



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“CALIDAD POR DISEÑO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA  
NANOENCAPSULACIÓN DE CASIOPEÍNA III-Ia Y LA MEZCLA  
SINÉRGICA DE CASIOPEÍNA III-Ia/CASIOPEÍNA VIII-gly EN  
SISTEMAS NIOSOMALES”**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. ZENAYDA AGUILAR JIMÉNEZ

DRA. LENA RUÍZ AZUARA

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO, FEBRERO DE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“CALIDAD POR DISEÑO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA NANOENCAPSULACIÓN DE CASIOPEÍNA III-Ia Y LA MEZCLA SINÉRGICA DE CASIOPEÍNA III-Ia/CASIOPEÍNA VIII-gly EN SISTEMAS NIOSOMALES”**

**T E S I S**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. ZENAYDA AGUILAR JIMÉNEZ**

DRA. LENA RUÍZ AZUARA

FACULTAD DE QUÍMICA



Ciudad de México 2023

## **Jurado Asignado**

Presidente: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Vocal: Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal: Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

Vocal: Dr. Jorge Humberto Serment Guerrero

Secretario: Dr. Gerardo Leyva Gómez

## **Lugar donde se desarrolló el trabajo**

Laboratorio 210, 05 y 306 Química Inorgánica Medicinal. Departamento de Química Inorgánica y Nuclear. Facultad de Química, UNAM.

UPEAL -bioterio. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco

Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza, UNAM.

### **Congresos y foros donde se ha presentado el trabajo**

-54° Congreso Mexicano de Química, complejo cultural universitario, BUAP, Puebla, México.  
30 de septiembre al 03 de octubre de 2019

-Simposio Virtual de Química Inorgánica Medicinal, Ciudad de México, reunión virtual. Mayo de 2021

- 8° Congreso de la Facultad de Ingeniería Química, UADY, Yucatán, reunión virtual. 29 y 30 de octubre de 2020

- VII Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry, Uruguay, reunión virtual. 06 al 09 de abril de 2021

- International Materials Research Congress, Cancún, México, reunión virtual. 15 al 20 de Agosto de 2021

### **Publicación:**

Aguilar-Jiménez, Z.; González-Ballesteros, M.; Dávila-Manzanilla, S.G.; Espinoza-Guillén, A.; Ruiz-Azuara, L. Development and In Vitro and In Vivo Evaluation of an Antineoplastic Copper(II) Compound (Casiopeina III-ia) Loaded in Nonionic Vesicles Using Quality by Design. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12756. <https://doi.org/10.3390/ijms232112756>



Dra. Lena Ruiz Azuara

**Asesor**



M. en C. Zenayda Aguilar Jiménez

**Sustentante**

## Agradecimientos

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, por el todo el apoyo brindado durante todo este tiempo, por sus consejos, conocimientos compartidos y dirección de esta tesis. Así como su paciencia, por el gran ser humano que es, por apoyar este proyecto con toda su confianza, por ser una inspiración para muchas mujeres.

A los proyectos Ciencias básicas CONACYT 179119 y PAIP 5000-9 por el apoyo económico.

A CONACYT por la beca otorgada en el periodo 2017-II - 2021-II con número de becario 335983.

Al Dr. David Díaz, por la facilidad del uso de sus instalaciones para los estudios de dispersión dinámica de luz y carga superficial, del laboratorio 213, edificio B, Facultad Química, UNAM.

A la Dra. Ma. Josefa Bernad, por permitir realizar los estudios del perfil de liberación, liofilización de muestras y dispersión dinámica de luz, en el laboratorio 002 y 003 del edificio F de la Facultad de Química, UNAM. Gracias por todo su apoyo, consejos y cariño.

Al Dr. Miguel Ángel Méndez, por las pruebas de STEM realizadas en la UDLAP, Puebla.

A la USAI por los estudios de TEM y análisis térmicos.

A la M. en C. Karen Reséndiz por su apoyo con los estudios *in vitro*.

Al M. en C. Mauricio González por su apoyo con los estudios *in vivo*.

Al M. en C. Adrián Espinoza por el apoyo técnico.

Al Dr. Luis Sánchez de la FES Zaragoza y al Dr. Miguel Zavala de la UAM Xochimilco por su apoyo en las pruebas *in vivo*.

Al bioterio de la UAM Xochimilco por proporcionar los ratones BALB/c hembras.

Al comité tutor: Dra. Lena Ruiz Azuara, Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad y el Dr. David Quintanar Guerrero por todos sus consejos, su conocimiento compartido y atenciones.

A los integrantes del laboratorio 210 y 05, por sus consejos, asesorías, ayuda. A todos, gracias.

A los miembros del jurado por su tiempo, comentarios y atención.

## DEDICATORIAS

“Puedes llorar porque se ha ido, o puedes  
sonreír porque ha vivido.  
Puedes cerrar los ojos y rezar para que vuelva  
o puedes abrirlos y ver todo lo que ha dejado;  
tu corazón puede estar vacío  
porque no lo puedes ver,  
o puede estar lleno del amor  
que compartiste...”

*Recuérdame – David Harkins*

A su memoria, gracias, por tanto:

**Margarita Jiménez, Ramón Jiménez, Evelyn Aguilar, Luis Aguilar, Gaby Gálvez,  
Rafa Jiménez**

Dedicada en especial a ti **Amada Juárez**, tan siempre Amada... Gracias por  
siempre esperarme con ansias todas las vacaciones... Te extraño todos los días.

**Los amo**

Gracias, **Eduardo Herrera**

A “Maya”, gracias por tu ayuda.

# Contenido

<b>I Antecedentes</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cáncer</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Metalofármacos</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Casiopeínas</b>	<b>3</b>
1.3.1 Casiopeína III-ia	4
1.3.2 Mezcla sinérgica de Casiopeína III-ia y Casiopeína VIII-gly	6
<b>1.4 Nanoacarreadores en Medicina</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Nanoencapsulación de Casiopeínas</b>	<b>8</b>
<b>1.6 Niosomas</b>	<b>10</b>
<b>1.7- Calidad por diseño</b>	<b>14</b>
1.7.1 Perfil de calidad del producto (QTPPs)	16
1.7.2. Atributos críticos de Calidad (CQAs)	17
1.7.3. Atributos críticos del material (CMAs)	18
1.7.4. Parámetros críticos del proceso (CPPs)	19
1.7.5- Análisis de riesgo	21
1.7.6.- Calidad por diseño: Diseño experimental (DoE)	22
1.7.7 Tecnología de proceso analítico (PAT)	24
1.7.8 Calidad por diseño en metalofármacos	24
<b>Hipótesis</b>	<b>26</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>26</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>26</b>
<b>II Materiales y métodos</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Materiales</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Métodos</b>	<b>30</b>
2.2.1 Calidad por diseño: Análisis de riesgo	30
2.2.1.1 Perfil de calidad del producto (QTPPs)	30
2.2.1.2 Atributos críticos de Calidad (CQAs)	32
2.2.1.3 Parámetros críticos del proceso (CPPs) y atributos críticos del material (CMAs)	33



<b>2.2.2 Formación de los niosomas</b>	<b>34</b>
<b>2.2.3. Calidad por diseño: Diseño experimental</b>	<b>36</b>
2.2.3.1 Diseño Plackett-Burman	36
2.2.3.2 Diseño factorial $2^k$	38
2.2.3.3 Diseño central compuesto (CCD)	40
<b>2.2.4.- Formulación optimizada: Caracterización de niosomas con Casiopeínas</b>	<b>41</b>
2.2.4.1.- Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)	41
2.2.4.2.- Carga superficial	41
2.2.4.3.- Eficiencia de encapsulación (EE)	41
2.2.4.4.- Microscopía electrónica	42
2.2.4.5.- Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	42
2.2.4.6.- Análisis térmico	42
<b>2.2.5.- Estudios de estabilidad física</b>	<b>43</b>
<b>2.2.6.- Estudios de liberación <i>in vitro</i></b>	<b>43</b>
<b>2.2.7. Estudios <i>in vitro</i> en células</b>	<b>46</b>
<b>2.2.8.- Estudios <i>In vivo</i> en ratones BALB/C</b>	<b>46</b>
<b>III RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>3.1- Aplicación de Calidad por Diseño</b>	<b>47</b>
<b>3.1.1 Análisis de riesgo</b>	<b>47</b>
3.1.1.1 Diagrama de Ishikawa	48
3.1.1.2 Matriz de riesgo	53
<b>3.1.2. Diseño experimental</b>	<b>55</b>
3.1.2.1 Diseño Plackett-Burman	55
3.1.2.2 Diseño Factorial	57
3.1.2.2 Diseño Central compuesto	62
<b>3.2. Formulación optimizada de niosomas con Cas III-ia</b>	<b>66</b>
<b>3.3.- Caracterización de la nanoformulación optimizada</b>	<b>71</b>
<b>3.3.1.- Microscopía electrónica</b>	<b>71</b>
<b>3.3.2.- Análisis térmico</b>	<b>74</b>
<b>3.3.3.- Estudios espectroscópicos de FTIR</b>	<b>76</b>
<b>3.3.4.- Estudios de estabilidad acelerada en <i>in vitro</i></b>	<b>77</b>
<b>3.3.5.- Estudios de liberación <i>in vitro</i></b>	<b>79</b>
<b>3.3.6.- Ensayos de citotoxicidad</b>	<b>81</b>

3.3.6.- Ensayos <i>in vivo</i>	83
<i>IV Conclusiones</i>	86
<i>Referencias</i>	88
<b>APÉNDICE 1</b>	<b>104</b>
<b>APÉNDICE 2:</b>	<b>116</b>

# Contenido de Figuras

<b>Figura 1.</b> Versatilidad estructura de los metalofármacos, en función del metal, su estado de oxidación y el ligante utilizado. Modificado de [7].	2
<b>Figura 2.</b> Estructura general de las Casiopeínas® (primera generación).	4
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la Casiopeína III-ia.	5
<b>Figura 4.</b> Principales ventajas de encapsulación de fármacos en sistemas nanoacarreadores.	7
<b>Figura 5.</b> Sistemas nanoacarreadores utilizados para la encapsulación de Casiopeína III-ia.	10
<b>Figura 6.</b> Estructura general de niosomas, a manera de ejemplo se presenta la vesiculación con Span60 y colesterol. Imagen modificada de [49].	11
<b>Figura 7.</b> Esquema de variables múltiples para el diseño de un sistema nanoacarreador..	13
<b>Figura 8.</b> Esquema del resumen de las guías ICH para la implementación de calidad por diseño.	15
<b>Figura 9.</b> Diagrama general de aplicación de calidad por diseño para la formación de nanopartículas, cuyo diseño depende de la aplicación.	16
<b>Figura 10.</b> Frecuencia de CQAs más reportadas en diversos estudios donde se ha aplicado QbD. Modificado de [84].	18
<b>Figura 11.</b> Ejemplos de atributos críticos del material normalmente utilizados en la formación de liposomas, el paclitaxel se utiliza como fármaco de ejemplo.	19
<b>Figura 12.</b> Parámetros críticos del proceso para la formación de nanopartículas poliméricas. Modificado de [82].	20
<b>Figura 13.</b> Pasos secuencias para la obtención de un espacio del diseño que permita obtener productos con la calidad deseada.	21
<b>Figura 14.</b> Estructuras químicas de los compuestos a utilizar para la formación de los niosomas y estructuras químicas de las Casiopeínas.	29
<b>Figura 15.</b> Esquema de estudios de liberación del fármaco, mediante el método de la bolsa de diálisis.	44
<b>Figura 16.</b> Análisis de riesgo mediante un diagrama de Ishikawa, para las variables de entrada de los materiales y los parámetros críticos del proceso sobre los CQAs.	48

<b>Figura 17.</b> Propuesta de formación de los niosomas con Span 60 y colesterol, en presencia de pluronic F127. _____	<b>53</b>
<b>Figura 18.</b> Diagrama de Pareto de efectos estandarizados ( $\alpha=0.05$ ) de tamaño de partícula, PDI, superficie de carga y eficiencia de encapsulación para el diseño Plackett-Burman. __	<b>56</b>
<b>Figura 19.</b> Gráfica de cubos obtenidas a partir del diseño factorial $2^3$ . Donde A) Tamaño de partícula; B) PDI; C) Potencial de carga y D) Eficiencia de encapsulación. _____	<b>58</b>
<b>Figura 20.</b> Gráfica de efectos principales para tamaño de partícula, PDI, superficie de carga y EE. _____	<b>60</b>
<b>Figura 21.</b> Gráfica de interacción del cambio del tamaño de partícula en función de la interacción de dos variables. _____	<b>61</b>
<b>Figura 22.</b> Gráfica de superficie de respuesta para tamaño de partícula, PDI, superficie de carga y eficiencia de encapsulación. _____	<b>63</b>
<b>Figura 23.-</b> Gráfica de contorno superpuesta para variables múltiples (EE y tamaño de partícula), en función de la concentración de Cas III-ia y la concentración S/C/P. _____	<b>65</b>
<b>Figura 24.</b> Gráfica de optimización para las respuestas de los principales CQAs, con las variables de entrada en algún valor para obtener las condiciones de CQAs necesarias. __	<b>67</b>
<b>Figura 25.</b> Posible interacción de la Casiopeína III-ia con los niosomas. Cálculo de la constante de equilibrio a partir del método propuesto por Hao y colaboradores [51]. _____	<b>70</b>
<b>Figura 26.</b> Cálculo de la constante de equilibrio. _____	<b>71</b>
<b>Figura 27.</b> Imágenes de (a) STEM, (b) TEM y c) EDS de la nanoformulación optimizada de niosomas con Cas III-ia y mezcla sinérgica de Cas III-ia/Cas VIII-gly. _____	<b>73</b>
<b>Figure 28.</b> Termogramas de (a) DSC y (b) TGA de Cas III-ia, de niosomas con y sin Cas III-ia. _____	<b>75</b>
<b>Figura 29.</b> Espectros de FTIR de Cas III-ia (línea roja), blanco de niosoma (línea azul) y niosoma con Cas III-ia (línea negra). _____	<b>77</b>
<b>Figura 30.</b> Estudios de estabilidad acelerada (40 °C y 75 % de humedad relativa) para Cas III-ia en niosomas, mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly en niosomas y blanco de niosomas para la formulación optimizada. _____	<b>78</b>
<b>Figure 31.</b> Perfil de liberación del fármaco nanoencapsulado (línea azul) y perfil de liberación Cas III-ia libre (línea roja) (n=3). _____	<b>79</b>
<b>Figura 32.</b> Ajuste realizado de los datos de liberación de la Cas III-ia a partir de los niosomas, a diversos modelos cinéticos. _____	<b>81</b>

