

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales COCIBA

**Evaluación leishmanicida *in vitro* de ciprofloxacina encapsulada
en parches de quitosano y pectina.**

Karen Marcela Calvopiña Esparza

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 17 de mayo de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Evaluación leishmanicida in vitro de ciprofloxacina encapsulada en
parches de quitosano y pectina.**

Karen Marcela Calvopiña Esparza

**Nombre del profesor, Título académico
Nombre del profesor, Título académico**

**Patricio Rojas Silva, M.D., Ph.D.
José Álvarez Barreto, Ph.D.**

Quito, 17 de mayo de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Karen Marcela Calvopiña Esparza

Código: 00334182

Cédula de identidad: 0604621193

Lugar y fecha: Quito, 17 de mayo de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad tropical desatendida causada por parásitos del género *Leishmania* que causa úlceras cutáneas y/o mucocutáneas de quienes lo padecen. Los tratamientos aprobados para esta enfermedad son el antimonio de meglumina y anfotericina B, que presentan limitaciones como la ruta de administración (vía intramuscular e intravenosa, respectivamente), severos efectos secundarios como daño hepático y molestias generales como fiebre y escalofríos. Esto requiere de vigilancia médica constante lo que impide que las poblaciones afectadas no puedan acceder al tratamiento ya que se encuentran en zonas vulnerables con poco acceso a centros de salud. Por lo cual el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia *in vitro* de prototipos de parches de quitosano y pectina cargados con un fármaco leishmanicida experimental con el fin de proponer un posible nuevo tratamiento que sea compatible con las necesidades del paciente. Así se encontró que tanto la ciprofloxacina libre como encapsulada exhiben una actividad leishmanicida a partir de los 2 días de tratamiento debido a la capacidad antiparasitaria del fármaco y la matriz polimérica así como la eficiente encapsulación y liberación de la ciprofloxacina. Asimismo, se encontró citocompatibilidad entre los prototipos de parches y macrófagos murinos RAW 264.7. De esta manera, se encuentra un potencial nuevo tratamiento accesible y compatible con las necesidades de la principal población vulnerable a esta enfermedad.

Palabras clave: leishmaniasis cutánea, ciprofloxacina, parches, quitosano, pectina, macrófagos.

ABSTRACT

Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by the parasite of the genus *Leishmania* that causes ulcers on patients. The approved treatments for this disease are meglumine antimoniate and amphotericin B, which have limitations such as the drug delivery systems (intramuscular and intravenous, respectively), severe side effects including liver damage and general discomfort like fever and chills. This requires constant medical surveillance, which prevents the affected populations from accessing the treatment because of their location with limited access to health care facilities. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the *in vitro* efficiency of prototypes of chitosan and pectin patches loaded with an experimental leishmanicidal drug in order to propose a possible new treatment compatible with the patient's needs. Results revealed that both free and encapsulated ciprofloxacin exhibit leishmanicidal activity after 2 days of treatment due to the antiparasitic capacity of the drug and the polymeric matrix as well as the efficient encapsulation and release of ciprofloxacin. In addition, cytocompatibility was reported between the patch prototypes and murine macrophages RAW 264.7. In this manner, this study was able to propose a potential new treatment that is accessible and compatible with the needs of the main population vulnerable to this disease.

Key words: cutaneous leishmaniasis, ciprofloxacin, patches, chitosan, pectin, macrophages.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	11
2. Métodos.....	14
2.1. Citocompatibilidad de parches con células del sistema inmune.....	14
2.1.1. Elaboración de prototipo de parche.	14
2.1.2. Cultivo celular.....	14
2.1.3. Actividad citotóxica de extracto de hidrogel en RAW 264.7.	14
2.2. Encapsulación y liberación de fármaco con actividad leishmanicida	15
2.2.1. Encapsulación por hinchamiento	15
2.2.2. Encapsulación en proceso de entrecruzamiento	16
2.2.3. Liberación de ciprofloxacina	16
2.3. Actividad leishmanicida de ciprofloxacina encapsulada en matriz polimérica	16
2.3.1. Cultivo de parásitos.....	16
2.3.2. Actividad leishmanicida.....	16
3. Resultados.....	17
3.1. Citocompatibilidad de prototipo de parches con células del sistema inmune.....	17
3.2. Encapsulación y liberación de fármaco con actividad leishmanicida	17
3.3. Actividad leishmanicida de ciprofloxacina encapsulada en una matriz polimérica	18
3.4. Análisis Estadístico ANOVA.....	19
4. Discusión	20
5. Conclusiones	24
6. Tablas	25
7. Figuras	26
8. Referencias.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Indicadores de rendimiento de encapsulación de ciprofloxacina por dos protocolos.	25
Tabla 2. Concentración de ciprofloxacina ($\mu\text{g/mL}$) liberada en el medio de liberación a diferente tiempo y protocolo de encapsulación.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Citocompatibilidad de parches de quitosano:pectina a diferentes concentraciones y relaciones poliméricas en células RAW 264.7.....	26
Figura 2. Perfil de liberación de ciprofloxacina encapsulada en parches al 1% p/v y relación poliomérica quitosano:pectina (50:50).....	26
Figura 3. Actividad leishmanicida en promastigotes de ciprofloxacina encapsulada en parches de quitosano:pectina 50:50 (1% p/v).....	27

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Encapsulación de Anfotericina B.....	31
ANEXO 2: Curva de Calibración ciprofloxacina.....	32
ANEXO 3: Cálculos encapsulación y liberación de ciprofloxacina.....	33
ANEXO 4: Análisis estadístico.....	34

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad endémica en 18 países de Latinoamérica que afecta alrededor de 42 000 personas al año con secuelas importantes como cicatrices desfigurantes. La mayoría de la población afectada son personas de escasos recursos con poco acceso a centros de atención médica, en zonas rurales desatendidas. En donde el tratamiento tradicional, inyecciones intravenosas por 20 días, es escaso, pero sobre todo complicado de administrar sin asistencia de personal de la salud [1].

Esta enfermedad tropical desatendida es causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, el cual ingresa al cuerpo humano mediado por un vector, flebótomos hembra de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* [2]. Una característica importante de este microorganismo es que su ciclo de vida consta de dos fases principales: promastigote, dentro del intestino del vector y al entrar en contacto con el ser humano u otros hospedadores. Y amastigote una vez es internalizado en células como macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, y células dendríticas [3].

En función de las manifestaciones clínicas se diferencia tres tipos de leishmaniasis: visceral, mucocutánea y cutánea; el presente trabajo se centrará en la última. Las principales manifestaciones son úlceras cutáneas acompañadas de lesiones secundarias en la piel y/o linfangitis nodular [2]. Las especies causantes de leishmaniasis cutánea en América son aquellas dentro del grupo "Nuevo Mundo" como *L. mexicana* y *L. braziliensis* [4]. Por lo general, estas lesiones se curan solas, pero el tiempo de cicatrización puede llegar hasta un año, incrementando la probabilidad de desarrollo de infecciones secundarias que contribuyen a la persistencia de leishmaniasis. Asimismo, el paciente se enfrenta con secuelas como cicatrices permanentes que suelen estar en zonas expuestas del cuerpo [5].

El tratamiento principal de esta infección parasitaria son fármacos antimoniales como el antimoniato de meglumina con una dosis de 20 mg/kg durante 21 a 30 días vía intramuscular, si la infección es persistente se requieren 2 o 3 ciclos de tratamiento. Adicional al tiempo de tratamiento este tipo de fármacos presentan desventajas como, la bioacumulación de este en el cabello de pacientes hasta un año después de su uso [6]. En los casos en que el tratamiento con antimoniales no es efectivo, la anfotericina B se presenta como una alternativa para diferentes tipos de leishmaniasis, en especial mucocutánea. La formulación más común de administración es la liposomal, ya que en su forma libre su uso se limita por su alta citotoxicidad, al igual que los antimoniales el régimen de tratamiento es prolongado, pero menor, con una dosis diaria de 3 mg/kg durante 6-7 días [7][8].

