayor relación superficie a volumen, que las hace termodinámicamente inestables, por lo que en la interfaz deben adicionarse cosurfactantes; a pesar de ello, pequeños cambios en condiciones físicas o químicas puede causar desestabilización, razón por la cual se debe controlar el pH y el ambiente iónico, y es común incrementar la viscosidad del medio añadiendo polímeros naturales o sintéticos [61].

Los surfactantes tradicionales pueden presentar problemas de biodegradabilidad, biocompatibilidad e incluso toxicidad; los biosurfactantes son alternativas naturales producidos por microorganismos. En cuanto a su carga pueden ser aniónicos o no iónicos, y químicamente son glicolípidos, biopolímeros, lipopéptidos y oligopéptidos. Suelen tener concentración micelar crítica menor que los surfactantes sintéticos [62].

Los métodos de elaboración tradicionales generalmente requieren de la incorporación de alta energía para disminuir el tamaño de gota de una emulsión, mediante Ultrasonido o de Homogenizadores de alta presión. Más recientemente se han desarrollado métodos basados en microfluídica. Existen opciones de baja energía, como aquellas que parten de una microemulsión a la que se va agregando la fase acuosa, presentan como desventaja el uso de concentraciones más altas de surfactante e incluso solventes [61].

De propiedades bien conocidas, permiten desarrollar una gran variedad de medicinas: vacunas, antineoplásicos, los más variados antimicrobianos han sido vehiculizados en ellas [58]. Su pequeño tamaño les permite penetrar en los tejidos y prolongar su circulación, el núcleo oleoso se puede cargar con drogas lipofílicas, protegiéndola del ambiente o de las enzimas, mejorando a la vez la absorción y por tanto

la biodisponibilidad. Además, se puede decorar la superficie con polímeros hidrofílicos, anticuerpos monoclonales y marcadores para diagnóstico [63].

1.3.12 Lípidos nanoestructurados

Las nanopartículas sólido lipídicas se desarrollaron para mejorar la estabilidad de los liposomas, controlando además la liberación del fármaco y disminuyendo la toxicidad por la ausencia de solventes orgánicos; sin embargo, aun presentaban una baja carga útil debido a la reorganización interna de la red cristalina. Se desarrollaron entonces los lípidos nanoestructurados (NLC) que contienen lípidos sólidos y líquidos, en relación 70:30 a 99:1, generando un núcleo lipídico menos ordenado que favorece una mayor incorporación de los fármacos en forma molecular y aglomerados amorfos, disminuyendo además el riesgo de que sean expulsados durante el almacenamiento [64][65].

Entre los lípidos sólidos se pueden nombrar triglicéridos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ceras y esteroides; entre los líquidos, además de triglicéridos, ácido y alcohol grasos se pueden nombrar los aceites vegetales, lecitina, aceites esenciales, escualeno, tocoferol, etc. También se requieren surfactantes para estabilizar la nanoestructura en el medio acuoso, por ejemplo, polisorbatos, fosfolípidos, polaxámeros, algunos surfactantes aniónicos, e incluso cosurfactantes como glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles, etc. [66][67].

Su preparación generalmente involucra un paso de nanoemulsificación, por lo que aplican los métodos antes mencionados; además se han reportado técnicas como el *spray drying* [66], y otras como inyección de solvente, evaporación de solvente de emulsificación y difusión del solvente de emulsificación [65], las cuales se tratarán en próximas secciones.

Se han reportado múltiples estudios con fármacos administrados por varias vías como la parenteral: bromocriptina, apomorfina, baicaleína, para enfermedades neurodegenerativas; transdermal: donepezil para tratar el Alzheimer, clotrimazol como antifúngico; oral: repaglinide en la diabetes; ocular: mangiferina para el tratamiento de las cataratas; pulmonar: montelukast sódico para el asma; pero por su puesto su mayor aplicación está en el área de la quimioterapia: docetaxel, paclitaxel, doxorubicina, quercetina, etopósido, tamoxifen, etc. [66].

1.3.13 Nanopartículas sólido lipídicas (SLNP)

1.3.13.1 Definición

Son sistemas coloidales de lípidos sólidos a temperatura ambiente, generalmente de forma esférica o de plaqueta, con tamaños de 50 a 1000 nm [68], estabilizados por surfactantes hidrofílicos y cosurfactantes [69]. Las dispersiones de SLNP son similares a las emulsiones o/w, pero el lípido es sólido a temperatura ambiente [70].

Se han reportado tres tipos de estructuras, figura 3, de las SLNP, dependientes de sus componentes y método de elaboración. La estructura de *matriz homogénea* (Tipo I), es propia de fármacos muy lipofílicos que están disueltos en la matriz lipídica, o dispersos como agregados amorfos. Se pueden formar por ruptura mecánica, en frío, de partículas más grandes; o, por homogeneización en caliente la matriz lipídica con el fármaco disuelto. En la estructura de *corteza enriquecida* (Tipo II), que se produce durante el enfriamiento de la matriz lipídica fundida, las moléculas de lípidos precipitan primero, formando un núcleo lipídico, la concentración del fármaco aumenta en el resto del lípido fundido, alcanza su límite de solubilidad y cristaliza formando una capa exterior. Por último, la estructura de *núcleo enriquecido* (Tipo III), es opuesta a la anterior y se produce cuando el fármaco está cerca de su límite de solubilidad en el lípido fundido y precipita primero, rodeándose de una cubierta de lípido con menor concentración de fármaco [65] [71] [72].

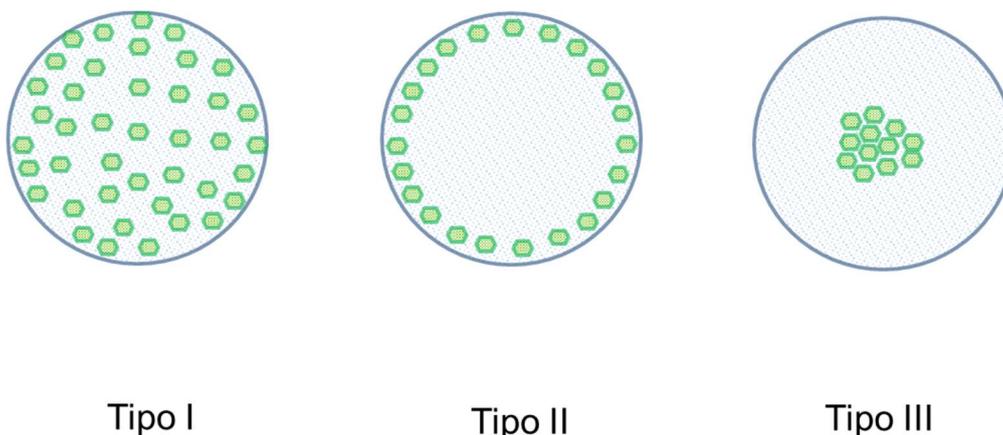


Figura 3. Representación esquemática de los tipos de estructuras para SLNP

1.3.13.2 *Ventajas y Desventajas de las SLNP*

Como es bien conocido, no existe un nanotransportador perfecto, el tipo de nanopartícula debe ser seleccionado desde el diseño del nanomedicamento en función de la vía de administración prevista, de las características fisicoquímicas del fármaco que va a ser encapsulado, y, de otras particularidades como por ejemplo los equipos disponibles y la escala de manufactura. A continuación, se resumen las ventajas y desventajas más relevantes de las SLNP, las cuales deben considerarse para aprovechar las unas, y mitigar, en lo posible, el efecto de las otras.

Ventajas

- Pueden aumentar la biodisponibilidad del fármaco.
- Mejoran la estabilidad del fármaco.
- La capacidad de encapsulación de fármacos es superior a la de otros nanotransportadores.
- Pueden encapsular fármacos hidrofílicos y lipofílicos.
- Son biodegradables.
- Permiten reducir o eliminar el uso de solventes orgánicos.
- Son biocompatibles.
- Permiten esterilizar y liofilizar el sistema.
- Es factible aumentar la escala de producción.
- El costo de producción es relativamente menor que el de otras nanopartículas.
- El proceso de producción genera baja cantidad de residuos que representen una amenaza para la salud humana o el medio ambiente [69]
- Excelente reproducibilidad [73]

Desventajas

- Durante el almacenamiento, la matriz lipídica, especialmente de aquellos altamente purificados, puede sufrir transiciones polimórficas de un estado de alta energía uno de baja energía, formándose una red cristalina más organizada que puede expulsar gradualmente el fármaco [71].

- El tamaño de partícula puede aumentar durante el almacenamiento
- Tienen baja capacidad de carga para fármacos hidrofílicos [69].

1.3.13.3 Componentes de las SLNP

A continuación, en la tabla 3, se citan ejemplos de los componentes más utilizados, omitiendo nombres comerciales, tanto de las sustancias puras o como de combinaciones [65,68,69,73–77].

Componente	Clase	Ejemplo
LIPIDOS	Esteres de glicerol	Gliceril palmitoestearato, Gliceril behenato, Gliceril monoestearato
		Gliceril tripalmitato, Gliceril trimiristato, Gliceril triestearato
		Triglicéridos de cadena media
	Ácidos grasos	Ácidos esteárico, mirístico, palmítico.
	Ceras	Cetil palmitato
		Cera de abeja
		Cera carnauba
	Alcoholes grasos	Alcoholes estearílico, cetílico
Lípido ionizable	PHC, N - palmitoil homocisteina	
SURFACTANTE	No iónico	Polisorbato 20, 60 y 80
		Polietilenglicol)-bloque-polipropilenglicol)-bloque-polietilenglicol)) 182, 188, 407
		Polioxietilenglicol éter de aceite de ricino hidrogenado
	Aniónico	Glicolato de sodio
		Dodecil sulfato de sodio
	Catiónico	CTAB, Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
		DOTAP, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano
	Anfotérico	Lecitina de soya
		Fosfatidil colina

ESTABILIZANTE	Cosurfactante	1-Butanol, etanol
		Glicerol, propilenglicol
		Ácidos propiónico, butírico.
		Taurocolato sódico
	Polímeros	Alcohol polivinílico
		Polietilenglicol

Tabla 3. Clasificación y ejemplos de los componentes más usados para la síntesis de nanopartículas sólido lipídicas

Los lípidos más utilizados son los ácidos grasos, alcoholes grasos y ésteres del glicerol; en ocasiones se incluyen en la formulación lípidos ionizables con la finalidad de modificar la carga superficial y hacerlos más estables, o para facilitar el escape endosomal o para favorecer la incorporación de macromoléculas cargadas como ADN o ARN [68,76,77].

Los surfactantes reducen la tensión interfacial de los componentes permitiendo la emulsificación, pero además estabilizan las nanopartículas una vez formadas. Nanopartículas que emplean lípidos catiónicos, se han beneficiado en cuanto a su estabilidad, con el uso de surfactantes con amonio cuaternario [69], pero no se debe olvidar que, si bien los surfactantes iónicos previenen mejor la agregación de partículas, también son más tóxicos, por lo que la cantidad usada debe ser la mínima necesaria; las formulaciones generalmente llevan de 0,5 a 5 % de surfactantes totales [65].

Los cosurfactantes se añaden cuando se requiere una película interfacial más flexible, que permita estabilizar estructuras más pequeñas, y por tanto con mayor energía libre [78]. Los polímeros por otra parte, a las concentraciones usualmente empleadas en estas formulaciones, forman capas adicionales sobre las nanopartículas previniendo su agregación por estabilización estérica [79,80].

1.3.13.4 *Métodos de elaboración de las SLNP*

Homogeneización a alta presión

Es la principal técnica empleada para producir SLN; es rápida, escalable, no requiere de solventes y hay múltiples equipos disponibles. Debido a la alta presión aplicada, 100 - 1000 bares, las partículas son obligadas a pasar por espacios de pocos micrómetros, de tal manera que se reduce su tamaño por los fuertes esfuerzos cortantes y fuerzas cavitacionales. Este aporte sustancial de energía puede elevar la temperatura de la dispersión afectando a sustancias termosensibles [74].

El proceso se puede realizar en frío o en caliente, en ambos casos, la disolución o dispersión de la droga en el lípido se realiza a temperaturas aproximadamente 5 - 10 °C superiores a su punto de fusión [69]. En la homogeneización a alta presión en caliente, una pre-emulsión a temperatura mayor que el punto de fusión del lípido se somete a tres o más ciclos de homogeneización, una vez que el tamaño de gota se ha reducido lo suficiente, la dispersión se enfría para generar SLNP por recristalización de la matriz lipídica.

En la homogeneización a alta presión en frío, el fármaco se disuelve o dispersa en lípido fundido, la mezcla es rápidamente enfriada y el sólido resultante se muele hasta tamaño micrométrico, antes de dispersarse en una solución acuosa de surfactantes. Finalmente, la suspensión se hace pasar varias veces por el homogeneizador de alta presión [73].

Técnica de la Microemulsión

Al igual que el anterior, empieza disolviendo el fármaco en lípidos fundidos a una temperatura superior a sus puntos de fusión (entre 5 y 10 °C). Se agrega una solución acuosa de surfactante con una temperatura superior a la temperatura del lípido fundido con agitación continua hasta que se obtiene una microemulsión transparente. Esta microemulsión caliente se dispersa en agua fría mediante agitación suave y las microgotículas se rompen en nanogotículas que cristalizan para formar SLNP; finalmente, las nanopartículas deben concentrarse mediante ultrafiltración o liofilización [65]. No requiere de la aplicación de altas energías, las microemulsiones se forman espontáneamente, pero para ello requieren altas cantidades de surfactante lo cual es su principal desventaja [72].

Método de homogeneización de alto cizallamiento por ultrasonificación

La técnica consiste en calentar un lípido sólido hasta 5 a 10 °C por encima de su punto de fusión, dispersarlo en una solución acuosa de tensioactivo, a la misma temperatura, con agitación a alta velocidad para formar una emulsión, y, mediante sonicación, reducir el tamaño de gota. El enfriamiento gradual de la emulsión hasta debajo de la temperatura de cristalización de los lípidos produce una dispersión de SLNP [72].

Una de las ventajas de proceso es que no requiere solvente, sin embargo, las nanopartículas obtenidas pueden tener alta dispersión en cuanto a su tamaño. También existe el riesgo de contaminar la dispersión con fragmentos de metal procedentes de la sonda ultrasónica [65].

Doble emulsificación

Esta técnica es adecuada para fármacos y péptidos hidrófilos. Se prepara una emulsión w/o con la solución acuosa del fármaco y una mezcla de lípidos derretidos. Esta emulsión primaria se dispersa en una solución acuosa de surfactante hidrófilo para formar una emulsión doble w/o/w. Luego, la doble emulsión se agita y se aísla por filtración. Finalmente, el enfriamiento precipita las SLNP [72].

Cada etapa de emulsificación incrementa la polidispersión de la gota, como resultado, el tamaño y estructura de las SLNP es difícil de controlar, lo que limita su uso en aplicaciones que requieren un control y liberación precisos de fármacos [74].

Emulsificación y difusión del solvente

Esta técnica utiliza un solvente orgánico parcialmente miscible en agua como, por ejemplo: lactato de butilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de isopropilo y alcohol bencílico [69]. El solvente está saturado con agua para lograr el equilibrio termodinámico, evitando la difusión del disolvente de las gotas de la fase interna a la fase externa acuosa. El lípido y el fármaco se dispersan en el disolvente y luego se añaden a una solución acuosa que contiene un tensioactivo, formando una emulsión o/w. Las partículas se forman añadiendo más agua, en relación 1:5 a 1:10, lo que facilita la difusión del disolvente hacia la fase continua e incita la precipitación de las

nanopartículas [65]. Posteriormente, el disolvente se elimina mediante liofilización o destilación al vacío. Este método se aplica a compuestos hidrófilos y lipófilos y no necesita temperaturas elevadas [69].

Emulsificación y evaporación del solvente

Implica la disolución de la matriz lipídica en un solvente orgánico inmiscible en agua, y su emulsificación en una fase acuosa. El solvente se evapora a presión reducida, con agitación constante, durante varias horas, precipitando los lípidos como nanopartículas. A veces se requiere un paso intermedio de homogeneización para reducir el tamaño de la gota [72]. Es un método adecuado para fármacos termolábiles, pero tiene como principal inconveniente el uso de disolventes orgánicos que dejan residuos nocivos. La concentración del lípido determina el tamaño de la partícula [65].

Microfluidica

Los métodos tradicionales para elaborar SLNP presentan generalmente baja reproducibilidad en cuanto a las características físicas y químicas, y dificultades para escalar los procesos del laboratorio a la industria. Los métodos basados en microfluidos ofrecen una alternativa para disminuir estos inconvenientes. Su principio implica la manipulación de líquidos en dimensiones de microescala utilizando un dispositivo micromezclador, que permite un control preciso del caudal y presión a la que se combinan la fase oleosa, mezcla de lípidos y fármaco, con la fase acuosa. La rápida mezcla de las fases inducida por el micromezclador permite el autoensamblado de las SLNP debido a la rápida dilución del solvente orgánico. Las nanopartículas así producidas muestran una distribución de tamaño homogénea, reproducible y una estabilidad mejorada en comparación con las técnicas convencionales. La producción se puede escalar usando varios dispositivos en paralelo. De hecho, Pfizer/BioNTech y Moderna Therapeutics usan esta tecnología para la producción en masa de vacunas COVID-19 [81].

Técnica del contactor de membrana

Este método usa un módulo de membrana cilíndrico. La fase acuosa que contiene un tensioactivo fluye desde el interior de la membrana, a temperatura mayor que la de fusión del lípido, y éste se comprime fundido a través de los poros de la membrana desde el exterior hacia el interior para pasar a la fase acuosa. Las SLNP se forman por enfriamiento de la dispersión. El método es escalable y el tamaño de las partículas se puede ajustar con el tamaño de poro de la membrana [72].

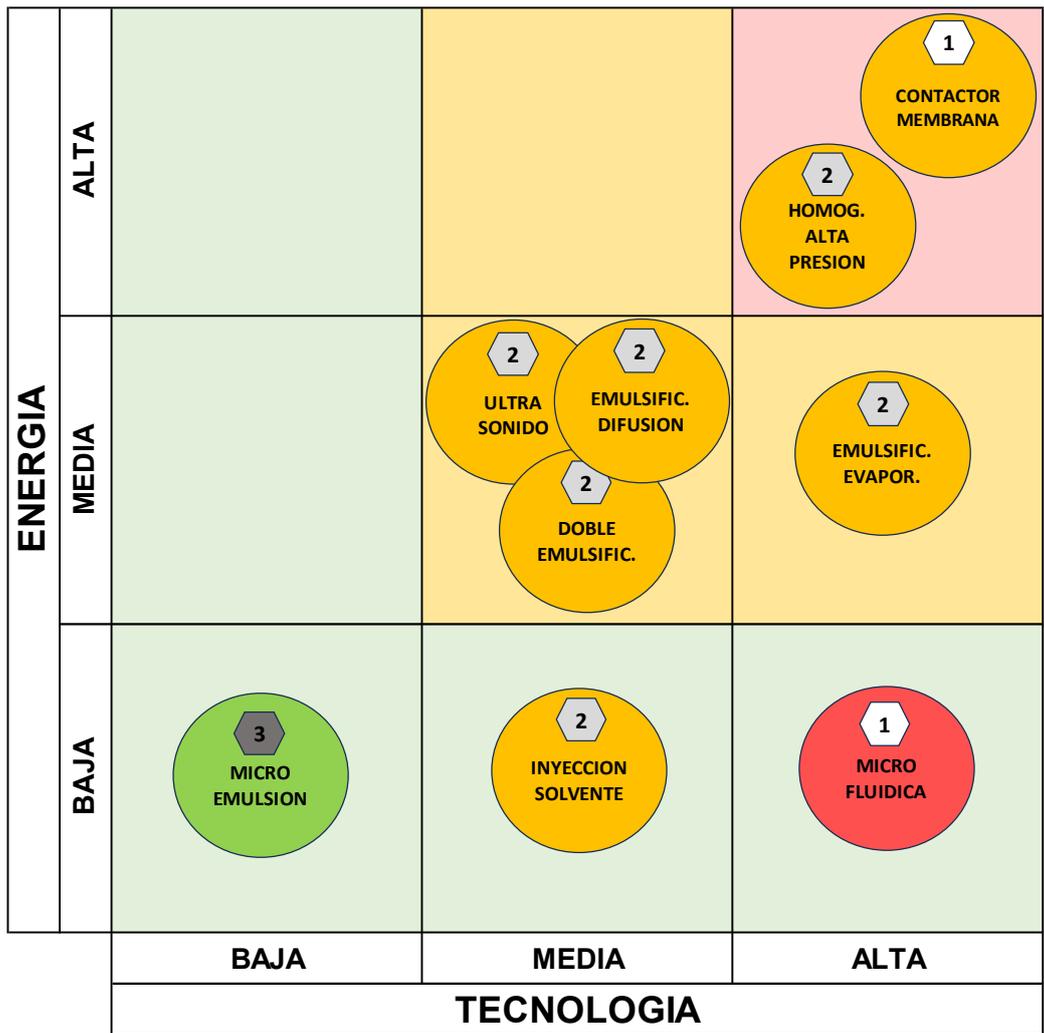
Inyección de solvente

También conocida como nanoprecipitación, o técnica del desplazamiento de disolvente, fue desarrollada y patentada por primera vez por Fessi *et al.* en 1989. Brevemente, un disolvente miscible en agua que contiene lípidos y fármacos hidrofóbicos, la llamada fase orgánica, se mezcla con una fase acuosa [73]. La rápida desolvatación de los lípidos y fármacos conduce a una rápida precipitación de SLNP y a la encapsulación inmediata del fármaco, por lo general, el proceso ocurre bajo agitación; es común la utilización de una aguja para que la inyección ocurra en el seno del líquido [72]. El proceso de nanoprecipitación está influenciado por el efecto Marangoni, que es un fenómeno intrincado y acumulado de turbulencia interfacial debido al flujo, difusión, y cambios de tensión superficial en la interfaz de dos disolventes miscibles [82].

El tamaño y la eficiencia de encapsulación se pueden modificar ajustando la velocidad de agitación, la relación solvente/antisolvente y la concentración de lípidos/surfactante/fármaco. Para reducir la distribución en el tamaño de las nanopartículas, se usa una solución sobresaturada de lípidos para promover la nucleación espontánea. Para obtener un tamaño de nanopartícula más pequeño, la mezcla debe completarse antes de que ocurra la precipitación. Sin embargo, el principal inconveniente de la nanoprecipitación es el control limitado de la dinámica de fluidos, lo que da como resultado nanopartículas con una distribución de tamaño demasiado amplia, especialmente para los grandes volúmenes de la producción a gran escala [71].

El uso de disolventes orgánicos es una desventaja de este método, aunque algunos son farmacéuticamente aceptables, no se pueden utilizar para vías particulares como la parenteral, ocular o intravenosa, ya que cualquier disolvente residual podría afectar negativamente al paciente [74]. Esta técnica es fácil y rápida, se utiliza en el laboratorio para producir SLN para evaluaciones preclínicas; no requiere de equipos complejos [68].

En base a las consideraciones anteriores, en la figura 4 se realiza una clasificación multidimensional, en tres niveles, de los métodos de elaboración de SLNP. La tecnología requerida y la energía necesaria durante el proceso para generarlas se clasifican como baja, media y alta; la escalabilidad, entendida aquí como la factibilidad para transferir el método del laboratorio a la industria, sigue un orden inverso; y, el consumo de solventes y surfactantes se categorizó en bajo, medio y alto. Es importante anotar que se trata de una generalización en base a la interpretación e integración de la literatura revisada, que tiene la finalidad de guiar, en una primera aproximación, la selección de un método de elaboración, no se pretende incluir en espacios estancos a la totalidad de formulaciones y procesos existentes.



SOLVENTES /SURFACTANTES

- BAJO**
- MEDIO**
- ALTO**

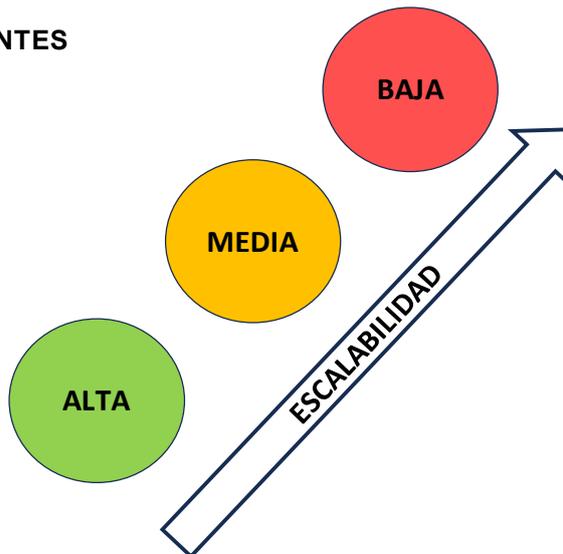


Figura 4. Clasificación de los métodos de elaboración en el contexto de las SLNP

1.3.13.5 Caracterización de las SLNP

Se han utilizado varias técnicas de caracterización para controlar y predecir el comportamiento de los nanotransportadores tanto *in vitro* como *in vivo*. Las más comunes evalúan sus propiedades fisicoquímicas, la carga del fármaco, la velocidad de liberación del fármaco, estabilidad del nanotransportador y la estabilidad del fármaco entre otras. A continuación, se describen las principales técnicas para las SLNP, haciendo énfasis en las aplicadas por disponibilidad de equipos.

1.3.13.5.1 Caracterización Físicoquímica

Las propiedades fisicoquímicas de los nanotransportadores incluyen su tamaño de partícula, distribución del tamaño de partícula, carga superficial y morfología. Su determinación puede predecir, en gran medida, la estabilidad física de los nanotransportador y permite valorar la consistencia entre lotes; así mismo, en casos específicos, podrían ser un indicativo de la manera en que interactúan con macromoléculas o estructuras biológicas.

El tamaño de partícula y la polidispersión son, junto con la morfología, las características más importantes, y las primeras que generalmente se investigan. La dispersión en el tamaño de las partículas se expresa por el índice de polidispersidad (PDI). El tamaño y la forma de las partículas afectan su captación celular, vida media de circulación, biodistribución y eliminación [83].

La técnica más utilizada para conocer el tamaño de partícula y el PDI de la población de partículas es la dispersión de luz dinámica, (del inglés *Dynamic Light Scattering* o DLS), la cual determina el diámetro de las partículas mediante las propiedades de dispersión de la luz asociadas al movimiento browniano de las mismas; por ello, partículas grandes con movimiento demasiado lento no son adecuadas para esta técnica. Los resultados obtenidos deben ser confirmados por microscopía electrónica, pues tiene entre sus limitantes la de asumir partículas esféricas [83].

La carga superficial de los nanotransportadores influye en su estabilidad física, captación celular y biodistribución; se expresa como potencial zeta (ζ), e indica posibles interacciones electrostáticas entre ellos y por tanto su tendencia a la agregación, en detrimento de su la estabilidad física de la dispersión. Su medición implica la aplicación de una corriente eléctrica a través de la dispersión, registrando el movimiento de las

partículas mediante velocimetría láser Doppler; la dispersión de luz electroforética es el método más utilizado [84].

Por lo general, la dispersión de nanotransportadores debe diluirse antes de la medición del potencial zeta, para obtener lecturas reproducibles; sin embargo, se debe considerar que la carga superficial es muy sensible a la fuerza iónica y el pH del medio, por lo que la selección del medio de disolución debe ser cuidadosa. Así mismo, la aplicación de corriente eléctrica durante la medición puede afectar la muestra, por lo que es preferible descartarla.

La morfología de los nanotransportadores impacta en propiedades biológicas, como su vida media, eficacia y toxicidad. Formas no esféricas como discos, elipsoides, cilindros, cubos y otras más complejas, tienen profundos efectos en esos procesos biológicos.

La microscopía de fuerza atómica (del inglés, *Atomic Force Microscopy*, AFM) permite estudiar la forma de nanotransportadores y las características estructurales de su superficie, su rugosidad, con alta resolución. Permite examinar las propiedades nanomecánicas de cada partícula en condiciones más cercanas a las fisiológicas. Este método de caracterización escanea físicamente las partículas mediante la punta de una sonda de escala atómica, que puede o no estar en contacto con la superficie mostrando la topografía de los objetos a través de la medición de las fuerzas entre la punta y la muestra [85].

Entre las microscopías electrónicas destaca la de barrido (del inglés *Scanning Electron Microscopy*, SEM) que proporciona información sobre la topografía mediante visualización directa. Las muestras se secan sobre un soporte y se recubren con un metal con alta conductividad eléctrica, como el oro, mediante pulverización catódica. La superficie de la muestra se escanea con un haz de electrones enfocado y se registran los electrones secundarios emitidos desde su superficie.

La microscopía electrónica de transmisión (del inglés *Transmisión Electron Microscopy*, TEM), a diferencia de la anterior, no usa los electrones emitidos desde la superficie de la muestra, sino los transmitidos a través de ella. La TEM permite una mayor resolución por lo que generalmente se prefiere para estudiar la morfología de las SLNP. En el proceso TEM convencional, un haz incidente de electrones se transmite a través de una extremadamente fina lámina de muestra, transformándose en electrones no dispersos, electrones elásticamente dispersos o electrones inelásticamente dispersos. Un conjunto de lentes electromagnéticas enfoca y proyecta los electrones en una pantalla para generar una imagen [84].

1.3.13.5.2 Eficiencia de carga

Debido a las pequeñas dimensiones involucradas, la determinación de la composición exacta de las partículas y la ubicación del fármaco en su estructura es altamente desafiante. La espectroscopia de rayos X se puede utilizar para examinar la constitución química de la superficie de los nanotransportadores mediante un análisis elemental que puede ser un indicativo de encapsulación exitosa. La espectroscopia Raman puede proporcionar datos sobre las propiedades superficiales de las moléculas en función de sus respectivas transiciones vibratorias. Para estudiar las interacciones entre los componentes del nanotransportador, se requiere calorimetría diferencial de barrido (DSC). Además, las interacciones poliméricas se pueden investigar mediante espectroscopia infrarroja, mientras que el análisis de difracción de rayos X puede revelar la cristalinidad de los componentes en los nanoportadores [83][84].

La eficacia de encapsulación (EE) es una de las principales variables a caracterizar en los nanotransportadores; se utilizan los métodos directo e indirecto para la cuantificación. En el método *indirecto*, el EE se mide determinando la concentración del fármaco no atrapado en la capa sobrenadante después haber separado las nanopartículas por centrifugación, magnetismo, filtración, adsorción, o cualquier otro proceso. Por otro lado, en el *directo*, la concentración del fármaco atrapado se mide dentro de las nanopartículas mediante su solubilización en un solvente adecuado, seguido de la filtración y el análisis del fármaco mediante el método apropiado. Dependiendo de la estructura química y concentración del fármaco, se puede cuantificar mediante espectrofotometría UV, Fluorescencia y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [83].

1.3.13.5.3 Liberación *in vitro*

La liberación del fármaco nanoencapsulado es crucial para predecir la eficacia terapéutica y los efectos secundarios, es decir, el comportamiento *in vivo*; por su puesto, que un fármaco se libere al medio no asegura su efectividad, pero si no se libera o lo hace a una velocidad demasiado baja, muy probablemente no habrá efectos *in vivo*.

La información obtenida de las pruebas de liberación *in vitro* es fundamental en la optimización de la formulación, y constituyen un parámetro muy importante para evaluar la consistencia en los procesos de síntesis, midiendo la variación entre lotes. Para obtener un perfil de liberación de fármacos *in vitro* se incuban, los nanotransportadores a temperatura y pH fisiológicamente relevante; se retiran muestras en diferentes tiempos y se determina la concentración del fármaco liberado [84]. Este método requiere la separación efectiva de los nanotransportadores del medio mediante filtros de jeringa, centrifugación, ultracentrifugación o ultrafiltración. Después del muestreo, se debe reponer el volumen retirado con medio fresco a la misma temperatura.

Se puede adaptar la configuración del equipamiento usado, cambiando el tamaño del contenedor, la forma de agitación y los procedimientos de muestreo. Cuando el volumen de la muestra, la cantidad de la droga y la señal analítica lo permiten, se deberían usar equipos reportados en la bibliografía oficial, las Farmacopeas, como el aparato USP I (canasta), USP II (paleta) o USP IV (celda de flujo), éste último es especialmente adecuado para nanotransportadores [86]. La agitación de las partículas en el medio de liberación es crucial para evitar su agregación. Aunque en general se recomienda mantener condiciones *sink* (exceso de disolvente), se han reportado métodos no *sink* para fármacos pobremente solubles en agua [83].

OBJETIVOS

2. Objetivos

El propósito central de esta Tesis doctoral es avanzar en el desarrollo de un sistema de nanoencapsulación lipídica accesible para la liberación controlada de terapias locales destinadas al tratamiento de la leishmaniasis. Este enfoque implica el reposicionamiento de fármacos aprobados, buscando abordar la enfermedad de manera más eficiente.

Para la consecución del objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos concretos:

1. Seleccionar compuestos leishmanicidas a través del procesamiento de información proveniente de bases de datos y estudios de acoplamiento molecular.
2. Categorizar las sustancias con mayor actividad leishmanicida entre las seleccionadas mediante estudios *in vitro* con promastigotes, identificando el candidato más prometedor para la siguiente etapa de desarrollo.
3. Desarrollar una formulación simple y un proceso de síntesis reproducible para obtener nanopartículas sólidas lipídicas que encapsulen el fármaco seleccionado.
4. Evaluar la eficacia de las nanopartículas sólidas lipídicas a través de ensayos *in cellulo* e *in vivo*, para determinar su actividad leishmanicida, avanzando hacia la validación de su viabilidad clínica.

MATERIALES Y METODOS

3. Materiales y Métodos

3.1 Selección de sustancias leishmanicidas

La primera etapa de la investigación implicó escoger cuidadosamente las sustancias con las que se trabajarían los siguientes meses. Para optimizar recursos se elaboró una lista de sustancias que podían manejarse adecuadamente, pero, incrementando las posibilidades de ubicar una con alta actividad leishmanicida y baja citotoxicidad.

La primera opción, la más viable, era provechar las librerías de sustancias que organizaciones como MMV (*Medicines for Malarian Venture*) ofrecen de manera gratuita a los investigadores; se trata de colecciones de varios cientos de sustancias de las cuales se dispone algún dato de actividad frente a enfermedades infecciosas, así como su citotoxicidad. El cribado, la selección rigurosa, en este caso requería de complementar la información, cruzar referencias y procesar la base de datos disponible en la mencionada iniciativa.

La segunda opción era adquirir sustancias, por lo que se decidió partir sobre una base de conocimiento experimental directo: las fluoroquinolonas, estudiadas desde años antes en el laboratorio dirigido por una de nuestra colaboradora, la Dra. Ana Poveda del Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ), de la Universidad Central del Ecuador, quien venía trabajando experimentalmente con promastigotes aplicando estos inhibidores de las topoisomerasas. Se habían categorizado algunas de ellas mediante su actividad sobre promastigotes, por lo que se seleccionó este grupo de antibióticos para, aplicando acoplamiento molecular *in silico*, ubicar las de mayor afinidad a las enzimas y por tanto las de mayor posibilidad de presentar actividad leishmanicida.

3.1.1 Procesamiento de Bases de datos

La información disponible en las bases de datos de "*Pathogen box*" (<https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/about-pathogen-box>) de la iniciativa *Medicines for Malaria Venture* (MMV: <https://www.mmv.org/about-us/what-we-do/overview-our-work>), fue cuidadosamente revisada y complementada con la disponible

en artículos científicos y páginas web. Se elaboró una tabla con actividad contra *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, citotoxicidad en macrófagos y hepatocitos, así como parámetros fisicoquímicos que permitió clasificarlas en tres niveles, asignando a cada uno una puntuación que sirvió para priorizar las sustancias con mayor posibilidad de presentar actividad leishmanicida.

3.1.2 Acoplamiento molecular

Empleando el programa de libre acceso Auto Dock Vina (<http://vina.scripps.edu/index.html>) se realizó el acoplamiento molecular (*molecular docking*) de la proteína Topoisomerasa (TOP II) de *Leishmania*, con fluoroquinolonas, según lo descrito en detalle en [87], proyecto de investigación de grado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, diseñado y dirigido por el doctorando en su calidad de docente. Brevemente: se revisaron artículos científicos acerca de actividad de fluoroquinolonas, incluyendo aquellas que se estudiaron *in vitro* en el laboratorio de Replicación del DNA e Inestabilidad del Genoma del CIZ (Instituto de Investigación en Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador), y se seleccionaron 42 fluoroquinolonas representativas de las cuatro generaciones de estos antibióticos. Sus estructuras, obtenidas de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), se procesaron en ChemAxon (<https://chemaxon.com/>), herramienta Chemicalize (<https://chemicalize.com/welcome>), se calculó sus pKa, y las curvas de distribución dependientes del pH. Mediante los programas ACD/ChemSketch y MarvinSketch (<https://chemaxon.com/marvin>) se modificó las cargas de las moléculas para pH 7; se depuraron, optimizaron y corrigieron en la opción Check Structure y se guardaron en formato *mol* y *sdf*.