**Figura 33.** Ensayos de citotoxicidad en la línea celular MDA-MB-231 tratadas con Cas III-ia, mezcla de Cas III-ia/VIII-gly encapsuladas, no encapsuladas y el blanco de niosomas a diferentes concentraciones a 24 y 48 h de incubación. \_\_\_\_\_ **82**

**Figura 34.** (a) Velocidad de crecimiento tumoral (TGS, por sus siglas en inglés) b) Peso del tumor primario para cada grupo con tratamiento. \_\_\_\_\_ **83**

**Figura 35.** (a) Peso inicial y final de los ratones BALB/C antes, durante y después del tratamiento. b) La toxicidad fue medida con el porcentaje de peso perdido del ratón, que fue un indicativo de toxicidad. Grupos marcados con asterisco fueron estadísticamente significativo (t-student no pareada). \_\_\_\_\_ **84**

**Figura A1.** Espectro de la región Ultravioleta con concentración de 20 ppm en disolución acuosa de la a) Casiopeína IIIia y b) Cas VIII-gly \_\_\_\_\_ **104**

**Figura A2.** Cuantificación de Casiopeína III-ia y Casiopeína VIIIgly, cuando es son pasadas a través de un filtro de PES. Cuantificación mediante espectrofotometría UV n= 3 réplicas con 3 repeticiones. \_\_\_\_\_ **104**

**Figura A3.** Espectro UV de la Casiopeína III-ia y Casiopeína VIII-gly (90  $\mu$ M), mezcla de Casiopeína III-ia/aditivo (90  $\mu$ M/20  $\mu$ M) y mezcla de casiopeína VIII-gly/aditivo (90  $\mu$ M/20  $\mu$ M) en una mezcla de diclorometano:metanol (1:1). \_\_\_\_\_ **105**

**Figura A4.** Espectro Visible de la casiopeína III-ia y casiopeína VIII-gly (3 mM), mezcla de Casiopeína III-ia/aditivo (3.6 mM/0.6 mM) y mezcla de casiopeína VIII-gly/aditivo (3.6 mM/0.6 mM) en una mezcla de diclorometano:metanol (1:1). \_\_\_\_\_ **105**

**Figura A5.** Gráfica de la velocidad de cambio de la masa con respecto a la temperatura para la Casiopeínas III-ia y VIIIgly, con una rapidez de calentamiento de 10  $^{\circ}$ C/minuto bajo atmósfera de nitrógeno. \_\_\_\_\_ **106**

**Figura A6.** Dispersión dinámica de luz para el tamaño de partícula con diferentes aditivos. Concentración total 400  $\mu$ M de Span60:colesterol (1:1, relación molar). El aditivo se utilizó al 5 % de la concentración molar total. \_\_\_\_\_ **107**

**Figura A7.** Curvas de normalidad y de residuos de efectos estandarizados para tamaño de partícula, PDI, carga superficial y eficiencia de encapsulación para el diseño Plackett-Burman. \_\_\_\_\_ **108**

**Figure A8.** Diagramas de Pareto, curvas de normalidad y gráficas residuos de efectos estandarizados ( $\alpha = 0.05$ ) para el diseño factorial  $2^3$ . \_\_\_\_\_ **109**

**Figura A9.** Gráfica de interacción del cambio de eficiencia de encapsulación, carga superficial y PDI, en función de la interacción de dos variables. \_\_\_\_\_ **110**

**Figura A10.** Gráfica de contorno del comportamiento de las respuestas (EE, carga superficial, PDI y tamaño de partícula) en función de dos variables con un valor fijo para una variable.

\_\_\_\_\_ 111

**Figure A11.** Curvas de normalidad y gráficas de residuos de efectos estandarizados ( $\alpha = 0.05$ ) del diseño central compuesto, para tamaño de partícula, superficie de carga, eficiencia de encapsulación y PDI para el diseño central compuesto.

\_\_\_\_\_ 112

**Figura A12.** Gráfica obtenida por dispersión Dinámica de Luz (DLS) de tamaño de partícula en intensidad para la nanoformulación optimizada.

\_\_\_\_\_ 112

**Figura A13.** Formación de micelas a partir del pluronic F127.

\_\_\_\_\_ 113

**Figure A14.** Termogramas de (a) DSC y (b) TGA de CasIII-VIII-gly, de niosomas con y sin Cas VIII-gly.

\_\_\_\_\_ 113

**Figura A15.** Espectros de FTIR-ATR de Cas III-ia (línea roja), blanco de niosoma (línea azul) y niosoma con Cas III-ia (línea negra).

\_\_\_\_\_ 114

**Figura A16.** Espectros de FTIR de Cas VIII-gly (línea roja), blanco de niosoma (línea azul) y niosoma con Cas VIII-gly (línea negra).

\_\_\_\_\_ 114

**Figura A17.** Estudios de estabilidad acelerada a 4 °C para Cas III-ia en niosomas, mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly en niosomas y blanco de niosomas para la formulación optimizada. Las barras marcadas con asterisco fueron estadísticamente significativas (t-student no pareada).

\_\_\_\_\_ 115

**Figura A18.** Gráfica del número de macrometástasis en pulmón y corazón (las barras de error representan el error estándar). A partir de pruebas de t-student se encontró que la Casiopeína III-ia, Niosomas/Cas III-ia y el Cis-pt fueron estadísticamente significativa con respecto al grupo sin tratamiento. (La prueba t-student se llevó a cabo con el error estándar).

\_\_\_\_\_ 115

# Contenido de Tablas

<b>Tabla 1.-</b> Diversos diseños experimentales utilizados para la formación de niosomas con encapsulación de distintos fármacos. _____	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Perfil de calidad del producto para Cas III-ia nanoformulación. _____	<b>30</b>
<b>Tabla 3.</b> Atributos críticos de calidad para la nanoformulación de Cas III-ia y mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly. _____	<b>32</b>
<b>Tabla 4.</b> Diseño Plackett-Burman. Donde: Tamaño de partícula: $Y_1$ PDI: $Y_2$ Carga superficial: $Y_3$ Eficiencia de encapsulación: $Y_4$ . Donde S/C/P es Span60/colesterol/Pluronic F127. ____	<b>37</b>
<b>Tabla 5.</b> Condiciones para la formación de los niosomas en el diseño factorial $2^3$ . _____	<b>38</b>
<b>Tabla 6.</b> Diseño factorial y diseño central compuesto para la optimización de la nanoformulación de la Cas III-ia. Tamaño de partícula: $Y_1$ PDI: $Y_2$ Carga superficial: $Y_3$ Eficiencia de encapsulación: $Y_4$ . Donde S/C/P es Span60/colesterol/Pluronic F127. _____	<b>39</b>
<b>Tabla 7.</b> Variables fijas en un valor categórico o continuo, de acuerdo con estudios previos y bibliografía. _____	<b>49</b>
<b>Tabla 8.</b> PDI, potencial zeta y tamaño de partícula para los sistemas niosomales obtenidos con diversas moléculas. . _____	<b>52</b>
<b>Tabla 9.</b> Análisis de riesgo basado en atributos críticos del material _____	<b>54</b>
<b>Tabla 10.</b> Análisis de riesgo basado en parámetros críticos del proceso _____	<b>54</b>
<b>Tabla 11.-</b> Condiciones para la formación de los niosomas durante el diseño factorial $2^3$ _	<b>57</b>
<b>Tabla 12.</b> Ecuaciones de regresión de unidades no codificados obtenidas a través del diseño central compuesto. _____	<b>64</b>
<b>Tabla 13.</b> Condiciones óptimas de preparación de la nanoformulación de niosomas con Cas III-ia optimizada. _____	<b>67</b>
<b>Tabla 14.</b> Tamaño de partícula, EE, potencial zeta y PDI de la nanoformulación optimizada de niosomas con y sin Cas III-ia (n = 3). _____	<b>68</b>
<b>A2. Tabla 1.</b> Resultados de ANOVA de unidades codificadas, del diseño factorial $2^3$ , para tamaño de partícula, índice de polidispersidad, superficie de carga y eficiencia de encapsulación, para niosomas con Cas III-ia. _____	<b>116</b>

**A2. Tabla 2.** Resultados de ANOVA de unidades codificadas para tamaño de partícula, PDI, carga superficial y eficiencia de encapsulación para niosomas con Cas III-ia para del diseño central compuesto. \_\_\_\_\_ **118**



## RESUMEN

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte en América. Uno de los fármacos más utilizados para su tratamiento es el cis-Pt, dada su alta efectividad; no obstante, también produce severos efectos adversos. Inspirados en el cis-Pt, se han desarrollado metalofármacos usando metales endógenos que tengan una alta efectividad con una baja toxicidad. Un ejemplo son las Casiopeínas, las cuales son compuestos de coordinación de cobre quelatos mixtos que han mostrado actividad en diversas líneas tumorales. La Casiopeína III-ia (Cas III-ia) destaca entre este grupo y actualmente se encuentra aprobada para entrar en fase clínica I. Debido a que, en estudios farmacocinéticos preclínicos, se encontró que la Cas III-ia tiene una baja concentración sanguínea y una alta unión a proteínas en plasma humano, se ha propuesto su encapsulación en sistemas vesiculares, como son los niosomas. Estos nanoacarreadores, presentan distintas variaciones en su formulación, lo que puede propiciar una alta influencia en respuestas de interés biológico como tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación. En este sentido, el uso de herramientas involucradas en calidad por diseño (QbD, por siglas en inglés) genera productos repetibles y reproducibles que sean seguros y eficaces, por lo que su empleo en la nanoformulación resulta de interés. En este trabajo, se presenta la nanoencapsulación de la Casiopeína III-ia y la mezcla sinérgica de Cas III-ia/VIII-gly en sistemas niosomales utilizando herramientas involucradas en QbD. Lo anterior, con el objetivo de poder optimizar una formulación para la administración por vía intravenosa de la Casiopeína III-ia y la mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly. Se realizó un análisis de riesgo para identificar los factores que podían tener impacto en la nanoformulación. Con las variables obtenidas se realizaron diseños experimentales lo que permitió obtener una formulación optimizada, repetible y reproducible. Dicha nanoformulación fue caracterizada por diversas técnicas espectroscópicas, térmicas, y mediante microscopia se observaron sistemas esféricos. La Casiopeína III-ia encapsulada presentó una liberación modificada bifásica gobernada por difusión, lo anterior, coincide con los resultados obtenidos en una línea tumoral de cáncer de mama metastásico donde se observó que la Cas III-ia encapsulada presentó una mayor actividad a las 48 h de incubación del compuesto en comparación con 24 h de tratamiento. Además, en los estudios *in vivo*, se observó que la Cas III-ia encapsulada muestra una menor toxicidad, respecto al cis-Pt y la Cas III-ia no encapsulada, y se encontró que la Cas III-ia encapsulada mantenía la actividad de la Cas III-ia. Las condiciones óptimas obtenidas mediante QbD podrían mejorar el proceso de escalamiento industrial y se presenta una formulación optimizada repetible y reproducible.