Las limitaciones de los tratamientos convencionales generan una necesidad de evaluar tratamientos alternativos menos citotóxicos y prolongados. Así se encontró la posible utilidad de la ciprofloxacina, un antibiótico de amplio espectro de segunda generación de fluoroquinolonas utilizado en humanos para el tratamiento de varias infecciones bacterianas como el cólera, meningitis, entre otras [9], [10]. En el estudio de Romero *et al.*, en 2005, se demuestra la eficacia de la ciprofloxacina *in vitro* en la inhibición de crecimiento del amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* y baja citotoxicidad en macrófagos [11].

Las formas farmacéuticas más comunes de este antibiótico son cápsulas, inyecciones y tabletas, sin embargo, la limitante que presentan es la baja biodisponibilidad, máximo 52%, asimismo, su corta vida media no permite una liberación prolongada del fármaco. Por lo cual la mayoría de ciprofloxacina termina degradada por lisosomas [12] o en el caso de administración oral es degradado por los jugos gástricos debido al metabolismo del primer paso [13] antes de generar un efecto tóxico al microorganismo que se desea tratar.

Una estrategia para resolver el problema de biodisponibilidad es modificar la forma farmacéutica a parches, es decir, por ruta transdérmica que trae ventajas como liberación controlada, mayor biodisponibilidad, menor citotoxicidad ya que disminuye la dosis efectiva y con ello efectos secundarios del fármaco [13], [14]. Asimismo, esta ruta de administración implica un fácil uso de parte del paciente, al ser menos invasiva que inyecciones intramusculares o vía intravenosa, lo que reduce la necesidad de profesionales de la salud.

En la literatura se registran un estudio clínico en donde se evaluó la tasa de curación de parches con óxido nítrico para el tratamiento de leishmaniasis cutánea. A pesar de que la tasa de curación con parches de óxido nítrico es menor que el del control, antimonio de meglumina vía intravenosa, 37.1 % versus 94.8%, en el grupo tratado con parches se evidenció menor frecuencia de eventos adversos y variación de marcadores séricos [15]. De esta manera, el cambio de forma farmacéutica no solo puede incrementar la biodisponibilidad y reducir la citotoxicidad, sino abre la posibilidad de desarrollar tratamientos accesibles para las poblaciones más vulnerables a contraer esta enfermedad infecciosa.

Debido a la potencial eficiencia de parches como matrices de liberación de fármacos, y al ser una forma farmacéutica compatible con las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea y las necesidades de la población afectada se plantea evaluar la eficiencia in vitro de prototipos de parches de quitosano y pectina cargados con un fármaco leishmanicida experimental, ciprofloxacina, en macrófagos murinos RAW 264.7 y el parásito *Leishmania mexicana*. Para ello se propone determinar la citocompatibilidad de parches a diferente concentración y relación polimérica en macrófagos RAW 264.7, encapsular el fármaco y examinar su perfil de liberación en parches de quitosano y pectina, y estimar el efecto leishmanicida de la ciprofloxacina encapsulada en parches.

2. MÉTODOS

2.1. Citocompatibilidad de parches con células del sistema inmune

2.1.1. Elaboración de prototipo de parche.

Los materiales usados en la formulación de parches fueron: quitosano (extraído de cáscara de camarones, grado de desacetilación $\geq 75\%$), marca Sigma-Aldrich, pectina cítrica brasileña de ‘La casa de los Químicos’, acetato de sodio 99%. La elaboración del parche inició con el tratamiento mecánico de los polímeros utilizando un mortero y un pistilo, en dos diferentes relaciones 50:50 y 65:35 (quitosano: pectina) [16]. Se definió trabajar con dos concentraciones poliméricas: 1% y 10% p/v, en ambos el buffer de entrecruzamiento fue acetato de sodio 0.1 N (pH 2). Los parches al 1 % se elaboraron a partir del proceso definido en el Laboratorio de Biomateriales USFQ [16] y colocaron en un plato de 24 pocillos. Los parches al 10% p/v se realizaron de forma directa en un plato de 24 pocillos acorde al protocolo desarrollado en 2022 [17]. Las muestras de parches de ambas concentraciones fueron liofilizadas durante 24 horas.

2.1.2. Cultivo celular.

La línea celular RAW 264.7 (ATCC TIB-71™) macrófagos murinos fue donada por el Dr. Ilya Raskin de la Universidad de Rutgers. El medio de cultivo empleado fue DMEM 1X (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) + GlutaMAX high glucose (Gibco) suplementado con 10% FBS (Sigma/Gibco) y 1% penicilina-estreptomicina (Gibco). El proceso de subcultivo se realizó una vez la confluencia llegó al 80% con el uso de un scrapper para levantar las células. La densidad celular de cultivo es de 1×10^6 células/mL para un flask T25 (volumen de trabajo de 5 mL), pasadas 24 horas se realiza un lavado con PBS 1X y cambio de medio. Las condiciones de mantenimiento fueron de 37°C y atmósfera con 5% CO₂.

2.1.3. Actividad citotóxica de extracto de hidrogel en RAW 264.7.

Los parches autoclavados, se colocaron en 2 mL de medio DMEM suplementado e incubaron a 37°C durante 48 y 72 horas, y se extrajo el sobrenadante como tratamiento de prueba [18]. Se cultivaron 5×10^4 células/mL en un plato de 96 pocillos el cual se incubó por 24 horas permitiendo la adhesión de las células, y se colocaron los tratamientos con las siguientes concentraciones y relaciones poliméricas: 1% 50:50, 1% 65:35, 10% 50:50, y 10% 65:35, como control positivo y negativo se empleó medio suplementado y DMSO 20%, respectivamente. Una vez transcurridas 24 horas, se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sal de tetrazolium MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Para este ensayo se realizó un lavado con PBS 1X previo para eliminar posibles partículas del hidrogel, y se colocó medio fresco con MTT (0.5 mg/mL) acorde al protocolo de Muhammad et al. [19]. El equipo utilizado para la lectura de absorbancia fue Agilent BioTek ELx808 Absorbance Microplate Reader.

2.2. Encapsulación y liberación de fármaco con actividad leishmanicida

Inicialmente se decidió trabajar con el segundo fármaco más utilizado en el tratamiento de leishmaniasis, anfotericina B, sin embargo, por su alto peso molecular e insolubilidad en agua [20] el proceso de encapsulación y liberación no fue eficiente (anexo 1). Para el proceso de encapsulación se definieron dos protocolos, y se optimizó el proceso de elaboración de parches incorporando 30 segundos de homogenización en el proceso de mezcla de los polímeros y el buffer de entrecruzamiento, y, se utilizó el protocolo de formación directa en la placa. La ciprofloxacina utilizada se adquirió de Interpharm en la presentación inyectable al 1%, y Thermo Scientific 98%, este último donado por el Dr. Ilya Raskin de la Universidad de Rutgers.

2.2.1. Encapsulación por hinchamiento

Los hidrogeles formado se colocaron en 18 mL de una solución de ciprofloxacina 300 $\mu\text{g/mL}$ e incuba por 24 horas a 37°C, finalizado el proceso se toma una alícuota del medio de hinchamiento. Se colocó el hidrogel con el fármaco encapsulado en 10 mL de PBS 1X a 37°C.

El porcentaje de encapsulación y masa total del fármaco encapsulada fueron calculadas (anexo 2) (anexo 3) [12].

2.2.2. Encapsulación en proceso de entrecruzamiento

Se siguió protocolo de elaboración de parches previamente mencionado, incorporando el fármaco en el buffer con una concentración final de 300 $\mu\text{g/mL}$, y se permitió la formación del hidrogel. Se calculó masa total de fármaco encapsulada a partir del peso de la muestra (anexo3).

2.2.3. Liberación de ciprofloxacina

Para ambos protocolos de encapsulación se tomó alícuotas de 500 μL durante las 6 primeras horas, 24 y 72 horas, reponiendo el volumen extraído con PBS 1X fresco. Las alícuotas tomadas fueron medidas con el espectrofotómetro UV/vis (Anexo 2).