En base a investigaciones anteriores [88], se seleccionaron las proteínas humanas TOP II alfa (5GWK) y TOP II beta (5GWJ), su estructura se tomó de las bases de datos PDBj (<https://pdj.org/>) y RCSB (<https://www.rcsb.org/>) y se investigó los posibles aminoácidos de interés para su unión con ligandos, sus centros activos, y secuencias de interés biológico en la página Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Se seleccionó además la TOP II de *Leishmania amazonensis* estudiada y validada en estudios previos [89].

Se determinaron, usando DockingServer (<https://www.dockingserver.com/web>), los mejores sitios de unión en cada una de las proteínas ensayadas, se subieron las fluoroquinolonas junto con meglumina antimonioato, un fármaco leishmanicida, como

ligandos y se especificó el pH al que estaban protonadas. Se cargaron las proteínas a utilizar, especificando la cadena y los mejores sitios de unión ubicados previamente.

El acoplamiento se realizó en DockingServer, añadiendo cargas parciales de Gasteiger al ligando; se agregaron los átomos de hidrógeno no polares y enlaces rotativos. Los átomos de hidrógeno principales, las cargas de tipo de átomo unido de Kollman y los parámetros de solvatación se agregaron con la ayuda de herramientas AutoDock. Se generaron mapas de afinidad y un espaciado de 0,375 Å usando Autogrid. Se usaron funciones dieléctricas dependientes de la distancia y el conjunto de parámetros de AutoDock en el cálculo de los términos electrostáticos y de van der Waals. Las simulaciones de acoplamiento se realizaron utilizando el algoritmo genético lamarckiano (LGA) y el método de búsqueda local. La posición inicial, orientación y torsiones de las moléculas, al azar. Todas las torsiones giratorias se liberaron durante el acoplamiento. Cada experimento de acoplamiento se derivó de 2 corridas diferentes que se configuraron para terminar después de un máximo de 250.000 evaluaciones de energía. El tamaño de la población se estableció en 150. Durante la búsqueda, se aplicó un paso de traslación de 0.2 Å y pasos de cuaternión y torsión de 5.

3.2 Determinación de la actividad leishmanicida

Una vez concluida la etapa *in silico*, la siguiente consistió en escoger el mejor candidato mediante ensayos *in vitro* consecutivos; los métodos, de menor a mayor complejidad técnica y de uso de recursos fueron: conteo directo de promastigotes, que requiere de varias horas de trabajo pero bajo consumo de reactivos; pasando luego a un análisis cuantitativo para determinar el IC₅₀ de las sustancias, basado en la medición de fluorescencia generada por el ADN combinado con un fluoróforo; y, finalmente un método por citometría de flujo.

3.2.1 Actividad leishmanicida por conteo directo de promastigotes

Los promastigotes de *Leishmania infantum*, se cultivaron en medio Schneider (Schneider's Drosophila Medium. Dominique Dutscher. Ref. L0207-500) suplementado con Suero fetal bovino o SFB (FBS Standard. PAN Biotech. Ref. P30-3306) al 10% y Gentamicina (Gentamicin (50mg/ml). Gibco. Ref. 15750-045) al 0,05%. A partir de cultivos que hayan alcanzado una concentración de 10⁶ a 10⁷ parásitos por ml (p/ml), se

prepararon dispersiones de promastigotes de concentración 10^5 p/ml en el mismo medio de cultivo.

En tubos eppendorf de 2,0 ml, se dispensó 1 ml de la dispersión de parásitos, y se adicionó una solución de la sustancia de prueba en Dimetil sulfóxido o DMSO (CAS 67-68-5. Sigma-Aldrich. Ref. D1435). Se preparó un control del cultivo y uno con DMSO en la misma proporción que la añadida en el tubo con la sustancia. Se incubó a 25 – 27 °C durante, 2, 3 o 5 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se tomaron 10 μ l del sobrenadante de cada tubo, y se fijaron con 90 μ l de formaldehído al 4 % preparado a partir de Paraformaldehído, 16% p/v solución acuosa libre de metanol. (Thermo scientific. Ref. 043368.9M) y Buffer fosfato salino 1x o PBS (PBS pH 7.4 (10X). Gibco. Ref. 70011-036). Para contar los parásitos en hemocitómetro, cuando fue necesario; se realizaron diluciones con PBS 1x para obtener entre 20 a 200 parásitos en los 4 cuadrantes.

Alternativamente, los parásitos se pueden contar sin fijar, para observar el patrón de movimiento y seleccionar los más activos para infectar macrófagos, por ejemplo. En este caso, se debe centrifugar el cultivo entre 800 – 1000 RPM durante 3 minutos, para separar los parásitos muertos. Tomar 10 μ l del sobrenadante, diluir en 990 μ l de PBS o de medio Schneider y contar.

3.2.2 Estudio de Viabilidad Mediante el Método de Fluorescencia

A partir de cultivos de promastigotes de 5 a 7 días, se preparó una dispersión de 1×10^5 p/ml en el mismo medio de cultivo. En una placa oscura de 96 pocillos se colocaron 100 μ l del cultivo en las filas A, B, C, D, E, F. Se colocaron 100 μ l de medio Schneider en las filas G y H. En la columna 12 se colocaron 75 μ l de cultivo en las filas A, B, C, D, E, F. En G12 y H12 se colocó 75 μ l de medio de cultivo.

Se añadió en la columna 12, 25 μ l de una dispersión de las nanopartículas en el medio que corresponda. Con la pipeta multicanal se homogenizó 3 veces cada pocillo. Se tomó 100 μ l y transfirió a la columna 11, se homogeneizó 3 veces. Se continuó de la misma manera hasta la columna 2. Se incubó 72 horas a 25 °C y se colocaron 200 μ l de PBS en cada pocillo, se centrifugó a 4000 RPM durante 5 minutos, eliminándose inmediatamente 200 μ l del sobrenadante (de lo contrario los parásitos vuelven al sobrenadante).

Se añadieron 150 µl de un buffer de lisis hipotónico (Tris 20mM pH:7.5, EDTA 5mM, Tritón 0.008%, Sarcosine 0.008%) en presencia de un fluoróforo, Sybr-Gold 0.1x. Se homogeneizó 3 veces antes de medir la Fluorescencia (Excitación: 495, Emisión: 539) en lector multiplacas BioTek Synergy H1 Multimode Reader.

Para determinar la citotoxicidad en macrófagos se procedió de la misma manera, pero el cultivo de macrófagos se realizó en DMEM suplementado con SBF al 10% en incubadora a 37 °C con 5% de CO₂.

3.2.3 Estudio del Efecto Leishmanicida por Citometría de Flujo

A partir de un cultivo de 5 a 7 días de *Leishmania infantum* en medio Schneider suplementado con 10% de SFB, se preparó una dispersión de 7,5 x 10⁵ p/ml; se dispensó en tubos eppendorf.

Se preparó una dilución de delamanid (CAS 681492-22-8. Targetmol. Ref. T4202) a una concentración de 9,33 µM en etanol, se añadió a los tubos para obtener concentraciones que podían estar entre 3,12 y 50,00 nM. Se prepararon además tubos con un volumen de etanol correspondiente al de la más alta concentración de fármaco, se incluyó cultivo sin tratamiento como control.

A las 48 h de incubación, se centrifugaron los tubos a 3000 RPM durante 3 minutos. Se eliminaron 950 µl de sobrenadante y se remplazaron con 950 µl de PBS. Se centrifugó a 3000 RPM durante 3 minutos y eliminó 950 µl del sobrenadante.

Se añadieron 1000 µl de PFA al 1% en PBS y se incubó durante 15 minutos, los tubos se centrifugaron a 3000 RPM durante 3 minutos. Se eliminaron 950 µl y añadieron 250 µl de Yoduro de Propidio 1:500 en PBST (Triton al 0,1 % en PBS). Se dejó en refrigeración durante toda la noche. Se centrifugaron los tubos a 3.000 RPM durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 250 µl de PBS. Finalmente, los tubos se llevaron al citómetro de flujo, máximo dentro de la siguiente hora.

3.2.4 Identificación de cambios morfológicos en promastigotes por efecto del delamanid

Durante la cuantificación directa de promastigotes mediante microscopía se observaron cambios morfológicos en los parásitos tratados con delamanid, para evidenciarlos y explorar el posible mecanismo de acción del fármaco, se cultivaron promastigotes de *Leishmania infantum* en el medio y condiciones anteriormente descritos, y se trataron con delamanid a concentración 25 nM, y nocodazol (CAS 31430-18-9. Sigma Life Science. Ref. M1404) a concentración 5 μ M. Así mismo, se trataron parásitos con fármaco y con SLNP con y sin fármaco para evidenciar la similitud del efecto. Utilizando el microscopio Motic SE2000, con aumento 20x y 40x, se fotografiaron seis días después de una única administración y comparándose con un cultivo control sin tratar.

3.3 Desarrollo de la formulación de las nanopartículas sólido lipídicas (SLNP)

Una vez seleccionada la molécula, delamanid, se estudiaron sus características fisicoquímicas, especialmente solubilidad acuosa y coeficiente de partición (lipofilicidad), lo que decantó, de entre las varias posibilidades, a las SLNP como el sistema de entrega de fármacos a desarrollar.

De todos los métodos descritos para su elaboración, se seleccionó el de solvente - antisolvente por su potencial para ser adaptado a requerimientos mínimos de tecnología. Su principal, desventaja, la necesidad de un solvente orgánico, se pensó sobrellevar, desde el inicio del diseño, usando las mínimas cantidades de etanol, excipiente empleado en formas farmacéuticas parenterales, orales y tópicos.

La formulación se optimizó en etapas: la primera enfocada en el tamaño de partícula, la segunda en la reproducibilidad del tamaño, luego en la estabilidad del tamaño de partícula y finalmente en su carga superficial. Posteriormente, se evaluó la reproducibilidad del proceso en al menos tres síntesis independientes y consecutivas de las SLNP.

3.3.1 Síntesis de SLNP

La formulación desarrollada se describe a continuación:

Fase orgánica: en un tubo eppendorf de 1,5 ml se pesaron 3,8 mg de ácido esteárico (CAS 57-11-4. Thermo Scientific. Ref. A12244), se añadió 740 μ l de una solución 0,5 mg/ml de delamanid en etanol, y 260 μ l de una solución 2,4 mg/ml de la sal de amonio de N-palmitoil homocisteina PHC, (CAS 474942-73-9. Avanti Polar Lipids. Ref. 870320P), en etanol. Se sonicó en baño durante 60 segundos hasta disolución total del lípido.

Fase acuosa: en un tubo eppendorf de 15 ml se colocaron 160 μ l de bromuro de cetil trimetil amonio o CTAB (CAS 57-09-0, Thermo Scientific. Ref. A15235), al 1% en PBS; 40 μ l de Tween 80 (CAS 9005-65-6. Sigma Aldrich. Ref. P8074) al 10% en PBS y 4600 μ l de PBS 0,25x. Agitar en vórtex durante 30 segundos.

Se inyectaron 200 μ l de la fase orgánica en la solución acuosa, sonicando con sonda a 40% de amplitud (130 W / 20 KHz), 5 pulsos de 30 segundos. Se filtró por membrana de MCE (*mixed cellulose esters*) de 0,22 μ m. La dispersión se almacenó a 4 °C hasta su uso (figura 5).

Para la determinación química de la eficiencia de encapsulación, la liberación *in vitro* y otros ensayos, fue necesario incluir en la formulación un componente que incremente la densidad de las partículas lipídicas de tal manera que se puedan separar por centrifugación. Para ello se añadieron 10 μ l de la dispersión de nanopartículas magnéticas de 200 nm (BNF Dextran. Micromod. Ref. 84-00-102), en 1.000 μ l de agua destilada filtrada por 0,22 μ m, se agitó en un vórtex durante 15 segundos; se centrifugó a 13.000 RPM con enfriamiento a 4 °C durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y repitió el lavado. El pellet se resuspendió en 200 μ l de agua destilada filtrada, sonicando en baño durante unos pocos segundos. Se añadió 100 μ l de esta dispersión en la fase acuosa de la síntesis.

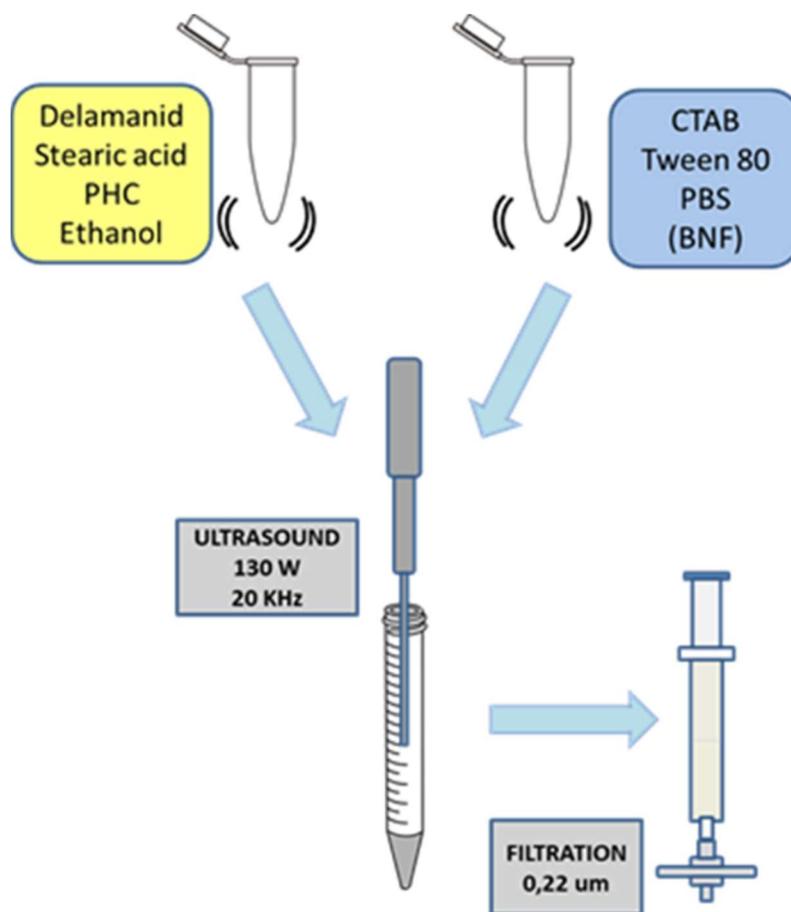


Figura 5. Esquema de elaboración de las SLNP por el método solvente antisolvente

3.3.2 Caracterización de las SLNP sintetizadas

3.3.2.1 Tamaño de partícula y potencial zeta (ζ potencial)

La Dispersión de luz dinámica (DLS) permite determinar el tamaño de partículas coloidales, mediante las fluctuaciones temporales de la de la intensidad de la luz dispersada por partículas en movimiento Browniano. La carga superficial de una partícula coloidal en suspensión se asimila al potencial zeta, el cual corresponde al potencial eléctrico en el espacio circundante constituido por moléculas de agua, moléculas adsorbidas y contraiones. En DLS su valor deriva de la velocidad de las nanopartículas y su tamaño. Su magnitud, independientemente de la carga, puede ser un indicativo de la estabilidad física: mientras menor es su valor, mayor será la tendencia a aglomerarse o precipitar.

El DLS mide el diámetro hidrodinámico de la partícula, es decir, el correspondiente a la partícula rodeada de moléculas de agua, contraiones y moléculas adsorbidas en su superficie; no el diámetro de la partícula sola, sino de toda la nube de moléculas, iones y átomos que rodean y acompañan en su movimiento.

Para la caracterización de los diferentes lotes de nanopartículas, se diluyeron 100 μl de la dispersión de SLNP en un tubo eppendorf con 900 μl de PBS 0,25x. Se agitó en vórtex durante 15 segundos antes de transferirlo a la cubeta de plástico de 1 cm y medirlo en DLS, Malvern Zetasizer Ultra. Se recuperó la dispersión anterior y se transfirió a la celda con electrodos para la medición del potencial zeta en el mismo equipo.

3.3.2.2 Preparación de muestras para TEM

Se colocaron 10 μl de la dispersión de SLNP en un tubo eppendorf con 990 μl de agua destilada filtrada por membrana 0,22 μm , se agitó en vórtex durante 15 segundos. Se colocaron 7 μl sobre la rejilla (Ref. CF400-CU. *Carbon film*, 400 Mesh Copper) para TEM, y se dejaron secar dentro de una placa Petri durante 24 horas a temperatura ambiente. Las imágenes se obtuvieron en JEOL JEM 1011.

3.3.2.3 Eficiencia de encapsulado

Se colocaron 650 μl de la dispersión de SLNP en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 13.000 RPM con enfriamiento a 4 °C durante 15 minutos. Se transfirieron alícuotas de 200 μl del sobrenadante a una placa transparente de 96 pocillos y se determinó su absorbancia a 340 nm, cuantificando con una curva de calibración preparada el mismo día, en el lector multiplacas Biotek, SYNERGY HTX.

3.3.2.4 Eficiencia de liberación in vitro

Se dispensaron 1667 μl de la dispersión de SLNP en 3 tubos eppendorf de 2 ml, y se centrifugaron a 13.000 RPM con enfriamiento a 4 °C durante 15 minutos; se eliminó el sobrenadante y se añadieron 1667 μl de PBS en cada tubo, resuspendiendo las SLNP

en baño ultrasónico durante 5 a 10 segundos. Se transfirió el contenido de los 3 tubos a un frasco con tapa hermética (volumen total de muestra: 5 ml). Se colocó en una placa de calentamiento dentro de la incubadora a temperatura suficiente para mantener el líquido a 37,5 °C en continua agitación magnética a 200 RPM.

A cada tiempo establecido se tomaron, usando una jeringuilla de 1 ml, 500 µl de la dispersión; se centrifugaron a 13.000 RPM con enfriamiento a 4 °C durante 15 minutos, se transfirió el sobrenadante a pocillos de una placa de 96 para medir la absorbancia. Sobre el pellet, se añadió 500 µl de PBS a 37,5 °C y se resuspendió en baño ultrasónico durante 5 a 10 segundos, regresándolos al frasco con tapa hermética para continuar con el estudio. Se cuantificó la cantidad de fármaco liberada en el sobrenadante a 340 nm frente a una curva de calibración preparada en PBS el mismo día del análisis.

3.4 Estudios de la eficacia *in vitro*, *in cellulo* e *in vivo* de las SLNP

La eficacia de las nanopartículas sintetizadas no puede predecirse mediante su caracterización fisicoquímica y debe ser confirmada mediante estudios en los que se evalúe su interacción con parásitos, células y organismos superiores.

En primera instancia se verificó la actividad del fármaco encapsulado en las nanopartículas, en un cultivo de promastigotes. Se verificó la captación de las SLNP por macrófagos infectados mediante microscopía electrónica de transmisión; y la liberación del contenido mediante una prueba de concepto con pigmentos fluorescentes. Escalando al siguiente nivel, se ensayó la liberación de un pigmento desde las SLNP aplicadas tópicamente en ratones. Las pruebas definitivas de eficacia fueron la actividad leishmanicida en amastigotes intracelulares y en animales infectados.

3.4.1 Actividad leishmanicida de las SLNP en promastigotes

A partir de cultivos de promastigotes de *Leishmania infantum*, en medio Schneider suplementado con SFB al 10%, que hayan alcanzado una concentración de 10^6 a 10^7 parásitos por ml (p/ml), se prepararon dispersiones de concentración 10^5 p/ml en el mismo medio de cultivo.

Se colocó 1 ml de la dispersión de parásitos en tubos eppendorf de 2,0 ml y se adicionó la dispersión de nanopartículas en volumen adecuado para alcanzar la concentración deseada del fármaco. Se preparó un control del cultivo sin tratamiento y otro control con nanopartículas sin fármaco, en el mismo volumen que el añadido en el tubo de prueba. Se incubó a 25 – 27 °C durante, 2 días. Todos los ensayos se realizan por triplicado. Se tomaron 10 µl del sobrenadante de cada tubo, y fijaron con 90 µl de formaldehído al 4% en PBS para contar los parásitos en hemocitómetro haciéndose diluciones con PBS para obtener entre 20 a 200 parásitos en los 4 cuadrantes en caso necesario.

Alternativamente, los parásitos se pueden contar sin fijar, para observar paralelamente el patrón de movimiento o los cambios morfológicos. En este caso se tomaban 10 µl del sobrenadante diluidos en 990 µl de PBS o de medio Schneider para recuento.

3.4.2 Localización subcelular de las SLNP mediante TEM

En una placa de seis pocillos se colocaron 200.000 células DH82 por pocillo, con medio RPMI (RPMI Medium 1640 (1X) + Glutamax-I. Gibco. Ref. 61870-010) suplementado con SBF al 10% y Gentamicina al 0,05%, y se incubaron a 37 °C / 5 % CO₂ durante 24 horas para asegurar su adhesión.

Tras reemplazar el medio, se añadieron 2 x 10⁶ promastigotes de *Leishmania infantum* (de un cultivo de 5 a 7 días) y se incubaron durante 4 horas. Se eliminaron los parásitos no internalizados, se lavó con PBS a 37 °C y se incubaron a 37 °C / 5 % CO₂ durante 12 horas para asegurar la formación de amastigotes. Se administró SLNP con delamanid, en concentración correspondiente al IC50 y se incubó a 37 °C / 5 % CO₂ durante 48 horas.

A continuación, se lavaron las células con PBS y se levantaron mediante micropipeta. Se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugaron a 1200 RPM durante 3 minutos, se lavaron con PBS, se centrifugó en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y se fijó con glutaraldehído al 3% en buffer fosfato 0,12 M, durante 20 minutos. Se centrifugó a 12.000 RPM a 4 °C durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

En lo posterior, entre lavados se centrifugó 5 minutos a 7000 RPM. Para la inclusión, se lavó el pellet con PBS durante 15 minutos por tres ocasiones; se añadió

tetraóxido de osmio al 2 % en buffer fosfato 0,12 M con CaCl₂ al 0,5%, y se dejó en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavó durante 15 minutos con NaCl 2,4% por dos ocasiones.

Se lavó con acetona al 30% durante 10 minutos, por dos ocasiones, luego con acetona al 50%, y dejar 12 horas con uranilo en acetona al 70% (filtrado por 0,45 µm) y con acetona al 80% durante 10 minutos por 2 ocasiones; finalmente con acetona al 95% y acetona al 100%. La muestra se embebió en resina Araldite (Durcupan ACM, Sigma-Aldrich), como se describe a continuación.

Se añadió acetona:Mezcla B (75:25) y se dejó 1 hora. Luego acetona:Mezcla B (50:50), acetona:Mezcla B (25:75) y se dejó en Mezcla B durante 12 horas. Se colocó Mezcla B nueva durante 3 horas, se colocó el código y dejó en estufa a 65°C durante 48 horas.

La mezcla A es Epoxiresina (Resina epóxica. Durcupan. Ref. 44611), Endurecedor (Hardener 964. Durcupan. Ref. 44612) y Plastificante (Component D. Durcupan. Ref. 44614), 10:10:0,1 (v/v). La mezcla B contiene 100 ml de Epoxiresina y 1,6 ml de acelerador (Accelerator 960. Durcupan. Ref. 44613)

3.4.3 Prueba de concepto de liberación *in cellulo*

Se prepararon SLNP con delamanid y Dil (41085-99-8. Invitrogen. Ref. D282), un pigmento fluorescente (excitación: 549 nm, emisión: 565 nm), para dar seguimiento a la liberación del contenido de las nanopartículas mediante el microscopio confocal Nikon A1R.

Se colocaron macrófagos J774 (macrófagos murinos, derivados de células mononucleares de médula ósea) en placas de 6 pocillos con cubreobjetos redondos conteniendo medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium-high glucosa. Sigma Life Science. Ref. D6429) suplementado con 10% de SFB, se incubaron a 37 °C / 5 % CO₂ durante 24 horas para asegurar su adhesión a la placa de cultivo. A continuación, se trataron con las nanopartículas durante 24 horas.

Se eliminó el medio, se lavó con PBS y los cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos. Se mantuvieron sumergidos en PBS y refrigerados hasta la tinción. Los cubreobjetos se enjuagaron con PBS, se tiñeron con DAPI (CAS 28718-90-3. Sigma Life Science. Ref. D9542) 1:4000 durante 3 minutos,

se montaron sobre portaobjetos (Immu-Mount. EpreDia. Ref. 9990402) y se observaron en el microscopio confocal Nikon A1R.

3.4.4 Prueba de concepto de liberación transdermal

Similar al caso anterior, se prepararon SLNP con delamanid y DiR (CAS 100068-60-8. Invitrogen. Ref. D12731), un pigmento que fluoresce en el infrarrojo cercano (excitación: 750 nm, emisión: 780 nm), para dar seguimiento a la liberación del contenido de las nanopartículas mediante microscopía confocal.

Se seleccionaron al azar seis ratones adultos (BALB/C; Janvier-Labs, Laval, France), mantenidos en condiciones libres de patógenos, tres machos y tres hembras, y se los dividió en tres grupos experimentales para tiempos cero, 2 y 24 horas. Con el ratón ligeramente sedado, se eliminó el pelo del lomo, de un área de 1 x 2 cm aproximadamente, inmediatamente junto a la cabeza, con una rasuradora eléctrica.

Se aplicaron 20 μ l de la dispersión de nanopartículas tópicamente y se dejó secar durante 5 minutos. Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales. Una vez cumplidos los tiempos estipulados, se procedió a la eutanasia y se disecó y seccionó la piel de la zona de aplicación y de una zona adyacente sin contacto con nanopartículas.

El tejido se colocó en casetes de biopsia y se sumergió en PFA al 4% durante al menos 1 hora. Para la deshidratación, los cortes se lavaron por dos ocasiones con PBS antes de proceder a la deshidratación. Para ello, se sumergieron en etanol al 50% durante 1 hora, luego en etanol al 70% por el mismo tiempo, e igualmente por etanol al 96%. Se pasaron los cortes a etanol al 100% durante 30 minutos, se repitió este paso. Finalmente se sumergió en xilol durante 10 minutos, repitiéndose este paso un total de tres ocasiones. Para la inclusión, se sumergió en una mezcla xilol – parafina (50:50) en estufa a 60 °C durante 30 minutos, luego en parafina durante dos horas, se cambió de parafina y se sumergió 1 hora más y se repitió este paso.

Para el montaje en parafina se orientó el corte de piel en un molde para histología, y se cubrió con parafina nueva fundida, se rotuló y refrigeró. Los cortes de aproximadamente 70 μ m se realizaron en un micrótopo LKB, colocando los fragmentos en la superficie de agua a 52 °C para separarlos y se los colocó en un portaobjetos con superficie cargada positivamente (Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides. EpreDia. Ref. J1800AMNZ). Se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en refrigeración.

Para deparafinar, los portaobjetos se colocaron de manera perpendicular dentro de estufa a 60 °C durante 20 minutos para que escurra la parafina. Se sumergieron en xilol durante 20 minutos, se repitió este paso. Se pasó luego a etanol al 100% durante 10 minutos por dos ocasiones, etanol 96% durante 10 minutos por dos ocasiones, etanol 70% durante 10 minutos, etanol 50% durante 10 minutos, PBS durante 10 minutos. Se tiñó con DAPI 1:4000 durante 3 minutos, se lavó con PBS, y finalmente con agua destilada, se colocó medio de montaje (Immu-Mount. EpreDia. Ref. 9990402) y cubreobjetos para su observación mediante microscopía confocal.

3.4.5 Actividad leishmanicida de las SLNP en amastigotes

Se colocó en cada pocillo de placas Lab-Tek, (8 well glass slide. Lab-Tek Chamber slide, system. Ref. 177402), 5×10^4 macrófagos DH82, y se llevó a un volumen de 300 μ l con medio RPMI completo. Se incubó a 37 °C / 5% CO₂ durante 1 hora. Se verificó al microscopio la adhesión de las células.

Se centrifugó un cultivo de *Leishmania infantum*, de entre 5 a 7 días, a 800 - 1000 RPM durante 3 minutos. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y centrifugó a 3000 RPM por 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en medio completo, se tomó 10 μ l del sobrenadante y colocó en un tubo con 990 μ l de PBS 1x para contar los parásitos vivos y móviles.

Se colocaron en cada pocillo de la placa LABTECK, con los macrófagos adheridos, $2,5 \times 10^5$ parásitos. La placa se incubó a 37 °C / 5% CO₂ durante 4 horas. Se eliminó el medio de cultivo con los parásitos no internalizados y se lavó por dos ocasiones con PBS. Se añadió 300 μ l de medio de cultivo (control), o de medio de cultivo con el fármaco o nanopartículas según corresponda e incubó a 37 °C / 5% CO₂ durante 48 horas. A continuación, se eliminó el medio de cultivo, lavó con PBS, se añadió 250 μ l metanol y se fijó durante 5 minutos. Finalmente se dejó secar al ambiente (invertido sobre papel secante).

Para la tinción se añadió 250 μ l de Giemsa (Giemsa Stain. Sigma – Aldrich. Ref. 48900) diluido 1/20 en agua de grifo y filtrado 0,2 μ m. Se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se lavó con agua destilada por inmersión en vaso de precipitados (2 a 5 veces). Se dejó secar al ambiente (invertido sobre papel secante). Se retiraron los pocillos, eliminando la silicona, se colocó medio de montaje y un cubreobjetos. Se contaron 400 células por duplicado en un microscopio Olympus BX41. El porcentaje de

células infectadas y la media del número de amastigotes por célula infectada fueron evaluados. El índice de infección se calculó por multiplicación de los dos parámetros.

3.4.6 Actividad leishmanicida de las SLNP *in vivo*

En la figura 6, se esquematiza el estudio realizado. Primero se prepararon SLNP con y sin delamanid (abreviado en adelante como Dm), sin nanopartículas de hierro. Se agruparon 15 ratones hembra (BALB/c; Janvier-Labs, Laval, France) de 8 semanas de edad en cuatro grupos experimentales: control (n=4), nanopartículas sin fármaco (SLNP, n=3), nanopartículas con delamanid (SLNP Dm. n=4), y delamanid en solución (Dm, n=4). Todos los ratones fueron inoculados, por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata derecha, con 1×10^4 promastigotes metacíclicos de *Leishmania major*. A partir de la segunda semana postinfección se iniciaron los siguientes tratamientos durante tres semanas (2 veces/semana) inoculando 10 μ l peri-lesionalmente:

Grupo Dm (solución de delamanid a una concentración 18,7 μ M en PBS estéril); grupo SLNP Dm (dispersión de SLNP con delamanid correspondiente a una concentración de 18,7 μ M); grupo SLNP (dispersión de SLNP sin fármaco).

A partir de la cuarta semana postinfección se determinó la *progresión de las lesiones* restando del ancho, en mm, de la almohadilla plantar derecha (infectada), el ancho de la almohadilla plantar izquierda, control, de cada individuo. Durante la sexta semana se registró fotográficamente el avance de la lesión.

Al llegar a la séptima semana postinfección, para determinar la *carga parasitaria*, se practicó eutanasia a todos los ratones, para extraer su bazo y ganglio linfático poplíteo drenante del punto de infección. Los órganos se sometieron a un ensayo de dilución límite a partir de una dilución inicial del macerado de órgano en 4 ml de medio Schneider con SFB al 10%, sembrando replicas por cuadruplicado de 50 μ l sobre 200 μ l de medio en placas de 96 pocillos y cultivándolos a 26 °C durante 7 días. Se estimaron los valores de carga parasitaria usando microscopio Olympus BX41, para localizar los pocillos con promastigotes y que representan la máxima dilución alcanzada.

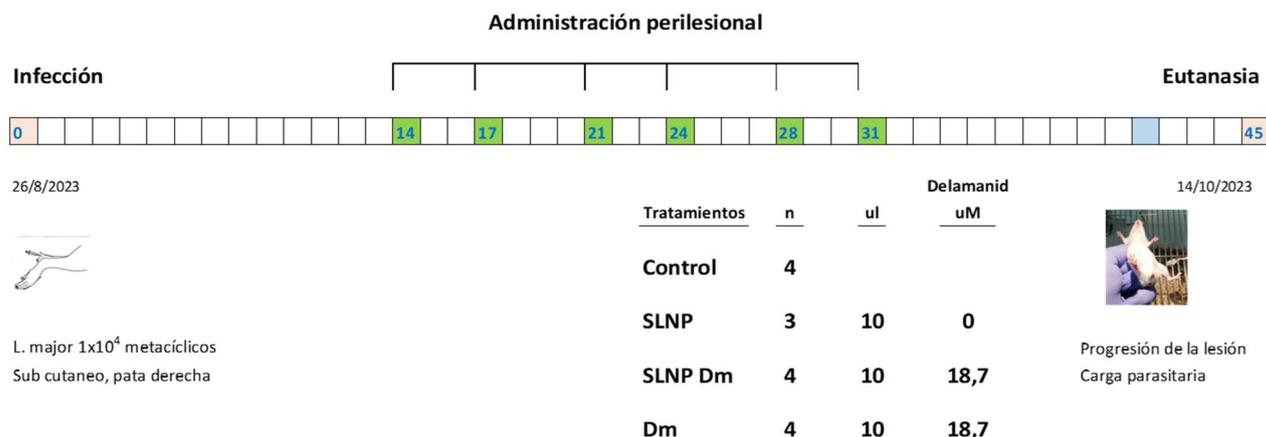


Figura 6. Esquema del ensayo in vivo para determinar la actividad leishmanicida de las SLNP en modelo murino.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la Comunidad de Madrid, España, (referencia: PROEX 211/18) siguiendo la legislación española y de la Unión Europea (Ley 32/2007, R.D. 53/2013 y Directiva del Consejo 2010/63/UE).

3.4.7 Tratamiento estadístico de resultados

Para comparar entre dos grupos, en los que por el número de muestras no fue posible hacer supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de la distribución, se aplicó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Cuando la comparación debía hacerse entre 3 o más grupos con las mismas características, la prueba no paramétrica fue la de Kruskal-Wallis y para el análisis de comparaciones múltiples se aplicó la prueba de Dunn. Cuando fue posible se aplicó un análisis paramétrico ANOVA de una vía y el análisis de comparaciones múltiples por el método de Tukey. Se utilizó el software *GraphPad Prism*.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Selección de sustancias leishmanicidas

4.1.1 Procesamiento de Bases de datos

A partir de base de datos "Pathogen box" del proyecto *Medicines for Malaria Venture (MMV)* se elaboró una tabla de las sustancias con actividad frente a tripanosomatídeos y su citotoxicidad. Los datos no disponibles se complementaron cuando fue posible con la de artículos científicos. Para acotar la selección se incluyeron parámetros fisicoquímicos característicos de moléculas con actividad biológica (*Drugability*) y con información sobre el mecanismo de acción reportado. Las sustancias se clasificaron en tres grupos: alta, media, baja actividad.

Mediante el estudio de la información de las tablas antes mencionadas se seleccionaron las seis sustancias con mayor potencial de presentar alta actividad leishmanicida, con baja citotoxicidad, y con características fisicoquímicas apropiadas para ser encapsuladas en sistemas de entrega de fármacos. La figura 7 muestra la estructura química de las sustancias.

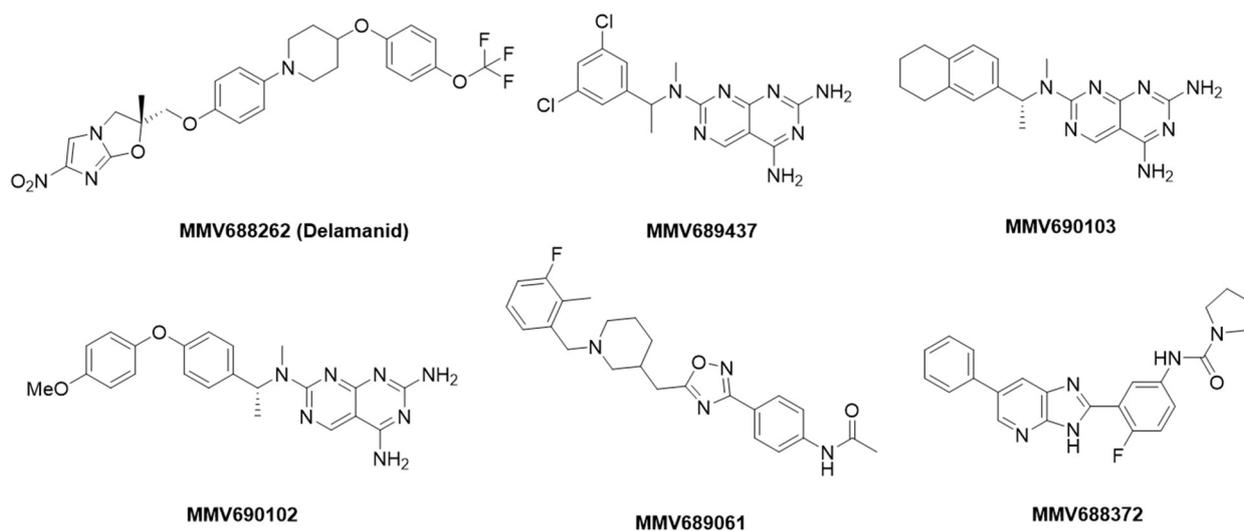


Figura 7. Estructura de las seis sustancias seleccionadas por su alta actividad frente a tripanosomatídeos y baja citotoxicidad.