# I Antecedentes

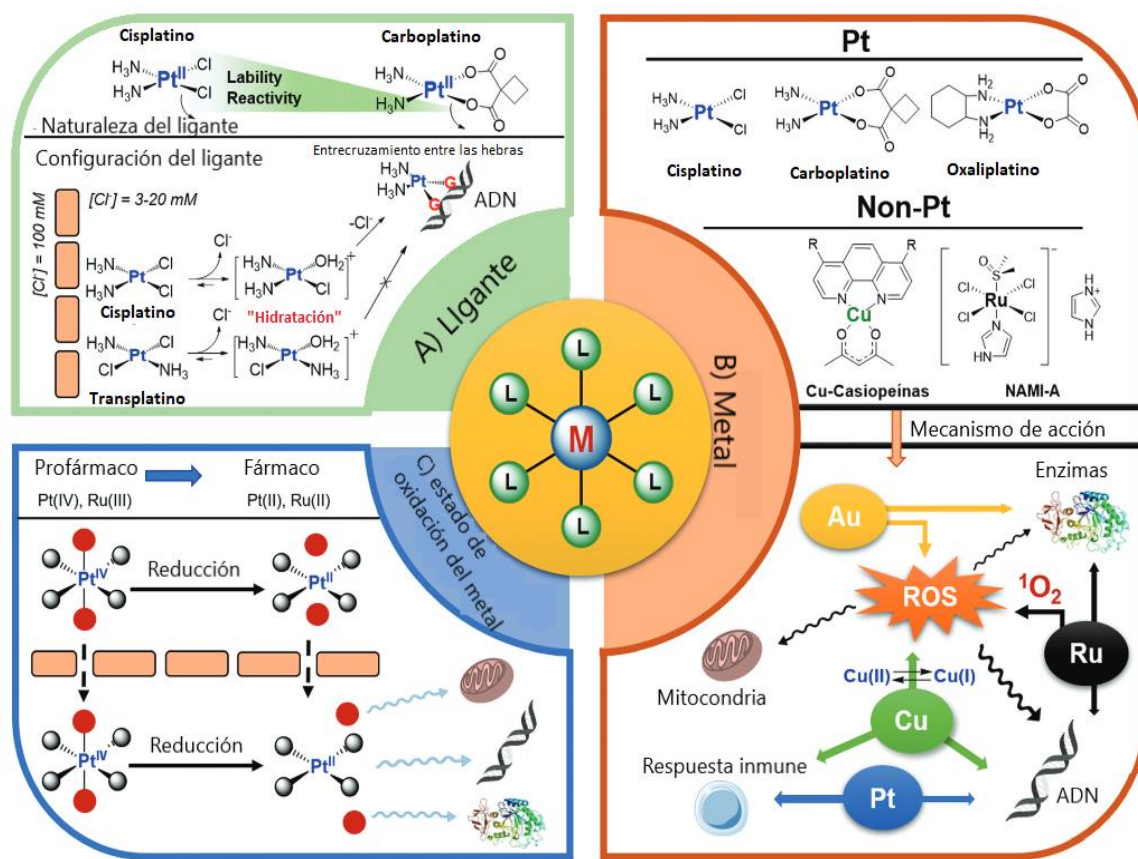
## 1.1 Cáncer

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se trata de un proceso de diseminación incontrolados de células y puede aparecer en cualquier parte del organismo. Según la Organización Mundial de la Salud, es la segunda causa de muerte en América. En el 2020 fueron diagnosticadas cerca de 4 millones de personas causando la muerte de 1.4 millones [1]. El perfil oncológico del Instituto Nacional de Estadística y Geografía publicado en 2020 mostró que para México, en 2019, se tuvo un total de 747, 784 defunciones por cáncer, siendo el 49 % de los casos en hombres y el 51 % en mujeres [2]. El tratamiento de este grupo de patologías consiste en cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia que generalmente son usadas en combinación o solas, dependiendo del tipo de cáncer a tratar. Para el caso específico de la quimioterapia existe un amplio grupo de compuestos citotóxicos, citostáticos y antineoplásicos que son usados en función del tipo de tumor a tratar. El propósito de este tratamiento es prevenir que las células cancerígenas se multipliquen, invadan, produzcan metástasis y la muerte del paciente [3,4]. Entre los compuestos utilizados se encuentran la doxorubicina, 5-fluoracil, paclitaxel y cis-Pt, siendo este último de los fármacos más usados en la clínica dada su alta efectividad. No obstante, también presenta diversos efectos adversos como ototoxicidad, nefrotoxicidad y anormalidad visual [5]. Además, se ha visto que diversos fármacos antitumorales pueden causar hipersensibilidad y resistencia celular. Es por lo anterior, que es necesario la búsqueda constante de nuevas opciones. En este sentido, en las últimas décadas se ha desarrollado un interés especial por moléculas que contengan metales en su estructura, llamados metalofármacos, inspirados en la alta efectividad del cis-Pt.

## 1.2 Metalofármacos

Se estima que el uso del Cis-Pt es alrededor del 50-70 % en los tratamientos de diversos tipos de cáncer. La razón por la cual los compuestos de platino, y de base metálica, podrían tener una amplia efectividad en diversos tumores, es la versatilidad estructural que poseen los metalofármacos. Entre las características principales de estos compuestos, se encuentran su capacidad de adaptar y modular sus propiedades de acuerdo con el ligante utilizado, el metal y el número de oxidación del metal, lo que les permite tener una ventana de actividad potencial. Además, el ligante y la

configuración de éste en torno al ion metálico permite modular las características fisicoquímicas y biológicas de los compuestos. Se ha visto que el diseño estructural de los metalofármacos, pueden tener diferentes dianas terapéuticas y de este modo obtener múltiples enfoques para el tratamiento del cáncer. En este sentido, se han reportado el uso de diversos compuestos de coordinación de metales como Ru, Au, Fe, Ti, Ir, Pd, Ga y Cu con diferentes combinaciones de ligantes, que han presentado actividad en diversas líneas tumorales [6,7]. En la Figura 1, se reúnen las ventajas que pueden ofrecer los metalofármacos en el tratamiento del cáncer, dada su versatilidad estructural.

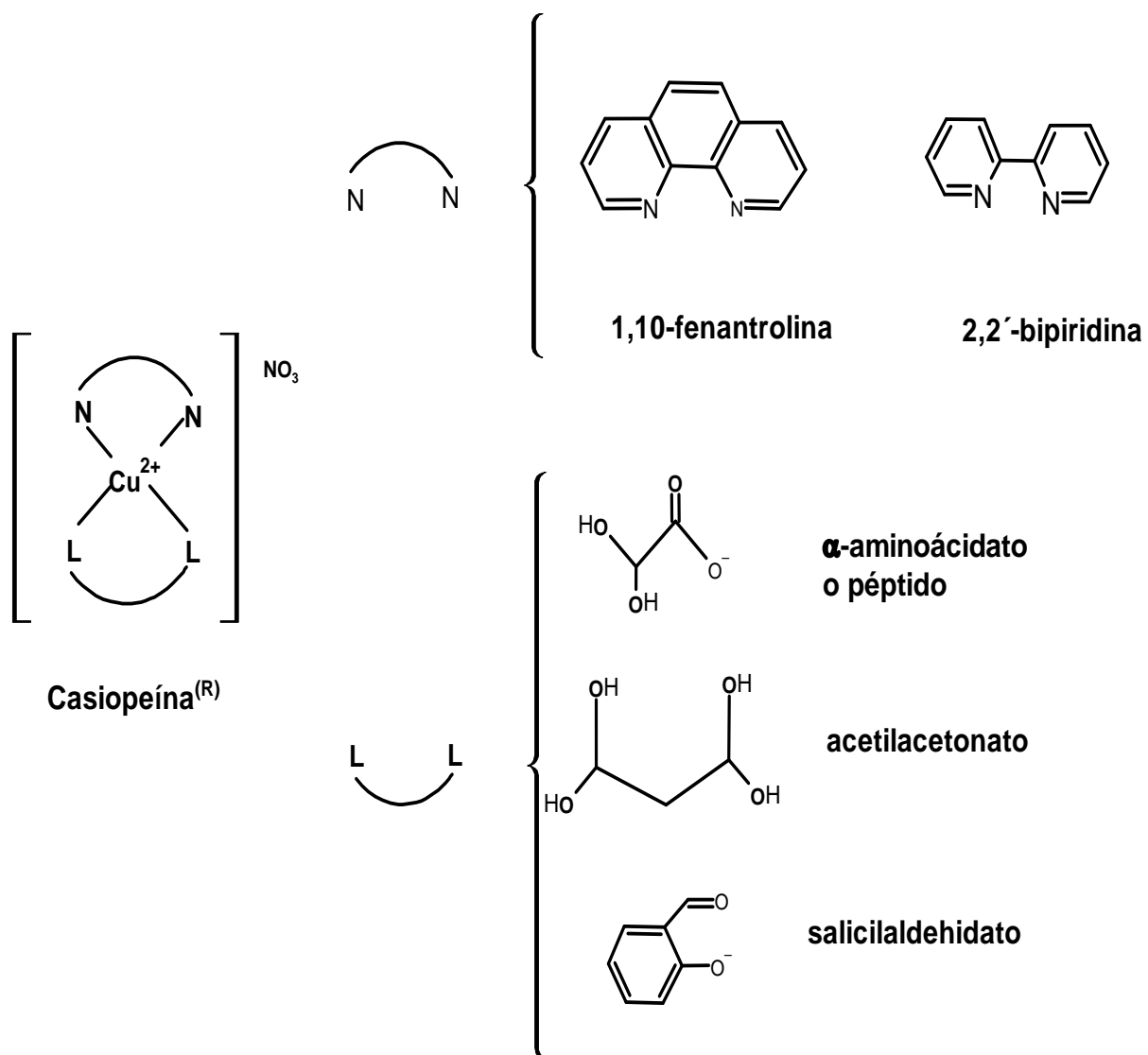


**Figura 1.** Versatilidad estructural de los metalofármacos, en función del metal, su estado de oxidación y el ligante utilizado. Modificado de [7].

El uso de un metal endógeno, como el cobre (II), en metalofármacos ha resultado de interés como agente quimioterapéutico debido a que se ha reportado que tiene la habilidad de tener múltiples dianas terapéuticas. Los primeros compuestos con actividad antitumoral reportados de cobre en su estructura fueron los Casiopéínas [6–8].

### 1.3 Casiopeínas

Las Casiopeínas son compuestos de coordinación de cobre (II), quelatos mixtos, que contienen un primer ligante de diiminas aromáticas (bipiridina o fenantrolinas) como ligante primario y un segundo ligante mono cargado que pueden ser donadores de O-O u O-N (para la primera generación) (Figura 2), ligantes neutros (segunda generación) y recientemente, se han desarrollado Casiopeinas cuyo ligante secundario son moléculas mono cargadas con actividad inherente, como indometacina y curcumina (tercera generación) [9,10]. Las Casiopeínas han sido sintetizadas por el grupo de investigación encabezado por la Dra. Lena Ruiz Azuara, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estos compuestos han presentado una amplia actividad en células tumorales de ratón como melanoma B16, glioma C6 y leucemia y en células tumorales humanas como colon (HCT-15), cervicouterino (HeLa, -SiHa), mama (MCF-7, MDA-MB-231), pulmón (A549, H157 and SKL-U), neuroblastoma CHP212, SK-N-SH, -CaSki, C33-A, CaLo, InBI y células de carcinoma de pulmón A549 and H157 y glioblastoma multiforme de Lewis, siendo citostáticas, citotóxicas y genotóxicas. Además, han mostrado actividad en pruebas *in vivo* en la reducción tumoral de la línea HCT-15 (cáncer colorrectal) [11–16]. El mecanismo de acción propuesto es mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, daño mitocondrial e interacción con el ADN [6]. Todas las Casiopeínas sintetizadas presentan diversas variaciones, lo que les confiere diferentes propiedades electroquímicas, lipofílicas y estructurales, que se ha comprobado mediante estudios de estructura-actividad, tanto cualitativas como cuantitativas, modula su actividad biológica en diversas líneas celulares de cáncer. Entre este grupo destacan la Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia, siendo esta última ya aprobada en México para entrar en fase clínica I, debido a que presenta una menor toxicidad en comparación con sus análogos más activos, de acuerdo con estudios preclínicos [17].

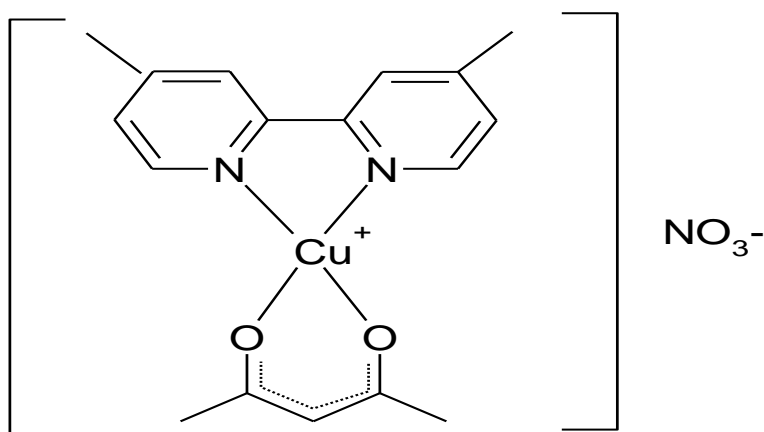


**Figura 2.** Estructura general de las Casiopeínas<sup>®</sup> (primera generación).

### 1.3.1 Casiopeína III-ia

La Casiopeína III-ia (Figura 3) con fórmula  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-1,10-bipiridina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , es un polvo fino de color azul claro, con peso molecular de 444.93 g/mol, coeficiente de partición de 0.358, un pKa de 8.25 y log D de -0.95. En condiciones ambientales es soluble en agua, metanol y suero glucosado a pH 7.4. En un estudio realizado en buffer de fosfatos (pH 7.4 y 64 mM a 37 °C) durante 12 horas, no se observó inestabilidad del compuesto. Por medio de análisis termogravimétrico se observó una pérdida de masa del 1.18 % con respecto al 100 %, a una temperatura de 60 °C, que corresponde a las dos moléculas de agua,

así como dos pérdidas más de masa, una a 220 °C y otra a 440 °C, correspondiente al acetilacetionato. Se trata de un compuesto paramagnético con un electrón desapareado, lo que indica que el centro metálico de cobre se encuentra en estado de oxidación II. Es electrólito 1:1, tratándose de un complejo catiónico con una molécula de nitrato como contra ion [18,19]. De acuerdo con la difracción de rayos X, la Casiopeína III-ia cristaliza en un sistema tricíclico en donde el ion Cu (II) se encuentra en una geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsiona. La base de la pirámide está constituida por los átomos donadores N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> de la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridiina y los átomos de O<sub>1</sub> y O<sub>2</sub> del acetilacetionato (O-O), mientras que la posición apical está ocupada por un átomo de oxígeno de una molécula del contra ion NO<sub>3</sub> [20]. De acuerdo con estudios de estabilidad en estado sólido, la Casiopeína III-ia no presenta productos de degradación a 40 ± 2 °C y humedad relativa de 75 ± 5 %, mientras que en disolución es estable a la fotólisis, hidrólisis básica y oxidación en estudios realizados durante 24 horas [21].