2.3. Actividad leishmanicida de ciprofloxacina encapsulada en matriz polimérica

2.3.1. Cultivo de parásitos

La especie de parásitos utilizada es *Leishmania mexicana*, donada por la Dra. Vanesa Aduai del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt, la temperatura de mantenimiento fue de 25°C, y el medio usado fue RPMI suplementado con 10% FBS (Sigma/Gibco) y 1% penicilina-estreptomicina (Gibco). El proceso de subcultivo se realizó cuando los parásitos alcanzaron la fase exponencial (20×10^6 parásitos/mL). La densidad de sembrado fue de 20×10^6 parásitos en un flask T25 (volumen de trabajo 10 mL).

2.3.2. Actividad leishmanicida.

El fármaco fue encapsulado en los parches según el protocolo descrito, pasadas las 24 horas, se colocaron en insertos (Uncoated Transwell HTS Insert Plates) con 300 μL de RPMI suplementado. Se cultivó 1×10^6 parásitos/mL en una placa de 24 pocillos (1 mL), y se introdujo los insertos con las muestras en la placa. El tiempo de incubación fue de 12, 48 y 72 horas a 25°C, posterior se toman 3 alícuotas de 200 μL de cada pocillo. La actividad leishmanicida se midió por el ensayo de MTT, acorde al protocolo de Barreiro-Costa [21].

3. RESULTADOS

3.1. Citocompatibilidad de prototipo de parches con células del sistema inmune

La estrategia principal para identificar la citocompatibilidad de una sustancia o matriz con líneas celulares es cuantificar la viabilidad celular respecto a los diferentes tratamientos. En la figura 1 se expone el porcentaje de viabilidad celular respecto a tres factores: concentración polimérica (1 – 10%), relación polimérica (50:50 y 65:35 quitosano:pectina) y tiempo de infusión de los hidrogeles (2 – 3 días). Para el análisis de concentración y relación polimérica se realizaron 4 combinaciones que corresponden a los tratamientos (1% 50:50, 1% 65:35, 10% 50:50 y 10% 65:35), asimismo se incluye el control positivo y negativo.

Al evaluar la respuesta de la viabilidad celular de macrófagos respecto al el tiempo de infusión se encuentra que este no es un factor significativo. Por otro lado, el análisis estadístico revela la interacción entre la concentración y relación polimérica del parche que impacta significativamente en la viabilidad de las células del sistema inmune (anexo 4.1). La mayor viabilidad celular se da cuando el tratamiento corresponde al extracto de hidrogel a 1% p/v y una relación quitosano:pectina 50:50, mientras que los demás tratamientos reducen la viabilidad a menos del 50%.

3.2. Encapsulación y liberación de fármaco con actividad leishmanicida

La figura 2 muestra el porcentaje de masa de ciprofloxacina liberada en función del tiempo hasta las 72 horas con dos diferentes metodologías de encapsulación. La primera corresponde a la encapsulación por hinchamiento posterior a su proceso de elaboración, mientras que el segundo protocolo hace referencia a la incorporación del fármaco durante el proceso de entrecruzamiento de la matriz polimérica. De forma general se observa que ambas curvas son estables y no existen picos que implique una variación anormal en la liberación de ciprofloxacina. Sin embargo, los resultados muestran que hay una diferencia significativa entre

ambos protocolos, en donde la mayor liberación se alcanza cuando el fármaco es encapsulado durante el proceso de entrecruzamiento. A su vez, las curvas y el análisis estadístico muestran que el tiempo de estabilización para ambos protocolos se alcanza a las 24 horas, en el cual también se da la liberación máxima del fármaco (anexo 4.2).

Por otro lado, la tabla 1 muestra la masa encapsulada por cada método demostrando que el protocolo de encapsulación por hinchamiento tiene una masa inicial alrededor de 3 veces mayor respecto al segundo método a pesar de que el porcentaje de encapsulación es bajo (11.3%). En el caso del protocolo de entrecruzamiento no se cuenta con porcentaje de encapsulación ya que el fármaco se coloca directamente en la matriz polimérica. De igual forma, la tabla 2 compara la concentración de ciprofloxacina liberada en el medio, demostrando que la concentración de fármaco es mayor para todos los niveles de tiempo cuando el fármaco es encapsulado por el protocolo de hinchamiento.

3.3. Actividad leishmanicida de ciprofloxacina encapsulada en una matriz polimérica

Una vez el fármaco fue encapsulado se evaluó la efectividad de la ciprofloxacina en la inhibición de crecimiento del parásito *Leishmania mexicana* en donde los resultados del porcentaje de viabilidad del parásito respecto a tres tratamientos: hidrogeles, ciprofloxacina libre (concentración final 30 µg/mL), respectivamente, y ciprofloxacina encapsulada se muestran en la figura 3. Respecto al tiempo de tratamiento los resultados revelan que el tratamiento es significativo a partir de los 2 días. Por otro lado, se observa que tanto el hidrogel como la ciprofloxacina de forma independiente tienen efecto en la inhibición del crecimiento del parásito, con un valor aproximado de viabilidad menor al 80 y 70%, respectivamente. Asimismo, se evidencia que existe una sinergia entre la ciprofloxacina y la matriz polimérica ya que cuando el fármaco está encapsulado la viabilidad del parásito es menor respecto a la ciprofloxacina libre, esto se puede evidenciar en el día 5 del tratamiento (anexo 4.3).

3.4. Análisis Estadístico ANOVA

Todos los valores se presentan como el promedio \pm SD, con $n=3$. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza, ANOVA, con un diseño factorial completo en donde se evaluaron posibles interacciones entre los factores. Para el caso en que existieron más de 2 niveles se utilizó el Modelo Lineal General y la prueba de comparación de pares por Tukey (95% de nivel de confianza). Los resultados se presentan en el Anexo 4.

4. DISCUSIÓN

El limitado acceso al tratamiento de leishmaniasis cutánea impide que las poblaciones más afectadas puedan curarse de manera adecuada, por lo que surge la necesidad de desarrollar soluciones médicas compatibles con las condiciones de vida de estas. Este trabajo propone una alternativa de tratamiento mediante una ruta de administración diferente, parches de quitosano y pectina, con un fármaco con menor frecuencia de efectos secundarios, ciprofloxacina.

El primer paso para evaluar la eficiencia del parche de quitosano y pectina es analizar la citocompatibilidad con la línea celular RAW 264.7, se escoge este tipo de células ya que forman parte del sistema inmune e interactúan con los parásitos al fagocitarlos, cuando la infección ingresa en el hospedador mamífero [22]. La combinación de concentración y relación polimérica que exhibe mayor citocompatibilidad corresponde a 15 p/v y 50:50 quitosano:pectina, esto puede deberse a que esta combinación es la que presenta menor concentración de quitosano respecto a las otras combinaciones. En el proceso de elaboración de los extractos todas las combinaciones, a excepción de la antes mencionada, presentaron un cambio de color en el medio de rojo a una tonalidad amarilla. Esta diferencia se debe a que el la solución se acidificó ya que el medio DMEM cuenta con el compuesto de rojo fenol que es un indicador de pH que cambia hacia la tonalidad amarilla y rosa vibrante cuando el pH se vuelve ácido y alcalino, respectivamente [23].

La dependencia del pH en la viabilidad de macrófagos murinos se ha reportado en el estudio de Wu *et al.*, en donde se observa que en un pH de 6.2 la proliferación celular se desacelera y hay un cambio en la estructura celular hacia formas fusiformes [24]. Las condiciones de pH adecuadas para esta línea celular es de 7.0 a 7.6 [25], por lo que la acidificación del medio llega

a debilitar actividades enzimáticas asociadas a la membrana y citosol, transporte de iones, y síntesis de macromoléculas.

Por otro lado, se decide evaluar la citotoxicidad a los 2 y 3 días ya que en protocolos reportados previamente [18], [19] el tiempo de tratamiento *in vitro* de hidrogeles es en un rango de tiempo de 48 a 72 horas. Respecto a este factor no hay diferencia en el efecto de la viabilidad celular entre ambos tiempos, estudios previos revelan que el nivel de degradación entre 2 y 3 días no es significativamente diferente al analizar el perfil de hinchamiento [16], [17].

