

SESQUICENTENARIO
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea

ALEX ARBEY LOPERA SEPÚLVEDA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de minas, Departamento de materiales, Escuela de física
Medellín, Colombia

2017

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea

Alex Arbey Lopera Sepúlveda

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ingeniería – Ciencia y Tecnología de Materiales

Directora:

Ph.D. Claudia Patricia Garcia Garcia

Codirector:

Ph.D. Sara Maria Robledo Restrepo

Línea de Investigación:

Materiales cerámicos avanzados

Grupo de Investigación:

Cerámicos y vítreos (C y V)

Programa de estudio y control de enfermedades tropicales (PECET)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de minas, Departamento de materiales, Escuela de física

Medellín, Colombia

2017

A la memoria de Tulia Osorio

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Claudia Patricia García García, por su invaluable acompañamiento personal y académico.

A mi codirectora, por brindarme las herramientas de trabajo necesarias para poder llevar a feliz término este trabajo de investigación y a Andrés Montoya.

A la profesora Marcia. A Graminha por abrirme las puertas de su grupo de investigación y poner a mi disposición su conocimiento e infraestructura.

A la Profesora María Aparecida Zaghete Bertochi, por sus asesorías de gran valor académico durante el desarrollo de mi tesis.

A todos mis compañeros de trabajo del grupo de Cerámicos y Vítreos, en especial, Andrés Chavarriaga.

A todos mis compañeros de trabajo del grupo de Parasitología y análisis clínica de la Universidad Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, en especial, Ángela Arenas.

Al Grupo de Investigación LIEC y la red de laboratorios CDMF.

A la Academia Mundial de Ciencias y el “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (TWAS-CNPq) por la financiación en el programa de becas de doctorado “sandwich”.

A Colciencias, Convocatoria 6172 Doctorados Nacionales.

A Katherine Vidal y mis amigos Vinicius Nonato, William Ribeiro, Sara y Benjamín Zuluaga.

Amparo Roldan por la motivación durante toda mi vida.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad de origen parasitario presente en más de 98 países, con una incidencia anual aproximada de 2 millones de casos. En Colombia es una enfermedad endémica presente en casi todos los departamentos. Las formas de tratamiento actuales consisten en terapias de administración de fármacos (parenteral), principalmente de compuestos antimoniales pentavalentes. Los efectos adversos de esta terapia radican en que muchos de estos compuestos presentan un grado de toxicidad que alteran la salud del paciente con la aparición de efectos secundarios como náuseas, fiebre, dolor etc. Trayendo consigo el abandono de la terapia antes de su culminación tendiendo a cuadros clínicos de recaídas y desarrollo de resistencia del parásito al medicamento, por lo que el avance en los fármacos actuales y en las terapias tratamiento se hacen indispensables. Una terapia de interés actual para el tratamiento de enfermedades localizadas es la terapia fotodinámica (TF), que consiste en la aplicación de un compuesto fotosensible que mediante la radiación apropiada preferiblemente en el rango visible produce especies oxidantes y/o reductoras que atacan en forma directa o indirecta la enfermedad. La Hipericina (HY) es un compuesto fotosensible, al que recientemente se le ha demostrado efecto anti-*Leishmania* bajo activación en el rango visible. Este compuesto es poco soluble en agua, requiere soluciones etanólicas o solventes orgánicos aumentando la posibilidad de agregación, baja selectividad (posibilidad de que el paciente presente fotosensibilidad) y la dificultad de garantizar la dosis adecuada del fotosensibilizador con la radiación apropiada de luz. Para superar estas desventajas, en el presente trabajo, se encapsuló la HY en nanopartículas de fosfatos de calcio (FC) obtenidas mediante dos rutas químicas de combustión en solución (Síntesis 1 y síntesis 2) encontrando que la encapsulación de la HY reduce notablemente la cantidad necesaria del medicamento para producir efecto antileishmaniasis. Además se encontró que las partículas de FC presentan por si mismas un efecto antiparasitario. También se sintetizaron nanoestructuras de dióxido de titanio por combustión en solución (TiO_2), con el fin de usarlas directamente o en asociación con principios activos como la HY para el tratamiento de la LC. Con el fin de mejorar la respuesta óptica del TiO_2 en la región visible, éste fue dopado con platino ($\text{TiO}_2 + \text{Pt}$), con hierro ($\text{TiO}_2 + \text{Fe}$) y con cinc ($\text{TiO}_2 + \text{Zn}$). El dopaje del TiO_2 favoreció la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando fue sometido a irradiación visible entre 400-800 nm siendo el Pt y el Zn los elementos que favorecieron la mayor producción de ROS en el rango visible. Las pruebas de citotoxicidad in vitro realizadas en macrófagos peritoneales de ratones mostraron que los compuestos de dióxido de titanio no presentan citotoxicidad significativa bajo condiciones de oscuridad o al ser expuestos a la irradiación visible. Los compuestos de TiO_2 dopados con Pt y Zn presentaron una buena actividad antileishmaniasis, al ser irradiados bajo luz visible, siendo el compuesto con Zn el que presentó mayor actividad antiparasitaria.

Experimentos *in vivo* realizados en el modelo hámster y modelo ratones Balb/C para los compuestos de FC + HY y los compuestos de TiO₂ Zn-HY respectivamente, mostraron una reducción de la lesión en los hámster del 48%, y en el caso del TiO₂ Zn-HY se presentó una reducción de la carga parasitaria de *Leishmania amazonensis* del 50 %. Sin embargo, no fue posible identificar una disminución significativa en el tamaño de la herida de los animales en este último. Estos resultados despiertan interés para plantear estudios futuros en los que se proponga la terapia fotodinámica como una alternativa para el tratamiento de la LC o la combinación de la misma con las técnicas actuales para mejorar su eficiencia.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease that is present in more than 98 countries, with an annual incidence of approximately 2 million cases. In Colombia, it is an endemic disease present in almost the entire country. The current ways of treatment consist of drug administration (parenteral) therapies, mainly pentavalent antimonial compounds. Many of these compounds have different degrees of toxicity that affect the patient's health and with side effects such as nausea, fever, pain, etc. These side effects encourage the patient to abandon the therapy before its end, tending to relapses and the development of resistance of the parasite to the drug. It is for this reason that the advance in current drugs and treatment therapies becomes indispensable. One therapy of current interest in localized diseases is photodynamic therapy (PT), which consists in the application of a photosensitive compound that by means of the appropriate radiation, mainly in the visible region, produces oxidizing and/or reducing species that attack directly or indirectly the disease. Hypericin (HY) is a photosensitive compound, which has recently been shown to have an anti-*Leishmania* effect under visible light activation. This compound is poorly soluble in water, requires ethanolic solutions or organic solvents increasing the possibility of aggregation, has low selectivity (possibility of the photosensitivity's patient), and finally, it is difficult to guarantee the adequate dose of the photosensitizer with the appropriate light radiation. To overcome these disadvantages, in the present work, the HY was encapsulated in calcium phosphate nanoparticles (CP) obtained through two chemical routes of combustion in solution (synthesis 1 and synthesis 2) finding that the encapsulation of the HY significantly reduced the amount needed of the drug to produce antileishmaniasis effect. Furthermore, it was found that the CP particles themselves have an antiparasitic effect. Titanium dioxide (TiO₂) nanostructures were also synthesized by combustion in solution, in order to use them directly or in association with active principles such as HY for the treatment of cutaneous leishmaniasis (CL). In order to improve the optical response of TiO₂ in the visible region, it was doped with platinum (TiO₂ + Pt), iron (TiO₂ + Fe) and zinc (TiO₂ + Zn). Doping of TiO₂ favored the production of reactive oxygen species (ROS) when it was subjected to visible radiation between 400-800 nm. Pt and Zn were the elements that favored the highest production of ROS in the visible. *In vitro* cytotoxicity tests performed on peritoneal mouse macrophages showed that TiO₂ compounds did not exhibit significant cytotoxicity under dark conditions or when it was exposed to visible irradiation. The TiO₂ compounds doped with Pt and Zn showed good antileishmania activity when they were irradiated under visible light being the compound with Zn the one that showed the highest anti-parasitic activity. *In vivo* experiments performed on Balb/C mice showed that the TiO₂-Zn-HY compound showed a 50% reduction of the parasitic load of *L. amazonensis*. However, it was not possible to identify a significant decrease in the animals wound size. These results are interesting to propose future studies in which photodynamic therapy is proposed as an alternative for the treatment of CL or the combination of PT with current techniques to improve its efficiency.

1. Contenido	
RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
1. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO	16
1.1 Leishmaniasis	18
1.1.1 Terapia fotodinámica en el tratamiento de leishmaniasis cutánea como alternativa de tratamiento.....	22
1.1.2 Activación de estructuras de dióxido de titanio en el rango visible	29
1.1.3 Síntesis de fosfatos de calcio, dióxido de Titanio y la combustión en solución.....	31
1.1.3.1 Combustibles-Oxidantes	35
1.1.3.2 Relación Combustible Oxidante.....	36
1.1.3.3 Temperaturas Características	36
2. OBJETIVOS	38
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	42
3.1 Síntesis de los sistemas de encapsulación	44
3.1.1 Síntesis de las nanoestructuras de fosfato de calcio esféricas (Síntesis 1)	44
3.1.2 Síntesis de las nanoestructuras de fosfato de calcio tipo whiskers, agujas o varillas (Síntesis 2).....	45
3.1.3 Síntesis de las estructuras de TiO ₂ dopadas con Pt, Fe, Zn (Síntesis 3)	46
3.2 Caracterización estructural de los polvos obtenidos en las rutas de síntesis	46
3.3 Encapsulación de Hipericina (HY) en las estructuras de fosfatos de calcio sintetizadas..	46
3.4 Evaluación indirecta de producción de especies ROS	47
3.5 Cuantificación de la carga del fármaco HY en las estructuras de fosfatos de calcio	47
3.6 Ensayos biológicos	48
3.6.1 Ensayos realizados con fosfatos de calcio (Síntesis 1-2)	48
3.6.2 Ensayos realizados con dióxido de titanio.....	52

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1	Síntesis y caracterización	57
4.1.1	Fosfatos de Calcio Síntesis 1.....	57
4.1.2	Fosfatos de calcio Síntesis 2.....	59
4.1.3	Estructuras de Dióxido de titanio. Síntesis 3.....	65
4.1.4	Posibles Mecanismos de combustión.....	71
4.2	Encapsulación de la Hipericina en los fosfatos de calcio.....	74
4.2.1	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	74
4.2.2	Espectrofotometría de Fluorescencia y Absorbancia	76
4.2.3	Cuantificación de la encapsulación de Hipericina.....	78
4.2.4	Medidas de producción de especies ROS de los fosfatos de calcio cargados con HY....	79
4.3	Ensayos Biológicos <i>in vitro</i>	80
4.3.1	Resultados fosfatos de calcio	80
4.3.2	Resultados compuestos de dióxido de titanio.....	87
5.	CONCLUSIONES	99
5.	Anexo 1.....	103
6.	REFERENCIAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo de vida de la Leishmania, figura adaptada de “Visceral leishmaniasis and Natural Infection Rates of Leishmania in Lutzomyia longipalpis in Latin America Karita y colaboradores” [9].....	19
Figura 1.2 Cambio en la estructura electrónica de un compuesto semiconductor con el incremento de las unidades atómicas N	22
Figura 1.3 Estado fundamental de un fotosensibilizador y paso a los estados energéticos excitados singlete y triplete.	23
Figura 1.4 Ejemplo del estado singlete y triplete de un fotosensibilizador y su transferencia de carga a un átomo de oxígeno para formar singletes de oxígeno.....	23
Figura 1.5 Mecanismos de encapsulación del fármaco en las estructuras de FC.....	28
Figura 1.6 Posibles Interacciones entre el fármaco y la estructura de los FC A) Fármaco libre B) Fármaco interactuando con los FC C) Fármaco libre y precipitado.....	28
Figura 1.7 Mecanismos de liberación del fármaco de las estructuras de FC A) liberación por difusión a través de los poros interconectados B) Reabsorción del FC y liberación más rápida. C) Formación de capa apatítica que retarda la liberación [13].....	29
Figura 1.8 Mecanismo de Fotogeneración de par electrón-hueco en la estructuras de banda del TiO ₂	30
Figura 1.9 Estados de energía intermedios asociados al dopante Pt [69].....	31
Figura 3.1 Esquema de la metodología utilizada para alcanzar los objetivos de este trabajo	44
Figura 3.2 Metodología de conformación del parche mediante hilado por extrusión de doble husillo	51
Figura 4.1 Difractogramas de rayos X para los polvos obtenidos por combustión en solución antes (Ceniza) y después del tratamiento térmico.	57
Figura 4.2 Espectrofotometría Raman para las cenizas y polvos tratados térmicamente obtenidas por combustión en solución.....	58
Figura 4.3 Imágenes SEM de los polvos de fosfato de calcio obtenido por combustión en solución y tratado térmicamente a 800°C durante dos horas.	59
Figura 4.4 Difractogramas de Rayos X para las muestras Y0, Y1, Y5.....	60
Figura 4.5 Espectros Raman para las muestras en función del contenido de sal Yn	60
Figura 4.6 Imágenes SEM de los polvos correspondientes a la muestra Y1 A) Sometidas a lavado y filtración B) Sometidas a lavado, filtración y tratamiento en ultrasonido.....	61
Figura 4.7 Foto micrografías SEM de las muestras A) Y0 B) Y1 C) Y2 D) Y3 E) Y4 F) Y5 .	62
Figura 4.8 Histogramas resultantes de las distribuciones de las medidas de longitud y diámetro de los materiales obtenidos por combustión asistida por sal.....	63
Figura 4.9 Difractogramas de Rayos x de las polvos de TiO ₂ dopados obtenidos por combustión en solución.	65
Figura 4.10 Ajustes de los Refinamiento Rietveld de las muestras de TiO ₂ A) sin dopante B) dopadas con hierro C) dopadas con platino D) Dopadas con cinc.	66

Figura 4.11 . Microscopia electronica de barrido y emission de campo de las nanopartículas de TiO ₂ y TiO ₂ dopados A) TiO ₂ + Fe B) TiO ₂ + Zn C) TiO ₂ + Pt D) TiO ₂	69
Figura 4.12 Microscopia electrónica de transmisión para las muestras de TiO ₂ obtenidas por combustión en solución.....	69
Figura 4.13 Gráfica longitud de onda vs absorbancia de los polvos de TiO ₂ dopados.....	70
Figura 4.14 Variación de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo de la molécula de prueba H ₂ DCFDA en presencia de las nanopartículas de TiO ₂ con y sin dopaje.	71
Figura 4.15 Espectros Infrarrojos de los fosfatos de calcio obtenidos mediante la síntesis 1 y 2...	74
Figura 4.16 Picos de confirmación de la fase B-TCP.	75
Figura 4.17 Espectros FTIR de los compuestos de fosfatos de calcio tratados térmicamente con encapsulación de la HY.....	76
Figura 4.18 Espectros de absorción y emisión A) HY sola B) HY cargada en fosfatos de calcio..	76
Figura 4.19 Curva de calibración de la concentración de HY vs. la intensidad usada para la cuantificación de la cantidad de HY encapsulada en los fosfatos de calcio.....	78
Figura 4.20 Medida de producción indirecta de oxígeno singlete por la HY encapsulada en los fosfatos de calcio, monitoreada por la fluorescencia de la sonda SOGs.	79
Figura 4.21 Imágenes de microscopia de fluorescencia de los cultivos de las células con los compuestos de fosfatos de calcio + compuesto fluorescente observadas con filtro 580nm-680nm A) 2 horas B) 4 horas C) 6 horas para varios tiempos de encubación.....	81
Figura 4.22 Espectro de emisión de la lámpara usada para los ensayos biológicos de los compuestos de fosfatos de calcio.	82
Figura 4.23 Diagrama del posible mecanismo de encapsulación, incorporación a las células, liberación y producción de especies ROS de la HY encapsulada en fosfatos de calcio.....	85
Figura 4.24 A) Microscopia electrónica de barrido para el parche B) Análisis químico EDS	86
Figura 4.25 Microscopia de barrido para los hilos usados para la conformación del parche.....	86
Figura 4.26 Fotos representativas de un hámster perteneciente a cada grupo de tratamiento.....	87
Figura 4.27 . Captación de los compuestos de TiO ₂ + extracto fluorescente medidos por microscopia de fluorescencia a) 2 horas b) 4 horas c) 6 horas	89
Figura 4.28 Imágenes de microscopia óptica tradicional A-B) Control de macrófagos sin presencia de compuesto C) Macrófagos incubados 2 horas con 10ug/mL de Nanopartículas de TiO ₂ D) Macrófagos incubados 2 horas con 20 ug/mL de Nanopartículas de TiO ₂	90
Figura 4.29 Espectro de emisión de la lámpara usada en los ensayos in vitro de los compuestos de dióxido de titano.....	91
Figura 4.30 Efecto In vitro de los compuestos de TiO ₂ con y sin dopante en macrófagos peritoneales de mamífero.	91
Figura 4.31 Fotos de la lesión de los ratones sometidos a irradiación visible y con filtro, los puntos verdes corresponden a la emisión de la HY.	94
Figura 4.32 Fotos de la evolución de las heridas de los ratones durante las tres semanas de tratamiento Grupo 2) Control Grupo 3) tratados con anfotericina B, Grupo 4) Tratados con PBS Grupo 5) tratados con EC ₅₀ /2 Grupo 6) Tratados con EC ₅₀ , Grupo 7) Tratados con 2EC ₅₀	96
Figura 4.33 Tamaño de la herida de los grupos tratados, medidas durante el tratamiento en días alternados.	96

Figura 4.34 Eficácia in vivo de los compostos de titanio ,y anfotericina B . El índice de infección fue calculado mediante dilución limitante. Datos expresados em média \pm DS $p < 0,05$ 98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Características de algunos fármacos usados en el tratamiento de la leishmaniasis [12, 13]	20
Tabla 1.2 Tipos de fosfatos de calcio según su relación Ca/P adaptada del libro “calcium phosphates in biological and industrial systems” [11]	27
Tabla 1.3 Resumen de algunas técnicas de síntesis usadas en la obtención de fosfatos de calcio. .	32
Tabla 1.4 Algunas técnicas de síntesis usadas en la obtención de estructuras de TiO ₂	34
Tabla 4.1 Valores utilizados para el análisis estadístico para la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis en este experimento	64
Tabla 4.2 Resultados del estadístico de prueba.....	64
Tabla 4.3 Resultados del análisis entre grupos para las muestras con diferentes contenidos de sal (Yn).Las Medidas con una letra común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$)	65
Tabla 4.4 Relación de fases y tamaño de cristalito obtenido por refinamiento Rietveld de las muestras de TiO ₂ dopadas.	67
Tabla 4.5 Entalpías de formación y calor específico asociado a los reactivos y productos.	72
Tabla 4.6 Resultados de área superficial BET (B runauer, E mmett, T eller) y BJH (Harkins y Jura., Halsey	79
Tabla 4.7 Resultados biológicos in vitro de la concentración citotóxica CC ₅₀ y la concentración efectiva CE ₅₀ de los compuestos de fosfatos de calcio obtenidos por la síntesis 1 (FC1) y síntesis 2 (FC2).	82
Tabla 4.8 Actividad antileishmania (EC ₅₀ , Concentración media inhibitoria) y toxicidad en células de mamífero (CC ₅₀ , concentración citotóxica media) de NPs de TiO ₂ en presencia de luz y su índice de selectividad ($IS = CC_{50}/EC_{50}$). Los datos fueron expresados como el promedio \pm SD, $p < 0.05$. ND: no efectivo (EC ₅₀ 50 μ g/mL); ND: no determinado	92

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviación	Nombre
DRX	Difracción de rayos X
SEM	Microscopia electrónica de escaneo o barrido
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TF	Terapia Fotodinámica
HY	Hipericina
FC	Fosfatos de calcio
TiO ₂ + Pt	Dióxido de titanio dopado con platino
TiO ₂ + Zn	Dióxido de titanio dopado con zinc
TiO ₂ + Fe	Dióxido de titanio dopado con hierro
ROS	Especies reactivos de oxígeno
LC	leishmaniasis Cutánea
LV	leishmaniasis Visceral
OMS	Organización Mundial de la salud
FS	Fotosensibilizador
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
<i>Ca/P</i>	Relación molar de calcio a fosfato
HAP	Hidroxiapatita
β-TCP	Fosfato tricálcico fase β
SCS	Síntesis de combustión en solución
FE-SEM	Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo
NPs	Nanopartículas
SOSG	Singlet Oxygen Sensor Green
H ₂ DCFDA	2',7' -dichlorofluorescein diacetate
huMDM	Macrófagos derivados de monocitos humanos
CC ₅₀	Concentración citotóxica necesaria para reducir la población de células en un 50%
PBS	Buffer de fosfato salino
CE ₅₀ .	Concentración efectiva necesaria para reducir la población de parásitos en un 50%
SFB	Suero fetal bovino
FC1	Fosfatos de calcio obtenidos mediante la ruta de síntesis 1
FC2	Fosfatos de calcio obtenidos mediante la ruta de síntesis 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
IS	Índice de selectividad
MB	Azul de metileno

1. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO

1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que pertenece al grupo de enfermedades infecciosas olvidadas según la OMS [1, 2] causada por un parásito protozoario del género *Leishmania* perteneciente a la familia Trypanosomatidae [3, 4]. Actualmente afecta aproximadamente a 12 millones de personas en el mundo con una tasa de 2 millones de casos nuevos por año y se calcula que hay cerca de 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad [1, 5]. En el año 2016 Colombia paso a ocupar el primer puesto en el país con más especies del parásito *Leishmania*, puestos anteriormente ocupados por Brasil y Venezuela. El sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública -SIVIGILA, al 2016 registro total en sus bases de datos acumulo 10743 casos de leishmaniasis, de los cuales 10561 casos fueron confirmados como leishmaniasis cutánea (LC) , la forma clínica más prevalente en el país, 122 casos confirmados de leishmaniasis mucosa y 60 casos confirmado para la forma visceral [6-8].

El ciclo de vida de la *Leishmania* (Figura 1.1) comienza en un reservorio animal tal como mosquitos (flebotomos), caninos o algunas especies de roedores. En el caso del hospedero vertebrado como el humano, el ciclo de vida de la *Leishmania* inicia cuando el promastigote metacíclico es inoculado por la picadura del flebotomo [8]. Posteriormente es captado por los macrófagos dermales y neutrófilos, el parásito se aloja en el fagolisosoma y pasa a su forma amastigote en el cual inhibe y es resistente a los procesos microbicidas de la célula. Allí inicia un proceso de desarrollo y multiplicación hasta que rompe el macrófago, diseminándose por toda la región infectada hasta ser engullido por otros macrófagos continuando su proceso multiplicativo generando una respuesta anti-inflamatoria y la formación de la lesión. La diseminación alcanza regiones no sólo a nivel de la dermis sino también en lugares ricos en células macrofágicas como la médula ósea, el bazo o el hígado. El parásito vuelve a su vector cuando por ejemplo el flebotomo pica el hospedero a fin de alimentarse de su sangre. Allí el parásito en su forma amastigote se transforma en promastigote procíclico y se multiplica por fisión binaria desarrollándose luego a formas promastigotes metacíclicos con capacidad infectiva para los reservorios. El ciclo se repite cuando el vector pica nuevamente al hospedero.

Dependiendo del sitio donde se aloje el parásito, la infección puede afectar la piel, las mucosas o las vísceras. Las características clínicas de la enfermedad varían de acuerdo con el género de *Leishmania*, la respuesta inmune y la evolución de la misma enfermedad. Las formas clínicas de la Leishmaniasis son: cutánea (L.C) [3], mucosa (mucocutánea) (L.M) y visceral (LV). Las dos primeras son enfermedades de la piel y las mucosas, que comienzan con la aparición de un absceso que va creciendo convirtiéndose, en muchos de los casos, en una úlcera indolora localizada y en otros en una úlcera diseminada. Estas lesiones pueden cicatrizar espontáneamente en meses o persistir durante uno o más años [2]. La leishmaniasis visceral es de carácter crónico y de progresión lenta. Sin tratamiento, esta enfermedad puede

ser mortal. Los síntomas pueden aparecer de forma gradual o abruptamente. Por lo general sus síntomas van desde dolor, fiebre intermitente, malestar general, anorexia, enflaquecimiento progresivo, palidez y hemorragias.

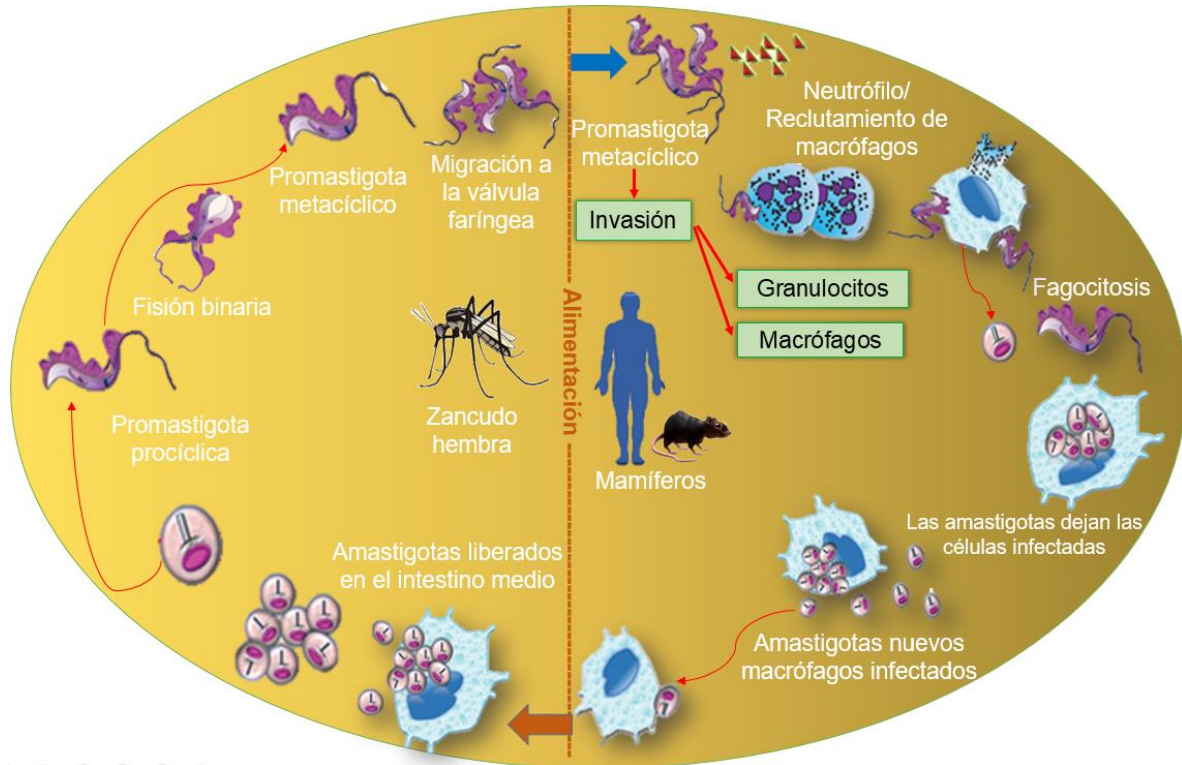


Figura 1.1 Ciclo de vida de la *Leishmania*, figura adaptada de “Visceral leishmaniasis and Natural Infection Rates of *Leishmania* in *Lutzomyia longipalpis* in Latin America Karita y colaboradores” [9]

Por más de 70 años, el tratamiento de la leishmaniasis ha consistido en primera instancia en la administración inicial de una primera línea de fármacos, como son las sales antimoniales pentavalentes [10], el antimonio de meglumina (glucantime®), el estibogluconato de sodio ((Pentostam®) y la miltefosina. Los tiempos de tratamiento varían de acuerdo a la forma clínica de leishmaniasis y las condiciones del paciente pero puede durar hasta un mes aproximadamente. Sin embargo, la alta cantidad de efectos adversos, los tratamientos prolongados, los costos elevados y recaídas (por encima de un 25% de los casos) son las principales limitaciones de estos fármacos [4]. Algunos medicamentos correspondientes a una segunda línea de acción son la pentamidina y la anfotericina B los cuales han mostrado ser más efectivos pero aun así presentan efectos adversos como problemas miocárdicos y nefrotóxicos, escalofríos, fiebre, vómitos, pudiendo aparecer también anafilaxis, enrojecimiento facial, dolores musculares y articulares, cefalea, anorexia etc. Con frecuencia estos síntomas son más marcados en los primeros días del tratamiento. Para mejorar la

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmania Cutánea

toxicidad se ha probado la encapsulación de algunos de estos fármacos como la encapsulación de anfotericina B en formulaciones lipídicas (AmBisome®) la cual ha tenido buenos resultados. Sin embargo su costo es elevado para ser accesible a países en desarrollo además de que la posibilidad de aparecer cepas resistentes[1, 11] comienza a limitar su uso y efectividad. La tabla 1.1 resume la forma de administración así como la dosis, tiempo y desventajas de algunos fármacos usados en el tratamiento de la leishmaniasis.

Tabla 1.1 Características de algunos fármacos usados en el tratamiento de la leishmaniasis [12, 13]

Medicamento	Administración /dosis	Tiempo	Desventajas
Antimoniales pentavalentes	Intra muscular 20mg/kg	20 días LC 28 días	Costo Elevado, efectos adversos, dolores musculares, fallas renales, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad
Anfotericina B	0.5-1 mg/kg/día	la dosis acumulada 20-30mh/Kg	Fiebre, escalofrío, cefalea, malestar general, perdida de potasio y magnesio, vomito, administración altas dosis
Miltefosina	Vía oral 100mg/día adulto 2.5mg/kg niños <45 Kg: 1.5 – 2.5 mg/Kg/día 45-64 Kg: 50 mg Cada 12 horas >65Kg: 50 mg cada 8 horas Duración: 28 días	4 semanas	tratamiento en LV y LC, enfermedades gastrointestinales, nauseas, vómitos, anorexia, diarrea, anormalidades oftalmológicas, nefrotóxico, patologías hepáticas (hepatotóxico), embarazo

Capítulo 1- Antecedentes y marco teórico

Pentamidina	3mg/kg/d intramuscular	4 dosis	LC usados en pacientes intolerantes a los tratamientos de los antimoniales, tiempos cortos de tratamiento. Hipoglicemia, posibles daños pancreáticos, hipotensión, taquicardia porcentaje de curación varía entre el 84% al 96%
ketoconazole, fluconazole, itraconazole	Vía Oral 600 mg/kg/d	28 días	Menos tóxicos que los antimoniales pentavalentes eficacia del 76%
Miltefosina	2.5 mg/kg/d Oral	28 días	Eficacia en aprox. El 84% medido en ratones
Imiquimod	20 mg/kg/d IM or IV	20 días	Recaídas cuando se suspende el tratamiento, pocos estudios clínicos
Allopurinol	20 mg/kg/d oral	15 días	efectividad del 46% comparada con los antimoniales Pentavalentes

La mayoría de investigaciones relacionadas con la leishmaniasis en la última década, se han encaminado hacia el desarrollo de nuevos medicamentos o alternativas en las terapias de tratamiento diferentes a la química[14, 15]. Existe un elevado interés en terapias físicas de carácter localizado como la crioterapia, electro-disecación, escisión quirúrgica, radioterapia[4, 16], y terapia fotodinámica [17-21]; estas terapias pueden ser alternativas en el tratamiento de la LC. Sin embargo, estas técnicas no son recomendadas cuando hay riesgo de diseminación de la infección [4]. En la actualidad estas técnicas, en especial la terapia fotodinámica, se viene usando en investigaciones de tratamiento de cáncer principalmente en los tumores superficiales, donde se usa la radiación de una fuente de luz sobre el tejido a tratar, produciendo la excitación cuántica de un fotosensibilizador (FS) que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que matan las células cancerígenas.

1.1. Terapia fotodinámica en el tratamiento de leishmaniasis cutánea como alternativa de tratamiento

La terapia fotodinámica (TF) es un proceso de naturaleza fotoquímica que se utiliza en múltiples aplicaciones desde la desinfección de aguas hasta en tratamiento de cáncer. En la actualidad su uso en el tratamiento de LC ha tomado interés debido a los potenciales beneficios que presenta en comparación con la terapia tradicional como lo son el bajo costo, la disminución de efectos adversos, efectos cosméticos, uso en casos que presentan resistencia a los fármacos actuales etc. Sin embargo, todavía es un área en exploración que ha presentado resultados prometedores [6]. El fundamento teórico de la terapia fotodinámica se aloja en los principios básicos de fotoquímica donde la luz puede generar especies ROS siempre y cuando haya condiciones apropiadas para promover la presencia de radicales libres [19, 22]. En la TF se requiere una excitación cuántica de un compuesto al que llamaremos fotosensibilizador o material fotoactivo. A medida que las unidades atómicas de un fotosensibilizante aumentan, la energía necesaria ΔE también conocida como energía de gap (E_{gap}) para excitar la especie disminuye (Figura 1.2). Es decir, se necesita menor energía para que un portador de carga ubicado en la última banda energética llena o semillena (banda de valencia E_v) pase a un estado energético superior (banda de conducción E_c). Así un fotón $h\nu$ es absorbido por la banda de valencia promoviendo un electrón (e^-) de la banda E_v a la banda E_c generando un hueco tras él (h^+) y el sistema alcanza un estado excitado

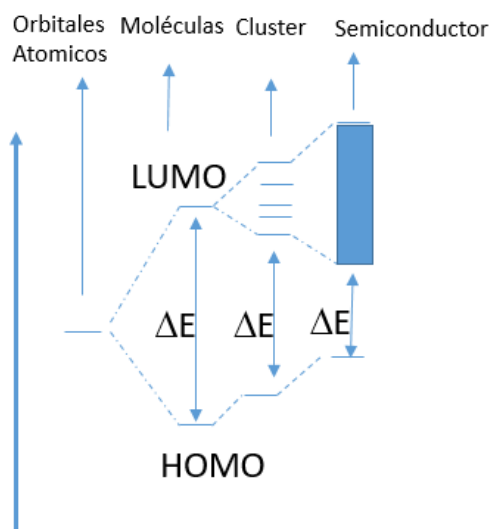


Figura 1.2 Cambio en la estructura electrónica de un compuesto semiconductor con el incremento de las unidades atómicas N

Al estado de mínima energía de un átomo o molécula se le denomina estado energético fundamental (S_0). Con la absorción de energía el sistema alcanza un estado excitado que

puede ser de carácter singlete o triplete. El primero se caracteriza porque los dos electrones más externos se encuentran apareados (números cuánticos de espín opuestos) y en el segundo caso los electrones se encuentran desapareados (Figura 1.3).

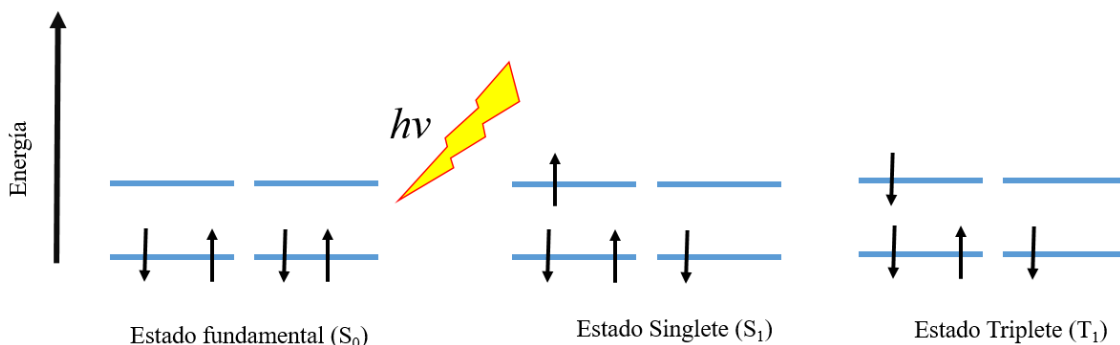


Figura 1.3 Estado fundamental de un fotosensibilizador y paso a los estados energéticos excitados singlete y triplete.

La desactivación de los estados excitados se puede producir por relajación vibracional, emisión de luz, o transferencia de carga. Así mismo las excitaciones pueden dar paso a procesos de sensibilización, como por ejemplo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este caso el oxígeno en su estado fundamental se encuentra en un estado triplete que no puede pasar a un estado singlete por sí solo, por lo cual es necesario la mediación de un sensibilizador. El mecanismo general consiste en que el sensibilizador es activado por luz llegando a un estado singlete el cual posteriormente evoluciona a un estado triplete de mayor tiempo de vida. Este puede transferir energía por intercambio electrónico a una molécula de oxígeno en estado fundamental obteniéndose el singlete de oxígeno ¹O₂ (especie de alto comportamiento oxidante y tiempo de vida entre 40 μs a 60 ms (Figura 1.4).

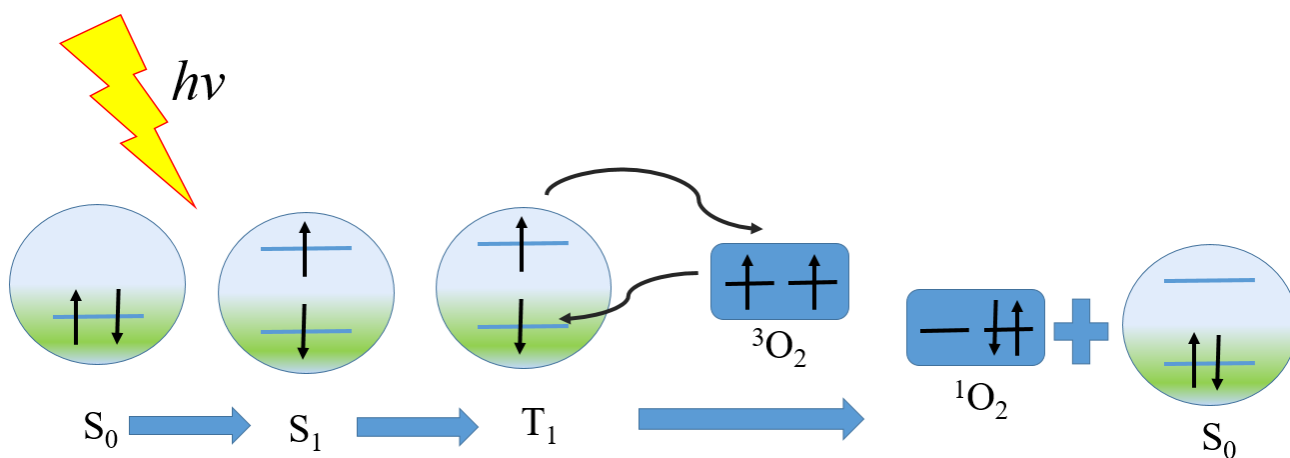
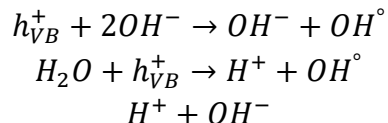


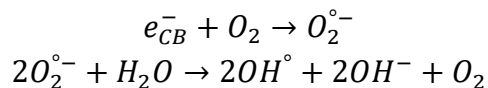
Figura 1.4 Ejemplo del estado singlete y triplete de un fotosensibilizador y su transferencia de carga a un átomo de oxígeno para formar singletes de oxígeno.