**Figura 3.** Estructura química de la Casiopeína III-ia.

La Casiopeína III-ia ha mostrado actividad en líneas tumorales de cáncer cervicouterino, mama y colon, además se ha visto que son menos tóxicas en comparación con sus análogos con fenantrolinas o el cis-platino. Al realizar estudios de la Casiopeína III-ia en el modelo de ratón xenotransplantado (nu/nu) con HCT-15, se observó un incremento en el retraso del volumen tumoral relativo, así como el tiempo de duplicación del tumor [22]; mientras que al evaluar el margen terapéutico de seguridad verdadero en perros se encontró en un intervalo de 4.7 a 23.6 mg/m<sup>2</sup> [23]. Se ha observado que una dosis única de Cas III-ia de 3 mg/kg mediante vía intravenosa en ratas sanas induce daño hemolítico a las 24 h posterior al tratamiento, siendo este daño completamente reversible a los 21 días[24]. A través de estudios farmacocinéticos, se encontró que tanto en ratones como en conejos el área bajo

la curva de concentración de la Casiopeína III-ia fue baja, con altos volúmenes de distribución, dada la baja concentración sanguínea. Se observó que el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) en ratas Wistar fue de 12.46 h [25]. Cuando se evaluó la unión a proteínas mediante estudios *in vitro* en plasma humano, se observó que, a menores concentraciones del compuesto, la unión a proteínas aumentaba hasta un  $89.1 \pm 1.9 \%$ , lo que sugiere un número limitado de sitios de unión que se encuentran disponibles para fijar el compuesto; además al aumentar la concentración de la Casiopeína se aumenta la concentración libre del compuesto [25]. Dadas las características fisicoquímicas, la farmacocinética preclínica y su actividad en líneas tumorales, se ha propuesto la nanoencapsulación de la Casiopeína III-ia.

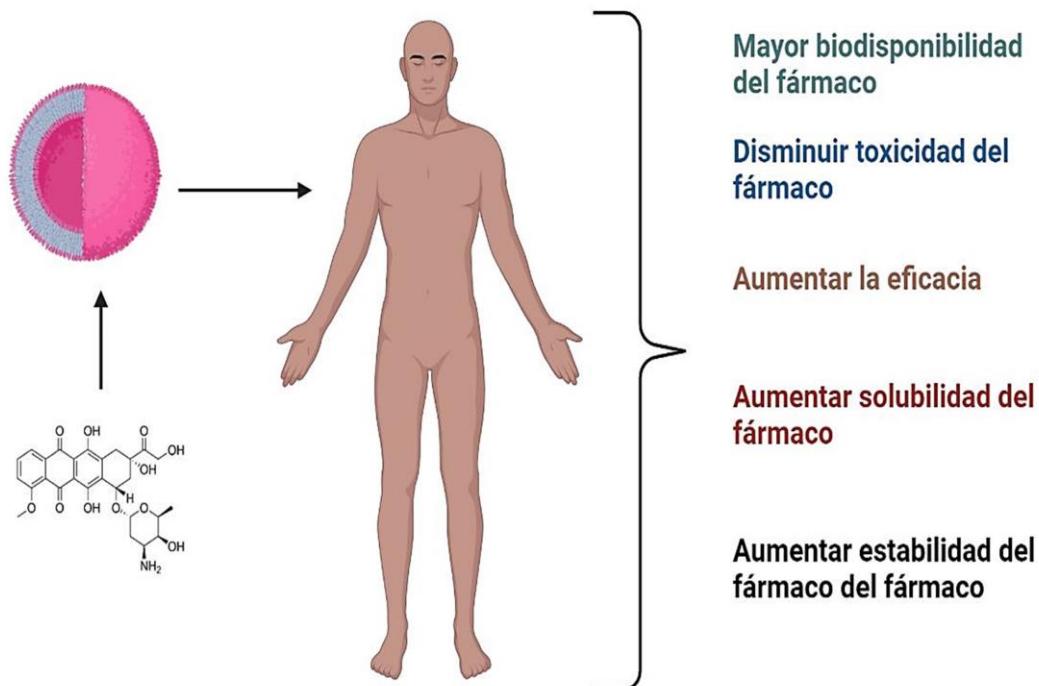
### 1.3.2 Mezcla sinérgica de Casiopeína III-ia y Casiopeína VIII-gly

En 2017, Dávila realizó un análisis fraccional e isoblográfico en células de adenocarcinoma cervicouterino, con el objetivo de establecer si la combinación de Cas III-ia con otros compuestos (sus análogos más activos o fármacos usados en clínica) podían mantener el 50 % de su actividad antiproliferativa con una disminución de la concentración molar de ambos. Se encontró que los compuestos con fenantrolinas tetrametiladas (Cas VIII-gly y Cas III-Ma) presentaron interacciones superaditivas, disminuyendo la concentración empleada de Cas III-ia desde 41.74 hasta 4.59  $\mu\text{M}$  cuando fue combinada con Cas VIII-gly [26]. De acuerdo con los resultados, es de interés evaluar el efecto sinérgico en combinación con nanoacarreadores, para observar si existe una menor toxicidad cuando esta combinación se encuentra encapsulada.

## **1.4 Nanoacarreadores en Medicina**

Los sistemas nanotecnológicos son sistemas coloidales que comprende un rango de tamaño de partícula de 10 a 100 nm [27]; no obstante, en su aplicación en nanomedicina, el tamaño de partícula puede comprender todo el rango nanométrico debido a que su eficacia no depende únicamente del tamaño de partícula [28]. El amplio uso de los nanoacarreadores en medicina es debido a que son capaces de transportar fármacos de bajo y alto peso molecular, así como macromoléculas, genes o proteínas. Estos sistemas pueden proteger al fármaco de la degradación, reducir el aclaramiento renal, incrementar el tiempo de vida media en el flujo sanguíneo y proveer solubilidad a fármacos insolubles. Dependiendo del diseño y tipo de nanoacarreador, pueden permitir el control de la cinética de liberación o ser selectivos para alguna diana terapéutica (vectorización). Además, se

busca que sean biocompatibles y biodegradables, de tal forma que puedan ser usados con seguridad en humanos (Figura 4) [29–31].



**Figura 4.** Principales ventajas de encapsulación de fármacos en sistemas nanoacarreadores.

Dadas las ventajas presentadas, los nanoacarreadores han surgido como una alternativa para ayudar en el tratamiento del cáncer; ya que al encapsular compuestos quimioterapéuticos se busca principalmente reducir los efectos adversos causados por los fármacos usados contra esta patología; además, se busca aumentar la biodisponibilidad y proveer seguridad y eficacia del tratamiento. Una de las principales ventajas de medicamentos, clínicamente aprobados, que incluyen sistemas nanoacarreadores es que han producido menores efectos adversos en comparación con la quimioterapia convencional [27,32–34]. Además de reducir los efectos adversos, la encapsulación de fármacos quimioterapéuticos puede ayudar a mantener el fármaco por un mayor tiempo en circulación sanguínea, a través de la extravasación a los tejidos tumorales mediante el efecto de permeación y retención mejorada (EPR, por sus siglas en inglés). El efecto EPR, es atribuido a que, en los tejidos tumorales, debido al requerimiento de nutrientes, se forman nuevos vasos sanguíneos, los cuales son altamente porosos e irregulares que provocan una desorganización entre las células endoteliales que recubren al tumor, generando un espacio entre dichas células (> 400



nm) y provocando la fenestración de las nanopartículas[35,36]. Un tamaño no adecuado de las nanopartículas, administrado por vía intravenosa, podría resultar en una obstrucción física de los vasos sanguíneos. Nanoacarreadores con diámetros mayores a 400 nm, son conocidos por ser fácil y rápidamente capturados por el sistema reticuloendotelial, por lo que las nanopartículas no pueden circular en el flujo sanguíneo por un tiempo suficiente para liberar una cantidad adecuada y conseguir el objetivo terapéutico [32]. Partículas en un rango de 100 a 200 nm son tamaños óptimos a partir de la inyección intravenosa y demostraron tiempos de circulación más prolongado en la sangre [32,37–40]. Es por lo anterior, que resulta de importancia considerar el tamaño de partícula de los sistemas nanoacarreadores.

Además del tamaño de partícula, la carga superficial y forma de la nanopartícula, el fármaco a encapsular, así como su aplicación terapéutica y la vía de administración, son parámetros a considerar en el diseño y tipo de nanoacarreador a utilizar [38]. Por lo que, se han utilizado diversos sistemas nanoacarreadores, tales como micelas, liposomas, dendrímeros, nanopartículas inorgánicas y nanopartículas sólidas lipídicas; que pueden autoensamblarse o ser directamente sintetizados dentro de multicomponentes y sistemas multifuncionales [41]. En este sentido, se ha realizado la nanoencapsulación de la Casiopeína III-ia en nanopartículas sólidas lipídicas y en nanopartículas poliméricas, tomando en cuenta las características de los tejidos tumorales y las propiedades farmacológicas y la farmacocinética preclínica del compuesto.

## 1.5 Nanoencapsulación de Casiopeínas

La Casiopeína III-ia, cuenta con un patente de una formulación para su administración por vía intravenosa. Sin embargo, ha resultado de interés encontrar una forma de administración farmacéutica que permita incrementar la concentración de la Casiopeína III-ia en el sistema sanguíneo y disminuir la unión a proteínas. Es por lo anterior, que se ha propuesto la encapsulación de la Cas III-ia en diversos sistemas nanoacarreadores. Con lo cual, además de incrementar la concentración sanguínea del fármaco, se busca reducir la toxicidad inherente al compuesto, dada su aplicación, para el tratamiento del cáncer.

En 2006 Morán reportó la nanoencapsulación de Casiopeína III-ia mediante nanopartículas sólidas lipídicas (nsl). Se obtuvieron tamaños de partículas de alrededor de 100 nm y se evaluó la estabilidad del sistema coloidal luego de tres meses de formadas los nanoacarreadores, presentando todas las formulaciones un aumento en el tamaño de partícula. De las cuatro formulaciones obtenidas, una

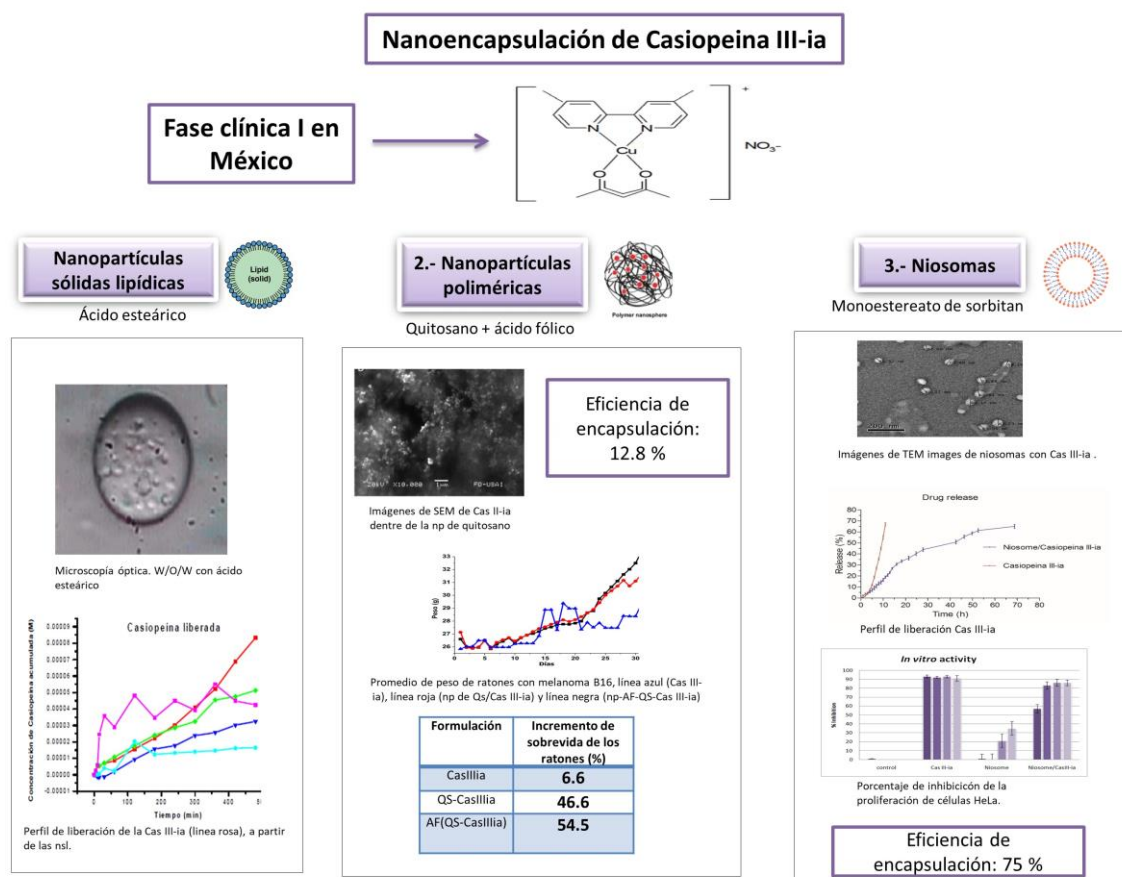
presentó estabilidad a través del tiempo y un potencial zeta de -30.2 mV. La inestabilidad observada para las otras tres fue confirmada mediante microscopía electrónica de barrido, observándose partículas de hasta 130  $\mu\text{m}$ . Al evaluar el perfil de liberación del compuesto, este mostró una liberación más prolongada en comparación con la Casiopeína III-ia libre [42].