En cuanto al protocolo más efectivo para la encapsulación de fármaco es cuando este proceso se da por hinchamiento. Esto se debe que hay una mayor cantidad de masa encapsulada (tabla 1) y la diferencia del porcentaje de masa liberado respecto al protocolo de encapsulación previo al entrecruzamiento es estadísticamente significativo, pero no considerable en el impacto de la concentración del fármaco en el medio.

De hecho, la concentración de ciprofloxacina liberada en el medio es mayor cuando el fármaco es encapsulado mediante el protocolo de hinchamiento como se observa en la tabla 2, lo que implica que el factor de diseño más relevante en el proceso de encapsulación es la cantidad de masa encapsulada. El transporte del fármaco desde la solución de hinchamiento hacia la matriz polimérica es posible debido a que los hidrogeles se caracterizan por la capacidad de absorber soluciones acuosas y retenerlas dentro de la misma sin diluirse en el medio [26].

Además, en el protocolo de adición previo al entrecruzamiento el fármaco al encontrarse encapsulado antes de que el parche sea esterilizado imposibilita el proceso de autoclavado ya que las condiciones altas de presión (1.0-2.0 bar) y temperatura (121-134°C) van a degradar a la molécula [27]. En el caso de la encapsulación por hinchamiento el proceso de esterilización se facilita ya que el hidrogel sin fármaco puede ser autoclavado sin perder sus propiedades, y a su vez el medio de hinchamiento se esteriliza por filtrado a través de una membrana de 0.22

µm [28], eliminando la presencia de microorganismos sin interferir en la conservación del fármaco y la matriz polimérica.

Finalmente, al obtener la combinación de concentración y relación polimérica con mayor citocompatibilidad con macrófagos RAW 264.7 e identificar el protocolo con mayor eficiencia de encapsulación y liberación de la ciprofloxacina fue posible evaluar el efecto leishmanicida de la ciprofloxacina encapsulada en cultivo de parásitos de *Leishmania mexicana* en su fase de promastigotes encontrando que tanto la ciprofloxacina como el prototipo de parche independientemente inhiben el crecimiento *in vitro* del parásito a partir de los 2 días de tratamiento como lo demuestra la figura 3.

La ciprofloxacina exhibe mayor efecto leishmanicida respecto al hidrogel, esto se debe a que la molécula actúa directamente sobre un objetivo celular que son las enzimas topoisomerasas II (TOPII), este hecho se ha comprobado al realizar ensayos de actividad de esta proteína y comprobar su inhibición en presencia de fluoroquinolonas de segunda generación como lo es la ciprofloxacina y enoxacina [29], [30]. Estas enzimas intervienen en el proceso de replicación celular ya que se encargan de la organización del ADN del parásito, tanto nuclear como del organelo conocido como kinetoplasto en donde se encarga de decatenar el ADN en círculos monoméricos cerrados covalentemente [31]. El kinetoplasto es de importancia en el proceso de infección ya que juega un rol fundamental en la carga parasitaria dentro de los macrófagos [32]. De hecho, se ha encontrado que este tipo de fluoroquinolonas tienen una actividad antiparasitaria en otros protozoos como *Toxoplasma gondii* al interactuar con el complejo ADN girasa del apicoplasto [33]. Por otro lado, se evidencia el efecto de quinolonas en la inhibición de varias especies del parásito del género *Trypanosoma* explicado por cambios en la morfología de las mitocondrias [34] e interacciones con sitios de unión de la enzima trans-

sialidasa la cual interviene en la estructura de moléculas de membrana que le permiten ingresar al patógeno a las células del hospedador [35].

Por otro lado, en el caso del quitosano se presume que su capacidad inhibitoria se debe a que fomenta la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) esto se evidencia en el estudio de Yousefi *et al.*, en donde incrementa la concentración de ROS en presencia de nanopartículas de quitosano al 10% y a su vez disminuye la viabilidad de promastigotes de *Leishmania major* [36]. La presencia de estas moléculas causa daños en proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, membranas y organelos que conducen a la activación de procesos de muerte celular [37]. Respecto a la pectina se ha evidenciado su efecto leishmanicida en un estudio donde se combina pectina sin embargo no se encuentra dilucidado su mecanismo de acción pero se presume que este biopolímero interactúa con la membrana celular del parásito [38].

De esta manera, se observa que en el día 5 del tratamiento hay una diferencia significativa (figura 3) ($p < 0.05$) en la inhibición de la viabilidad parasitaria entre la ciprofloxacina encapsulada y su forma libre sugiriendo una sinergia entre el fármaco y la matriz sobre los parásitos lo que se puede atribuir a su actividad leishmanicida independiente y a que el método de encapsulación y liberación del fármaco es eficiente permitiendo que el fármaco llegue desde la matriz polimérica al medio de cultivo.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó la eficiencia *in vitro* de un posible nuevo tratamiento para leishmaniasis cutánea mediante el uso de una fluoroquinolona, ciprofloxacina, encapsulada en un prototipo de parche elaborado a base de quitosano y pectina. Se encontró que existe citocompatibilidad de al menos una combinación de concentración y relación polimérica de los parches, 1 % p/v y 50:50 quitosano:pectina, con macrófagos murinos RAW 264.7 que puede atribuirse a las características inherentes de ambos biomateriales como son la biodegradabilidad y actividad antiinflamatoria. A su vez se estableció un protocolo de encapsulación de ciprofloxacina en parches de quitosano y pectina eficiente y compatible que permitió la liberación controlada del fármaco mediante un proceso de hinchamiento del hidrogel con una solución que contiene el fármaco de interés. Finalmente, se encontró que tanto la ciprofloxacina como la matriz de quitosano y pectina exhiben una actividad leishmanicida de alrededor del 30 y 20%, respectivamente a partir de dos días de tratamiento debido a su incidencia en procesos celulares como inhibición de enzimas y daño a macromoléculas indispensables para la célula que conllevan a la apoptosis. Sin embargo, al combinar ambos componentes: fármaco y matriz polimérica es posible alcanzar una inhibición de hasta el 50% de la viabilidad del parásito en el quinto día del tratamiento como resultado de la sinergia de la ciprofloxacina encapsulada.

6. TABLAS

Tabla 1. Indicadores de rendimiento de encapsulación de ciprofloxacina por dos protocolos.

	Hinchamiento	Entrecruzamiento
Masa encapsulada mg (Desviación estándar)	725,2 ± 78	272,2 ± 44
% encapsulación	11,3 ± 1.2 %	-

Tabla 2. Concentración de ciprofloxacina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) liberada en el medio de liberación a diferente tiempo y protocolo de encapsulación.

Tiempo	Hinchamiento	Entrecruzamiento
1	44,9	23,4
2	46,2	22,0
3	43,0	21,6
4	41,3	21,5
5	40,8	20,2
6	38,9	18,7
24	41,6	18,9
72	52,6	20,4