En el caso en que el fotosensibilizador sea de naturaleza semiconductor, la excitación del átomo da paso a la formación de un par electrón-hueco con el salto de un electrón de la banda de conducción a la banda de valencia. Cuando el electrón regresa a su estado fundamental se presenta una recombinación cuántica. También puede ocurrir que el electrón fotogenerado reduzca a un aceptor electrónico o que el hueco generado oxide a un donador electrónico, produciendo de esta forma especies ROS.

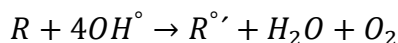
En el caso de los huecos estos pueden reaccionar con especies como agua o iones hidróxido y formar radicales hidroxilo.



Por otro lado los electrones pueden reducir especies como el oxígeno molecular y formar singletes de oxígeno.



Ambas especies pueden generar la oxidación de reactantes orgánicos o en células degradar las organelas, proteínas y ADN conllevando a la apoptosis o necrosis celular por el ataque sucesivo de los radicales hidroxilos o estados singlete [23, 24]:



Entre los diferentes compuestos usado en la TF para el tratamiento de leishmaniasis cutánea se tienen dos grandes grupos: los de origen orgánico como por ejemplo el azul de metileno [21], derivados de riboflavin [19], carbopyrrin [25], chloroaluminum phthalocyanine [17] y los de origen inorgánico como nanopartículas de óxido de zinc, nanopartículas de oro, dióxido de titanio, plata etc. [18, 20]. De estos dos grupos son de especial interés para nosotros la hipericina (HY) y el dióxido de titanio como compuestos para el tratamiento de leishmaniasis cutánea mediante TF.

La hipericina es un compuesto orgánico policíclico aromático perteneciente a la clase de las antraquinonas extraídas de las planta *Hypericum perforatum*, usada comúnmente como antidepresivo y que en las últimas décadas se ha reportado con propiedades anti-retroviricas, antitumorales y fotosensibilizantes [7, 26]. Es una molécula que se caracteriza por presentar un espectro intenso de absorción en el rango visible, con alto rendimiento cuántico que asegura una alta producción de oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxígeno, bajo fotoblanqueo y mínima toxicidad, características que son fundamentales para las aplicaciones biológicas y clínicas de un fotosensibilizador [7]. Las principales investigaciones con este fármaco se han centrado en su uso tópico, en terapia fotodinámica para el tratamiento de

Capítulo 1- Antecedentes y marco teórico

tumores cancerosos y también en terapias de foto diagnóstico [35, 36]. Estudios han demostrado su efecto anti fúngico y antibacterial en el tratamiento de *Candida* spp y *S. aureus* respectivamente [27-29]. La hipericina es un compuesto que no presenta toxicidad ni es agente mutagénico y actualmente su uso se encuentra aprobado por la FDA [30]. En el uso para tratamiento de la leishmaniasis, Shalini Singh y colaboradores[31] reportaron la actividad anti-*Leishmania* de la hipericina *in vitro* con una dosis entre 10uM-100uM en promastigotes, presentando una concentración inhibitoria (IC50) de 18 uM sin presentar efecto tóxico en macrófagos. Montoya y colaboradores[30] evaluaron el efecto anti amastigota de la hipericina usando un modelo animal (*L. panamensis* en hasmter), desarrollando una formulación en crema con 0.5% de hipericina. Para el tratamiento se usó una dosis de 40 mg/día dos veces por semana durante tres semanas, y una energía de activación de 5 J/cm². En este trabajo se reportó una mejoría en los animales infectados entre el 75% al 80%. La hipericina mostró que al entrar en contacto con la piel induce factores de crecimiento obteniéndose mejores resultados cosméticos en la cicatrización [30]. El mecanismo de acción de la hipericina como agente fotosensibilizador aún no es claro y es fuente de estudio en la actualidad, así como su optimización en aplicaciones clínicas. Algunos trabajos se han centrado en la encapsulación de la hipericina con el fin de mejorar su agregación (la cual desactiva la respuesta fotoactiva), aumentar la eficiencia y selectividad [32]. Dentro de las desventajas de la Hipericina se cuentan el no ser soluble en agua y por lo tanto se requiere su disolución en medios etanólicos para su administración los cuales causan un dolor local, tiende a acumularse en la membrana celular (parte anfifílica) y el tratamiento es no selectivo.

Por otra parte el dióxido de titanio es un material cerámico que se presenta en tres formas cristalográficas: Anatasa, Brookita y Rutilo. Es un material de gran popularidad debido a sus distintas propiedades como abundancia, baja toxicidad, estabilidad química que le ha permitido múltiples aplicaciones que van desde la industria del color, electrónica, celdas solares, industria cosmética, aplicaciones fotocatalíticas y en el campo biológico se usa como potencial agente antimicrobial y antiparasitario debido a su respuesta fotodinámica. Sin embargo, su elevada reflectancia en el rango visible y la energía de activación para lograr un salto electrónico de 3.2 eV para la fase anatasa y 3.0 eV para la fase rutilo, restringen sus aplicaciones. Según la ecuación de planck $E_f = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$ dicha energía corresponde a una longitud de onda igual o menor a 387.5 nm valor que se encuentra en la región ultravioleta [33] y donde solo cerca de un 5 % de la energía solar podría ser aprovechada. En el caso de aplicaciones biológicas, irradiar con altas dosis de energía UV es contraproducente por presentar efectos citotóxicos. Por otra parte el par electrón-hueco fotogenerados tienden a recombinarse rápidamente limitando aún más su respuesta fotodinámica. De las fases de TiO₂ la de principal interés es la anatasa debido a que presenta una banda de conducción cerca de 0.3eV más positiva que la fase de rutilo haciendo que el exceso de electrones en la banda de conducción genere una mayor fuerza de reducción de reactantes que la fase de rutilo. También esta fase presenta una capacidad de absorción de O₂ mayor que previene la

recombinación cuántica[34]. En el tratamiento de la LC se han usado varios compuestos de TiO_2 tales como nanopartículas de TiO_2 y compuestos de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. Este último, obtenido por ruta hidrotermal, fue usado en TF bajo luz visible para la inhibición de parásitos *L.Tropica* y *L. infantum*, dando como resultado una disminución de la viabilidad, la actividad metabólica y supervivencia en las células hospederas lo que amplía la posibilidad de uso de estos compuestos no solo en la LC sino también en la LV[35]. De igual forma se han realizado formulaciones del sistema $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ con compuestos de acción antileishmania como meglumina y nigella savital oil encontrando que se puede mejorar la toxicidad de dichas moléculas al realizar combinaciones con las nanopartículas cerámicas[36, 37]. Sin embargo, el principal inconveniente de estos sistemas consiste en que su activación se hace mediante la exposición a fuentes de luz UV que resultan dañinas para las células. La búsqueda de sistemas con respuesta en el rango visible y de fácil obtención hace parte de los principales focos en el desarrollo de sistemas fotodinámicos y/o fotocatalíticos. En el caso del TiO_2 se ha intentado mejorar su respuesta en el rango visible mediante el dopaje de la estructura con metales, sensibilización con diferentes moléculas y síntesis de compuestos de TiO_2 con otros materiales. En el anexo 1 se resumen los diferentes compuestos usados en terapia fotodinámica para tratamiento de leishmaniasis con resultados prometedores que han sido valuados *in vitro* y/o *in vivo*.

Los fosfatos de calcio (FC) son materiales de gran interés en los campos de la biología, medicina e industria. Tanto su formación, funciones y aplicaciones dependen de su estructura, composición, solubilidad y estabilidad [38]. Los FC se utilizan principalmente en la regeneración de tejido óseo, por su excelente biocompatibilidad, osteoconductividad y fase mineral similar a la de los huesos, además de otras propiedades como lo son la viabilidad para realizar configuraciones con aplicación *in vivo* y capacidad de inyectabilidad[39]. Estas características los potencian para el desarrollo de sistemas de encapsulación para la liberación controlada, retardada y localizada de fármacos [40-43]. En la familia de los fosfatos de calcio se distinguen los metafosfatos con grupos PO_3^- , los pirofosfatos con grupos $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ y ortofosfatos de calcio que son sales del ácido fosfórico tribásico H_3PO_4 . Dependiendo de las condiciones, los FC pueden formar compuestos que contengan iones de H_2PO_4^- , HPO_4^- o PO_4^{3-} . Los dos últimos están presentes en los minerales de los huesos y los dientes. Para las aplicaciones biomédicas, los únicos de interés son los ortofosfatos de calcio puesto que los pirofosfatos y metafosfatos pueden generar calcificaciones extra óseas [44].

En el sistema ternario $\text{Ca(OH)}_2\text{-H}_3\text{PO}_4$ son conocidos once fosfatos de calcio que se distinguen entre sí por la variación de la relación molar de calcio a fosfato (Ca/P). Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM), fosfato monocálcico anhídrido (MCPA), Fosfato dicálcico dihidratado (Brucita- DCPD), Fosfato dicálcico anhídrido (Monetita-DCP o DCPA), fosfato octacálcico (OCP), dos formas de fosfato tricálcico alfa (α -TCP), fosfato de calcio amorfo (ACP) e hidroxiapatita (HA) o también la posibilidad de formar hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA), fosfato tricálcico beta (β -TCP), y fosfato tetracálcico (TTCP). Por otro lado con la sustitución del haluro por un ion hidróxido se obtiene fluoroapatita (FAP)

Capítulo 1- Antecedentes y marco teórico

o clorapatita (ClAp). La witlockita se forma en presencia de iones de magnesio y la apatita carbonatada (CO₃Ap) en presencia de carbonato. Tabla 1.2. resume la lista de fosfatos de calcio junto con sus parámetros estructurales, producto de solubilidad y relación Ca/P.

Tabla 1.2 Tipos de fosfatos de calcio según su relación Ca/P adaptada del libro “calcium phosphates in biological and industrial systems” [11]

Nombre y Formula Química	Log K _{sp} a 25°C	Relación Ca/P
MCPM: Fosfato monocálcico monohidratado Ca(H ₂ PO ₄) ₂ .H ₂ O	Alta solubilidad	0.50
MCPA: fosfato monocálcico anhídrido Ca(H ₂ PO ₄) ₂	Alta solubilidad	0.50
DCPD: Fosfato dicálcico dihidratado CaHPO ₄ .2H ₂ O	6.59	1.00
DCPA: Fosfato dicálcico anhídrido CaHPO ₄	6.90	1.00
OCP: fosfato octacálcico Ca _{0.8} H ₂ (PO ₄) ₆ .5H ₂ O	96.6	1.33
α-TCP: fosfato tricálcico alfa α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	25.5	1.50
β-TCP: fosfato tricálcico beta β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	28.9	1.50
HA: hidroxiapatita Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	58.4	1.67
FAp:Fluroapatita Ca ₅ (PO ₄) ₃ F	60.5	1.67
ClAp: Clorapatita Ca ₅ (PO ₄) ₃ Cl		1.67
TTCP: fosfato tetracálcico	38	2.00

Entre las principales estructuras de FC usados en encapsulación se tienen la hidroxiapatita [42, 45-48] [49, 50], α-TCP[41], β-TCP[46, 51] y ACP [43, 52]. También se ha investigado en el uso de sistemas core-shell de FC con partículas magnéticas o poliméricas para la liberación controlada y retardada [53-57] con el fin de que el proceso de liberación del fármaco sea más lento desde el inicio (carga de fármaco liberado en los primeros minutos u horas) y extendido en el tiempo.

En el caso de los FC la incorporación de los fármacos se puede realizar mediante tres mecanismos globales [39] (Figura 1.5):

- 1) Incorporación del fármaco a la fase sólida y posterior mezcla con la fase líquida.

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmania Cutánea

- 2) Incorporación del fármaco a la fase líquida y posterior mezcla con la fase sólida.
- 3) Formación y configuración del FC y posterior carga del fármaco ya sea gota a gota o por inmersión

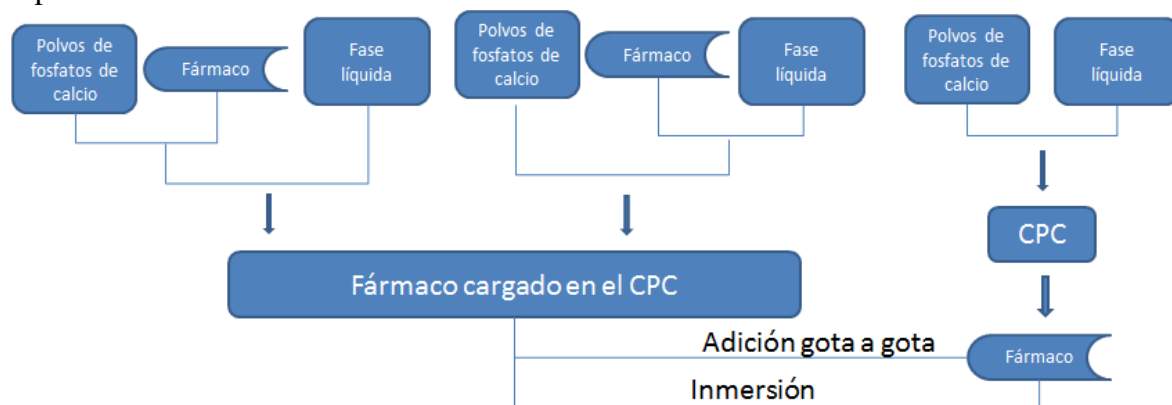


Figura 1.5 Mecanismos de encapsulación del fármaco en las estructuras de FC.

Una vez se ha incorporado el fármaco a los FC se pueden establecer las siguientes interacciones entre el fármaco y la estructura de los FC

- a) El fármaco disuelve en la fase líquida sin formación de precipitados
- b) El fármaco enlaza en la superficie de cristales adyacentes
- c) La concentración de fármaco es mayor a la solubilidad del mismo en el medio presentándose la precipitación. (Figura 1.6)

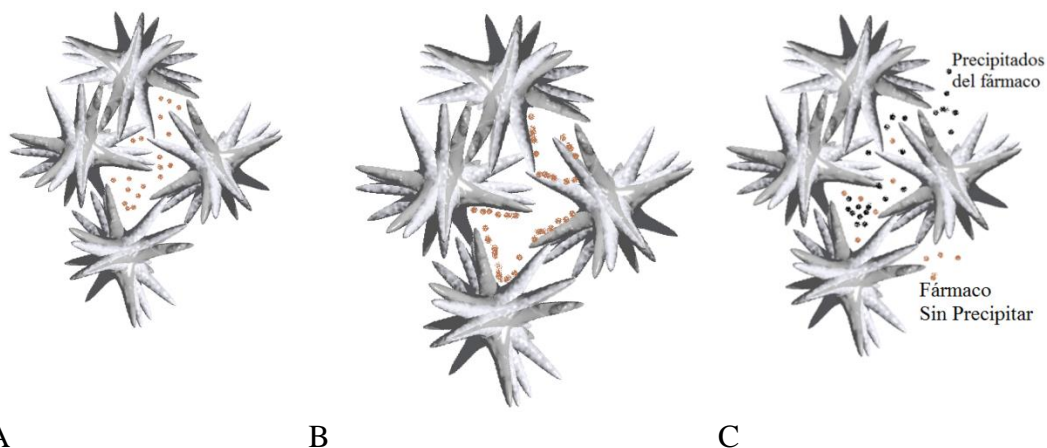


Figura 1.6 Posibles Interacciones entre el fármaco y la estructura de los FC A) Fármaco libre B) Fármaco interactuando con los FC C) Fármaco libre y precipitado.

Los mecanismos de liberación del fármaco han sido ampliamente estudiados pero, en forma general, en el caso que la estructura de los FC permanezca estable durante todo el tiempo de liberación, los poros interconectados juegan un papel importante en la liberación del fármaco.

El mecanismo en ese caso es principalmente gobernado por procesos de difusión a través de los fluidos fisiológicos que permean la estructura (Figura 1.7 A). En otros sistemas, como es el caso de los cementos brucíticos, la porosidad aumenta por fenómenos de reabsorción haciendo el proceso de liberación más rápido (Figura 1.7 B). Lo contrario ocurre en los cementos de fosfato cálcico con comportamiento más bioactivo, en los cuales se forma una capa apatítica en la superficie del material por interacción con los fluidos circundantes, lo cual produce una liberación del medicamento más lenta (Figura 1.7 C)

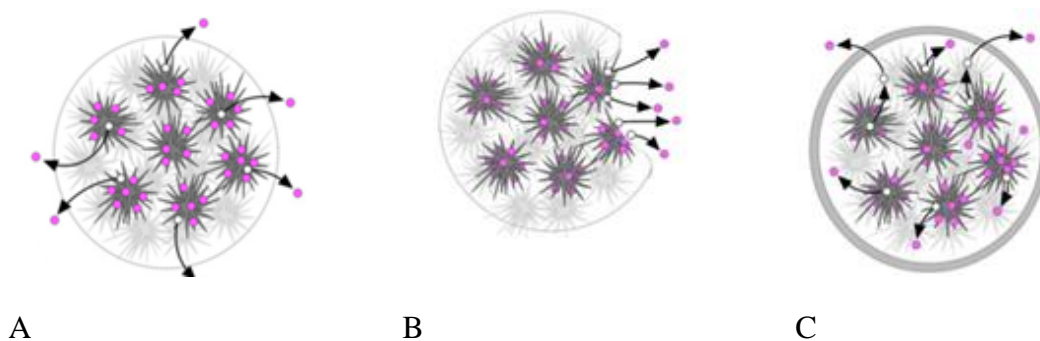


Figura 1.7 Mecanismos de liberación del fármaco de las estructuras de FC A) liberación por difusión a través de los poros interconectados B) Reabsorción del FC y liberación más rápida. C) Formación de capa apatítica que retarda la liberación [13]

Los diferentes tipos de fármacos incorporados a los FC van desde fármacos de bajo peso molecular hasta alto peso molecular[39]. Los de bajo peso molecular pueden ser antibióticos[42, 58], anti-inflamatorios [46], anticancerígenos, antiosteoporóticos etc. y en el caso de alto peso molecular pueden ser proteínas [39].

Dependiendo de cómo se dé la incorporación del fármaco a la estructura encapsulante y de las características fisicoquímicas del mismo (solubilidad, tamaño del fármaco etc.) se tendrá un efecto sobre la configuración del FC que a la larga afectará la cinética de liberación del fármaco[39]

Se ha encontrado que el efecto de compuestos fotoactivos puede ser potencializado cuando se encapsula o funcionaliza con el fin de mejorar su aplicación y selectividad. Las opciones exploradas en encapsulación de sistemas fotodinámicos han sido realizadas en sistemas poliméricos o liposomales[17, 59, 60] pero aún no se ha explorado la opción de sistemas inorgánicos de carácter cerámico como son los fosfatos de calcio, los cuales en el mundo biológico gozan de popularidad por su buena biocompatibilidad, capacidad de reabsorción tanto activa (mediada por células) como pasiva (degradación de la estructura) [61, 62]

1.2. Activación de estructuras de dióxido de titanio en el rango visible

El dióxido de titanio (TiO_2) se caracteriza por ser un material semiconductor que actúa como fotocatalizador en diversas aplicaciones tecnológicas. Factores como la absorción de la radiación electromagnética, el gap de energía, la tasa de recombinación entre electrones y huecos, la absorción de reactantes en la superficie externa de las partículas del polvo y las velocidades de óxido reducción entre los electrones y los huecos afectan la foto actividad de un semiconductor[63]. Estos factores a su vez, se ven influenciados por la microestructura, la cristalinidad, la textura, los tamaños y la forma de las partículas. El TiO_2 es un material fotocatalítico de gran interés, ya que presenta baja toxicidad, fácil reutilización, alta foto actividad, bajo costo, buena estabilidad térmica y química[64]. El mecanismo de fotogeneración de estados excitados en el dióxido de titanio se puede observar en la Figura 1.8.

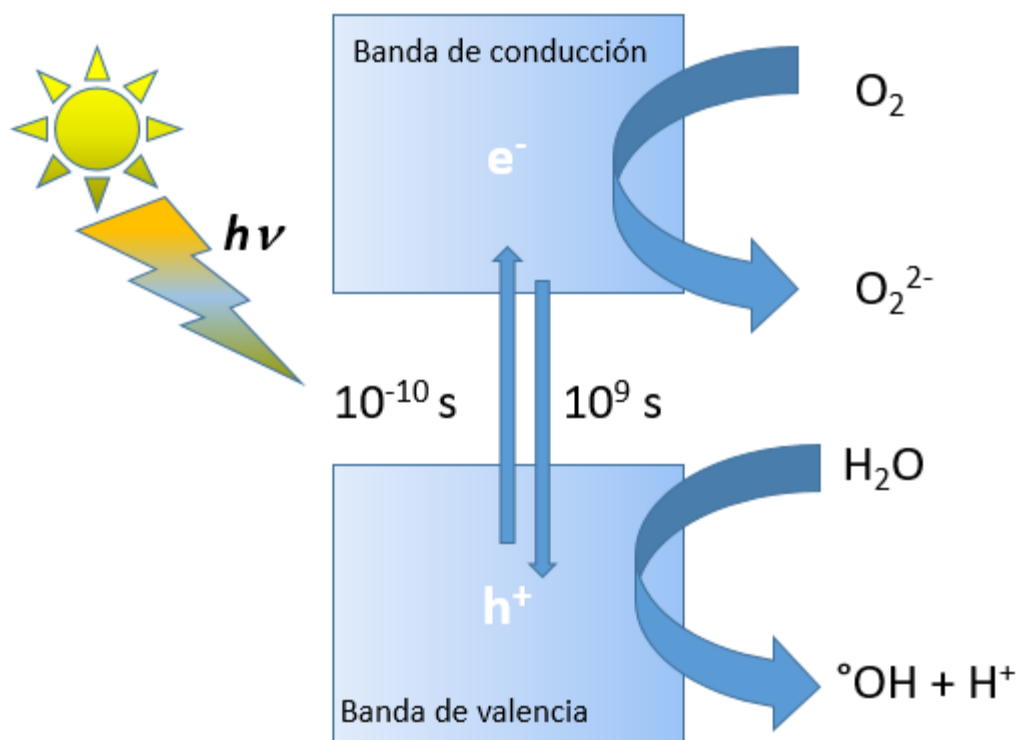


Figura 1.8 Mecanismo de Fotogeneración de par electrón-hueco en la estructuras de banda del TiO_2 .

Un electrón de la banda de valencia salta a través del band gap hasta la banda de conducción cuando es excitado con la energía apropiada dejando tras él un hueco. Este par electrón hueco puede actuar como centro de reacción a fin de formar especies oxidantes. A pesar que el TiO_2 tiene una buena foto-respuesta con un fuerte potencial redox, su alta eficiencia se presenta principalmente cuando es sometido a irradiación ultravioleta lo que constituye una

de las principales desventajas para su aplicación. Solo el 6% de la radiación solar pertenece a la región ultravioleta y dicha región presenta efectos adversos en la salud humana. Además, el TiO_2 presenta alta velocidad de fotodegeneración, es decir, alta velocidad en la recombinación de los pares electrón - hueco, lo cual disminuye su actividad fotocatalítica [65, 66] . Con el fin de superar estas falencias del TiO_2 , es necesario desplazar su respuesta fotocatalítica de la región ultravioleta a la región visible, que permita usar la radiación solar, y por otra parte, mejorar las propiedades microestructurales y químicas que lo hagan más foto activo disminuyendo su tasa de recombinación. Para desplazar la respuesta fotocatalítica del TiO_2 al visible, se han realizado investigaciones en el uso de sistemas fotosensibilizantes como colorantes, dopaje con iones, polímeros conjugados, y metales de transición (Ag, Au, Pt)[67, 68] La idea fundamental con estos dopantes es generar estados intermedios de energía que aumenten la separación de carga entre los pares electrón-hueco de tal forma que se disminuya la tasa de recombinación cuántica, como se ve en la Figura 1.9, en la cual con el dopaje con Pt, se forma un estado de energía intermedio.

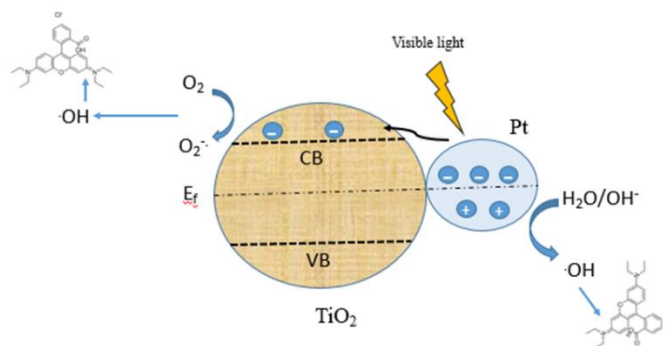


Figura 1.9 Estados de energía intermedios asociados al dopante Pt [69]

Otra alternativa para mejorar las propiedades microestructurales y químicas del TiO_2 es mediante las rutas de síntesis que permitan obtener TiO_2 con grandes áreas superficiales y tamaños nanométricos. Hay algunos reportes que intentan obtener sistemas de TiO_2 en un solo paso sin necesidad de calcinaciones posteriores que desarrollen ambas características en el material. Es así como Wey Yang Teoh y colaboradores[70] reportaron la obtención de TiO_2 dopado con Pt mediante Spray pirólisis, y obtuvieron la mezcla de las fases de anatasa y rutilo con tamaños de partícula nanométricos. Estudios similares realizaron Heiko Schulz y colaboradores[71] con el mismo método de síntesis, pero enfocado en la optimización del control de la morfología de las partículas. G. Sivalingam y colaboradores[72] sintetizaron TiO_2 por el método de combustión en solución directa y evaluaron principalmente el efecto en la degradación de colorantes como azul de metileno, sin tener en cuenta el efecto sobre las propiedades ópticas del TiO_2 que tuvo la ruta de síntesis y el dopaje.

1.3. Síntesis de fosfatos de calcio, dióxido de Titanio y la combustión en solución

Hay una gran variedad de rutas usadas para la preparación de fosfatos de calcio y dióxido de titanio, desde rutas tradicionales en estado sólido, rutas químicas como sol gel, precipitación, co-precipitación, hidrotermal, método de plantilla, método sono-químico, síntesis asistidas por microondas, métodos de combustión etc. La Tabla 1.3 y Tabla 1.4 resumen algunas de las técnicas empleadas para la síntesis de algunos fosfatos de calcio y dióxido de titanio.

Tabla 1.3 Resumen de algunas técnicas de síntesis usadas en la obtención de fosfatos de calcio.

	Método	Característica del producto			Ventajas	Desventajas	Ref.
		Tamaño	Fase	Forma			
Métodos en seco	Estado sólido	Micrométrico	HAP/ β – TCP	Diversas y porosas	Bajo costo, escalable	Aglomeración	[73]
	Mecano-químico	Nanométrico	HAp	Nano granos, nano varillas	Bajo costo, buena cristalinidad, alta reproducibilidad	Aglomeración, contaminación durante la molienda	[74]
Métodos Químicos	Precipitación			Nano-micro		Baja cristalinidad	[41]
	Co-precipitación	Nanométrico	Hap, B- TCP, CDA	Nano varillas	Bajo costo, método simple	Agregación	[75]
	Sol-gel	nanométrico a pocas micras	Hap, B- TCP	0D-1D, esféricas	Alto control estequiométrico	Algunos reactivos costosos y especiales, pequeña escala, aglomeración	[76] , [77] [78] [79]

Capítulo 1- Antecedentes y marco teórico

	Auto ensamble o método directo de cristalización	nanométricos micrométrico	DCP D, DCP A, Hap, mezcla de fases	Flores, platos, diversas estructuras	formas controlables	alto costo,	[80] [81] [82] [57]
	Sono-químico	Nanométrico	HAP	esferas, nano rods	bajo costo, alta cristalinidad, buena dispersión	pequeña escala	[55] [83] [84] [85]
	Hidrotermal/ Hidrotermal con plantilla Hidrotermal asistido por MW	Nanométrico micrométrico	Múltiples fases. HAP, B-TCP, DCP D,DC PA	Múltiples formas: varillas, esferas, agujas, flores etc.	Control en forma, control en cristalinidad	Escala pequeña, cuando se usa surfactantes son generalmente costosos	[45] [42] [43] [52] [46]
Métodos de alta temperaturas	Método de combustión	Nanométrico a submicrométrico	HAP, DCP D, CDA, Mezcla de fosfatos de calcio	Diversa	No se tiene un control en la forma de las partículas	Bajo costo, y simplicidad de montaje, agregación	[86] [87] [88] [89] [90]
	Combustión sol-gel	Nano y submicrométrico	Hap, BTC O	Granulares, nanotubos		Bajo costo	[91] [92]

	Spray pyrolysis	Nano, sub-micrométricos	Mezcla de fosfatos, HAp	Esferas, nano rods	Escalable	Agregados, alto consumo de energía	[93] [94]
	Sales fundidas	Nano, sub-micrométrico, centímetros	Hap	Platos, fibras	Alta cristalinidad	Alto costo	[95]
Técnicas físicas	Método de electrospinning, deposición electrofórica	Micrométrico	HA, B-TCP, mezcla	Fibras, platos		Sistemas policristalinos, uso de aditivos costosos	[96] [51] [97]

Tabla 1.4 Algunas técnicas de síntesis usadas en la obtención de estructuras de TiO₂

Método	Característica del producto	morfología	Ventajas	Desventajas	Ref.
Sol gel	Anatasa nanométrica	Esférica, varillas	Ruta de un solo paso, bajas T de síntesis, homogeneidad, control de morfologías	Algunos reactivos costosos, tiempos de síntesis prolongados	[98]
Hidrotermal-Solvotermal	Anatasa, rutilo	Esféricas, varillas, platos, fibras	Alto control de morfología	Uso de autoclaves, tiempos prolongados de síntesis	[99] [100]
Oxidación anódica	Anatasa	nanotubos de TiO ₂	Fabricación in-situ con dopantes	Difícilmente se puede variar la morfología	[101]
Métodos asistidos por microondas	Anatasa, rutilo	Placas varillas, nano hojas	Cortos tiempos de reacción, costo eficiencia	Algunas reacciones son difíciles de controlar	[102]

Métodos de Plantilla	Anatasa, rutilo	Variada dependiendo de la plantilla	Alto control de la morfología, homogeneidad	Uso de plantillas adecuadas	[103]
Método sonoquímico	Anatasa, rutilo	esféricas y nano varillas	tamaños micro métricos y nanométricos	Costo eficiencia energía	[104]
Electro deposición CVD	Anatasa , Rutilo	Nano capas	Fabricación de filmes	Equipamiento	[105]

La síntesis de combustión (SCS) es un método de alta temperatura, rápido y de amigable implementación por el bajo costo de los equipos usados. Es efectiva en la síntesis de diferentes óxidos o estructuras cerámicas en una escala nano lo que le permite ser usado en una gran variedad de aplicaciones avanzadas. Esta ruta permite obtener en la mayoría de los casos el producto deseado en una sola etapa ahorrando energía y tiempo aunque en ocasiones es necesario un tratamiento térmico posterior para promover la obtención de la fase. Desde el punto de vista termodinámico la síntesis de combustión en solución es una reacción exotérmica de óxido-reducción fuertemente dependiente de la relación combustible y oxidante. Se inicia en una temperatura llamada temperatura de ignición T_i y se sostiene por un determinado tiempo. En general los principales parámetros que intervienen en la formación de una determinada fase son relación combustible oxidante, tipo de flama, temperatura, gases generados, composición química de los precursores e incluso hay reportes del contenedor de la reacción.

1.4.1 Combustibles-Oxidantes

Las características principales que debe cumplir un combustible para ser empleado en SCS es ser soluble en agua, tener bajas temperaturas de ignición, liberar gran cantidad de gases, y no dejar compuestos residuales durante la combustión. Los combustibles son fuente de C e H, los cuales durante la combustión forman CO_2 , H_2O y liberan calor. Los combustibles forman complejos con los iones metálicos, permitiendo una mezcla homogénea. Durante su descomposición forman gases combustibles como HNCO, HNO_3 , NO_x , CO etc. La presencia de flama se da por la mezcla de estos productos. La escogencia del combustible apropiado es fundamental en la exotermicidad de la reacción y la obtención del producto final. Por lo general los combustibles deben cumplir la propiedad de actuar como agentes acomplejantes de los iones metálicos que van a participar en la reacción, entonces los combustibles más adecuados son estructuras que se componen generalmente de aminoácidos [106].

Entre los combustibles más usados se tiene la glicina (NH_2CH_2COOH), la cual es un aminoácido de acción acomplejante de amplio espectro de iones metálicos, compuesta por

un grupo amino y uno carboxílico. El grupo amino acompleja más fácilmente los iones de transición, mientras que el grupo carboxilo presenta mayor afinidad por los cationes alcalinos o alcalinotérreos. Además presenta comportamiento bipolar (Zwiteriónico o amfotérico) que le permite acomplejar iones metálicos de diferentes tamaños previniendo la precipitación y la formación de un gel de alto grado de homogeneidad[34]. Otros tipos de combustibles explorados han sido úrea, carbohidrazida etc. En las rutas de combustión, los nitratos son por lo general los principales precursores escogidos debido a su buena solubilidad. Los grupos (NO₃) de estos actúan como agentes oxidantes. En el caso en que se requiera se pueden usar agentes oxidantes extra como por ejemplo el nitrato de amonio (NH₄NO₃), el cual aumenta el gas en la combustión por lo que incrementa el área específica de los polvos producidos [107].

1.4.2 Relación Combustible Oxidante

El combustible posee la propiedad de intervenir sobre los enlaces CH aceptando electrones mientras que un oxidante es la sustancia que ayuda a la combustión proveyendo el oxígeno (donador de electrones). Cuando la mezcla de combustibles y oxidante es la adecuada se genera una reacción exotérmica a la temperatura de ignición. Para el cálculo de la relación apropiada combustible-oxidante se emplea el concepto de propelente químico y la energía liberada durante la combustión conocida como el impulso específico (I_{sp})

$$I_{sp} = k \sqrt{\frac{T_c}{\text{Peso molecular de los productos gaseosos}}}$$

Donde T_c es la temperatura de combustión. La máxima temperatura de combustión T_c se alcanza cuando la relación entre el combustible y el oxidante $\varphi = \frac{\text{Oxidante}}{\text{Relacion de combustible}}$ es igual a la unidad. Esta relación puede ser expresada en términos de los coeficientes estequiométricos que participan en la reacción

$$\varphi = \frac{\sum \text{Coeficiente.Elementos oxidantes} \times \text{valencia}}{(-1) * \sum \text{Coeficiente.Elementos reductores} \times \text{valencia}}$$

El elemento oxidante es el oxígeno, mientras que el carbono, hidrogeno y los cationes metálicos son los elementos reductores y el nitrógeno es considerado como neutral. Los elementos oxidantes tienen valencias positivas y los elementos reductores tienen valencias negativas. Una reacción deficiente en combustible es aquella para la que $\varphi > 1$, una reacción rica en combustible es aquella $\varphi < 1$. En los casos en que dicha relación es baja o muy elevada las reacciones de combustión son lentas y sin presencia de llama. Variables como tamaño de cristalito, área específica, porosidad, morfología, fases, grado de aglomeración dependen generalmente de una adecuada escogencia del parámetro φ .

1.4.3 Temperaturas Características

Capítulo 1- Antecedentes y marco teórico

En la combustión en solución se identifican varias temperaturas características como los son:
La temperatura de ignición T_0 la cual es considerada como la temperatura promedio de la mezcla inicial de precursores.

Temperatura de ignición T_{ig} corresponde a la temperatura a la cual se inicia la reacción de combustión.

Temperatura adiabática de flama $T_{(ad)}$ Es la máxima temperatura de combustión alcanzada por el sistema bajo condiciones adiabáticas.

Temperatura máxima de flama: Corresponde a la máxima temperatura alcanzada por el sistema bajo condiciones no adiabáticas (Temperatura de flama en el sistema).

Estas temperaturas pueden ser influenciadas por múltiples factores, como relaciones de combustible oxidante y sus cálculos incluyen modelos físico químicos y termodinámicos.

Por ejemplo en el cálculo de la temperatura adiabática se puede proceder como sigue

$$\Delta H^0 = \Delta H_f^0 = \int_{T_i}^{T_{ad}} \Delta C_p(\text{productos}) dT$$

Donde T_{ad} , T_{ig} son la temperatura adiabática de flama y la temperatura de ignición respectivamente, C_p es la capacidad calórica molar y ΔH^0 es la entalpía de reacción que está dada por:

$$\Delta H^0 = \left(\sum n \Delta H_{\text{productos}} \right) - \left(\sum n \Delta H_{\text{Reactivos}} \right)$$

donde $\Delta H_{\text{productos}}$ y $\Delta H_{\text{reactivos}}$ son las entalpías de formación a condiciones estándar de los productos y los reactivos respectivamente

2. OBJETIVOS

La leishmaniasis es una enfermedad de origen parasitario presente en más de 98 países, con una incidencia anual aproximada de 2 millones de casos. En Colombia es una enfermedad endémica presente en casi todos los departamentos. Las formas de tratamiento actuales consisten en terapias de administración de fármacos (parenteral), principalmente de compuestos antimoniales pentavalentes. Los efectos adversos de esta terapia radican en que muchos de estos compuestos presentan un grado de toxicidad que alteran la salud del paciente con la aparición de efectos secundarios como náuseas, fiebre, dolor etc. trayendo consigo el abandono de la terapia antes de su culminación tendiendo a cuadros clínicos de recaídas y desarrollo de resistencia del parásito al medicamento, por lo que el avance en los fármacos actuales y en las terapias de tratamiento se hacen indispensables. Una terapia de interés actual en el uso de enfermedades localizadas es la terapia fotodinámica (TF), que consiste en la aplicación de un compuesto fotosensible que mediante la radiación apropiada preferiblemente en el rango visible produce especies oxidantes y/o reductoras que atacan en forma directa o indirecta la enfermedad. La terapia fotodinámica se potencia como una alternativa de tratamiento para L.C que busca en primera instancia disminuir los efectos adversos de los fármacos actuales y evitar el abandono del tratamiento por parte del paciente[11]. Esta terapia implica la aplicación o inyección de un compuesto fotosensible en la zona afectada el cual, mediante irradiación focalizada, genera especies ROS que atacan el parásito o reservorio donde éste se encuentre. Los principios activos de interés para ser aplicados, deben cumplir especificaciones y características que son fundamentales para las aplicaciones biológicas y clínicas de un fotosensibilizador como presentar un espectro intenso de absorción en el rango visible, un alto rendimiento cuántico que asegure una alta producción de oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxígeno, bajo fotoblanqueo y mínima toxicidad. La Hipericina (HY) es un compuesto fotosensible, de origen natural, presenta actividad antitumoral y ha servido para realizar marcación de células cancerígenas[29]. Recientemente fue demostrado que también presenta comportamiento anti-*Leishmania* [7, 26], lo que lo convierte en candidato potencial para ser usado como agente fotosensibilizador en el tratamiento localizado de L.C. Sin embargo, la hipericina al ser altamente lipofílica, presenta baja solubilidad en agua lo que restringe su aplicación médica al requerir soluciones etanólicas y solventes orgánicos aumentando la posibilidad de agregación. Además, se ha identificado que en el tratamiento de células cancerígenas la eficiencia de este fármaco está íntimamente ligada con la localización subcelular, tipo de célula o tejido, dosis del fármaco presente, irradiación con la fuente de luz apropiada, tiempo y duración de la irradiación, y se cuentan con pocos estudios de cómo estas variables pueden afectar el efecto anti-*Leishmania*. Para superar estas desventajas se ha llevado a cabo encapsulación de HY en complejos poliméricos y lipídicos o inclusión en formulaciones biofarmacéuticas encaminadas al tratamiento de cáncer, pero estos procesos son en la mayoría de elevado costo y de difícil acceso en caso de que se quiera implementar para mejorar el efecto anti-*Leishmania* [40, 108, 109]. Una alternativa para realizar la encapsulación de la HY la constituyen los Fosfatos de Calcio (FC), los cuales son biomateriales que gozan de excelente popularidad por su buena biocompatibilidad y

Capítulo 2- Objetivos

capacidad de reabsorción tanto activa (mediada por células) como pasiva (degradación de la estructura) [61, 62]. Con dicha encapsulación se busca garantizar la protección del fármaco hasta llegar al sitio de interés que en el caso de la LC serían los macrófagos superando las barreras físicas, disminuyendo la localización no selectiva del fármaco, fotoactivación indirecta, realizando cambios en la dosis terapéutica, garantizando la sostenibilidad de la terapia en el tiempo, comodidad para el paciente durante la terapia, y mejorando la eficiencia del principio activo.