Por su parte, Miranda en 2012 reportó la preparación de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con Casiopeína III-ia, mediante el método de coacervación. Observó que las diversas variables como la concentración del polímero, concentración del estabilizante, pH del medio y velocidad de agitación son factores claves para obtener un tamaño de partícula adecuado para su administración intravenosa. Además, dependiendo de las condiciones, obtuvo tamaños de partícula desde 100 hasta 1000 nm, mientras que la mayor eficiencia de encapsulación obtenida fue del 12.8 %, debido al carácter hidrofílico del compuesto. La actividad sobre una línea tumoral HeLa no se modificó por la presencia de quitosano. Sin embargo, la administración de Casiopeína III-ia en las nanopartículas de quitosano aumentó el tiempo de supervivencia en ratones y disminuyó la ganancia en peso con respecto a la administración del compuesto libre [43].

Si bien los resultados obtenidos con ambos sistemas de liberación son prometedores, se ha planteado la necesidad de buscar un sistema nanoacarreador que ofrezca una mejor encapsulación del fármaco, reduzca la toxicidad inherente del fármaco, sea biocompatible, con bajos costo de fabricación, que sea factible su escalabilidad industrial y que sea compatible con las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del compuesto a encapsular. En este sentido, los sistemas vesiculares presentan la ventaja de encapsular compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos con altos porcentajes de encapsulación. Es por lo anterior que en las últimas décadas se han realizado diversos estudios con sistemas vesiculares análogos a los liposomas, pero formados con tensoactivos no iónicos, que reciben el nombre de niosomas.

Previo a esta propuesta de trabajo, se realizó la nanoencapsulación de la Cas III-ia en sistemas niosomales, utilizando Span60 y colesterol para la formación de los niosomas [44]. Se observaron sistemas esféricos mediante microscopía electrónica de transmisión y una encapsulación del compuesto hasta del 75 %, el perfil de liberación indicó que se tenía una liberación bifásica modificada hasta por 69 horas y cuando se evaluaron los sistemas en líneas tumorales de HeLa, se encontró que la Casiopeína III-ia presentaba actividad aun estando encapsulada. Los estudios de potencial de carga indicaron que los niosomas eran físicamente inestables lo cual fue confirmado por medio de microscopía electrónica de barrido, donde, luego de 10 días de realizada la

formulación se observaron sistemas amorfos de hasta 1.70  $\mu\text{m}$  [44]. Una forma de otorgar estabilidad física a los niosomas es mediante el uso de moléculas que puedan conferir cargas electrostáticas a la superficie de la vesícula, o bien, el uso de cadenas largas de polietilenglicol que mediante impedimentos estéricos puedan ayudar a reducir la coalescencia de las vesículas [45,46]. En la Figura 5, se presenta el esquema general de las nanoformulaciones previamente descritas.

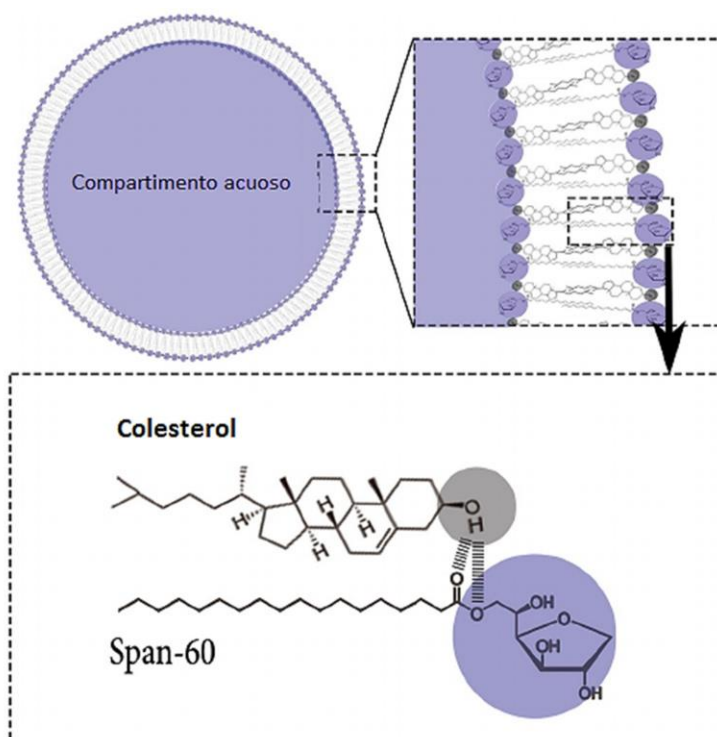


**Figura 5.** Sistemas nanoacarreadores utilizados para la encapsulación de Casiopeína III-ia.

## 1.6 Niosomas

Los niosomas son sistemas vesiculares formados por tensoactivos no iónicos. Los tensoactivos no iónicos son el tipo más común de agentes activadores de la superficie usados en la preparación de estas vesículas, dado los beneficios que ofrecen respecto a la estabilidad, compatibilidad y toxicidad comparada con sus contrapartes aniónicas, anfotéricas o catiónicas. Los tensoactivo no iónicos son generalmente menos tóxicos, menos hemolíticos e irritantes a la superficie celular [47,48]. Para la formación de los niosomas, los Spans (ésteres de sorbitan), Tweens (polisorbatos) y Brij

(polioxietilen aquil éter) son los tensoactivos más usados debido a que presentan en general un parámetro de empaquetamiento entre 0.5-1 y un balance hidrofílico-lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés) entre 4 y 8, lo que los hace candidatos a la formación de vesículas [46,47,49,50]. Entre los tensoactivos más utilizados, destaca el Span 60, debido a que se ha observado que por su balance HLB (8.6) y la longitud de la cadena hidrocarbonada, se obtienen sistemas vesiculares estables y con altas eficiencias de encapsulación, tanto para fármacos hidrofílicos, como la metformina, como para fármacos hidrofóbicos (como el tamoxifeno). Además, el Span 60 es ampliamente utilizado como excipiente en diversas formulaciones farmacéuticas [51–55]. Pese a que el Span 60 tiene la capacidad de formar vesículas, generalmente se agrega colesterol a la formulación con el objeto de estabilizar el autoensamblaje del tensoactivo en niosomas. El colesterol tiene la capacidad de proveer una mayor estabilidad a la bicapa vesicular debido a que disminuye la fluidez e imparte rigidez al niosoma y en general, afecta las propiedades físicas y estructurales como la permeabilidad de la membrana, mejoramiento de su estiramiento mecánico, tiempo de almacenamiento y estabilidad [45,46,49,56,57]. En la Figura 6, se observa la formación de niosomas con Span 60 y colesterol.

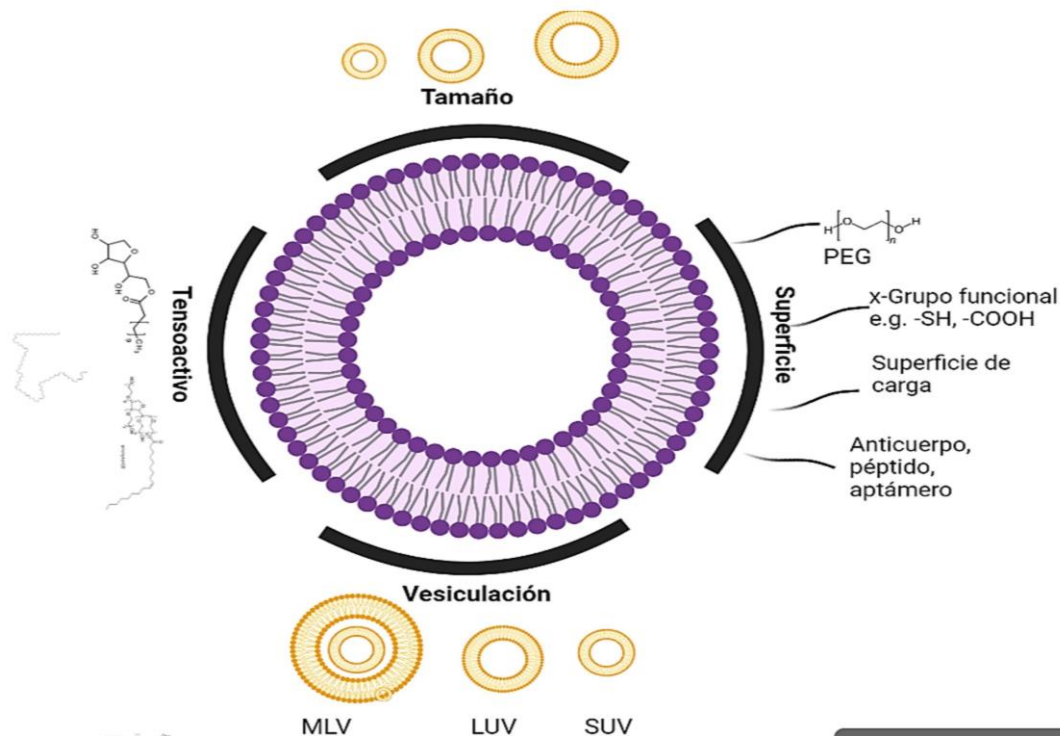


**Figura 6.** Estructura general de niosomas, a manera de ejemplo se presenta la vesiculación con Span60 y colesterol. Imagen modificada de [49].

Además del colesterol, se utilizan moléculas que puedan otorgar estabilidad física a las vesículas, ya sea mediante repulsiones electrostáticas o estéricas. En el caso de la estabilidad física mediante repulsiones electrostáticas, algunas de las moléculas más utilizadas son el dicetil fosfato (DCP) y estearil amina (SA). Estas moléculas son generalmente usadas entre un 2.5-5 % en relación molar de la concentración total [45,46,57,58]. En el caso de las repulsiones estéricas se ha utilizado ampliamente el polietilenglicol (PEG); sin embargo, se ha observado que los liposomas funcionalizados con PEG pierden sus características de larga circulación cuando se administra al menos dos veces en el mismo animal, provocando una rápida fenestración mediante el aclaramiento sanguíneo acelerado basado en la inducción de la inmunoglobulina M (IgM) desde la primera dosis [59]. Como alternativa, se han utilizados Poloxameros, como el Pluronic F127, el cual se ha visto que tiene la capacidad de inhibir el sistema retículo endotelial y que sus monómeros pueden reducir la resistencia a múltiples fármacos [60,61].

Han sido diversos los fármacos nanoencapsulados en sistemas niosomales, tales como el cis-Pt, doxorubicina, curcumina y tamoxifeno; obteniéndose diversos tamaños de partícula, perfil de liberación, potencial zeta y otros parámetros del producto, los cuales dependieron de diversas variables como concentración de los excipientes y método de producción [54,55,62–68];

En este sentido, es bien conocido que existen múltiples variables en la formación de los sistemas nanoacarreadores y nanoencapsulación de los fármacos. En el caso específico de los niosomas, las características requeridas de la formulación estarán directamente afectada por el tipo de tensoactivo, cantidad de colesterol, la inclusión de moléculas que pueden otorgar estabilidad a los nanoacarreadores, la concentración de las moléculas y del principio activo, así como el método de formación de los niosomas (Figura 7) [49,69–71]. Estas variables tendrán un impacto directo en características de interés del sistema nanoacarreador, como tamaño de partícula, carga superficial, forma, eficiencia de encapsulación, entre otros. Dichas características estarán basadas en el perfil de calidad del producto, que principalmente depende del tipo de fármaco a encapsular y el uso terapéutico del nanoacarreador.



**Figura 7.** Esquema de variables múltiples para el diseño de un sistema nanoacarreador.

Las diversas variables que presentan los nanoacarreadores, hacen que las nanoformulaciones puedan llegar a ser un proceso complejo y sensible. Una pequeña variación en el proceso puede afectar las propiedades fisicoquímicas (tamaño, forma, composición, morfología, solubilidad) y las propiedades biológicas. Por consiguiente, se puede tener una baja reproducibilidad y repetibilidad de las nanoformulaciones afectando la escalabilidad industrial y afectando la comercialización de sistemas nanoacarreadores, lo que provoca una mayor brecha en la implementación a la clínica [72,73].

Con el objeto de evaluar la influencia de las diversas variables, y sus interacciones, durante el diseño de un producto en nanomedicina, se ha hecho el uso de algunas herramientas involucradas en el concepto de calidad por diseño (QbD, por sus siglas en inglés) ya que se busca establecer seguridad y calidad en productos farmacéuticos.