7. FIGURAS

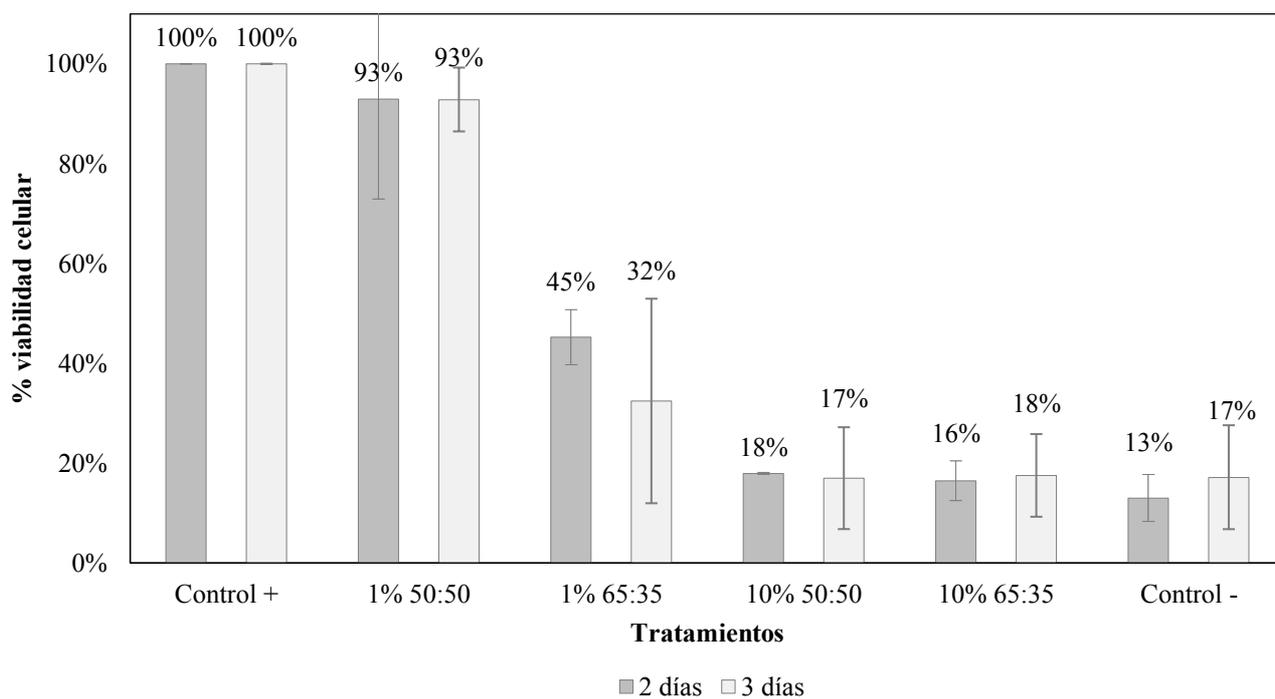


Figura 1. Citocompatibilidad de parches de quitosano:pectina a diferentes concentraciones y relaciones poliméricas en células RAW 264.7.

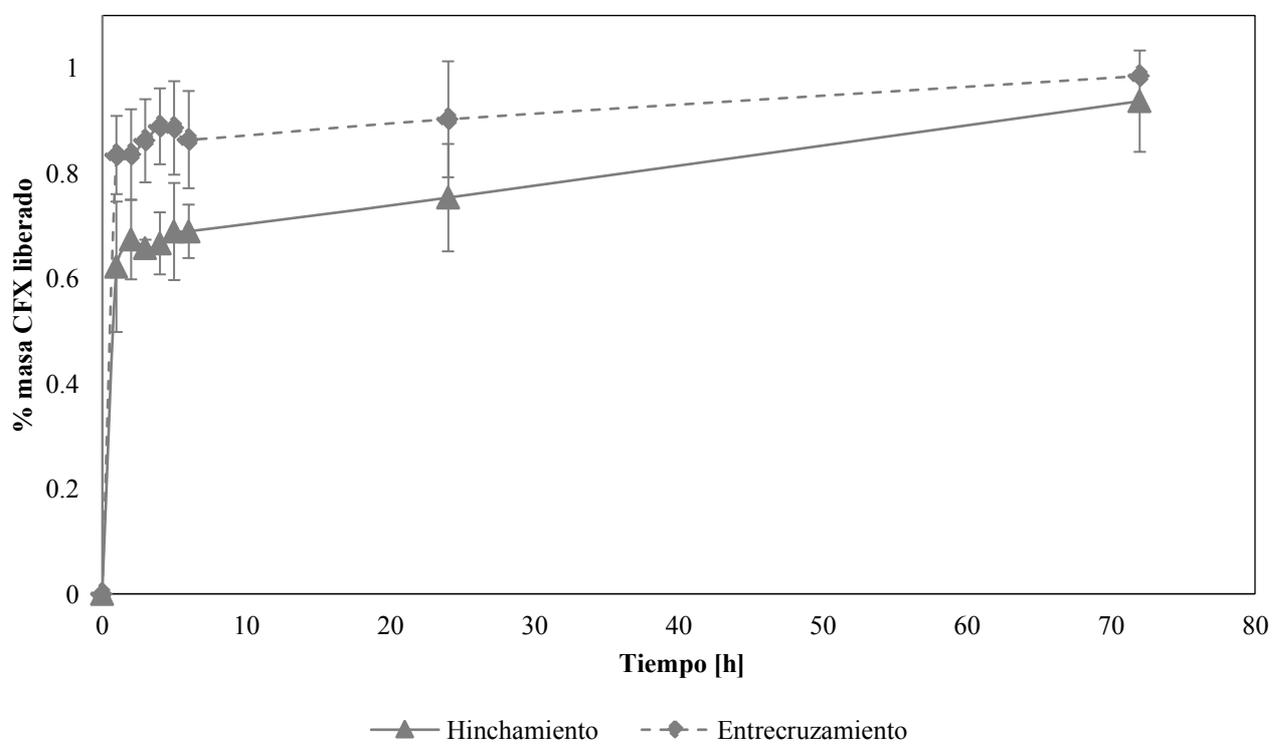


Figura 2. Perfil de liberación de ciprofloxacina encapsulada en parches al 1% p/v y relación poliómica quitosano:pectina (50:50).

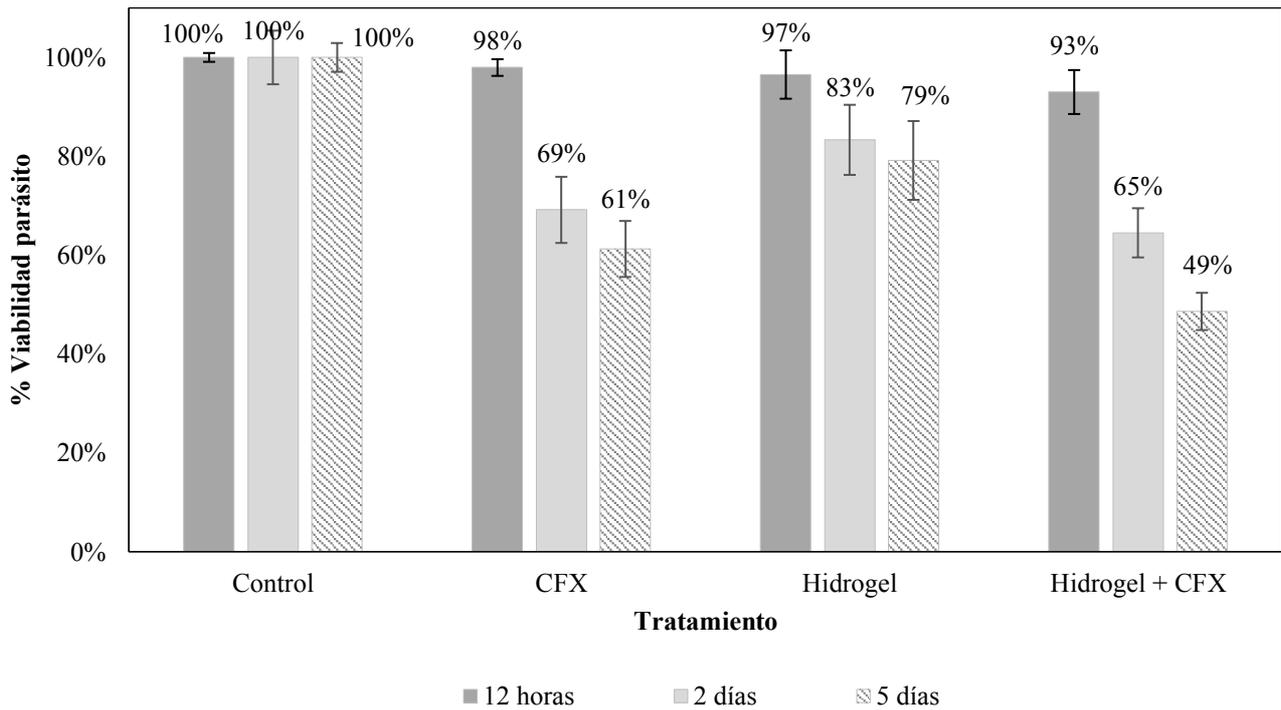


Figura 3. Actividad leishmanicida en promastigotes de ciprofloxacina encapsulada en parches de quitosano:pectina 50:50 (1% p/v)