4.1.2 Acoplamiento molecular

Mediante la aplicación de estudios bioinformáticos en el software *Autodock Vina* se identificaron varias Fluoroquinolonas con alta afinidad por TOP II de *Leishmania* y baja afinidad por TOP II α y TOP II β humanas. De entre las 42 fluoroquinolonas, representativas de todas las generaciones, se seleccionan las tres representadas en la figura 8.

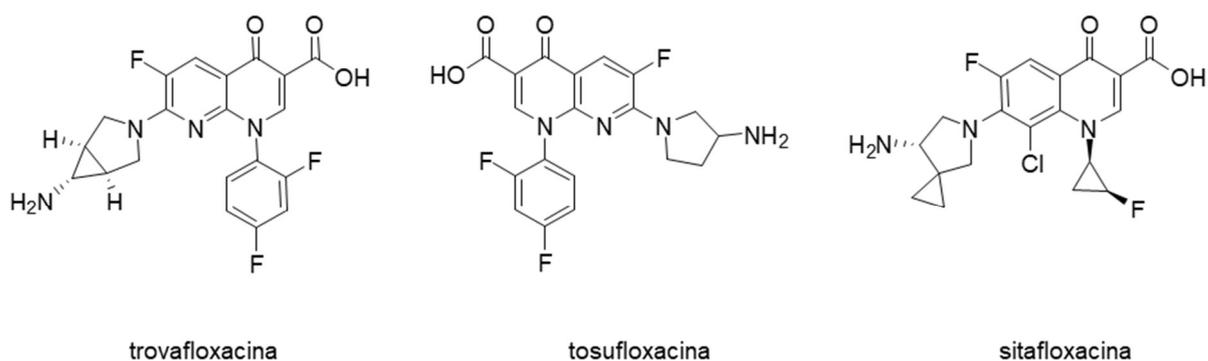


Figura 8. Estructura química de las sustancias con mayor afinidad frente a enzimas de interés.

A las tres fluoroquinolonas, se añadió la enrofloxacin por haberla usado experimentalmente en estudios *in vitro* en investigaciones previas, y, la prulifloxacin por lo disímil de su estructura (véase figura 9): anillo de cuatro miembros incluyendo N1 y un átomo de azufre, [90], descritos como potenciadores de la actividad [91,92].

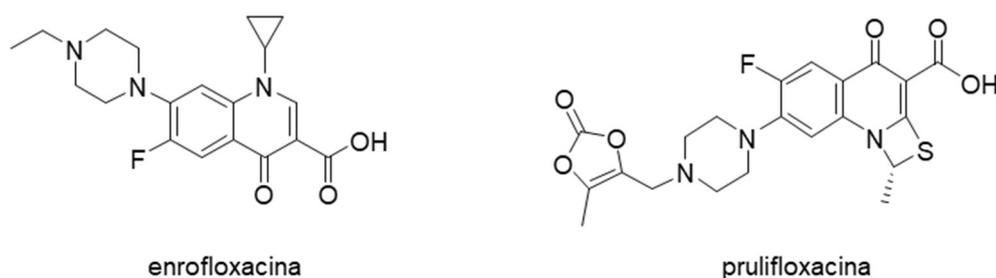


Figura 9. Estructura química de las dos fluoroquinolonas adicionales incluidas.

4.2 Determinación de la actividad leishmanicida

4.2.1 Actividad leishmanicida por conteo directo de promastigotes

Para esta primera etapa experimental se utilizó la ciprofloxacina como referencia, dado que el valor de su Concentración Inhibitoria 50, IC50, se había determinado experimentalmente aplicando metodologías basadas en fluorescencia, en proyectos de investigación anteriores [93]. Se llevaron a cabo una serie de pruebas de actividad leishmanicida en etapas sucesivas, comparando la cantidad de parásitos vivos en los cultivos tratados con ciprofloxacina con la presente en los cultivos tratado con las sustancias a testar.

Los compuestos que presentaron mayor actividad leishmanicida que la sustancia de referencia (ciprofloxacina), se ensayaron a concentraciones cada vez menores hasta que se pudo estimar la concentración que causaba una reducción del cincuenta por ciento en la población de parásitos (IC50). De los compuestos investigados, el delamanid (MMV688262) mostró una actividad notable contra los promastigotes; así mismo, la prulifloxacina fue la sustancia con mayor actividad entre las fluoroquinolonas. La figura 10 muestra el ordenamiento de las sustancias en función de su actividad leishmanicida; la escala de IC50 está invertida por lo que, a la izquierda, arriba aparece la sustancia con mayor actividad.

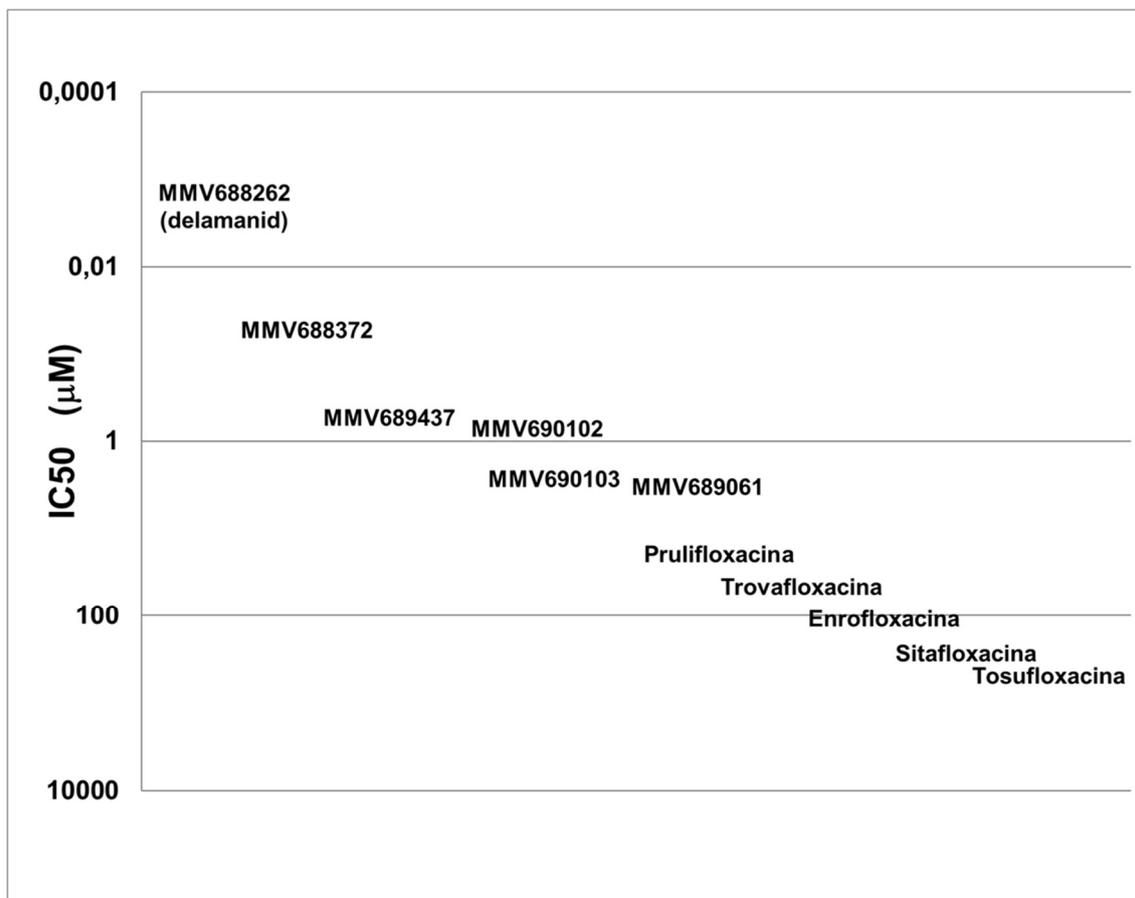


Figura 10. Actividad leishmanicida relativa de las sustancias seleccionadas, determinada por conteo de parásitos.

4.2.2 Estudio de Viabilidad Mediante el Método de Fluorescencia

A las dos sustancias con mayor actividad, determinadas en la etapa anterior, se aplicó el método de fluorescencia, descrito previamente, para cuantificar su IC 50 en promastigotes, tabla 4. Se tomó como referencia la enrofloxacin porque se había confirmado su actividad sobre promastigotes, en solución [94] y encapsulada en nanosistemas [95].

Fármaco	IC 50 (uM)
delamanid	0,03
prulifloxacin	180,23
enrofloxacin	451,30

Tabla 4. IC 50 de delamanid y prulifloxacin determinada por el método de fluorescencia.

El delamanid es un nitroimidazol bicíclico, aprobado para uso oral contra *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente. Tiene un espectro de acción muy estrecho y no tiene actividad sobre la microflora intestinal aeróbica o anaeróbica. Es un profármaco que en *Mycobacterium* se activa mediante una nitroreductasa dependiente de deazaflavina F420. Se escinde generando especies reactivas de nitrógeno, por lo que su efecto es doble, por un lado, la interrupción de la biosíntesis de los ácidos metoxi y ceto micólico, componentes de la pared celular, y por otro, la interrupción de la actividad respiratoria [96].

En un estudio realizado con promastigotes de *Leishmania donovani* de cepas clínicamente aisladas, se demostró que las nitroreductasas no juegan un papel en la activación del delamanid en ninguna de las etapas del ciclo vital, por lo que el mecanismo de acción de este fármaco sería diferente al del fexinidazol; sin embargo, delamanid es rápidamente metabolizado por el parásito [97]. Es importante recalcar que el fexinidazol es un nitroimidazol, al igual que delamanid, y es utilizado en el tratamiento de la tripanosomiasis africana.

La prulifloxacina, por otro lado, es una molécula lipofílica perteneciente a las fluoroquinolonas; es un profármaco de un derivado carboxílico de tiaceto quinolina, la ulifloxacina [98,99], y tiene un amplio espectro antimicrobiano frente a bacterias gram positivas y gram negativas. Se absorbe rápidamente por vía oral, alcanza su Cmax en 1 hora, y se metaboliza rápidamente en ulifloxacino. Tiene actividad intracelular y una vida media de 10 a 12 horas, lo que permite una administración una vez al día [100–103]. Es bien tolerado, con un efecto y un perfil de seguridad similares a otros fármacos de referencia de la clase de las quinolonas. Los eventos adversos son de gravedad leve a moderada, siendo los más comunes dolor gástrico, diarrea, náuseas y erupción cutánea [99]. Su principal mecanismo de acción es el bloqueo de la ADN girasa y la TOP IV bacterianas, esenciales para la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN [104,105].

En los tripanosomátidos, las TOP comparten muchas características con sus contrapartes humanas, pero exhiben diferentes requisitos de actividad enzimática, sitios catalíticos variables y diferentes sensibilidades a los bloqueadores enzimáticos [106]. Los estudios estructurales y mecanicistas sobre la TOP II de kinetoplastos mostraron diferencias suficientes entre la enzima del parásito y sus contrapartes eucariotas [107] como para convertirlas en objetivos atractivos para la terapia [108].

Se ha informado actividad micromolar para algunas fluoroquinolonas contra *Trypanosoma brucei* [109], así como para *Leishmania panamensis* [110]. Otros investigadores probaron la enrofloxacin sola y en combinación, contra *Leishmania infantum*, mediante estudio *in vitro* e *in vivo* en perros, demostrando no tener actividad en el primer caso, pero sí una mejoría en la evolución de la lesión cutánea cuando se combina con metronidazol [111].

4.2.3 Estudio del Efecto Leishmanicida Mediante Citometría de Flujo

Se utilizó citometría de flujo para confirmar el IC50 de delamanid, estudiar su variación entre especies de *Leishmania* y determinar la citotoxicidad en las células eucarióticas utilizadas los ensayos *in cellulo*. (Tabla 5).

Especie / Línea celular	IC 50 (nM)
<i>Leishmania infantum</i>	17,21 ± 0,95
<i>Leishmania major</i>	21,95 ± 2,82
<i>Leishmania mexicana</i>	13,51 ± 0,93
DH82 (macrófagos caninos)	> 1,6 x 10 ⁵
J774 (macrófagos murinos)	> 1,6 x 10 ⁵

Tabla 5. IC 50 del delamanid para promastigotes de tres especies de *Leishmania* y citotoxicidad en dos líneas de macrófagos (n=3, $\bar{X} \pm DS$).

La concentración inhibitoria 50 para las tres especies de *Leishmania* se sitúa en el rango nanomolar, lo que destaca la notable eficacia del compuesto contra estos patógenos. También es crucial resaltar que, al examinar la citotoxicidad en las células eucariotas estudiadas, observamos que esta es al menos cuatro órdenes de magnitud mayor. Este contraste enfatiza la selectividad del compuesto hacia *Leishmania*, ya que se requieren concentraciones significativamente más altas para afectar negativamente las células del hospedador.

Los valores de IC50 obtenidos son congruentes con los reportados para *Leishmania donovani*: 18,5 nM, en el estudio realizado con promastigotes de cepas clínicamente aisladas [97]. La marcada diferencia de tres órdenes de magnitud en los

valores de la IC50 entre delamanid y prulifloxacina, junto con el margen de seguridad más amplio observado para el primero, motivó la decisión de centrar el estudio exclusivamente en este fármaco.

4.2.4 Identificación de cambios morfológicos en promastigotes por efecto del delamanid.

La observación de la morfología de los parásitos tratados con fármacos puede mostrar los daños por la inhibición de la diana del fármaco; por supuesto esta información debe ser complementada con otros ensayos para identificar los objetivos moleculares de los fármacos [35].

Se utilizó microscopía de contraste de fases para evaluar el impacto del delamanid en el parásito, específicamente en posibles alteraciones morfológicas y signos de muerte celular. Este enfoque permitió analizar su influencia en el crecimiento y la estructura del parásito (figura 11).

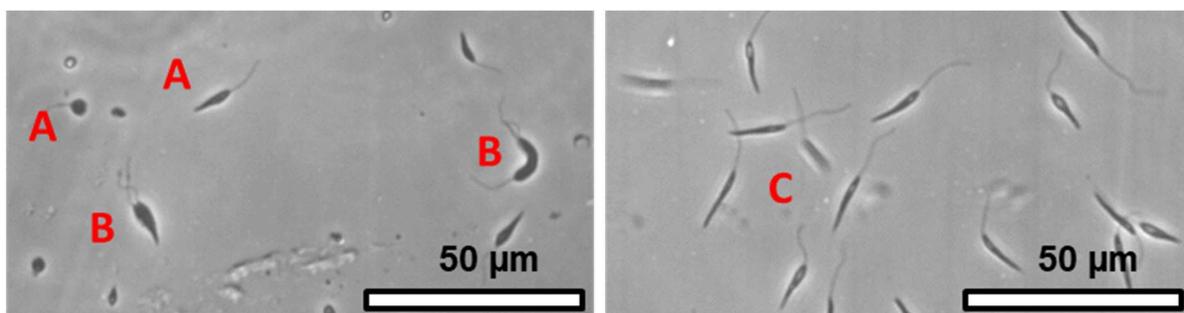


Figura 11. Cambios morfológicos (A) y detención en la citocinesis (B) de promastigotes expuestos a delamanid. (C) parásitos sin tratamiento

Además de una disminución notable en la población de promastigotes de *Leishmania infantum*, tras el tratamiento con delamanid, se observaron cambios morfológicos importantes, que incluyen aumento de tamaño, forma redondeada de los parásitos y anomalías notables en la citocinesis, todo evidente desde el día dos de una sola administración de delamanid, incluso a concentraciones inferiores que su IC50.

Como se describió anteriormente, el mecanismo de acción más aceptado en la actualidad para el delamanid en *Mycobacterium tuberculosis* es la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos. La presencia de estos ácidos (figura 12) se ha descrito en la envoltura celular de varios géneros y especies de microorganismos, pero, hasta la fecha no se han detectado en *Leishmania* [112].

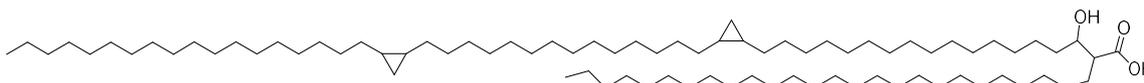


Figura 12. Ácido alfa micólico

Se ha detectado eso sí, en las fosfatidiletanolaminas de los tripanosomatídeos incluida *Leishmania*, el ácido *cis*-9,10-metilenoctadecanoico (figura 13), un ciclo propano ácido graso, cuya estructura guarda relación con la de los ácidos micólicos [113].



Figura 13. Ácido *cis*-9,10-metilenoctadecanoico

Es importante señalar que un mayor contenido de C19 Δ se ha asociado con la resistencia a fármacos leishmanicidas como la anfotericina B y la miltefosina [114], por lo que la combinación de delamanid con esos leishmanicidas tradicionales abre nuevas posibilidades para el tratamiento de cepas resistentes. Y, aunque la función de los ciclopropano ácidos grasos y de la ciclopropano ácido graso sintasa aún no se comprende completamente, su ubicación en el retículo endoplásmico y la membrana celular [115], así como su papel en el mantenimiento de la estructura del parásito y su resistencia al ambiente ácido al que está expuesto dentro del macrófago, justifica su importancia como posible diana terapéutica [116].

De hecho, la presencia de ciclo propano ácidos grasos, y su relación con la resistencia a ambientes ácidos, ha sido también reportada en *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* [117,118]. Estos ácidos grasos parecen aumentar la fluidez en la membrana plasmática de los microorganismos al tiempo que inducen un estado más ordenado. Este efecto podría explicar cómo estos ácidos grasos mejoran la estabilidad de la membrana frente a altas presiones osmóticas y temperaturas, reduciendo a la vez su permeabilidad a las toxinas [119].

Basados en lo expuesto, proponemos como hipótesis para futuras investigaciones, que la inhibición de la biosíntesis de ciclo propano ácidos grasos podría ser la explicación detrás de la actividad leishmanicida del delamanid, sugiriendo así su posible participación en el mecanismo de acción del fármaco.

Para fortalecer la base de nuestra proposición, es relevante destacar que los mutantes nulos de la sintasa de ciclopropano ácidos grasos de *Leishmania mexicana* presentan una morfología celular modificada, mayor susceptibilidad a condiciones de pH ácido y un patrón de crecimiento alterado en medios carentes de suero [120]. Estos hallazgos ofrecen evidencia adicional que respalda la posible conexión entre la inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos y la actividad antimicrobiana del delamanid.

Como una segunda posibilidad para explicar el mecanismo de acción del delamanid en *Leishmania*, proponemos como hipótesis la participación de las aurorquinasas como dianas moleculares. La inhibición de LdAIRK con hesperadina, en *Leishmania donovani*, tuvo efecto en la integridad del citoesqueleto y la citocinesis [121]. Se observaron cambios similares en la morfología celular cuando se usaron barasertib y GSK-1070916, otros inhibidores de estas enzimas, aun en concentraciones nanomolares [122], por lo que, los cambios morfológicos observados en promastigotes tratados con delamanid, podrían también ser explicados por la inhibición de las aurorquinasas.

Identificamos una tercera posibilidad al explorar si el fenotipo observado en el proceso de la citocinesis tiene origen microtubular. Se trató un cultivo de promastigotes con nocodazol 5 μM durante 3 días, observándose, figura 14, cambios morfológicos similares a los causados por el delamanid.



Figura 14. Cambios morfológicos observados en promastigotes tratados con nocodazol 5 μ M durante 72 horas.

El nocodazol es un benzimidazol usado como antineoplásico por la inhibición de la polimerización de los microtúbulos generada por su afinidad con la subunidad beta de la tubulina [123]. Los microtúbulos son constituyentes del citoesqueleto el cual, entre otras funciones, mantiene la morfología celular y participa en su proceso de división [124,125]. Existen similitudes estructurales entre nocodazol y delamanid, la tercera hipótesis que postulamos es que el mecanismo de acción del delamanid podría implicar la inhibición de las tubulinas.

En definitiva, (i) las sintasas de los ciclopropano ácidos grasos, (ii) las aurora kinasas, y (iii) las tubulinas deben ser investigadas como dianas moleculares del delamanid. Al develar el mecanismo de acción de este fármaco en *Leishmania* se podría, en primer lugar, identificar otras sustancias con potencial actividad leishmanicida y, luego, extrapolar este conocimiento a otras enfermedades tropicales olvidadas, empezando, pero no limitándose, a las causadas por tripanosomátidos: tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) y enfermedad de Chagas. Los primeros pasos en la investigación deberían ser estudios *in silico*, de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR) y de Acoplamiento molecular, incluyendo inhibidores conocidos de las enzimas antes mencionadas, y al delamanid, como referencia.

4.3 Desarrollo de nanopartículas sólido-lipídicas (SLNP)

El delamanid es un compuesto lipofílico que exhibe una alta afinidad por una matriz rica en lípidos, como la compuesta por los ácidos grasos de una nanopartícula, de ahí la elección de este sistema de nanoencapsulación. Adicionalmente, los tripanosomátidos necesitan cantidades sustanciales de lípidos para la construcción de sus membranas y el anclaje de proteínas glicosiladas en su superficie [126]; así, las SLNP diseñadas serían una fuente de lípidos para el parásito, pero llevando en su interior un fármaco que, paradójicamente, le impide utilizarlos para construir con ellos su barrera protectora.

Las SLNP tienen además otras ventajas: son muy biocompatibles, biodegradables, permiten controlar el patrón de liberación del fármaco, presentan relativa factibilidad de escalamiento de procesos y son muy versátiles en términos de vías de administración ya que pueden administrarse por vía transdermal, parenteral, pulmonar, e incluso por vías ocular, oral y cerebral [127].

El principal uso previsto de las SLNP diseñadas es la administración por vía tópica, por lo que es importante destacar entre sus características el incremento de la penetración o permeación a través de la piel, el incremento de la solubilidad del fármaco y la posibilidad de generar un depósito cutáneo que actúe como reservorio para liberación extendida. Por otro lado, para el caso de la vía parenteral, que es otra opción de vía de administración de las SLNP diseñadas, es importante destacar el aumento de la concentración plasmática, la acumulación en las células hepáticas y el potencial para estimular el sistema inmunológico [128].

Los componentes básicos de las SLNP son su matriz lipídica y los tensioactivos que mantienen su estabilidad física; si es necesario, se puede incluir un modificador de carga superficial para mejorar la estabilidad. Como componentes secundarios podemos nombrar conservantes y crioprotectores, estos últimos imprescindibles cuando hay un paso de liofilización en el proceso [73,128,129].

En el presente diseño, se combinó: (i) un lípido aniónico, el componente principal, (ii) un lípido catiónico en relación 6:1; (iii) un tensioactivo no iónico y (iv) uno catiónico como modificador de carga, en relación 5:2. Además se incorporó un PBS diluido (1:4) en agua destilada filtrada por membrana 0,22 μm . Finalmente, el antisolvente seleccionado fue el etanol por su baja toxicidad.

Los métodos de fabricación usuales para producir nanopartículas pueden requerir la incorporación de energía térmica o mecánica mediante calentamiento, cizallamiento, ultrasonido, etc.; o, alternativamente, cambios en la solubilidad, tensión superficial, etc.; en muchos casos se utiliza una combinación de las estrategias

mencionadas [73,127–129]. En el presente desarrollo, los principios involucrados fueron la insolubilización solvente-antisolvente, modulada por ultrasonido y estabilizada mediante la disminución de la tensión interfacial.

El diseño cuidadoso del proceso permitió combinar estos principios en pocos y simples pasos, aplicables sin que sean necesarios equipos de alta tecnología, generando SLNP con características muy reproducibles entre una síntesis y otra.

4.3.1 Síntesis de SLNP

Los componentes de la formulación, figura 15, fueron seleccionados en función de su lipofilidad y solubilidad, por el principio de similar polaridad con el fármaco delamanid; así mismo, los lípidos se complementan en cuanto a su carga iónica. Los surfactantes por su parte se seleccionaron para estabilizar las nanopartículas en dispersión, considerando su carga y su balance hidrofílico – lipofílico, (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*, HLB).

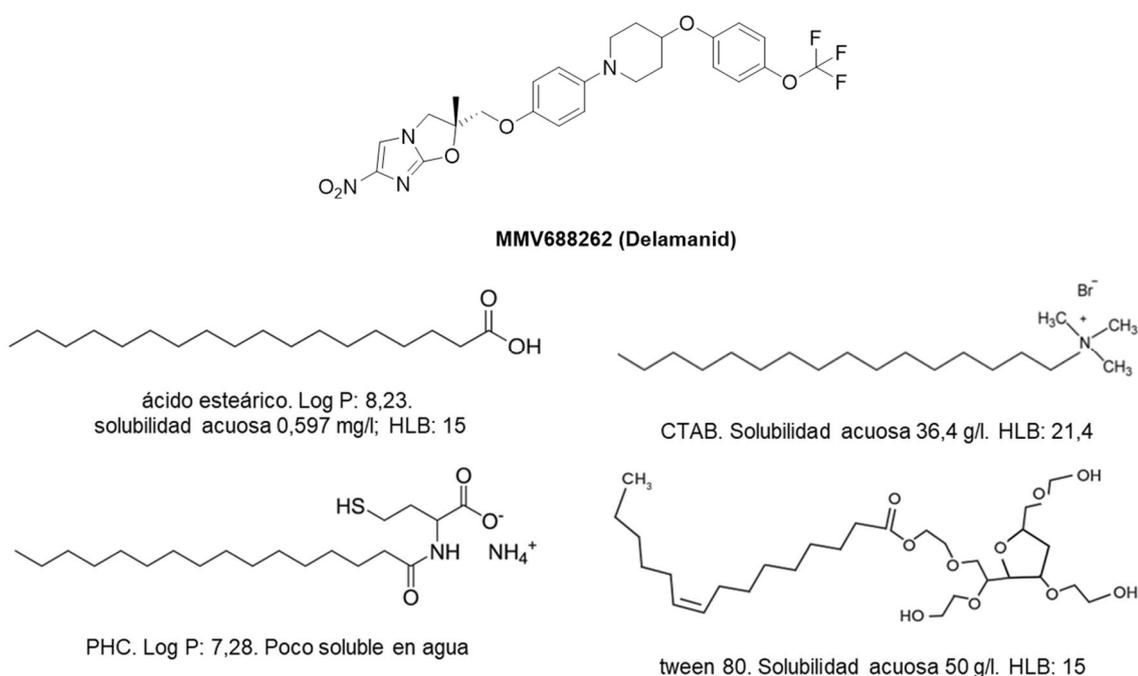


Figura 15. Estructura química de los componentes de las nanopartículas sólidas lipídicas, con sus parámetros fisicoquímicos más relevantes.

La combinación de los componentes en proporciones y orden de adición adecuados, generan las nanopartículas representadas en el esquema de la figura 16.

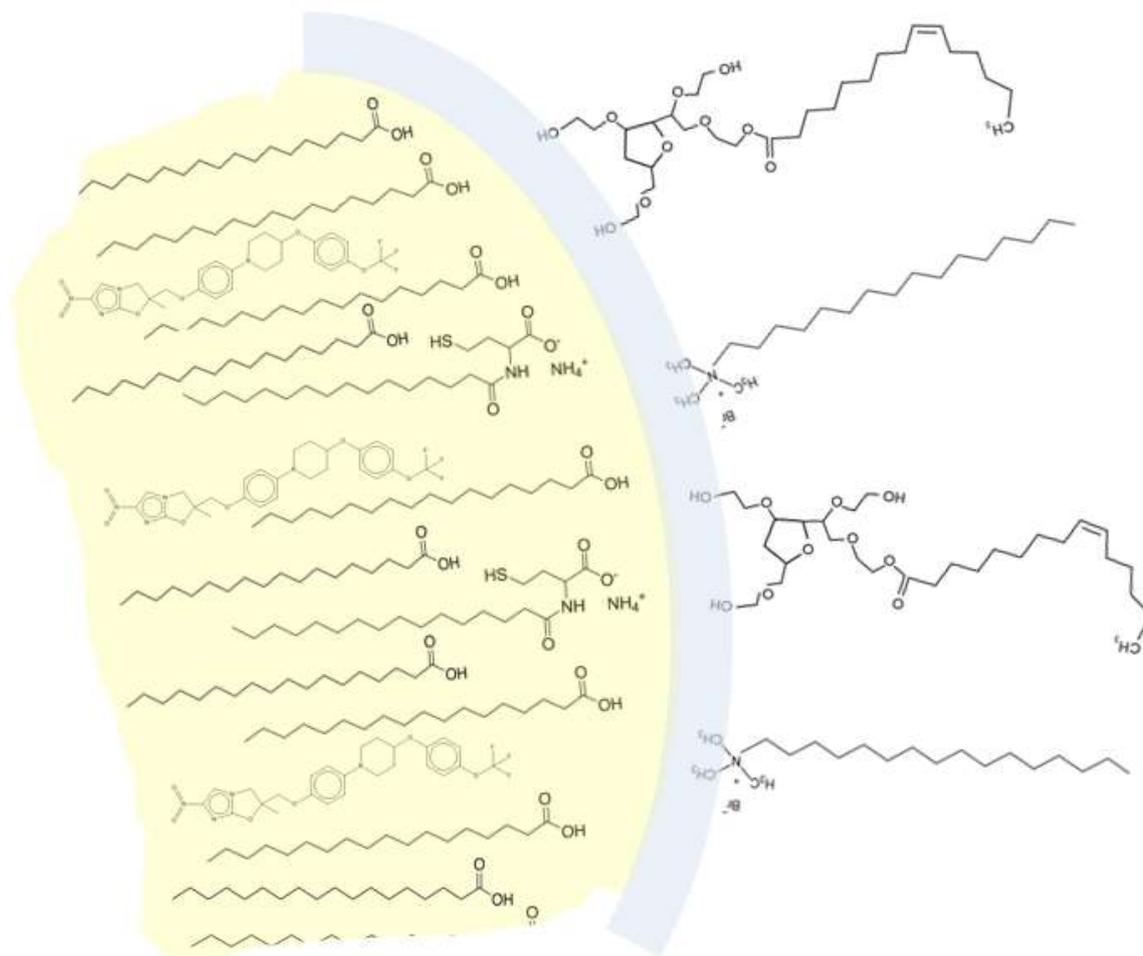


Figura 16. Esquema de la probable distribución de los componentes en un corte transversal de SLNP dispersas en medio acuoso a pH fisiológico.

La fórmula de manufactura (f.m.), que describe la cantidad de cada componente expresada en mg, utilizada en una partida de síntesis de 5000 mg, es decir, en un lote de producción a escala de laboratorio; y, la fórmula porcentual (f.p.), que describe lo mismo en porcentaje peso/peso, se muestran en la Tabla 6.

COMPONENTE	f.m.	f.p.
	mg	% (p/p)
delamanid	0,074	0,0015
PHC	0,125	0,0025
ácido esteárico	0,760	0,0152
etanol	162,000	3,240
CTAB	1,600	0,0320
Tween 80	4,000	0,0800
PBS	4831,400	96,6290
Total	5000,000	100,0000

Tabla 6. Fórmula de manufactura y fórmula porcentual de las SLNP

4.3.2 Caracterización de las SLNP sintetizadas

4.3.2.1 Tamaño de partícula y potencial zeta (ζ potencial)

La figura 17 muestra el tamaño de partícula de cuatro lotes sintetizados independientemente. Se aprecia la baja variabilidad intra- e inter-lotes, evidenciando la robustez de la formulación y del proceso. El tamaño de partícula de las nanopartículas diseñadas, determinado por DLS estuvo entre 120 y 150 nm.

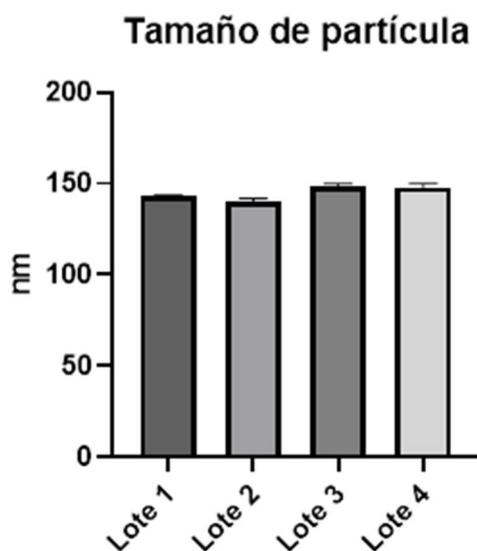


Figura 17. Tamaño de partícula de 4 lotes de SLNP sintetizados ($n=3$, $Me \pm DS$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas ($n=3$) del tamaño de partícula entre cuatro lotes (Lote 1, Lote 2, Lote 3 y Lote 4) elaborados independientemente. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 9,359 con 3 grados de libertad ($p=0,002$), indicando diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para identificar diferencias específicas entre los grupos, calculando el valor p ajustado, que toma en cuenta el número de comparaciones realizadas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del Lote 1 (143,1) no difiere significativamente de la mediana del Lote 2 (140,2), ($p>0,999$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre los Lotes 1 y 3 (148,2), ($p=0,676$); ni entre los Lotes 1 y 4 (149,0), ($p=0,846$); ni entre los Lotes 2 y 3 ($p=0,055$); ni entre los Lotes 2 y 4 ($p=0,076$); ni entre los Lotes 3 y 4 ($p>0,999$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$. Estos resultados muestran que no hay diferencias significativas en el tamaño de partícula de los cuatro lotes elaborados independientemente.

La caracterización del tamaño de partícula a través de la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) desempeña un papel crucial en el proceso de desarrollo de nanopartículas. La rapidez con la que se obtienen los resultados mediante esta técnica es particularmente valiosa, ya que guían de manera ágil y efectiva la optimización de la formulación. También se usan para controles de proceso, controles de calidad rutinarios y estudios de estabilidad, siempre que se correlacionen sus resultados con los obtenidos mediante técnicas directas para medir tamaño de partícula por TEM.

Debido al enorme número de partículas que participan en la medición en DLS, se puede describir la distribución de tamaños de partículas en una muestra mediante el Índice de polidispersión (*Polydispersity Index*, PDI); mientras más cercano a 0 es su valor, más estrecha es la distribución de tamaños en torno a la media. Un bajo PDI puede resultar de un mayor control de los parámetros de la elaboración de las nanopartículas, así como de la robustez de la formulación, debido a que se han controlado adecuadamente las fuentes de variabilidad inherentes al producto y al proceso.

Este fue el caso de las nanopartículas diseñadas, una vez optimizadas, el valor del PDI nunca superó un valor de 0,3, incluso entre varios lotes de SLNP; tal como se parecía en la figura 18, en la que se representan los promedios y la variación de este parámetro en cuatro lotes preparados independientemente.

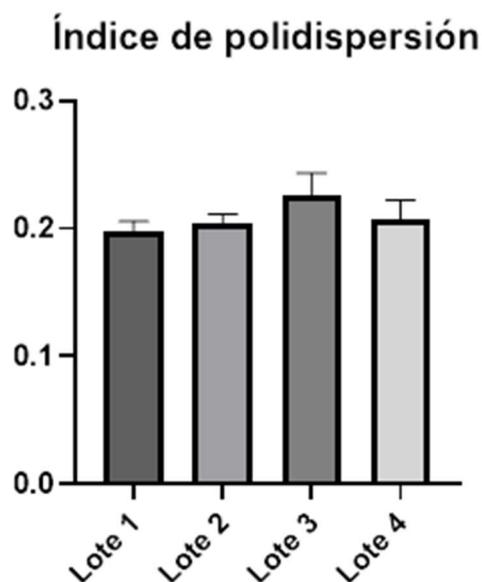


Figura 18. Índice de polidispersión de 4 lotes de SLNP ($n=3$, $Me \pm DS$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas ($n=3$) del Índice de polidispersión entre cuatro lotes (Lote 1, Lote 2, Lote 3 y Lote 4) elaborados independientemente. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 4,846 con 3 grados de libertad ($p=0,194$), indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para identificar diferencias específicas entre los grupos, calculando el valor p ajustado, que toma en cuenta el número de comparaciones realizadas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del Lote 1 (0,193) no difiere significativamente de la mediana del Lote 2 (0,203), ($p>0,999$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre los Lotes 1 y 3 (0,226), ($p=0,189$); ni entre los Lotes 1 y 4 (0,213), ($p>0,999$); ni entre los Lotes 2 y 3 ($p=0,846$); ni entre los Lotes 2 y 4 ($p > 0,999$); ni entre los Lotes 3 y 4 ($p>0,999$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$. Estos resultados muestran que no hay diferencia en el Índice de polidispersión de los cuatro lotes elaborados independientemente.