## 1.7- Calidad por diseño

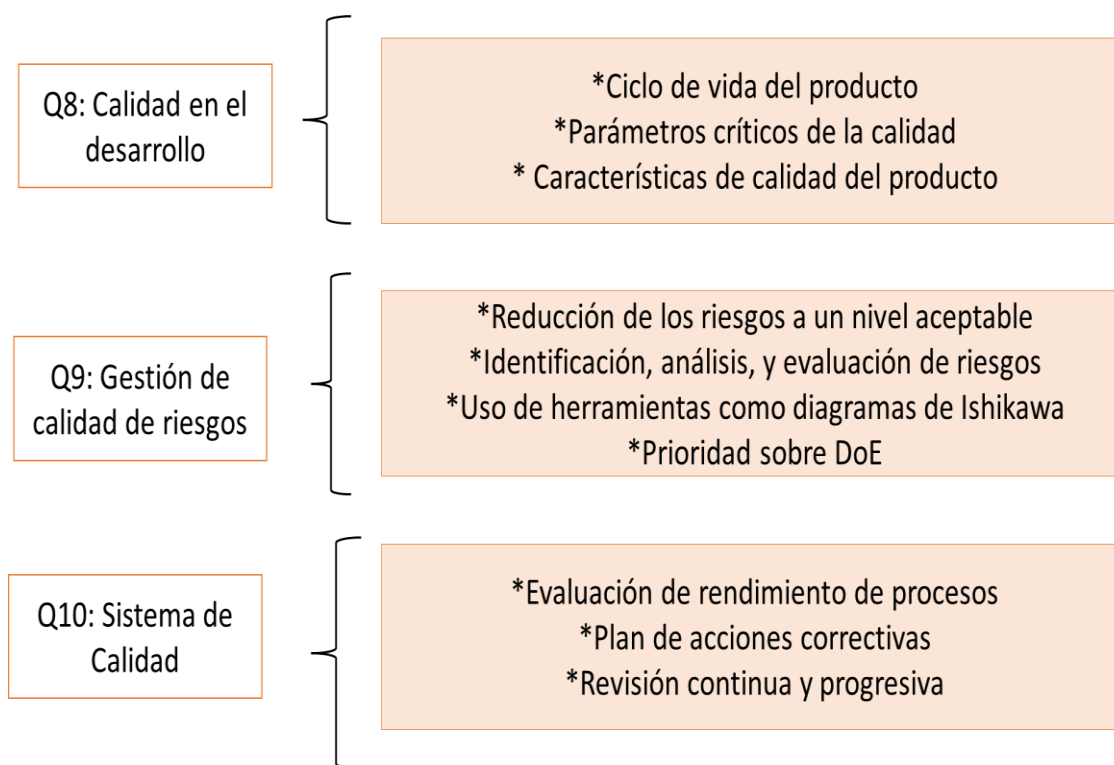
De acuerdo con la guía de la International Conference on Harmonisation (ICH) Q8, calidad por diseño es definido como una aproximación sistémica que comienza con un objetivo predefinido y se enfatiza en el entendimiento del producto y procesos, así como el control del proceso basado en la ciencia y en administración de riesgos de calidad [74]. Lo anterior permite tener un mejor control del proceso en la obtención de formulaciones, productos repetibles y reproducibles, un mejor escalamiento industrial, reducción de costos, y, que los productos farmacéuticos puedan ser seguros y eficaces [75–77]. En relación con lo anterior, es importante establecer la formulación desde los conceptos iniciales hasta el diseño final, siendo necesario considerar los componentes de la formulación (por ejemplo: propiedades del fármaco, excipientes a utilizar, vía de administración, sistema contenedor, etc.), así como los procesos de manufactura y conocimientos previos, que sean similares a la formulación a desarrollar. Es importante tener en cuenta los atributos críticos de la formulación, junto con las opciones del proceso de manufactura, con el objetivo de seleccionar de manera adecuada los componentes y metodología a desarrollar para la formación de los nanoacarreadores. El desarrollo de los procesos estudiados debería proveer las bases para el proceso mejorado, validación, verificación continua y algunos procesos de requerimientos de control. El conocimiento generado a partir del desarrollo de dichos procesos puede ser usado, de manera apropiada, para justificar las especificaciones del producto. [74,78].

El desarrollo farmacéutico debe incluir:

- Definición del perfil de calidad del producto
- Identificar los atributos críticos de calidad
- Seleccionar los materiales y métodos de manufactura
- Definir una estrategia de control
- Identificar, a través del conocimiento previo y análisis de riesgo, los atributos del material y parámetros del proceso que tienen impacto sobre los atributos de calidad del producto
- Al tener el entendimiento del proceso de formación del producto y la administración de riesgos de calidad, se pueden establecer estrategias de control.

Como resultado de lo anterior, es posible obtener una aproximación sistemática para un mejoramiento continuo a través del ciclo de vida del producto [79]. El desarrollo de calidad por diseño implica varias etapas con el objetivo de poder obtener el producto requerido. Por lo anterior,

un análisis de riesgo se vuelve necesario de realizar con el objetivo de identificar las variables críticas del desarrollo del producto. Las variables identificadas pueden ser evaluadas en diseños experimentales para obtener el impacto de estas variables sobre las características deseables del producto, optimizar el sistema y de ser necesario, realizar acciones correctivas. QbD, se basa principalmente en tres guías del ICH. La ICH Q8: Calidad en el desarrollo; ICH Q9: Gestión de calidad de riesgos e ICH Q10: Sistema de calidad. En la Figura 8, se presenta un esquema de las guías anteriormente mencionadas.

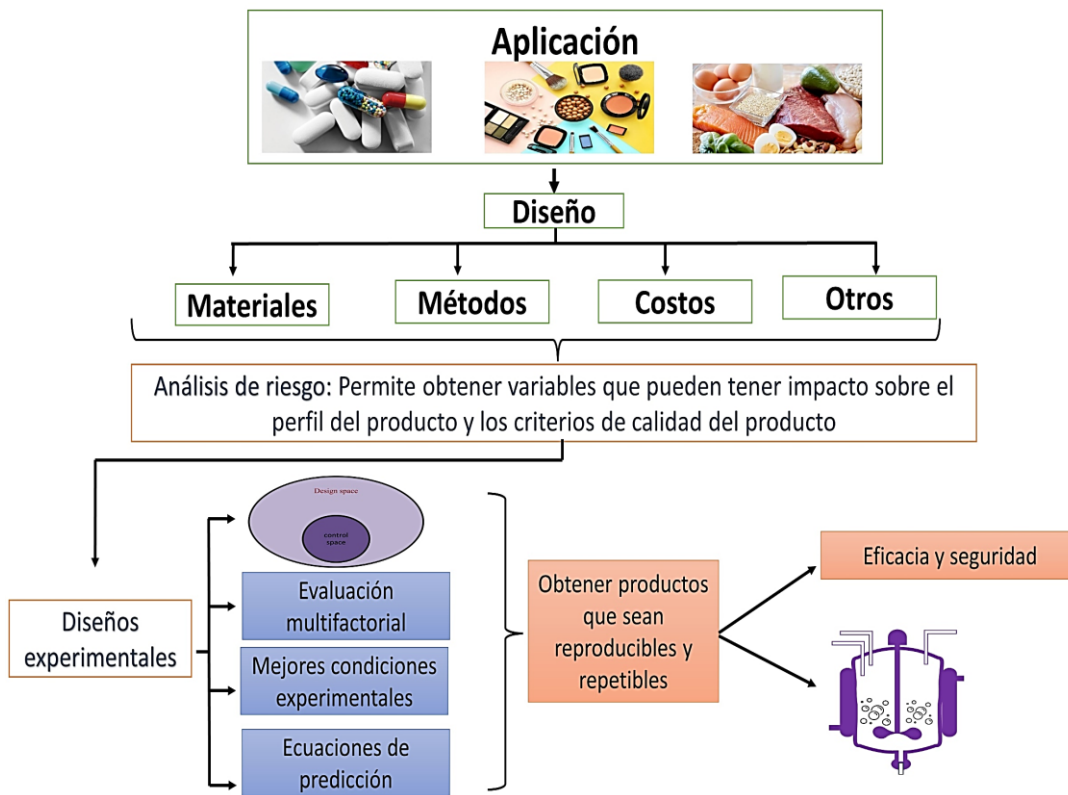


**Figura 8.** Esquema del resumen de las guías ICH para la implementación de calidad por diseño.

Dadas las ventajas presentadas del QbD en la industria farmacéutica, en el área de la nanomedicina, las nanoformulaciones basadas en herramientas involucradas en este concepto se ha incrementado [75,76,80,81]. Diversos trabajos de revisión presentan estudios en los que se han implementado algunos conceptos de QbD, sin embargo, dada la complejidad del diseño de los sistemas nanoacarreadores y la amplia brecha de su traslado a la clínica, únicamente se han empleado conceptos basados en la guía ICH Q8 y algunos trabajos en la guía ICH Q9. En este sentido, Bastogne en 2017, realizó una revisión de trabajos que en los últimos 10 años han reportado el uso de QbD para el diseño de nanoacarreadores donde, en el 62 % de los estudios examinados, la aplicación de



QbD está restringida al desarrollo de la formulación (guía ICH Q8), probablemente por la complejidad que puede llegar a tener el diseño de los productos nanotecnológicos y la falta de entendimiento del concepto de QbD al aplicar en estudios de nanomedicina. A continuación, se describen de las principales herramientas de calidad por diseño empleadas en nanomedicina. En la Figura 9 se ilustran de manera general los pasos secuenciales de la implementación de QbD en sistemas nanoacarreadores [81].



**Figura 9.** Diagrama general de aplicación de calidad por diseño para la formación de nanopartículas, cuyo diseño depende de la aplicación.

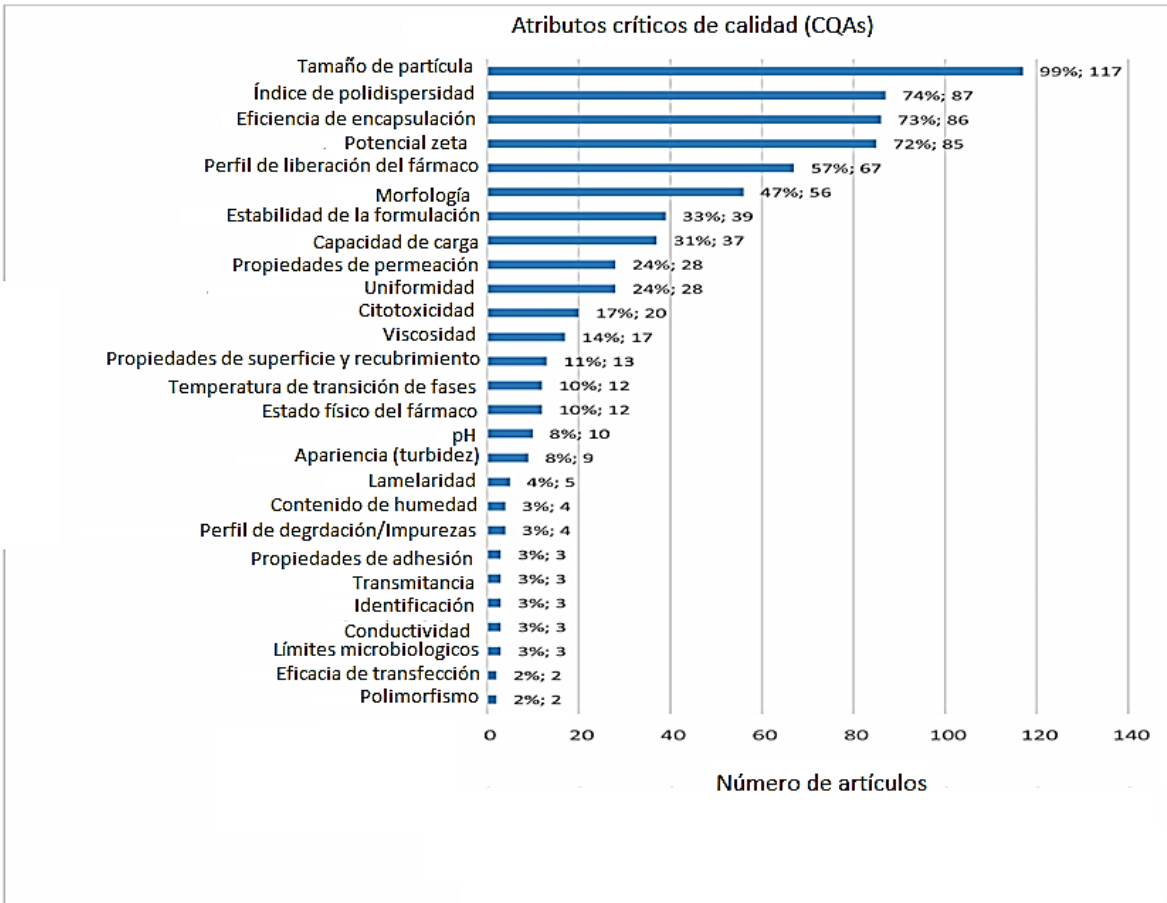
### 1.7.1 Perfil de calidad del producto (QTPPs)

El perfil de calidad del producto es un resumen de las características de calidad ideales tomando en cuenta la seguridad y eficacia del producto. Está basado en conocimientos científicos previos y estudios preclínicos y clínicos. Se refiere principalmente a la forma de dosificación, ruta de administración, perfil de liberación, indicación terapéutica, estabilidad y propiedades basadas en la forma intencionada que tendrá para el mercado [75,76]. Lo anterior ayuda a identificar los atributos

críticos de calidad del producto. Típicamente, en el caso de los nanoacarreadores, los QTPPs más comunes son la ruta de administración (oral, inyectable, tópica), la forma de la dosificación (polvo liofilizado o dispersión), perfil de liberación del fármaco, características farmacocinéticas, tiempo de vida media y sistema de contenedor [75,76,81].