Una segunda alternativa para el tratamiento de la LC la constituyen los materiales inorgánicos que presenten comportamiento fotodinámico. El dióxido de titanio es un material cerámico de elevado interés debido a sus distintas propiedades como abundancia, baja toxicidad, estabilidad química y propiedades catalíticas, que lo potencia para múltiples aplicaciones que van desde la industria del color, electrónica, celdas de solares, industria cosmética, y aplicaciones fotocatalíticas. En el campo biológico su respuesta fotodinámica le ha permitido ser usado como potencial agente antimicrobial, antiparasitario e incluso en liberación controlada de fármacos. Su efecto antileishmania ya ha sido reportado en nanoestructuras cuando han sido sometidas a irradiación UV y se han hecho asociaciones de este material con principios activos antileishmania mostrando mayor eficiencia de dichos fármacos. Estas características posicionan el dióxido de titanio como una alternativa para el tratamiento de la LC, mucho más si se mejora su respuesta fotodinámica en regiones de longitud de onda visible que permitan su aplicación con fuentes de luz de bajo costo y que no presentan ningún efecto adverso como lo hacen fuentes de luz UV.

El objetivo general de este trabajo fue diseñar un sistema de encapsulación de Hipericina en Fosfatos de Calcio como terapia alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. En el desarrollo del trabajo, y como una opción adicional para el tratamiento de la enfermedad, se planteó mejorar la respuesta fotodinámica del TiO_2 en regiones de longitud de onda visible que permitan su aplicación con fuentes de luz de bajo costo y que no presentan ningún efecto adverso como lo hacen fuentes de luz UV.

Para alcanzar el objetivo general, fue necesario enfatizar algunos tópicos como:

Sintetizar por métodos químicos vehículos de encapsulación y liberación basados en fosfatos de calcio con las propiedades estructurales adecuadas para la encapsulación de fármacos hidrófobos.

Relacionar las propiedades micro-estructurales y químicas de los vehículos de encapsulación con la eficiencia de carga de fármaco y posterior liberación en el tiempo.

Establecer los efectos que tiene el vehículo encapsulante en la respuesta fotodinámica de la HY.

Establecer la carga de fármaco necesaria en el vehículo encapsulante para generar una respuesta anti-*Leishmania* (dosis terapéutica).

Realizar la batería de pruebas biológicas necesarias para proponer el sistema fosfato de calcio-Hipericina como una alternativa al tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Con el fin de lograr los objetivos propuestos se sintetizaron fosfatos de calcio mediante la ruta de combustión en solución y una variación de la misma obteniendo dos morfologías diferentes para realizar la respectiva encapsulación de la HY. Por otra parte, teniendo en cuenta los principios de terapia fotodinámica que se fundamenta en la respuesta electrónica de un material a una determinada longitud de onda quisimos explorar la respuesta fotodinámica de compuestos cerámicos como el TiO_2 y su potencial uso como fotosensibilizador en el tratamiento de LC. Este trabajo anexo al principal consistió en obtener estructuras de dióxido de titanio dopadas con Pt, Fe, Zn las cuales también fueron obtenidas por combustión en solución. A todos los compuestos se les realizó una respectiva caracterización estructural y morfológica para luego ser sometidos a las pruebas biológicas *in vitro* y como plus realizar ensayos *in vivo* con las mejores estructuras de TiO_2 combinadas con HY. La Figura 3.1 resume la metodología general seguida en el desarrollo de la tesis.

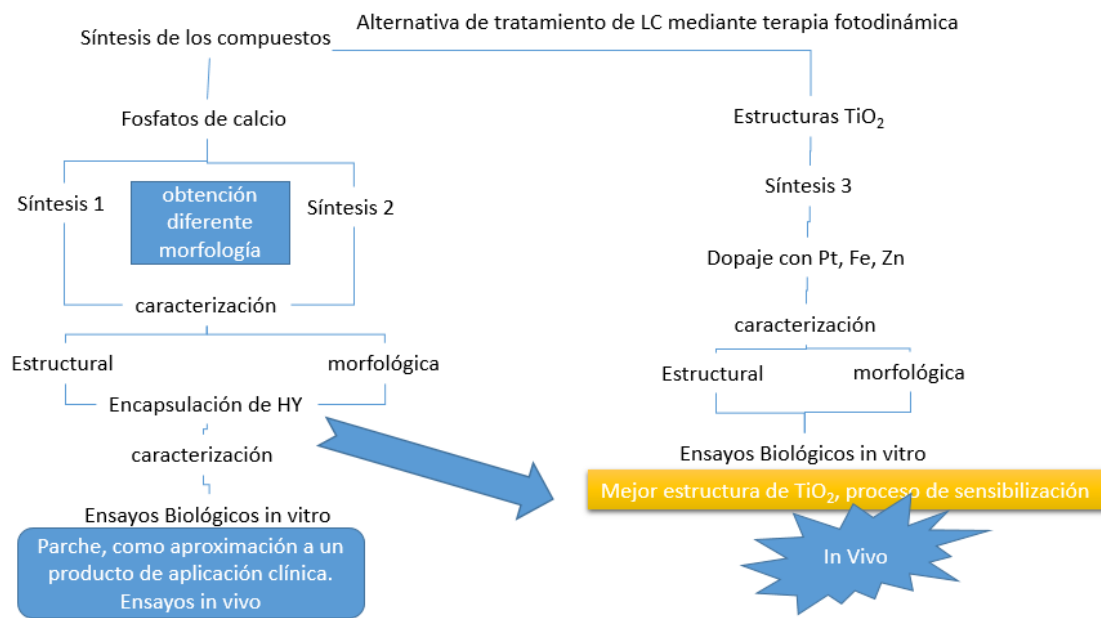


Figura 3.1 Esquema de la metodología utilizada para alcanzar los objetivos de este trabajo

3.1 Síntesis de los sistemas de encapsulación

3.1.1 Síntesis de las nanoestructuras de fosfato de calcio esféricas (Síntesis 1)

Las estructuras de fosfato de calcio (FC) se sintetizaron por la ruta de autocombustión en solución. Como materias primas se usaron nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck), hidrogeno-fosfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Alfa Aesar) como fuentes de calcio y fósforo respectivamente, glicina $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (Merck) como combustible, y ácido nítrico HNO_3

al 65% (Biochemical). Inicialmente el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ fueron mezclados en 20 ml de agua destilada bajo constante agitación manteniendo una relación $\text{Ca/P}=1,5$; a la mezcla se añadió HNO_3 suficiente para disolver el precipitado previamente formado. Con el fin de agregar la cantidad adecuada de combustible (glicina) y obtener la máxima temperatura de combustión, se usó el parámetro ϕ definido como $\phi = \frac{\sum \text{Coefficient.Reducing elements X Valence}}{\sum \text{Coefficient.Oxidant elements X Valence}}$ y ajustado a la relación estequiométrica oxidante-combustible para $\phi = 1$. En esta etapa la solución permaneció en agitación y calentamiento a una temperatura de 60°C durante una hora hasta la evaporación casi total del solvente y formación de una resina, esta resina fue llevada a una temperatura de 140°C hasta la combustión. Las cenizas formadas fueron llevadas a tratamiento térmico a 800°C durante 2 horas. Los polvos fueron suspendidos en 80 ml de alcohol isopropílico y ultrasonificados en un equipo Cole Palmer de 500W a diferentes amplitudes durante 1 hora. Los polvos fueron nuevamente secados durante 2 horas a 90°C .

3.1.2 Síntesis de las nanoestructuras de fosfato de calcio tipo whiskers, agujas o varillas (Síntesis 2)

Con el objetivo de modificar la morfología de los fosfatos de calcio mediante la ruta de combustión en solución se optó por la modificación de la síntesis tradicional con la combinación de sales fundidas y asistencia de reacción por microondas [69]. Para esto el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ fueron mezclados en 15 ml de agua destilada bajo constante agitación manteniendo una relación $\text{Ca/P}=1,5$; a la mezcla se añadió HNO_3 suficiente para disolver el precipitado previamente formado. La cantidad de combustible se controló con el parámetro ϕ definido en la ecuación 1. En esta etapa la solución permaneció en agitación constante por una hora. La sal usada como aditivo fue el cloruro de potasio KCl (Merck). Con el fin de controlar la cantidad de sal a adicionar, se definió el parámetro Υ , como la relación entre la cantidad en peso del FC a preparar y la cantidad de sal a adicionar. Se prepararon soluciones con valores de Υ de 0, 0.07, 0.11, 0.16, 0.33, y 1. Las muestras fueron renombradas como Υ_0 , Υ_1 , Υ_2 , Υ_3 , Υ_4 , y Υ_5 respectivamente. Las mezclas fueron llevadas por separado a una plancha de calentamiento a una temperatura de 60°C bajo fuerte agitación y cada mezcla permaneció en la plancha hasta la evaporación casi total del solvente. Cada mezcla fue llevada por separado a un horno microondas Marca LG de 2.4GHz y puesto entre refractarios de Alúmina manteniendo la irradiación con microondas en todas las muestras durante 1:30 s, hasta la combustión. Cada sistema se dejó en el microondas durante 20 minutos con el fin de evitar el choque térmico del beaker. Posteriormente, cada muestra fue lavada mediante filtración al vacío con agua caliente por tres veces con el fin de eliminar el exceso de KCl presente. El material recuperado se secó en una estufa eléctrica por 30 minutos a 70°C . Los polvos obtenidos fueron suspendidos en 80 ml de alcohol isopropílico y sometidos a agitación con ultrasonido en un equipo Cole Plamer de 500W a diferentes amplitudes durante 1 hora. Los polvos fueron nuevamente secados durante 2 horas a 90°C .

3.1.3 Síntesis de las estructuras de TiO₂ dopadas con Pt, Fe, Zn (Síntesis 3)

Los precursores usados en la síntesis del TiO₂ fueron isopropóxido de titanio (IV) Ti(OCH(CH₃)₂)₄Ti (IV) (Alfa Aesar), glicina NH₂CH₂CO₂H (Alfa Aesar), tetracloruro de platino PtCl₄ (SigmaAldrich), nitrato de Zinc Zn(NO₃)₂·6H₂O (Sigma), nitrato de hierro Fe(NO₃)₃·9H₂O (Merck) y ácido nítrico HNO₃ (Scharlau).

Inicialmente se obtuvo el titanyl nitrato mediante la reacción química previamente reportada [34] entre el ácido nítrico y el Titanyl hidróxido, el cual fue sintetizado por la hidrólisis lenta de 2,98 ml de Ti (IV) isopropóxido en 25 ml de agua destilada con fuerte agitación a 0°C durante 1 hora. Posteriormente, se siguió con el proceso de nitración agregando 3,98 ml de ácido nítrico y agitando por dos horas hasta formar una solución transparente. Después se agregaron los dopantes de Pt, Fe, Zn a una concentración de 0.6% por cada síntesis. Luego 1,03 g de glicina fue añadido a las soluciones anteriores y se continuó con la agitación por 5 minutos. La mezcla oxido reductora fue llevada hasta la temperatura ambiente y posteriormente puesta en una plancha de calentamiento a 90°C con el fin de eliminar lentamente el agua hasta la formación de una resina blanca. En ese momento la temperatura de la plancha fue llevada hasta 180 °C produciéndose una reacción exotérmica de combustión en dos etapas, primero la formación de una ceniza gris y después de 10 minutos la formación de polvos con coloración amarilla que al ser llevados a temperatura ambiente se tornaron blancos. Estos polvos fueron macerados en mortero de ágata.

3.2 Caracterización estructural de los polvos obtenidos en las rutas de síntesis

La estructura de los materiales obtenidos fue evaluada usando difracción de rayos X con un equipo Xpert-Pro PANanalytical difractómetro de doble círculo multipropósito de radiación Cu-Kα ($\lambda = 0.15406$ nm) en ángulos de difracción entre 10-50° y 20-80° (2θ) para las muestras de fosfatos de calcio y para las muestras de TiO₂ respectivamente. Las medidas de espectroscopía Raman fueron obtenidas con un equipo Labram Horiba usando un láser de 532 nm con potencia de 5mW. Para el análisis morfológico las muestras fueron preparadas mediante lavado y ultrasoniación en alcohol isopropílico en un equipo Cole Palmer de 500W con una amplitud de 80% durante 1:20 h. Las imágenes SEM fueron recolectadas con un equipo Carl Zeiss EVO MA10 y microscopio electrónico de barrido con emisión de campo marca JEOL-JSM – 6701F (FE-SEM). Posteriormente se realizó un análisis de imagen y estadístico con un software GNU e InfoStat respectivamente. Para las muestras de TiO₂ se realizaron medidas de Espectrofotometría de reflectancia difusa UV-Vis usando un espectrofotómetro Marca Ocean Optics S 2000 con rango espectral entre 280-800 nm.

3.3 Encapsulación de Hipericina (HY) en las estructuras de fosfatos de calcio sintetizadas

Capítulo 3- Procedimiento Experimental

La encapsulación de la HY se hizo en las estructuras de fosfatos de calcio obtenidas en la ruta de síntesis 1 y en la mejor estructura por sus propiedades morfológicas obtenidas en la ruta de síntesis 2 (aquella que presentó menor cantidad de agregados y tamaño de grano apropiado para la aplicación muestra γ_1 γ_3).

Para la encapsulación de la HY se usó la técnica de impregnación-agitación. Para ello 20 mg de nanopartículas fueron re-suspendidas en 0,5 ml de DMSO y llevadas a agitación mediante ultrasonido durante 30 segundos. Una solución de HY con una concentración de 100 μ M en DMSO se preparó por separado y posteriormente se agregó a la dispersión de nanopartículas. El sistema se dejó en agitación durante 20 horas a 60 rpm. Posteriormente la dispersión fue centrifugada a 15000 rpm. El precipitado fue recuperado y llevado a 40°C durante 24 horas. Las posibles interacciones del fármaco con el encapsulante se evaluaron por medio de espectroscopia IR con transformada de Fourier en un equipo Thermo Scientific Nicolet iS50 FTIR y espectrofotometría VIS en un equipo Infinite M200Pro, TECAN

3.4 Evaluación indirecta de producción de especies ROS

La semicuantificación de producción de especies ROS se realizó indirectamente mediante ensayos de fluorescencia de moléculas de prueba. En el caso de la HY encapsulada en los FC la sonda usada fue Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG- Thermo Fischer Scientific) la cual es específica para especies reactivas de oxígeno (1O_2) y para los compuestos de TiO_2 dopados se empleó 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA-sigma Aldrich) la cual es específica para radicales hidroxilo (-OH). Se prepararon suspensiones de la HY encapsulada en los FC y de las NPs del TiO_2 en medio acuoso en un volumen final de 200 μ l en placas negras de 96 pozos de fondo plano (Corning™). A los compuestos de FC se le añadió 3 μ M de SOSG y para las NPs de TiO_2 se agregó 10 μ g/mL de H2DCFDA; ambas moléculas de prueba disueltas previamente en DMSO (los experimentos fueron hechos por triplicado). Posteriormente las placas fueron sometidas a irradiación visible durante 60 minutos tomando medidas de fluorescencia en diferentes intervalos con valores de longitud de emisión/excitación 505/525 nm, 488/520 para la SOSG y la H2DCFDA respectivamente en un equipo Infinite M200Pro, TECAN.

3.5 Cuantificación de la carga del fármaco HY en las estructuras de fosfatos de calcio

Para la determinación de la cantidad de hipericina cargada en las nanopartículas de fosfato de calcio se construyó una curva estándar de concentración. Para ello la HY fue diluida en metanol en diluciones seriadas 1:5 a partir de 25 μ g de hipericina[30]. La fluorescencia de la dilución fue leída en un espectrofluorómetro Variokan Flash (Thermo Scientific) a una

longitud de onda de excitación de 542nm y emisión a 610 nm (el experimento fue realizado por triplicado). Los datos obtenidos fueron ajustados al mejor modelo matemático obteniendo una ecuación de intensidad en función de la concentración. Posteriormente 20 µg /mL de partículas cargadas con HY fueron sometidas a lavado en metanol, vortex y centrifugación varias veces, con el fin de liberar la HY contenida en ellas. El sobrenadante fue recuperado y su fluorescencia fue medida en tres réplicas por triplicado. Este resultado se compara con la curva estándar anteriormente realizada para calcular la cantidad de HY encapsulada en las partículas.

3.6 Ensayos biológicos

3.6.1 Ensayos realizados con fosfatos de calcio (Síntesis 1-2)

3.6.1.1 Cultivo de Parásitos

Para los diferentes ensayos *in vitro* de los FC se usaron promastigotes de L (V) panamensis (MHOM/CO/87/UA140 epir-GFP) que corresponden a parásitos transfectados con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Los parásitos se mantuvieron en cultivo en medio NNN (Nicole Novy Neal) a 26°C. Para las infecciones *in vitro* de macrófagos derivados de monocitos humanos (huMDM) se usaron promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, es decir de 5 días de cultivo que corresponden a promastigotes metacíclicos o infectivos.

3.6.1.2 Obtención de macrófagos humanos derivados a partir de monocitos de sangre periférica (huMDM) para los ensayos *in vitro*

Para los experimentos biológicos *in vitro* los huMDM se obtuvieron a partir de la metodología reportada previamente por Montoya [110]. Se tomaron 60 mL de sangre periférica almacenada en tubos de 10 mL. Los tubos se agitaron manualmente hasta que se formó coágulo de fibrina. Una vez finalizado el proceso de desfibrinación se transfirió la sangre a un tubo nuevo, donde se diluyó con PBS en proporción 1:1. En tubos cónicos de 15 ml se depositaron 3 ml de Ficoll-Hystopaque 1077 (Sigma-Aldrich) y se agregaron lentamente 12 ml de la sangre diluida 1:1 en PBS. Estos tubos se centrifugaron a 2000 r.p.m (300g) por 20 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la capa de células mononucleares, las cuales se lavaron dos veces con PBS a 1800 rpm por 5 minutos. El botón de células que quedó en el fondo después de estos lavados correspondió a la población de células mononucleares las cuales fueron re-suspendidas en medio RPMI-1640 suplementado con 0.1% de suero autólogo. 5×10^5 células por pozo fueron colocadas en platos de 96 pozos y 3×10^6 células por pozo fueron colocadas en platos de 24 pozos. Las células se dejaron adheriendo durante 4h a 37°C, al 5% de CO₂. Luego de este periodo de incubación se removieron las células no adherentes con dos lavados con 500 µl de PBS por pozo. Se adicionó RPMI al 10% de suero autólogo y las células se dejaron diferenciando durante 72h.

3.6.1.3 Captación de las nanopartículas cargadas con hipericina en huMDM.

La captación celular fue evaluada mediante microscopia de fluorescencia en un microscopio Nikon Labophot-2 a una longitud de onda de excitación de 540-580 nm y de emisión de 600-680 nm. Se cultivaron huMDM en presencia de 20ug/ml de nanopartículas cargadas con el fármaco. Se tomaron imágenes a las 2, 4 y 6 horas para evidenciar la captación. Si las nanopartículas son cargadas por las células estas deben presentar fluorescencia con longitud de emisión en el rojo.

3.6.1.4 Fuente de irradiación de luz visible

La fuente de luz usada con el fin de activar la HY fue una lámpara de luz visible hecha con 18 leds de 1 Watt de potencia de color blanco. La lámpara tiene un sistema de refrigeración y control de temperatura. La potencia y espectro de emisión de la lámpara se caracterizó con un potenciómetro Thorlabs PM100D y un espectrofotómetro Ocean Optics PS-2000

3.6.1.5 Ensayos de Citotoxicidad

El potencial citotóxico de las nanopartículas solas y cargadas con hipericina se determinó según la concentración letal 50 (CL₅₀ o CC₅₀) en cultivos primarios huMDM cultivados en presencia de diferentes concentraciones de nanopartículas solas y de nanopartículas cargadas con hipericina. Para ello, 5 x 10⁵ huMDM fueron colocadas en platos de 96 pozos en 200 µL de RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) y 10% de penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Se evaluaron 6 concentraciones de nanopartículas solas y cargadas con hipericina, partiendo de 200 µg/ml en diluciones seriadas 1 en 2. Como control de citotoxicidad se usó anfotericina B. Las células se incubaron en presencia del compuesto a diferentes concentraciones durante 2 horas bajo oscuridad. Posteriormente los platos fueron sometidos a irradiación visible garantizando una dosis de 22 J/cm². Esta energía es la necesaria para la activación del fármaco [30]. Luego de la irradiación, las células se encubaron nuevamente a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas en condiciones de oscuridad. Los resultados se expresaron como la Concentración Letal 50 (CL₅₀) [111], calculada mediante un análisis Probit, (relación dosis-respuesta) [112]

3.6.1.6 Evaluación de la actividad leishmanicida *in vitro*

Para los ensayos de actividad leishmanicida *in vitro* en amastigotes intracelulares de *Leishmania*, se infectaron 3 x 10⁵ huMDM con promastigotes de *L. (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140 epirGFP) en proporción 30:1 parásitos:células siguiendo el protocolo descrito por Muñoz y col en 2009[112]. Las nanopartículas se adicionaron a una

concentración inicial de 20 µg/ml en diluciones seriadas 1 en 2. Pasadas 2 horas de incubación, las células se irradiaron con la luz visible suministrando una energía de 22 J/cm². Las células se llevaron nuevamente a incubación 34°C, 5% de CO₂ y luego de 72 horas se determinó el efecto de los compuestos en la viabilidad de los amastigotes intracelulares por medio de citometría de flujo. Para ello, las células se desprendieron del fondo de cada pozo y las células en suspensión se leyeron en el citómetro de flujo (Cytomics FC 500MPL, Beckman Coulter, E.U) a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión contando al menos 10.000 eventos. Se determinó el porcentaje de células infectadas según el número de eventos positivos (fluorescencia verde) mediante análisis de diagrama de puntos, al igual que la carga parasitaria según el análisis de la Intensidad de Fluorescencia Media para el canal de fluorescencia verde [112]. La actividad anti-*Leishmania* se calculó mediante el porcentaje de inhibición de la infección obtenido para cada compuesto a la concentración evaluada, determinando el porcentaje de infección de acuerdo a lo reportado por Muñoz y col 2009. La Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) para cada compuesto se calculó mediante un análisis estadístico, usando como datos los porcentajes de infección y de inhibición de la infección obtenidos para cada concentración evaluada en cada caso. Se calculó además el índice de selectividad (IS) dividiendo la actividad citotóxica entre la actividad leishmanicida con la fórmula $IS = CC_{50}/CE_{50}$.

3.6.1.7 Ensayos biológicos *in vivo*

Con el fin de llevar a cabo los ensayos *in vivo* con la HY encapsulada en los fosfatos de calcio el compuesto que presentó mejor respuesta *in vitro* fue utilizado para la fabricación de un parche polimérico con las nanopartículas dispersas. Esta etapa fue realizada en asocio con el instituto tecnológico de Aragón. Para esto la HY encapsulada en los FC fueron mezclados con el polímero PA6, una poliamida termoplástica semicristalina de buena resistencia mecánica (en una proporción 10% en peso de partículas respecto al polímero). La mezcla fue sometida a un tratamiento de molienda, secado y posteriormente llevada a una extrusora de doble husillo donde se realizó la extrusión del hilo bajo unas condiciones de procesamiento de 240°C a 250°C y una velocidad de 100-150 rpm durante 5 minutos. El hilo obtenido fue cortado utilizando Nitrógeno líquido y usado en la conformación del parche para su posterior evaluación antileishmania. (ver Figura 3.2)



Figura 3.2 Metodología de conformación del parche mediante hilado por extrusión de doble husillo

El potencial terapéutico del parche se evaluó en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente siguiendo el método descrito por Robledo y colaboradores 2012 y Montoya [113]. Para ello, hámsteres de 7 semanas de edad en promedio se infectaron con 5×10^8 promastigotes de *L. (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140 epirGFP). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar para micro y macroambiente (temperatura of 24-28°C; 70-80% humedad), alimento (10% del peso Rodentina®, agua estéril ad libitum), con cambios de cama una vez por semana y agrupados por género y rango de edad. Los animales se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales (n = 5 animales por grupo) G1: Glucantime, G1: Parche con luz + Partículas, G2: Parche sin luz + partículas, G3: Parche con luz, G4: Parche sin luz. La respuesta terapéutica del parche se comparó con la del glucantime intralesional, por ser éste el medicamento estándar y ampliamente utilizado.

Luego de 6 a 8 semanas, una vez los animales desarrollaron las lesiones, se inició el tratamiento con el parche. El esquema de tratamiento para el parche fue el siguiente: Se hidrató el material y se colocó sobre la herida, se irradió cada lesión con una lámpara de luz visible de 5 mW/cm² durante el tiempo apropiado para suministrar 22 J/cm². Este tratamiento se aplicó dos veces por semana durante tres semanas. Para los grupos sin exposición a la luz, la formulación luego de aplicada era protegida de la luz durante 24 horas. El glucantime se aplicó intralesionalmente (200 µg en 20 µl) dos veces por semana durante tres semanas.

Una vez finalizado el tratamiento se midió el tamaño de la lesión. La respuesta terapéutica a cada tratamiento se evaluó según criterios clínicos en términos de cura (cicatrización y desaparición completa de la lesión), mejoría clínica (reducción > 30% en el tamaño de la

lesión), falla (reducción < 30% o aumento del tamaño de la lesión) o recaída (reaparición de la lesión luego de una cura inicial).

3.6.2 Ensayos realizados con dióxido de titanio

3.6.2.1 Cultivo de Parásitos

Para los diferentes ensayos *in vitro* se usaron promastigotes de *L. amazonensis* MPRO/BR/1972/M1841-LV- Los parásitos se mantuvieron en cultivo en medio “in liver-infusion tryptose médium” (LIT)(SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco) a 28°C. Para las infecciones *in vitro* de los macrófagos se usaron promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, es decir de 5 días de cultivo que corresponden a promastigotes metacíclicos o infectivos.

3.6.2.2 Obtenciones de los macrófagos y ensayos de citotoxicidad

Se obtuvo macrófagos peritoneales según la metodología reportada previamente por Velasquez y colaboradores [114]. Para ello ratones Swiss (machos, con 6 a 8 semanas de edad, y masa de entre 25 e 30 g) fueron inoculados via intraperitoneal con 3 mL de tioglicolato de sodio al 3 % [115]. Después de cuatro días los ratones fueron sacrificados según los procedimientos adoptados por el comité de ética CEUA/FCF/CAr: 43/2016. Los macrófagos fueron retirados con 5ml de PBS y almacenados en tubos falcon bajo hielo [116]

3.6.2.3 Captación de las nanopartículas de TiO₂ por los huMDM.

Con el fin de verificar la captación de las partículas de TiO₂ en las células mediante fluorescencia se usó como molécula de prueba extracto de hipericina. Para ello se cargó mediante la técnica de impregnación-agitación la solución de extracto de HY en las nanopartículas de TiO₂ y la captación celular fue evaluada mediante microscopia de fluorescencia en un microscopio Nikon Labophot-2 a una longitud de onda de excitación de 540-580 nm y de emisión de 600-680 nm. Se cultivaron huMDM en presencia de 20µg/ml de nanopartículas de dióxido de titanio cargadas con HY como molécula de prueba. Se tomaron imágenes a las 2, 4 y 6 horas para evidenciar la captación. Si las nanopartículas son cargadas por las células estas deben presentar fluorescencia con longitud de emisión en el rojo.

3.6.2.4 Fuente de irradiación de luz visible

Capítulo 3- Procedimiento Experimental

La fuente de luz usada con el fin de activar los compuestos de TiO₂ fue una lámpara de luz visible con longitud de 400-800 nm. La potencia y espectro de emisión de la lámpara se caracterizó con un potenciómetro Thorlabs PM100D y un espectrofotómetro Ocean Optics PS-2000.

3.6.2.5 Ensayos de citotoxicidad

Los macrófagos fueron contados y su concentración ajustada a 5×10^6 macrófagos/mL. 100 μ L de la suspensión de macrófagos fueron adicionados en cada pozo de una placa de 96 pozos. Para la adhesión de las células estas fueron encubadas durante 4 h a 37°C y 5 % de CO₂ y posteriormente lavadas con 200 μ L de medio RPMI. Se adicionaron los compuestos de TiO₂ en diluciones seriadas entre 300 a 1 μ g/mL y nuevamente se encubaron durante 4 horas para la posterior irradiación durante 40 minutos con luz visible y 55 J, llevándolos nuevamente a encubación por 24 h, tiempo después del cual, se realizó el ensayo MTT para determinar la viabilidad celular descrito inicialmente por Mosman y colaboradores [117]. El ensayo se basa en la capacidad de las células vivas para reducir la sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) en formazán catalizado por metálsulfato de fenazina (PMS), el cual característicamente presenta un color azul. En cada pozo de la placa se adicionaron 10 μ L de MTT/PMS [118] y se encubaron las células protegidas de la luz durante 75 min a 28°C. Luego de este tiempo, los cristales de formazán fueron disueltos con 100 μ L de una solución de dodecil sulfato de sodio al 10% en HCl en una concentración de 1 mol/L (SDS-HCl) y las células se encubaron nuevamente por 30 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz durante 30 min. La lectura de la placa se realizó en un espectrofotómetro de placas a longitud de onda de 540 nm. La intensidad de la absorbancia es proporcional a la cantidad porcentual de macrófagos vivos. Estos ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

3.6.2.6 Evaluación *in vitro* de la capacidad anti amastigota intracelular de *L. amazonensis* de los compuestos de TiO₂

Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones swis conforme al ítem anterior y fueron encubados en platos de 24 pozos con laminulas circulares de 13 mm de diámetro a una concentración de 1×10^5 macrófagos/mL durante 4 h (37°C, 5 % de CO₂). Parásitos de *L. amazonenses* fueron adicionados en una proporción 5:1 (promastigotas:macrófagos) y dejados por 24 horas, permitiendo la infección de los macrófagos y posterior replicación de los parásitos en el interior del macrófago. Los parásitos no interiorizados fueron removidos mediante lavado con PBS. Los compuestos de TiO₂ fueron añadidos en diluciones seriadas por debajo del valor de LC₅₀ encontrada en el ensayo de citotoxicidad. Los compuestos fueron encubados por 4 horas previas a la irradiación con la luz durante 40 minutos y posteriormente otras 24 horas más. Después de este tiempo las laminulas fueron removidas

y coloreadas con Gimsa para la observación del número de amastigotas intracelulares por cada 100 macrófagos mediante microscopía óptica tradicional [119].

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y según lo establecido por el comité de ética en el uso de animales (CEUA), CEUA/FCF/CAR 44/2016, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, UNESP-Araraquara

3.6.2.7 Ensayos biológicos *in vivo* Compuesto $TiO_2 + Zn + HY$

Para realizar los ensayos *in vivo* se tomó el compuesto de TiO_2 que presentó mejores resultados en la evaluación *in vitro* y se elaboró una suspensión con HY de forma análoga a lo realizado con la encapsulación en sistemas de fosfatos de calcio. Para ello 20 mg de partículas de $TiO_2 + Zn$ fueron suspendidas en una solución de HY al 25 μM y mantenida bajo agitación durante 24 horas. Después las partículas fueron recuperadas para ser usadas en la preparación de la solución stock con PBS como medio. Hembras BALB/c con 3-4 semanas de edad fueron infectadas subcutáneamente en la pata trasera derecha con una concentración de 1×10^7 de promastigotas *L. amazonensis* en fase meta cíclica. Después de dos meses de infección se dio inicio al tratamiento vía subcutáneo durante 30 días aplicando dosis en días alternados y suministrando una energía de activación equivalente a 55 J/cm^2 con longitudes de onda 492 nm y 660 nm. Se establecieron 7 grupos con una cantidad de 5 animales por cada uno de la siguiente forma: Grupo control animales no infectados (G1), animales infectados y no tratados (G2), Animales infectados y tratados con el vehículo (G3), animales infectados y tratados con fármaco de referencia vía intraperitoneal, Anfotericina B (2 mg/Kg- G4) animales infectados y tratados con el compuesto a un valor de $\frac{1}{2} EC_{50}$ (G5), animales infectados y tratados con el compuesto a un valor de EC_{50} (G6), animales infectados y tratados con el compuesto a un valor de EC_{50} (G7). Durante el tiempo de tratamiento se realizó la medida de la lesión mediante un calibrador digital marca Mitutoyo. Después del tratamiento los animales fueron sacrificados, siguiendo las recomendaciones del comité de ética-protocolo CEUA/FCF/CAR: 43/2016 y la dermis y epidermis de la región de la lesión fueron removidas para la cuantificación de la carga parasitaria mediante las técnicas de dilución limitante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmania Cutánea

4.1 Síntesis y caracterización

4.1.1 Fosfatos de Calcio Síntesis 1

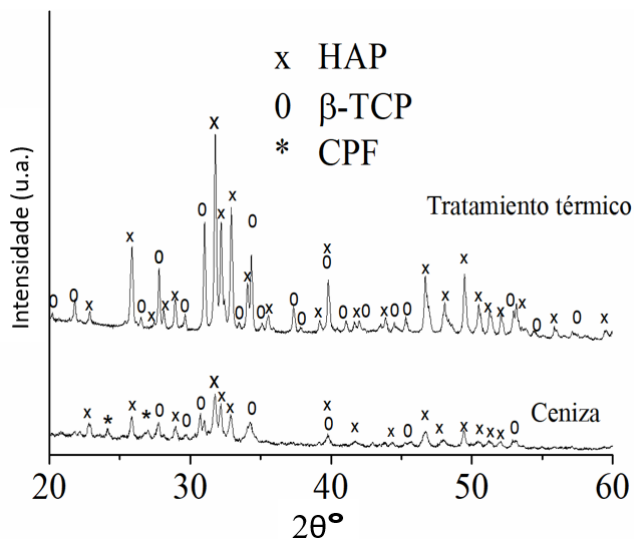


Figura 4.1 Difractogramas de rayos X para los polvos obtenidos por combustión en solución antes (Ceniza) y después del tratamiento térmico.

La Figura 4.1 muestra el difractograma de rayos X de las muestras obtenidas por combustión (ceniza) y con tratamiento térmico de 900° C durante dos horas. Desde la combustión se evidencia la formación de dos fases mayoritarias de fosfato de calcio: la Hidroxiapatita la cual indexa en el patrón JCDPDS 010740566 (HAP), y el fosfato de calcio tricálcico fase β JCDPDS 01-070-2065 (β-TCP). Además se detecta la presencia de fases minoritarias de pirofosfato de calcio 01-073-0440 (CPF). Con el tratamiento térmico es posible corroborar que se mejora la cristalización de las fases mayoritarias y la fase pirofosfato desaparece.

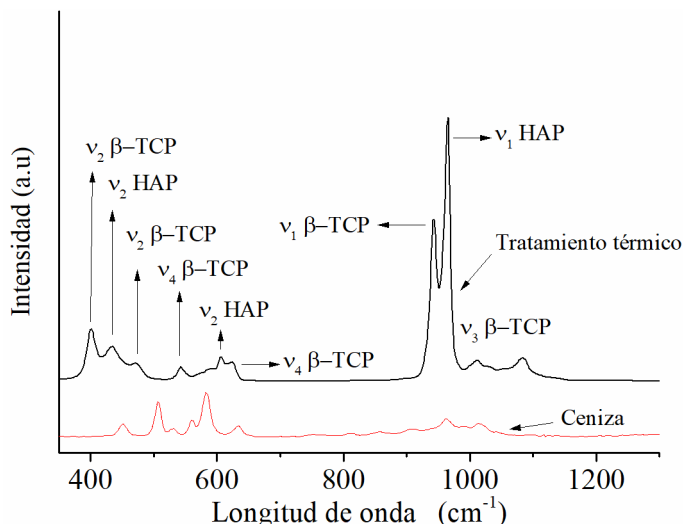


Figura 4.2 Espectrofotometría Raman para las cenizas y polvos tratados térmicamente obtenidas por combustión en solución.

En la Figura 4.2 se muestran los espectros Raman de las muestras obtenidas con y sin tratamiento térmico. Los espectros de la HAP y el β -TCP están dominados por los modos de vibraciones internas de los grupos PO_4^{3-} [120]. El modo de vibración ν_1 que corresponde al estiramiento simétrico del enlace P-O, se ubica a 962 cm^{-1} para la HAP y en 945 cm^{-1} para el β -TCP. Los modos de flexión doblemente degenerados O-P-O ν_2 para el β -TCP están en 403, 473 mientras que para la HAP se ubica en 432. Los modos de estiramiento asimétricos triples degenerados P-O ν_3 , se encuentran a 1013 y 1084 cm^{-1} para el β -TCP y los modos de flexión triplemente degenerados O-P-O ν_4 se encuentran en $545\text{-}625 \text{ cm}^{-1}$ para el β -TCP y para la HAP el ν_4 se observa en 606 cm^{-1} [121, 122]. En las cenizas se observan débilmente los modos de estiramiento simétrico P-O y con mayor intensidad los modos de estiramiento asimétricos triples degenerados P-O (ν_3) y los modos de flexión triplemente degenerados O-P-O (ν_2 y ν_4).

La Figura 4.3 muestra las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los polvos obtenidos por combustión en solución. Se observó la presencia de agregados de aproximadamente $5 \mu\text{m}$ compuestos a su vez de nanopartículas con morfología granular o esférica. El tamaño de grano de las nanopartículas se estimó por medio de un conteo estadístico de 200 partículas. El comportamiento de los datos del tamaño del grano obedece a una distribución Gaussiana. El tamaño aproximado de grano obtenido fue de $42.9 \text{ nm} \pm 1.12 \text{ nm}$.