El potencial zeta ligeramente positivo determinado en tres lotes independientes de nanopartículas, figura 19, es congruente con la carga positiva de los grupos amonio cuaternario y amina presentes en varios de los componentes. La magnitud de la carga

nunca superó los 15 mV, lo cual, como se verá en breve, no tuvo un efecto significativo en su estabilidad física, dentro de la ventana temporal para la cual estas partículas fueron diseñadas.

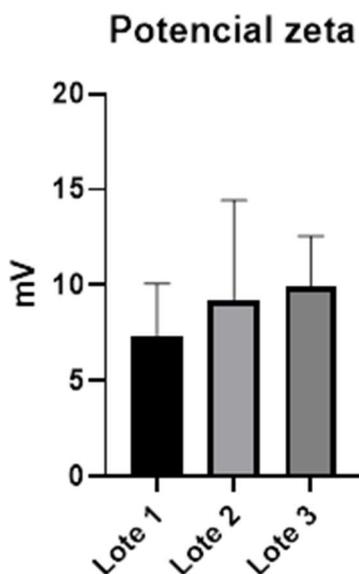


Figura 19. Potencial zeta de 3 lotes de SLNP ($n=3$, $Me \pm DS$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas ($n=3$) del potencial zeta entre tres lotes (Lote 1, Lote 2 y Lote 3) elaborados independientemente. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 1,067 con 2 grados de libertad ($p=0,664$), indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medianas del Lote 1 (7,516), Lote 2 (11,260) y Lote 3 (11,140). Los resultados de la prueba de Dunn arrojaron valores de $p>0,999$ para todas las comparaciones. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$. Estos resultados muestran que no hay diferencia en el potencial zeta de tres lotes elaborados independientemente.

4.3.2.2 Estabilidad física de las nanopartículas

Parte de la contribución que pretende este trabajo es superar la limitación del escalamiento de la síntesis desde el laboratorio hasta nivel industrial, debida a la

inestabilidad física de estos nanotransportadores que complica su producción y cadena de abastecimiento. De ahí el enfoque en el diseño de un producto y un proceso que permita la elaboración de SLNP a pequeña escala, bajo demanda y personalizadas, destinadas a formar parte de preparaciones farmacéuticas: cremas, geles, etc., elaboradas en PoC, puntos de atención al paciente, dispensadas para ser aplicadas durante unos pocos días.

En ese contexto, las nanopartículas diseñadas, se han monitorizado durante una semana, almacenadas en refrigeración. Como se observa en la figura 20, el tamaño de partícula no llega a 180 nm hasta el día 7 en refrigeración (izquierda); el índice de polidispersión no supera el valor de 0,25 (centro); y, el potencial zeta mantiene su signo, y en su magnitud no hay diferencias durante el tiempo de estudio (derecho).

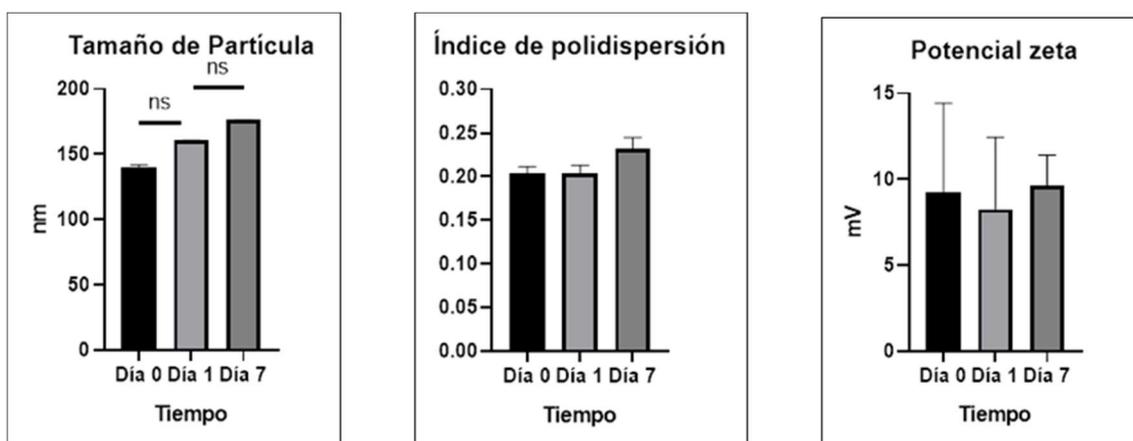


Figura 20. Estabilidad física de SLNP almacenadas a 4 °C durante 7 días (n=3, Me ± DS).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas ($n=3$) del tamaño de partícula entre las tres determinaciones (día 0, día 1 y día 7) durante el estudio de estabilidad. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 7,200 con 2 grados de libertad ($p=0,004$), indicando diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para identificar diferencias específicas entre los grupos, calculando el valor p ajustado, que toma en cuenta el número de comparaciones realizadas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del día 0 (140,2) no difiere significativamente de la mediana del día 1 (160,4), ($p=0,539$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre el día 1 y día 7 (176,1), ($p=0,539$); pero sí entre los días 0 y 7 ($p=0,022$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$.

Estos resultados muestran que no hay diferencia significativa en el tamaño de partícula tras un día de almacenamiento a 4 °C, tampoco entre el día 1 y el 7, pero sí entre el inicio y el final del estudio. El tamaño de partícula se mantiene por debajo de 180 nm al finalizar el estudio de estabilidad.

Así mismo, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas ($n=3$) del Índice de polidispersión entre las tres determinaciones (día 0, día 1 y día 7) durante el estudio de estabilidad. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 5,422 con 2 grados de libertad ($p=0,071$), indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del día 0 (0,203) no difiere significativamente de la mediana del día 1 (0,207), ($p>0,999$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre el día 0 y día 7 (0,235), ($p=0,158$); ni entre los días 1 y 7 ($p=0,111$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$. Estos resultados muestran que no hay diferencia significativa en el Índice de polidispersión durante el tiempo que duró el estudio de estabilidad.

Finalmente, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas ($n=3$) del potencial zeta entre las tres determinaciones (día 0, día 1 y día 7) durante el estudio de estabilidad. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 0,267 con 2 grados de libertad ($p=0,929$), indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del día 0 (11,260) no difiere significativamente de la mediana del día 1 (6,037), ($p>0,999$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre el día 0 y día 7 (9,168), ($p>0,999$); ni entre los días 1 y 7 ($p>0,999$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$.

Estos resultados muestran que no hay diferencia significativa en el potencial zeta durante el tiempo que duró el estudio de estabilidad. En definitiva, las SLNP diseñadas mantienen sus características durante al menos siete días almacenaje a 4 °C.

4.3.2.3 Caracterización de las SLNP por TEM

Las mediciones en el DLS dan importante información de tamaño y carga, pero no permiten conocer la forma general ni los detalles estructurales de las nanopartículas, por lo cual la microscopía electrónica es un complemento obligado de aquella técnica. Como se comenta en materiales y métodos, la necesidad de incluir las nanopartículas

de hierro tiene únicamente fines de separación mediante centrifugación; un efecto secundario positivo de esto es el incremento del contraste en microscopía electrónica, lo cual permitió ubicarlas fácilmente al aplicar esta técnica. En la figura 21, se observan microfotografías electrónicas de SLNP; todas ellas tienen como constante la forma esférica, el tamaño inferior a 200 nm y la presencia de nanopartículas de hierro en su interior.

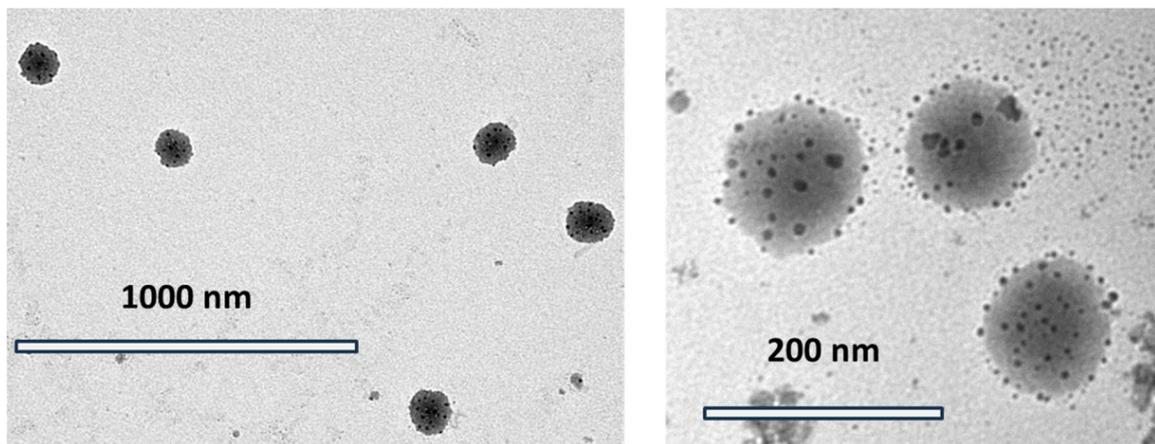


Figura 21. Imagen TEM de SLNP con nanopartículas de hierro encapsuladas en su interior.

4.3.2.3 Eficiencia de encapsulado

La cantidad de fármaco encapsulado en una SLNP depende en parte de su solubilidad en los lípidos. El delamanid tiene un log P de 5,6 indicativo de su alta lipofilidad, pues podría entenderse como una molécula que es 5 órdenes de magnitud más afín por una fase lipídica que por una fase acuosa. Los resultados experimentales confirman lo anterior, la mayor parte del fármaco usado en la síntesis, entre el 84 y 85%, se encapsuló (figura 22).

Eficiencia de encapsulado

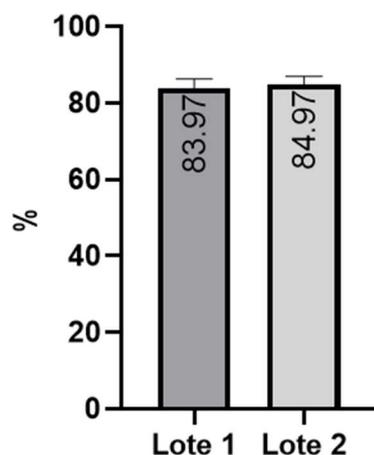


Figura 22. Eficiencia de encapsulamiento de delamanid en las SLNP ($n=3$, $Me \pm DS$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar las medianas ($n=3$) de la Eficiencia de encapsulamiento entre dos lotes. El estadístico de prueba fue de 3,0 con $p=0,700$, indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$. Estos resultados muestran que no hay diferencia significativa en la Eficiencia de encapsulamiento entre dos lotes fabricados independientemente.

4.3.2.4 Eficiencia de Liberación *in vitro*

El hecho de que la sustancia activa se libere desde un sistema de encapsulación y entrega, de una nanopartícula en este caso, no es garantía para su efectividad; sin embargo, si la liberación *in vitro* no se produce, su fallo *in vivo* es altamente probable. La figura 23 muestra el perfil de disolución de las SLNP en medio a pH y temperatura fisiológicas; más del 60% del fármaco se libera durante los primeros 5 días en una cinética prácticamente lineal (orden cero). En transcurso de una semana, más del 80% se ha transferido al medio de disolución.

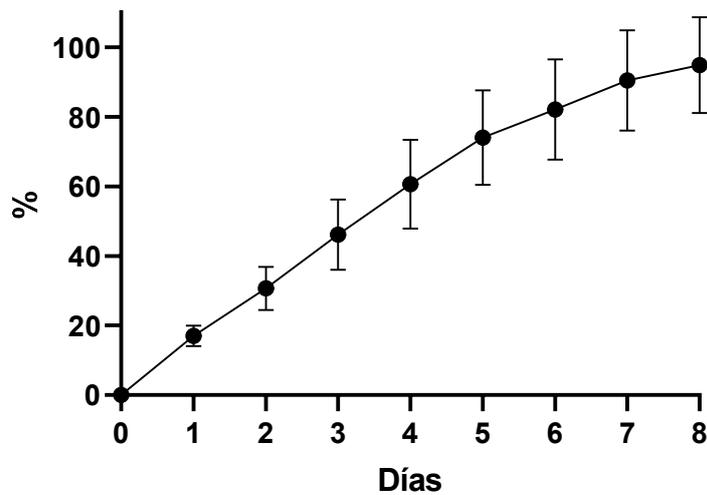


Figura 23. Perfil de disolución in vitro de SLNP en PBS pH 7,4 (n=4, $\bar{x} \pm DS$).

4.4 Eficacia de las SLNP *in vitro*, *in cellulo* e *in vivo*

4.4.1 Actividad leishmanicida de las SLNP en promastigotes

La actividad leishmanicida de la sustancia debe ser confirmada, cuando se encuentra encapsulada en nanopartículas. Se ensayó la actividad de las nanopartículas frente a promastigotes usando como controles el cultivo de parásitos sin tratamiento y con nanopartículas sin fármaco, para conocer el efecto de los componentes del nanotransportador. Adicionalmente, se evaluó el efecto de las nanopartículas de hierro en la formulación (figura 24).

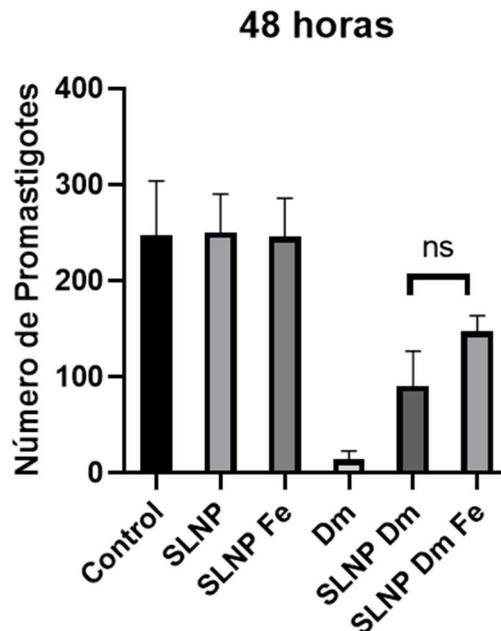


Figura 24. Actividad leishmanicida de SLNP por contaje de promastigotes ($n=3$, $Me \pm DS$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas ($n=3$) del número de promastigotes entre grupos: Control, SLNP (SLNP sin fármaco) y SLNP Fe (SLNP sin fármaco, pero con nanopartículas magnéticas). El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 0,090 con 2 grados de libertad ($p=0,986$), indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medianas del Control (257,5), SLNP (255,0) y SLNP Fe (242,5). Los resultados de la prueba de Dunn arrojaron valores de $p>0,999$ para todas las comparaciones. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$.

Así mismo, se compararon las medianas ($n=3$) entre Dm (delamanid, el fármaco libre), SLNP Dm (SLNP con fármaco) y SLNP Dm Fe (SLNP con fármaco y con nanopartículas de hierro). El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 7,200 con 2 grados de libertad ($p=0,004$), indicando diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana de Dm (15,0) no difiere significativamente de la mediana SLNP Dm (89,2), ($p=0,539$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre el SLNP Dm y SLNP Dm Fe (144,2), ($p=0,539$); pero sí entre Dm y SLNP Dm Fe ($p=0,022$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$.

Los resultados antes descritos indican que los excipientes de las nanopartículas no tienen efecto sobre los promastigotes; así mismo, la presencia de nanopartículas de hierro no afecta la actividad de delamanid encapsulado. Por otro lado, el fármaco encapsulado en las SLNP mantiene su actividad leishmanicida frente a promastigotes, si bien ésta es menor que la del fármaco en solución. Esto se explica por la liberación prolongada desde las nanopartículas, demostrada en los estudios de disolución *in vitro* donde se muestra como a las 48 horas solo una cuarta parte del delamanid es liberado. Esto representa una oportunidad interesante para el diseño de formulaciones farmacéuticas que incluyan las SLNP, puesto que permitiría disminuir el número de administraciones, y con ello, incrementar el cumplimiento por parte del paciente a la vez que disminuir los efectos adversos.

4.4.2 Captación celular de SLNP mediante TEM

Una condición altamente deseable para el tratamiento de infecciones intracelulares con nanotransportadores, es que éstos sean capturados por la célula y no que solamente liberen su contenido en el medio extracelular. La opsonización, el proceso inmunológico que utiliza opsoninas para marcar patógenos extraños y eliminarlos a través de fagocitosis, principalmente a cargo de los macrófagos, que suele presentarse como una desventaja para los nanotransportadores, puede utilizarse como estrategia para aumentar la efectividad del tratamiento de infecciones intracelulares, por ejemplo para la leishmaniasis [129]; es importante señalar que la respuesta del organismo ante la presencia de nanopartículas también depende del tamaño, forma, topografía, carga superficial, entre otras características [130,131].

Para confirmar su internalización celular, se incubaron las SLNP Dm con macrófagos infectados durante 48 horas, se fijaron, embebieron en resina, se cortaron en el ultramicrotomo. Las secciones ultrafinas, colocadas sobre rejillas, se examinaron en TEM. Las imágenes obtenidas se muestran en la figura 25, en la cual las flechas blancas corresponden a los mismos recuadros magnificados, la flecha negra en la primera fotografía indica un parásito intracelular muerto.

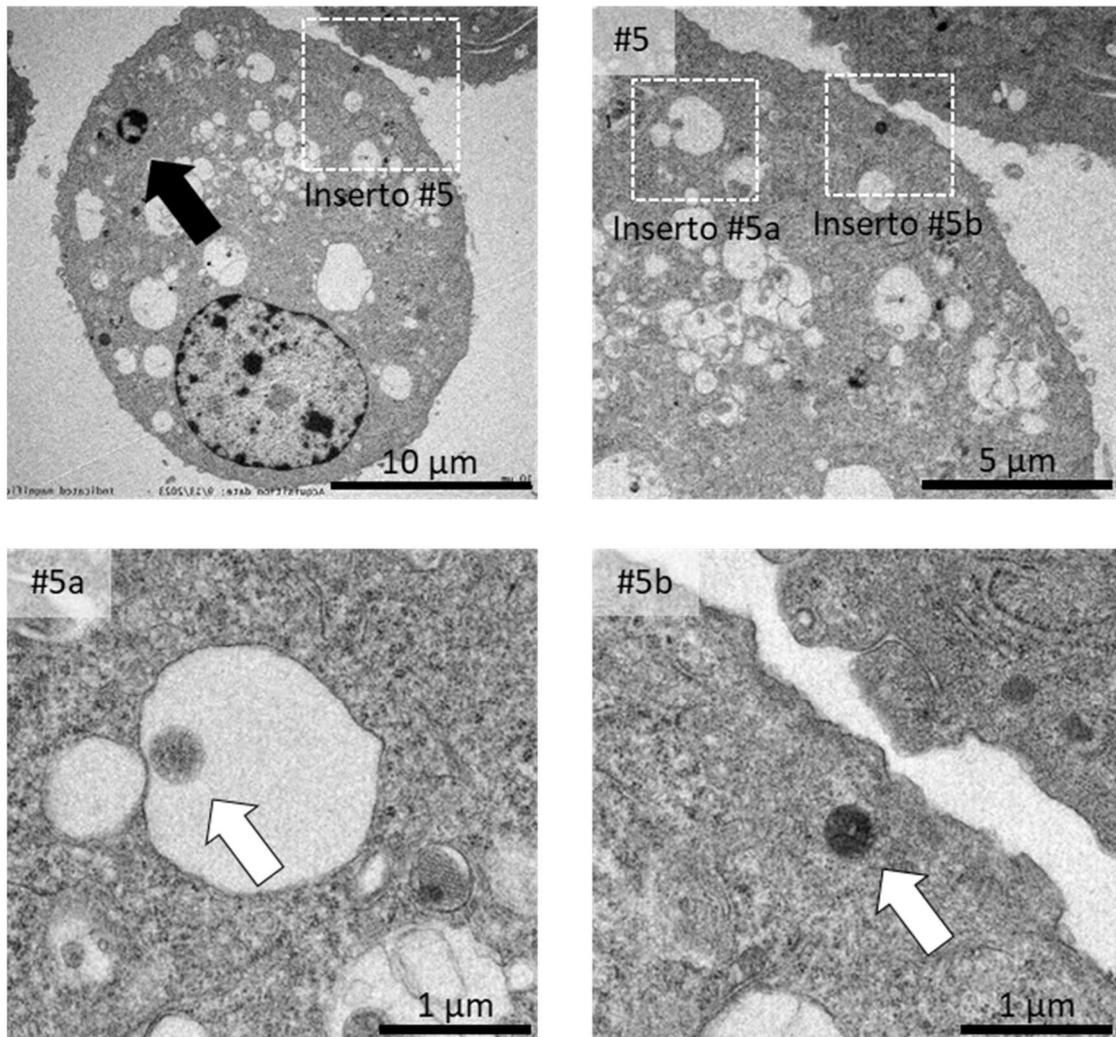


Figura 25. Imagen TEM de la captación celular de SLNP por macrófagos infectados con *Leishmania*.

Gracias a la presencia de nanopartículas en el interior de las SLNP, el TEM permitió la identificación y observación de algunos nanotransportadores intracelulares rodeados de membranas, probablemente incluidos en fagosomas (recuadro 5a), lo que sugiere captación por fagocitosis. Otras SLNP se observaron libres en el citoplasma sin membranas circundantes (recuadro 5b).

4.4.3 Prueba de concepto de liberación *in cellulo*

A continuación, se investigó la liberación del fármaco desde la SLNP al interior celular, prueba de concepto *in cellulo* que se acerca más a lo que ocurrirá dentro de un organismo.

Como se estableció anteriormente, lo que se busca en el diseño de nanotransportadores destinados a infecciones intracelulares, es que estos sean internalizados en las células que contienen los parásitos. Dado que no puede descartarse la liberación del fármaco en el ambiente celular, se sintetizaron nanopartículas de idéntica composición, pero encapsulando además un pigmento fluorescente lipofílico cuyo comportamiento se podría aproximar al del fármaco. Esta prueba de concepto permitió evidenciar la liberación de la carga de la nanopartícula y su permeación al interior de la célula (figura 26).

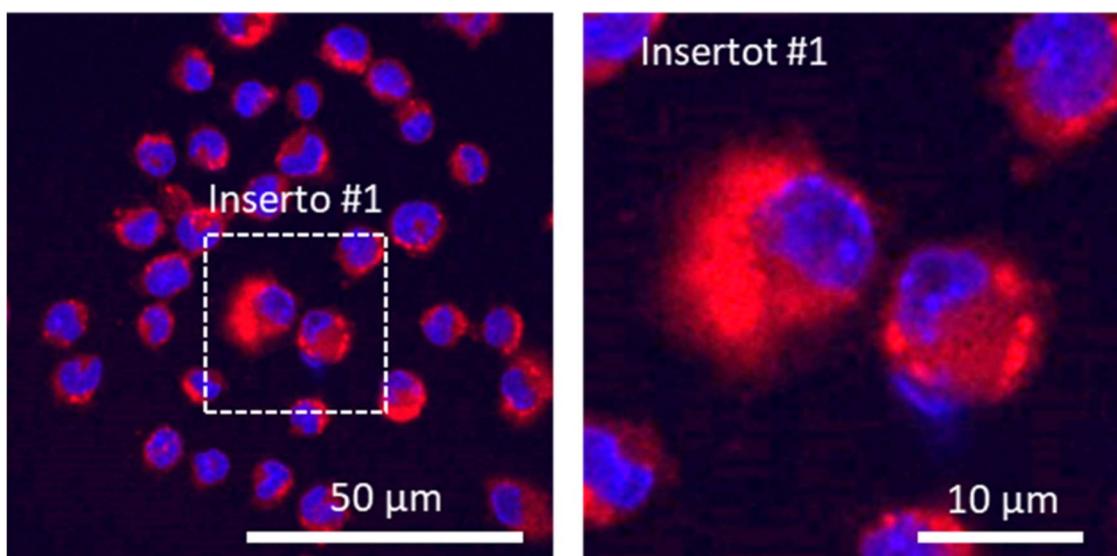


Figura 26. Actividad leishmanicida de SLNP de delamanid frente a promastigotes.

La fuerte fluorescencia citoplasmática que se observa en los macrófagos, indica la liberación exitosa del colorante encapsulado y su permeación al ambiente intracelular.

4.4.4 Prueba de concepto de liberación transdermal

Para evaluar la liberación de carga de la nanopartícula *in vivo*, y sobre todo su penetración transdermal, se realizó una prueba de concepto: las SLNP cargadas con delamanid y un pigmento fluorescente que emite en el canal infrarrojo cercano, se aplicaron tópicamente sobre piel de ratones normales. A varios tiempos tras la aplicación, se sacrificaron ratones y se recogió la piel que se procesó histológicamente para observación por microscopía confocal (figuras 27, 28 y 29). El canal rojo muestra la fluorescencia del pigmento que fue encapsulado en las partículas, los núcleos están teñidos con DAPI (canal azul), el canal verde representa la autofluorescencia del tejido.

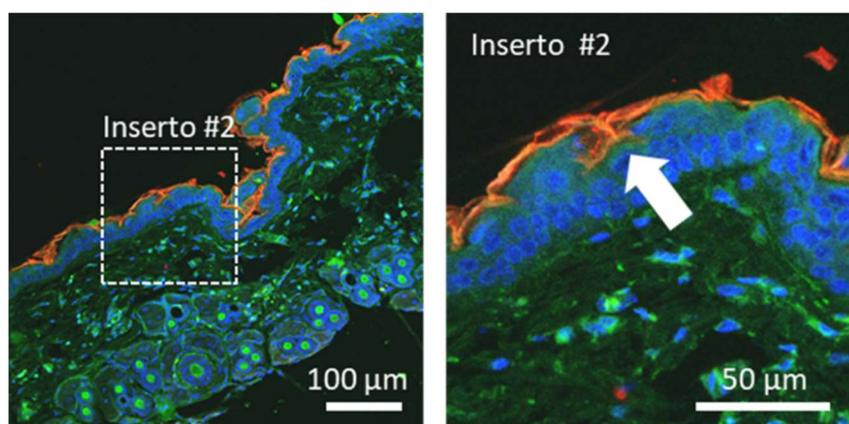


Figura 27. Microscopía confocal de piel después de la administración tópica de las SLNP Dm (0 horas)

La figura 27 es una imagen representativa de piel después de la administración tópica de las SLNP Dm (0 horas) tomadas mediante microscopía confocal. El pigmento fluorescente encapsulado se observa en el canal rojo.

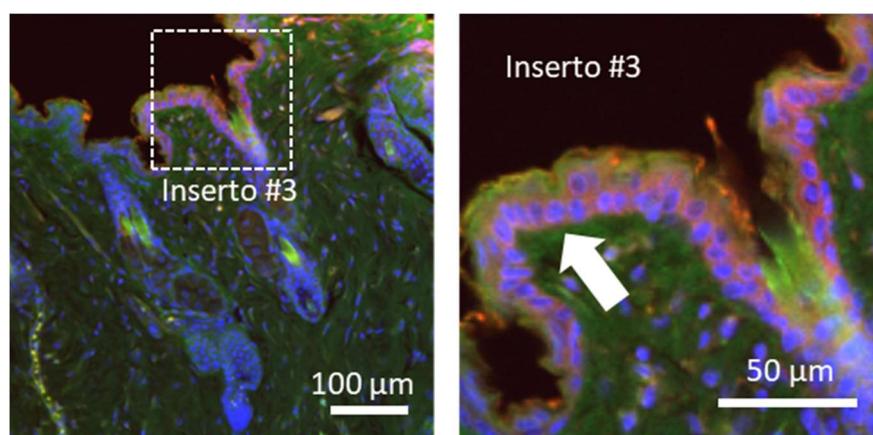


Figura 28. Microscopía confocal de piel 2 horas después de la administración tópica de los SLNP Dm.

La figura 28 es una imagen representativa de piel después de 2 horas de la administración tópica de las SLNP Dm tomadas mediante microscopía confocal. El pigmento fluorescente encapsulado se observa en el canal rojo.

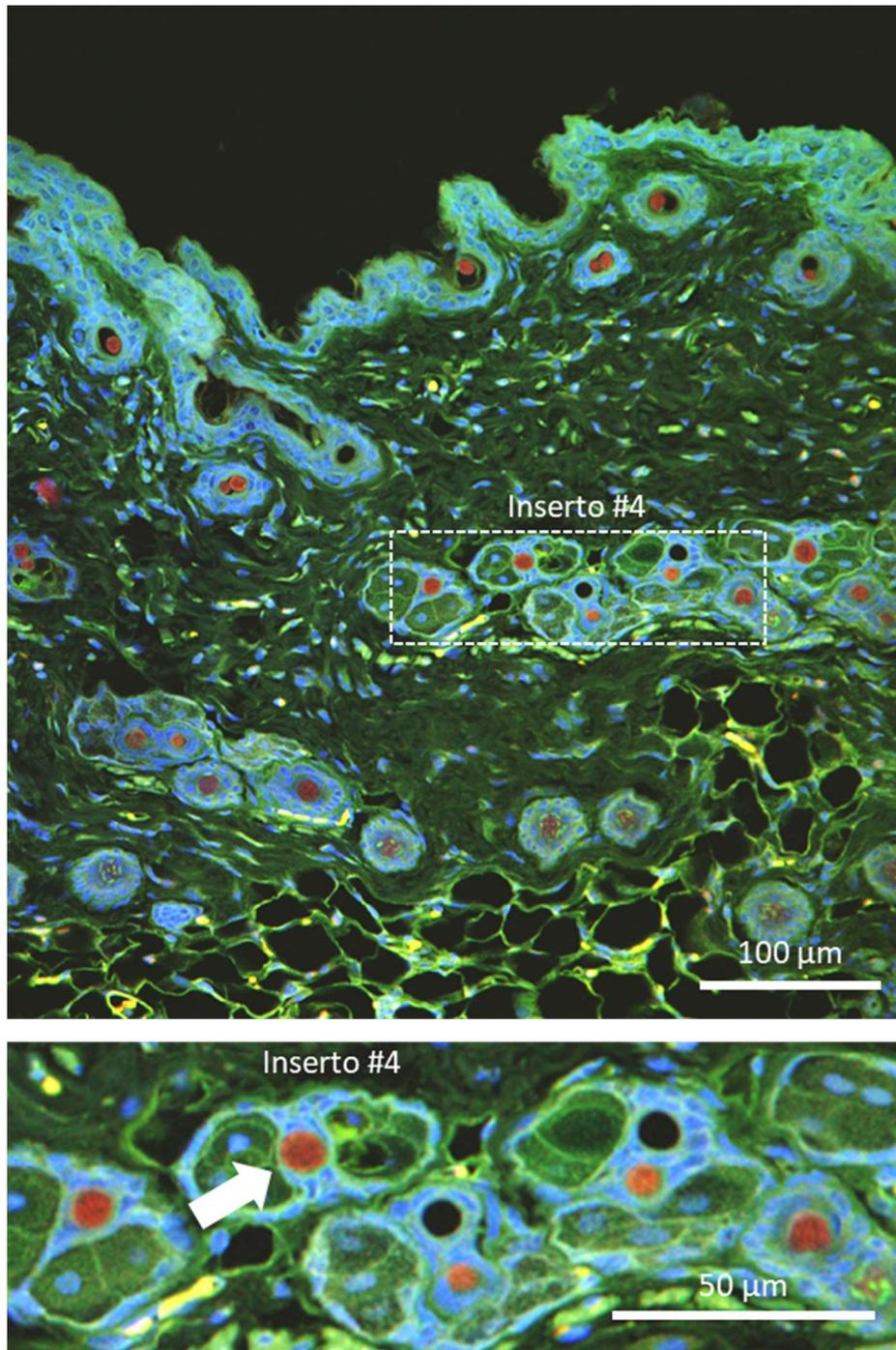


Figura 29. Microscopía confocal de piel 1 día después de la administración tópica de los SLNP Dm.

La figura 29 es una imagen representativa de piel 1 día después de la administración tópica de las SLNP Dm tomadas mediante microscopía confocal. El pigmento fluorescente encapsulado se observa en el canal rojo.

Luego de pocos minutos de la aplicación, el pigmento se distribuye en el estrato córneo (figura 27), a las 2 horas de la aplicación se lo puede detectar en el citoplasma de las células de la capa basal (figura 28) y a las 24 horas es notable su acumulación en el folículo piloso (figura 29). En conclusión, este estudio demuestra como las SLNP liberan eficientemente su contenido lipofílico tras su aplicación tópica *in vivo*.

4.4.5 Actividad leishmanicida de las SLNP en amastigotes

Los promastigotes se cultivan en medio líquido, por lo que, alcanzar concentraciones efectivas por adición de fármaco o por liberación desde un sistema de entrega, no garantiza su actividad leishmanicida frente a amastigotes intracelulares, puesto que para alcanzarlos se deben superar varias barreras biológicas. Por tanto, la actividad leishmanicida de un fármaco frente a promastigotes es solo un indicativo de su efectividad, misma que debe ser confirmada en amastigotes intracelulares, la forma clínicamente relevante del parásito.

Para evaluar la eficacia del tratamiento con SLNP, se infectaron macrófagos caninos DH82 con *Leishmania infantum* y se sometieron a tres tratamientos diferentes: nanopartículas sin fármaco (SLNP), nanopartículas que encapsulan delamanid (SLNP Dm), y el fármaco libre (Dm); cada uno en dos niveles de concentración. Tras 48 horas, se cuantificó el número de células infectadas y el número de amastigotes por célula, mediante tinción con Giemsa. Los valores resultantes se utilizaron para calcular el índice de infección, proporcionando una medida general de la carga parasitaria (figura 30).

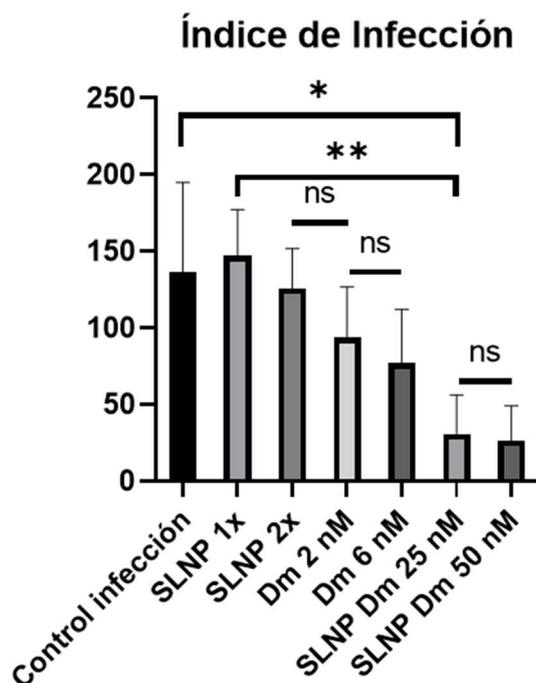


Figura 30. Actividad leishmanicida de SLNP frente a amastigotes ($n=6$, $Me \pm DS$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas ($n=6$) del Índice de infección entre siete grupos: Control de infección, SLNP 1x (SLNP sin fármaco, administradas en el mismo volumen que las SLNP con delamanid a concentración 25nM), SLNP 2x (SLNP sin fármaco, administradas en el mismo volumen que las SLNP con delamanid a concentración 50nM), Dm 2nM (delamanid a concentración 2 nM), Dm 6nM (fármaco a concentración 6nM), SLNP Dm 25nM (SLNP con delamanid a concentración 25nM), SLNP Dm 50nM (SLNP con delamanid a concentración 50nM).

El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 29,020 con 6 grados de libertad ($p<0,0001$), indicando diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para identificar diferencias específicas entre los grupos, calculando el valor p ajustado, que toma en cuenta el número de comparaciones realizadas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del Control de infección (127,4) no difiere significativamente de la mediana de SLNP 1x (147,0), ni de la mediana de SLNP 2x (122,5), tampoco de Dm 2nM (93,9), ni de Dm 6nM (67,0), todos con un valor $p>0,999$; pero si difiere significativamente de SLNP Dm 25nM (31,7), ($p=0,037$) y de SLNP Dm 50nM (20,3), ($p=0,015$).

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre SLNP 1x y SLNP 2x ($p>0,999$), ni entre SLNP 1x y Dm 2nM ($p>0,999$), ni entre SLNP 1x y Dm 6nM ($p=0,566$); pero sí entre SLNP 1x y SLNP Dm 25nM ($p=0,004$) y entre SLNP 1x y SLNP Dm 50nM ($p=0,002$).