#### 1.7.2. Atributos críticos de Calidad (CQAs)

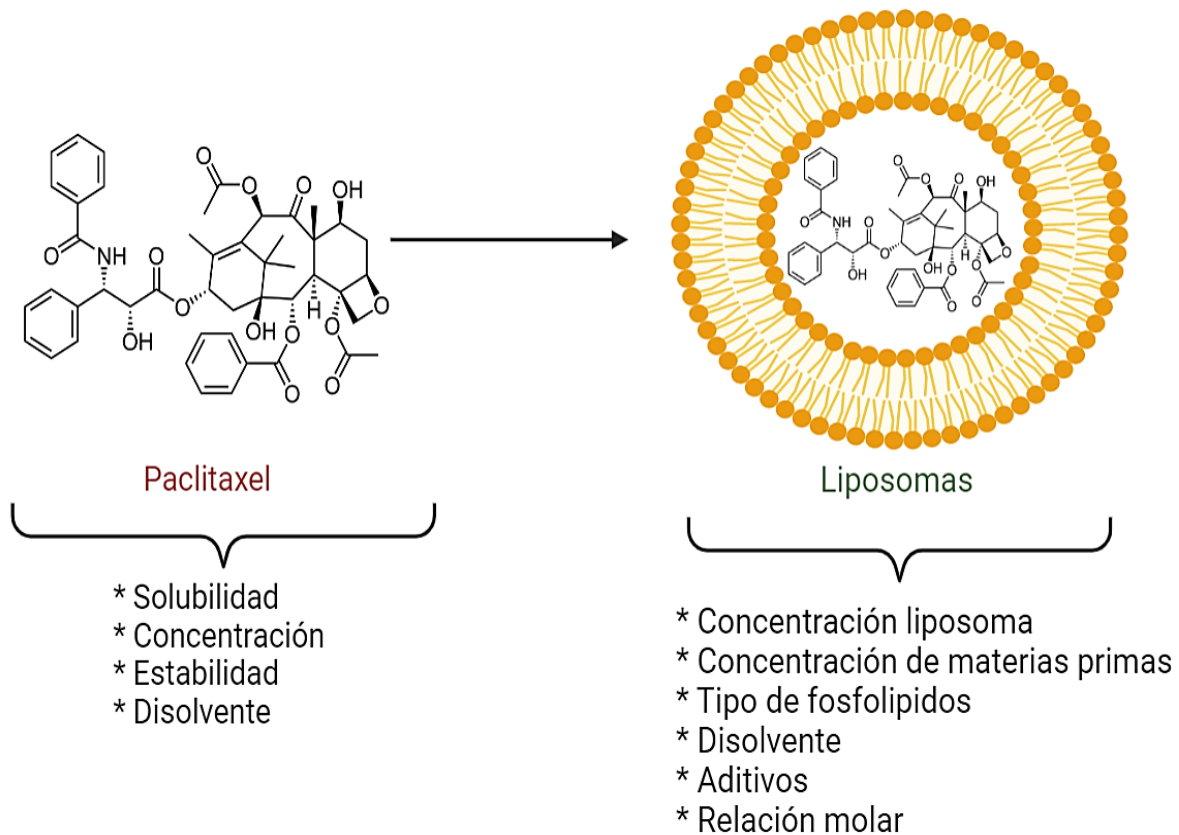
Un CQA es una propiedad o característica física, química, biológica o microbiológica que deberían estar dentro de un límite apropiado, rango, o distribución para asegurar la calidad deseable del producto. Los CQAs potenciales, surgen a partir del perfil de calidad del producto requerido y de conocimientos previos reportados, dependiendo del producto a desarrollar [74,82]. Definen el rango o el límite de aceptación de un producto que asegure la calidad esperada de la nanoformulación. En el caso de las nanopartículas, los CQAs son generalmente tamaño de partícula, potencial zeta, eficiencia de encapsulación y perfil de liberación del fármaco. Los CQAs se ven directamente afectados con el tipo de fármaco, los excipientes y la concentración de estos últimos, las concentraciones de fármaco, los materiales del proceso y los parámetros del proceso. Zagalo y colaboradores realizaron una búsqueda de los principales CQAs reportados en nanomedicina en investigación [83]. En la Figura 10, se presenta la gráfica con los CQAs con mayor frecuencia, de acuerdo con los estudios realizados por dicho grupo de trabajo.



**Figura 10.** Frecuencia de CQAs más reportadas en diversos estudios donde se ha aplicado QbD. Modificado de [83].

1.7.3. Atributos críticos del material (CMAs)

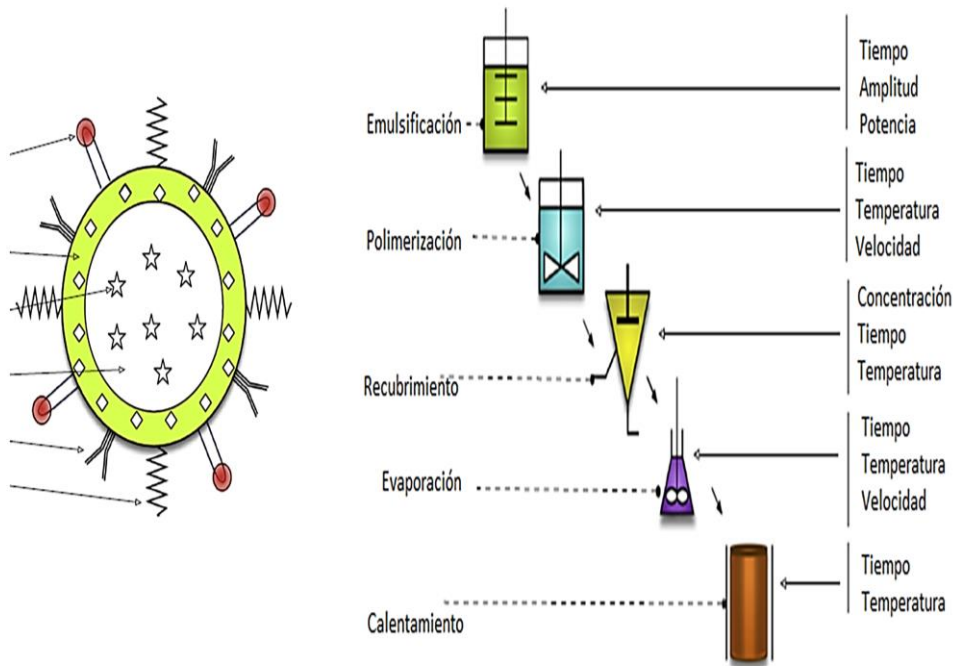
Los atributos críticos del material son los factores de entrada que causan variabilidad en los CQAs y están directamente asociados con la composición del nanoacarreador. Los CMAs incluyen las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los materiales a utilizar, y deberían de encontrarse en límites apropiados, de tal forma que asegure la calidad necesaria del producto final [72,81,83]. Tal como se aprecia en la Figura 11, algunos de los materiales que generalmente son considerados de entrada en los nanoacarreadores son, concentración del tensoactivo o fosfolípidos, tipo de tensoactivo, disolvente, cantidad de disolvente, concentración del polímero (si se requiere), así como el fármaco a utilizar y sus características fisicoquímicas y farmacéuticas.



**Figura 11.** Ejemplos de atributos críticos del material normalmente utilizados en la formación de liposomas, el paclitaxel se utiliza como fármaco de ejemplo.

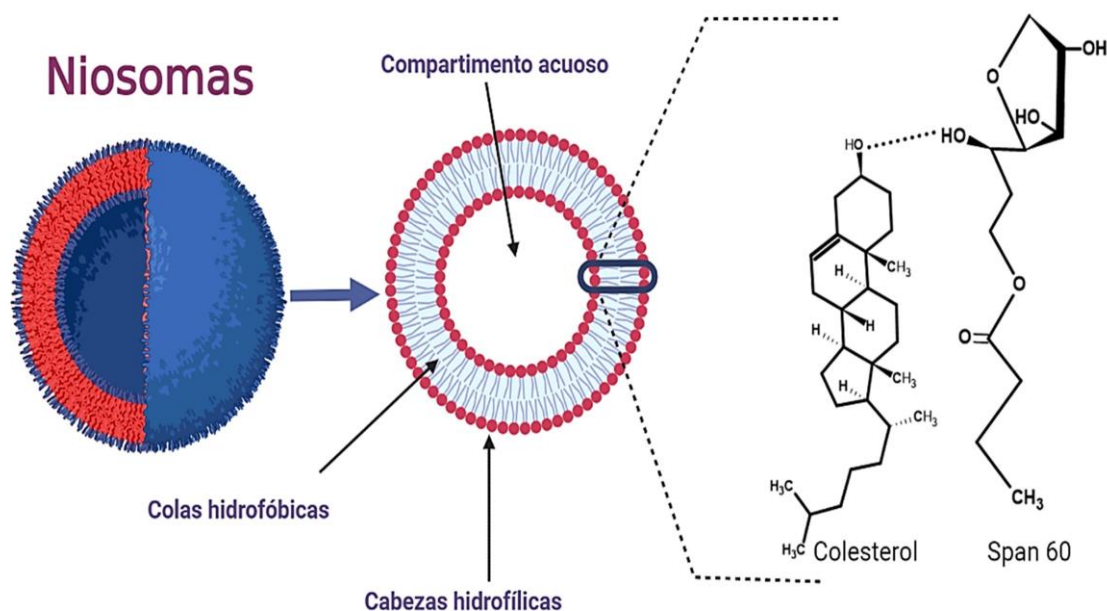
#### 1.7.4. Parámetros críticos del proceso (CPPs)

Los parámetros críticos del proceso son factores con un riesgo potencial de causar variabilidad sobre los CQAs y están ligados a procesos de manufactura de la nanoformulación. Los CPPs son variables de entrada que deben ser controlados dentro de límites adecuados que aseguren la calidad del producto. Dependiendo del tipo de nanoacarreador, y por lo tanto de su método de manufactura, algunas de las variables de entrada pueden ser velocidad de agitación, tiempo de agitación, sonicación, tiempo de evaporación, entre otras [77,78,81]. A manera de ejemplo, en la Figura 12, se pueden observar variables de entrada del proceso, para la obtención de nanopartículas poliméricas.



**Figura 12.** Parámetros críticos del proceso para la formación de nanopartículas poliméricas. Modificado de [81].

Cuando el perfil de calidad del producto es definido en función de los requerimientos de su aplicación, es posible entonces precisar que parámetros de calidad tendrá el producto y que variables serán las que afecten dicha calidad. Las variables generalmente están relacionadas con los materiales de entrada y los parámetros críticos del proceso. Para poder identificar las variables que afectan la calidad del producto, es necesario realizar análisis de riesgo, que generan una primera información del posible impacto de estas variables. Dado que generalmente se basan en conocimientos y reportes previos, es posible definir un espacio del diseño con las posibles variables, en el cual se pueda tener una estrategia de control [76,78]. En la Figura 13, se encuentra un resumen de los pasos secuenciales para poder obtener un espacio del diseño, que permita realizar diseños experimentales, con el objetivo de modelar el comportamiento de la calidad del producto en función de las variables que tienen impacto sobre el producto.



**Figura 13.** Pasos secuencias para la obtención de un espacio del diseño que permita obtener productos con la calidad deseada.

#### 1.7.5- Análisis de riesgo

Las diversas variables que se pueden tener durante la formación de un nanoacarreador generan un riesgo inherente de afectar la calidad del producto deseado, por lo que el riesgo es definido como una combinación de probabilidad de ocurrencia y la severidad del daño. Esto consiste en la identificación de peligro y el análisis y evaluación de riesgos asociado con la exposición a estos peligros. Su evaluación comienza con la descripción de un problema bien definido y esto conlleva al uso de un análisis adecuado que conduzca a que los riesgos y la forma de impacto sean más fácil de identificar [72,84]. El principal objetivo de la evaluación de riesgos es identificar y dependiendo de la herramienta, medir el impacto de las variables de los materiales de entrada y las variables del proceso de obtención. Existen diversas herramientas que pueden ayudar a identificar las variables potenciales que tienen efecto sobre los CQAs. De acuerdo con la guía ICH Q9, algunas de las más utilizadas son: métodos de análisis de riesgos básicos, como diagrama de Ishikawa, diagramas de flujo, hojas de lista, análisis de árbol de fallos, clasificación y cribado de riesgos, análisis preliminar de riesgos, análisis del modo de fallos y de los efectos (FMEA, por sus siglas en inglés), matriz de riesgo, entre otros. La selección de la herramienta a utilizar dependerá de conocimientos científicos previos y experiencia sobre el producto. Una de las herramientas más utilizadas es el diagrama de

Ishikawa o espina de pescado, dada su facilidad y la forma en la que se pueden asociar las causas que producen un efecto sobre diversas respuestas. Además, es una herramienta que puede ayudar a ser un primer acercamiento al impacto de las variables, para posteriormente poder llevar a cabo análisis donde, de manera cualitativa, se pueda evaluar el impacto generado por cada variable, asignando un valor de impacto alto, medio o bajo a partir de una matriz de riesgo [84,85]. En este sentido se ha visto que algunos reportes que involucran conceptos de calidad por diseño para la formación de los niosomas han utilizado principalmente diagrama de Ishikawa, dada la facilidad y bondad de esta herramienta [86–88].