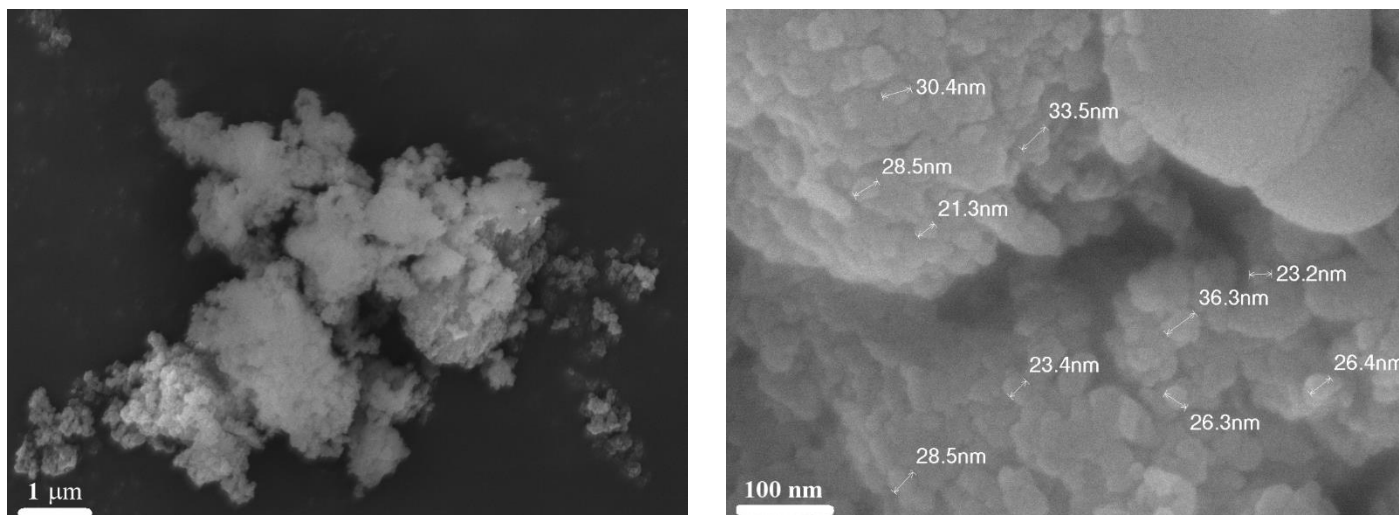


Figura 4.3 Imágenes SEM de los polvos de fosfato de calcio obtenido por combustión en solución y tratado térmicamente a 800°C durante dos horas.

4.1.2 Fosfatos de calcio Síntesis 2

La Figura 4.4 muestra los difractogramas de rayos X para las muestras Υ_0 , Υ_1 , Υ_5 respectivamente. La fase predominante sin adición del KCl fue el pirofosfato de calcio Ca_2PO_7 (JCPDS 01-073-0440) y una fase minoritaria de fosfato de calcio hidratado $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS 00-003-0331). Con la presencia del KCl se formaron fases apatíticas como la Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (JCPDS 01-074-0566) y clorapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ (JCPDS 01-70-1454). Con el incremento de la cantidad de KCl se favoreció la formación de clorapatita, la disminución de la HAP y la formación de Ca_2PO_7 (muestra Υ_5)

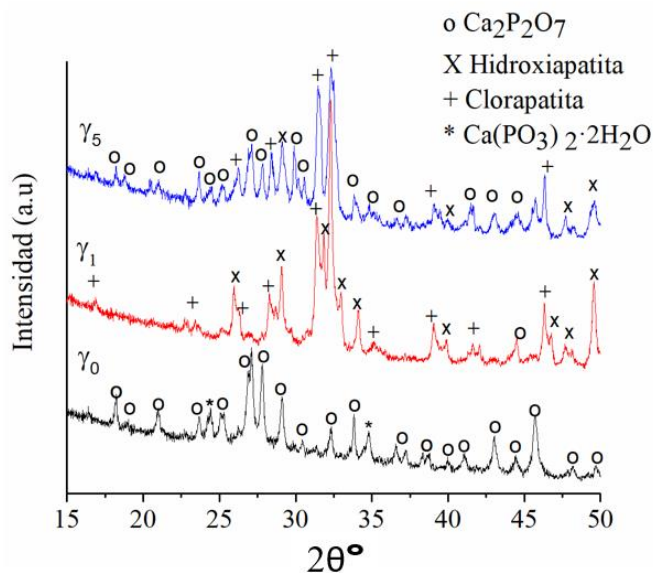


Figura 4.4 Difractogramas de Rayos X para las muestras γ_0 , γ_1 , γ_5

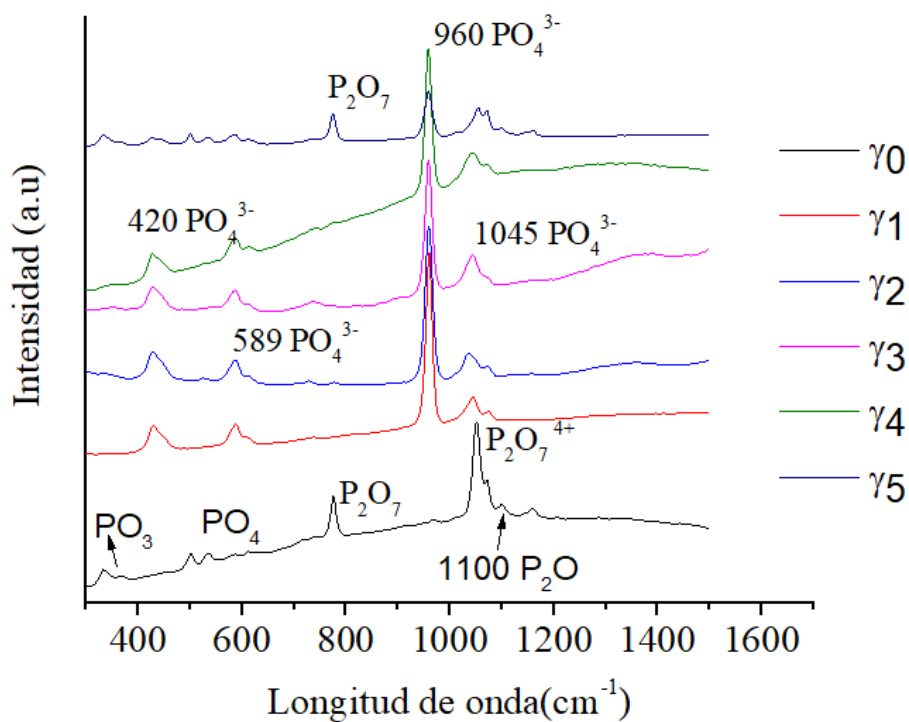


Figura 4.5 Espectros Raman para las muestras en función del contenido de sal γ_n

En la Figura 4.5 se muestran los espectros Raman entre 300 y 1500 cm^{-1} para los fosfatos de calcio sintetizados. Los modos de vibración internos del grupo tetraedral PO_4^{3-} a 960 cm^{-1} corresponden a un estiramiento simétrico de los enlaces P-O. La banda vibracional centrada en 429 cm^{-1} es atribuida a los modos de flexión del enlace O-P-O. Las bandas presentes a

Capítulo 4- Resultados y Discusión

1046 cm^{-1} y 1074 cm^{-1} se relacionan con estiramiento asimétrico del enlace P-O del grupo PO_4^{3-} [123, 124]. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en los difractogramas de rayos X de las muestras Y_1, Y_5 , en las cuales se detectan fases apatíticas como hidroxiapatita y cloroapatita.

Las bandas del espectro Raman localizadas en 742 cm^{-1} y 1051 cm^{-1} , corresponden a modos de vibración de estiramiento simétrico del enlace P-O en el grupo pirofosfato $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, los cuales han sido reportados para pirofosfatos alcalinotérreos [125]. Es importante anotar que ambas bandas se encuentran en la muestra Y_5 , lo cual concuerda con lo encontrado en los difractogramas de rayos X, permitiendo comprobar la influencia de la sal KCl en la formación de hidroxiapatita y cloroapatita y el polimorfo alfa de pirofosfato de calcio [126], que no se encuentra en las muestras $\text{Y}_1, \text{Y}_2, \text{Y}_3$ y Y_4 . También se observan vibraciones a 1163 cm^{-1} y 1105 cm^{-1} asociadas con estiramientos asimétricos del enlace P-O en el grupo $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$. A 974 cm^{-1} se observa una banda de vibración de estiramiento asimétrica del enlace P-O-P en el grupo $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, de baja intensidad en la muestra Y_0 . Finalmente, los picos de baja intensidad en 354 cm^{-1} , 380 cm^{-1} , 504 cm^{-1} y 537 cm^{-1} , corresponden a los modos de flexión [127].

Una vez las muestras fueron lavadas y filtradas al vacío, presentaron alto grado de agregación de las partículas formando aglomerados micrométricos (Figura 4.6 A). Las muestras se sometieron a ultrasonicación, en un equipo Cole Palmer de 500W a una amplitud de 40% durante 5 minutos con el fin de disgregar las partículas (Figura 4.6 B) quedando en un estado adecuado para realizar análisis de imagen. En general todas las muestras presentaron comportamientos similares antes y después del lavado y la ultrasonicación.

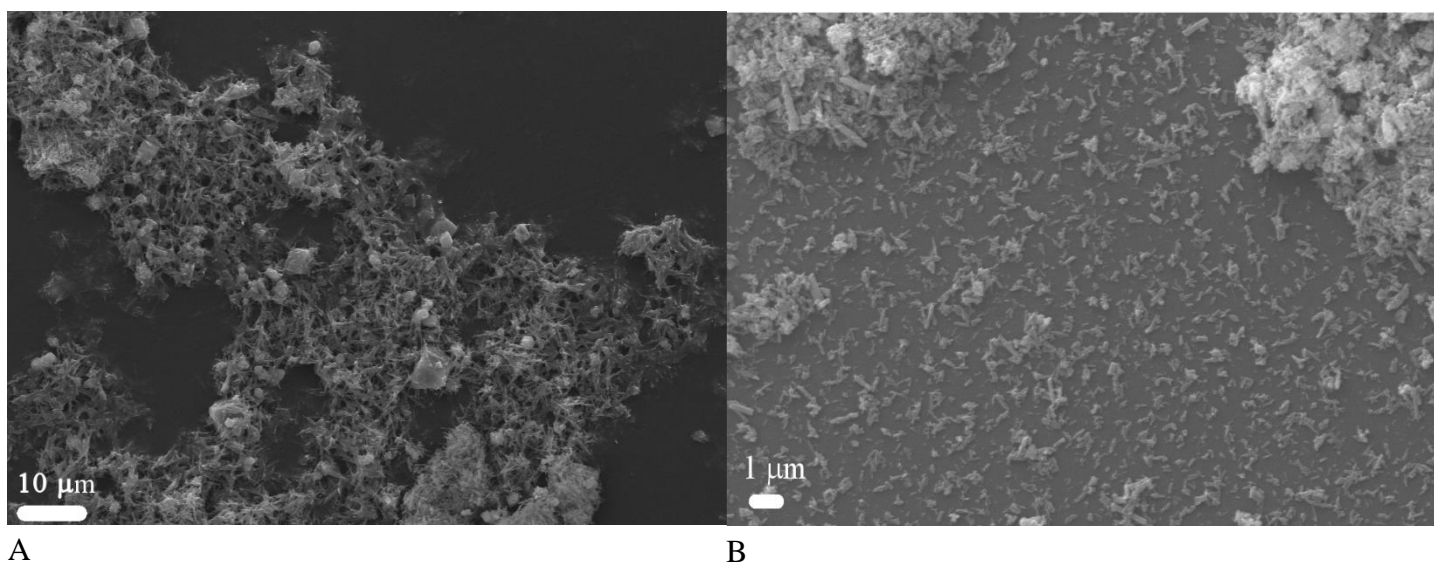


Figura 4.6 Imágenes SEM de los polvos correspondientes a la muestra Y_1 A) Sometidas a lavado y filtración B) Sometidas a lavado, filtración y tratamiento en ultrasonido.

En la Figura 4.7 A-F se observan las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) para todas las muestras sintetizadas con diferente cantidad de sal. Es posible

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmania Cutánea

observar que el contenido de sal durante la síntesis afecta la morfología del polvo obtenido. La Figura 4.7.A, sintetizada sin sal, presenta partículas con morfologías irregulares y gránulos ovalados. Incrementando la cantidad de KCl, se distinguen morfologías tipo whiskers (Figura 4.7 B-F) de longitudes y diámetros variables. La muestra Y5, con la mayor cantidad de sal, presenta nuevamente geometrías granulares en combinación con whiskers (Figura 4.7 F).

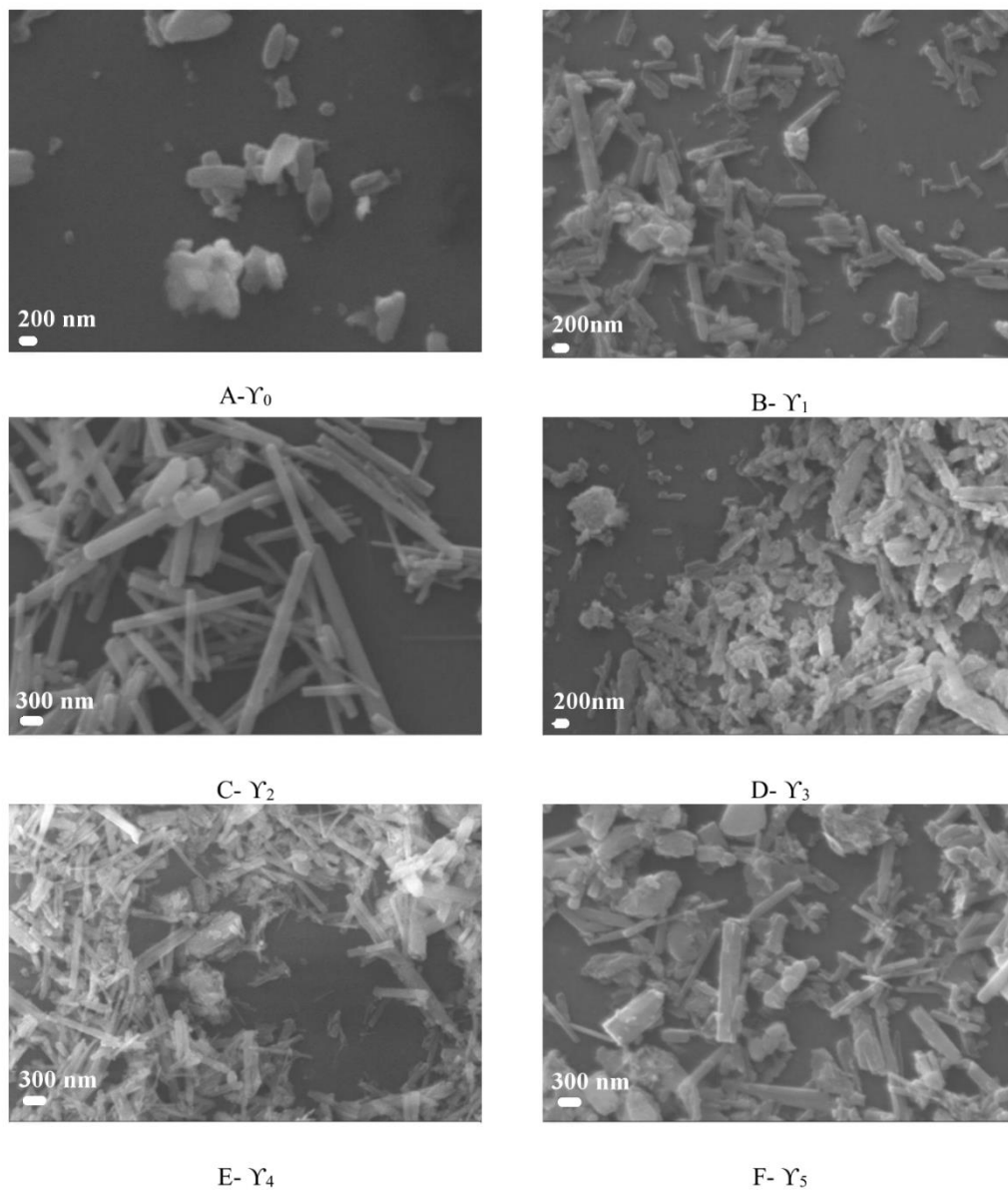


Figura 4.7 Foto micrografías SEM de las muestras A) Y₀ B) Y₁ C) Y₂ D) Y₃ E) Y₄ F) Y₅

Con el fin de validar las observaciones cualitativas, se realizó un análisis estadístico considerando un total de 200 partículas en cada muestra analizada. En la Figura 4.8 se

Capítulo 4- Resultados y Discusión

muestran los histogramas correspondientes al análisis realizado a las imágenes SEM sobre la longitud y diámetro de las agujas resultantes.

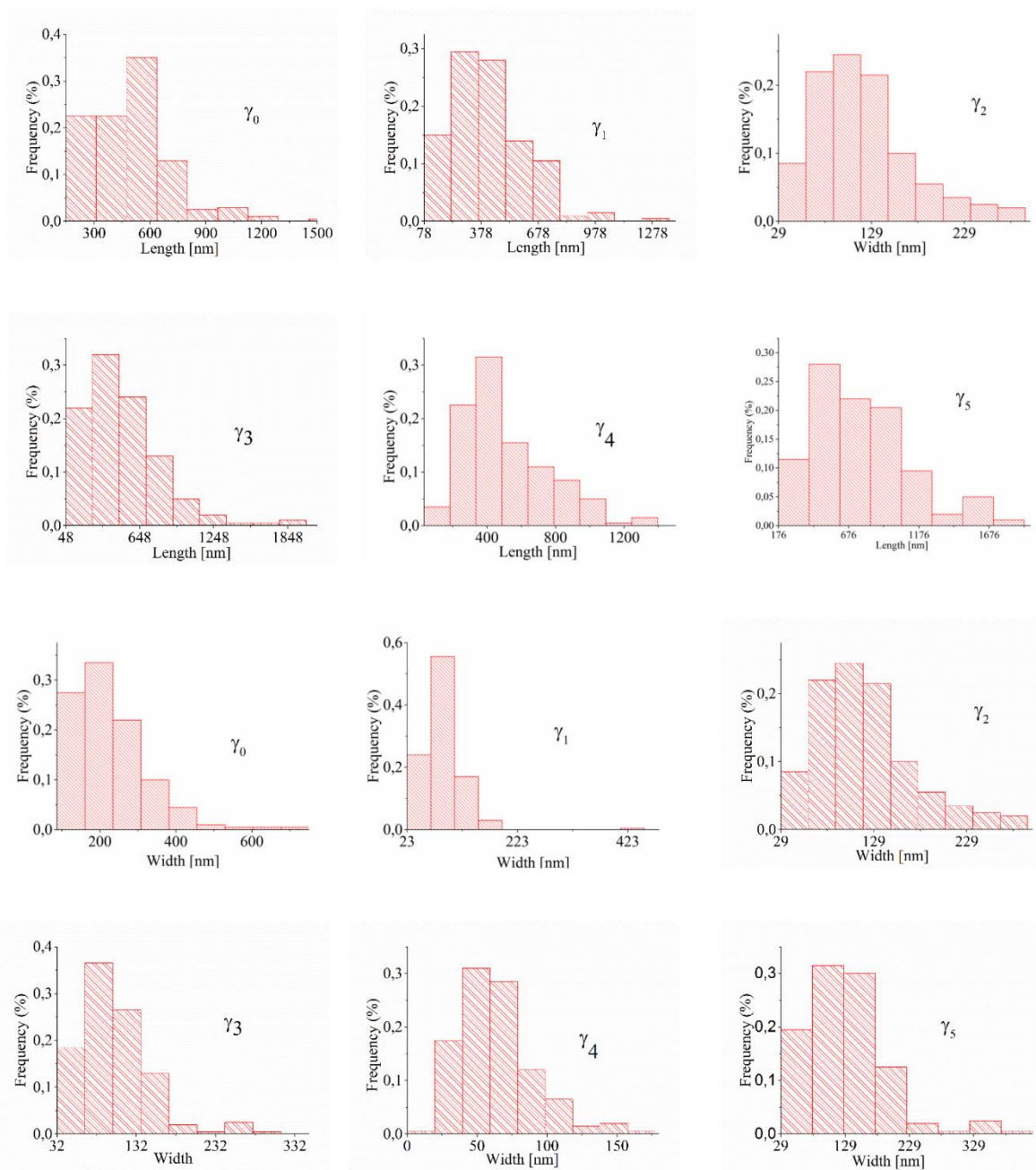


Figura 4.8 Histogramas resultantes de las distribuciones de las medidas de longitud y diámetro de los materiales obtenidos por combustión asistida por sal.

Las muestras que presentan más cantidad de partículas con valores de longitud mayor fueron γ_2 , γ_4 y γ_5 con valores aproximados entre 500 nm y 1 μm . Las muestras que presentaron mayor cantidad de partículas con menor longitud fueron las correspondientes a γ_1 y γ_3 con valores aproximados entre 50 y 500 nm. Los espesores de los whiskers estuvieron en el rango

de 30 a 300 nm aproximadamente. Se definió un factor de forma F como la relación entre el largo y el ancho de cada partícula. A estos datos se les realizó un test de normalidad y homocedasticidad arrojando resultados negativos por lo que se realizó un test estadístico no paramétrico. El método implementado fue Kruskal-Wallis ANOVA donde la hipótesis nula H_0 se definió como H_0 : El efecto del contenido de sal Y_n es idéntico en términos del factor de forma F, mientras que la hipótesis alternativa se expresó como H_1 : Por lo menos el efecto de uno de los contenidos de sal Y_n no es idéntico en términos del factor de forma F, con un nivel de significancia del 5%.

El análisis de Kruskal-Wallis arrojó que, para al menos un tratamiento, el factor de forma F varía significativamente (chi-square 588.84 , $P < 0.05$) con el contenido de sal Y_0 usado durante la síntesis. La Tabla 4.1 resume los valores utilizados para el análisis estadístico de la prueba y la **Tabla 4.2** resume los resultados de dicho análisis.

Tabla 4.1 Valores utilizados para el análisis estadístico para la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis en este experimento

	Tratamiento	N	Media de ranquins		Mediana	Desviación Estándar (SE)	SE de La media
			Media	Media			
Relación de aspecto	Y_0	200	153.96	2.28649	2.25446	0.68401	0.04837
	Y_1	200	527.51	4.90903	4.47269	2.11254	0.14938
	Y_2	200	890.365	9.52927	9.1143	4.27076	0.30199
	Y_3	200	524.24	4.97257	4.41567	2.46535	0.17433
	Y_4	200	831.695	8.47193	7.58415	4.07916	0.28844
	Y_5	200	675.23	6.50005	6.11962	3.37044	0.23833

Tabla 4.2 Resultados del estadístico de prueba

Estadísticos Kruskal-Wallis ANOVA	
Chi-cuadrado	588.83
Df	5
p	0.0001

Con el fin de establecer la comparación entre poblaciones asociadas a los distintos valores de Y_n , se realizó un análisis de los rangos utilizando el software infoStat ®. Los resultados de la comparación múltiple arrojó que el factor de forma fue similar para las muestras Y_3 y Y_1 y lo mismo ocurrió para la pareja de muestras Y_4 y Y_2 (tabla 5.3).

Tabla 4.3 Resultados del análisis entre grupos para las muestras con diferentes contenidos de sal (Y_n). Las Medidas con una letra común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$)

Tratamiento	Ranquins	
Y_0	153.96	A
Y_3	524.24	B
Y_1	527.51	B
Y_5	675.23	D
Y_4	831.695	C
Y_2	890.365	C

De estas muestras la que se eligió para realizar la encapsulación fue la correspondiente a Y_1 Y_3 por presentar la morfología y distribución de granos micrométricos y submicrométricos inferiores al intervalo de 5-10 μm que puede medir un macrófago.

4.1.3 Estructuras de Dióxido de titanio. Síntesis 3

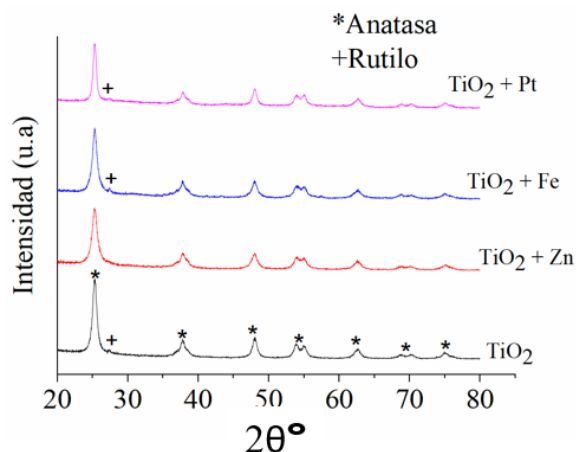


Figura 4.9 Difractogramas de Rayos x de las polvos de TiO_2 dopados obtenidos por combustión en solución.

La Figura 4.9 muestra los difractogramas de rayos X de los polvos de TiO_2 obtenidos por combustión en solución. Es posible identificar que la fase predominante en todas las muestras fue anatasa indexando en la carta estándar JCPDS No. 21-1272 y una fase minoritaria de rutilo (JCPDS No. 76-1940) excepto en la síntesis donde se incluyó el precursor dopante de Zn. La temperatura reportada como crítica para la transformación de anatasa a rutilo es 600°C [128]. Figura 4.10 A-D muestra los ajustes de refinamiento Rietveld realizados en el software Gsas@. La **Tabla 4.4** muestra los resultados de la semicuantificación relativa de fases. Es posible ver que la inclusión del precursor de Zn inhibió la formación de rutilo, mientras que la presencia de rutilo en las otras muestras fue inferior al 10% en peso. La no

presencia de picos asociados al ZnO al Fe_2O_3 y al Pt sugiere una posible incorporación de los dopantes en la estructura. [129, 130].

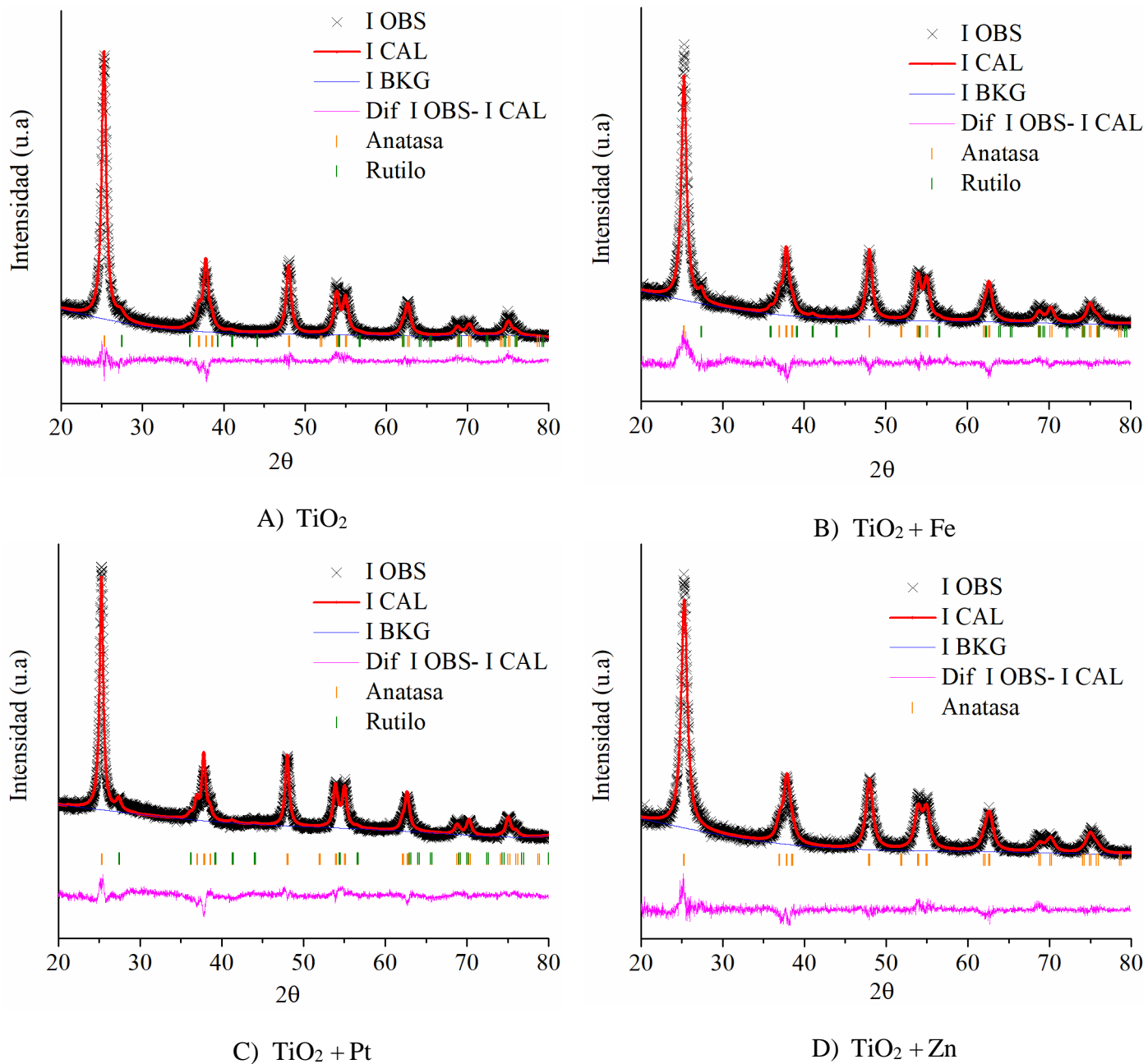


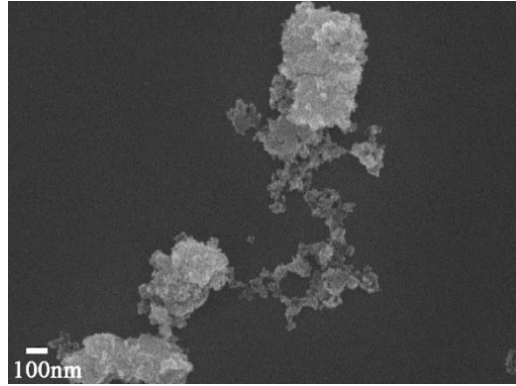
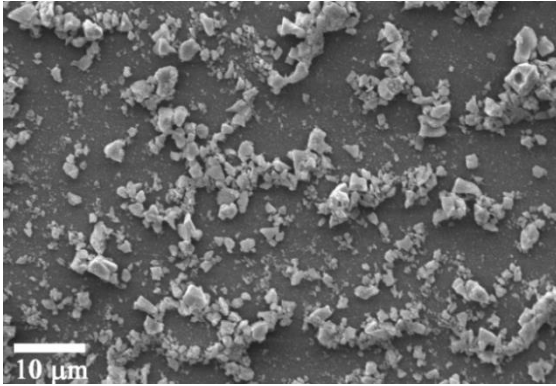
Figura 4.10 Ajustes de los Refinamiento Rietveld de las muestras de TiO_2 A) sin dopante B) dopadas con hierro C) dopadas con platino D) Dopadas con cinc.

Tabla 4.4 Relación de fases y tamaño de cristalito obtenido por refinamiento Rietveld de las muestras de TiO₂ dopadas.

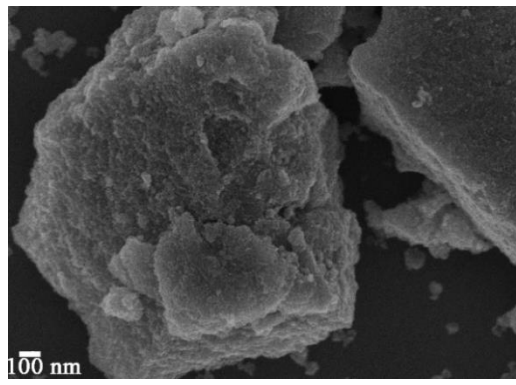
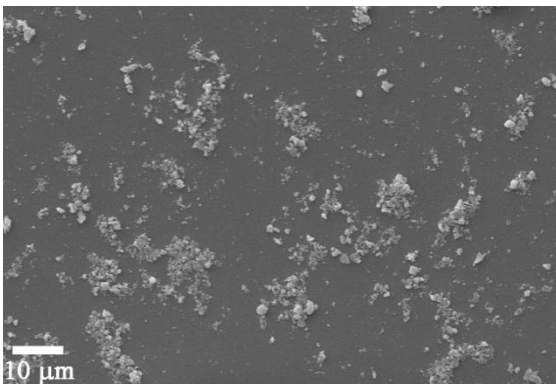
Muestra	X^2	Rwp	Rexp	Anatasa % wt	Rutilo % wt	Tamaño cristalito (nm)
TiO ₂	1.508	0.1205	0.0981	93.98	6.01	12.394
TiO ₂ + Zn	1.290	0.1093	0.0962	100	--	9.285
TiO ₂ + Fe	1.603	0.1155	0.0912	94.84	5.15	10.98
TiO ₂ + Pt	2.276	0.0391	0.0259	92.122	7.877	11.44

La Figura 4.11 muestra las fotomicrografías SEM de los polvos de TiO₂ dopados con Pt, Fe, y Zn. Todos los compuestos mostraron una morfología con tendencia granular. Es posible observar la formación de agregados de tamaños aproximados entre 1-10 μm e incluso la presencia de agregados con valores por debajo de 1 μm (Figura 4.11 A,B,C, izquierda). La microscopia de emisión de campo mostró que para todas las muestras de TiO₂ estos agregados están compuestos por partículas más pequeñas con valores por debajo de los 100 nm (Figura 4.11 A, B, C, D derecha). Las técnicas de combustión en solución se caracterizan por ser reacciones exotérmicas de óxido reducción, en las cuales dependiendo de la relación combustible oxidante es posible obtener la fase deseada sin necesidad de tratamiento térmico posterior, al igual que la obtención sencilla de nanoestructuras[34, 131]. En este trabajo fue posible obtener TiO₂ en su fase anatasa en todas las reacciones de combustión con los dopantes. La presencia de agregados se puede relacionar con la cantidad de gases liberados y la velocidad de combustión, los cuales son factores determinantes en el tamaño de granos y la porosidad. Una liberación de gases importante conlleva a la obtención de sistemas menos agregados y con tamaño de partículas menores, mientras que para reacciones de combustión rápidas y de menor cantidad de gases la probabilidad de obtener agregados es mayor[132, 133] hecho que se evidenció en todas las reacciones.

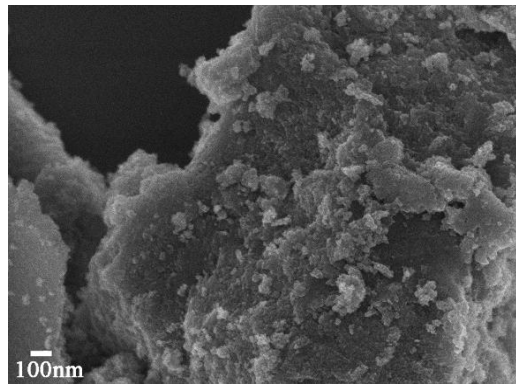
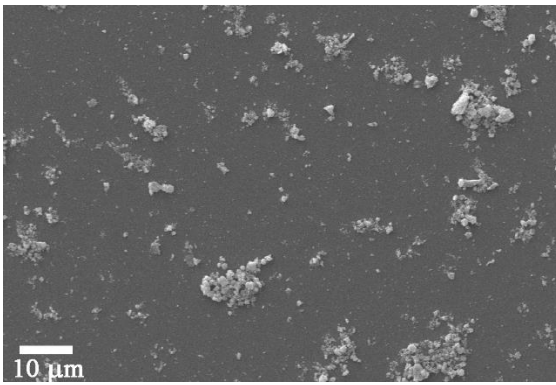
Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmania Cutánea



A



B



C

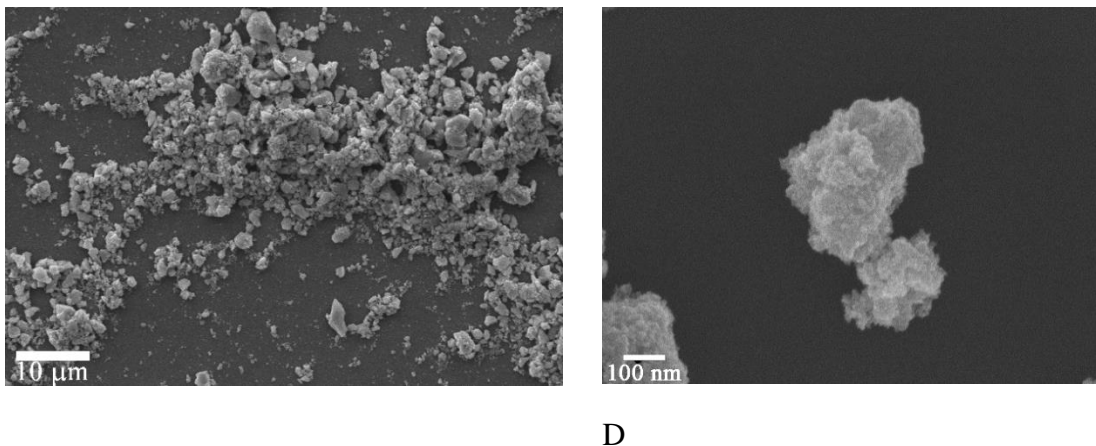


Figura 4.11 . Microscopia electronica de barrido y emission de campo de las nanopartículas de TiO_2 y TiO_2 dopados A) $\text{TiO}_2 + \text{Fe}$ B) $\text{TiO}_2 + \text{Zn}$ C) $\text{TiO}_2 + \text{Pt}$ D) TiO_2

La microscopia electrónica de transmisión mostró que para todas las muestras, de TiO_2 dopadas y sin dopar, los agregados estaban compuestos por partículas con morfología granular y tamaño por debajo de los 20 nm (Figura 4.12 A-B)

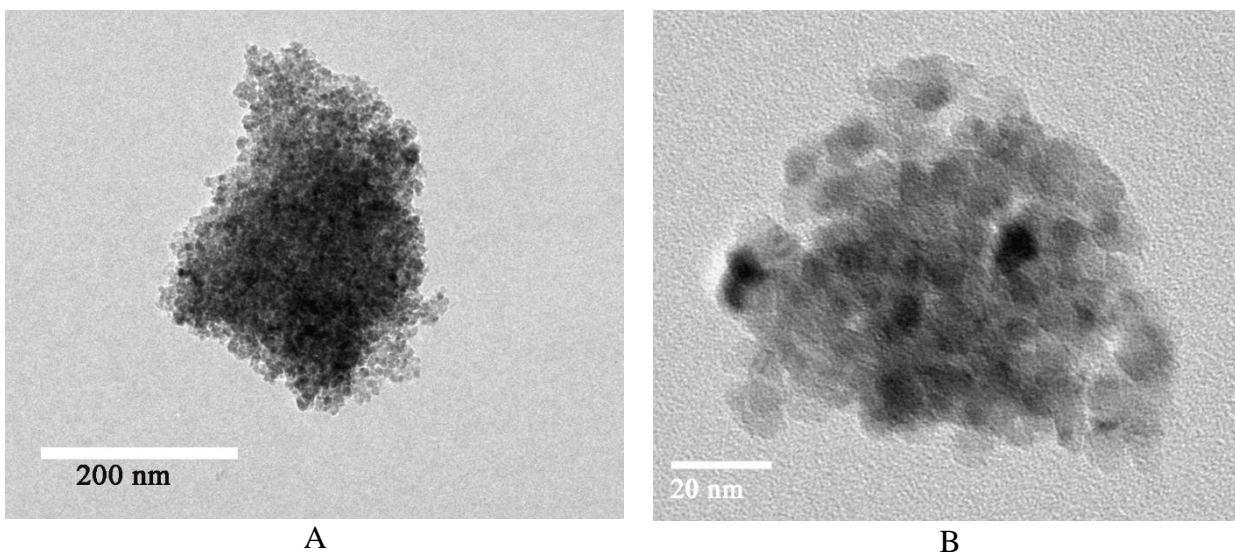


Figura 4.12 Microscopia electrónica de transmisión para las muestras de TiO_2 obtenidas por combustión en solución.