8. REFERENCIAS

- [1] PAHO, “Four Latin American countries use thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis in vulnerable populations - PAHO/WHO | Pan American Health Organization.” Accessed: Apr. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.paho.org/en/news/18-12-2023-four-latin-american-countries-use-thermotherapy-treat-cutaneous-leishmaniasis#>
- [2] H. J. C. De Vries, H. D. Schallig, H. J. C. De Vries, and H. D. Schallig, “Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments,” *Am J Clin Dermatol*, vol. 23, pp. 823–840, 123AD, doi: 10.1007/s40257-022-00726-8.
- [3] S. H. Ilvia Carvalho *et al.*, “American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment,” 2019, doi: 10.1111/tmi.13210.
- [4] J. Y. Shin, Y. B. Lee, B. K. Cho, and H. J. Park, “New World Cutaneous Leishmaniasis Treated with Intralesional Injection of Pentavalent Antimony,” *Ann Dermatol*, vol. 25, no. 1, p. 80, Feb. 2013, doi: 10.5021/AD.2013.25.1.80.
- [5] B. L. Herwaldt, B. A. Arana, and T. R. Navin, “The Natural History of Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala,” *J Infect Dis*, vol. 165, no. 3, pp. 518–527, Mar. 1992, doi: 10.1093/INFDIS/165.3.518.
- [6] S. H. Carvalho *et al.*, “American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment,” *Tropical Medicine & International Health*, vol. 24, no. 4, pp. 380–391, Apr. 2019, doi: 10.1111/TMI.13210.
- [7] C. M. Wilson and D. O. Freedman, “Antiparasitic Agents,” in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Disease*, Elsevier, 2008, pp. 1488–1506. doi: 10.1016/B978-0-7020-3468-8.50302-3.
- [8] H. I. Al-Mohammed, M. L. Chance, and P. A. Bates, “Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*,” *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49, no. 8, pp. 3274–3280, Aug. 2005, doi: 10.1128/AAC.49.8.3274-3280.2005.
- [9] A. R. Tunkel *et al.*, “2017 Infectious Diseases Society of America’s Clinical Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis,” *Clin Infect Dis*, vol. 64, no. 6, pp. E34–E65, Mar. 2017, doi: 10.1093/CID/CIW861.
- [10] R. L. Guerrant *et al.*, “Practice guidelines for the management of infectious diarrhea,” *Clin Infect Dis*, vol. 32, no. 3, pp. 331–351, 2001, doi: 10.1086/318514.
- [11] I. C. Romero, N. G. Saravia, and J. Walker, “Selective Action of Fluoroquinolones against Intracellular Amastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis* In vitro,” *J Parasitol*, vol. 91, no. 6, pp. 1474–1479, 2005, [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/20059897>
- [12] D. H. Hanna and G. R. Saad, “Encapsulation of ciprofloxacin within modified xanthan gum- chitosan based hydrogel for drug delivery,” *Bioorg Chem*, vol. 84, pp. 115–124, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.BIOORG.2018.11.036.
- [13] D. Ramadan, M. T. C. McCrudden, A. J. Courtenay, and R. F. Donnelly, “Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications,” *Drug Deliv Transl Res*, vol. 12, no. 4, p. 758, Apr. 2022, doi: 10.1007/S13346-021-00909-6.

- [14] O. A. Al Hanbali, H. M. S. Khan, M. Sarfraz, M. Arafat, S. Ijaz, and A. Hameed, "Transdermal patches: Design and current approaches to painless drug delivery," *Acta Pharmaceutica*, vol. 69, no. 2. Sciendo, pp. 197–215, Jun. 01, 2019. doi: 10.2478/acph-2019-0016.
- [15] P. López-Jaramillo *et al.*, "A Controlled, Randomized-Blinded Clinical Trial to Assess the Efficacy of a Nitric Oxide Releasing Patch in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania (V.) panamensis*," *Am J Trop Med Hyg*, vol. 83, no. 1, p. 97, Jul. 2010, doi: 10.4269/AJTMH.2010.09-0287.
- [16] A. Stacey Borja, "Elaboración de hidrogeles en base al entrecruzamiento entre pectina extraída de 3 frutas y quitosano para la liberación controlada de una proteína modelo," Quito, 2019.
- [17] K. Calvopiña, "Parches a base de mecanogeles de quitosano y pectina con potencial aplicación en la encapsulación y liberación de fármacos," Universidad San Francisco de Quito, Quito, 2022. Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/12392>
- [18] M. Yin, S. Wan, X. Ren, and C. C. Chu, "Development of Inherently Antibacterial, Biodegradable, and Biologically Active Chitosan/Pseudo-Protein Hybrid Hydrogels as Biofunctional Wound Dressings," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 12, pp. 14688–14699, Mar. 2021, doi: 10.1021/ACSAMI.0C21680.
- [19] M. A. Raza, Y. M. Lim, S. W. Lee, K. K. Seralathan, and S. H. Park, "Synthesis and characterization of hydrogels based on carboxymethyl chitosan and poly(vinylpyrrolidone) blends prepared by electron beam irradiation having anticancer efficacy, and applications as drug carrier for controlled release of drug," *Carbohydr Polym*, vol. 258, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2021.117718.
- [20] R. Soto, P. Patel, A. B. Albadarin, M. O. Diniz, and S. P. Hudson, "Solubility, aggregation and stability of Amphotericin B drug in pure organic solvents: Thermodynamic analysis and solid form characterization," *J Mol Liq*, vol. 366, p. 120276, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2022.120276.
- [21] O. Barreiro-Costa *et al.*, "Synthesis and Evaluation of Biological Activities of Bis(spiropyrazolone)cyclopropanes: A Potential Application against Leishmaniasis," *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4960, vol. 26, no. 16, p. 4960, Aug. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26164960.
- [22] Y. Goto and H. Mizobuchi, "Pathological roles of macrophages in *Leishmania* infections," *Parasitol Int*, vol. 94, p. 102738, Jun. 2023, doi: 10.1016/J.PARINT.2023.102738.
- [23] PubChem, "Phenol red | C19H14O5S | CID 4766 - PubChem." Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol-red>
- [24] H. Wu *et al.*, "Effects of Environmental pH on Macrophage Polarization and Osteoimmunomodulation," *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 5, no. 10, pp. 5548–5557, Oct. 2019, doi: 10.1021/ACSBBIOMATERIALS.9B01181.
- [25] W. C. Raschke, S. Baird, P. Ralph, and I. Nakoinz, "Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus," *Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 261–267, 1978, doi: 10.1016/0092-8674(78)90101-0.
- [26] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review," *J Adv Res*, vol. 6, no. 2, pp. 105–121, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.JARE.2013.07.006.
- [27] V. R. Sastri, "Material Requirements for Plastics Used in Medical Devices," *Plastics in Medical Devices*, pp. 65–112, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-323-85126-8.00008-4.