No se encontraron diferencias significativas entre SLNP 2x y Dm 2nM ($p>0,999$), ni entre SLNP 2x y Dm 6nM ($p>0,999$), tampoco entre SLNP 2x y SLNP Dm 25nM ($p=0,054$); pero si entre SLNP 2x y SLNP Dm 50nM ($p=0,023$).

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las dos dosis de fármaco en solución, Dm 2nM y Dm 6nM ($p>0,999$), ni entre Dm 2nM y SLNP Dm 25nM ($p=0,805$) ni entre Dm 2nM y SLNP Dm 50nM ($p=0,416$); ni entre Dm 6nM y SLNP Dm 25nM ($p>0,999$), ni entre Dm 6nM y SLNP Dm 50nM ($p>0,999$). Finalmente, tampoco hubo diferencias significativas en la actividad leishmanicida en amastigotes al administrar SLNP Dm 25nM o SLNP 50 nM ($p>0,999$).

Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$. La convención común es asignar asteriscos para indicar diferentes niveles de significancia, y el número de asteriscos generalmente refleja el nivel de significancia alcanzado en una comparación. Para este contexto: un asterisco (*) representa un nivel de significancia de $p<0,050$, dos asteriscos (**) un nivel de significancia de $p<0,010$ y tres asteriscos (***) representan un nivel de significancia de $p<0,001$.

En resumen, no hay diferencia estadísticamente significativa entre el índice de infección de las SLNP sin fármaco y el delamanid en solución. Sin embargo, las nanopartículas con delamanid (SLNP Dm) presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto del control de infección y de las nanopartículas sin fármaco, presentando el menor índice de infección de todos los tratamientos. Estos resultados demuestran que el delamanid encapsulado en SLNP presenta un mayor efecto leishmanicida en comparación con el delamanid en solución, forma no encapsulada.

Este resultado es congruente con los otros estudios reportados en este documento: el fármaco encapsulado mantiene su actividad leishmanicida, las nanopartículas son internalizadas en macrófagos infectados, liberan el fármaco intracelularmente y presentan actividad frente a amastigotes. El fármaco administrado como solución, libre en el medio extracelular aparentemente no ingresa lo suficiente para alcanzar concentraciones leishmanicidas.

4.4.6 Actividad leishmanicida de las SLNP *in vivo*

Dentro del contexto de esta Tesis Doctoral, la confirmación final de la efectividad de las SLNP encapsulando delamanid, se logró con el estudio *in vivo*; la verificación directa de la *progresión de la infección* a lo largo del estudio constituyó una herramienta de gran utilidad. La figura 31 muestra el estado de las lesiones a la semana 6 de infección, es decir, dos semanas luego de la última administración de los tratamientos. El efecto de las SLNP encapsulando delamanid se evidencia por la diferencia entre el tamaño de la almohadilla plantar del grupo de animales tratados intralesionalmente con SLNP encapsulando delamanid, y el resto de los grupos, figura 30. Es importante resaltar que el tamaño de la lesión no disminuye con el fármaco libre. Estos resultados son consistentes con los descritos en secciones previas, en los que se dejaba entrever la importancia de que el fármaco esté encapsulado en nanotransportadores que puedan ser internalizados en las células.

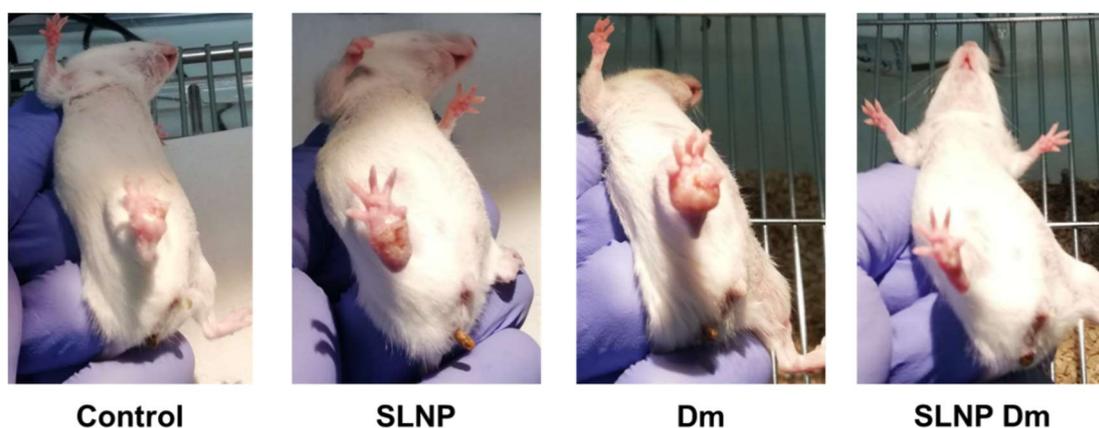


Figura 31. Fotografías representativas del estado de las lesiones a la semana sexta del estudio, dos semanas después de finalizada la administración de los tratamientos.

Con la finalidad de obtener información numérica sobre la eficacia de los tratamientos, se calculó la progresión de la infección relacionando el ancho de la pata derecha (infectada) con la izquierda (control) de cada individuo. La figura 32 muestra los resultados obtenidos desde la última administración del tratamiento, hasta el final del estudio.

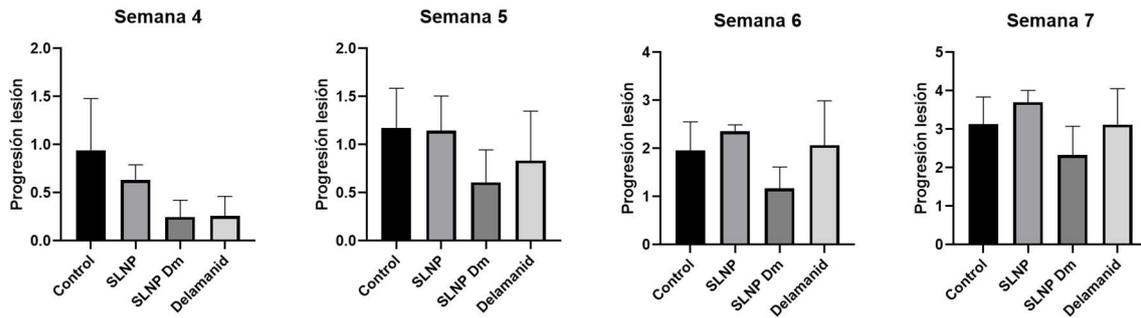


Figura 32. Actividad leishmanicida de SLNP evidenciada por la Progresión de la infección ($n=4$, $Me \pm DS$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de la Progresión de la Infección entre los grupos Control ($n=4$), SLNP ($n=3$), SLNP Dm ($n=4$) y Dm ($n=4$) a la semana 4 del estudio. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 5,963 con 3 grados de libertad ($p=0,104$), indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para identificar diferencias específicas entre los grupos, calculando el valor p ajustado, que toma en cuenta el número de comparaciones realizadas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del Control (1,00) no difiere significativamente de la mediana del grupo tratado con SLNP (0,65), ($p>0,999$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre el Control y SLNP Dm (0,30), ($p=0,172$); ni con el grupo tratado con Dm (0,27) ($p=0,206$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$. Los análisis estadísticos para las semanas 5, 6 7, tampoco mostraron diferencias significativas.

Si bien, debido a la alta dispersión de los datos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, las tendencias son evidentes, como se aprecia en la figura 33.

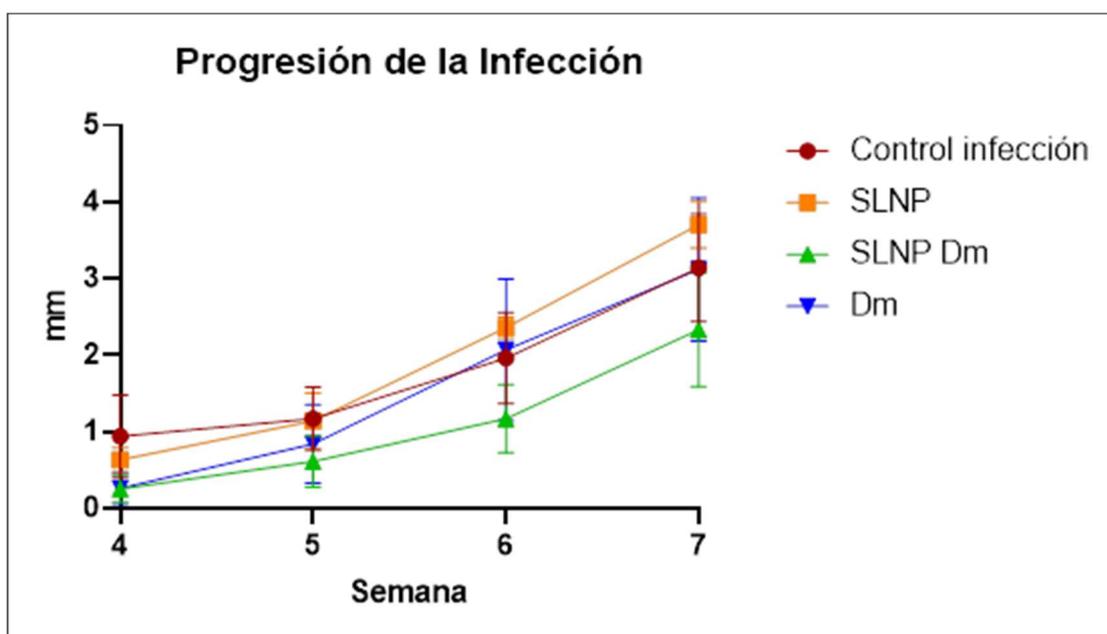


Figura 33. Tendencias en la progresión de la infección.

Al finalizar la administración de los tratamientos, semana 4, la progresión de la infección entre los grupos tratados con SLNP Dm y Dm es similar, siendo muy notoria la diferencia de ambos grupos con el control de infección. En la semana 5, la liberación prolongada del fármaco desde la nanopartícula permite mantener la diferencia en la progresión de la infección entre el grupo tratado con SLNP Dm y el Control hasta el final del estudio; en contraste, en el grupo que fue tratado con el fármaco libre, el efecto prácticamente desaparece una semana después de finalizado el tratamiento. Curiosamente, las nanopartículas sin fármaco parecen tener un efecto inicial, probablemente por activación del sistema inmune, pero se pierde una semana luego de finalizado el tratamiento.

En un próximo estudio *in vivo*, aparte de incrementar el número de individuos, se deberían incluir variables como la dosis, la frecuencia de administración (diaria, en lugar de dos veces por semana) y la duración del tratamiento (incrementarlo de 2 a 8 semanas). Por otro lado, el avance de la infección deberá documentarse por la medición del ancho y del espesor de la pata, fue evidente que el incremento en esta última dimensión fue mayor que en la primera. De hecho, sería altamente recomendable usar, en un estudio futuro, herramientas de fotogrametría y software especializado en reconstrucción 3D para estimar el volumen de la infección a partir de fotografías desde

varios ángulos. La reproducción de objetos digitales mediante fotogrametría es está usando con aplicaciones médicas, por ejemplo, en cardiología [132].

Para evaluar la infección, más allá del sitio de inoculación de los parásitos, se determinó la carga parasitaria en bazo y ganglio poplíteo, por el método dilución límite. Los datos obtenidos se aprecian en la figura 34.

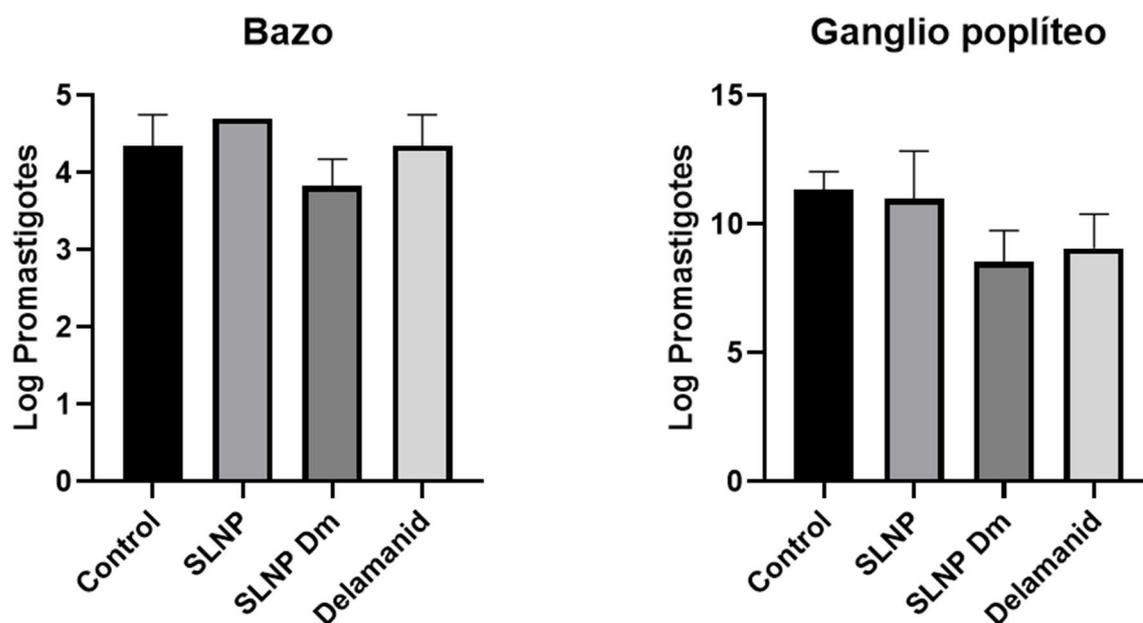


Figura 34. Carga parasitaria de los individuos al final del estudio ($n=4$, $Me \pm DS$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de la Carga parasitaria entre los grupos Control ($n=4$), SLNP ($n=3$), SLNP Dm ($n=4$) y Dm ($n=4$) en Bazo, al final del estudio. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 7,125 con 3 grados de libertad ($p=0,052$), indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para identificar diferencias específicas entre los grupos, calculando el valor p ajustado, que toma en cuenta el número de comparaciones realizadas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del Control (4,35) no difiere significativamente de la mediana del grupo tratado con SLNP (4,70), ($p=0,756$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre el Control y SLNP Dm (4,00), ($p=0,335$); ni con el grupo tratado con Dm (4,35) ($p>0,999$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$.

También se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de la Carga parasitaria entre los grupos Control ($n=4$), SLNP ($n=3$), SLNP Dm ($n=4$) y Dm ($n=4$) en Ganglio poplíteo, al final del estudio. El estadístico de prueba de Kruskal-Wallis fue de 7,750 con 3 grados de libertad ($p=0,032$), indicando diferencias significativas. Posteriormente, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para identificar diferencias específicas entre los grupos, calculando el valor p ajustado, que toma en cuenta el número de comparaciones realizadas. Los resultados de la prueba de Dunn indicaron que la mediana del Control (11,69) no difiere significativamente de la mediana del grupo tratado con SLNP (11,69), ($p>0,999$); tampoco se encontraron diferencias significativas entre el Control y SLNP Dm (8,54), ($p=0,068$); ni con el grupo tratado con Dm (8,54) ($p=0,164$). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia establecido en $\alpha=0,05$.

Las diferencias no fueron tan evidentes como en el caso de la progresión de la infección, muy probablemente debido a que al tiempo de la eutanasia ya habían transcurrido tres semanas desde la finalización del tratamiento. En un siguiente estudio se deberá disponer de suficiente número de individuos para realizar un seguimiento semanal de la carga parasitaria.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Esta tesis doctoral representa un paso adelante en el desarrollo de nanopartículas sólidas lipídicas para la liberación controlada de terapias destinadas al tratamiento de la leishmaniasis, reposicionando un fármaco aprobado, el delamanid, dentro de un enfoque de nanomedicina accesible.

1. A través de revisión de información y de estudios de acoplamiento molecular, se identificaron once moléculas con potencial para ser reposicionados como leishmanicidas. Los estudios *in vitro* con promastigotes mostraron a la prulifloxacin y el delamanid como las más promisorias.

2. Por su alta actividad leishmanicida y baja citotoxicidad, se seleccionó al delamanid para diseñar una formulación y un proceso que lo encapsule en nanopartículas sólido-lipídicas.

3. La eficiencia de encapsulación fue notablemente alta y el fármaco exhibió liberación prolongada *in vitro*. Los resultados mostraron una liberación exitosa de la carga útil dentro de los macrófagos, así como una penetración eficiente en la piel después de la aplicación tópica.

4. Los estudios *in cellulo* e *in vivo* demostraron que las SLNP encapsulando delamanid tienen mayor actividad leishmanicida, sobre amastigotes intracelulares, que el fármaco en solución.

5. El proceso de fabricación es sencillo, energéticamente eficiente, rentable y altamente reproducible, y permite obtener un sistema de entrega para fármacos con baja solubilidad acuosa para tratar leishmaniasis. Esta plataforma puede ser expandida para el tratamiento de enfermedades tropicales olvidadas, infecciones intracelulares, cáncer y otras enfermedades.

CONCLUSIONS

6. Conclusions

This doctoral thesis represents a step forward in the development of solid lipid nanoparticles for the controlled release of therapies aimed at treating leishmaniasis, repositioning an approved drug, delamanid, within an accessible nanomedicine approach.

1. Through information review and molecular docking studies, eleven molecules with the potential to be repositioned as leishmanicidal agents were identified. *In vitro* studies with promastigotes showed prulifloxacin and delamanid to be the most promising.

2. Due to their high leishmanicidal activity and low cytotoxicity, delamanid was selected to design a formulation and a process that encapsulates it in solid lipid nanoparticles.

3. The encapsulation efficiency was remarkably high, and the drug exhibited prolonged release *in vitro*. The results demonstrated successful payload release within macrophages, as well as efficient penetration into the skin after topical application. *In cellulo* and *in vivo* studies showed that SLNPs encapsulating delamanid have greater leishmanicidal activity against intracellular amastigotes than the drug in solution.

4. The manufacturing process is simple, energetically efficient, cost-effective, and highly reproducible, enabling the production of a drug delivery system for poorly water-soluble drugs to treat leishmaniasis. This platform can be expanded for the treatment of neglected tropical diseases, intracellular infections, cancer, and other illnesses.

PERSPECTIVAS

7. Perspectivas futuras del estudio

7.1. Incorporación de las SLNP con delamanid en Formas Farmacéuticas

La primera y más evidente perspectiva del presente estudio es la inclusión de las SLNP en vehículos para uso tópico: formas farmacéuticas clásicas como las emulsiones o/w o los hidrogeles. Por la naturaleza lipídica del nanosistema y el fármaco, éstos últimos serían la primera opción por probar. En paralelo se podrían ensayar sistemas no tradicionales como parches transdermales con microagujas que mejoran el cumplimiento terapéutico por parte del paciente al disminuir el número de aplicaciones.

Además de los sistemas no invasivos descritos, es mandatorio la aplicación de las nanopartículas por vía parenteral, no solo como referencia de otras vías en estudios *in vivo*, sino como apoyo durante tratamientos que requieran inicialmente altas concentraciones plasmáticas del fármaco, o que tengan contraindicada la vía tópica por la edad o condición del paciente.

En tercera línea estaría la aplicación de las SLNP desarrolladas por vías de administración alternativas. En este contexto, la administración pulmonar, mediante aerosoles, del delamanid encapsulado en las SLNP aquí desarrolladas tendría perspectivas más bien en el tratamiento de la tuberculosis.

Además, se considera que la vía de administración oral no debe ser dejada de lado: estudios comparativos de las SLNP con los comprimidos orales actualmente aprobados para tuberculosis, podrían sustentar el uso de estos nanotransportadores para, mejorando la biodisponibilidad del fármaco, disminuir su dosis.

Finalmente, cabe destacar el potencial de las SLNP que contienen nanopartículas de hierro para ser empleadas en la liberación bajo demanda del fármaco empleando hipertermia por inducción magnética: al llegar al punto de fusión de los lípidos la gran mayoría del fármaco quedaría libre en el medio. También podrían incluirse en su estructura nanovarillas (nanorods) de oro estimulables por luz láser con la misma finalidad.

7.2. Investigación de la diana molecular del delamanid

En el presente estudio se han postulado tres enzimas como posibles dianas farmacológicas del delamanid: ciclopropano ácido graso sintasas, Aurorquinasas y Tubulinas. Estas hipótesis deben ser confirmadas mediante estudios *in silico* (acoplamiento y dinámica molecular), *in vitro* (cinética enzimática, co-cristalización del ligando con la proteína y difracción de rayos x, estudios estructurales por microscopía confocal y electrónica, entre otras). Esta investigación básica permitirá identificar otros fármacos leishmanicidas, extrapolar su mecanismo de acción a otras enfermedades infecciosas y diseñar nuevas moléculas farmacológicamente activas

7.3. Identificación de sustancias estructuralmente similares a delamanid con potencial actividad leishmanicida

Sin obstar lo anterior, aun sin haberse validado la diana farmacológica, se pueden identificar moléculas estructuralmente similares al delamanid y realizar ensayos tanto en forma libre como encapsulada (en SLNP), con promastigotes y amastigotes.

Un ejemplo de lo anterior son los Benzimidazoles representados en la figura 35, junto con su Log P y solubilidad acuosa. Estos antihelmínticos, que comparten el grupo imidazol con el delamanid, tienen alta afinidad por la β -tubulina inhibiendo la polimerización de los microtúbulos en parásitos. Debido su lipofilicidad y baja solubilidad acuosa es mandatorio que se usen encapsuladas en SLNP como las aquí desarrolladas.

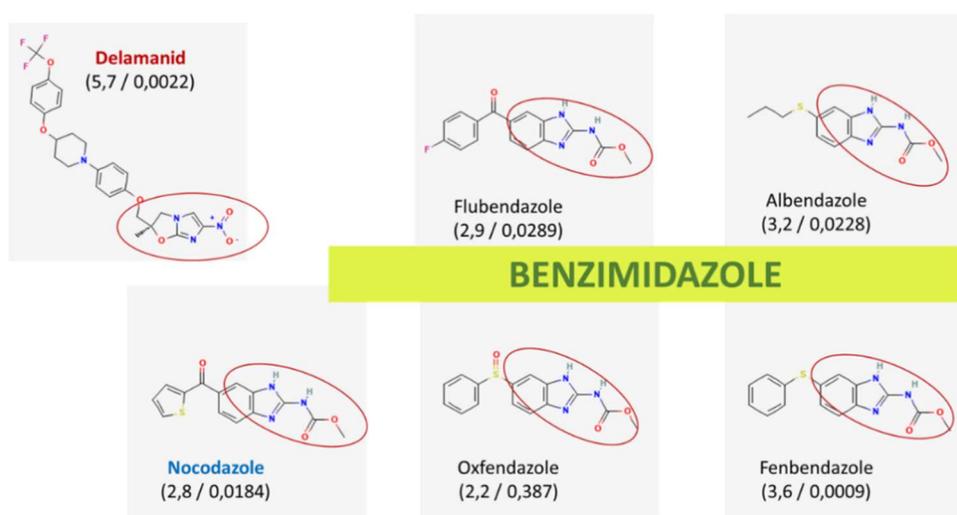


Figura 35. Benzimidazoles aprobados con grupos funcionales relacionados al delamanid.

Estas mismas sustancias y nanoestructuras pueden ser ensayadas en otras enfermedades tropicales olvidadas, e incluso cáncer. Se ha documentado la actividad antineoplásica de algunas de ellas, pero su uso no ha prosperado, probablemente por su baja biodisponibilidad.

7.4. Aplicación de las SLNP diseñadas a tratamientos combinados para leishmaniasis

Varios de los regímenes terapéuticos recomendados para la leishmaniasis son combinaciones de fármacos [18] [22], con la finalidad de potenciar efectos, disminuir períodos de administración o reducir el riesgo de resistencia. Las SLNP desarrolladas tienen el potencial de utilizarse como sistemas de entrega simultánea, no solo de delamanid con otro leishmanicida, sino de las combinaciones recomendadas de los fármacos actualmente aprobados.

Aparte de la anfotericina, de conocida lipofilia, otros agentes leishmanicidas actualmente aprobados son susceptibles de incorporarse en SLNP. Entre ellos se debe destacar la miltefosina, un fármaco anfílico, análogo a los fosfolípidos, con log P de 2,68 y solubilidad acuosa de 0,00022 mg/ml, características apropiadas para usos en nanotransportadores lipídicos y en estructuras micelares [133]. Llama la atención su estructura de tensoactivo (figura 36) y aún más, que presenta un grupo de amonio cuaternario que recuerda la del lípido catiónico usado en las SLNP.

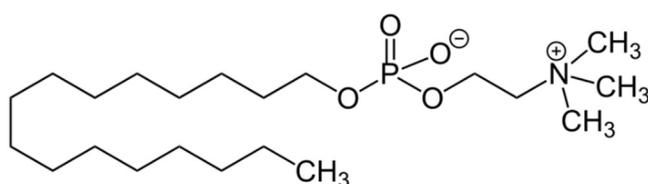


Figura 36. Estructura de la Miltefosina, leishmanicida análogo a los fosfolípidos.

7.5. Aplicación de las SLNP diseñadas a otras ETD

Entre las veinte enfermedades tropicales olvidadas, la Tripanosomiasis emerge como una candidata preeminente para aprovechar las nanopartículas desarrolladas en este estudio, especialmente debido a las notables similitudes en la biología de los

parásitos. Estas afinidades allanan el camino para formular la hipótesis de que estas nanopartículas podrían demostrar actividad prometedora tanto en la Tripanosomiasis africana como en la enfermedad de Chagas.

Diversas enfermedades tropicales olvidadas son ocasionadas por parásitos pluricelulares, tales como nemátodos, trematodos o tenias. Entre ellas se encuentran la Dracunculiasis, Equinococosis, Trematodiasis de transmisión alimentaria, Geohelminthiasis, Teniasis, Esquistosomiasis, Oncocercosis y Filariasis. Algunas de estas enfermedades pueden abordarse mediante benzoimidazoles para tratamiento o prevención. En este contexto, las SLNP utilizadas como sistema de entrega emergen como alternativas terapéuticas prometedoras, ofreciendo la posibilidad de tratamientos más eficaces.

La filariasis linfática (elefantiasis) puede ser de especial interés, la hipótesis a probar en este caso sería si el encapsular el albendazol en SLNP incrementa su efectividad en parásitos adultos. Sería muy interesante también, ensayar estas mismas SLNP frente a *Echinococcus* que en la actualidad a veces solo se pueden eliminar con cirugía [17].

7.6. Aplicación de las SLNP diseñadas a otros antibióticos

En el ámbito de los antimicrobianos, el mismo delamanid abre todo un capítulo, pues es reconocido su estrecho espectro de acción, aquí la hipótesis sería si su incorporación en SLNP amplía su ámbito de aplicación a otras Mycobacterias, *Mycobacterium ulcerans* y *Mycobacterium leprae*, por ejemplo, causantes de otras enfermedades tropicales olvidadas), y por supuesto a otras bacterias patógenas para las cuales hoy urgen nuevas alternativas de tratamiento.

Por demás está señalar que el mismo sistema de entrega podría ser utilizado con muchos otros antibióticos que han caído en desuso por su falta de efectividad. Los mecanismos de resistencia relacionados con el ingreso del antibiótico a la bacteria podrían ser evadidos o superados por la internalización que las SLNP consiguen; varios estudios han evaluado las aplicaciones de la nanotecnología en la lucha contra la resistencia antimicrobiana [134].

REFERENCIAS

Referencias

1. González, C.; Wang, O.; Strutz, S.E.; González-Salazar, C.; Sánchez-Cordero, V.; Sarkar, S. Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4*, doi:10.1371/journal.pntd.0000585.
2. Wijerathna, T.; Gunathilaka, N. Time Series Analysis of Leishmaniasis Incidence in Sri Lanka: Evidence for Humidity-Associated Fluctuations. *Int J Biometeorol* **2023**, *67*, 275–284, doi:10.1007/s00484-022-02404-0.
3. Organización Mundial de la Salud *Ending the Neglect to Attain the Sustainable Development Goals: A Road Map for Neglected Tropical Diseases 2021-2030*; **2021**; <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>.
4. Ainsworth, C. Tropical Diseases Move North Available online: https://www.nature.com/articles/d41586-023-03476-7?utm_source=nature&utm_medium=collections-page (accessed on 30 November 2023), <https://doi.org/10.1038/d41586-023-03476-7>.
5. Lenk, E.J.; Redekop, W.K.; Luyendijk, M.; Rijnsburger, A.J.; Severens, J.L. Productivity Loss Related to Neglected Tropical Diseases Eligible for Preventive Chemotherapy: A Systematic Literature Review. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10*, doi:10.1371/journal.pntd.0004397.
6. Makin, S. Mental Health: The Invisible Effects of Neglected Tropical Diseases Available online: <https://www.nature.com/articles/d41586-023-02973-z> (accessed on 30 November 2023), <https://doi.org/10.1038/d41586-023-02973-z>.
7. Organización Panamericana de la Salud *Leishmaniasis. Informe Epidemiológico de Las Américas*; **2022**; https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56833/OPASCDEVT220021_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
8. Lang, X.; Liu, J.; Zhang, G.; Feng, X.; Dan, W. Knowledge Mapping of Drug Repositioning's Theme and Development. *Drug Des Devel Ther* **2023**, *17*, 1157–1174, doi:10.2147/DDDT.S405906.
9. GNS, H.S.; GR, S.; Murahari, M.; Krishnamurthy, M. An Update on Drug Repurposing: Re-Written Saga of the Drug's Fate. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2019**, *110*, 700–716, doi:10.1016/j.biopha.2018.11.127.
10. Volpedo, G.; Costa, L.; Ryan, N.; Halsey, G.; Satoskar, A.; Oghumu, S. Nanoparticulate Drug Delivery Systems for the Treatment of Neglected Tropical Protozoan Diseases. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* **2019**, *25*, doi:10.1590/1678-9199-jvatitd-1441-18.
11. Lim, S.; Park, J.; Shim, M.K.; Um, W.; Yoon, H.Y.; Ryu, J.H.; Lim, D.K.; Kim, K. Recent Advances and Challenges of Repurposing Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems to

- Enhance Cancer Immunotherapy. *Theranostics* **2019**, *9*, 7906–7923, doi:10.7150/thno.38425.
12. Sims, K.R.; MacEren, J.P.; Strand, A.I.; He, B.; Overby, C.; Benoit, D.S.W. Rigor and Reproducibility in Polymer Nanoparticle Synthesis and Characterization. *RSC Adv* **2020**, *10*, 2513–2518, doi:10.1039/c9ra10091a.
 13. Abualfaraa, W.; Salonitis, K.; Al-Ashaab, A.; Ala'raj, M. Lean-Green Manufacturing Practices and Their Link with Sustainability: A Critical Review. *Sustainability (Switzerland)* **2020**, *12*, doi:10.3390/su12030981.
 14. Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 301–312, doi:10.1039/b918763b.
 15. Duan, H.; Wang, D.; Li, Y. Green Chemistry for Nanoparticle Synthesis. *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 5778–5792, doi:10.1039/c4cs00363b.
 16. Singh, H.; Desimone, M.F.; Pandya, S.; Jasani, S.; George, N.; Adnan, M.; Aldarhami, A.; Bazaid, A.S.; Alderhami, S.A. Revisiting the Green Synthesis of Nanoparticles: Uncovering Influences of Plant Extracts as Reducing Agents for Enhanced Synthesis Efficiency and Its Biomedical Applications. *Int J Nanomedicine* **2023**, *18*, 4727–4750, doi:10.2147/IJN.S419369.
 17. World Health Organization Neglected Tropical Diseases Available online: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1 (accessed on 15 November 2023).
 18. Burza, S.; Croft, S.L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *The Lancet* **2018**, *392*, 951–970, doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
 19. Tunalı, V.; Özbilgin, A. Knock, Knock, Knocking on Europe's Door: Threat of Leishmaniasis in Europe with a Focus on Turkey. *Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases* **2023**, *4*, doi:10.1016/j.crpvbd.2023.100150.
 20. Cecílio, P.; Cordeiro-da-Silva, A.; Oliveira, F. Sand Flies: Basic Information on the Vectors of Leishmaniasis and Their Interactions with Leishmania Parasites. *Commun Biol* **2022**, *5*, doi:10.1038/s42003-022-03240-z.
 21. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. *Control de Las Leishmaniasis : Informe de una reunión del comité de expertos de la OMS sobre el control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de Marzo de 2010.*; Organización Mundial de la Salud: Ginebra, 2012; https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf?sequence=1.
 22. Organización Panamericana de la Salud *Manual de Procedimientos Para La Vigilancia y El Control de Las Leishmaniasis En La Región de Las Américas*; Washington, D.C., 2023; <https://doi.org/10.37774/9789275327340>.
 23. World Health Organization *Operational Manual on Leishmaniasis Vector Control, Surveillance and Monitoring and Evaluation*; Geneva, 2022; ISBN 978-92-4-006034-0, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060340>.

24. MSP *Enfermedades Transmitidas Por Vectores-Ecuador-SE-52-2022*; 2022; <https://www.salud.gob.ec/gacetatas-vectoriales-2022/>.
25. eBioMedicine Leishmania: An Urgent Need for New Treatments. *EBioMedicine* **2023**, *87*, doi:10.1016/j.ebiom.2023.104440.
26. Drugs and Supplements (Mayo Clinic) Available online: <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/> (accessed on 4 December 2023).
27. Field, M.C.; Horn, D.; Fairlamb, A.H.; Ferguson, M.A.J.; Gray, D.W.; Read, K.D.; De Rycker, M.; Torrie, L.S.; Wyatt, P.G.; Wyllie, S.; et al. Anti-Trypanosomatid Drug Discovery: An Ongoing Challenge and a Continuing Need. *Nat Rev Microbiol* **2017**, *15*, 217–231, doi:10.1038/nrmicro.2016.193.
28. Hua, Y.; Dai, X.; Xu, Y.; Xing, G.; Liu, H.; Lu, T.; Chen, Y.; Zhang, Y. Drug Repositioning: Progress and Challenges in Drug Discovery for Various Diseases. *Eur J Med Chem* **2022**, *234*, doi:10.1016/j.ejmech.2022.114239.
29. Cha, Y.; Erez, T.; Reynolds, I.J.; Kumar, D.; Ross, J.; Koytiger, G.; Kusko, R.; Zeskind, B.; Risso, S.; Kagan, E.; et al. Drug Repurposing from the Perspective of Pharmaceutical Companies. *Br J Pharmacol* **2018**, *175*, 168–180, doi:10.1111/bph.v175.2/issuetoc.
30. Ashburn, T.T.; Thor, K.B. Drug Repositioning: Identifying and Developing New Uses for Existing Drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 673–683, doi:10.1038/nrd1468.
31. Jourdan, J.P.; Bureau, R.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Drug Repositioning: A Brief Overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2020**, *72*, 1145–1151, doi:10.1111/jphp.13273.
32. Andrews, K.T.; Fisher, G.; Skinner-Adams, T.S. Drug Repurposing and Human Parasitic Protozoan Diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2014**, *4*, 95–111, doi:10.1016/j.ijpddr.2014.02.002.
33. Dichiara, M.; Marrazzo, A.; Prezzavento, O.; Collina, S.; Rescifina, A.; Amata, E. Repurposing of Human Kinase Inhibitors in Neglected Protozoan Diseases. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 1235–1253, doi: 10.1002/cmdc.201700259.
34. Jain, S.; Sahu, U.; Kumar, A.; Khare, P. Metabolic Pathways of Leishmania Parasite: Source of Pertinent Drug Targets and Potent Drug Candidates. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi: 10.3390/pharmaceutics14081590.
35. Fairlamb, A.H.; Wyllie, S. The Critical Role of Mode of Action Studies in Kinetoplastid Drug Discovery. *Frontiers in Drug Discovery* **2023**, *3*, doi:10.3389/fddsv.2023.1185679.
36. Sun, M.; Sen Gupta, A. Vascular Nanomedicine: Current Status, Opportunities, and Challenges. *Semin Thromb Hemost* **2020**, *46*, 524–544, doi:10.1055/s-0039-1692395.
37. Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* **2020**, *25*, doi: 10.3390/molecules25010112.
38. Mazari, S.A.; Ali, E.; Abro, R.; Khan, F.S.A.; Ahmed, I.; Ahmed, M.; Nizamuddin, S.; Siddiqui, T.H.; Hossain, N.; Mubarak, N.M.; et al. Nanomaterials: Applications, Waste-

- Handling, Environmental Toxicities, and Future Challenges - A Review. *J Environ Chem Eng* **2021**, *9*, doi:10.1016/j.jece.2021.105028.
39. Paliwal, R.; Babu, R.J.; Palakurthi, S. Nanomedicine Scale-up Technologies: Feasibilities and Challenges. *Ageing Int* **2014**, *15*, 1527–1534, doi:10.1208/s12249-014-0177-9.
 40. Chamundeeswari, M.; Jeslin, J.; Verma, M.L. Nanocarriers for Drug Delivery Applications. *Environ Chem Lett* **2019**, *17*, 849–865, doi:10.1007/s10311-018-00841-1.
 41. Rathinavel, S.; Priyadharshini, K.; Panda, D. A Review on Carbon Nanotube: An Overview of Synthesis, Properties, Functionalization, Characterization, and the Application. *Materials Science and Engineering: B* **2021**, *268*, doi:10.1016/j.mseb.2021.115095.
 42. Cerqueira, M.; Belmonte-Reche, E.; Gallo, J.; Baltazar, F.; Bañobre-López, M. Magnetic Solid Nanoparticles and Their Counterparts: Recent Advances towards Cancer Theranostics. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14030506.
 43. Badilli, U.; Mollarasouli, F.; Bakirhan, N.K.; Ozkan, Y.; Ozkan, S.A. Role of Quantum Dots in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, and Its Application in Drug Delivery. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2020**, *131*, doi:10.1016/j.trac.2020.116013.
 44. Narayan, R.; Nayak, U.Y.; Raichur, A.M.; Garg, S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, doi:10.3390/pharmaceutics10030118.
 45. Janjua, T.I.; Cao, Y.; Kleitz, F.; Linden, M.; Yu, C.; Papat, A. Silica Nanoparticles: A Review of Their Safety and Current Strategies to Overcome Biological Barriers. *Adv Drug Deliv Rev* **2023**, 115115, doi:10.1016/j.addr.2023.115115.
 46. Jarvis, M.; Krishnan, V.; Mitragotri, S. Nanocrystals: A Perspective on Translational Research and Clinical Studies. *Bioeng Transl Med* **2019**, *4*, 5–16, doi:10.1002/btm2.10122.
 47. Souto, E.B.; Fernandes, A.R.; Martins-Gomes, C.; Coutinho, T.E.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, S.B.; Silva, A.M.; Santini, A. Nanomaterials for Skin Delivery of Cosmeceuticals and Pharmaceuticals. *Applied Sciences (Switzerland)* **2020**, *10*, doi:10.3390/app10051594.
 48. Sandoval-Yañez, C.; Rodriguez, C.C. Dendrimers: Amazing Platforms for Bioactive Molecule Delivery Systems. *Materials* **2020**, *13*, doi:10.3390/ma13030570.
 49. Asadullah Khan, M.; Peng, R.; Liu, C.L.; Chen, Z. Synthesis, Dynamics and Applications (Cytotoxicity and Biocompatibility) of Dendrimers: A Mini-Review. *Eur Polym J* **2022**, *181*, doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111708.
 50. Patel, P.; Patel, V.; Patel, P.M. Synthetic Strategy of Dendrimers: A Review. *Journal of the Indian Chemical Society* **2022**, *99*, doi:10.1016/j.jics.2022.100514.
 51. Jain, A.; Bhattacharya, S. Recent Advances in Nanomedicine Preparative Methods and Their Therapeutic Potential for Colorectal Cancer: A Critical Review. *Front Oncol* **2023**, *13*, doi:10.3389/fonc.2023.1211603.