La Figura 4.13 muestra los espectros de absorbancia para los polvos de TiO_2 obtenidos por combustión en solución y dopados con Fe, Pt y Zn. Es posible observar que la absorbancia en el rango visible del TiO_2 sin dopante aumenta respecto al TiO_2 comercial además las energías de activación fueron de 3.26 eV, 3.15 eV y 3.14 eV respectivamente. Mani y colaboradores [134] mostraron que era posible obtener estructuras de TiO_2 con buen comportamiento fotocatalítico en el rango visible mediante la ruta de combustión en solución

debido al posible dopaje con C producto de la reacción de combustión. Jia Wang [135] mostró que el dopaje con Fe en estructuras de TiO_2 afecta la energía de transición electrónica cambiando el band gap óptico. Comportamientos similares se han encontrado cuando se incorpora Zn y Pt presentando un desplazamiento de la región UV a la región visible[136]. Sin embargo, es necesario ejercer un control sobre el dopaje del TiO_2 puesto que un corrimiento en la absorción óptica hacia el visible no es garante de una producción efectiva de especies ROS y por lo general habrá un valor óptimo de dopante y tipo de dopante donde se optimiza la respuesta fotocatalítica.

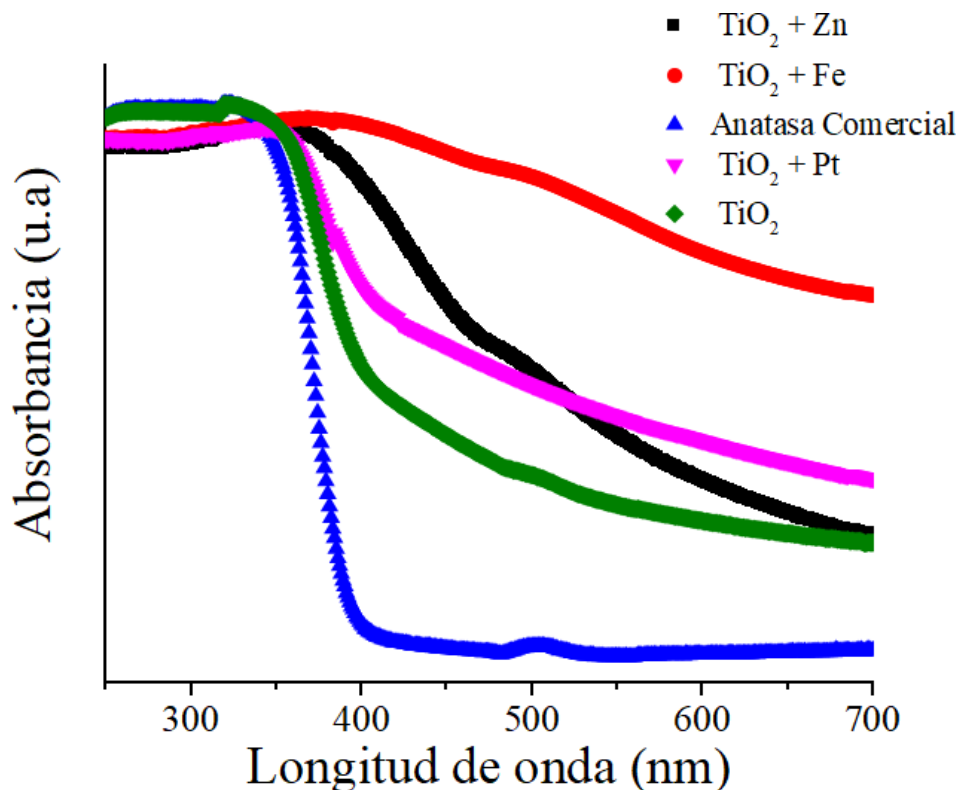


Figura 4.13 Gráfica longitud de onda vs absorbancia de los polvos de TiO_2 dopados

La Figura 4.14 muestra la variación de la intensidad en la fluorescencia con el tiempo de la molécula de prueba H_2DCFDA en presencia de las nanopartículas de TiO_2 con y sin dopaje. La variación de la intensidad de la fluorescencia está directamente relacionada con la producción de especies ROS. Las muestras de TiO_2 dopado con Fe presentan menor producción de especies ROS, incluso por debajo de la anatasa comercial, a pesar que fue el compuesto que presentó una mayor absorción en el rango visible en comparación con los otros compuestos. Un fenómeno similar observó Özge Kerkez-Kuyumcu y colaboradores [137], quien atribuyó la baja actividad fotocatalítica del dopaje con Fe a la inhabilidad de éste para actuar como un nivel de energía intermedio para el salto de electrones de la banda de valencia del TiO_2 . Además se plantea que el dopaje con Fe puede crear defectos superficiales como vacancias de oxígeno, que aumentan la probabilidad de recombinación

de cargas. El dopaje con Pt y Zn potenciaron la producción de especies ROS del TiO_2 y fueron los dos compuestos siguientes con mayor absorción en el rango visible. Estos metales de transición pueden generar estados intermedios de energía en el gap del TiO_2 por debajo de la banda de conducción y cumplir funciones de atrapamiento de centros donde electrones de la banda de valencia del TiO_2 pueden saltar a los orbitales d disponibles y donde electrones en estos estados energéticos pueden ser excitados a la banda de conducción del TiO_2 evitando los fenómenos de recombinación y una mayor respuesta fotocatalítica [136-138].

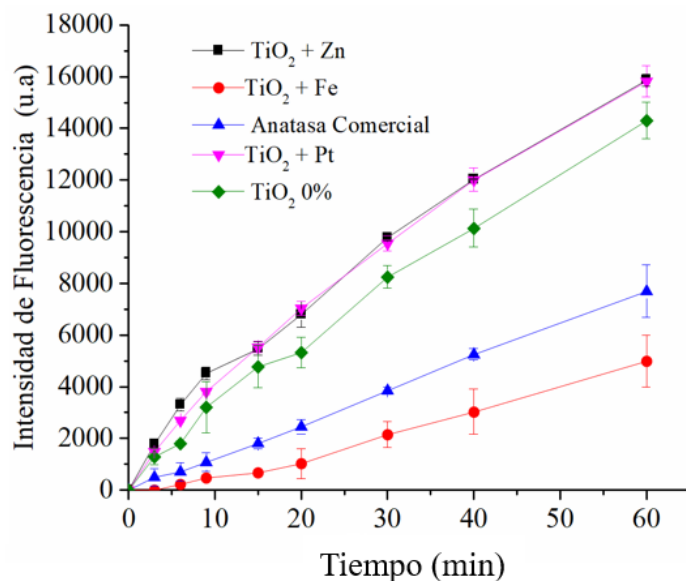


Figura 4.14 Variación de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo de la molécula de prueba H_2DCFDA en presencia de las nanopartículas de TiO_2 con y sin dopaje.

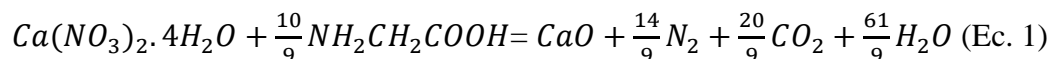
4.1.4 Posibles Mecanismos de combustión

En las reacciones de combustión el combustible actúa como el agente reductor, mientras que los nitratos son la fuente oxidante, generándose de esta manera una reacción de óxido-reducción que se inicia cuando la temperatura del entorno alcanza un valor crítico conocido como la temperatura de Ignición. Este fenómeno favorece la formación de fases estables o metaestables al alcanzar una máxima temperatura conocida como temperatura de flama. En el caso de la síntesis de fosfatos de calcio el principal agente oxidante es el nitrado de calcio puesto que el precursor fosfato de amonio hidrogenado no participa en la reacción de combustión. En el caso de la síntesis de las estructuras de dióxido de titanio el agente oxidante corresponde al oxinitrato de titanio.

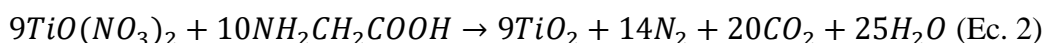
Para los cálculos termodinámicos de la temperatura adiabática de combustión de los FC y las estructuras de TiO_2 se siguió lo reportado por Samir Kumar Ghosh y colaboradores[87] y KC Patil respectivamente. El primero asocia el nitrato de calcio como el principal compuesto

oxidante en la reacción de combustión y el segundo establece el oxinitrato de titanio como principal agente de reacción para la obtención del TiO₂.

La temperatura de flama de la combustión de las reacciones se puede evaluar mediante cálculos termodinámicos (ecuación 1, 2) [87] teniendo en cuenta el precursor del calcio para la síntesis de los FC y el oxinitrato de titanio en la síntesis 3, además considerando los sistemas bajo condiciones adiabáticas.



$$\Delta H^0 = -96.76 \text{ kcal}$$



$$\Delta H^0 = \Delta H_f^0 = \int_{T_i}^{T_{ad}} \Delta C_p(\text{product}) dT \text{ (Ec. 3)}$$

donde T_{ad}, y T_i son la temperatura adiabática de flama y la temperatura de ignición respectivamente, Cp es la capacidad calórica molar y ΔH⁰ es la entalpía de reacción dada por la ecuación 4 [139]

$$\Delta H^0 = (\sum n\Delta H_{\text{productos}}) - (\sum n\Delta H_{\text{Reactivos}}) \text{ (Ec 4)}$$

Donde ΔH_{productos} y ΔH_{reactivos} son las entalpías de formación a condiciones estándar de los productos y reactivos respectivamente

Los parámetros termodinámicos para el cálculo de la temperatura de flama en la ecuación 3 se adaptaron de las referencias reportadas previamente [87, 139, 140] y se listan en la Tabla 4.5

Tabla 4.5 Entalpías de formación y calor específico asociado a los reactivos y productos.

Compuesto	ΔH _f ⁰ (25°C kcal mol ⁻¹)	Cp (cal/mol K)
CO(NH ₂) ₂	-79.71	
NH ₂ CH ₂ COOH	-127.36	23.71
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-509.37	
CaO	-151.79	6.44+0.0182T
H ₂ O	-59.796	7.20+0.0036T
CO ₂	-94,051	10.34+0.00274T
N ₂	0	6.50+0.0010T
TiO(NO ₃) ₂	-321.6	-
TiO ₂	-225.8	13.15
O ₂	0	5.92+0.0035T

El valor calculado de temperatura de flama teórico para los fosfatos de calcio es equivalente a 1415K, temperatura que permite la formación de las fases de fosfatos de calcio desde la

combustión, lo cual se comprobó en los DRX de la síntesis 1. Un posible mecanismo que da cuenta de la formación de estructuras en forma de whiskers en la síntesis 2 mediante el método de combustión híbrido o asistido por sales cuando se adiciona el KCl como aditivo, ha sido planteado en los últimos años. Los mecanismos tradicionales se fundamentan en un proceso de calentamiento convencional donde la formación de las nanopartículas depende principalmente de la temperatura local, y la distribución de ésta en el medio. De esta forma, temperaturas inhomogéneas producirán distribuciones variadas en los tamaños y formas de la partícula (Nucleación y crecimiento)[141]. En el caso de la síntesis por combustión asistida por sales y microondas la evaporación de solvente se da idealmente por un calentamiento homogéneo en toda la solución producto de la irradiación por microondas. Cuando se evapora la cantidad de solvente indicado, el soluto puede alcanzar un estado sobresaturado y comenzar a nuclear y precipitar formando cristales semilla, ya sean producto de las materias primas, la sal, e incluso impurezas presentes en el medio. La forma en que se precipita la sal y su distribución juega un papel importante en la morfología de las partículas. Chen y colaboradores [142] sugieren que la sal al precipitar forma una costra alrededor de los complejos, semillas o nanopartículas previamente formadas. Cuando el sistema alcanza las condiciones óptimas de ignición se libera una gran cantidad de calor en corto tiempo, resultando en una alta temperatura de reacción. En esta etapa se pueden presentar dos situaciones: que la temperatura no exceda el punto de fusión de la sal (en el caso del KCl una T de 1409 K[140]) la cual actúa como una caja de reacción, que impide la interacción con partículas o complejos adyacentes, evitando la presinterización típica que se observa en la síntesis convencional de combustión en solución, obteniendo sistemas altamente dispersos con una disminución marcada de agregados [143] [144-148]. La segunda situación se presenta cuando la temperatura de combustión supera la temperatura de fusión de la sal, produciendo una fase líquida que puede actuar como medio de disolución, acelerando la cinética y mejorando la difusión de especies. La sal reduce significativamente la temperatura de reacción entre especies vecinas debido a la absorción de calor de reacción por parte de la sal fundida[149, 150]. Cuando la mezcla de sal fundida se enfría rápidamente se produce una rápida cristalización a lo largo del eje preferencial de crecimiento de la fase obteniéndose estructuras tipo whiskers o agujas con buen grado de dispersión [141, 150-152]. Sahil Jalota y colaboradores explica este comportamiento como un proceso secuencial de disolución-cristalización y crecimiento. En el caso de la obtención de whiskers de fosfatos de calcio Jolat y colaboradores[141] reportan que la morfología y distribución de whiskers puede depender también de la solubilidad del fosfato de calcio en la sal además de otros factores como el grado de sobrecalentamiento de la sal fundida, tiempo de remojo y del pico de temperatura alcanzado en el sistema. En la reacción de obtención de las estructuras de TiO_2 el valor de la temperatura teórica adiabática de llama fue de 2309 K. Por debajo de 2453K solo es posible formar Anatasa y por encima de esta temperatura, se nuclea la fase Rutilo. Esto concuerda con los resultados obtenidos por DRX y Raman.

En conclusión, las reacciones de combustión en solución convencional y asistida por sales son rutas adecuadas para la obtención de fases de fosfatos de calcio y estructuras de dióxido de titanio con un óptimo rendimiento y con las prestaciones adecuadas tales como morfología y estructura para poder ser usadas como potenciales encapsulantes de fármacos fotodinámicos o soportes fotocatalíticos.

4.2 Encapsulación de la Hipericina en los fosfatos de calcio

4.2.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 4.15 muestra los espectros IR asociados a los polvos obtenidos mediante las síntesis 1 y 2. Es posible observar en ambos espectros los modos principales de vibración típicos de los fosfatos de calcio asociados a los grupos PO_4^{3-} . Se distinguen los modos de vibración ν_2 a 460 cm^{-1} , y los modos de vibración ν_4 en el rango de $500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. En la síntesis 1 se puede observar la presencia de βTCP confirmada por los hombros situados a 949 y 975 cm^{-1} típicos de esta fase (Figura 4.16). El agua adsorbida puede ser monitoreada entre 2600 y 3600 cm^{-1} y el grupo OH a 3580 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} . Las vibraciones asociadas a los grupos CO_3 se explican como posibles iones sustitutos de los fosfatos. La vibración a 725 cm^{-1} confirma la presencia de una fase minoritaria de pirofosfatos de calcio. La presencia de HAP se confirma con los modos de vibración propios de la HAP ν_1 a 960 cm^{-1} y 632 cm^{-1} y los modos ν_3 se pueden observar en el rango de 1000 a 1130 cm^{-1} . El hombro a 632 cm^{-1} se asocia al grupo HPO_4^{2-} que evidencia la presencia de HAP no estequiométrica en ambas síntesis.

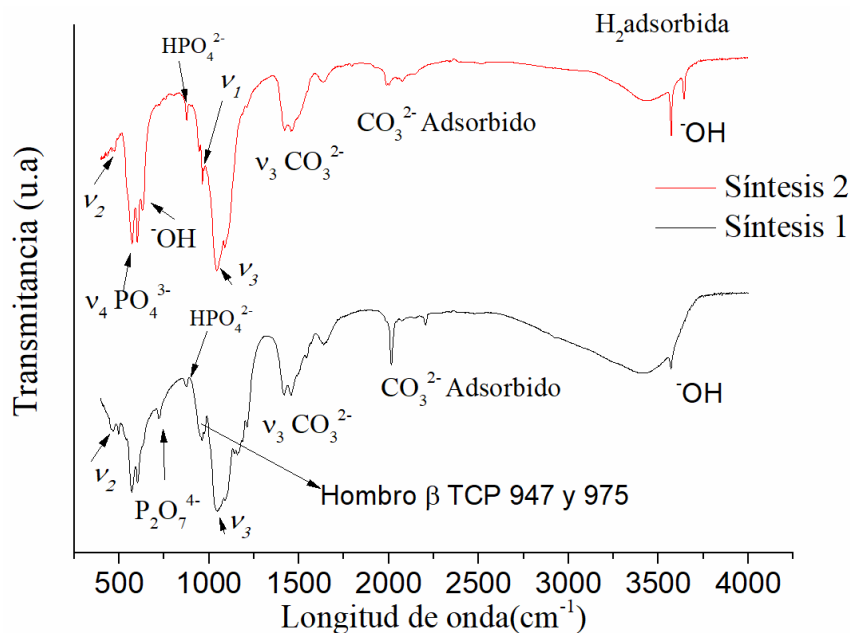


Figura 4.15 Espectros Infrarrojos de los fosfatos de calcio obtenidos mediante la síntesis 1 y 2

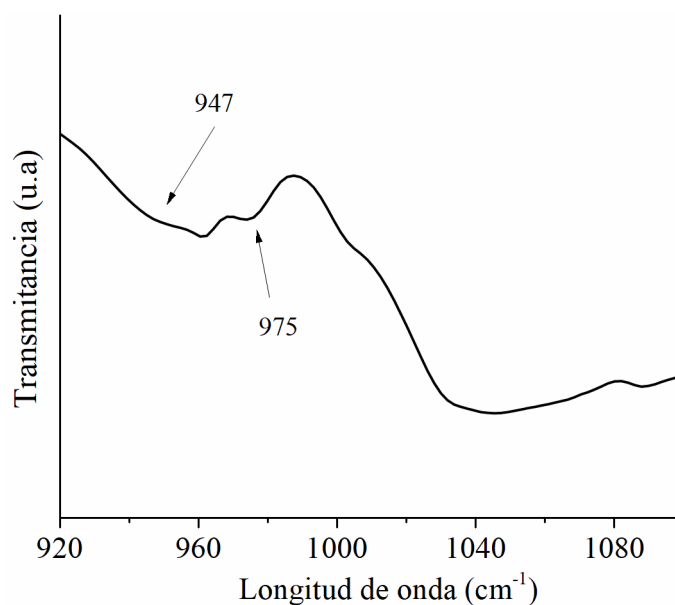


Figura 4.16 Picos de confirmación de la fase B-TCP.

En la Figura 4.17 se muestra el espectro FTIR de los polvos cargados con HY. Además de los picos y bandas característicos de los fosfatos de calcio, se puede observar la aparición de picos característicos de la HY. Los picos situados a 3000 y 2920 cm^{-1} corresponden a los estiramientos de los enlaces C-H de los grupos metilo mientras que el pico ubicado a 1380 cm^{-1} corresponde al grupo CH_3 [153] [154]. El aumento de intensidad de la banda ubicada aproximadamente a 1585 y 1725 cm^{-1} también confirma la presencia de hipericina ya que puede ser atribuido a la contribución de los grupos carboxilo (1640 cm^{-1}) o los grupos OH (1650 cm^{-1}) [155]. Además se puede notar claramente la disminución de intensidad asociada a los modos de vibración ν_3 y ν_4 correspondientes a los grupos PO_4^{3-} y parcialmente del grupo OH, sitios donde la Hipericina podría estar enlazándose con la estructura del fosfato de calcio.

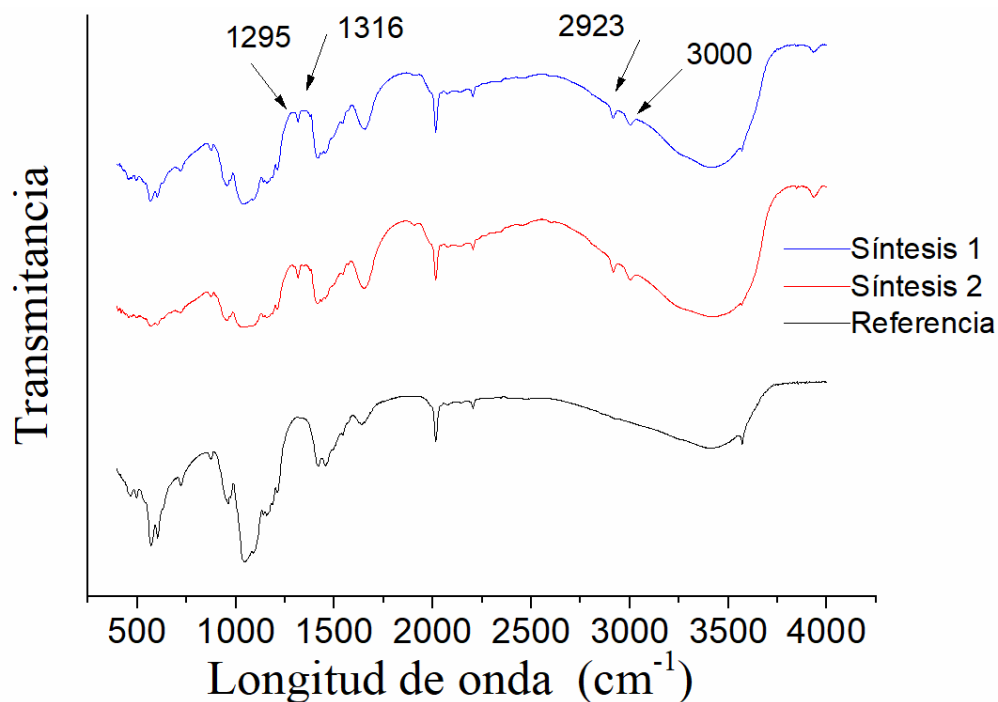


Figura 4.17 Espectros FTIR de los compuestos de fosfatos de calcio tratados térmicamente con encapsulación de la HY

5.2.2 Espectrofotometría de Fluorescencia y Absorbancia

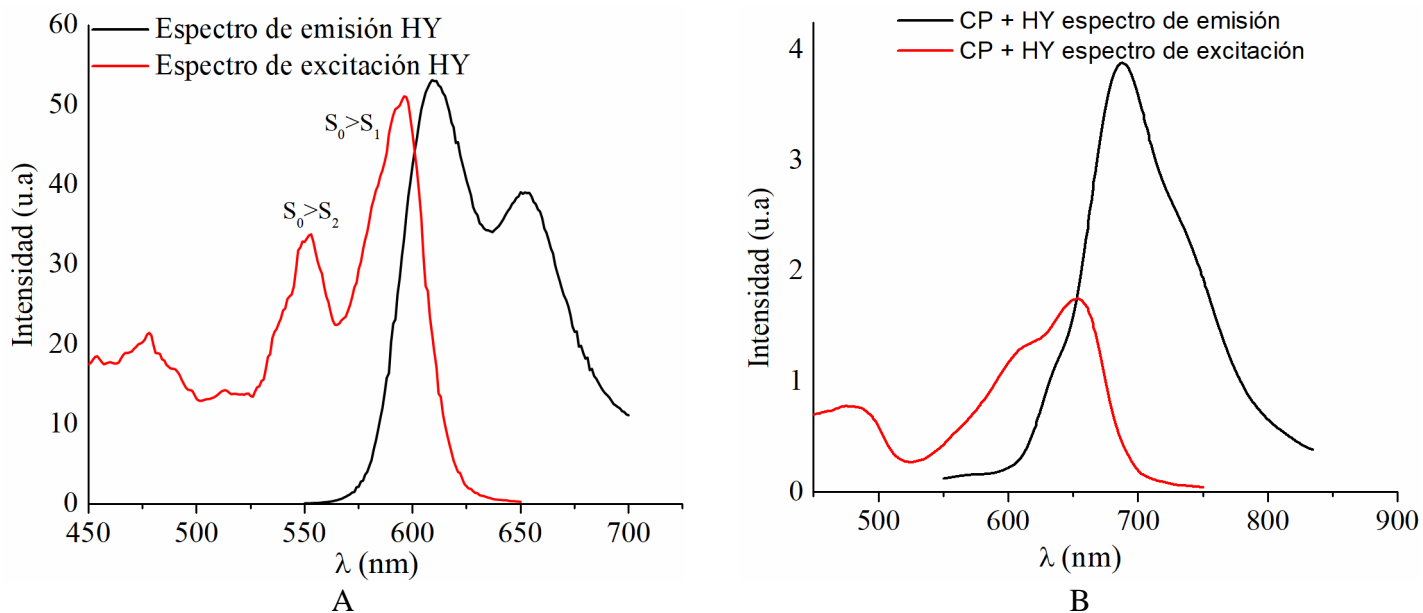


Figura 4.18 Espectros de absorción y emisión A) HY sola B) HY cargada en fosfatos de calcio.

Capítulo 4- Resultados y Discusión

En la Figura 4.18 A-B se observan los espectros de absorción y emisión de la HY y de la HY cargada en el fosfato de calcio respectivamente. Se pueden identificar las dos transiciones en el rango visible características de este compuesto en medios orgánicos $S_0 \rightarrow S_1$ $\lambda_{max} = 500-600$ nm y $S_0 \rightarrow S_2$ $\lambda_{max} = 485-425$ nm. La transición más al rojo ha sido asignada a la primera transición $\pi \rightarrow \pi^*$ que es polarizada a lo largo del eje más corto del esqueleto de la estructura (Skeleton) de la HY. La segunda transición $S_0 \rightarrow S_2$ $\lambda_{max} = 485-425$ nm, es la transición polarizada a lo largo del eje más largo que contiene los grupos carbonilos (Figura 4.18 A). La Figura 4.18 B muestra un corrimiento de los espectros de absorción y emisión al rojo confirmando la interacción de la HY con el sistema encapsulante. Estudios previos han mostrado que los corrimientos en los espectros de absorción al igual que los cambios solvocromáticos están asociados a los posibles estados en que se presente la HY ya sea monomérica, agregada o protonada. Dichos estados están asociados a factores como el tipo de solvente (prótico o aprótico), la temperatura, el pH y átomos vecinos. En medios ácidos se induce a una protonación de la HY y en medios básicos una desprotonación donde la molécula fácilmente pierde los protones de los grupos hidroxilos. Esta desprotonación se correlaciona con un desplazamiento al rojo de la absorción y con la fluorescencia. También se ha encontrado que la HY forma enlazamientos inter moleculares de hidrógeno de sus grupos Hidroxilo 4,4' y 5 5' formando agregados o dímeros. Esto se vería reflejado en una disminución o desaparición total de la fluorescencia. En nuestro caso el desplazamiento de los espectros al rojo corroboran la desprotonación de la HY debido posiblemente a las interacciones con los grupos OH y PO_4^{3-} del fosfato de calcio que en principio pueden romper los enlaces intra moleculares de la HY y formar enlaces intermoleculares que coinciden con la disminución de las bandas de estos grupos en el FTIR [156]. Los picos a 600 y 650 nm muestran que hay HY monomérica pero también se presenta una disminución de la intensidad asociada a la fluorescencia y la absorbancia junto con un aumento del ancho de banda. Esto puede ser debido a la aparición de algunas especies agregadas.

4.2.3 Cuantificación de la encapsulación de Hipericina

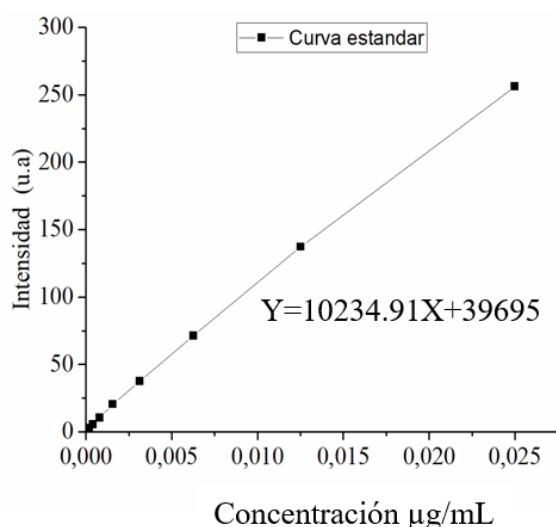


Figura 4.19 Curva de calibración de la concentración de HY vs. la intensidad usada para la cuantificación de la cantidad de HY encapsulada en los fosfatos de calcio.

La Figura 4.19 muestra la curva estándar de concentración de HY vs intensidad usada para la cuantificación de HY cargada en los fosfatos de calcio. Los datos se ajustaron a una regresión lineal con un R de 0.9986 y límite de detección correspondiente al valor más bajo ajustado (0.01 $\mu\text{g/mL}$). Por medio de la ecuación resultante de la curva ($Y=10234.91X+39695$) y utilizando el valor de la intensidad correspondiente a la media resultante de la medida de la fluorescencia realizada a las partículas cargadas. Los fosfatos de calcio obtenidos mediante la metodología 1 encapsularon $0.13 \pm 0.01\mu\text{g}$ de HY por cada μg del material y los obtenidos por la metodología 2 presentaron una encapsulación de $0.22 \pm 0.01\mu\text{g}$ respectivamente.

Estos resultados fueron relacionados con las medidas de área superficial BET que se muestran en la Tabla 4.6. Es posible observar que las partículas que presentaron mayor porcentaje de encapsulación fueron las obtenidas por la síntesis 2 cuya área superficial fue de $18.0852 \text{ m}^2/\text{g}$ mientras que las partículas obtenidas por la síntesis 1 presentaron área superficial de $7.5099 \text{ m}^2/\text{g}$. Estos resultados muestran que el grado de encapsulación está asociado principalmente con la HY adsorbida a nivel superficial de los fosfatos de calcio y no con la incorporada a nivel de los poros puesto que las partículas correspondientes a la síntesis 1 presentaron una menor área de microporos correspondiente a $5.9368 \text{ m}^2/\text{g}$, mientras que en el caso de los fosfatos obtenidos por la síntesis 2 este valor fue de casi tres veces $15.7861\text{m}^2/\text{g}$

Tabla 4.6 Resultados de área superficial BET (*Brunauer, Emmett, Teller*) y BJH (*Harkins y Jura, Halsey*)

COMPUESTO	BET (m ² /g)	BJH (m ² /g)
Síntesis 1	7.5099	5.9368
Síntesis 2	18.0582	15.7861

4.2.4 Medidas de producción de especies ROS de los fosfatos de calcio cargados con HY

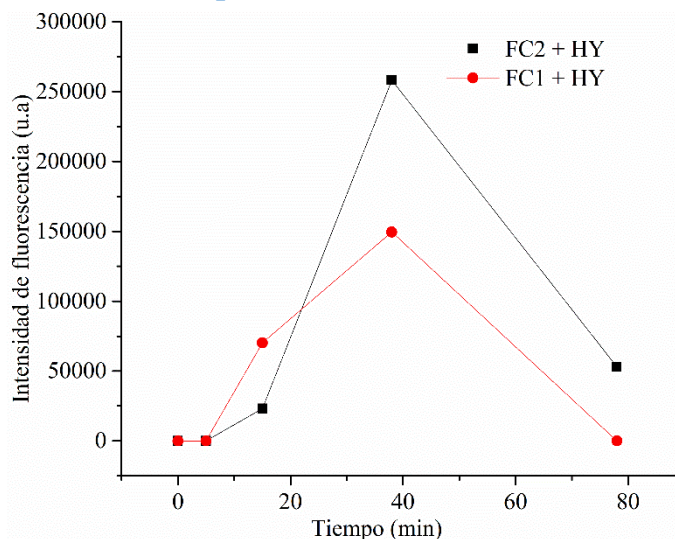


Figura 4.20 Medida de producción indirecta de oxígeno singlete por la HY encapsulada en los fosfatos de calcio, monitoreada por la fluorescencia de la sonda SOGs.

La Figura 4.20 muestra la gráfica de intensidad de fluorescencia vs tiempo para los fosfatos de calcio en solución obtenidos en las síntesis 1 y 2 de la sonda SOGs sometidos a irradiación de luz visible durante 80 minutos con el fin de detectar de forma indirecta la producción específica de oxígeno singlete. Es posible observar que la encapsulación no afectó la propiedad fotodinámica de la HY. Ambos materiales mostraron un máximo de producción de especies ROS a los 40 minutos. La caída de intensidad de la fluorescencia que se detecta en ambos materiales después de este tiempo, corresponde a la inestabilidad química de la sonda que pierde fluorescencia con el tiempo. El compuesto que presentó un mayor pico de producción ROS fue el fosfato de calcio con HY obtenido por la ruta de síntesis 2. Esto puede estar relacionado directamente con el grado de carga de HY en la estructura puesto que esta corresponde a casi el doble de HY encapsulada que en las estructuras tipo 1. Es de resaltar entonces que los fosfatos de calcio cumplen la función de actuar como soportes catalíticos sin afectar la respuesta fotodinámica de la HY y son de principal interés para generar la respuesta antileishmania

4.3 Ensayos Biológicos

4.3.1 Resultados fosfatos de calcio *in-vitro*

4.3.1.1 Captación de las nanopartículas de fosfatos de calcio + HY

En la Figura 4.21 se observan las imágenes de microscopia de fluorescencia de los cultivos de las células con los compuestos de fosfatos de calcio para varios tiempos de incubación y vistas con un filtro 580nm-680nm. Después de dos horas, el macrófago ya ha comenzado a internalizar las nanopartículas cargadas con HY. Esto es apreciable con la aparición de fluorescencia de la célula (Figura 4.21 A). En cuatro y seis horas se aprecia una mayor fluorescencia que se puede asociar a una mayor captación de nanopartículas (Figura 4.21 B-C). Ensayos previos mostraron que la HY libre se capta por parte de los macrófagos desde las 6 horas y la mayor captación se da a las 8 horas [110]. De acuerdo con sus propiedades, la HY puede atravesar la membrana celular de forma pasiva. En los ensayos realizados con HY libre, las células captan la HY a partir de 10 μ M [30] mientras que en el caso de la HY encapsulada en las nanopartículas de fosfatos de calcio, la captación se logra con 5.15 nM de HY reduciendo considerablemente la cantidad de medicamento necesaria para que se observe la internalización. La encapsulación muestra una disminución del tiempo de captación y la cantidad necesaria de fármaco por parte de las células, lo cual evidencia que encapsulando la HY en las nanopartículas se hace más eficiente el mecanismo para la administración del fármaco. Por otra parte la captación de los fosfatos de calcio a nivel celular depende de factores como tamaño de partícula, morfología, concentración de partículas, carga etc. Las vías de internalización puede ser por mecanismos de difusión para partículas nanométricas y por endocitosis para partículas submicrométricas o micrométricas. Este último mecanismo consiste en la formación de vesículas alrededor de las partículas cuando son cargadas al interior de la célula y una posterior liberación y distribución a las distintas organelas [157]. Los tiempos de captación celular de estas partículas han sido reportados desde 3 hasta 5 horas tiempos en los cuales las partículas de fosfatos de calcio pueden estar ubicadas en los lisosomas donde el pH entre 4-5 puede iniciar la degradación de dichas estructuras y posterior liberación del sistema [157]. J. Schwiertz y colaboradores [158] encapsularon azul de metileno (MB) como agente fotosensibilizante en fosfatos de calcio para terapia fotodinámica de células cancerígenas, encontrando que la captación celular del MB en comparación al fotosensibilizante solo, fue mayor. La captación celular se dio en 4 horas y aumentó levemente con el tiempo de incubación.

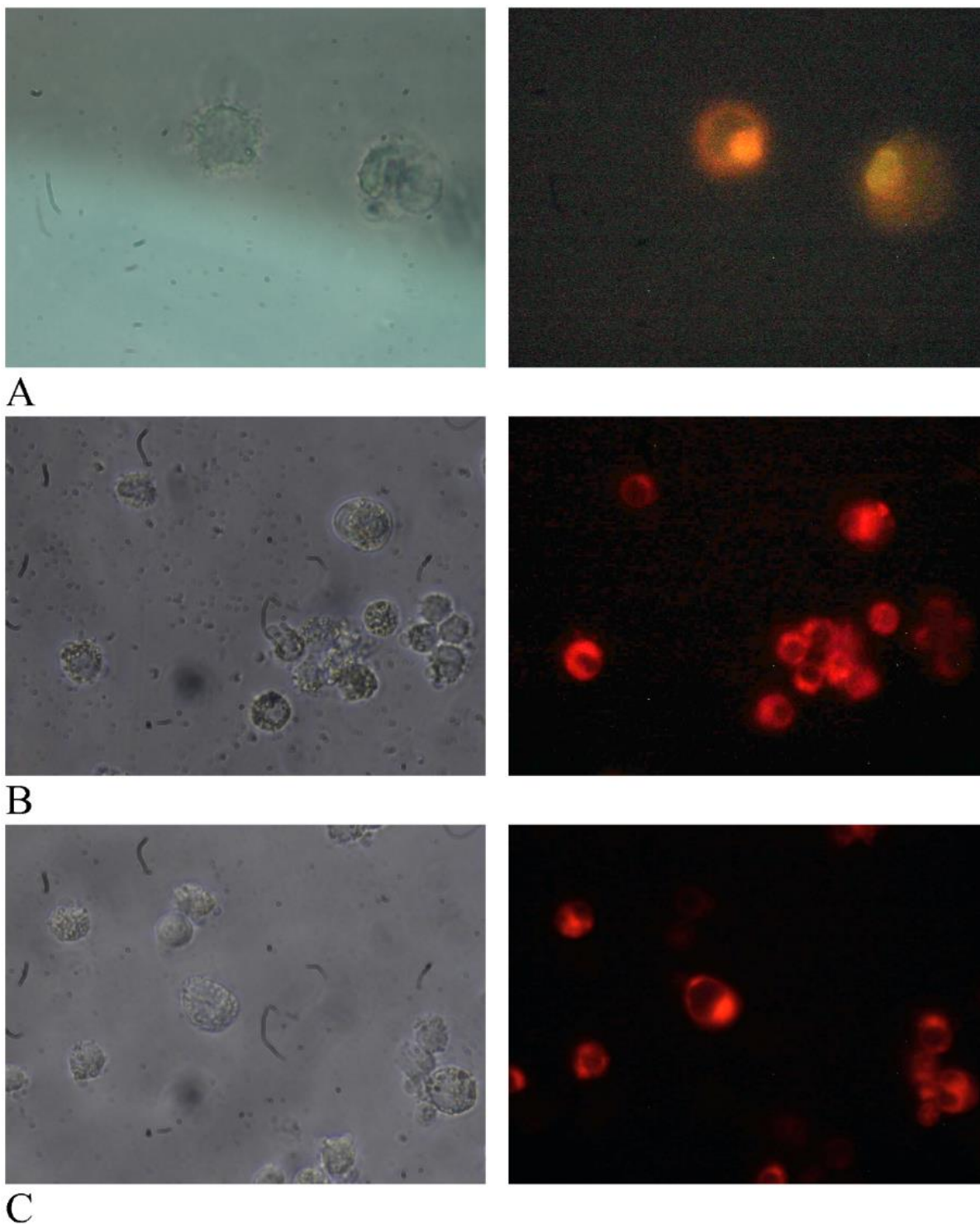


Figura 4.21 Imágenes de microscopia de fluorescencia de los cultivos de las células con los compuestos de fosfatos de calcio + compuesto fluorescente observadas con filtro 580nm-680nm A) 2 horas B) 4 horas C) 6 horas para varios tiempos de incubación.