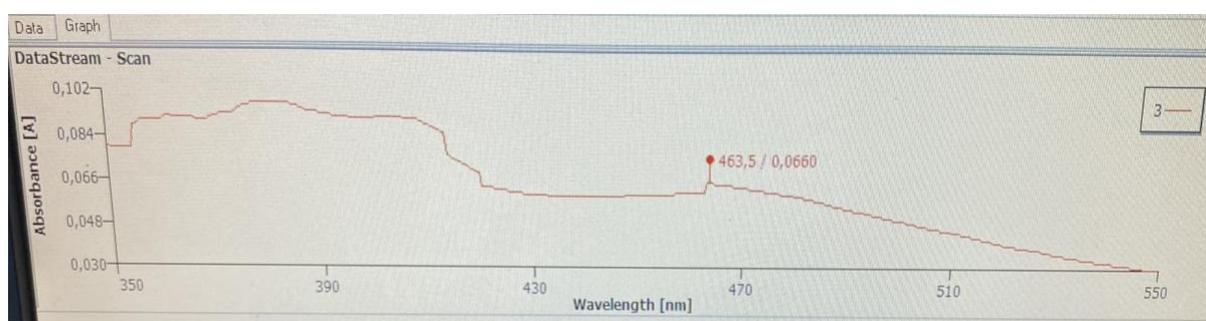
- [28] T. H. Meltzer and M. Jornitz, "The sterilizing filter and its pore size rating," *Am Pharm Rev*, vol. 6, pp. 44–52, May 2003.
- [29] T. M. Cortázar, G. H. Coombs, and J. Walker, "Leishmania panamensis: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine," *Exp Parasitol*, vol. 116, no. 4, pp. 475–482, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.EXPPARA.2007.02.018.
- [30] R. M. Reguera, E. K. Elmahallawy, C. García-Estrada, R. Carbajo-Andrés, and R. Balaña-Fouce, "DNA Topoisomerases of Leishmania Parasites; Druggable Targets for Drug Discovery," *Curr Med Chem*, vol. 26, no. 32, pp. 5900–5923, May 2019, doi: 10.2174/0929867325666180518074959.
- [31] A. K. Chakraborty and H. K. Majumder, "Decatenation of kinetoplast DNA by an ATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate Leishmania donovani," *Mol Biochem Parasitol*, vol. 26, no. 3, pp. 215–224, Dec. 1987, doi: 10.1016/0166-6851(87)90074-0.
- [32] I. C. Yilmaz *et al.*, "Leishmania kinetoplast DNA contributes to parasite burden in infected macrophages: Critical role of the cGAS-STING-TBK1 signaling pathway in macrophage parasitemia," *Front Immunol*, vol. 13, p. 1007070, Nov. 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.1007070/BIBTEX.
- [33] E. S. Martins-Duarte *et al.*, "Ciprofloxacin Derivatives Affect Parasite Cell Division and Increase the Survival of Mice Infected with Toxoplasma gondii," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, May 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0125705.
- [34] G. Hiltensperger *et al.*, "Synthesis and structure-activity relationships of new quinolone-type molecules against trypanosoma brucei," *J Med Chem*, vol. 55, no. 6, pp. 2538–2548, Mar. 2012, doi: 10.1021/JM101439S/SUPPL_FILE/JM101439S_SI_001.PDF.
- [35] M. F. Adasme *et al.*, "Repositioned Drugs for Chagas Disease Unveiled via Structure-Based Drug Repositioning," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 22, pp. 1–22, Nov. 2020, doi: 10.3390/IJMS21228809.
- [36] E. Yousefi *et al.*, "Anti-leishmanial activity of sanguinarine and nano chitosan is modulated by increased ROS production and upregulated TNF- α and iNOS expression," *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 50, pp. 1878–8181, 2023, doi: 10.1016/j.bcab.2023.102725.
- [37] M. Redza-Dutordoir and D. A. Averill-Bates, "Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1863, no. 12, pp. 2977–2992, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2016.09.012.
- [38] G. P. Kothandaraman, V. Ravichandran, C. Bories, P. M. Loiseau, and A. Jayakrishnan, "Anti-fungal and anti-leishmanial activities of pectin-amphotericin B conjugates," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 39, pp. 1–7, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.JDDST.2017.02.010.
- [39] A. P. Perez *et al.*, "Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 139, pp. 190–198, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2015.12.003.
- [40] F. Alexandrino-Junior *et al.*, "A functional wound dressing as a potential treatment for cutaneous leishmaniasis," *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 5, May 2019, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS11050200.

ANEXO 1: Encapsulación de Anfotericina B

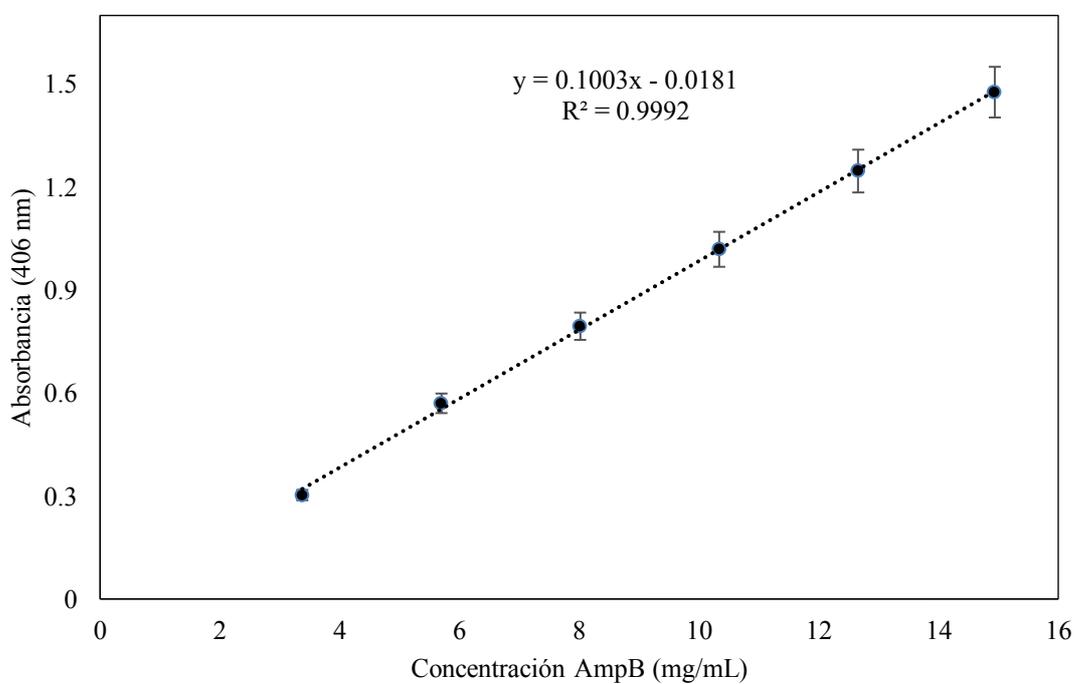
Anexo 1.1. Protocolo de encapsulación

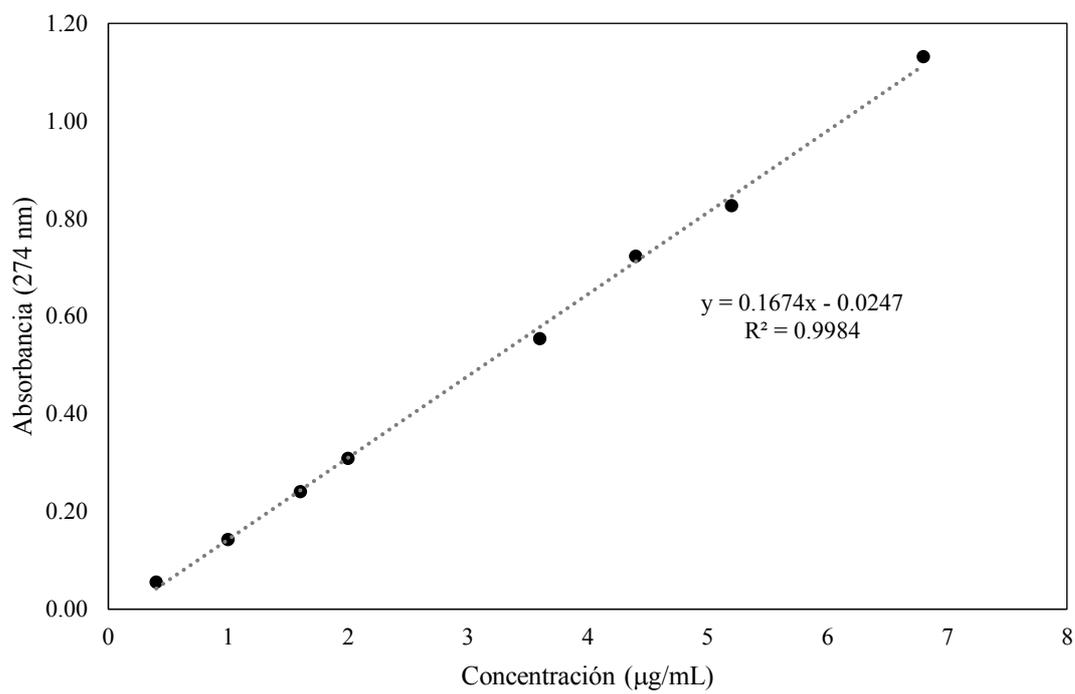
La encapsulación de anfotericina se realizó acorde al protocolo de Alexandrino-Junior *et al.*, y Perez *et al.* mediante la formación de una emulsión con la anfotericina B con el uso de ultrasonido [39], [40].