52. Ghezzi, M.; Pescina, S.; Padula, C.; Santi, P.; Del Favero, E.; Cantù, L.; Nicoli, S. Polymeric Micelles in Drug Delivery: An Insight of the Techniques for Their Characterization and Assessment in Biorelevant Conditions. *Journal of Controlled Release* **2021**, *332*, 312–336, doi:10.1016/j.jconrel.2021.02.031.
53. National Library of Medicine ClinicalTrials.Gov Available online: <https://clinicaltrials.gov/search?term=liposomes> (accessed on 5 December 2023).
54. Nsairat, H.; Khater, D.; Sayed, U.; Odeh, F.; Al Bawab, A.; Alshaer, W. Liposomes: Structure, Composition, Types, and Clinical Applications. *Heliyon* **2022**, *8*, doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
55. Liu, P.; Chen, G.; Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27041372.
56. Andra, V.V.S.N.L.; Pammi, S.V.N.; Bhatraju, L.V.K.P.; Ruddaraju, L.K. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *Bionanoscience* **2022**, *12*, 274–291, doi:10.1007/s12668-022-00941-x.
57. Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Res Lett* **2013**, *8*, doi:10.1186/1556-276X-8-102.
58. Bhardwaj, P.; Tripathi, P.; Gupta, R.; Pandey, S. Niosomes: A Review on Niosomal Research in the Last Decade. *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *56*, doi:10.1016/j.jddst.2020.101581.
59. Ag Seleci, D.; Seleci, M.; Walter, J.G.; Stahl, F.; Scheper, T. Niosomes as Nanoparticulate Drug Carriers: Fundamentals and Recent Applications. *J Nanomater* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/7372306.
60. Karim, K.; Mandal, A.; Biswas, N.; Guha, A.; Chatterjee, S.; Behera, M.; Kuotsu, K. Niosome: A Future of Targeted Drug Delivery Systems. *J Adv Pharm Technol Res* **2010**, *1*, 374–380, doi:10.4103/0110-5558.76435.
61. Naseema, A.; Kovooru, L.; Behera, A.K.; Kumar, K.P.P.; Srivastava, P. A Critical Review of Synthesis Procedures, Applications and Future Potential of Nanoemulsions. *Adv Colloid Interface Sci* **2021**, *287*, doi:10.1016/j.cis.2020.102318.
62. Dinshaw, I.J.; Ahmad, N.; Salim, N.; Leo, B.F. Nanoemulsions: A Review on the Conceptualization of Treatment for Psoriasis Using a ‘Green’ Surfactant with Low-Energy Emulsification Method. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13071024.
63. Wilson, R.J.; Li, Y.; Yang, G.; Zhao, C.X. Nanoemulsions for Drug Delivery. *Particuology* **2022**, *64*, 85–97, doi:10.1016/j.partic.2021.05.009.
64. Elmowafy, M.; Al-Sanea, M.M. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Drug Delivery Platform: Advances in Formulation and Delivery Strategies. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2021**, *29*, 999–1012, doi:10.1016/j.jsps.2021.07.015.

65. Viegas, C.; Patrício, A.B.; Prata, J.M.; Nadhman, A.; Chintamaneni, P.K.; Fonte, P. Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: A Comparative Review. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, doi:10.3390/pharmaceutics15061593.
66. Haider, M.; Abdin, S.M.; Kamal, L.; Orive, G. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, doi:10.3390/pharmaceutics12030288.
67. Nguyen, V.H.; Thuy, V.N.; Van, T.V.; Dao, A.H.; Lee, B.J. Nanostructured Lipid Carriers and Their Potential Applications for Versatile Drug Delivery via Oral Administration. *OpenNano* **2022**, *8*, doi:10.1016/j.onano.2022.100064.
68. Assefi, M.; Ataeinaeini, M.; Nazari, A.; Gholipour, A.; Vertiz-Osores, J.J.; Melody Calla-Vásquez, K.; Zuhair Talib Al-Naqeeb, B.; Hussein Jassim, K.; Kalajahi, H.G.; Yasamineh, S.; et al. A State-of-the-Art Review on Solid Lipid Nanoparticles as a Nanovaccines Delivery System. *J Drug Deliv Sci Technol* **2023**, *86*, doi:10.1016/j.jddst.2023.104623.
69. Punu, G.F.; Harahap, Y.; Anjani, Q.K.; Hartrianti, P.; Donnelly, R.F.; Ramadon, D. Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Formulation and Fabrication. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)* **2023**, *10*, 55–66, <https://doi.org/10.7454/psr.v10i2.1313>
70. Khairnar, S. V.; Pagare, P.; Thakre, A.; Nambiar, A.R.; Junnuthula, V.; Abraham, M.C.; Kolimi, P.; Nyavanandi, D.; Dyawanapelly, S. Review on the Scale-Up Methods for the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14091886.
71. Xu, L.; Wang, X.; Liu, Y.; Yang, G.; Falconer, R.J.; Zhao, C.-X. Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *Adv Nanobiomed Res* **2022**, *2*, doi:10.1002/anbr.202100109.
72. Stefanov, S.; Gugleva, V.; Andonova, V. Technological Strategies for the Preparation of Lipid Nanoparticles: An Updated Review. *Pharmacia* **2023**, *70*, 449–463, doi:10.3897/PHARMACIA.70.E108119.
73. Duan, Y.; Dhar, A.; Patel, C.; Khimani, M.; Neogi, S.; Sharma, P.; Siva Kumar, N.; Vekariya, R.L. A Brief Review on Solid Lipid Nanoparticles: Part and Parcel of Contemporary Drug Delivery Systems. *RSC Adv* **2020**, *10*, 26777–26791, doi:10.1039/d0ra03491f.
74. Wadekar, A.B.; Manwar, J. V; Bakal, R.L.; Kumbhar, D.D. Mechanisms and Pharmaceutical Application of Solid Lipid Nanoparticles as Efficient Drug Delivery System. *Systematic Review Pharmacy* **2022**, *13*, doi:10.31858/0975-8453.13.12.862-869.
75. Nadig, S.N.; Dixit, S.K.; Levey, N.; Esckilsen, S.; Miller, K.; Dennis, W.; Atkinson, C.; Broome, A.M. Immunosuppressive Nano-Therapeutic Micelles Downregulate Endothelial Cell Inflammation and Immunogenicity. *RSC Adv* **2015**, *5*, 43552–43562, doi:10.1039/c5ra04057d.
76. Wilson, B.; Geetha, K.M. Lipid Nanoparticles in the Development of mRNA Vaccines for COVID-19. *J Drug Deliv Sci Technol* **2022**, *74*, doi:10.1016/j.jddst.2022.103553.
77. Ojeda, E.; Puras, G.; Agirre, M.; Zarate, J.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Digiacoimo, L.; Caracciolo, G.; Pedraz, J.L. The Role of Helper Lipids in the Intracellular Disposition and

- Transfection Efficiency of Niosome Formulations for Gene Delivery to Retinal Pigment Epithelial Cells. *Int J Pharm* **2016**, *503*, 115–126, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.02.043.
78. Smail, S.S.; Ghareeb, M.M.; Omer, H.K.; Al-Kinani, A.A.; Alany, R.G. Studies on Surfactants, Cosurfactants, and Oils for Prospective Use in Formulation of Ketorolac Tromethamine Ophthalmic Nanoemulsions. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13040467.
 79. Lourenco, C.; Teixeira, M.; Simoes, S.; Gaspar, R. Steric Stabilization of Nanoparticles: Size and Surface Properties. *Int J Pharm* **1996**, *138*, 1–12, doi:10.1016/0378-5173(96)04486-9.
 80. Gagliardi, A.; Giuliano, E.; Venkateswararao, E.; Fresta, M.; Bulotta, S.; Awasthi, V.; Cosco, D. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Front Pharmacol* **2021**, *12*, doi:10.3389/fphar.2021.601626.
 81. Vogelaar, A.; Marcotte, S.; Cheng, J.; Oluoch, B.; Zaro, J. Use of Microfluidics to Prepare Lipid-Based Nanocarriers. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, doi:10.3390/pharmaceutics15041053.
 82. Hsieh, M.H.; Wei, H.J.; Chen, K.H.; Wang, H.C.; Yu, C.H.; Lu, T.H.; Chang, Y.; Sung, H.W. A Fast and Facile Platform for Fabricating Phase-Change Materials-Based Drug Carriers Powered by Chemical Marangoni Effect. *Biomaterials* **2021**, *271*, doi:10.1016/j.biomaterials.2021.120748.
 83. Alshawwa, S.Z.; Kassem, A.A.; Farid, R.M.; Mostafa, S.K.; Labib, G.S. Nanocarrier Drug Delivery Systems: Characterization, Limitations, Future Perspectives and Implementation of Artificial Intelligence. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14040883.
 84. Akhlesh K., J.; Thareja, S. In Vitro and in Vivo Characterization of Pharmaceutical Nanocarriers Used for Drug Delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2019**, *47*, 524–539, doi:10.1080/21691401.2018.1561457.
 85. Bellotti, R.; Picotto, G.B.; Ribotta, L. AFM Measurements and Tip Characterization of Nanoparticles with Different Shapes. *Nanomanufacturing and Metrology* **2022**, *5*, 127–138, doi:10.1007/s41871-022-00125-x.
 86. Tang, J.; Srinivasan, S.; Yuan, W.; Ming, R.; Liu, Y.; Dai, Z.; Noble, C.O.; Hayes, M.E.; Zheng, N.; Jiang, W.; et al. Development of a Flow-through USP 4 Apparatus Drug Release Assay for the Evaluation of Amphotericin B Liposome. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2019**, *134*, 107–116, doi:10.1016/j.ejpb.2018.11.010.
 87. Jacho, D.; Méndez, M.A.; Santamaría-Aguirre, J. Métodos Computacionales Para El Diseño de Fluoroquinolonas Con Alta Afinidad Por Topoisomerasa II de Leishmania., Universidad Central del Ecuador: Quito, 2021, <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22844>
 88. Uzcanga, G.; Lara, E.; Gutiérrez, F.; Beaty, D.; Beske, T.; Teran, R.; Navarro, J.C.; Pasero, P.; Benítez, W.; Poveda, A. Nuclear DNA Replication and Repair in Parasites of the Genus *Leishmania*: Exploiting Differences to Develop Innovative Therapeutic

- Approaches. *Crit Rev Microbiol* 2017, 43, 156–177, doi: 10.1080/1040841X.2016.1188758.
89. Espíndola, L. Validación de La ADN Opoisomerasa Tipo II Como Diana Terapéutica En El Tratamiento de Leishmaniasis, Universidad San Francisco de Quito: Quito, 2019, <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/8284>
 90. Matera, M.G. Pharmacologic Characteristics of Prulifloxacin. *Pulm Pharmacol Ther* **2006**, 19, 20–29, doi:10.1016/j.pupt.2005.09.009.
 91. Chu, D.T.W.; Fernandes, P.B. Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **1989**, 131–135, doi: 10.1128/AAC.33.2.131
 92. Higgins, P.G.; Fluit, A.C.; Schmitz, F.-J. Fluoroquinolones: Structure and Target Sites. *Curr Drug Targets* **2003**, 4, 181–190, doi: 10.2174/1389450033346920.
 93. Esteves, L. Efecto de las fluoroquinolonas sobre Topoisomerasas Tipo II en Trypanosomatidae, Universidad Central del Ecuador: Quito, 2018. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15413>
 94. Albarracín, J. Efecto de la enrofloxacin en la movilidad de los promastigotes de Leishmania mexicana, Universidad Central del Ecuador: Quito, 2020. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22719>
 95. Loachamin, G. Comparación de la actividad leishmanicida de los transferosomas de enrofloxacin frente a enrofloxacin en solución usando promastigotes de L. Mexicana como modelo biológico, Universidad Central del Ecuador: Quito, 2018. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15665>
 96. Khoshnood, S.; Taki, E.; Sadeghifard, N.; Kaviar, V.H.; Haddadi, M.H.; Farshadzadeh, Z.; Kouhsari, E.; Goudarzi, M.; Heidary, M. Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Front Microbiol* **2021**, 12, doi:10.3389/fmicb.2021.717045.
 97. Patterson, S.; Wyllie, S.; Norval, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F.R.; Auer, J.L.; Osuna-Cabello, M.; Read, K.D.; Fairlamb, A.H. The Anti-Tubercular Drug Delamanid as a Potential Oral Treatment for Visceral Leishmaniasis. *Elife* **2016**, 24, doi:10.7554/eLife.09744.001.
 98. Ozaki, M.; Matsuda, M.; Tomii, Y.; Kimura, K.; Segawa, J.; Kitano, M.; Kise, M.; Shibata, K.; Otsuki, M.; Nishino, T. In Vivo Evaluation of NM441, a New Thiazeto-Quinoline Derivative. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**, 35, 2496–2499, doi: 10.1128/AAC.35.12.2496.
 99. Giannarini, G.; Tascini, C.; Selli, C. Prulifloxacin: Clinical Studies of a Broad-Spectrum Quinolone Agent. *Future Microbiol* **2009**, 4, 13–24, doi:10.2217/17460913.4.1.13.
 100. Tellone, V.; Coppola, P.; Ammendola, M.; Di Loreto, G.; Picollo, R.; Del Vecchio, A.; Comandini, A.; Garofolo, F.; Tongiani, S. New Insights on the Pharmacokinetics of Ulifloxacin After Administration of Prulifloxacin in Patients with Mild, Moderate and Severe Renal Impairment. *Drugs in R and D* **2018**, 18, 237–245, doi:10.1007/s40268-018-0245-9.

101. Keam, S.J.; Perry, C.M. Prulifloxacin. *Drugs* **2004**, *64*, 2221–2234, doi: 10.2165/00003495-200464190-00005.
102. She, P.; Li, S.; Liu, Y.; Xu, L.; Zhou, L.; Zeng, X.; Li, Y.; Liu, S.; Li, Z.; Hussain, Z.; et al. Repurposing Sitafloxacin, Prulifloxacin, Tosufloxacin, and Sisomicin as Antimicrobials Against Biofilm and Persister Cells of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Curr Microbiol* **2022**, *79*, doi:10.1007/s00284-021-02729-w.
103. Blasi, F.; Aliberti, S.; Tarsia, P.; Santus, P.; Centanni, S.; Allegra, L. Prulifloxacin: A Brief Review of Its Potential in the Treatment of Acute Exacerbation of Chronic Bronchitis. *International Journal of COPD* **2007**, *2007*, 27–31, doi: 10.2147/copd.2007.2.1.27.
104. Prats, G.; Rossi, V.; Salvatori, E.; Mirelis, B. Prulifloxacin: A New Antibacterial Fluoroquinolone. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2006**, *4*, 27–41, doi: 10.1586/14787210.4.1.27.
105. Shi, Z.; Zhang, J.; Tian, L.; Xin, L.; Liang, C.; Ren, X.; Li, M. A Comprehensive Overview of the Antibiotics Approved in the Last Two Decades: Retrospects and Prospects. *Molecules* **2023**, *28*, doi:10.3390/molecules28041762.
106. Saha, S.; Chowdhury, S.R.; Majumder, H.K. Dna Topoisomerases of Kinetoplastid Parasites: Brief Overview and Recent Perspectives. *Curr Issues Mol Biol* **2019**, *31*, 45–62, doi:10.21775/CIMB.031.045.
107. Das, B.B.; Sengupta, T.; Ganguly, A.; Majumder, H.K. Topoisomerases of Kinetoplastid Parasites: Why so Fascinating? *Mol Microbiol* **2006**, *62*, 917–927, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05428.x.
108. Uzcanga, G.; Lara, E.; Gutiérrez, F.; Beaty, D.; Beske, T.; Teran, R.; Navarro, J.C.; Pasero, P.; Benítez, W.; Poveda, A. Nuclear DNA Replication and Repair in Parasites of the Genus *Leishmania*: Exploiting Differences to Develop Innovative Therapeutic Approaches. *Crit Rev Microbiol* **2017**, *43*, 156–177, doi:10.1080/1040841X.2016.1188758.
109. Nenortas, E.; Burri, C.; Shapiro, T.A. Antitrypanosomal Activity of Fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43*, 2066–2068, doi: 10.1128/AAC.43.8.2066.
110. Romero, I.C.; Saravia, N.G.; Walker, J. Selective Action of Fluoroquinolones against Intracellular Amastigotes of *Leishmania*. *J Parasitol* **2005**, *91*, 1474–1479.
111. Bianciardi, P.; Fasanella, A.; Manzillo, V.F.; Trotta, T.; Pagano, A.; Sorino, S.; Gradoni, L.; Oliva, G. The Efficacy of Enrofloxacin, Alone or Combined with Metronidazole, in the Therapy of Canine Leishmaniasis. *Parasitol Res* **2004**, *93*, 486–492, doi:10.1007/s00436-004-1170-0.
112. Marrakchi, H.; Lanéelle, M.A.; Daffé, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem Biol* **2014**, *21*, 67–85, doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.011.
113. Fish, W.R.; Holz, G.G.; Beach, D.H.; Owen, E.; Anekwe, G.E. The Cyclopropane Fatty Acid of Trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **1981**, *3*, 103–115, doi:10.1016/0166-6851(81)90010-4.
114. Fernandez-Prada, C.; Vincent, I.M.; Brotherton, M.C.; Roberts, M.; Roy, G.; Rivas, L.; Leprohon, P.; Smith, T.K.; Ouellette, M. Different Mutations in a P-Type ATPase

- Transporter in Leishmania Parasites Are Associated with Cross-Resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10*, doi:10.1371/journal.pntd.0005171.
115. Oyola, S.O.; Evans, K.J.; Smith, T.K.; Smith, B.A.; Hilley, J.D.; Mottram, J.C.; Kaye, P.M.; Smith, D.F. Functional Analysis of Leishmania Cyclopropane Fatty Acid Synthetase. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0051300.
 116. Leroux, M.; Luquain-Costaz, C.; Lawton, P.; Azzouz-Maache, S.; Delton, I. Fatty Acid Composition and Metabolism in Leishmania Parasite Species: Potential Biomarkers or Drug Targets for Leishmaniasis? *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24054702.
 117. Cronan, J.E.; Luk, T. Advances in the Structural Biology, Mechanism, and Physiology of Cyclopropane Fatty Acid Modifications of Bacterial Membranes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2022**, *86*, doi:10.1128/membr.00013-22.
 118. Guianvarc'h, D.; Guangqi E; Drujon, T.; Rey, C.; Wang, Q.; Ploux, O. Identification of Inhibitors of the E. Coli Cyclopropane Fatty Acid Synthase from the Screening of a Chemical Library: In Vitro and in Vivo Studies. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **2008**, *1784*, 1652–1658, doi:10.1016/j.bbapap.2008.04.019.
 119. Poger, D.; Mark, A.E. A Ring to Rule Them All: The Effect of Cyclopropane Fatty Acids on the Fluidity of Lipid Bilayers. *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 5487–5495, doi:10.1021/acs.jpcc.5b00958.
 120. Xu, W.; Mukherjee, S.; Ning, Y.; Hsu, F.F.; Zhang, K. Cyclopropane Fatty Acid Synthesis Affects Cell Shape and Acid Resistance in Leishmania Mexicana. *Int J Parasitol* **2018**, *48*, 245–256, doi:10.1016/j.ijpara.2017.09.006.
 121. Efsthathiou, A.; Smirlis, D. Leishmania Protein Kinases: Important Regulators of the Parasite Life Cycle and Molecular Targets for Treating Leishmaniasis. *Microorganisms* **2021**, *9*, doi:10.3390/microorganisms9040691.
 122. Chhajer, R.; Bhattacharyya, A.; Didwania, N.; Shadab, M.; Das, N.; Palit, P.; Vaidya, T.; Ali, N. Leishmania Donovanii Aurora Kinase: A Promising Therapeutic Target against Visceral Leishmaniasis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2016**, *1860*, 1973–1988, doi:10.1016/j.bbagen.2016.06.005.
 123. Beswick, R.W.; Ambrose, H.E.; Wagner, S.D. Nocodazole, a Microtubule Depolymerising Agent, Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells Associated with Changes in Bcl-2 Phosphorylation and Expression. *Leuk Res* **2006**, *30*, 427–436, doi:10.1016/j.leukres.2005.08.009.
 124. Sinclair, A.N.; Huynh, C.T.; Sladewski, T.E.; Zuromski, J.L.; Ruiz, A.E.; de Graffenried, C.L. The Trypanosoma Brucei Subpellicular Microtubule Array Is Organized into Functionally Discrete Subdomains Defined by Microtubule Associated Proteins. *PLoS Pathog* **2021**, *17*, doi:10.1371/journal.ppat.1009588.
 125. Laisne, M.C.; Michallet, S.; Lafanechère, L. Characterization of Microtubule Destabilizing Drugs: A Quantitative Cell-based Assay That Bridges the Gap between Tubulin Based- and Cytotoxicity Assays. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13205226.

126. de Aquino, G.P.; Gomes, M.A.M.; Salinas, R.K.; Laranjeira-Silva, M.F. Lipid and Fatty Acid Metabolism in Trypanosomatids. *Microbial Cell* **2021**, *8*, 262–275, doi:10.15698/mic2021.11.764.
127. Dhiman, N.; Awasthi, R.; Sharma, B.; Kharkwal, H.; Kulkarni, G.T. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. *Front Chem* **2021**, *9*, doi:10.3389/fchem.2021.580118.
128. Ghasemiyeh, P.; Mohammadi-Samani, S. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Novel Drug Delivery Systems: Applications, Advantages and Disadvantages. *Res Pharm Sci* **2018**, *13*, 288–303, doi:10.4103/1735-5362.235156.
129. Santonocito, D.; Puglia, C. Applications of Lipid-Based Nanocarriers for Parenteral Drug Delivery. *Curr Med Chem* **2022**, *29*, 4152–4169, doi:10.2174/0929867329666220104111949.
130. Gulumian, M.; Andraos, C.; Afantitis, A.; Puzyn, T.; Coville, N.J. Importance of Surface Topography in Both Biological Activity and Catalysis of Nanomaterials: Can Catalysis by Design Guide Safe by Design? *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22158347.
131. Baranov, M. V.; Kumar, M.; Sacanna, S.; Thutupalli, S.; van den Bogaart, G. Modulation of Immune Responses by Particle Size and Shape. *Front Immunol* **2021**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.607945.
132. Talevi, G.; Pannone, L.; Monaco, C.; Bori, E.; Cappello, I.A.; Candelari, M.; Wyns, M.; Ramak, R.; La Meir, M.; Gharaviri, A.; et al. Evaluation of Photogrammetry for Medical Application in Cardiology. *Front Bioeng Biotechnol* **2023**, *11*, doi:10.3389/fbioe.2023.1044647.
133. Feitosa, V.A.; de Almeida, V.C.; Malheiros, B.; de Castro, R.D.; Barbosa, L.R.S.; Cerize, N.N.P.; Rangel-Yagui, C. de O. Polymeric Micelles of Pluronic F127 Reduce Hemolytic Potential of Amphiphilic Drugs. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2019**, *180*, 177–185, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.04.045.
134. Chakraborty, N.; Jha, D.; Roy, I.; Kumar, P.; Gaurav, S.S.; Marimuthu, K.; Ng, O.T.; Lakshminarayanan, R.; Verma, N.K.; Gautam, H.K. Nanobiotics against Antimicrobial Resistance: Harnessing the Power of Nanoscale Materials and Technologies. *J Nanobiotechnology* **2022**, *20*, doi:10.1186/s12951-022-01573-9.

PUBLICACIONES

Publicaciones

Santamaría-Aguirre, J.; Jacho, D.; Méndez, M. A.; Poveda, A.; Carrión, J.; Fanarraga, M. Solid lipid nanoparticles enhancing the leishmanicidal activity of Delamanid. *Pharmaceutics*. **2023**.

Submitido: 6 de noviembre del 2023. En revisión.

Coba-Males, M.A.; **Santamaría-Aguirre, J.**; Alcívar-León, C.D. In Silico Evaluation of New Fluoroquinolones as Possible Inhibitors of Bacterial Gyrases in Resistant Gram-Negative Pathogens. *Chem. Proc.* **2022**, *8*, 43. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-25-11753>

Coba-Males, M.A.; Lavecchia, M.J.; Alcívar-León, C.D.; **Santamaría-Aguirre, J.** Novel Fluoroquinolones with Possible Antibacterial Activity in Gram-Negative Resistant Pathogens: In Silico Drug Discovery. *Molecules* **2023**, *28*, 6929. <https://doi.org/10.3390/molecules28196929>

Barreiro-Costa, O.; Morales-Noboa, G.; Rojas-Silva, P.; Lara-Barba, E.; **Santamaría-Aguirre, J.**; Bailón-Moscoso, N.; Romero-Benavides, J.C.; Herrera, A.; Cueva, C.; Ron-Garrido, L.; et al. Synthesis and Evaluation of Biological Activities of Bis(spiropyrazolone)cyclopropanes: A Potential Application against Leishmaniasis. *Molecules* **2021**, *26*, 4960. <https://doi.org/10.3390/molecules26164960>

Santamaría-Aguirre, J.; Alcocer-Vallejo, R.; López-Fanarraga, M. Drug Nanoparticle Stability Assessment Using Isothermal and Nonisothermal Approaches. *Journal of Nanomaterials* **2018**, *Vol.* *2018*, Article ID 3047178. <https://doi.org/10.1155/2018/3047178>

Article

Solid lipid nanoparticles enhancing the leishmanicidal activity of delamanid

Javier Santamaria-Aguirre^{1,2,3,*}, Daniela Jacho⁴, Miguel Angel Méndez⁵, Ana Poveda³, Javier Carrión^{6,7}, and Mónica L. Fanarraga^{1,2,*}

- ¹ Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain
- ² Grupo de Nanomedicina, Instituto Valdecilla-IDIVAL, 39011 Santander, Spain
- ³ Grupo de Investigación en Biodiversidad, Zoonosis y Salud Pública (GIBCIZ), Instituto de Salud Pública y Zoonosis (CIZ), Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), Universidad Central del Ecuador, Quito 170521, Ecuador.
- ⁴ Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), Universidad Central del Ecuador, Quito 170521, Ecuador.
- ⁵ Universidad San Francisco de Quito USFQ, Instituto de Simulación Computacional (ISC-USFQ), Departamento de Ingeniería Química, Quito 170157, Ecuador.
- ⁶ Dpto. Sanidad Animal. Grupo ICPVet, Universidad Complutense de Madrid, España.
- ⁷ Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, España.
- * Correspondence: jsantamaria@uce.edu.ec; fanarrag@unican.es

Abstract: Leishmaniasis, a zoonotic parasitic disease transmitted by infected sandflies, impacts nearly 1 million people yearly and is endemic in many countries across Asia, Africa, the Americas, and the Mediterranean; despite that, it remains a neglected disease with limited effective treatments, particularly in impoverished communities with limited access to healthcare. This study aims to repurpose approved drugs for an affordable leishmaniasis treatment. After the screening of potential drug candidates by reviewing databases and utilizing molecular docking analysis, delamanid was chosen to be incorporated into solid lipid nanoparticles (SLNPs). Both *in cellulo* and *in vivo* tests confirmed the successful payload release within macrophages and through the epidermis following topical application on murine skin. Evaluation of macrophages infected with *L. infantum* amastigotes showed that the encapsulated delamanid exhibited greater leishmanicidal activity compared to the free drug. The process of encapsulating delamanid in SLNPs, as demonstrated in this study, places a strong emphasis on employing minimal technology, ensuring energy efficiency, cost-effectiveness, and reproducibility. It enables consistent, low-cost production of nanomedicines, even on a small scale, offering a promising step towards more accessible and effective leishmaniasis treatments.

Keywords: zoonosis, trypanosomatid, nanomedicine, neglected, fluoroquinolone, benzimidazoles

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected tropical parasitic disease that predominantly affects impoverished communities in tropical areas, placing a disproportionate burden on women and children. Factors such as poverty, malnutrition, limited healthcare access, and population displacement exacerbate the situation [1] [2] [3] [4]. The disease caused by various *Leishmania* protozoa species, spreads through the bites of infected female sandflies [5] and can manifest in three forms, ranging from skin lesions to a nearly always fatal visceral type. Leishmaniasis is endemic in over 90 countries across tropical and subtropical regions of Asia, Africa, the Americas, and the Mediterranean. However, changes in temperature and rainfall patterns due to climate change are influencing the size and distribution of sandfly populations [6] [7].

Every year, an estimated 700,000 to 1 million new cases of leishmaniasis emerge and impose devastating health, social, and economic consequences on over one billion people

according to the World Health Organization [8]. These challenges are further intensified by shifts in demographics, leading to increased vulnerability to various hardships, including high healthcare costs, productivity loss [9], disability, stigma [10] [11] and discrimination, primarily due to the nature of the lesions. Unfortunately, despite these alarming statistics, there has not been adequate public and private investment in prevention and control measures [6].

Treatment of leishmaniasis is challenging in poor communities with limited access to regular health care. The choice of treatment for leishmaniasis depends on the specific clinical presentation, which is further influenced by the parasite species and geographical distribution, and the efficacy of treatment is primarily influenced by the level of toxicity and associated side effects, which can affect the willingness of patients to undergo treatment. In addition, the drugs used can be both expensive and in short supply [12]. The Pan American Health Organization recommends the use of pentavalent antimonials, such as meglumine antimoniate, administered once daily for up to 30 days. Regrettably, the associated adverse effects, including myalgia and arthralgia, often lead to non-compliance and contribute to the development of resistant strains [13] [14].

The first stage of this study is dedicated to examining existing approved drugs for their potential applicability in treating leishmaniasis through repositioning [15] [16] [17]. This approach provides notable benefits in terms of both time and cost efficiency compared to the development of entirely new compounds [18][19]. Certain approved and previously discarded molecules may suffer from issues like inadequate solubility, restricted bioavailability, undesirable side effects, and dosing complexities, all of which can potentially be mitigated through the process of nanoencapsulation [20] [21] [20].

Among the various available nanoencapsulation systems, Solid Lipid Nanoparticles (SLNPs) present a promising platform for drug delivery [22] [23] [24] [25]. They enhance the solubility and bioavailability of hydrophobic drugs, provide sustained release for prolonged therapeutic effects, and improve chemical stability [26] [27]. Additionally, SLNPs boast benefits like better biocompatibility, targeted delivery, reduced toxicity, and protection from enzymatic degradation, making them versatile for pharmaceutical applications. They also hold the potential for efficient production processes and minimizing variability [10].

In the context of leishmaniasis, as well as other neglected tropical diseases, the successful use of SLNPs depends on the streamlined formulation and production methods that are cost-effective, time-efficient, and environmentally responsible [28][29,30][31]. This approach should address supply concerns: the industrial-scale production of nanoparticles implies high technology costs for manufacturing, storage, and distribution; the small-scale, on-demand, and personalized production of nanomedicines can improve their accessibility, especially for impoverished populations.

To address these needs, our research begins by identifying a leishmanicidal compound from a pool of drugs through database analysis and molecular docking. After confirming the compound's effectiveness against the *Leishmania* promastigote forms, we proceed to create a point-of-care compatible SLNPs formulation using the solvent-antisolvent method to encapsulate the drug. Subsequently, we evaluate the formulation *in vitro* and *in cellulo*, ultimately demonstrating its efficacy against the amastigote stage.

2. Materials and Methods

2.1. Identification of Compounds Exhibiting High Activity Against Trypanosomatids and Minimal Cytotoxicity.

2.1.1 Database processing. The information available in databases of "Pathogen box" (<https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/about-pathogen-box>) from the Initiative Medicines for Malaria Venture (MMV: <https://www.mmv.org/about-us/what-we-do/overview-our-work>), complemented with scientific articles and web pages allowed

the preparation of a table with activity against *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. infantum*, *L. donovani*, cytotoxicity in macrophages and hepatocytes, as well as physicochemical parameters; then classify them into three levels, assigning each one a score that served to prioritize the substances with the greatest possibility of presenting leishmanicidal activity.

2.1.2 Molecular docking. Molecular docking was performed using Auto Dock Vina software to analyze the proteins DHFR-TS and topoisomerase II (TOP II) from Leishmania, the protein structures were obtained from PubChem, and their pKa and pH-dependent distribution curves were calculated using ChemAxon's Chemicalize tool. The charges of the molecules were adjusted for pH 7 using AC/DC and MarvinSketch software. The modified structures were debugged, optimized, and corrected using the Check Structure tool. Human alpha and beta TOP II proteins and TOP II from *L. amazonensis*, were selected based on previous research by Uzcanga et al. (2017) [32] and Espindola (2019) [33], respectively. The Docking Server was utilized to test the best binding sites identified previously. Forty-two fluoroquinolones and meglumine antimoniate were used as ligands. AutoDock tools were also employed. A more detailed procedure is described in supplementary material Procedures S1 [34] and S2 [33].

2.2. Determination of the leishmanicidal activity of the selected drugs

2.2.1. Leishmanicidal activity in promastigotes. *L. infantum* (M/CAN/ES/96/BCN150 zymodeme MON-1) promastigotes, were maintained for 5–7 days in Schneider medium supplemented with 10% FBS, then, 1×10^5 promastigotes were seeded in microcentrifuge tubes with 1 ml of medium. The effect of the drug or nanoparticles, was compared with controls after 5-day incubation at 25–27 °C. Parasite viability was performed in a hemocytometer. Assays were performed in triplicate.

A fluorescence method described previously [35] was applied to drug substances, Procedure S3. Briefly, 10^4 promastigotes were cultured for 72 hours at 25 °C in the presence/absence of the drug dissolved in the medium at the indicated dilutions. Hypotonic lysis buffer (20mM Tris pH:7.5, 5mM EDTA, 0.008% Triton, 0.008% Sarcosine) with fluorophore (Sybrgold 0.1x) was added. Fluorescence was measured with excitation at 495 nm and emission at 539 nm. To determine cytotoxicity, the same procedure was followed using J774 macrophage in DMEM supplemented with 10% FBS, incubated at 37 °C with 5% CO₂.