4.3.1.2 Caracterización de la fuente de irradiación

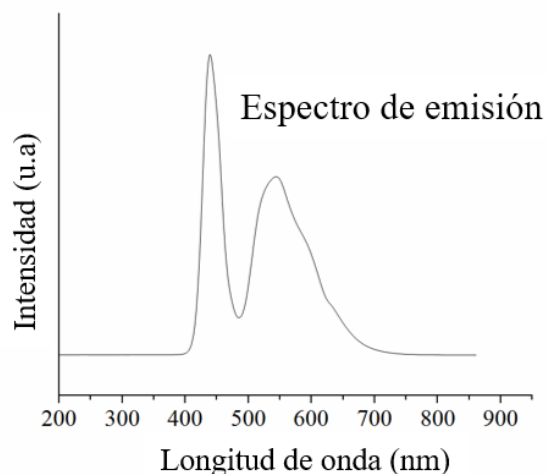


Figura 4.22 Espectro de emisión de la lámpara usada para los ensayos biológicos de los compuestos de fosfatos de calcio.

La Figura 4.22 muestra el espectro de emisión de la lámpara led utilizada para la activación de la HY. Se puede evidenciar que no hay presencia de picos en el UV o en el IR, garantizando que los sistemas biológicos no van a ser sometidos a irradiaciones que las puedan afectar directamente. Los picos principales corresponden a longitudes de onda propias del visible de 430 nm y 542 nm. La potencia entregada por la lámpara a una distancia de 15,5 cm fue de aproximadamente $5\text{mW}/\text{cm}^2$.

4.3.1.3 Citotoxicidad y ensayo antileishmania

La Tabla 4.7 muestra los resultados de los ensayos de citotoxicidad realizados en macrófagos humanos derivados de sangre periférica medidos mediante viabilidad celular en huMDM expresados como CC_{50} y el efecto antileishmania evaluado mediante la capacidad de los compuestos de eliminar amastigotas intracelulares de *L. panamensis* expresada según la concentración efectiva CE_{50} en huMDM.

Tabla 4.7 Resultados biológicos *in vitro* de la concentración citotóxica CC_{50} y la concentración efectiva CE_{50} de los compuestos de fosfatos de calcio obtenidos por la síntesis 1 (FC1) y síntesis 2 (FC2).

Síntesis	CC ₅₀ µg/mL	CE ₅₀ sin Luz µg/mL	CE ₅₀ Luz µg/mL	Indice selectividade
Fosfatos de calcio Síntesis 1 (FC1)	>200	120±4.5	100.45±3.2	1.99
FC1 + HY	>200	60.54±4	54.22±9.1	3.66
Fosfatos de calcio Síntesis 2 (FC2)	>200	50.54±5.7	40.765±9.2	4.80
FC2 + Hipericina	>200	130.15±18.3	19.5±2,4	10.21
HY Libre	>200	800±0.5	458.0 ±0,6	0.46

Es posible observar que ninguno de los compuestos presentaron actividad citotóxica en los huMDM para las concentraciones evaluadas (<200 µg/mL) tanto con y sin irradiación de luz visible. Esto asegura que los fosfatos de calcio sintetizados mediante las dos metodologías pueden ser usados sin presentar efectos adversos en las células. Los resultados de la evaluación antileishmania mostró que los fosfatos de calcio sin encapsulación del compuesto fotodinámico presentaron CE₅₀ siendo los FC obtenidos por la síntesis 2 quienes presentaron menores valores (40.76 ± 9.2 µg/mL y 60.54±12 µg/mL con y sin luz respectivamente) mientras que los FC obtenidos mediante la síntesis 1 presentaron CE₅₀ de 100.4 ± 3.2 µg/mL y 120.0±4.5 µg/mL con y sin luz respectivamente. Con la incorporación de la HY el efecto de la luz se hace evidente siendo los FC2 + HY los compuestos que presentaron mayor respuesta fotodinámica logrando una reducción en la CE₅₀ del 85% cuando fueron irradiados con la fuente de luz visible y una energía de 22 J/cm². Además este compuesto fue el que presentó mayor índice de selectividad.

Si bien los fosfatos de calcio presentan una CC₅₀ por si solos, esto puede estar relacionado con el efecto que puede tener el calcio en la viabilidad celular de la *Leishmania* y la alta concentración a nivel intracelular producto de la captación por parte de la célula. Se ha encontrado que el Ca²⁺ y el pH son cruciales para la actividad enzimática de los parásitos. El calcio es un importante segundo mensajero en los tripanosomas pero un aumento prolongado de este conlleva a la muerte celular. Los tripanosomas usan dos fuentes de calcio Ca²⁺ para generar señales: el liberado a través de los compartimentos intracelulares y el Ca²⁺ que entra a través de la membrana plasmática. En los tripanosomatidios como en las células eucariotas el Ca²⁺ intracelular es finamente regulado y esto es garantizado por la presencia de diferentes mecanismos de transporte, algunos de estos localizados en organelas intracelulares y otros en la membrana plasmática. La *Leishmania* posee dos estados diferentes, uno extracelular promastigote y otro intracelular amastigote. Esto implica que estos parásitos pueden poseer dos mecanismos diferentes de regulación de estos cationes. A nivel celular la regulación del

calcio ocurre en la mitocondria la cual es capaz de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} y en el retículo endoplasmático. Estos parásitos también tienen acidocalcisomas, una organela involucrada en los procesos bioenergéticos las cuales pueden acumular grandes cantidades de polifosfatos junto con iones de Ca^{2+} . De esta manera la regulación del Ca^{2+} va estar ligada a la capacidad de almacenamiento de cada compartimiento celular. Estos mecanismos son de regulación a corto plazo y son controlados por el inositol 1,4,5 trifosfato en el caso para la regulación a largo tiempo los parásitos de *Leishmania* tienen Ca^{2+} -ATPasa la cual es capaz de bombear el calcio fuera de la célula. El Ca^{2+} en *Leishmania* presenta una influencia en la invasión de la célula hospedera, en los procesos de diferenciación y en los procesos bioenergéticos. En la actualidad se ha relacionado el efecto antileishmania de algunos fármacos a la capacidad de romper este equilibrio a nivel intracelular tal como lo hacen la Miltefosina® y el Pamoconazole®. En síntesis, el efecto de las nanopartículas de fosfatos de calcio puede estar relacionado con la disrupción de la homeostasis del ion Ca^{2+} que conduce a un efecto letal en la célula de *Leishmania* ya sea mediante un mecanismo de apoptosis o necrosis [159-161].

La actividad antileishmania de la HY está relacionada con su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno como el singlete de oxígeno (mecanismo tipo II) o la formación de ion superóxido (mecanismo tipo I) cuando es sometida a la acción de luz visible [162]. Con la incorporación de la HY en los fosfatos de calcio estos últimos actúan como soportes fotocatalíticos que sirven para inmovilizar y proteger el compuesto fotosensible hasta llegar al sitio de interés aumentando la selectividad y disminuyendo la acumulación del fotosensibilizador o dispersión no selectiva. En la Figura 4.23 se ilustra el posible mecanismo de captación. Inicialmente las interacciones de los fosfatos de calcio con la HY se dan a través de una desprotonación e interacción con los grupos OH y PO_4^{3-} del fosfato de calcio a nivel superficial de las partículas y de su porosidad. Esta etapa se caracteriza por un cambio solvocrómico de la suspensión de las partículas de rojo a verde. Como se encontró en los resultados, las partículas que incorporaron mayor cantidad de HY fueron los FC obtenidos por la síntesis 2 los cuales presentaron área superficial dos veces mayor que los obtenidos mediante la síntesis 1 lo cual coincide con las partículas que presentaron mayor respuesta fotodinámica. Los fosfatos de calcio son incorporados en los macrófagos mediante dos posibles mecanismos: por fagocitosis para partículas de tamaño micrométrico y submicrométrico y por difusión de la membrana para partículas con tamaños nanométricos. En el caso de las partículas que entran por fagocitosis, estas son cubiertas por un lisosoma al entrar a la célula. Como se demostró en los experimentos de captación este proceso puede tardar entre dos y cuatro horas. Una vez los FC cargados con HY entran a la célula estos pueden comenzar a degradarse debido condiciones de pH ayudando a la liberación de la HY cargada en la porosidad de las partículas de FC. En este punto la célula puede ser sometida a irradiación visible haciendo que la HY libre o asociada a la partícula a nivel superficial pase a un estado excitado produciendo especies ROS las cuales presentan el efecto antileishmania. El mecanismo de acción a nivel celular de los sistemas fotosensibilizantes aún es materia de

estudio, pero se sabe que la HY aumenta los niveles de especies ROS intracelulares lo cual induce a muerte celular por apoptosis. Shalini Singh y colaboradores[31] mostró que la HY decrece los niveles de tripanotona e incrementa los niveles de glutatona y de especies ROS. Además se ha demostrado que los agentes fotosensibilizadores pueden inducir peroxidación de membranas lipídicas, y generar un estrés oxidativo [30, 163].

Estos resultados muestran que el sistema encapsulaste no afecta la respuesta antileishmania de la HY. Trabajos previos han reportado la viabilidad del uso sistemas cerámicos de HAP como soportes catalíticos [164]. Además se observa que el sistema encapsulaste presenta cierta actividad antileishmania y baja considerablemente la cantidad de HY necesaria para producir una respuesta antileishmania, pasando de 458 $\mu\text{g/mL}$ cuando se trata de HY libre hacia un valor de 2.53 $\mu\text{g/mL}$ cuando se tiene HY encapsulada en los fosfatos de calcio [30], reduciendo hasta en 181 veces la cantidad de HY necesaria para generar una respuesta antileishmania. El potencial efecto antileishmania por parte del sistema encapsulante da a entender que la reducción del EC_{50} con el sistema FC + HY se debe posiblemente a un efecto conjunto tanto del fármaco como del encapsulante cuyos mecanismos de acción deberán ser materia de estudio en investigaciones futuras.

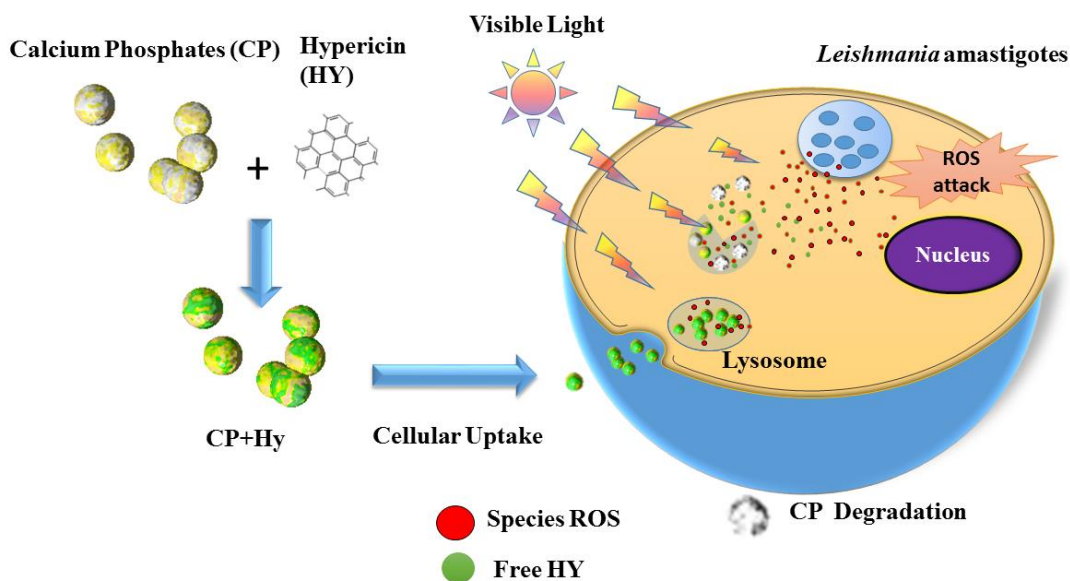


Figura 4.23 Diagrama del posible mecanismo de encapsulación, incorporación a las células, liberación y producción de especies ROS de la HY encapsulada en fosfatos de calcio.

4.31.4 Ensayos biológicos in vivo del parche hecho con la HY encapsulada en fosfatos de calcio obtenidos por la síntesis 2 y poliamida 6

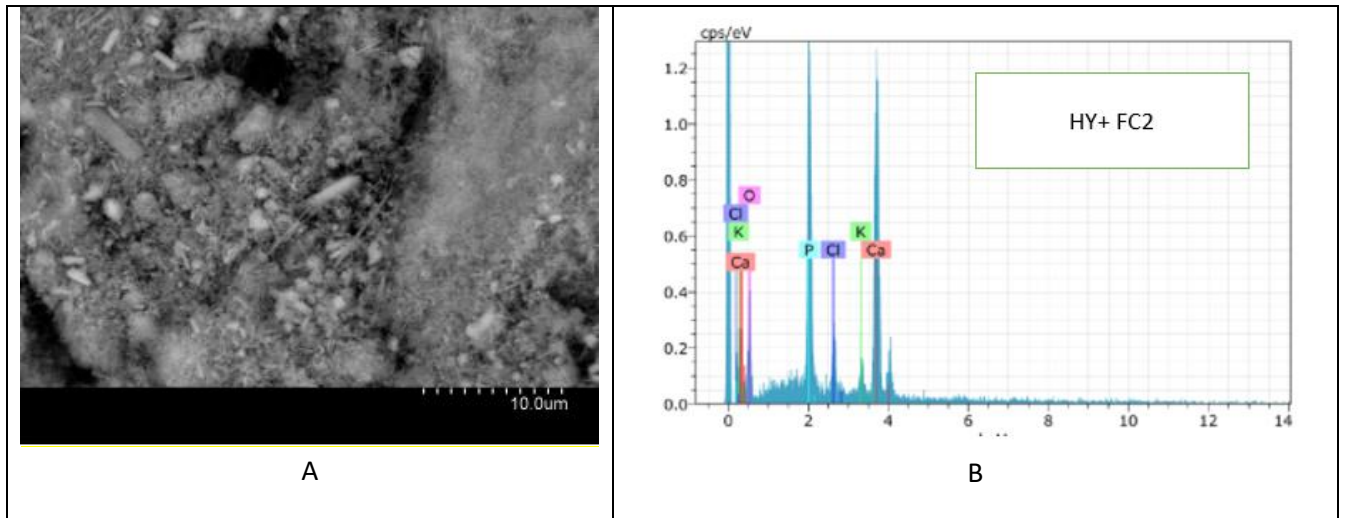


Figura 4.24 A) Microscopia electrónica de barrido para el parche B) Análisis químico EDS

Microscopia electrónica de barrido mostró que en el parche se presentan las partículas con alto grado de dispersión (a nivel nano), mientras otras están formando aglomerados de rangos micrométricos de hasta 50 μm Figura 4.24 A) *Microscopia electrónica de barrido para el parche*. No fue posible remover los aglomerados por medios mecánicos. Análisis de EDS confirmaron la presencia de átomos de Ca, P y Cl propios de las estructuras apatíticas verificadas anteriormente por DRX como fases de fosfatos de calcio fase B, hidroxiapatita y clorapatita. En la Figura 4.24 B

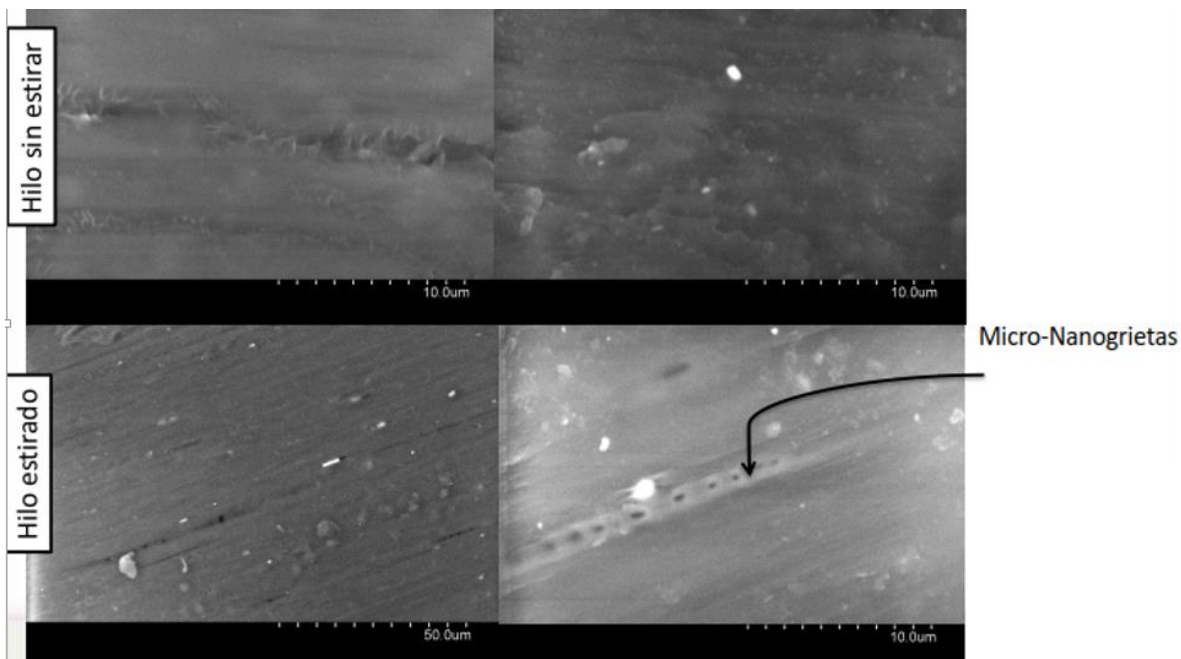


Figura 4.25 Microscopia de barrido para los hilos usados para la conformación del parche

Capítulo 4- Resultados y Discusión

Mediante SEM, también fue posible verificar que el hilo usado en la conformación del parche presentó micro y nanogrietas al ser sometido a estiramiento lo cual puede favorecer la difusión de las partículas dispersas y del medicamento a través de él (Figura 4.25 Microscopia de barrido para los hilos usados para la conformación del parche Figura 4.25).

En la Figura 4.26 se puede apreciar el tamaño de la lesión al iniciar el tratamiento y 90 días después de finalizar el tratamiento

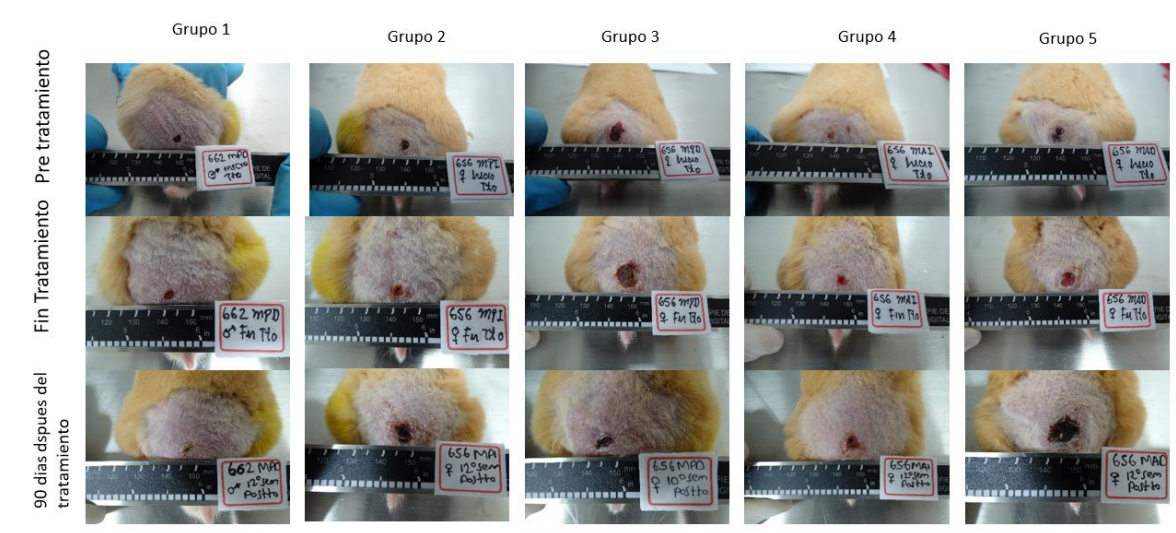


Figura 4.26 Fotos representativas de un hámster perteneciente a cada grupo de tratamiento

Estos resultados mostraron que la reducción del tamaño de la herida fue del 48% lo que se traduce como una mejora clínica en términos de cura cicatrización. Esto permite potenciar el parche como una alternativa de uso en el tratamiento de lesiones cutáneas. Aunque se hace necesario realizar investigaciones futuras encaminadas a optimizar la fabricación del parche, la cantidad de partículas de fosfato de calcio con hipericina encapsulada incluidas en el parche y el mecanismo de administración en la herida.

4.3.2 Resultados compuestos de dióxido de titanio *in vitro*

4.3.2.1 Evaluación de la captación celular de las estructuras de dióxido de titanio

En la Figura 4.27 A-C se puede observar un agregado de nanopartículas de dióxido de titanio con extracto de *hypericum*, el cual presenta fluorescencia al ser observada con el filtro 580nm-680 nm confirmando que el marcador fluorescente está en la superficie de las partículas. Fue posible identificar una captación de las nanopartículas a partir de 2 horas de incubación y un aumento de la fluorescencia a las 4 horas de incubación (Figura 4.27 B). Estos tiempos resultan similares a los observados en la carga de fosfatos de calcio por células

[157, 158]. La captación también fue corroborada por microscopia óptica (Figura 4.28). No hay una metodología estándar que permita cuantificar el grado de captación de nanopartículas al interior de la célula. Incluso la relación entre las propiedades físico químicas de las nanopartículas y el grado de captación aún no ha sido dilucidado completamente [165]. Investigaciones previas afirman que la carga de partículas en el interior de la célula es dependiente del tamaño, donde partículas de gran tamaño activan los mecanismos de la endocitosis mientras que las de pequeño tamaño pueden entrar por difusión, y alojarse dentro de vesículas distribuidas a través del citoplasma [166, 167]. Además, muchas de las partículas no necesariamente pueden estar dentro de la célula sino estar asociadas a la membrana. En la Figura 4.28 se observan las fotos de microscopia óptica de macrófagos encubados a concentraciones diferentes de Nps de TiO_2 (20ug/mL -50ug/mL) A-B grupo control, C-D después de dos horas de incubación. Es posible observar puntos negros asociados al compuesto de TiO_2 los cuales tienden a formar mayor cantidad de agregados con el aumento de la concentración. Se encontró que parte de estas partículas rodeaban la membrana y otra parte fue posible identificarlas dentro de la célula. Zouhir E. Allouni [165] realizó un estudio de la posible influencia de la asociación celular de Nps de TiO_2 con diferentes propiedades fisicoquímicas, encontrando que en la mayoría de los casos se formaron aglomerados y que el porcentaje de células asociadas con las nanopartículas dependía de la concentración de NPs alcanzando valores de saturación de 5mg/mL de Nps. También encontró que la carga de captación era mayor para las NPs que mostraban mezcla de fases cristalinas y una morfología esférica.

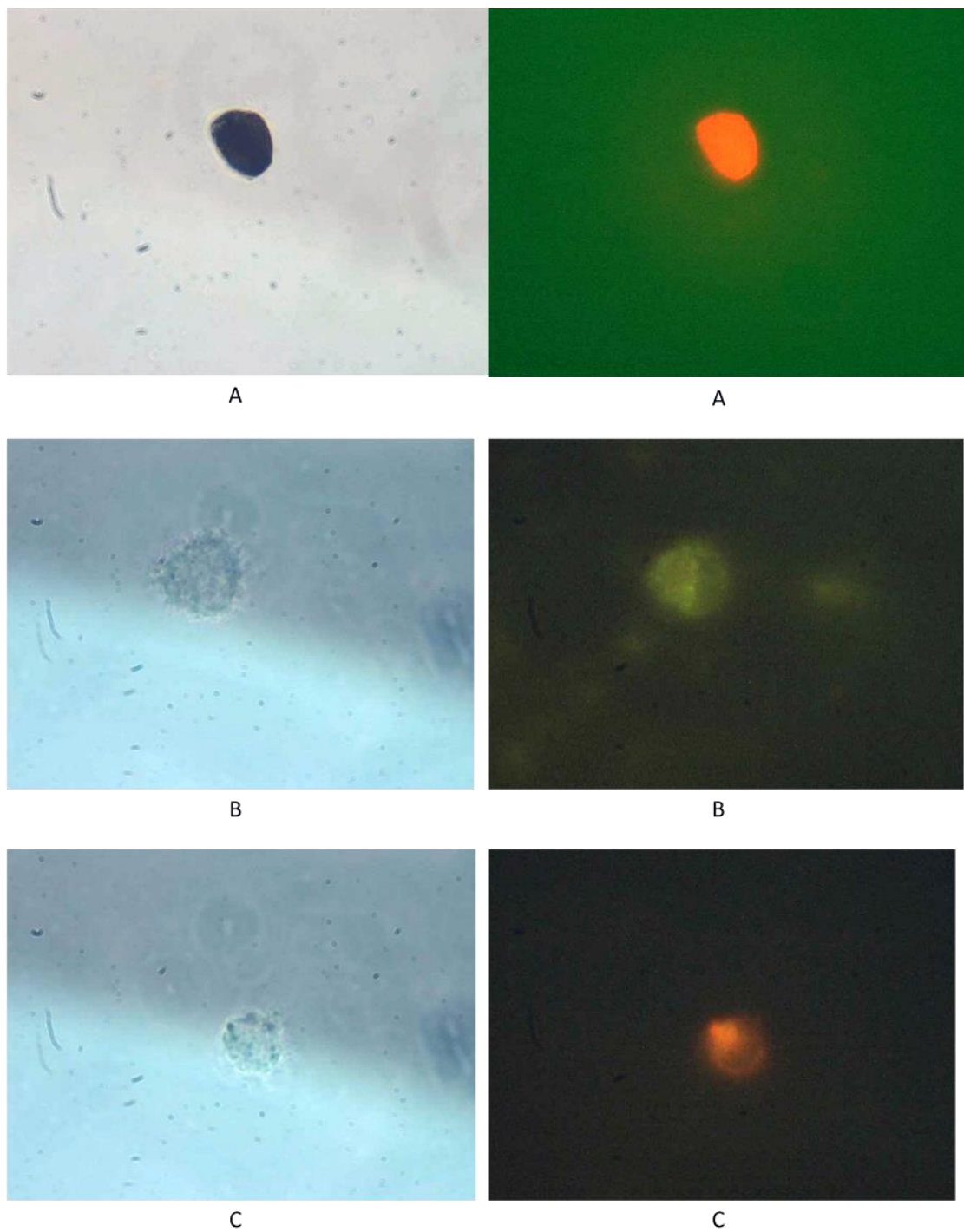
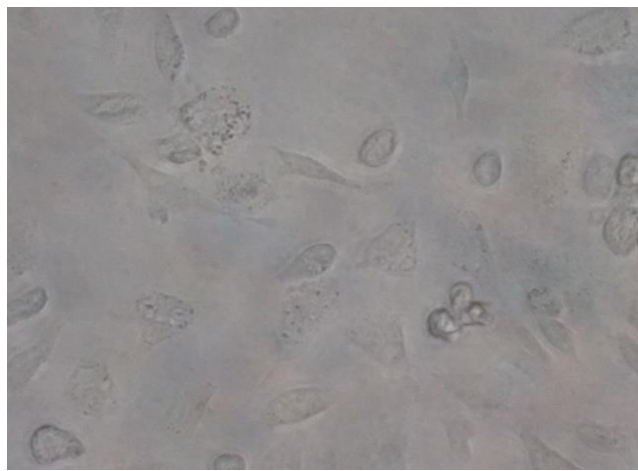


Figura 4.27 . Captación de los compuestos de TiO_2 + extracto fluorescente medidos por microscopia de fluorescencia a) 2 horas b) 4 horas c) 6 horas

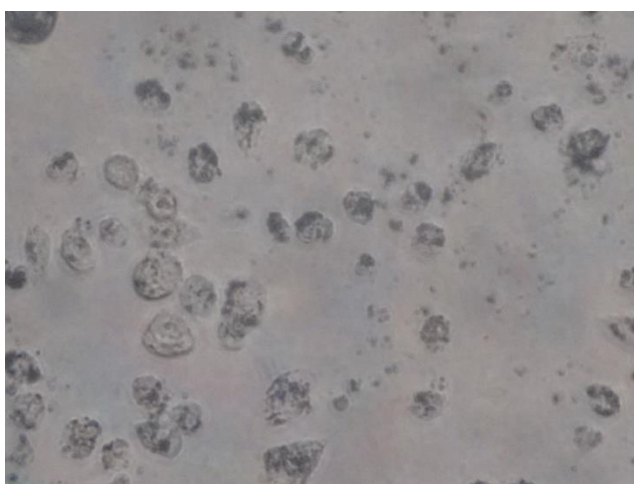
Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmania Cutánea



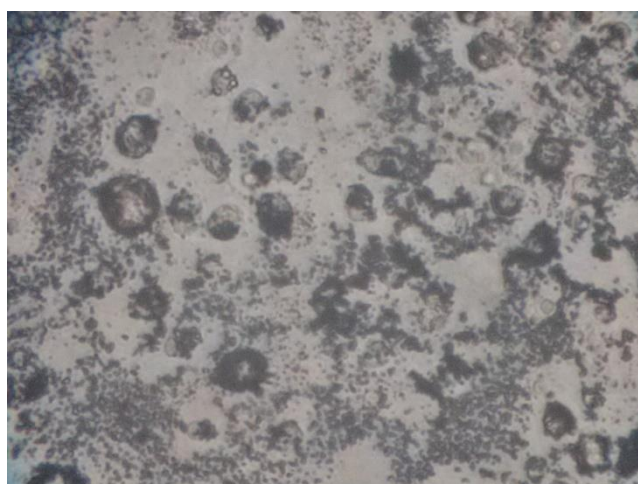
A



B



C



D

Figura 4.28 Imágenes de microscopía óptica tradicional A-B) Control de macrófagos sin presencia de compuesto C) Macrófagos incubados 2 horas con 10µg/mL de Nanopartículas de TiO₂ D) Macrófagos incubados 2 horas con 20 µg/mL de Nanopartículas de TiO₂

4.3.2.2 Caracterización de la lámpara usada

El espectro de la fuente de luz usada para los ensayos biológicos observa en la Figura 4.29 presenta una emisión totalmente en el visible con dos picos principales en 450 nm y 552nm sin presencia de picos asociados a la región UV o IR y la potencia medida fue de 22.6 mW/cm²

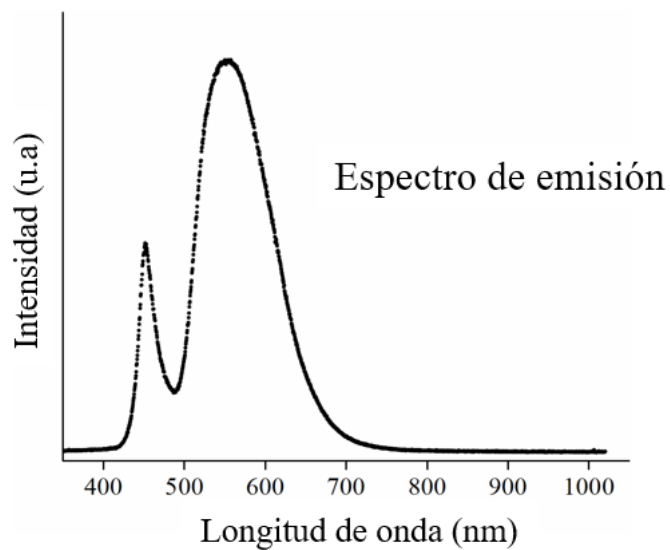


Figura 4.29 Espectro de emisión de la lámpara usada en los ensayos *in vitro* de los compuestos de dióxido de titanio.

4.3.2.3 Citotoxicidad y ensayo antileishmania

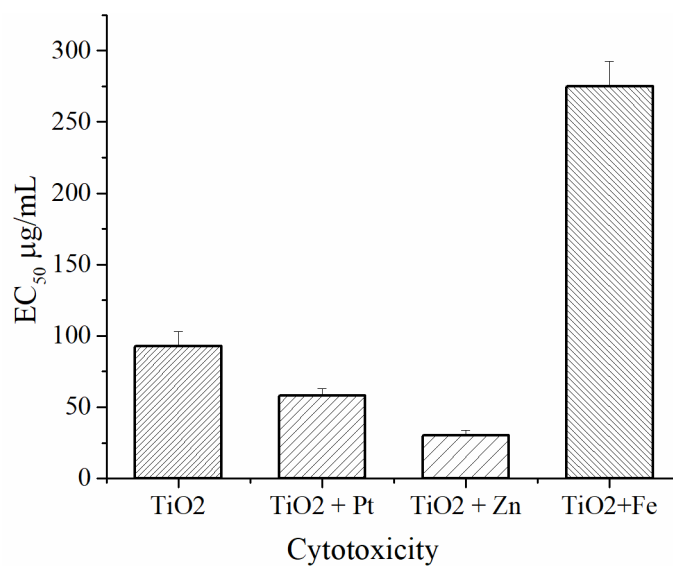


Figura 4.30 Efecto *In vitro* de los compuestos de TiO₂ con y sin dopante en macrófagos peritoneales de mamífero.

Los compuestos de TiO₂ dopados con Pt y Zn presentaron actividad leishmanicida en amastigotas intracelulares *L. amazonensis* cuando fueron sometidos a irradiación visible con una energía de 55 J (Figura 4.30) presentando un EC₅₀ de 18.2 ± 0.8 µg/mL y 16.4 ± 0.3 µg/mL con y sin luz respectivamente. La actividad antileishmania de los compuestos estudiados se vincula a la capacidad de producción de especies ROS por parte de los compuestos cuando son irradiados. Los compuestos dopados con Pt y Zn fueron los que presentaron mayor producción de especies ROS (TiO₂+Fe < TiO₂ < TiO₂+Pt ≅ TiO₂+Zn) y mayor actividad antileishmania. La presencia de los dopantes en la estructura del TiO₂ parece potenciar la capacidad de producción de especies ROS y produce desplazamientos de la longitud de absorción en el rango visible, debido probablemente a la aparición de estados intermedios de energía y transferencia de carga entre el dopante y el hospedero cuando se usan metales de transición [168, 169]. Por otro lado, hay diferentes reportes que dan cuenta del buen comportamiento antibacterial de estructuras con Zn y Pt y por tal el posible efecto por si solo del dopante [131, 170, 171].

Tabla 4.8 Actividad antileishmania (EC₅₀, Concentración media inhibitoria) y toxicidad en células de mamífero (CC₅₀, concentración citotóxica media) de NPs de TiO₂ en presencia de luz y su índice de selectividad (IS = CC₅₀/EC₅₀). Los datos fueron expresados como el promedio ± SD, p<0.05. NE: no efectivo (EC₅₀ 50 µg/mL); ND: no determinado

Compuesto	CC 50 µg/mL sin luz	EC₅₀ (µg/ mL) Con luz	CC₅₀ (µg/ mL) Con Luz	INDICE SELECTIVIDAD LUZ (IS)
TiO₂	NE	NE	92.8 ± 10.3	SI
TiO₂ + Pt	NE	18.2± 0.8	58.3 ± 4.7	ND
TiO₂ +Zn	75.88±6.68	16.4 ± 0.3	30.4 ± 3.5	3.2
TiO₂ + Fe	NE	NE	275.1 ± 17.3	1.9

Adicionalmente, la citotoxicidad de las NPs para las células hospederas fue evaluada con y sin irradiación visible durante 40 minutos y comparada con la actividad antileishmanicida con el fin de determinar el índice de selectividad (IS) el cual corresponde a la relación entre el CC₅₀ para los macrófagos y EC₅₀ para los parásitos (Tabla 4.8). Entre más alto el valor del IS quiere decir que el compuesto es más selectivo para el parásito que para la célula. Nuestros datos mostraron que el dióxido de titanio dopado con Zn fue el único compuesto que mostró comportamiento citotóxico en condiciones de oscuridad, con un valor de CC₅₀ de 75.88±6.68 µg/mL. El TiO₂ dopado con Fe fue el compuesto que presentó menor citotoxicidad tanto con irradiación como sin ella, con un CC₅₀ de 275.1 ± 17.3 µg/mL para las muestras irradiadas y

sin LC sin irradiación respectivamente. Los compuestos de Pt- ($CC_{50}= 58.3 \pm 4.7$, $IS= 3.2$) y el Zn- ($CC_{50}= 30.4 \pm 3.5$, $IS=1.9$) fueron dos veces más selectivos para el parásito coincidiendo en ser los materiales que presentaron los mayores niveles de producción de especies ROS. Sin embargo, el TiO_2 dopado con Zn fue levemente más citotóxico para las células hospederas.

Las pruebas de citotoxicidad que examinan nanopartículas inorgánicas, dan como resultado una relación de la citotoxicidad con el tamaño de partícula y otras propiedades físico-químicas. A menores tamaños de partículas, la citotoxicidad aumenta. En los compuestos de titanio la citotoxicidad también se relaciona con la capacidad de producción de especies ROS que resultan cuando el TiO_2 es excitado con la energía adecuada que por lo general se encuentra en longitudes de onda del ultravioleta. La fase anatasa resulta más activa en producción de especies ROS en comparación con el rutilo. Es por esto que cuando hay presencia predominante de fase anatasa hay mayor respuesta fotodinámica. El dopaje no solo es importante en el desplazamiento de la respuesta fotodinámica a longitudes de onda visible sino también en el efecto que pueden presentar los dopantes sobre el sistema biológico. En nuestro caso se puede ver que la citotoxicidad estuvo influenciada principalmente por la respuesta fotodinámica de los compuestos dopados, siendo los compuestos más citotóxicos aquellos que presentaron mayor producción de especies ROS (dopados con Zn y Pt). Por otra parte, el efecto que presentó el TiO_2 dopado con Zn sin irradiación, se puede asociar al dopante en concordancia con las propiedades antimicrobiales de diferentes compuestos de Zn reportadas en un número considerable de publicaciones, lo cual puede estar relacionado con la capacidad antimicrobial del Zn [172, 173]

4.3.2.4 Ensayos biológicos in vivo de las estructuras de dióxido de titanio TiO_2 + Zn asociado con HY

Los resultados *in vitro* mostraron que los compuestos de TiO_2 +Zn presentaron el menor EC_{50} correspondiente a un valor de 16.4 ± 0.3 ug/mL en amastigotas intracelulares *L. amazonensis*. Por eso fue el material escogido para realizar los estudios *in vivo* formulando una asociación entre el compuesto con la HY mediante la técnica adsorción agitación como fue reportado en la metodología. A partir del EC_{50} *in vitro* se determinaron tres concentraciones a trabajar correspondientes a $EC_{50}/2$, EC_{50} , $2EC_{50}$.