Anexo 1.2. Curva de absorbancia de liberación de Anfotericina B



Anexo 1.3. Curva de calibración Anfotericina B



ANEXO 2: Curva de Calibración ciprofloxacina

ANEXO 3: Cálculos encapsulación y liberación de ciprofloxacina

La concentración fue medida con la curva de calibración (Anexo 2)

Encapsulación por hinchamiento

- Masa total de ciprofloxacina en hidrogel

$$m_{CFX_{hg}} = (c_i - c_f) \cdot V_h$$

C_i Concentración inicial (solución de hinchamiento)

C_f Concentración final (solución posterior a 24 horas de hinchamiento)

V_h Volumen de hinchamiento

- Porcentaje de encapsulación

$$\% \text{ encapsulación} = \frac{c_i - c_f}{c_i} \cdot 100$$

Encapsulación por entrecruzamiento

- Masa total de ciprofloxacina en hidrogel

$$m_{CFX_{hg}} = c_i \cdot V_h \cdot \frac{m_{hg}}{m_t}$$

C_i Concentración inicial (buffer con fármaco)

V_h Volumen de buffer

m_t Masa total de muestra

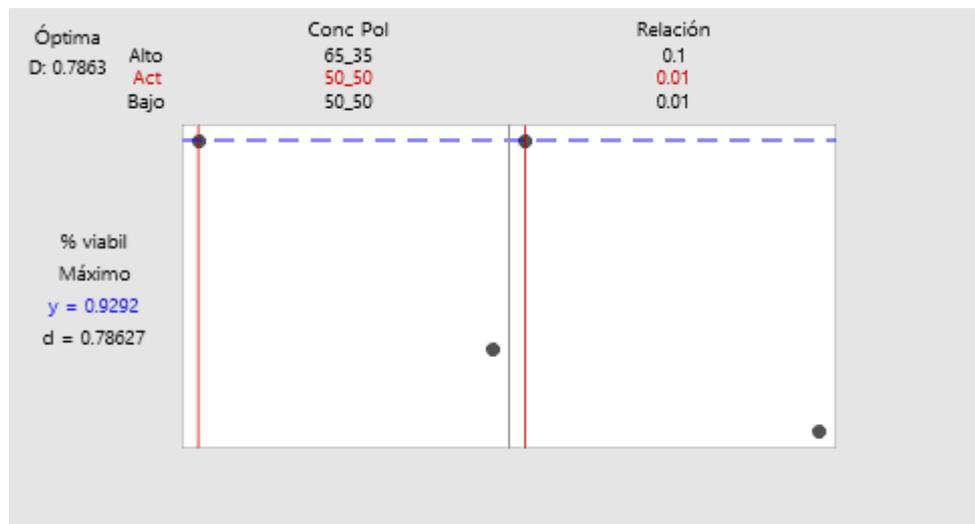
m_{hg} Masa del hidrogel

ANEXO 4: Análisis estadístico

Anexo 4.1: Citocompatibilidad de prototipo de parches con células del sistema inmune

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	4.66075	0.66582	59.12	0.000
Lineal	3	3.75267	1.25089	111.08	0.000
Conc Polimérica	1	0.88292	0.88292	78.40	0.000
Relación pol	1	2.85675	2.85675	253.68	0.000
Tiempo inf	1	0.01300	0.01300	1.15	0.289
Interacciones de 2 términos	3	0.89157	0.29719	26.39	0.000
Conc Polimérica*Relación pol	1	0.87210	0.87210	77.44	0.000
Conc Polimérica*Tiempo inf	1	0.00775	0.00775	0.69	0.412
Relación pol*Tiempo inf	1	0.01172	0.01172	1.04	0.314
Interacciones de 3 términos	1	0.01650	0.01650	1.47	0.233
Conc Polimérica*Relación pol*Tiempo inf	1	0.01650	0.01650	1.47	0.233
Error	40	0.45045	0.01126		
Total	47	5.11120			



Anexo 4.2: Citocompatibilidad de prototipo de parches con macrófagos RAW 264.7

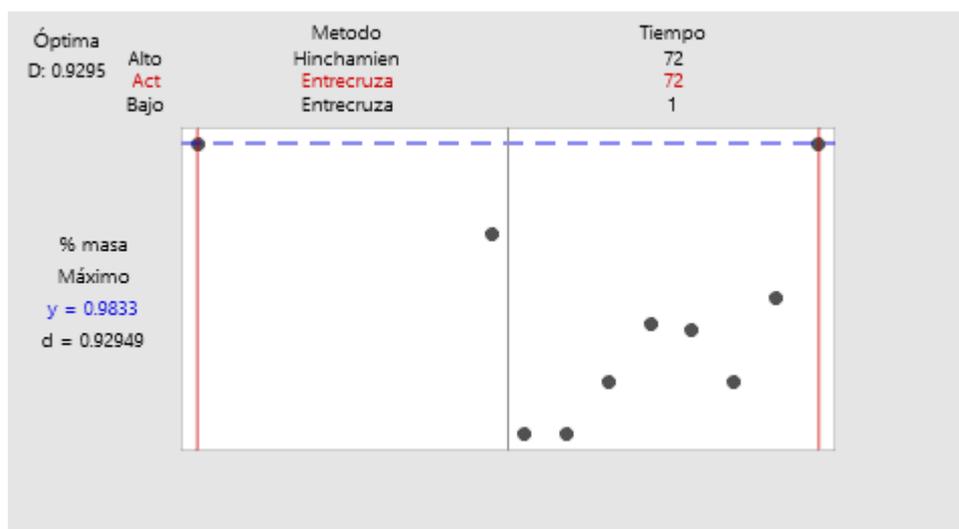
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	15	0.60350	0.040233	5.90	0.000
Lineal	8	0.57024	0.071280	10.46	0.000
Metodo	1	0.35021	0.350208	51.39	0.000
Tiempo	7	0.22003	0.031433	4.61	0.001
Interacciones de 2 términos	7	0.03326	0.004751	0.70	0.674
Metodo*Tiempo	7	0.03326	0.004751	0.70	0.674
Error	32	0.21807	0.006815		
Total	47	0.82157			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo	N	Media	Agrupación
72	6	0.960000	A
24	6	0.828333	A B
5	6	0.786667	B
4	6	0.778333	B
6	6	0.773333	B
3	6	0.758333	B
2	6	0.753333	B
1	6	0.728333	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Anexo 4.3: Actividad leishmanicida de ciprofolxacin encapsulada en una matriz polimérica

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	1.09256	0.099324	57.12	0.000
Lineal	4	0.89993	0.224983	129.38	0.000
Tiempo	2	0.40571	0.202853	116.66	0.000
Hidrogel	1	0.09100	0.091003	52.33	0.000
Ciprofloxacina	1	0.40322	0.403225	231.89	0.000
Interacciones de 2 términos	5	0.18189	0.036378	20.92	0.000
Tiempo*Hidrogel	2	0.02811	0.014053	8.08	0.002
Tiempo*Ciprofloxacina	2	0.14712	0.073558	42.30	0.000
Hidrogel*Ciprofloxacina	1	0.00667	0.006669	3.84	0.062
Interacciones de 3 términos	2	0.01074	0.005369	3.09	0.064
Tiempo*Hidrogel*Ciprofloxacina	2	0.01074	0.005369	3.09	0.064
Error	24	0.04173	0.001739		
Total	35	1.13430			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo	N	Media	Agrupación
12	12	0.975000	A
48	12	0.792500	B
120	12	0.723333	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Prueba t: actividad leishmanicida ciprofolxacin encapsulada y libre a los 5 días de tratamiento

	CFX + hidrogel	CFX
Media	0,486666667	0,613333333
Varianza	0,000433333	0,001033333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,000733333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-5,728715547	
P(T<=t) una cola	0,002298505	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,00459701	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	