The leishmanicidal activity of drugs and nanoparticles was also measured using flow cytometry. Promastigote cultures of *L. infantum*, *L. major* (clone V1:MHOM/IL/80/Friedlin), and *L. mexicana* cultivated for 5-7 days, were fixed using 4% paraformaldehyde, followed by thorough washing. Subsequently, they were stained overnight with a 1:500 dilution of propidium iodine. A total of 10,000 events minimum were processed in each flow cytometry experiment. Assays were performed in triplicate.

2.2.2. Phase-contrast microscopy imaging. Live promastigotes were photographed with a Nikon Eclipse TS 100 phase contrast microscope using the 10x and 20x lenses.

2.3. Delamanid encapsulation in SLNPs.

2.3.1. Design and Synthesis of the SLNPs. Delamanid (CAS 681492-22-8, TargetMol), stearic acid (CAS 57-11-4, Thermo Scientific), and the ammonium salt of N-palmitoyl homocysteine, PHC, (CAS 474942-73-9, Avanti Polar lipids) where solubilized in ethanol (Code 141086, PanReac AppliChem). Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB, (CAS 57-09-0, Thermo Scientific), Tween 80 (CAS 9005-65-6, Sigma Aldrich), and phosphate buffer saline, PBS (Ref. 70011-036, Gibco) were dispersed in a microcentrifuge tube. The organic phase was injected into the aqueous phase, sonicated (5 cycles 30 seconds each) at 130 W / 20 KHz, filtered through a membrane, and stored at 4 °C until use.

For analytical purposes, commercially available magnetic nanoparticles (BNF Dextran, Product code 84-00-102, Micromod) were introduced into the aqueous phase of the

SLNPs formulation; its original size, 100 nm, is fragmented during sonication (figure 2d). This inclusion aided in the separation of SLNPs through centrifugation. The incorporation of magnetic nanoparticles did not show any noticeable effect on the leishmanicidal activity as demonstrated in Figure S7.

2.3.2. Characterization of SLNPs. The SLNPs dispersion was diluted in PBS and measured by Dynamic Light Scattering (DLS) in a Malvern Zetasizer Ultra. Transmission Electron Microscopy (TEM) imaging was performed in a Jeol JEM 1011 equipped with a Gatan Orius Sc 1000 CCD, using SLNP placed and dried on a grid, no contrast was necessary since fragments of magnetic nanoparticles were included in the formulation for this purpose. Drug encapsulation efficiency was determined indirectly by quantifying the non-encapsulated drug in the supernatant, measuring its absorbance at 340 nm, and using a calibration curve.

2.3.3. *In vitro* drug release.

SLNPs dispersions in PBS were subjected to agitation, 200 rpm at 37.5 °C for 8 days, to investigate *in vitro* drug release. The absorbance of 500 µl samples from the supernatant was determined at 340 nm, and the quantification of the drug was performed employing a calibration curve.

2.4. *In cellulo* activity of SLNPs

2.4.1. Cellular Proof-of-Concept Drug Release.

SLNPs carrying both DiI (41085-99-8, Invitrogen) were prepared as a proof-of-concept (PoC) to investigate drug release *in cellulo*. After 24-hour exposure to these nanoparticles, macrophages J774 were fixed using 4% paraformaldehyde. They were then stained with DAPI (CAS 28718-90-3, Sigma Aldrich) and mounted on slides for imaging using a Nikon A1R confocal microscope.

2.4.2. Transdermal PoC drug release. Eight-week-old female and male BALB/c mice (Janvier-Labs, Laval, France) were maintained in the Animal Facility of the Complutense University of Madrid under specific pathogen-free conditions without food or water restriction. The animal research described in this manuscript complied with Spanish (Ley 6/2013) and European Union legislation (2010/63/UE). The protocols used were approved by the Animal Care Committee of the Complutense University of Madrid. The animals were carefully shaved to facilitate the application of 20 µl of the dispersion containing SLNPs loaded with both the drug and DiR (CAS 100068-60-8, Invitrogen). The treatment was left in place as indicated in the text. After humane sacrifice, the skin was dissected, fixed in 4% formalin, and embedded in paraffin. Samples were then sectioned, stained, and prepared for confocal microscopy imaging.

2.4.2. Electron microscopy imaging of infected macrophages. Canine macrophage DH82, cultured in RPMI (RPMI Medium 1640 (1X) + Glutamax-I, Gibco, Ref. 61870-010) supplemented with 10% FBS and 0.05% Gentamicin, and incubated at 37 °C / 5% CO₂ were infected with *L. infantum* promastigotes for 4 hours. Then, non-internalized parasites were removed and cells were treated. After 12 hours, treatments (drug or SLNPs) at a concentration corresponding to the IC₅₀ were added and incubated for 48 hours. After treatment, the cells were fixed with glutaraldehyde 3% for inclusion and post-fixed in 2% buffered osmium tetroxide, dehydrated in a graded acetone series, and embedded in Araldite resin (Durcupan ACM, Sigma-Aldrich). Ultrathin sections of ca. 70 nm thick, were obtained on an LKB ultramicrotome, stained with lead citrate and uranyl acetate. Imaging was performed using a JEOL JEM 1011 operated at 100 kV.

2.4.4. Leishmanicidal activity in amastigotes. DH82 cells were infected with *L. infantum* live parasites on cell culture slide chambers for 4 h. Cells were treated with the drug, SLNPs, or control media for 48 hours. The number of infected macrophages and amastigotes by cell was determined in 400 cells under optic microscopy. Olympus BX41, on Giemsa-stained slides. The infection index was obtained by multiplying the number

of infected cells by the number of amastigotes per cell. A one-way ANOVA statistical test, followed by *post hoc* comparisons using the Tukey HSD test, was used to evaluate differences.

The *in vitro* experiments were carried out in a laboratory equipped with laminar flow cabinets adapted for biosafety level 2 microorganisms following the procedures of Biosecurity Standard Operating Procedures (SOPs) applied to the Faculty of Veterinary Medicine.

3. Results

3.1. Identification of Compounds Exhibiting High Activity Against Trypanosomatids and Minimal Cytotoxicity

3.1.1. Database processing

We assessed the activity of compounds against trypanosomatids and their cytotoxicity against macrophages using the "Medicines for Malaria Venture (MMV) project's Pathogen box" database. The results were summarized in comparative tables for evaluation; briefly, the leishmanicidal activity values were stratified into tertiles and color-coded as green, orange, or red, corresponding to scores of 3, 2, and 1, respectively. The highest score was assigned to the lowest IC₅₀ values, indicating superior leishmanicidal activity. Conversely, for cytotoxicity assessment, higher IC₅₀ values were associated with elevated scores. To establish prioritization, these scores were multiplied to generate a priority number. Substances falling within the first tertile, marked by the highest combined scores, were considered to exhibit greater potential. In cases where data was unavailable for promising molecules, we supplemented it with information from scientific articles. To refine the selection process, we took into account physicochemical parameters that are indicative of biological activity (Drugability). This data was then cross-referenced with scientific literature, offering valuable insights into potential targets and mechanisms of action. Finally, six different molecules were selected: MMV688262 (delamanid), MMV688372, MMV689061, MMV689437, MMV690102, AND MMV690103 (Figure S1).

3.1.2. Molecular docking

Using Autodock Vina (<https://vina.scripps.edu/>), we conducted bioinformatic studies examining 42 fluoroquinolones representing all generations. Among them, compounds with high affinity for topoisomerase II (TOP II) of *Leishmania* and Salmonella Gyrase, coupled with low affinity for human TOP II alpha and TOP II beta, were identified. In the process of data analysis, affinity values were categorized into tertiles and color-coded as green, orange, or red, with corresponding scores of 3, 2, and 1, respectively. The highest score was attributed to the compounds displaying the greatest affinity for parasite enzymes. In contrast, for human enzymes, higher scores were linked to lower affinity values. To facilitate prioritization, these scores were multiplied to generate a comprehensive priority number. Substances situated within the first tertile, characterized by the most favorable combined scores, were deemed to possess superior potential. These molecules include Trovafloxacin, Tosufloxacin, and Sitafloxacin. Enrofloxacin was selected for inclusion based on its previous use in *in vitro* research, along with its high bioavailability and low toxicity [36]. Furthermore, Prulifloxacin (Figure S2) was included in the study due to its structural feature of a four-membered ring containing a sulfur atom, which has been reported to enhance its activity [37] [38].

3.2. Assessing Leishmanicidal Activity of Selected Drugs against Promastigotes

3.2.1. Leishmanicidal activity in promastigotes

Leishmanicidal activity assays were conducted in multiple phases, systematically comparing the efficacy of the experimental compound with that of ciprofloxacin. The effectiveness of the latter had been previously confirmed using fluorescence-based methodologies described previously [35]. Compounds exhibiting significant activity were subjected to dilution, and the test was reiterated until the concentration causing a fifty-percent reduction in the population (IC₅₀) could be approximated. Delamanid displayed notable activity against *L. mexicana* promastigotes and prulifloxacin was the best among the fluoroquinolones (Figure S3).

To gain deeper insights into the prior findings, we applied the fluorescence method outlined in section 2.2.1 to ascertain the IC₅₀ values in promastigotes. The results indicated an IC₅₀ value of 0.026 μ M for delamanid, 180.2 μ M for prulifloxacin, and 451.3 μ M for enrofloxacin. Enrofloxacin was selected as a reference due to its previous usage on promastigotes, both in solution [39], and encapsulated in nanosystems [40,41].

Additionally, we employed flow cytometry to determine the IC₅₀ (Table 1) for different *Leishmania* species and macrophage cell lines DH82 and J774, both used in *in cellulo* assays.

Table 1. Determination of delamanid IC₅₀ Against *Leishmania* Species and Macrophages Using Flow Cytometry (n=3, media \pm SD)

Specie/cell line	IC 50 (nM)
<i>L. infantum</i>	17.2 \pm 0.9
<i>L. major</i>	21.9 \pm 2.8
<i>L. mexicana</i>	13.5 \pm 0.9
DH82 macrophages	> 1.6 \times 10 ⁵
J774 macrophages	> 1.6 \times 10 ⁵

The IC₅₀ of delamanid against the three *Leishmania* species is within the same order of magnitude, while the cytotoxicity in assayed eukaryotic cells is at least 10,000-fold higher. These results agree with previous investigations that revealed an IC₅₀ of 18.5 nM in *L. donovani* promastigotes derived from clinically isolated strains [42]. Given the significant difference in leishmanicidal activity observed between delamanid and prulifloxacin, coupled with its safety margin in eukaryotic cells, the study aimed toward delamanid (Figure 1a).

3.2.2. Phase-contrast microscopy evaluation of the effect of delamanid on promastigotes.

We utilized phase-contrast microscopy to assess the impact of delamanid on the parasite, focusing on potential morphological alterations and signs of cell death. This approach enabled us to analyze how delamanid influenced the growth and structure of the parasite (Figure 1b). Alongside a notable decrease in the population of *L. infantum* promastigotes, we noted morphological abnormalities such as an increase in their size, a more rounded shape, and noticeable cytokinetic abnormalities, all evident six days after a single administration of delamanid at its IC₅₀ concentration.

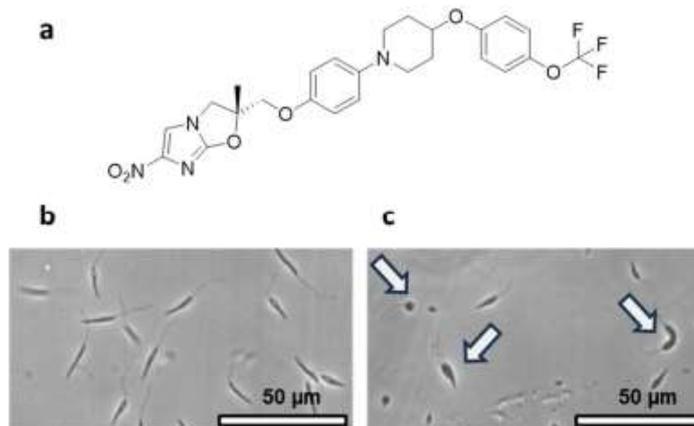


Figure 1. Molecular structure of delamanid and impact on promastigotes. **(a)** Chemical structure of delamanid, a bicyclic nitroimidazole compound approved for the treatment of multi-drug resistant tuberculosis, exhibiting high activity against *Leishmania* parasites. **(b)** Untreated *L. infantum* promastigotes after 7-day culture. **(c)** Morphological alterations induced by delamanid in *L. infantum* promastigotes after 2 days of treatment.

3.3 Encapsulation of delamanid in SLNPs

3.3.1 Design and Synthesis of the SLNPs

The SLNP formulation comprises seven components, the exact quantities employed for the synthesis are shown in Table 2. The ethanol content is maintained well below the maximum allowable limit, the combined total of surfactants is kept below 0.12%, and the lipids are limited to 0.018%. Lipids complement each other due to their charges, stearic acid is a widely recognized ingredient in the pharmaceutical and cosmetic industries [43]. The added delamanid corresponds to 27.7 μM in the SLNP dispersion.

Table 2. Delamanid SLNPs weight/weight percentage formula

Component	% (w/w)
delamanid	0.0015
PHC	0.0025
stearic acid	0.0152
etanol	3.240
CTAB	0.0320
Tween 80	0.0800
PBS	96.6290

The manufacturing process, as illustrated in Figure 2a, was intentionally designed to involve a minimum number of steps and incur low energy costs. One notable feature of this method is the remarkable consistency in the batches of nanoparticles produced, as demonstrated in Figure S4.

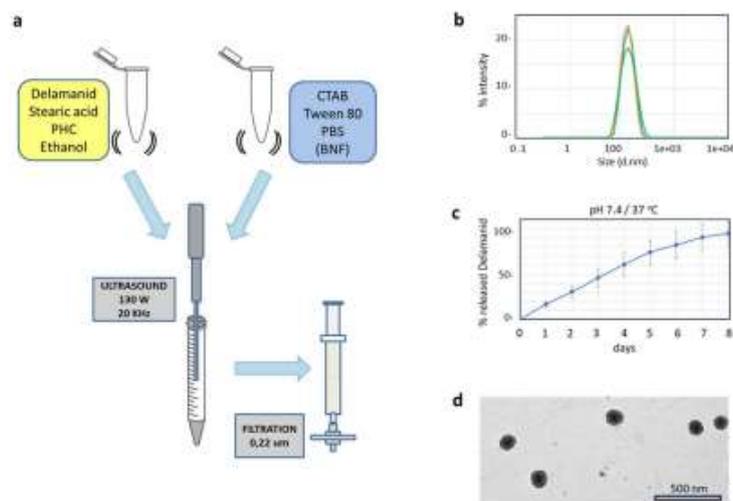


Figure 2. SLNPs synthesis and characterization. (a) Schematic representation of SLNP synthesis using the solvent-antisolvent method. (b) Characterization of hydrodynamic diameter. Data from three distinct batches exhibit high reproducibility in particle size, as determined by Dynamic Light Scattering (DLS), with a polydispersity index below 0.25. (c) *In vitro* drug release profiles indicate sustained release over one week. (d) The SLNPs dispersion was diluted at a ratio of 1 to 10 in PBS, applied to a grid, and left to air-dry at room temperature overnight before observation under TEM.

3.3.2 Characterization of SLNPs

As shown in Figures 2b and 2d, particle size does not exceed 200 nm with a highly reproducible polydispersity index. Four consecutive batches, prepared independently, showed minimal variation in particle size between 140–180 nm diameter and a polydispersity index of less than 0.25. The zeta potential measured approximately +10 mV, indicating a slight positive charge (refer to Figure S4). Importantly, the encapsulation of delamanid in the SLNPs did not alter their sizes or zeta potential. The stability of the physical characteristics of the SLNPs was assessed for 7 days at 4 °C (Figure S5), and no discernible changes in properties were observed.

Regarding drug encapsulation, the produced SLNPs demonstrated an average encapsulation efficiency of 84.5% (Figure S6). When it comes to drug release from SLNPs under physiological conditions (pH 7.4, 37 °C), these nanosystems exhibited a sustained release pattern for delamanid. Specifically, over half of the content was released during the first four days. The 80% threshold was surpassed by the sixth day (Figure 2c).

3.4 SLNPs Payload Release: Proof-of-Concept

3.4.1 *In cellulo* and *in vivo* payload release

Next, we exposed macrophage cells to the SLNPs in the culture media to examine the uptake, the pathways for intracellular nanoparticle transport, and the payload release. To assess the effectiveness of intracellular drug release within macrophages following SLNP internalization, we conducted a proof-of-concept experiment by incorporating a fluorescent pigment into the delamanid-loaded SLNPs (Materials and Methods). After 24 hours of exposure to the nanoparticles, macrophages were imaged using confocal microscopy. The study revealed a prominent fluorescence in their cytoplasm, indicative of the successful release of the nanoparticle payload intracellularly (Figure 3a, Inset #1). This confirms both the capture of the SLNPs and the release of the cargo.

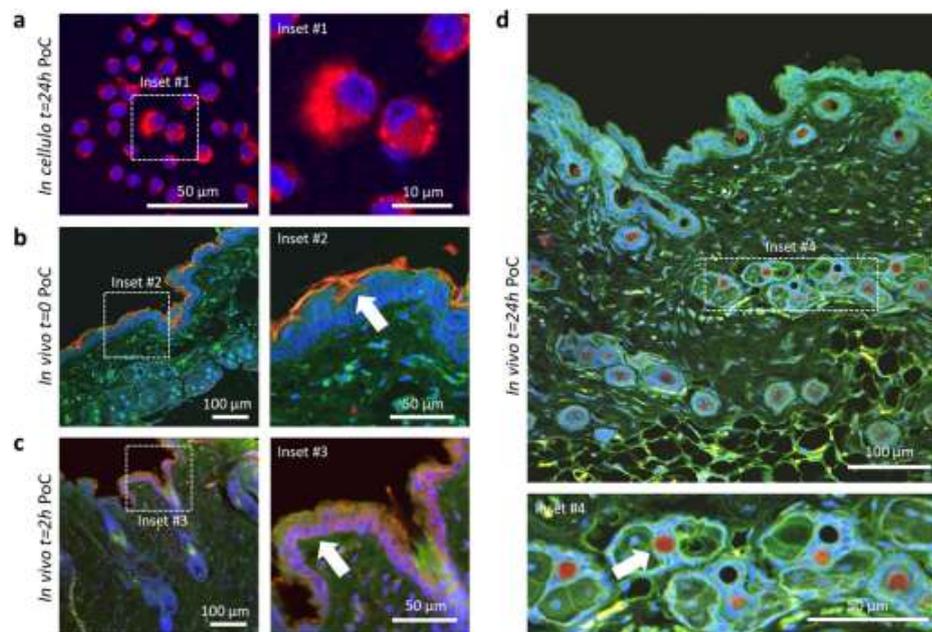


Figure 3. Liberation of payload from SLNPs containing dye and delamanid. (a) After 24 hours of exposure to SLNPs, macrophages display robust cytoplasmic fluorescence, indicating the successful release of the encapsulated dye intracellularly (Inset #1). (b–d) Confocal microscopy images of skin sections taken at sequential time points after the topical administration of the SLNPs show distinct patterns. (b) Immediately after application, the released compound is visible in the corneal stratum (Inset #2, arrow). (c) In 2 hours, the dye has penetrated the basal layer of the dermis being visible intracellularly (Inset #3, arrow). (d) A notable concentration of the dye around the hair follicles is detected at 24 hours. The red channel shows the fluorescence of the dye (Inset #4 arrows). Nuclei are stained with Dapi (blue channel). The green channel represents tissue autofluorescence.

Finally, to evaluate *in vivo* payload release, we conducted a proof-of-concept experiment to evaluate the release of the compounds. In this experiment, SLNPs loaded with both, the fluorescent dye and delamanid were applied topically on normal murine skin. Skin from treated mice was collected at various times after topical application and histologically processed for confocal microscopy imaging to assess compound release and diffusion through different skin layers. Figures 3b–d depict different time points at which the skin was observed to assess the penetration of the dye (indicated by arrows). Immediately

after the initial application, the fluorescent dye was primarily observed within the corneal stratum (Figure 3b). Two hours later, the dye had successfully penetrated down to the basal cell layer of the dermis (Figure 3c). After 24 hours, the dye was mainly concentrated in the hair follicles (Figure 3d).

These findings illustrate that the nanoparticles demonstrate a high level of efficiency in releasing their cargo at the intracellular level. Additionally, they highlight the potential of the nanoencapsulation system for transdermal delivery of lipophilic molecules like delamanid. Moreover, because of its fully biocompatible formulation, there is optimism regarding the efficient delivery of the treatment through alternative routes of administration.

3.4.2 Subcellular Distribution of SLNPs in Infected Macrophages

To study the entry of SLNPs into macrophages, the nanoparticle subcellular pathway, and the effect of amastigotes, we infected macrophages with *L. infantum* for 48 hours. Following the incubation period, the parasites were removed by washing, and the macrophages were then treated with SLNPs. For imaging purposes, magnetic nanoparticles were incorporated into these nanoparticle batches. Following an additional 48-hour exposure to the SLNPs, cells were fixed, dehydrated, and embedded in resin for ultramicrotomy and TEM imaging.

Figure 4 shows a section of two representative infected macrophages. Some intracellular nanoparticles were observed surrounded by membranes, probably phagosomes (Figure 4, inset # 5a), suggesting uptake by phagocytosis, while others were also seen free in the cytoplasm of cells, lacking surrounding membranes (Figure 4, insets #5b, #6). The distinct recognition of SLNPs is facilitated by the inclusion of iron nanoparticles in the formulation, making their structure visible and clearly distinguishable from other cellular structures observed in these sections.

These findings are consistent with confocal microscopy observations and suggest successful uptake of SLNPs by macrophages, the cells targeted for treatment. The results suggest that this novel formulation shows promise for the treatment of leishmaniasis.

3.4.3 Comparative Leishmanicidal Efficacy of SLNPs Against Intracellular Amastigotes

To assess the effectiveness of SLNP treatment compared to controls, canine macrophages infected with *L. infantum* were subjected to three different treatments: (i) unloaded nanoparticles as a control (SLNP), (ii) nanoparticles encapsulating delamanid (SLNP Dm), and (iii) the free drug (Dm). Following treatment, the number of amastigotes per infected cell was quantified on Giemsa-stained cells. The resulting values were used to calculate the infection index, providing an overall measure of parasite burden (Figure 4b).

A one-way ANOVA statistical test was performed to assess the impact of treatments on the Infection Index of DH82 macrophages. The analysis revealed a statistically significant effect of the treatment on the Infection Index at the $p < 0.05$ level, compared to the control conditions [$F(2, 15) = 22.13, p < 0.0001$]. Post hoc comparisons using the Tukey HSD test indicated that the mean score for SLNP Dm ($M = 30.95, SD = 25.36$) was significantly different from SLNP ($M = 147.12, SD = 30.34$) and Dm ($M = 77.20, SD = 34.92$).

These results demonstrate that the delamanid encapsulated in SLNPs displays a markedly enhanced leishmanicidal effect when compared to delamanid in its unencapsulated form, particularly in its potency against intracellular amastigotes of *L. infantum*.

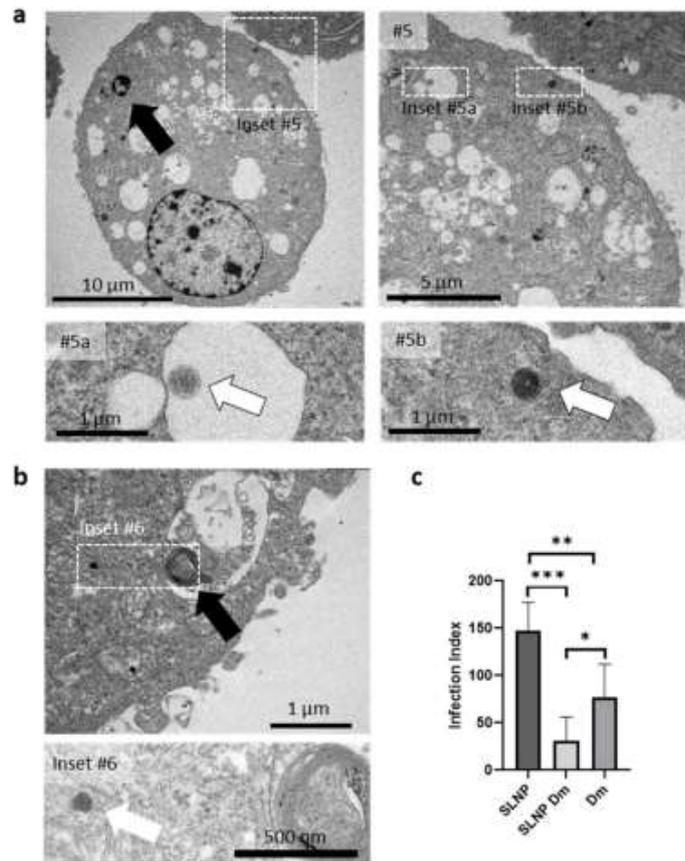


Figure 4. Effect of SLNPs Treatment on Amastigotes. (a–b) Subcellular localization of SLNPs in infected macrophages. TEM images of an ultrathin section of an infected macrophage treated with SLNPs. Black arrows delineate the localization of intracellular dead parasites. Insets #5a and #5b offer magnified views of the areas enclosed in Inset #5. Inset #6 highlights the specified region in Figure 4b. White arrows indicate intracellular SLNPs, some observed within a putative phagosome (Inset #5a), while others are freely present in the cytoplasm (Insets #5b, #6). The presence of magnetic nanoparticles inside serves as the identifier for the SLNPs. (c) The use of SLNPs containing delamanid (SLNP Dm) significantly reduces the Infection Index of macrophages infected with *L. infantum* in comparison to the control groups, which include unloaded SLNPs and the plain drug (Dm).

4. Discussion

Delamanid, an approved oral treatment for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, possesses high lipophilicity, making it compatible with the lipid-rich matrix of SLNPs. These nanoplatforms offer a range of benefits, particularly in overcoming biological barriers and providing sustained drug release. Notably, the manufacturing process is

highly versatile, allowing for various administration routes, including topical, parenteral, inhalation, and even routes like ocular, oral, or even intra-cerebral administration [44].

In comparison to other nanoencapsulation methods, which often necessitate the application of thermal or mechanical energy (such as heating, shearing, ultrasound, etc.) or induce nanoparticle formation through alterations in solubility and surface tension [44] [45][46] the approach employed in this study is notably streamlined and straightforward. It combines principles like solvent-antisolvent insolubilization, ultrasound-mediated top-down processes, and reduction in interfacial tension. Importantly, this method can be carried out without the need for high-tech equipment. As a result, it yields SLNPs with highly consistent and reproducible characteristics across different synthesis batches.

The mechanism of action of delamanid on *Mycobacterium* may entail disrupting the biosynthesis of crucial components of the cell wall, namely methoxy and keto mycolic acids. Additionally, it may interfere with respiratory activity in the bacteria [47]. However, it's important to note that mycolic acids, which are commonly encountered in the cell envelopes of various microorganisms, are absent in *Leishmania* [48]. However, this parasite does contain cis-9,10-methylene octadecanoic acid, a fatty acid structurally akin to mycolic acids. This similarity suggests that it could potentially be the target of delamanid's leishmanicidal activity [49]. It's worth noting that a higher content of C19 Δ has been associated with resistance to antileishmania drugs like amphotericin B and miltefosine [50]. Additionally, cyclopropane fatty acid synthase null mutants of *L. mexicana* display altered cell shape, increased sensitivity to acidic pH, and modified growth patterns in serum-free media [51].

It is also important to consider the potential involvement of Aurora kinases as targets for delamanid in *Leishmania*. The significance of hesperidin, an inhibitor, in preserving cytoskeletal integrity and facilitating cytokinesis, as indicated by previous research [52], could potentially offer insight into the observed experimental outcomes. Similar results were replicated with inhibitors such as Barasertib and GSK-1070916 [53].

5. Conclusions

This study primarily focused on formulating SLNPs for the delivery of delamanid in the treatment of leishmaniasis. The process encompassed the selection of delamanid among different drug candidates, its incorporation into SLNPs, and subsequent evaluation of its effectiveness against *Leishmania* parasites. Encapsulation efficiency was notably high, and the released drug exhibited prolonged release characteristics. Results showcased successful payload release within macrophages, as well as efficient skin penetration following topical application. Moreover, delamanid demonstrated heightened activity against intracellular amastigotes when incorporated into the SLNPs formulated in this study. The manufacturing process proved to be not only straightforward and energy-efficient but also cost-effective and highly reproducible. In summary, this research suggests that delamanid-loaded SLNPs hold substantial promise as an effective treatment for leishmaniasis, representing a significant advancement in the quest for improved therapies against this parasitic disease.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1: Procedure S1: Molecular Docking; Figure S1: Substances selected from MMV library; Figure S2: Substances selected through molecular docking, experimental data, and bibliographic review; Figure S3: Relative leishmanicidal activity on promastigotes; Figure S4: Physical characterization of SLNPs batches synthesized independently; Figure S5: Physical stability of SLNPs; Figure S6: Encapsulation efficiency of SLNPs; Figure S7: Leishmanicidal activity of SLNPs over promastigote; Figure S8: Cyclopropane fatty acids in *Mycobacterium* and *Leishmania*.

Author Contributions: Conceptualization, JSA, MLF; methodology, JSA, MAM, DJ, AP, JC; validation, MAM, JSA, AP, JC, and MLF; formal analysis, JSA, JC, MLF; investigation, JSA, DJ, MAM, AP, JC; resources, MLF; data curation, JSA, MLF; writing, review and editing, JSA, MLF; funding acquisition, MLF. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: MLF acknowledges the financial support from the AEI and European Regional Development Fund, “Investing in your future”, Grant TED2021-129248B-I00 and CA21111 “One Health drugs against parasitic vector-borne diseases in Europe and beyond (OneHealthdrugs)” COST action, the Spanish Nanomedicine network RED2022-134560-T MICIN/AEI/ 1013039/501100011033 “NanoCARE 2.0” and IDIVAL for the INNVAl 17/11 project.

Institutional Review Board Statement: All the procedures described in this manuscript complied with Spanish (Law 63/2013) and European Union legislation (2010/63/UE) and were approved by the Animal Welfare Committee of the Community of Madrid, Spain, under procedural number PROEX 212/18.

Data Availability Statement: Data are available from the corresponding authors.

Acknowledgments: The figures and graphs have been created with BioRender software (License ID: 9519A1C8-0002).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- World Health Organization Neglected Tropical Diseases Available online: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1 (accessed on 15 November 2023).
- González, C.; Wang, O.; Strutz, S.E.; González-Salazar, C.; Sánchez-Cordero, V.; Sarkar, S. Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4*, doi:10.1371/journal.pntd.0000585.
- Wijerathna, T.; Gunathilaka, N. Time Series Analysis of Leishmaniasis Incidence in Sri Lanka: Evidence for Humidity-Associated Fluctuations. *Int J Biometeorol* **2023**, *67*, 275–284, doi:10.1007/s00484-022-02404-0.
- Burza, S.; Croft, S.L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *The Lancet* **2018**, *392*, 951–970, doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- Cecilio, P.; Cordeiro-da-Silva, A.; Oliveira, F. Sand Flies: Basic Information on the Vectors of Leishmaniasis and Their Interactions with Leishmania Parasites. *Commun Biol* **2022**, *5*, doi:10.1038/s42003-022-03240-z.
- World Health Organization *Ending the Neglect to Attain the Sustainable Development Goals: A Road Map for Neglected Diseases 2021–2030*; Geneva, 2020; ISBN 9789240010352.
- Ainsworth, C. Tropical Diseases Move North Available online: https://www.nature.com/articles/d41586-023-03476-7?utm_source=nature&utm_medium=collections-page (accessed on 30 November 2023).
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. *Control de Las Leishmaniasis: Informe de Una Reunión Del Comité de Expertos de La OMS Sobre El Control de Las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de Marzo de 2010*; Organización Mundial de la Salud: Ginebra, 2012;
- Lenk, E.J.; Redekop, W.K.; Luyendijk, M.; Rijnsburger, A.J.; Severens, J.L. Productivity Loss Related to Neglected Tropical Diseases Eligible for Preventive Chemotherapy: A Systematic Literature Review. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10*, doi:10.1371/journal.pntd.0004397.