La Figura 4.31 muestra una foto representativa de las heridas de los ratones cuando son inyectados con la formulación TiO_2 + Zn-HY bajo irradiación visible led correspondiente a una longitud de onda de 492 nm. Con la ayuda de los filtros de la cámara fotográfica fue posible identificar la emisión del compuesto fotosensible de HY el cual se caracteriza por estar en el verde. Es posible ver que la distribución del compuesto no fue homogénea a través de toda la lesión. Por el contrario se encuentra localizada alrededor de los puntos de inoculación

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmania Cutánea

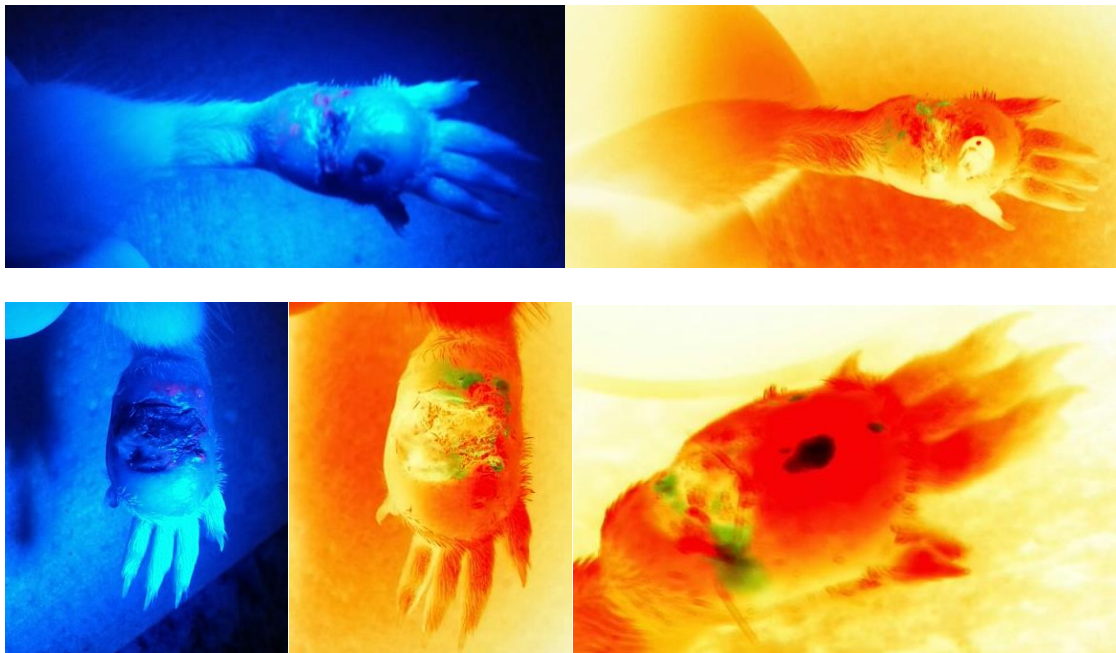


Figura 4.31 Fotos de la lesión de los ratones sometidos a irradiación visible y con filtro, los puntos verdes corresponden a la emisión de la HY.

La Figura 4.32 muestra las fotos de la evolución del tamaño de la herida de un ratón característico por cada grupo, durante las últimas tres semanas de tratamiento. Fue posible observar que la herida creció durante el tratamiento y no se observó una disminución de la misma. La Figura 4.33 muestra el promedio del volumen de la herida de cada grupo. Estadísticamente no fue posible identificar una disminución significativa de la herida en los grupos tratados con el compuesto de $\text{TiO}_2+\text{Zn-Hy}$. Solo el grupo tratado con anfotericina B mostró una reducción aproximada del 40% de la herida respecto al grupo control. Estos resultados pueden ser debidos posiblemente a una respuesta inflamatoria del sistema inmune debido a los compuestos.



Grupo 2

Capítulo 4- Resultados y Discusión



Grupo 3



Grupo 4



Grupo 5



Grupo 6



Grupo7

Figura 4.32 Fotos de la evolución de las heridas de los ratones durante las tres semanas de tratamiento Grupo 2) Control Grupo 3) tratados con anfotericina B, Grupo 4) Tratados con PBS Grupo 5) tratados con EC₅₀/2 Grupo 6) Tratados con EC₅₀, Grupo 7) Tratados con 2EC₅₀.

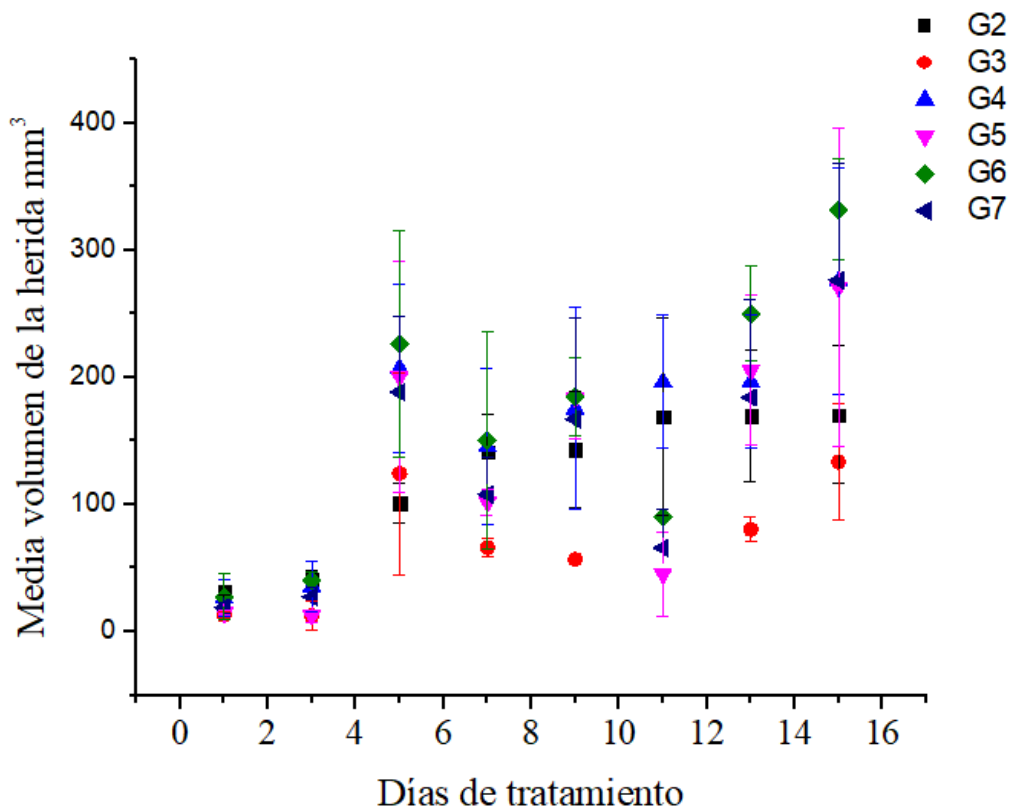


Figura 4.33 Tamaño de la herida de los grupos tratados, medidas durante el tratamiento en días alternados.

Capítulo 4- Resultados y Discusión

Los resultados de cuantificación de la carga por dilución limitante (Figura 4.34) para determinar la carga parasitaria mostró que el compuesto $\text{TiO}_2+\text{Zn-HY}$ disminuye la carga parasitaria en un 50% respecto al grupo control y solo presentan una diferencia del 23% respecto a la anfotericina B la cual presentó una disminución de la carga parasitaria del 73%. Así está demostrado que la combinación del $\text{TiO}_2+\text{Zn-HY}$ reduce la carga parasitaria casi en el mismo orden al fármaco de referencia. Es bien conocido que el actual tratamiento de la LC presenta muchos problemas como el incremento de la toxicidad, aparición de resistencia por parte de los parásitos y un elevado costo. Los resultados mostrados por el compuesto de TiO_2+Zn lo impulsan como un potencial fármaco para ser usado en el tratamiento de LC mediante una terapia alternativa de tratamiento como lo es la TF. El principal objetivo de esta terapia es decrecer los efectos citotóxicos y disminuir los costos de tratamiento. Estudios previos ya han mostrado el potencial uso de nanopartículas de TiO_2 para el tratamiento de LC, pasando por nanopartículas dopadas con Ag hasta la formulación de compuestos de TiO_2 combinados con fármacos de respuesta antileishmania como por ejemplo la meglumina. La respuesta antileishmania de este compuesto está asociada principalmente al mismo mecanismo visto en los resultados *in vitro*, el cual es la producción de especies ROS. En este caso al combinar el TiO_2+Zn con HY se logra un efecto conjunto de producción de especies ROS. Por una parte la activación del compuesto de HY que produce especies ROS a una longitud de onda de 600 nm aproximadamente y del compuesto de TiO_2+Zn el cual se fotoactiva entre 400 nm y 600 nm. Otros trabajos han mostrado que las nanopartículas de TiO_2 pueden asociarse a las membranas celulares microbianas provocando daño celular y capacidad de interactuar con el DNA, enzimas y otras proteínas contribuyendo a la erradicación de los parásitos [35-37].

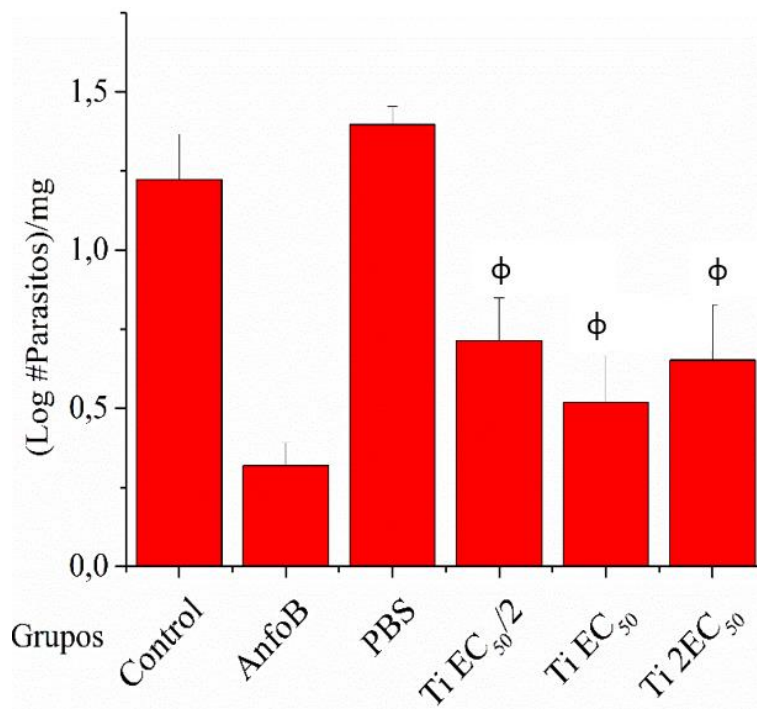


Figura 4.34 Eficacia in vivo de los compuestos de titanio ,y anfotericina B . El índice de infección fue calculado mediante dilución limitante. Datos expresados em média ± DS $p < 0,05$.

Otro efecto interesante que se encontró fue que los compuestos de $TiO_2+Zn-HY$ no presentaron una respuesta antileishmania dosis-dependiente puesto que para las tres concentraciones probadas no hubo diferencia estadística. Esto puede ser debido a dos posibles causas: la primera es la no distribución homogénea del compuesto al ser inoculado en la herida como se puede observar en la Figura 4.31 en la cual se observan los puntos asociados al compuesto fluorescente cercanos al punto de inoculación. Otra causa puede ser posiblemente a que al inocular el compuesto, el sistema de inyección no fue el adecuado para garantizar el volumen efectivo correspondiente a cada concentración, puesto que se tuvieron casos en que por lo avanzado de la lesión parte del compuesto salía por las partes abiertas de la herida.

Estos resultados indican que los compuestos de $TiO_2-Zn+HY$ muestran un efecto fotodinámico antileishmania en el modelo Balb/c cuando son activados con 55 J de energía, lo que los hace de interés para continuar las investigaciones alrededor de los posibles efectos secundarios y la forma de optimizar el suministro de las dosis.

5. CONCLUSIONES

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmania Cutánea

La ruta de síntesis química de combustión en solución permitió obtener nanopartículas de fosfato de calcio ricas en hidroxiapatita y fosfato tricálcico fase β , siendo este proceso más eficiente que los reportados actualmente en la literatura en cuanto a la relación costo/cantidad. Se probaron dos rutas de síntesis. La síntesis 1 (FC1) se caracterizó por ser una reacción de combustión tradicional iniciada mediante una fuente de calor por convección y la síntesis 2 (FC2) uso como aditivo KCL y la combinación con ignición por microondas. Ambas rutas de síntesis FC1 y FC2 permitieron obtener sistemas nanométricos. La ruta FC1 se caracterizó por presentar partículas altamente agregadas con morfologías tendientes a ser granulares de tamaños aproximados entre 12 nm-50 nm y área superficial de 7.5099 m²/g. Con la inclusión de la sal en la ruta de síntesis de combustión en solución y la combinación de microondas (FC2) se favoreció la obtención de estructuras tipo whiskers o nanotubos con alto grado de dispersión con tamaños en longitud variando entre 100-200 μ m y diámetros entre 20 nm a 80 nm. El área superficial se caracterizó por ser mayor que la combustión tradicional presentando un valor de 18.05 m²/g. Estas estructuras de FC fueron adecuadas para realizar la encapsulación de la HY mediante la técnica de impregnación/agitación. Este proceso permitió adsorber y absorber el principio activo en las estructuras de los FC, lo cual fue validado mediante FTIR y espectroscopia de fluorescencia. La incorporación de HY se dio principalmente por las interacciones de la HY a nivel de los grupos PO₄³⁻ y parcialmente del grupo OH de los fosfatos de calcio a través de interacciones electrostáticas y puentes de hidrogeno. Los fosfatos de calcio obtenidos mediante la síntesis 1 encapsularon 0.13 \pm 0.01 μ g de HY por cada μ g del material y los obtenidos por la síntesis 2 presentaron una encapsulación de 0.22 \pm 0.01 μ g. Estos resultados fueron relacionados con las medidas de área superficial observando que los materiales que presentaron mayor porcentaje de encapsulación fueron los obtenidos por aquellos con mayor área superficial.

La ruta de combustión en solución también permitió obtener estructuras de dióxido de titanio, principalmente tipo anatasa dopadas con Fe, Pt y Zn incluso sin necesidad de tratamiento térmico posterior. La microscopía electrónica de transmisión permitió confirmar que en estas estructuras las morfologías fueron granulares con tamaños por debajo de 20 nm. El principal efecto del dopante en las estructuras de TiO₂ fue generar un corrimiento del espectro de absorción hacia la región visible y una disminución de la energía de activación siendo el dopaje con Pt y Zn quienes presentaron valores de 3.15 eV y 3.14 eV respectivamente.

Mediante medidas indirectas de especies ROS fue posible verificar que el encapsulamiento de la HY en las estructuras de FC no afecta la respuesta fotoactiva de ésta. Se observó que los fosfatos de calcio actuaron como soportes fotocatalíticos sin comprometer la producción de especies ROS. Por otra parte, el dopaje de los compuestos de TiO₂ con Pt, Fe, y Zn condujo a la excitación del TiO₂ en la región visible de manera tal que la producción del par electrón hueco permitió la producción de especies ROS, posiblemente por la formación de estados intermedios de energía producto de los dopantes. Los compuestos dopados con Zn y Pt fueron los que presentaron mejores resultados.

Las medidas cualitativas de captación celular mostraron que los compuestos de fosfatos de calcio y dióxido de titanio son incorporados por las células a partir de las 2 horas de cultivo,

presentando mejores resultados a las 4 y 6 horas confirmando que dichas estructuras son aptas para usarse en terapias que precisen de la ubicación del compuesto dentro de la célula. Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* realizadas en macrófagos humanos derivados de monocitos y macrófagos peritoneales de ratones mostraron que los compuestos de fosfato de calcio y de dióxido de titanio no presentan citotoxicidad significativa bajo condiciones de oscuridad o al ser expuestos a la irradiación visible.

La evaluación de la actividad antileishmania *in vitro* mediante estimulación fotodinámica mostró que la HY encapsulada en los fosfatos de calcio presentó un EC_{50} de $40,76 \pm 9,2$ $\mu\text{g/mL}$ y 19.5 ± 2.4 $\mu\text{g/mL}$ para los obtenidos por la ruta de síntesis 1 y síntesis 2 respectivamente. Estos resultados en comparación con la cantidad de HY libre necesaria para generar una respuesta terapéutica (458.0 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$) muestran que la encapsulación favorece significativamente la acción antileishmania disminuyendo hasta 181 veces el EC_{50} de la hipericina libre y a su vez los fosfatos de fosfato de calcio mostraron una acción antileishmania por si solos. Este fenómeno se relacionó con un posible rompimiento del equilibrio del Ca^{2+} intracelular y debe ser tenido en cuenta en investigaciones futuras. Los compuestos de TiO_2 dopados con Pt y Zn presentaron actividad antileishmania, al ser irradiados bajo luz visible, siendo el compuesto con Zn el que presentó mayor actividad antiparasitaria (16.4 ± 0.3 $\mu\text{g/mL}$.) seguido por el dopado con Pt que mostró un EC_{50} de 18.2 ± 0.8 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados *in vivo* para el parche conformado por la HY encapsulada en los FC mostraron una reducción de la herida del 48% catalogada como una mejora clínica aunque se hace necesario profundizar en investigaciones futuras en la conformación del parche para mejorar dicha respuesta. Los resultados *in vivo* de los compuestos de TiO_2 Zn-HY presentaron una reducción de la carga parasitaria de *L. amazonensis* del 50 % pero no fue posible identificar una disminución significativa de la herida de los animales tratados con el compuesto de TiO_2 Zn-Hy. Estos resultados pueden ser debidos posiblemente a una respuesta inflamatoria del sistema inmune debido al compuesto de titanio.

Tanto los compuestos de fosfatos de calcio como encapsulantes de compuestos orgánicos fotoactivos, como el TiO_2 dopado con Zn y Pt, presentaron resultados prometedores en el tratamiento de leishmaniasis cutánea mediante terapia fotodinámica avalados tanto por ensayos *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados potencian su uso en investigaciones futuras encaminadas a entender los mecanismos de acción y su potencial aplicación como alternativas o combinación con terapias actuales para el tratamiento de la LC con un gran impacto a nivel social.

5. Anexo 1

Compuestos de acción fotodinámica usados en el tratamiento de leishmaniasis.

Compuesto	Ensayo	Concentraciones trabajadas	Observaciones	Año
Sol gel de zinc photoalocyanine in sol-gel de TiO ₂	Células cancerígenas y parásitos de L. Chagasi, L. Panamenesis <i>in vitro</i> . Evaluación en promastigotes	0,05uM-50uM Luz roja y una dosis de 2,5J/cm	El compuesto fue soportado en TiO ₂ los sistemas presentan una buena absorción en la región 600-800 nm. No se observaron efectos citotóxicos para valores de 50µg/ml	2010 [174]
Azul de metileno, 3,7-bis(N,N-dibutylamino)phenothiazinium bromide (PPA904), δ-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX (ALA),chloroaluminum phthalocyanine ,imethyl and diethyl carbaporphyrin ketals (CKOMe and CKOEt)	Ensayo realizado en L. Major		Con el ALA se realizó un ensayo clínico con pacientes que presentaban la enfermedad. Se tratan pacientes clínicos con el compuesto, a los 90 días se observó una mejoría del 93,5 % en la herida tratada, el control se realizó con paramomicin y un placebo	2013 [175] [176]
Zinc phthalocyanine liposomados	L. braziliensis evaluación en amastigotes y macrófagos	0.01 µM ZnPc and 7.6 µM Lámpara halógena de 0,22mW/cm2 durante 15mn dosis 0.2 J/cm2	Se obtuvieron compuestos con 130nm aproximadamente, la liposomación ayudó a la captación de los macrófagos, Se realizaron medidas de especies ROS con ayuda de H2DCFDA y citometría de flujo.	2014 [60]

Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la *Leishmania Cutánea*

Nanopartículas de plata	<i>Leishmania</i> trópica, promastigote y amastigote	25-200µg/ml UV por 30 m.	Presenta una reducción de 1,5 veces de carga parasitaria respecto al control sin luz y 6,5 a 7 veces de disminución con UV, los promastigotes presentaron mayor sensibilidad que los amastigotes.	2011 [177]
ZnO dopado con Ag y liposomado	L Tropica, amastigotes	0,1ng/ml 15 minutos a la luz solar 168w/m ²	solo se producen las ROS cuando el sistema es irradiado no presentó efecto en la oscuridad, efectividad en amastigotes hasta del 89%	2014 [20]
Metvix (Photocure, Oslo, Norway) in vivo	L. donovani	2 veces por semana y luego de la uso de Luz roja y dosis de 75 J/cm ²	Los resultados cosméticos fueron buenos no hubo toxicidad y diez meses después no se presentaron recaídas	2003 [178]
3,7-bis(di-n-utylamino)phenothiazin-5-ium bromide (PPA904	<i>Leishmania</i> major	500uM en unguento aplicaciones por 7 días 665,15 nm dosis de 50 J/cm ²	Los mejores resultados se lograron cuando se dejó la crema por 90 minutos con tres dias de aplicación en 4 días de intervalo entre tratamiento. Los parásitos de Leishmania tienen carga negativa. El fármaco al ser de carga positiva presenta afinidad eléctrica La crema es altamente lipófila.	2009 [179]
Chloroaluminum phthalocyanine (ClAlPc) encapsulados en liposomas <i>in vitro</i> . Tamaños de 109 nm	<i>Leishmania</i> chagasi y <i>Leishmania</i> panamensis	(0.0282–1666 nM) se varió la energía de 0 J a 17 J/cm ² longitud 597-752 nm	Se encapsuló en ultra liposomas deformables, con la encapsulación se logró 10 veces mayor efecto antileishmania que los compuestos sin encapsular, los sistemas fueron no tóxicos, presentó selectividad para promastigotes pero no para amastigotes, Con el aumento de la energía aumenta el efecto antileishmania	2011 [17]

5-ethylamino-9-diethylaminobenzo[a]phenoselenazinium chloride (EtNBSe) and (3,7-Bis(N,N-dibutylamino)phenothiazinium bromide (PPA904). <i>In vivo</i> como <i>in vitro</i>	L. major	Formulación en crema (500 uM de PPA904). 635 y 665 nm dosis de 10J/cm ² para los experimentos <i>in vivo</i> la potencia fue 50J/cm ²	Se proponen tratamientos con intervalos de 5- 7 el PPA904 mostró una tasa de reducción en los modelos de ratón , debido a la reactivación de la <i>Leishmania in vivo</i> en es posible que el PPA904 active la respuesta inmune Th1, el fármaco hidrófilo presenta mayor efecto anti <i>Leishmania</i> , las posibles limitaciones de la TF son la penetración del medicamento, inequidad de la distribución en la herida y la irritación con el contacto	2007 [180]
Riboflavin <i>in vitro</i>	L. major	0.1-40 uM 470 nm por 30 minutos 60J/cm ²	Los derivados de riboflavin no presentaron toxicidad en la oscuridad, pero tienen baja solubilidad en medio fisiológico y baja foto estabilidad, se pueden dar los dos mecanismos de fotosensibilización por producciones de radicales libres y singletes de oxígeno	2015 [19]
Azul de metileno (MB) <i>in vitro</i> y caso clínico	<i>Leishmania amazonensis</i>	100-20uM del antimonial pentavalente en solución acuosa de Azul de metileno al 0,5% Dosis de 20J/cm ² con y longitud de onda de 650nm 5mg/kg/d dosis en el paciente	El tratamiento fue por 20 días de un antimonial combinado con MB y una dosis de 20J/cm ² se irradió con 570 a 750 nm, se presenta citotoxicidad con el aumento de la concentración de MB. A los 14 días de tratamiento la lesión ya se había cerrado. Se pasó de una reducción de IC ₅₀ del antimonial pentavalente de 100 a 20uM cuando se combinó con la TF	2011 [21]
ZnPc en Ultraliposomas deformables	L. Braziliensis	1-10 mM 15J/cm ² luz solar	Se pasa de una actividad anti promastigote y amastigote del 20% al 80-100% con la encapsulación, la liposomación ayuda a la penetración en la piel	[18]

TiAg-Nps	<i>L. tropica</i> y <i>L. infantum</i>	1-500ug/ml Luz visible	Se presentó una disminución de 20 veces carga parasitaria cuando es sometida a la luz en el caso de promastigotes y 4,5 veces en el caso de amastigotes, Entre 5 µg/ml a 15 µg/ml no se observaron efectos citotóxicos nanopartículas de TiO ₂ se observan altamente agregadas.	2013 [35]
Chloroaluminium phthalocyanine liposomado (AICIPC)	<i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i>	AICIPC 200uM y de la miltefosina 200 mg/kg/d suministrada vía oral en días alternado por 20 días laser de 80mW con longitud de onda de 670 nm y energía total de 100J/cm ²	La combinación de ambos compuestos muestran una significativa reducción de la carga parasitaria comparada con el grupo control usan Pluronic F-127 para la formulación de un gel que permita mayor adhesión al cuerpo, la liposomación ayuda a la captación celular	2016 [181]
Dimethyl and diethyl carbaporphyrin ketals	<i>Leishmania</i>	1.1–4.2 uM lámpara fluorescente de 20 y 70 W para irradiación a 3 horas y 30 minutos	Evaluación en promastigotes, Se realizaron medidas de las especies ROS mediante monitoreo indirecto por resonancia magnética nuclear, se usan marcadores para conocer la ubicación en la célula, el Ketal se aloja incluso dentro de los parásitos de <i>Leishmania</i> , estos compuestos presentan actividad antileishmania	2008 [182]
Ag NPs, Au NPs, TiO ₂ NPs, ZnO NPs, y MgO NPs <i>in vitro</i> . Tamaños aproximados de 10-40 nm	<i>Leishmania</i> major	concentraciones evaluadas de 1-100 ug/ml UV, IR, 200-300nm and 800-1400nm	Se presentó mayor actividad antileishmanial para las nanopartículas de Ag NPs, seguidas por las de Au NPs, TiO ₂ NPs, ZnO NPs, y MgO NPs - Bajo condiciones de oscuridad esas nanopartículas tienen alta toxicidad a los macrófagos, hecho que debe ser considerado y analizado en futuros estudios.	2013 [183]

6. REFERENCIAS

- [1] R. Lopes, C.V. Eleutério, L.M.D. Gonçalves, M.E.M. CruzandA.J. Almeida, Lipid Nanoparticles Containing Oryzalin for the Treatment of Leishmaniasis, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45 (2012) 442-450.
- [2] M.d.I.P.S.R.d.C.D.G.d.S.P.O.P.d.I.S. OPS/OMS, C.d.C.T.c.e.M.d.I.P.S. Nro.andd.y.N.d. 2010, Guía Para La Atención Clínica Integral Del Paciente Con Leishmaniasis, (2010).
- [3] C. WilcocksandP.E.C. Manson-Bahr, *Manson's Tropical Diseases*, Bailiere-Tindall, London, 1976.
- [4] P. Mitropoulos, P. KonidasandM. Durkin-Konidas, New World Cutaneous Leishmaniasis: Updated Review of Current and Future Diagnosis and Treatment, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63 (2010) 309-322.
- [5] M. Tafaghodi, M. Eskandari, A. KhamesipourandM.R. Jaafari, Alginate Microspheres Encapsulated with Autoclaved< I> Leishmania Major</I>(Alm) and Cpg-Odn Induced Partial Protection and Enhanced Immune Response against Murine Model of Leishmaniasis, *Experimental parasitology*, 129 (2011) 107-114.
- [6] J.C. Padilla, F.E. Lizarazo, O.L. Murillo, F.A. Mendigaña, E. PachónandM.J. Vera, *Epidemiología De Las Principales Enfermedades Transmitidas Por Vectores En Colombia, 1990-2016*, *Biomédica*, 37 (2017) 27-40.
- [7] T.O. Viviana Milena, R.R. Yesmit KarinaandL.R. Daniel Arturo, Plantas Con Actividad Fotosensibilizadora Y Potencial Terapéutico En Leishmaniasis Cutánea: Hipericina, Una Alternativa Prometedora, *Infectio*, 17 (2013) 90-102.
- [8] S.E.G. Romero, E.F.E. TransmisiblesandG.E. transmitidas por Vectores, Informe Del Evento Leishmaniasis, Hasta El Periodo Epidemiológico Doce, Colombia, 2014, (2014).
- [9] K.C.F. Lidani, F.A. Andrade, M.R. Tizzot, M.C. Costa-Ribeiro, M.H. BeltrameandI.J. Messias-Reason, Visceral Leishmaniasis and Natural Infection Rates of Leishmania in Lutzomyia Longipalpis in Latin America, in: *The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis*, InTech, 2017.
- [10] T.S. Tiuman, A.O. Santos, T. Ueda-NakamuraandC.V. Nakamura, Recent Advances in Leishmaniasis Treatment, *International Journal of Infectious Diseases*, 15 (2011) e525-e532.
- [11] K. O'Riordan, O.E. AkilovandT. Hasan, The Potential for Photodynamic Therapy in the Treatment of Localized Infections, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2 (2005) 247-262.
- [12] M. Ouellette, J. DrummelsmithandB. Papadopoulou, Leishmaniasis: Drugs in the Clinic, Resistance and New Developments, *Drug Resistance Updates*, 7 (2004) 257-266.
- [13] S.L. CroftandG.H. Coombs, Leishmaniasis–Current Chemotherapy and Recent Advances in the Search for Novel Drugs, *Trends in parasitology*, 19 (2003) 502-508.
- [14] T.S. Tiuman, A.O. Santos, T. Ueda-Nakamura, B.P.D. FilhoandC.V. Nakamura, Recent Advances in Leishmaniasis Treatment, *International Journal of Infectious Diseases*, 15 (2011) e525-e532.
- [15] S.L. Croft, M.P. BarrettandJ.A. Urbina, Chemotherapy of Trypanosomiasis and Leishmaniasis, *Trends in Parasitology*, 21 (2005) 508-512.
- [16] S. Toraya-Brown, M.R. Sheen, P. Zhang, L. Chen, J.R. Baird, E. Demidenko, M.J. Turk, P.J. Hoopes, J.R. Conejo-GarciaandS. Fiering, Local Hyperthermia Treatment of

- Tumors Induces Cd8+ T Cell-Mediated Resistance against Distal and Secondary Tumors, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10 (2014) 1273-1285.
- [17] I.P. Hernández, J. Montanari, W. Valdivieso, M.J. Morilla, E.L. Romero and P. Escobar, In Vitro Phototoxicity of Ultradeformable Liposomes Containing Chloroaluminum Phthalocyanine against New World Leishmania Species, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117 (2012) 157-163.
- [18] J. Montanari, C. Maidana, M.I. Esteva, C. Salomon, M.J. Morilla and E.L. Romero, Sunlight Triggered Photodynamic Ultradeformable Liposomes against Leishmania Braziliensis Are Also Leishmanicidal in the Dark, *Journal of Controlled Release*, 147 (2010) 368-376.
- [19] A.V. Silva, A. López-Sánchez, H.C. Junqueira, L. Rivas, M.S. Baptista and G. Orellana, Riboflavin Derivatives for Enhanced Photodynamic Activity against Leishmania Parasites, *Tetrahedron*, 71 (2015) 457-462.
- [20] A. Nadhman, S. Nazir, M. Ihsanullah Khan, S. Arooj, M. Bakhtiar, G. Shahnaz and M. Yasin zai, Pegylated Silver Doped Zinc Oxide Nanoparticles as Novel Photosensitizers for Photodynamic Therapy against Leishmania, *Free Radical Biology and Medicine*, 77 (2014) 230-238.
- [21] L.S. Peloi, C.E.G. Biondo, E. Kimura, M.J. Politi, M.V.C. Lonardoni, S.M.A. Aristides, R.C.C. Dorea, N. Hioka and T.G.V. Silveira, Photodynamic Therapy for American Cutaneous Leishmaniasis: The Efficacy of Methylene Blue in Hamsters Experimentally Infected with Leishmania (Leishmania) Amazonensis, *Experimental Parasitology*, 128 (2011) 353-356.
- [22] J.B.P. Ribeiro, A.L. Miranda-Vilela, D. Graziani, M.R.d.A. Gomes, A.A.S. Amorim, R.D. Garcia, J. de Souza Filho, A.C. Tedesco, F.L. Primo, J.R. Moreira, A.V. Lima and R.N.R. Sampaio, Evaluation of the Efficacy of Systemic Miltefosine Associated with Photodynamic Therapy with Liposomal Chloroaluminium Phthalocyanine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania (L.) Amazonensis in C57bl/6 Mice, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 13 (2016) 282-290.
- [23] M. BLESÁ and B. GALVEZ, Desinfección Mediante Fotosensibilizadores: Principios Básicos, *SOLAR SAFE WATER*, (2005) 243.
- [24] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.-L. Viriot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, Nanoparticles as Vehicles for Delivery of Photodynamic Therapy Agents, *Trends in biotechnology*, 26 (2008) 612-621.
- [25] J.B. Morgenthaler, S.J. Peters, D.L. Cedeño, M.H. Constantino, K.A. Edwards, E.M. Kamowski, J.C. Passini, B.E. Butkus, A.M. Young, T.D. Lash and M.A. Jones, Carbaporphyrin Ketals as Potential Agents for a New Photodynamic Therapy Treatment of Leishmaniasis, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16 (2008) 7033-7038.
- [26] A.P. Dagnino, F.M.C.d. Barros, G.V. Ccana-Ccapatinta, J.S. Prophiro, G.L.v. Poser and P.R.T. Romão, Leishmanicidal Activity of Lipophilic Extracts of Some Hypericum Species, *Phytomedicine*, 22 (2015) 71-76.
- [27] M. Olivo, C.Y. Fu, V. Raghavan and W.K.O. Lau, New Frontier in Hypericin-Mediated Diagnosis of Cancer with Current Optical Technologies, *Annals of biomedical engineering*, 40 (2012) 460-473.
- [28] A. Rezusta, P. López-Chicón, M.P. Paz-Cristobal, M. Alemany-Ribes, D. Royo-Díez, M. Agut, C. Semino, S. Nonell, M. Revillo and C. Aspiroz, In Vitro Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on Candida Species†, *Photochemistry and photobiology*, 88 (2012) 613-619.

- [29] N. Nafee, A. Youssef, H. El-Gowell, H. Asema and S. Kandil, Antibiotic-Free Nanotherapeutics: Hypericin Nanoparticles Thereof for Improved in Vitro and in Vivo Antimicrobial Photodynamic Therapy and Wound Healing, *International Journal of Pharmaceutics*, 454 (2013) 249-258.
- [30] A. Montoya, A. Daza, D. Muñoz, K. Ríos, V. Taylor, D. Cedeño, I.D. Vélez, F. Echeverri and S.M. Robledo, Development of a Novel Formulation with Hypericin to Treat Cutaneous Leishmaniasis Based on Photodynamic Therapy in in Vitro and in Vivo Studies, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59 (2015) 5804-5813.
- [31] S. Singh, S. Sarma, S.P. Katiyar, M. Das, R. Bhardwaj, D. Sundar and V.K. Dubey, Probing the Molecular Mechanism of Hypericin-Induced Parasite Death Provides Insight into the Role of Spermidine Beyond Redox Metabolism in *Leishmania Donovanii*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59 (2015) 15-24.
- [32] A.M. Lima, C.D. Pizzol, F.B.F. Monteiro, T.B. Creczynski-Pasa, G.P. Andrade, A.O. Ribeiro and J.R. Perussi, Hypericin Encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles: Phototoxicity and Photodynamic Efficiency, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125 (2013) 146-154.
- [33] C.A. Rebeiz, L.J. Guta, K. Leea, J.A. Juvika, C.C. Rebeiza and C.E. Boutona, Photodynamics of Porphyrin Insecticides, *Crit Rev Plant Sci*, 14 (1995).
- [34] K. Patil, *Chemistry of Nanocrystalline Oxide Materials: Combustion Synthesis, Properties and Applications*, World Scientific, 2008.
- [35] A.M. Allahverdiyev, E.S. Abamor, M. Bagirova, S.Y. Baydar, S.C. Ates, F. Kaya, C. Kaya and M. Rafailovich, Investigation of Antileishmanial Activities of Tio₂@Ag Nanoparticles on Biological Properties of *L. Tropica* and *L. Infantum* Parasites, *in Vitro, Experimental Parasitology*, 135 (2013) 55-63.
- [36] E.S. Abamor and A.M. Allahverdiyev, A Nanotechnology Based New Approach for Chemotherapy of Cutaneous Leishmaniasis: Tio₂@Ag Nanoparticles – *Nigella Sativa* Oil Combinations, *Experimental Parasitology*, 166 (2016) 150-163.
- [37] E.S. Abamor, A.M. Allahverdiyev, M. Bagirova and M. Rafailovich, Meglumine Antimoniate-Tio₂@Ag Nanoparticle Combinations Reduce Toxicity of the Drug While Enhancing Its Antileishmanial Effect, *Acta Tropica*, 169 (2017) 30-42.
- [38] Z. Amjad, *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*, Kluwer academic publishers Boston, 1998.
- [39] M.-P. Ginebra, C. Canal, M. Espanol, D. Pastorino and E.B. Montufar, Calcium Phosphate Cements as Drug Delivery Materials, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 1090-1110.
- [40] I.R. Bell, G.E. Schwartz, N.N. Boyer, M. Koithan and A.J. Brooks, Advances in Integrative Nanomedicine for Improving Infectious Disease Treatment in Public Health, *European Journal of Integrative Medicine*, 5 (2013) 126-140.
- [41] D. Loca, M. Sokolova, J. Locs, A. Smirnova and Z. Irbe, Calcium Phosphate Bone Cements for Local Vancomycin Delivery, *Materials Science and Engineering: C*, 49 (2015) 106-113.
- [42] Y.-P. Guo, Y.-B. Yao, Y.-J. Guo and C.-Q. Ning, Hydrothermal Fabrication of Mesoporous Carbonated Hydroxyapatite Microspheres for a Drug Delivery System, *Microporous and Mesoporous Materials*, 155 (2012) 245-251.
- [43] L. Chen, H. Zhu, S. Yang, B. Zhou, F. You and X. Yan, Nanostructured Calcium Phosphate Carriers for Deliver of Poor Water-Soluble Drug Silybin, *Materials Letters*, 143 (2015) 252-255.

- [44] M.P. Ginebra Molins, Desarrollo Y Caracterización De Un Cemento Óseo Basado En Fosfato Tricálcico Para Aplicaciones Quirúrgicas, (1997).
- [45] W. Zhang, Y. Chai, X. Xu, Y. Wang and N. Cao, Rod-Shaped Hydroxyapatite with Mesoporous Structure as Drug Carriers for Proteins, *Applied Surface Science*, 322 (2014) 71-77.
- [46] H. Baradari, C. Damia, M. Dutreih-Colas, E. Laborde, N. Pécout, E. Champion, D. Chulia and M. Viana, Calcium Phosphate Porous Pellets as Drug Delivery Systems: Effect of Drug Carrier Composition on Drug Loading and in Vitro Release, *Journal of the European Ceramic Society*, 32 (2012) 2679-2690.
- [47] M. Itokazu, W. Yang, T. Aoki, A. Ohara and N. Kato, Synthesis of Antibiotic-Loaded Interporous Hydroxyapatite Blocks by Vacuum Method and in Vitro Drug Release Testing, *Biomaterials*, 19 (1998) 817-819.
- [48] T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, S. Yamaguchi, T. Kusunose, T. Toyonaga, Y. Hamada and J. Takahashi, Hydroxyapatite Particles as a Controlled Release Carrier of Protein, *Biomaterials*, 25 (2004) 3807-3812.
- [49] M.A. Rauschmann, T.A. Wichelhaus, V. Stinal, E. Dingeldein, L. Zichner, R. Schnettler and V. Alt, Nanocrystalline Hydroxyapatite and Calcium Sulphate as Biodegradable Composite Carrier Material for Local Delivery of Antibiotics in Bone Infections, *Biomaterials*, 26 (2005) 2677-2684.
- [50] Y. Mizushima, T. Ikoma, J. Tanaka, K. Hoshi, T. Ishihara, Y. Ogawa and A. Ueno, Injectable Porous Hydroxyapatite Microparticles as a New Carrier for Protein and Lipophilic Drugs, *Journal of Controlled Release*, 110 (2006) 260-265.
- [51] S. Radin, J.T. Campbell, P. Ducheyne and J.M. Cuckler, Calcium Phosphate Ceramic Coatings as Carriers of Vancomycin, *Biomaterials*, 18 (1997) 777-782.
- [52] G.-J. Ding, Y.-J. Zhu, C. Qi, B.-Q. Lu, J. Wu and F. Chen, Porous Microspheres of Amorphous Calcium Phosphate: Block Copolymer Templated Microwave-Assisted Hydrothermal Synthesis and Application in Drug Delivery, *Journal of Colloid and Interface Science*, 443 (2015) 72-79.
- [53] H. Nie and C.-H. Wang, Fabrication and Characterization of Plga/Hap Composite Scaffolds for Delivery of Bmp-2 Plasmid DNA, *Journal of controlled release*, 120 (2007) 111-121.
- [54] Q. Xu and J.T. Czernuszka, Controlled Release of Amoxicillin from Hydroxyapatite-Coated Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres, *Journal of Controlled Release*, 127 (2008) 146-153.
- [55] M. Vukomanović, S.D. Škapin, B. Jančar, T. Maksin, N. Ignjatović, V. Uskoković and D. Uskoković, Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide)/Hydroxyapatite Core-Shell Nanospheres. Part 1: A Multifunctional System for Controlled Drug Delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82 (2011) 404-413.
- [56] W. Pon-On, N. Charoenphanth, I.M. Tang, P. Jongwattanapisan, N. Krishnamra and R. Hoonsawat, Encapsulation of Magnetic CoFe₂O₄ in SiO₂ Nanocomposites Using Hydroxyapatite as Templates: A Drug Delivery System, *Materials Chemistry and Physics*, 131 (2011) 485-494.
- [57] G. Zuo, Y. Wan and Y. Zhang, Preparation and Characterization of a Novel Laminated Magnetic Hydroxyapatite for Application on Gene Delivery, *Materials Letters*, 68 (2012) 225-227.

- [58] M.I. Ahymah Joshy, K. Elayaraja, R.V. Suganthi, S. Chandra VeerlaandS.N. Kalkura, In Vitro Sustained Release of Amoxicillin from Lanthanum Hydroxyapatite Nano Rods, *Current Applied Physics*, 11 (2011) 1100-1106.
- [59] A. Nadhman, S. Nazir, M.I. Khan, S. Arooj, M. Bakhtiar, G. ShahnazandM. Yasinzai, Pegylated Silver Doped Zinc Oxide Nanoparticles as Novel Photosensitizers for Photodynamic Therapy against Leishmania, *Free Radical Bio. Med.*, 77 (2014) 230-238.
- [60] A.P. Perez, A. Casasco, P. Schilrreff, M.V.D. Tesoriero, L. Duempelmann, M.J. Altube, L. Higa, M.J. Morilla, P. PetrayandE.L. Romero, Enhanced Photodynamic Leishmanicidal Activity of Hydrophobic Zinc Phthalocyanine within Archaeolipids Containing Liposomes, *International journal of nanomedicine*, 9 (2014) 3335.
- [61] C. Großardt, A. Ewald, L.M. Grover, J.E. BarraletandU. Gbureck, Passive and Active in Vitro Resorption of Calcium and Magnesium Phosphate Cements by Osteoclastic Cells, *Tissue Engineering Part A*, 16 (2010) 3687-3695.
- [62] S.V. Dorozhkin, Dissolution Mechanism of Calcium Apatites in Acids: A Review of Literature, *World journal of methodology*, 2 (2012) 1.
- [63] Y. Ishibai, J. Sato, T. NishikawaandS. Miyagishi, Synthesis of Visible-Light Active Tio 2 Photocatalyst with Pt-Modification: Role of Tio 2 Substrate for High Photocatalytic Activity, *Applied Catalysis B: Environmental*, 79 (2008) 117-121.
- [64] M. Stucchi, C.L. Bianchi, C. Pirola, S. Vitali, G. Cerrato, S. Morandi, C. Argiris, G. Sourkouni, P.M. SakkasandV. Capucci, Surface Decoration of Commercial Micro-Sized Tio₂ by Means of High Energy Ultrasound: A Way to Enhance Its Photocatalytic Activity under Visible Light, *Applied Catalysis B: Environmental*, 178 (2015) 124-132.
- [65] J. Wang, C. Li, X. Luan, J. Li, B. Wang, L. Zhang, R. XuandX. Zhang, Investigation on Solar Photocatalytic Activity of Tio 2 Loaded Composite: Tio 2/Skeleton, Tio 2/Dens and Tio 2/Hap, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 320 (2010) 62-67.
- [66] P. Wei, J. LiuandZ. Li, Effect of Pt Loading and Calcination Temperature on the Photocatalytic Hydrogen Production Activity of Tio₂ Microspheres, *Ceramics International*, 39 (2013) 5387-5391.
- [67] D. Lončarević, J. Dostanić, V. Radonjić, A. Radosavljević-MihajlovićandD.M. Jovanović, Structure–Activity Relationship of Nanosized Porous Peg-Modified Tio₂ Powders in Degradation of Organic Pollutants, *Advanced Powder Technology*, 26 (2015) 1162-1170.
- [68] H. Yang, J. Zhang, Y. Song, S. Xu, L. JiangandY. Dan, Visible Light Photocatalytic Activity of C-Pva/Tio₂ Composites for Degrading Rhodamine B, *Applied Surface Science*, 324 (2015) 645-651.
- [69] A. Lopera, E. Chavarriaga, H. Estupiñan, I. Valencia, C. PaucarandC. Garcia, Synthesis and Spectroscopic Characterization of Nanoparticles of Tio₂ Doped with Pt Produced Via the Self-Combustion Route, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49 (2016) 205501.
- [70] W.Y. Teoh, L. Mädler, D. Beydoun, S.E. PratsinisandR. Amal, Direct (One-Step) Synthesis of Tio₂ and Pt/Tio₂ Nanoparticles for Photocatalytic Mineralisation of Sucrose, *Chemical Engineering Science*, 60 (2005) 5852-5861.
- [71] H. Schulz, L. Mädler, R. Strobel, R. Jossen, S.E. PratsinisandT. Johannessen, Independent Control of Metal Cluster and Ceramic Particle Characteristics During One-Step Synthesis of Pt/Tio 2, *Journal of materials research*, 20 (2005) 2568-2577.

- [72] G. Sivalingam, K. Nagaveni, M.S. Hegde and G. Madras, Photocatalytic Degradation of Various Dyes by Combustion Synthesized Nano Anatase TiO_2 , *Applied Catalysis B: Environmental*, 45 (2003) 23-38.
- [73] G.D. Webler, M.J.M. Zapata, L.C. Agra, E. Barreto, A.O.S. Silva, J.M. Hickmann and E.J.S. Fonseca, Characterization and Evaluation of Cytotoxicity of Biphasic Calcium Phosphate Synthesized by a Solid State Reaction Route, *Current Applied Physics*, 14 (2014) 876-880.
- [74] B. Nasiri-Tabrizi, P. Honarmandi, R. Ebrahimi-Kahrizsangi and P. Honarmandi, Synthesis of Nanosize Single-Crystal Hydroxyapatite Via Mechanochemical Method, *Materials Letters*, 63 (2009) 543-546.
- [75] Y.-S. Wu, Y.-H. Lee and H.-C. Chang, Preparation and Characteristics of Nanosized Carbonated Apatite by Urea Addition with Coprecipitation Method, *Materials Science and Engineering: C*, 29 (2009) 237-241.
- [76] A.H. Rajabi-Zamani, A. Behnamghader and A. Kazemzadeh, Synthesis of Nanocrystalline Carbonated Hydroxyapatite Powder Via Nonalkoxide Sol-Gel Method, *Materials Science and Engineering: C*, 28 (2008) 1326-1329.
- [77] K. Cheng, S. Zhang and W. Weng, Sol-Gel Prepared B-Tcp/Fha Biphasic Coatings, *Thin Solid Films*, 515 (2006) 135-140.
- [78] B.H. Fella and P. Layrolle, Sol-Gel Synthesis and Characterization of Macroporous Calcium Phosphate Bioceramics Containing Microporosity, *Acta Biomaterialia*, 5 (2009) 735-742.
- [79] A. Gozalian, A. Behnamghader, M. Daliri and A. Moshkforoush, Synthesis and Thermal Behavior of Mg-Doped Calcium Phosphate Nanopowders Via the Sol Gel Method, *Scientia Iranica*, 18 (2011) 1614-1622.
- [80] J. Hui, H. Li, X. Zheng, H. Ma, D. Fan, H. Liu and Y. Wang, Control Synthesis and Self-Assembly of Calcium Apatite at Low Temperatures, *Ceramics International*.
- [81] C. Kailasanathan, N. Selvakumar and V. Naidu, Structure and Properties of Titania Reinforced Nano-Hydroxyapatite/Gelatin Bio-Composites for Bone Graft Materials, *Ceramics International*, 38 (2012) 571-579.
- [82] J.S. Son, M. Appleford, J.L. Ong, J.C. Wenke, J.M. Kim, S.H. Choi and D.S. Oh, Porous Hydroxyapatite Scaffold with Three-Dimensional Localized Drug Delivery System Using Biodegradable Microspheres, *Journal of Controlled Release*, 153 (2011) 133-140.
- [83] W. Kim and F. Saito, Sonochemical Synthesis of Hydroxyapatite from H_3PO_4 Solution with $\text{Ca}(\text{OH})_2$, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (2001) 85-88.
- [84] G.E. Poinern, R.K. Brundavanam, N. Mondino and Z.-T. Jiang, Synthesis and Characterisation of Nanohydroxyapatite Using an Ultrasound Assisted Method, *Ultrasonics Sonochemistry*, 16 (2009) 469-474.
- [85] C. Qi, Y.-J. Zhu, X.-Y. Zhao, J. Zhao, F. Chen, G.-F. Cheng and Y.-J. Ruan, High Surface Area Carbonate Apatite Nanorod Bundles: Surfactant-Free Sonochemical Synthesis and Drug Loading and Release Properties, *Materials Research Bulletin*, 48 (2013) 1536-1540.
- [86] J. Zhao, X. Dong, M. Bian, J. Zhao, Y. Zhang, Y. Sun, J. Chen and X. Wang, Solution Combustion Method for Synthesis of Nanostructured Hydroxyapatite, Fluorapatite and Chlorapatite, *Applied Surface Science*, 314 (2014) 1026-1033.
- [87] S.K. Ghosh, S.K. Roy, B. Kundu, S. Datta and D. Basu, Synthesis of Nano-Sized Hydroxyapatite Powders through Solution Combustion Route under Different Reaction Conditions, *Materials Science and Engineering: B*, 176 (2011) 14-21.

- [88] J. Zhao, J. Zhao, J. Chen, X. Wang, Z. Han and Y. Li, Rietveld Refinement of Hydroxyapatite, Tricalcium Phosphate and Biphasic Materials Prepared by Solution Combustion Method, *Ceramics International*, 40 (2014) 3379-3388.
- [89] J. Zhao, J. Zhao, Y. Qian, X. Zhang, F. Zhou, H. Zhang, H. Lu, J. Chen, X. Wang and W. Yu, Solution Combustion Synthesis of Calcium Phosphate Particles for Controlled Release of Bovine Serum Albumin, *Materials Science and Engineering: C*, 50 (2015) 194-200.
- [90] R. Ramakrishnan, P. Wilson, T. Sivakumar and I. Jemina, A Comparative Study of Hydroxyapatites Synthesized Using Various Fuels through Aqueous and Alcohol Mediated Combustion Routes, *Ceramics International*, 39 (2013) 3519-3532.
- [91] Y. Han, S. Li, X. Wang and X. Chen, Synthesis and Sintering of Nanocrystalline Hydroxyapatite Powders by Citric Acid Sol-Gel Combustion Method, *Materials Research Bulletin*, 39 (2004) 25-32.
- [92] O. Kaygili, S.V. Dorozhkin and S. Keser, Synthesis and Characterization of Ce-Substituted Hydroxyapatite by Sol-Gel Method, *Materials Science and Engineering: C*, 42 (2014) 78-82.
- [93] M. Honda, Y. Kawanobe, K. Ishii, T. Konishi, M. Mizumoto, N. Kanzawa, M. Matsumoto and M. Aizawa, In Vitro and in Vivo Antimicrobial Properties of Silver-Containing Hydroxyapatite Prepared Via Ultrasonic Spray Pyrolysis Route, *Materials Science and Engineering: C*, 33 (2013) 5008-5018.
- [94] G.H. An, H.J. Wang, B.H. Kim, Y.G. Jeong and Y.H. Choa, Fabrication and Characterization of a Hydroxyapatite Nanopowder by Ultrasonic Spray Pyrolysis with Salt-Assisted Decomposition, *Materials Science and Engineering: A*, 449-451 (2007) 821-824.
- [95] D. Gopi, J. Indira, L. Kavitha, S. Kannan and J.M.F. Ferreira, Spectroscopic Characterization of Nanohydroxyapatite Synthesized by Molten Salt Method, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77 (2010) 545-547.
- [96] T. Lan, Z.-q. Shao, J.-q. Wang and M.-j. Gu, Fabrication of Hydroxyapatite Nanoparticles Decorated Cellulose Triacetate Nanofibers for Protein Adsorption by Coaxial Electrospinning, *Chemical Engineering Journal*, 260 (2015) 818-825.
- [97] D.M. Santos, M.W. Carneiro, T.R. de Moura, M. Soto, N.F. Luz, D.B. Prates, J.M. Irache, C. Brodskyn, A. Barral, M. Barral-Netto, S. Espuelas, V.M. Borges and C.I. de Oliveira, Plga Nanoparticles Loaded with Kmp-11 Stimulate Innate Immunity and Induce the Killing of Leishmania, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9 (2013) 985-995.
- [98] D.M. Antonelli and J.Y. Ying, Synthesis of Hexagonally Packed Mesoporous TiO₂ by a Modified Sol-Gel Method, *Angewandte Chemie International Edition*, 34 (1995) 2014-2017.
- [99] A. Testino, I.R. Bellobono, V. Buscaglia, C. Canevali, M. D'Arienzo, S. Polizzi, R. Scotti and F. Morazzoni, Optimizing the Photocatalytic Properties of Hydrothermal TiO₂ by the Control of Phase Composition and Particle Morphology. A Systematic Approach, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 3564-3575.
- [100] A. Barnard and L. Curtiss, Prediction of TiO₂ Nanoparticle Phase and Shape Transitions Controlled by Surface Chemistry, *Nano letters*, 5 (2005) 1261-1266.
- [101] M. Paulose, K. Shankar, S. Yoriya, H.E. Prakasam, O.K. Varghese, G.K. Mor, T.A. Latempa, A. Fitzgerald and C.A. Grimes, Anodic Growth of Highly Ordered TiO₂ Nanotube

- Arrays to 134 Mm in Length, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 16179-16184.
- [102] Q. Xiang, J. Yu, B. Cheng and H. Ong, Microwave-Hydrothermal Preparation and Visible-Light Photoactivity of Plasmonic Photocatalyst Ag-TiO₂ Nanocomposite Hollow Spheres, *Chemistry—An Asian Journal*, 5 (2010) 1466-1474.
- [103] N. Li, G. Liu, C. Zhen, F. Li, L. Zhang and H.M. Cheng, Battery Performance and Photocatalytic Activity of Mesoporous Anatase TiO₂ Nanospheres/Graphene Composites by Template-Free Self-Assembly, *Advanced Functional Materials*, 21 (2011) 1717-1722.
- [104] J. Guo, S. Zhu, Z. Chen, Y. Li, Z. Yu, Q. Liu, J. Li, C. Feng and D. Zhang, Sonochemical Synthesis of TiO₂ Nanoparticles on Graphene for Use as Photocatalyst, *Ultrasonics sonochemistry*, 18 (2011) 1082-1090.
- [105] K. Siefert and G. Griffin, Growth Kinetics of Cvd TiO₂: Influence of Carrier Gas, *Journal of the Electrochemical Society*, 137 (1990) 1206-1208.
- [106] S.T. Aruna and A.S. Mukasyan, Combustion Synthesis and Nanomaterials, *Current opinion in solid state and materials science*, 12 (2008) 44-50.
- [107] K.C. Patil, S.T. Aruna and T. Mimani, Combustion Synthesis: An Update, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6 (2002) 507-512.
- [108] A. Boiy, R. Roelandts and P.A.M. de Witte, Photodynamic Therapy Using Topically Applied Hypericin: Comparative Effect with Methyl-Aminolevulinic Acid on Uv Induced Skin Tumours, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 102 (2011) 123-131.
- [109] A. Boiy, R. Roelandts, T. Roskams and P.A.M. de Witte, Effect of Vehicles and Esterification on the Penetration and Distribution of Hypericin in the Skin of Hairless Mice, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 4 (2007) 130-139.
- [110] A. Montoya, Hipericina, Un Agente Fotosensibilizador Útil En Terapia Fotodinámica Para La Leishmaniasis Cutánea, in, Universidad de Antioquia, 2014.
- [111] S.M. Duque-Benítez, L.A. Ríos-Vásquez, R. Ocampo-Cardona, D.L. Cedeño, M.A. Jones, I.D. Vélez and S.M. Robledo, Synthesis of Novel Quaternary Ammonium Salts and Their in Vitro Antileishmanial Activity and U-937 Cell Cytotoxicity, *Molecules*, 21 (2016) 381.
- [112] D.L. Muñoz, S.M. Robledo, B.K. Kolli, S. Dutta, K.P. Chang and C. Muskus, Leishmania (Viannia) Panamensis: An in Vitro Assay Using the Expression of Gfp for Screening of Antileishmanial Drug, *Experimental parasitology*, 122 (2009) 134-139.
- [113] S.M. Robledo, L.M. Carrillo, A. Daza, A.M. Restrepo, D.L. Muñoz, J. Tobón, J.D. Murillo, A. López, C. Ríos and C.V. Mesa, Cutaneous Leishmaniasis in the Dorsal Skin of Hamsters: A Useful Model for the Screening of Antileishmanial Drugs, *Journal of visualized experiments: JoVE*, (2012).
- [114] A. Velásquez, R.A.d. Souza, T.G. Passalacqua, A.R. Ribeiro, M. Scontri, C.M. Chin, L.d. Almeida, M.L.D. Cistia, J.A.d. Rosa and A.E. Mauro, Antiprotozoal Activity of the Cyclopalladated Complexes against Leishmania Amazonensis and Trypanosoma Cruzi, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27 (2016) 1032-1039.
- [115] F.d. Paiva, V.V. Maffili and A. Santos, Curso De Manipulação De Animais De Laboratório, Salvador: Ministério da Saúde, FIOCRUZ, (2005).
- [116] I.Z. Carlos, C. Carli, D.C. Maia, F.P. Benzatti, F. Lopes, F.M. Roese, M. Watanabe, A.C. Micheletti, L.C.d. Santos and W. Vilegas, Immunostimulatory Effects of the Phenolic Compounds from Lichens on Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Production, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (2009) 847-852.

- [117] T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1983) 55-63.
- [118] A. Dutta, S. Bandyopadhyay, C. Mandal and M. Chatterjee, Development of a Modified Mtt Assay for Screening Antimonial Resistant Field Isolates of Indian Visceral Leishmaniasis, *Parasitology international*, 54 (2005) 119-122.
- [119] T.G. Passalacqua, L.A. Dutra, L. de Almeida, A.M.A. Velásquez, F.A.E. Torres, P.R. Yamasaki, M.B. dos Santos, L.O. Regasini, P.A. Michels and V. da Silva Bolzani, Synthesis and Evaluation of Novel Prenylated Chalcone Derivatives as Anti-Leishmanial and Anti-Trypanosomal Compounds, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25 (2015) 3342-3345.
- [120] R. Vani, E. Girija, K. Elayaraja, S.P. Parthiban, R. Kesavamoorthy and S.N. Kalkura, Hydrothermal Synthesis of Porous Triphasic Hydroxyapatite/(A and B) Tricalcium Phosphate, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (2009) 43-48.
- [121] P. De Aza, F. Guitian, C. Santos, S. De Aza, R. Cusco and L. Artus, Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 2. Comparison between Hydroxyapatite and B-Tricalcium Phosphate, *Chemistry of Materials*, 9 (1997) 916-922.
- [122] G. Sauer, W. Zunic, J. Durig and R. Wuthier, Fourier Transform Raman Spectroscopy of Synthetic and Biological Calcium Phosphates, *Calcified tissue international*, 54 (1994) 414-420.
- [123] C.S. Ciobanu, S.L. Iconaru, F. Massuyeau, L.V. Constantin, A. Costescu and D. Predoi, Synthesis, Structure, and Luminescent Properties of Europium-Doped Hydroxyapatite Nanocrystalline Powders, *Journal of Nanomaterials*, 2012 (2012) 61.
- [124] V.R. Kodati, G.E. Tomasi, J.L. Turumin and A.T. Tu, Raman Spectroscopic Identification of Phosphate-Type Kidney Stones, *Applied spectroscopy*, 45 (1991) 581-583.
- [125] B. Cornilsen and R. Condrate, The Vibrational Spectra of B-Ca₂P₂O₇ and Γ-Ca₂P₂O₇, *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 41 (1979) 602-605.
- [126] J.-J. Bian, D.-W. Kim and K.-S. Hong, Phase Transformation and Sintering Behavior of Ca₂P₂O₇, *Materials letters*, 58 (2004) 347-351.
- [127] B. Cornilsen and R. Condrate, The Vibrational Spectra of A-Alkaline Earth Pyrophosphates, *Journal of Solid State Chemistry*, 23 (1978) 375-382.
- [128] C. Huang, W. You, L. Dang, Z. Lei, Z. Sun and L. Zhang, Effect of Nd³⁺ Doping on Photocatalytic Activity of TiO₂ Nanoparticles for Water Decomposition to Hydrogen, *Chinese Journal of Catalysis*, 27 (2006) 203-209.
- [129] M. Sanchez-Dominguez, G. Morales-Mendoza, M.J. Rodriguez-Vargas, C.C. Ibarra-Malo, A.A. Rodriguez-Rodriguez, A.V. Vela-Gonzalez, S.A. Perez-Garcia and R. Gomez, Synthesis of Zn-Doped TiO₂ Nanoparticles by the Novel Oil-in-Water (O/W) Microemulsion Method and Their Use for the Photocatalytic Degradation of Phenol, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3 (2015) 3037-3047.
- [130] H. Moradi, A. Eshaghi, S.R. Hosseini and K. Ghani, Fabrication of Fe-Doped TiO₂ Nanoparticles and Investigation of Photocatalytic Decolorization of Reactive Red 198 under Visible Light Irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry*, 32 (2016) 314-319.
- [131] D. Sethi and R. Sakthivel, ZnO/TiO₂ Composites for Photocatalytic Inactivation of Escherichia Coli, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 168 (2017) 117-123.

- [132] A. Varma and A.S. Mukasyan, Combustion Synthesis of Advanced Materials: Fundamentals and Applications, Korean Journal of Chemical Engineering, 21 (2004) 527-536.
- [133] R. Ianoş, I. Lazău and C. Păcurariu, The Influence of Combustion Synthesis Conditions on the Al₂O₃ Powder Preparation, Journal of materials science, 44 (2009) 1016-1023.
- [134] A. Daya Mani, B. Rama Raju, N. Xanthopoulos, P. Ghosal, B. Sreedhar and C. Subrahmanyam, Effect of Fuels on Combustion Synthesis of TiO₂ – Towards Efficient Photocatalysts for Methylene Blue Oxidation and Cr (VI) Reduction under Natural Sunlight, Chemical Engineering Journal, 228 (2013) 545-553.
- [135] J. Wang, Y.F. Zhao, T. Wang, H. Li and C. Li, Photonic, and Photocatalytic Behavior of TiO₂ Mediated by Fe, Co, Ni, N Doping and Co-Doping, Physica B: Condensed Matter, 478 (2015) 6-11.
- [136] H. Li, W. Zhang, L.-x. Guan, F. Li and M.-m. Yao, Visible Light Active TiO₂-ZnO Composite Films by Cerium and Fluorine Codoping for Photocatalytic Decontamination, Materials Science in Semiconductor Processing, 40 (2015) 310-318.
- [137] Ö. Kerkez-Kuyumcu, E. Kibar, K. Dayioğlu, F. Gedik, A.N. Akın and Ş. Özkara-Aydinoğlu, A Comparative Study for Removal of Different Dyes over M/TiO₂ (M=Cu, Ni, Co, Fe, Mn and Cr) Photocatalysts under Visible Light Irradiation, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 311 (2015) 176-185.
- [138] S.N.R. Inturi, T. Boningari, M. Suidan and P.G. Smirniotis, Visible-Light-Induced Photodegradation of Gas Phase Acetonitrile Using Aerosol-Made Transition Metal (V, Cr, Fe, Co, Mn, Mo, Ni, Cu, Y, Ce, and Zr) Doped TiO₂, Applied Catalysis B: Environmental, 144 (2014) 333-342.
- [139] X. Ma, L. Xue, X. Li, M. Yang and Y. Yan, Controlling the Crystalline Phase of TiO₂ Powders Obtained by the Solution Combustion Method and Their Photocatalysis Activity, Ceramics International, 41 (2015) 11927-11935.
- [140] J. Niu, S. Suzuki, X. Yi and T. Akiyama, Fabrication of AlN Particles and Whiskers Via Salt-Assisted Combustion Synthesis, Ceramics International, 41 (2015) 4438-4443.
- [141] S. Jalota, A.C. Tasa and S.B. Bhaduri, Microwave-Assisted Synthesis of Calcium Phosphate Nanowhiskers, Journal of materials research, 19 (2004) 1876-1881.
- [142] W. Chen, F. Li, J. Yuan and Y. Li, Novel Salt-Assisted Combustion Synthesis of High Surface Area Ceria Nanopowders by an Ethylene Glycol-Nitrate Combustion Process, Journal of Rare Earths, 24 (2006) 434-439.
- [143] X. Zhang, W. Jiang, D. Song, H. Sun, Z. Sun and F. Li, Salt-Assisted Combustion Synthesis of Highly Dispersed Superparamagnetic CoFe₂O₄ Nanoparticles, Journal of Alloys and Compounds, 475 (2009) L34-L37.
- [144] W. Chen, F. Li and J. Yu, Salt-Assisted Combustion Synthesis of Highly Dispersed Perovskite NdCoO₃ Nanoparticles, Materials Letters, 61 (2007) 397-400.
- [145] A. Nekahi and S. Firoozi, Effect of KCl, NaCl and CaCl₂ Mixture on Volume Combustion Synthesis of TiB₂ Nanoparticles, Materials Research Bulletin, 46 (2011) 1377-1383.
- [146] K.V. Manukyan, S. Aydinyan, K.G. Kirakosyan, S. Kharatyan, G. Blugan, U. Müller and J. Kuebler, Molten Salt-Assisted Combustion Synthesis and Characterization of MoSi₂ and MoSi₂-Si₃N₄ Composite Powders, Chemical engineering journal, 143 (2008) 331-336.

- [147] W. Chen, F. Li, J. Yu, L. Liu and H. Gao, Rapid Synthesis of Mesoporous Ceria–Zirconia Solid Solutions Via a Novel Salt-Assisted Combustion Process, *Materials research bulletin*, 41 (2006) 2318-2324.
- [148] J. Niu, X. Yi, I. Nakatsugawa and T. Akiyama, Salt-Assisted Combustion Synthesis of B-Sialon Fine Powders, *Intermetallics*, 35 (2013) 53-59.
- [149] Y.X. Li, W.F. Chen, X.Z. Zhou, Z.Y. Guan and C.M. Chen, Synthesis of CeO₂ Nanoparticles by Mechanochemical Processing and the Inhibiting Action of NaCl on Particle Agglomeration, *Materials Letters*, 59 (2005) 48-52.
- [150] H. Zhou, M. Nedley and S.B. Bhaduri, Microwave Assisted Solution Combustion Synthesis of Strontium Phosphate (SrP) Whiskers, *Materials Letters*, 116 (2014) 286-288.
- [151] D.E. Wagner, K.M. Eisenmann, A.L. Nestor-Kalinoski and S.B. Bhaduri, A Microwave-Assisted Solution Combustion Synthesis to Produce Europium-Doped Calcium Phosphate Nanowhiskers for Bioimaging Applications, *Acta biomaterialia*, 9 (2013) 8422-8432.
- [152] M. Nabiyouni, H. Zhou, T.J. Luchini and S.B. Bhaduri, Formation of Nanostructured Fluorapatite Via Microwave Assisted Solution Combustion Synthesis, *Materials Science and Engineering: C*, 37 (2014) 363-368.
- [153] G. Nikolić, S. Zlatković and N. Nikolić, Identification and Compatibility of the Major Active Principles in Some New Natural Origin Antiseptics, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 83 (2009) 1612-1616.
- [154] A.-M. FLOREA, A. SÂRBU, T.-V. IORDACHE, S.A. GÂREA, T. SANDU, S. APOSTOL and G. HUBCA, Operational Parameters for the Preparation of Precursor Polymer Matrix Used in Molecular Imprinting.
- [155] H. Unterweger, D. Subatzus, R. Tietze, C. Janko, M. Poettler, A. Stiegelschmitt, M. Schuster, C. Maake, A.R. Boccaccini and C. Alexiou, Hypericin-Bearing Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Selective Drug Delivery in Photodynamic Therapy, *International journal of nanomedicine*, 10 (2015) 6985.
- [156] S. Arabei, T. Pavich, J.-P. Galaup and P. Jardon, Influence of the Nature of Sol–Gel Matrices on Absorption and Fine-Structure Fluorescence Spectra of Hypericin, *Chemical physics letters*, 306 (1999) 303-313.
- [157] V. Sokolova, D. Kozlova, T. Knuschke, J. Buer, A.M. Westendorf and M. Epple, Mechanism of the Uptake of Cationic and Anionic Calcium Phosphate Nanoparticles by Cells, *Acta Biomater*, 9 (2013) 7527-7535.
- [158] J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Gräfe, B. Gitter and M. Epple, Calcium Phosphate Nanoparticles as Efficient Carriers for Photodynamic Therapy against Cells and Bacteria, *Biomaterials*, 30 (2009) 3324-3331.
- [159] R. Docampo and G. Huang, Calcium Signaling in Trypanosomatid Parasites, *Cell calcium*, 57 (2015) 194-202.
- [160] M.L. Gazarini, C.A. Sigolo, R.P. Markus, A.P. Thomas and C.R. Garcia, Antimalarial Drugs Disrupt Ion Homeostasis in Malarial Parasites, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (2007) 329-334.
- [161] D. MALARIOLOGÍA and Y.S. AMBIENTAL, Targeting Calcium Homeostasis as the Therapy of Chagas' Disease and Leishmaniasis-a Review, *Revista de revistas*, 52 (2012).
- [162] J. Barnes, L.A. Anderson and J.D. Phillipson, St John's Wort (*Hypericum Perforatum* L.): A Review of Its Chemistry, Pharmacology and Clinical Properties, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53 (2001) 583-600.

- [163] V.M. Taylor, D.L. Cedeño and S.M. Robledo, Fototerapia Para El Tratamiento De La Leishmaniasis Cutánea, *Infectio*, 15 (2011) 277-288.
- [164] S. Wuyts, D.E. De Vos, F. Verpoort, D. Depla, R. De Gryse and P.A. Jacobs, A Heterogeneous Ru–Hydroxyapatite Catalyst for Mild Racemization of Alcohols, *Journal of catalysis*, 219 (2003) 417-424.
- [165] Z.E. Allouni, P.J. Hol, M.A. Cauqui, N.R. Gjerdet and M.R. Cimpan, Role of Physicochemical Characteristics in the Uptake of TiO₂ Nanoparticles by Fibroblasts, *Toxicol In Vitro*, 26 (2012) 469-479.
- [166] K. Tomankova, J. Horakova, M. Harvanova, L. Malina, J. Soukupova, S. Hradilova, K. Kejlova, J. Malohlava, L. Licman, M. Dvorakova, D. Jirova and H. Kolarova, Cytotoxicity, Cell Uptake and Microscopic Analysis of Titanium Dioxide and Silver Nanoparticles in Vitro, *Food Chem Toxicol*, 82 (2015) 106-115.
- [167] S. Picchiatti, C. Bernini, V. Stocchi, A.R. Taddei, R. Meschini, A.M. Fausto, L. Rocco, F. Buonocore, D. Cervia and G. Scapigliati, Engineered Nanoparticles of Titanium Dioxide (TiO₂): Uptake and Biological Effects in a Sea Bass Cell Line, *Fish Shellfish Immunol*, 63 (2017) 53-67.
- [168] S.M. El-Sheikh, T.M. Khedr, A. Hakki, A.A. Ismail, W.A. Badawy and D.W. Bahnemann, Visible Light Activated Carbon and Nitrogen Co-Doped Mesoporous TiO₂ as Efficient Photocatalyst for Degradation of Ibuprofen, *Separation and Purification Technology*, 173 (2017) 258-268.
- [169] P.W. Koh, M.H.M. Hatta, S.T. Ong, L. Yuliatian and S.L. Lee, Photocatalytic Degradation of Photosensitizing and Non-Photosensitizing Dyes over Chromium Doped Titania Photocatalysts under Visible Light, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 332 (2017) 215-223.
- [170] S. Naghibi, S. Vahed, O. Torabi, A. Jamshidi and M.H. Golabgir, Exploring a New Phenomenon in the Bactericidal Response of TiO₂ Thin Films by Fe Doping: Exerting the Antimicrobial Activity Even after Stoppage of Illumination, *Applied Surface Science*, 327 (2015) 371-378.
- [171] Y. Wang, X. Xue and H. Yang, Modification of the Antibacterial Activity of Zn/TiO₂ Nano-Materials through Different Anions Doped, *Vacuum*, 101 (2014) 193-199.
- [172] C.M. Blumenfeld, B.F. Sadtler, G.E. Fernandez, L. Dara, C. Nguyen, F. Alonso-Valenteen, L. Medina-Kauwe, R.A. Moats, N.S. Lewis, R.H. Grubbs, H.B. Gray and K. Sorasaene, Cellular Uptake and Cytotoxicity of a near-Ir Fluorescent Corrole-TiO₂ Nanoconjugate, *J Inorg Biochem*, 140 (2014) 39-44.
- [173] J. Borovanský and P.A. Riley, Cytotoxicity of Zinc in Vitro, *Chemico-biological interactions*, 69 (1989) 279-291.
- [174] T. Lopez, E. Ortiz, M. Alvarez, J. Navarrete, J.A. Odriozola, F. Martinez-Ortega, E.A. Páez-Mozo, P. Escobar, K.A. Espinoza and I.A. Rivero, Study of the Stabilization of Zinc Phthalocyanine in Sol-Gel TiO₂ for Photodynamic Therapy Applications, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6 (2010) 777-785.
- [175] R. Yin, T. Dai, P. Avci, A.E.S. Jorge, W.C. de Melo, D. Vecchio, Y.-Y. Huang, A. Gupta and M.R. Hamblin, Light Based Anti-Infectives: Ultraviolet C Irradiation, Photodynamic Therapy, Blue Light, and Beyond, *Current opinion in pharmacology*, 13 (2013) 731-762.
- [176] P. Escobar, I.P. Hernández, C.M. Rueda, F. Martínez and E. Páez, Photodynamic Activity of Aluminium (III) and Zinc (II) Phthalocyanines in Leishmania Promastigotes, *Biomedica*, 26 (2006) 49-56.

- [177] A.M. Allahverdiyev, E.S. Abamor, M. Bagirova, C.B. Ustundag, C. Kaya, F. Kaya and M. Rafailovich, Antileishmanial Effect of Silver Nanoparticles and Their Enhanced Antiparasitic Activity under Ultraviolet Light, *International journal of Nanomedicine*, 6 (2011) 2705.
- [178] K. Gardlo, Z. Horska, C.D. Enk, L. Rauch, M. Megahed, T. Ruzicka and C. Fritsch, Treatment of Cutaneous Leishmaniasis by Photodynamic Therapy, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48 (2003) 893-896.
- [179] O.E. Akilov, W. Yousaf, S.X. Lukjan, S. Verma and T. Hasan, Optimization of Topical Photodynamic Therapy with 3, 7-Bis (Di-N-Butylamino) Phenothiazin-5-Ium Bromide for Cutaneous Leishmaniasis, *Lasers in surgery and medicine*, 41 (2009) 358-365.
- [180] O.E. Akilov, S. Kosaka, K. O'Riordan and T. Hasan, Photodynamic Therapy for Cutaneous Leishmaniasis: The Effectiveness of Topical Phenothiaziniums in Parasite Eradication and Th1 Immune Response Stimulation, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6 (2007) 1067-1075.
- [181] J.B.P. Ribeiro, A.L. Miranda-Vilela, D. Graziani, M.R. de Aguiar Gomes, A.A.S. Amorim, R.D. Garcia, J. de Souza Filho, A.C. Tedesco, F.L. Primo and J.R. Moreira, Evaluation of the Efficacy of Systemic Miltefosine Associated with Photodynamic Therapy with Liposomal Chloroaluminium Phthalocyanine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) Amazonensis* in C57bl/6 Mice, *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 13 (2016) 282-290.
- [182] V.M. Taylor, D.L. Cedeño, D.L. Muñoz, M.A. Jones, T.D. Lash, A.M. Young, M.H. Constantino, N. Esposito, I.D. Vélez and S.M. Robledo, In Vitro and in Vivo Studies of the Utility of Dimethyl and Diethyl Carbaporphyrin Ketals in Treatment of Cutaneous Leishmaniasis, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55 (2011) 4755-4764.
- [183] A. Jebali and B. Kazemi, Nano-Based Antileishmanial Agents: A Toxicological Study on Nanoparticles for Future Treatment of Cutaneous Leishmaniasis, *Toxicology in Vitro*, 27 (2013) 1896-1904.