10. Sims, K.R.; MacEren, J.P.; Strand, A.I.; He, B.; Overby, C.; Benoit, D.S.W. Rigor and Reproducibility in Polymer Nanoparticle Synthesis and Characterization. *RSC Adv* **2020**, *10*, 2513–2518, doi:10.1039/c9ra10091a. 522–524
11. Makin, S. Mental Health: The Invisible Effects of Neglected Tropical Diseases Available online: <https://www.nature.com/articles/d41586-023-02973-z> (accessed on 30 November 2023). 525–526
12. Organización Panamericana de la Salud *Manual de Procedimientos Para La Vigilancia y El Control de Las Leishmaniasis En La Región de Las Américas*; Washington, D.C., 2023; 527–528
13. Pan American Health Organization *Guideline for the Treatment of Leishmaniasis in the Americas. Second Edition*; Pan American Health Organization, 2022; 529–530
14. Field, M.C.; Horn, D.; Fairlamb, A.H.; Ferguson, M.A.J.; Gray, D.W.; Read, K.D.; De Rycker, M.; Torrie, L.S.; Wyatt, P.G.; Wyllie, S.; et al. Anti-Trypanosomatid Drug Discovery: An Ongoing Challenge and a Continuing Need. *Nat Rev Microbiol* **2017**, *15*, 217–231, doi:10.1038/nrmicro.2016.193. 531–533
15. Ashburn, T.T.; Thor, K.B. Drug Repositioning: Identifying and Developing New Uses for Existing Drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 673–683, doi:10.1038/nrd1468. 534–535
16. Andrews, K.T.; Fisher, G.; Skinner-Adams, T.S. Drug Repurposing and Human Parasitic Protozoan Diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2014**, *4*, 95–111, doi:10.1016/j.ijpddr.2014.02.002. 536–537
17. Jourdan, J.P.; Bureau, R.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Drug Repositioning: A Brief Overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2020**, *72*, 1145–1151, doi:10.1111/jphp.13273. 538–539
18. GNS, H.S.; GR, S.; Murahari, M.; Krishnamurthy, M. An Update on Drug Repurposing: Re-Written Saga of the Drug's Fate. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2019**, *110*, 700–716, doi:10.1016/j.biopha.2018.11.127. 540–541
19. Hua, Y.; Dai, X.; Xu, Y.; Xing, G.; Liu, H.; Lu, T.; Chen, Y.; Zhang, Y. Drug Repositioning: Progress and Challenges in Drug Discovery for Various Diseases. *Eur J Med Chem* **2022**, *234*, doi:10.1016/j.ejmech.2022.114239. 542–544
20. Lim, S.; Park, J.; Shim, M.K.; Um, W.; Yoon, H.Y.; Ryu, J.H.; Lim, D.K.; Kim, K. Recent Advances and Challenges of Repurposing Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems to Enhance Cancer Immunotherapy. *Theranostics* **2019**, *9*, 7906–7923, doi:10.7150/thno.38425. 545–547
21. Volpedo, G.; Costa, L.; Ryan, N.; Halsey, G.; Satoskar, A.; Oghumu, S. Nanoparticulate Drug Delivery Systems for the Treatment of Neglected Tropical Protozoan Diseases. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* **2019**, *25*, doi:10.1590/1678-9199-jvatitd-1441-18. 548–550
22. Haider, M.; Abdin, S.M.; Kamal, L.; Orive, G. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, doi:10.3390/pharmaceutics12030288. 551–552
23. Nguyen, V.H.; Thuy, V.N.; Van, T.V.; Dao, A.H.; Lee, B.J. Nanostructured Lipid Carriers and Their Potential Applications for Versatile Drug Delivery via Oral Administration. *OpenNano* **2022**, *8*, doi:10.1016/j.onano.2022.100064. 553–555
24. Assefi, M.; Ataieinaeini, M.; Nazari, A.; Gholipour, A.; Vertiz-Osores, J.J.; Melody Calla-Vásquez, K.; Zuhair Talib Al-Naqeeb, B.; Hussein Jassim, K.; Kalajahi, H.G.; Yasamineh, S.; et al. A State-of-the-Art Review on Solid Lipid Nanoparticles as a Nanovaccines Delivery System. *J Drug Deliv Sci Technol* **2023**, *86*, doi:10.1016/j.jddst.2023.104623. 556–559
25. Punu, G.F.; Harahap, Y.; Anjani, Q.K.; Hartrianti, P.; Donnelly, R.F.; Ramadon, D. Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Formulation and Fabrication. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)* **2023**, *10*, 55–66. 560–562

26. Duan, Y.; Dhar, A.; Patel, C.; Khimani, M.; Neogi, S.; Sharma, P.; Siva Kumar, N.; Vekariya, R.L. A Brief Review on Solid Lipid Nanoparticles: Part and Parcel of Contemporary Drug Delivery Systems. *RSC Adv* **2020**, *10*, 26777–26791, doi:10.1039/d0ra03491f. 563
27. Wadekar, A.B.; Manwar, J. V.; Bakal, R.L.; Kumbhar, D.D. Mechanisms and Pharmaceutical Application of Solid Lipid Nanoparticles as Efficient Drug Delivery System. *Systematic Review Pharmacy* **2022**, *13*, doi:10.31858/0975-8453.13.12.862-869. 564
28. Abualfaraa, W.; Salonitis, K.; Al-Ashaab, A.; Ala'raj, M. Lean-Green Manufacturing Practices and Their Link with Sustainability: A Critical Review. *Sustainability (Switzerland)* **2020**, *12*, doi:10.3390/su12030981. 565
29. Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 301–312, doi:10.1039/b918763b. 566
30. Duan, H.; Wang, D.; Li, Y. Green Chemistry for Nanoparticle Synthesis. *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 5778–5792, doi:10.1039/c4cs00363b. 567
31. Singh, H.; Desimone, M.F.; Pandya, S.; Jasani, S.; George, N.; Adnan, M.; Aldarhami, A.; Bazaid, A.S.; Alderhami, S.A. Revisiting the Green Synthesis of Nanoparticles: Uncovering Influences of Plant Extracts as Reducing Agents for Enhanced Synthesis Efficiency and Its Biomedical Applications. *Int J Nanomedicine* **2023**, *18*, 4727–4750, doi:10.2147/IJN.S419369. 568
32. Uzcanga, G.; Lara, E.; Gutiérrez, F.; Beaty, D.; Beske, T.; Teran, R.; Navarro, J.C.; Pasero, P.; Benítez, W.; Poveda, A. Nuclear DNA Replication and Repair in Parasites of the Genus *Leishmania*: Exploiting Differences to Develop Innovative Therapeutic Approaches. *Crit Rev Microbiol* **2017**, *43*, 156–177, doi:10.1080/1040841X.2016.1188758. 569
33. Espindola, L. Validación de La ADN Opoisomerasa Tipo II Como Diana Terapéutica En El Tratamiento de Leishmaniasis, Universidad San Francisco de Quito: Quito, 2019. 570
34. Jacho, D.; Méndez, M.A.; Santamaria-Aguirre, J. Métodos Computacionales Para El Diseño de Fluoroquinolonas Con Alta Afinidad Por Topoisomerasa II de Leishmania., Universidad Central del Ecuador: Quito, 2021. 571
35. Esteves, L. Efecto de Las Fluoroquinolonas Sobre Topoisomerasas Tipo II En Trypanosomatidae, Universidad Central del Ecuador: Quito, 2018. 572
36. Shi, Z.; Zhang, J.; Tian, L.; Xin, L.; Liang, C.; Ren, X.; Li, M. A Comprehensive Overview of the Antibiotics Approved in the Last Two Decades: Retrospects and Prospects. *Molecules* **2023**, *28*, doi:10.3390/molecules28041762. 573
37. Matera, M.G. Pharmacologic Characteristics of Prulifloxacin. *Pulm Pharmacol Ther* **2006**, *19*, 20–29, doi:10.1016/j.pupt.2005.09.009. 574
38. Hudhomme, P. Four-Membered Rings with One Sulfur and One Nitrogen Atom. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Katritzky, A., Ramsden, C., Taylor, R., Eds.; Elsevier Science, 2008. 575
39. Albarracín, J. Efecto de La Enrofloxacin En La Movilidad de Los Promastigotes de Leishmania Mexicana, Universidad Central del Ecuador: Quito, 2020. 576
40. Loachamin, G. Comparación de La Actividad Leishmanicida de Los Transferosomas de Enrofloxacin Frente a Enrofloxacin En Solución Usando Promastigotes de L. Mexicana Como Modelo Biológico, Universidad Central del Ecuador: Quito, 2018. 577
41. Morales, N. Desarrollo de Nanoparticulas de Enrofloxacin de Liberación Modificada, Universidad Central del Ecuador: Quito, 2018. 578

42. Patterson, S.; Wyllie, S.; Norval, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F.R.; Auer, J.L.; Osuna-Cabello, M.; Read, K.D.; Fairlamb, A.H. The Anti-Tubercular Drug Delamanid as a Potential Oral Treatment for Visceral Leishmaniasis. *Elife* **2016**, *24*, doi:10.7554/eLife.09744.001. 604–606
43. European Chemicals Agency Substance Infocard Cetrimonium Bromide Available online: <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.000.283> (accessed on 20 October 2023). 607–608
44. Dhiman, N.; Awasthi, R.; Sharma, B.; Kharkwal, H.; Kulkarni, G.T. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. *Front Chem* **2021**, *9*, doi:10.3389/fchem.2021.580118. 609–610
45. Duan, Y.; Dhar, A.; Patel, C.; Khimani, M.; Neogi, S.; Sharma, P.; Siva Kumar, N.; Vekariya, R.L. A Brief Review on Solid Lipid Nanoparticles: Part and Parcel of Contemporary Drug Delivery Systems. *RSC Adv* **2020**, *10*, 26777–26791, doi:10.1039/d0ra03491f. 611–613
46. Ghasemiyeh, P.; Mohammadi-Samani, S. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Novel Drug Delivery Systems: Applications, Advantages and Disadvantages. *Res Pharm Sci* **2018**, *13*, 288–303, doi:10.4103/1735-5362.235156. 614–616
47. Khoshnood, S.; Taki, E.; Sadeghifard, N.; Kaviar, V.H.; Haddadi, M.H.; Farshadzadeh, Z.; Kouhsari, E.; Goudarzi, M.; Heidary, M. Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Front Microbiol* **2021**, *12*, doi:10.3389/fmicb.2021.717045. 617–620
48. Marrakchi, H.; Lanéelle, M.A.; Daffé, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem Biol* **2014**, *21*, 67–85, doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.011. 621–622
49. Fish, W.R.; Holz, G.G.; Beach, D.H.; Owen, E.; Anekwe, G.E. The Cyclopropane Fatty Acid of Trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **1981**, *3*, 103–115, doi:10.1016/0166-6851(81)90010-4. 623–624
50. Fernandez-Prada, C.; Vincent, I.M.; Brotherton, M.C.; Roberts, M.; Roy, G.; Rivas, L.; Leprohon, P.; Smith, T.K.; Ouellette, M. Different Mutations in a P-Type ATPase Transporter in Leishmania Parasites Are Associated with Cross-Resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10*, doi:10.1371/journal.pntd.0005171. 625–628
51. Xu, W.; Mukherjee, S.; Ning, Y.; Hsu, F.F.; Zhang, K. Cyclopropane Fatty Acid Synthesis Affects Cell Shape and Acid Resistance in Leishmania Mexicana. *Int J Parasitol* **2018**, *48*, 245–256, doi:10.1016/j.ijpara.2017.09.006. 629–631
52. Efsthathiou, A.; Smirlis, D. Leishmania Protein Kinases: Important Regulators of the Parasite Life Cycle and Molecular Targets for Treating Leishmaniasis. *Microorganisms* **2021**, *9*, doi:10.3390/microorganisms9040691. 632–634
53. Chhajer, R.; Bhattacharyya, A.; Didwania, N.; Shadab, M.; Das, N.; Palit, P.; Vaidya, T.; Ali, N. Leishmania Donovanii Aurora Kinase: A Promising Therapeutic Target against Visceral Leishmaniasis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2016**, *1860*, 1973–1988, doi:10.1016/j.bbagen.2016.06.005. 635–637

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content

Review Article

Drug Nanoparticle Stability Assessment Using Isothermal and Nonisothermal Approaches

Javier Santamaría-Aguirre ¹, Robert Alcocer-Vallejo,¹ and Mónica López-Fanarraga²

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

²Grupo de Nanomedicina, IDVAL, Universidad de Cantabria, Santander 39011, Spain

Correspondence should be addressed to Javier Santamaría-Aguirre; jrsantamaria@uce.edu.ec

Received 30 April 2018; Revised 18 July 2018; Accepted 30 July 2018; Published 28 August 2018

Academic Editor: Victor M. Castaño

Copyright © 2018 Javier Santamaría-Aguirre et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Many drugs are administered in the form of liquid-dispersed nanoparticles. Frequently, one of the overlooked aspects in the development of this drug delivery system is the loss of efficacy and the degradation of the carried drugs. Estimating the shelf life of drug products implies the storage of samples under controlled conditions of temperature and humidity for different periods, ranging from months to years, delaying decisions during development, manufacturing, and commercialization. Adapting well-known isothermal and nonisothermal methods to nanoparticles would allow correlating kinetic parameters obtained in a single mathematical model and predicting the shelf life faster than traditional methods. Unlike the traditional approaches, the isoconversional method (i) considers drug products as heterogeneous systems, without a unique kinetic order, (ii) establishes a maximum percentage of degradation, (iii) assumes the same kinetics for all processes regardless of the conditions, and (iv) includes the influence of humidity by a modification of Arrhenius equation. This method serves in calculating the kinetic parameters and shelf life derived from them, in a few weeks. In the same way, nonisothermal treatments allow obtaining these parameters by differential scanning calorimetry. Samples are subjected to different heating rates to establish the temperature at which the thermal decomposition event occurs and, thus, to calculate in a few days the activation energy and the preexponential factor using the Kissinger method. But this approach has limitations: the isoconversional method does not consider crystalline state of the sample, while nonisothermal method ignores the effect of the storage conditions. Processing nanoparticles for isothermal and nonisothermal treatments would allow accurate and fast prediction of the drug-loaded nanoparticle shelf life correlating parameters obtained using a single mathematical model. The accuracy of the prediction would be assessed by comparison of estimated shelf life versus data coming from traditional stability studies.

1. Introduction

1.1. Nanoparticles as Drug Carriers. Nanotechnology offers different solutions in the development of new therapeutic strategies for the treatment of diseases where traditional solutions have already failed. As an important specific application, nanomedicine emerged, this is a new science with diverse therapeutic possibilities for the development of new treatments [1].

Many drugs are frequently supplied in the form of nanoparticles dispersed or not in a liquid for consumption. These particles have diameters in the range of one to several hundred nanometers and are presented in colloidal forms.

Poorly soluble drugs that have an average particle size between 200 and 600 nm are stabilized in suspension by surfactants and/or polymers in a dispersion media. In crystalline nanosuspensions, the drug is maintained with a decreased particle size and an increased surface area leading to a higher rate of dissolution [2] and thus better bioavailability. Nanoparticles intended for oral administration are often presented in nanosuspensions, commonly transformed into a solid paste to prevent sedimentation, cremation, and crystal growth. This facilitates drug administration, patient comfort, and medication compliance [2].

One of the main problems of nanoparticles in suspension is the great difference that they present in the saturation

solubility and the concentration gradient that can give rise to Ostwald maturation (small crystal dissolution to increase size of larger crystals). The process of producing nanoparticles can lead to (i) a crystalline or amorphous product, (ii) a mixture of both, or even (iii) a disordered phase. Amorphous nanoparticles are prone to particle growth due to Ostwald maturation; on the other hand, it can be highly unstable in the presence of small amounts of crystalline particles. In addition, the high surface energy of these particles triggers agglomeration of the drug crystals. These phenomena can be controlled by the addition of various additives to ensure adequate stabilization. The main function of the stabilizer is to coat the drug particles to prevent Ostwald maturation and agglomeration of the nanosuspension and to achieve a physically stable formulation by providing a steric or ionic barrier. Suitable wetting of drug particles as well as their electrostatic and steric stabilization by excipients is necessary to produce stable nanosuspensions [3, 4].

As it happens for many other nanoparticles of different natures, the industrial production of pharmaceutical nanoparticles is also carried out through two basic approaches: (i) bottom-up, upstream process and (ii) top-down, downstream process. The first consists of controlled precipitation or crystallization to make nanoparticles of desired size from the molecular state, while the latter technologies consist of mechanical wear of large drug powder into smaller particles. The relationship of production process in the stability of nanoparticles is not yet completely clarified, but it is highly probable that processes requiring high levels of mechanical energy, like top-down ones, affect the most.

To improve nanoparticle bioavailability, it is of prime importance to control their extent of dispersion and, therefore, an encapsulation process is required. In this respect, drug nanoparticles can be straightforwardly encapsulated in the presence of polymers, surfactants, and both. These polymeric nanoparticles have been extensively investigated in both pharmaceutical and medical fields because their subcellular size and biocompatibility with tissue and cells can serve in controlling their release properties *in vivo*. The most common methods to elaborate polymeric nanoparticles are based on solvent-based encapsulation such as selective nanoprecipitation in the presence of surfactants. It is now clear that the stability of heterogeneous particulate systems depends on the number of components. As the number of components increases, greater is the possibility of negative interactions of a physical or chemical type with deleterious effects over the stability of the particle.

Most of the characterization processes are performed in nanoparticle dispersions. These analyses are carried out in a very similar way to traditional studies, where the particle size, appearance, color, odor, and related impurities are analyzed. In addition, dispersion is also evaluated for zeta potential, crystalline state, dissolution, and *in vivo* efficacy. For an electrostatically stabilized nanodispersion, a suitable zeta potential is above +30 mV or below -30 mV and for a static and electrostatic stabilization, it must be above +20 mV and below -20 mV. Dynamic light scattering (DLS) is a fast and sensitive method, especially for determining particle sizes that are in the nanometer range, requiring only a small

amount of particles. Therefore, it is very suitable for routine measurements and development of early formulation, when only small amounts of API are available [5].

1.2. Stability Test for Drug Delivery Systems. Determining the stability of a pharmaceutical compound in the form of nanoparticles is critical in terms of safety and efficacy. These tests serve to recommend ideal storage conditions and to establish the effect of out-of-specification results or deviations on the manufacturing process. This will ultimately affect the safety, efficacy, or quality of a drug in the short term, medium term, or long term.

There are different stability tests to determine the shelf life of pharmaceutical forms. Official guidelines—such as those recommended by *International Conference of Harmonization, ICH Q1A (R2), Stability Testing of New Drug Substances and Products (2003)*—describe an isothermal process, where the sample is subjected to constant temperature and humidity conditions for a minimum period of 12 months in the case of long-term studies and 6 months for accelerated studies in order to determine the decreasing content of active principle during degradation, as well as changes in other parameters specific to the performance of the product such as degradation products, dissolution test, and appearance.

Traditional stability methods are based on the application of mathematical models that come from the kinetic theory of gases to wide variety of liquid, semisolid, and solid drug products. These tests are applied at different stages of drug product life cycle. In early stages, extreme conditions of temperature and humidity are investigated, not only to identify the degradation products that can be found in long-term storage but also to select the most promissory drug candidates. Other studies are also carried out a posteriori under less severe conditions to predict the shelf life of products.

In addition to these tests, real-time stability tests are performed over long periods (months to years). During these studies, the evolution of the degradation process is measured sampling at different time points. The reliability of data interpretation can be increased by including a batch of reference material, the characteristics of which have already been established.

In accelerated stability tests, samples are subjected to relatively high temperatures in order to cause an increase in degradation rate, in an attempt to reduce the time necessary to take decisions over safety, efficacy, and quality of medicines. These methods are used to predict drug shelf life or for comparison with alternative formulations. The most used is Arrhenius method, which determines the variation of the kinetic constant as a function of temperature; its application requires knowing the kinetic order of reaction.

1.3. Kinetics in Heterogeneous Drug Delivery Systems. The study of the rapidity of physical and chemical transformations is of great importance, since it has uses in many fields of industry, pharmacy, or chemistry, both in its processing conditions and in the storage of raw materials and products.

Most pharmaceutical nanoparticulated systems are highly complex and not homogeneous at molecular or atomic levels,

so approaches based on gas kinetic theory which assumes that each reactant molecule is surrounded mostly by vacuum probably are not the best. The transformations of substances in such systems comprise changes in physical state, crystallization, melting, solubility, chemical reactions, etc. that can be thermally stimulated by heating or cooling processes. The speed and form to which they are transformed are determined by the kinetic characteristic of the system [2].

The classical method of assessing pharmaceutical stability has three main problems that must be considered: First, a mathematical model that attempts to match the kinetics of solid substances must be created. The second element to be considered is the effect of relative humidity on the reaction kinetics, and the third lies essentially in the time required to perform the determination of stability [6].

From the classical perspective, chemical reactions can be fitted into a mathematical model with a certain kinetic order. Nevertheless, this approach may be appropriate when dealing with homogeneous systems, such as chemical reactions that occur in gaseous or liquid solution where the intensity at which the reaction takes place is a function of the total molecules present in the volume occupied by the system, in other words, the kinetic equations are expressed as a function of the concentration of the reactants. In the case of a heterogeneous system, a substance that reacts with an external agent is not mixed at the molecular level, and the reactants should be represented as individual phases, which interact at the interface. In pharmaceutical forms, the active pharmaceutical ingredient (API) may exist in several states, which may be modified as changes in temperature occur in the system. Parallel to the physical transformation, processes of chemical degradation can develop, which also modify the structure of the API and even of excipients. In such scenario, mathematical expressions describing the rate of degradation will be only approximated.

In the evaluation of the reaction kinetics in heterogeneous systems, the only concentration of importance is at the reaction interface, which cannot be quantified in a practical way; for this reason, the way of monitoring the development of the reaction is measuring the degree of conversion (α) of the reagent or the product [7]. Considering the above, the kinetics of transformation can be represented by

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha), \quad (1)$$

where α is the magnitude of the chemical or physical conversion, t is the time, T is the temperature, $f(\alpha)$ is the reaction model, and $k(T)$ is the proportionality constant whose value depends on temperature and is defined by Arrhenius equation:

$$k(T) = Ae^{-E_a/RT}, \quad (2)$$

where A is the collision factor, E_a is the activation energy, R is the constant proportionality of the ideal gas, and T is the system's temperature.

The degree of transformation can be defined in different ways, either as a decrease in the amount of the substance of interest or in the generation of a decomposition compound.

$$\alpha = \frac{\Delta C}{C_0}. \quad (3)$$

For the purposes of the present study, α is considered to be

$$\alpha = \frac{C_0 - C}{C_0}, \quad (4)$$

where α corresponds to the extension of change in a specific parameter of interest, the amount of degraded substance for example; in this particular case, C_0 is the initial concentration of substance and C is the amount of substance measured at time t [8].

For homogeneous systems, the chemical kinetics of reactions can be classified as first, second, and third order; in heterogeneous systems, models should be developed to describe the phenomena of kinetic transformation, and three main types of kinetic behaviors are identified and represented by isothermal curves α versus T : acceleration, deceleration, and linear sigmoidal.

In acceleration models, the degree of conversion α increases with time; on the contrary, in the deceleration models, the conversion rate decreases over time; sigmoidal ones share the characteristics of both and represent autocatalytic process. The three types of kinetics can spread on dozens of heterogeneous reaction models. Frequently, experimental data do not fit any model, or if it does, it will fit one of them at the beginning of the process and other at the end. The challenges increase when model fitting is performed on experimental data obtained in a nonisothermal run at a single heating rate, β [9].

To overcome this complexity, the isoconversion paradigm was developed: it allows the calculation of the Arrhenius equation constants, without the need to determine the order of the reactions.

1.4. Isoconversional Methods. The isoconversion is a methodology created by Kujirai and Akahira in 1925, who studied the decomposition of materials under isothermal conditions, allowing them the determination of the activation energy as a function of mass loss; in 1948, Dakin proposed some kinetic models in the decomposition of complex materials; and, in the 1950s, instrumentation was generated that allowed the study of materials under nonisothermal conditions.

Modern methods maintain the principle of isoconversion through flexible integration procedures for the determination of activation energy. Moreover, it has been observed that the activation energy obtained from the free models is independent of the heating rate, but certain studies indicate that there would be dependence of the heating range.

The kinetic isoconversion methods are based on the elimination of the reaction model from kinetic calculations. The principle states that the rate of conversion, under certain environmental conditions, depends solely

on temperature. For the experimental determination, it is necessary to establish a specification (broken line in Figure 1), an acceptance limit to which the samples must not reach, in a determined time, in order to remain safe and effective.

In plotting degradation versus time, the shape of the curve would be the same at different temperatures, being more pronounced at elevated temperatures and with a tendency to look like a straight line as the temperature decreases [10]. From Figure 1, it can be said that the lines k_1 and k_2 start from zero as the origin and can be described by

$$k_i = \frac{\alpha_i}{t_i} \quad (5)$$

If the degradation value α is the same for the lines k_1 and k_2 , one has to

$$k_1 t_1 = k_2 t_2 \quad (6)$$

It is possible to calculate the value of the kinetic constants based on a fixed degradation limit, regardless of the shape of the curve. Thereby, a sample submitted to intense conditions of temperature and humidity will reach a predetermined limit in a specific time. The isoconversion stability test uses some samples as maintained at different temperature and humidity conditions, in order to determine the values of the kinetic constants at different temperatures [6, 11, 12]. Unlike the gaseous or solution state kinetics, where the molecules react according to a reaction order, in nonhomogeneous systems, the molecules are arranged in multiple unbalanced states, characterized by their variable mobility, where each one can react to form products under their own kinetics. The kinetics of the set of states or phases is complex. In this situation, the isoconversion method is advantageous for the determination of degradation kinetics because it only considers the time to reach the specification [13]. There are some types of isoconversional methods.

Standard isoconversion method uses the logarithm of the exponential relation between degradation and time of the Arrhenius Equation, for data of an isothermal process, of the function $g(\alpha)$, which expresses the degree of conversion.

$$\ln g(\alpha) = \ln A - \left(\frac{E_a}{RT}\right) + \ln t \quad (7)$$

Friedman's method is a differential method expressed as

$$\ln \left(\frac{d\alpha}{dt}\right) = \ln A f(\alpha) - \left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (8)$$

Ozawa Flynn and Wall, who applies to data from non-isothermal process:

$$\log g(\alpha) = \log \left(\frac{AE_a}{R\beta}\right) + \ln p(x), \quad (9)$$

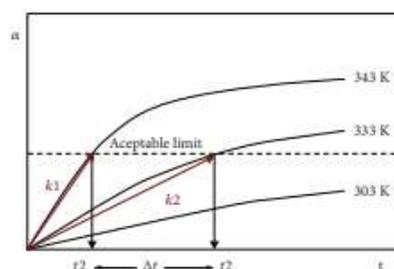


FIGURE 1: Relation between the degree of conversion and the time at different temperatures (graph based on [9]).

where $p(x)$ is the integral function of Arrhenius, x is equal to E_a/RT , and $\beta = dT/dt$ [2].

1.5. Moisture Effect. Moisture has a significant effect on the stability of the pharmaceutically active ingredient even if the reactions do not involve water molecules. As the temperature increases, the water content in the atmosphere for a given relative humidity value increases; however, the water activity depends only on the relative humidity (% RH) value [14]. One of the main effects of the relative humidity value is the loss or addition of water molecules of hydration in the crystalline forms of the active principle; in certain cases, this loss of water of hydration can result in the complete transformation of the API to the amorphous state, which may present a higher instability than the crystalline forms. For a given temperature, the effect of moisture on the kinetic constant can be represented by the following equation:

$$\ln k = B(\%RH) + C \quad (10)$$

This expression is called moisture sensitivity equation, where B and C are constants. The value of B usually ranges from 0.00 to 0.09; for example, under conditions of 10% RH, B will have a value of 0.00, and under conditions of 75% RH, B would have a value of 0.09.

1.6. Combining the Effect of Temperature and Relative Humidity. The combination of Arrhenius equations and moisture sensitivity [6] gives an equation that considers the effects of temperature and humidity on API stability.

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{E_a}{RT}\right) + B(\%RH) \quad (11)$$

This equation states that the rate of degradation, or kinetic constant, depends on temperature and relative humidity.

Because the equation has 3 constants A , E_a , and B and two independent variables, the minimum number of experiments required to solve the equation is three, being necessary to increase the number of points to improve the accuracy of the measurements [13]. In most studies, two to three weeks may be suitable to determine the shelf life of a product under

environmental conditions. Some authors suggest considering the variation of 5°C and 5% of RH for 14-day assay.

These measurements can be used to estimate the isoconversion time in each condition. (1) First, draw a line through the data to find the intercept with the limit specification. (2) The two points closest to the specification limit can be used to interpolate or extrapolate the time to reach the specification. (3) A single point closest to the specification can be used to determine $k = a/t$.

To determine the relationship between the variables with the degradation, two methodologies can be used: (1) transform the Arrhenius equation to the linear form and determine the constants by least squares regression and (2) make a least squares fit in the exponential form.

1.7. Accuracy of Accelerated Isoconversion Stability Studies.

The determination of the value of the constants in the corrected Arrhenius equation for moisture is associated with an imprecision value from the measurements. In addition, extrapolation is required in the axes of temperature and humidity, incorporating another imprecision factor. Applying an error propagation procedure in the corrected Arrhenius equation is mathematically complicated; instead, an approximation is used by simulation. The approach used is the Monte Carlo method, which provides variations at each temperature and relative humidity, within a certain range, and makes a least squares fit with all possible combinations. In the application of the simulation with the Monte Carlo method, a normal distribution and its standard deviation are assumed. The process comprises 5000 simulations, in order to build confidence limits for kinetic parameters [15]. In the development of the isoconversion stability test, it is necessary to consider the following: (i) the precision of the analysis will affect the accuracy of the shelf life, the improved result may increase the number of repetitions, but in many cases, it will not be necessary. (ii) Greater extrapolation in the magnitude of % RH or temperature generates a greater error of the predictions, (iii) for certain API's, broad extrapolations provide an acceptable determination. (iv) Conditions of low humidity levels and high temperatures can cause problems if physical changes are generated, such as dehydration and changes of crystalline forms.

1.8. Nonisothermal Methods. As previously stated, stability tests provide information on how the quality of an API, excipient, or drug delivery system changes as a function of time under the influence of environmental factors such as temperature, humidity, and light, in order to establish the shelf life of the compound and propose the best storage conditions.

The factors influencing the reaction rate of homogeneous systems, such as temperature, pressure, and composition, do not include factors characteristic of heterogeneous systems such as the matter transport between phases and the mode of interaction between these phases.

This leads to the use of standard methods to determine small changes in drug concentration, which have low sensitivity and therefore require the previous dissolution of the solid product, causing distortions in the test as a result of

the acceleration of the decomposition process when the compound is solvated.

Applying a nonisothermal treatment by differential scanning calorimetry would reduce the analysis period from months or years to a few days and reduce the problems related to the evaluation of heterogeneous systems.

In order to do that, some points have to be issued. First, it is necessary to create a mathematical model that could adjust to the kinetics that develops in condensed phases; the second element to be considered is the effect of the relative humidity on the reaction kinetics, and the third one is the necessary time to carry out the determination of the stability.

The traditional kinetic models state out that their postulates on the concentration monitoring as a function of time consider the system as homogeneous and accept the loss of precision by assuming a zero-order model for all reactions.

For heterogeneous systems, kinetic studies monitor the degraded fraction, α , as a function of time and reaction order models are much more varied than for liquids. To deal with the large number of models involved, isoconversional methods have been developed, which do not need to consider the reaction model, focusing instead on the failure time or shelf life, t_d , i.e., the time during the substance, which undergoes decomposition as a result of the conditions under which it is stored, is kept within acceptable limits.

The kinetic parameters of a decomposition reaction can be estimated using differential scanning calorimetry (DSC).

If a sample is subjected to different heating rates, β , in DSC, the maximum decomposition temperatures T_m increase as β increases.

According to Kissinger's method, if $\ln(\beta/T_m^2)$ is plotted as a function of the inverse of T_m , the activation energy of the reaction, E_a , can be determined from the slope of the line.

$$\ln\left(\frac{\beta}{T_m^2}\right) = a - b\left(\frac{1}{T_m}\right). \quad (12)$$

In which

$$a = \ln\left(\frac{AR}{E_a}\right), \quad (13)$$

$$b = \frac{E_a}{R}.$$

Once E_a is known, the value of A can be estimated by the expression:

$$A = \beta\left(\frac{E_a}{RT_m^2}\right) \exp(E_a/RT_m). \quad (14)$$

The values of the decomposition rate constant, k , can be calculated for a reference temperature, T , by

$$\log k = \log A - \left(\frac{E_a}{2.3RT}\right). \quad (15)$$

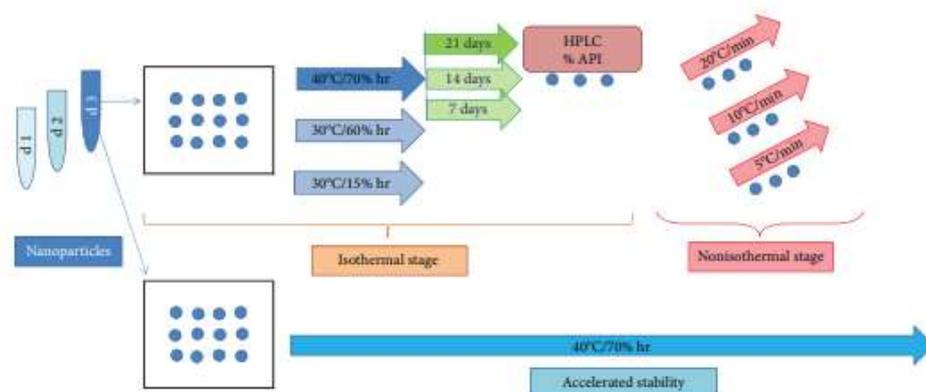


FIGURE 2: Schematic representation of methodology combining isothermal isoconversional and nonisothermal approaches for the assessment of shelf life in nanoparticles.

Low E_a values would imply a lower energy barrier to be overcome for degradation to occur and, therefore, less stability; low values of k would indicate longer times until the substance comes out of the specification by decomposition.

The shelf life of a drug delivery system is the period during it remains under the acceptable limits, for example, an API content $\geq 95\%$ (or a value of $\alpha = 0.05$); it can be calculated by

$$t_{\alpha} = \frac{-\ln(1 - (\alpha/100))}{Ae^{(-E_a/RT)}} \quad (16)$$

where the reference temperature, T , is 298.15 K (25°C) [16].

The kinetic parameters and the shelf life time are used to compare API from different batch, manufacturer, time, or storage conditions and make inferences about their stability and decomposition progress. In the case of drug delivery systems, decisions can be made about which formulation has the greatest stability or whether a formulation in the process of development is similar or not to a market one, of known stability.

The validity of the predictions of shelf life must be verified because the calculations are made by assuming that (i) the reactions are of first order; (ii) the values of the kinetic parameters are similar for the temperatures in the study range; and (iii) the effect of moisture is not significant. Studies that propose new methods of analysis or that provide specific information on an active principle such as kinetic parameters and degradation pathways are very useful in the pharmaceutical industry because they can save resources, as well as guarantee the safety, quality, and effectiveness of medicines.

Thermal analysis techniques such as differential scanning calorimetry (DSC) allow the characterization and identification of physicochemical changes in the solid state of different compounds, thus streamlining the process of reformulation and development of drugs and substances

of pharmacological interest. Its use is not limited solely to the determination of purity, polymorphs, solvates and hydrates, melting point, and component quantification but also allows the characterization of the surface properties of powders, such as humectants, adsorbents, and surface energy, thus constituting a useful tool in decision making in the case of problems related to the production process.

Another advantage of using a nonisothermal method is that it is not based on any assumptions about the reaction mechanism and thus does not require any prior knowledge of the initial concentration of the API, which eliminates the prolonged reaction times and storage requirements required by conventional techniques.

It also allows the saving of money, labor, and amount of drug used and decreases the generation of waste, which even lowers the cost of the drug, making it more accessible for the population.

Finally, by combining isothermal isoconversional and nonisothermal method, their individual limitations could be overwhelmed, allowing a faster and accurate shelf life estimation that could be contrasted against data obtained from accelerated or long-term stability studies. This proposal is schematized in Figure 2.

1.8.1. Isothermal Stage. Nanoparticles should be weighted in 18 open aluminum capsules for DSC; all the capsules of the same type of nanoparticle (d1, d2, or d3) are placed in specially designed supports, subjecting the nanoparticles to the established humidity and temperature conditions (3 different conditions). Keep the nanoparticles to the selected conditions during the selected time (3 storage times). Quantify by HPLC the amount of API remaining in 3 capsules at 7, 14, and 21 days.

1.8.2. Nonisothermal Stage. For T_m determination, submit the remaining 9 capsules of isothermal stage at three different

heating rates (3 capsules for each speed). Calculate the kinetic parameters for the isothermal and nonisothermal methods.

1.8.3. Accelerated Stability Study Stage. Another set of 12 samples will be subjected to 40°C and 75% RH in accelerated traditional stability study. Samples will be taken at 1, 2, 3, and 6 months and analyzed for API content.

Using the API remaining quantity in each sample, corresponding to each temporal point, elaborate confidence hyperbola to establish the shelf life.

The accuracy of the estimated shelf life will be assessed by comparison with long-term stability data. A mathematical model to predict shelf life stability should be established.

2. Conclusions

The development of a fast and reliable method to assess shelf life nanoparticles by isothermal and nonisothermal methods allows to calculate its kinetic parameters and to establish a mathematical model to estimate its shelf life.

The accuracy of mathematical model could be assessed by comparison of predicted shelf life versus results coming from long-term stability studies.

Isothermal isoconversional methods and nonisothermal treatments could allow the establishment of mathematical predictors of stability with less uncertainty than traditional approach for nanoparticles.

Conflicts of Interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

This work was supported by IDIVAL INVAL17/11.

References

- [1] D. Ag Selec, M. Selec, J. G. Walter, F. Stahl, and T. Scheper, "Niosomes as nanoparticulate drug carriers: fundamentals and recent applications," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2016, Article ID 7372306, 13 pages, 2016.
- [2] W. W. L. Chin, J. Parmentier, M. Widzinski, E. N. H. Tan, and R. Gokhale, "A brief literature and patent review of nanosuspensions to a final drug product," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 103, no. 10, pp. 2980–2999, 2014.
- [3] J. R. G. Sander, B. W. Zeiger, and K. S. Suslick, "Sonocrystallization and sonofragmentation," *Ultrason Sonochem*, vol. 21, no. 6, pp. 1908–1915, 2014.
- [4] A. A. Lonare and S. R. Patel, "Antisolvent crystallization of poorly water soluble drugs," *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, vol. 4, no. 5, pp. 337–341, 2013.
- [5] S. Khan, M. MatasDe, J. Zhang, and J. Anwar, "Nanocrystal preparation: low-energy precipitation method revisited," *Crystal Growth & Design*, vol. 13, no. 7, pp. 2766–2777, 2013.
- [6] W. R. Porter, "Degradation of Pharmaceutical Solids Accelerated by Changes in Both Relative Humidity and Temperature and Combined Storage Temperature and Storage Relative Humidity (T×h) Design Space for Solid Products," *Journal of Validation Technology*, vol. 2002, no. 2, 2013.
- [7] S. Vyazovkin and C. A. Wight, "Isothermal and non-isothermal kinetics of thermally stimulated reactions of solids," *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 17, no. 3, pp. 407–433, 1998.
- [8] S. V. Vyazovkin, "A time to search: finding the meaning of variable activation energy," *Phys Chem Chem Phys*, vol. 18, no. 28, pp. 18643–18656, 2016.
- [9] S. Vyazovkin, *Isoconversional Kinetics of Thermally Stimulated Processes*, Springer International Publishing Switzerland, 2015.
- [10] K. C. Waterman, L. Chen, P. Waterman, C. B. MacDonald, A. P. Monahan, and G. Scrivens, "Modeling of in-use stability for tablets and powders in bottles," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 42, no. 10, pp. 1571–1578, 2016.
- [11] W. R. Porter, "Stability by Design," *Journal of Validation Technology*, vol. 17, no. 3, pp. 82–96, 2011.
- [12] P. Simon, "Isoconversional methods - Fundamentals, meaning and application," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 76, pp. 123–132, 2004.
- [13] K. C. Waterman, "The application of the accelerated stability assessment program (ASAP) to quality by design (QbD) for drug product stability," *AAPS PharmSciTech*, vol. 12, no. 3, pp. 932–937, 2011.
- [14] M. Fu, M. Perlman, Q. Lu, and C. Varga, "Pharmaceutical solid-state kinetic stability investigation by using moisture-modified Arrhenius equation and JMP statistical software," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 107, pp. 370–377, 2015.
- [15] K. C. Waterman, A. J. Carella, M. J. Gumkowski et al., "Improved protocol and data analysis for accelerated shelf-life estimation of solid dosage forms," *Pharmaceutical Research*, vol. 24, no. 4, pp. 780–790, 2007.
- [16] L. Campanella, V. Micieli, M. Tomassetti, and S. Vecchio, "Kinetic investigation and predictive model for the isothermal degradation time in two commercial acetylsalicylic acid-based pharmaceutical tablet formulations," *Thermochimica Acta*, vol. 526, no. 1–2, pp. 151–156, 2011.