#### 1.7.6.- Calidad por diseño: Diseño experimental (DoE)

Con las variables identificadas y analizadas a partir del análisis de riesgo, es posible identificar aquellas variables que tienen el mayor impacto sobre los CQAs, mediante el uso de diseños experimentales (DoE). Lo anterior, permite una evaluación multivariable que genera un mejor entendimiento del impacto de las variables de CMAs, solas o en combinación con los parámetros del proceso que afectan al producto. Debido a que el diseño experimental es un método organizado que ayuda a determinar la relación entre los factores que afectan el proceso y las características del producto, se genera un mejorado conocimiento sobre el proceso. Para poder llevar a cabo un diseño factorial, es indispensable tener en cuenta el espacio del diseño del proceso y del producto que es establecido con los CQAs de interés, por lo que, una vez que se ha determinado la variable de CQAs, es necesario basarse en conocimientos previos y análisis de riesgo, para definir el rango de los valores de las variables continuas y las variables categóricas que se encuentren dentro de un espacio apropiado para la calidad del producto[81,82,89]. El llevar a cabo los diseños experimentales, ayuda a obtener una estrategia de control con el objetivo de asegurar un producto de calidad que pueda ser consistentemente producido. El DoE juega un papel muy importante en la optimización de las nanoformulaciones utilizando un menor número de experimentos que provee productos costo-beneficio en un menor tiempo. Dependiendo del objetivo del producto, existen múltiples diseños experimentales, basados en el cribado (Plackett-Burman) de variables, evaluación del impacto de pocas variables y su interacción (diseño factorial) o la optimización de un producto (diseño central compuesto). En el caso de los niosomas, se han utilizado diversos diseños factoriales para evaluar los diversos factores que pueden influenciar en el tamaño de partícula, índice de polidispersidad, eficiencia de encapsulación y potencial zeta (Tabla 1).

**Tabla 1.** Diversos diseños experimentales utilizados para la formación de niosomas con encapsulación de distintos fármacos.

<b>Objeto de investigación</b>	<b>Diseño experimental</b>	<b>Parámetros evaluados</b>	<b>Respuestas</b>	<b>Resultados</b>
Obtención de niosomas (Span60:colesterol) y liposomas, estables, bajo PDI y altas EE, con vitamina D y Sudán rojo 7B, como moléculas modelo de encapsulación [90].	Diseño Plackett-Burman (cribado de variables) y Diseño factorial para la optimización de la formulación	Relación O/A, concentración fosfolípido, estiramiento iónico, velocidad de flujo de inyección, temperatura de evaporación, velocidad de evaporación, amplitud de sonication, tiempo de sonication.	Tamaño promedio y PDI.	Niosomas y liposomas optimizados. Estables con altas eficiencias de encapsulación.
Encapsulación de Metotrexato en niosomas para sistema de liberación dérmica. Observar el efecto del disolvente y la variabilidad de la formulación [91].	Diseño Box-Behnken. Modelo cuadrático con evaluación binaria y efecto polinomial.	Concentración de tensoactivos (Span 40, Tween 20), concentración de colesterol. Longitud de cadenas. Hidrofobicidad del disolvente.	Tamaño partícula, eficiencia de encapsulación y potencial zeta.	Encontraron las mejores condiciones de optimización y el disolvente que ofreció mejor estabilidad y mayor EE.
Formulación optimizada de Imatinib en niosomas, para mejorar la eficacia	Diseño Box-Behnken. Modelo cuadrático con evaluación	HLB tensoactivo, Relación molar colesterol, Relación molar DCP.	Tamaño de partícula, potencial zeta, EE, porcentaje inicial liberado y porcentaje	Observaron una estabilidad mejorada de la formulación optimizada. Observaron una mejorada eficacia y selectividad en células



quimioterapéutica del fármaco [92].	binaria y efecto polinomial.		liberado acumulado.	cancerígenas de la formulación optimizada a diferencia del fármaco libre.
Optimización del proceso de manufactura para la obtención de niosomas cargados con Sumatriptán [93].	Método de Taguchi, arreglo ortogonal, para la optimización de los valores de los parámetros	Cantidad fármaco, tipo tensoactivo, cantidad estearilamina, relación molar de tensoactivo:colesterol).	Tamaño de partícula, carga de superficie, eficiencia de encapsulación.	Lograron optimizar una formulación, con baja polispersidad, altas eficiencias de encapsulación.

### 1.7.7 Tecnología de proceso analítico (PAT)

La tecnología de proceso analítico son estrategias de control que pueden incluir parámetros y atributos relativos a los fármacos, materiales del fármaco y componentes, facilidades y condiciones de operación del equipo, controles en proceso, especificaciones de productos terminados. Algunas herramientas analíticas de uso común para la evaluación de la adecuada obtención de los nanoacarreadores, son FTIR, Raman, espectroscopía fluorescencia, UV, dispersión dinámica de luz, entre otras. [72,75].

### 1.7.8 Calidad por diseño en metalofármacos

Dadas las ventajas presentadas con el uso de calidad por diseño, aunado al creciente interés por el uso de metalofármacos para el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el Cáncer, se han realizados en los últimos 5 años estudios de encapsulación de fármacos que incluyen metales como platino y vanadio.

Cacicedo y colaboradores, en 2019, reportaron la nanoencapsulación de un compuesto denominado Metvan con vanadio en su estructura, la encapsulación se realizó en nanopartículas lipídicas y

herramientas de QbD fueron aplicadas, obteniendo tamaños de partícula adecuadas con baja polidispersidad, eficiencias de encapsulación de hasta el 80 % con una liberación sostenida hasta las 60 h y observaron una mejorada actividad de la nanoformulación, sobre células de osteosarcoma humana (MG-63), en comparación con el Metvan libre. Para obtener la formulación optimizada, utilizaron diseños experimentales como parte de estrategia de QbD y realizaron estudios de validación donde observaron procesos de síntesis altamente reproducibles [94].

Patel y colaboradores, en 2021, estudiaron el desarrollo de una formulación de nanopartículas contenidas en un polvo seco de inhalación para tratamiento cáncer de pulmón multirresistente. Las nanopartículas estaban cargadas con cis-Pt y ABCC3 siRNA. La formulación se optimizó con herramientas de calidad por diseño, cuyos CQAs principales fueron tamaño de partícula y encapsulación de cis-Pt. Las variables principales fueron concentración del lípido, concentración del polímero y la relación molar del lípido. La nanoformulación demostró mejorar los parámetros farmacocinéticos con un mayor tiempo de residencia en los pulmones [95].

De acuerdo a los antecedentes hasta aquí expuestos, en el presente trabajo se propone nanoencapsular la Casiopeína III-ia y la mezcla sinérgica de Casiopeína III-ia y Casiopeína VIII-gly en sistemas niosomales reformulados, utilizando Span60:colesterol y con la inclusión de alguna molécula que pueda otorgar estabilidad física al sistema. En este trabajo se propone el uso de una molécula con cargada positivamente (estearilamina), una negativamente (colato de sodio) y dos moléculas neutras (Pluronic® F127 y monoestereato de polietilenglicol). Dichas moléculas, dada su estructura química, pueden conferir diversas interacciones débiles entre las Casiopeínas encapsuladas y la membrana niosomal de tal forma que la liberación de las Casiopeínas se verá modificada en función de la molécula a utilizar. Asimismo, para conocer los factores que pueden afectar respuestas como potencial zeta, tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, se realizará un diseño experimental, planteando conceptos de interés involucrados en QbD, principalmente basados en la guía ICH Q8 y análisis de riesgo (ICH Q9), y utilizando herramientas como diagramas de Ishikawa, diagramas de Pareto, diseños experimentales, y realizando un análisis de riesgo de interacciones de las materias primas a utilizar con las Casiopeínas a encapsular.

# Hipótesis

El Uso de QbD permitirá sistematizar y optimizar una formulación farmacéutica repetible para la liberación modificada de la Casiopeína III-ia y de la mezcla sinérgica de la Casiopeína III-ia y VIII-gly que en estudios *in vivo*, presentará una menor toxicidad con respecto al compuesto sin encapsular.

## Objetivo general

Obtener una nueva formulación optimizada, reproducible y repetible, utilizando herramientas de QbD, de Casiopeína III-ia y mezcla de Casiopeína III-ia/VIII-gly en sistemas niosomales para obtener una menor toxicidad en pruebas preclínicas *in vivo*.

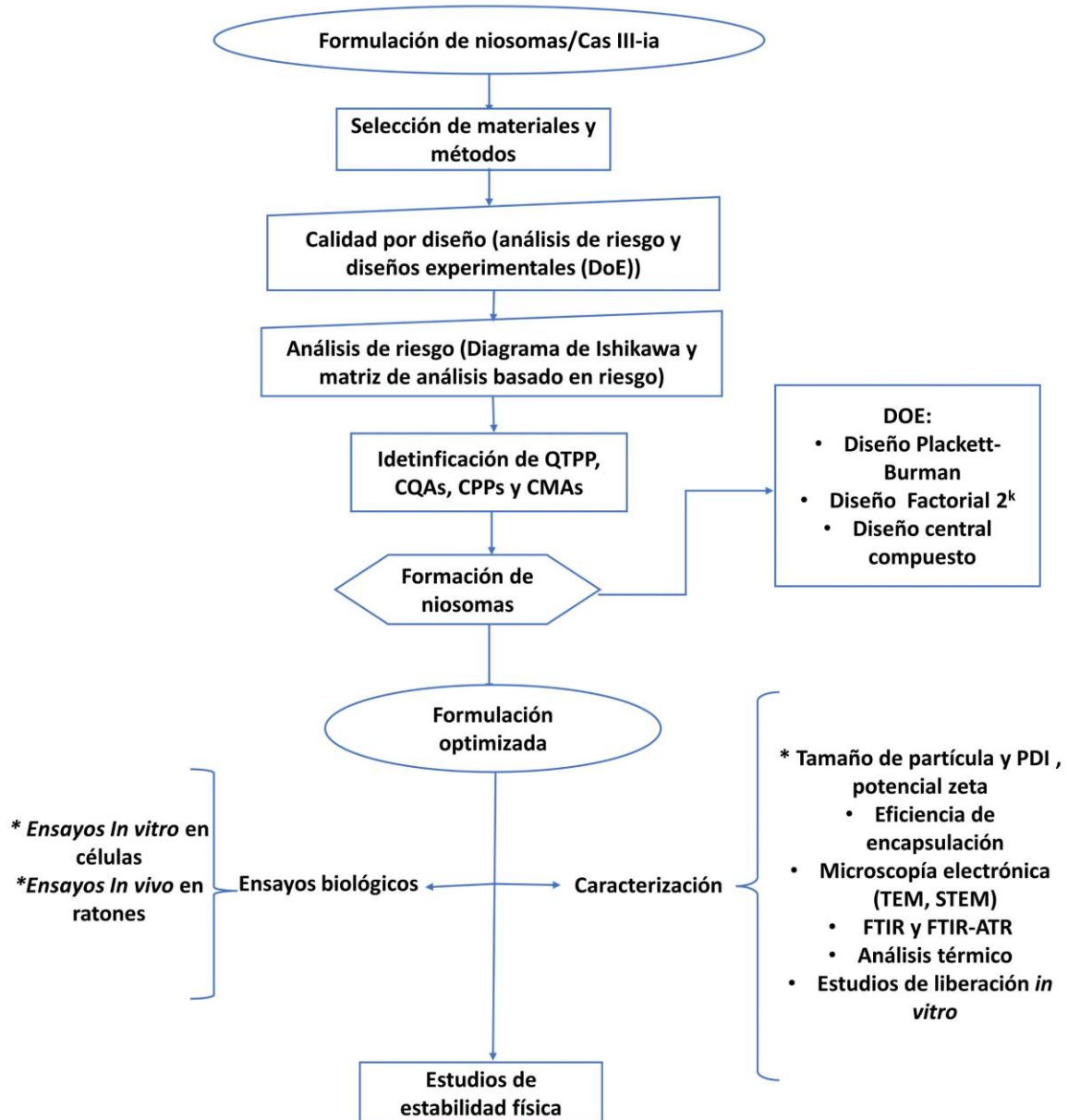
## Objetivos específicos

- Definir los atributos críticos de calidad a partir del perfil de calidad del producto para evaluar el riesgo de los parámetros críticos del proceso y los atributos críticos de los materiales.
- Realizar un análisis de riesgo mediante diagramas de Ishikawa y matriz de riesgo para obtener las variables que afectan los atributos críticos de calidad.
- Corroborar la integridad de los compuestos a nanoencapsular al evaluar la interacción de la Casiopeína III-ia y la Casiopeína VIII-gly con los aditivos a utilizar mediante espectrofotometría UV-Visible.
- Realizar un cribado de las variables obtenidas del análisis de riesgo, mediante un diseño de Plackett-Burman para conocer las variables que presentan influencia en los atributos críticos de calidad.
- Evaluar la influencia de las variables obtenidas, a partir del diseño Plackett-Burman, en los atributos críticos de calidad, mediante un diseño factorial  $2^3$  y diseño central compuesto para la optimización de la formulación.
- Caracterizar las nanoformulaciones optimizadas, mediante dispersión dinámica de luz, microscopía, espectrofotometría UV-Visible, análisis térmico y espectroscopía de infrarrojo.

- Determinar la posible interacción de la Cas III-ia con la membrana niosomal mediante espectrofotometría UV-Visible.
- Evaluar *in vitro* en la línea tumoral MDA-MB-231, la mezcla de Casiopeína III-ia y la Casiopeína VIII-gly nanoencapsuladas y la Casiopeína III-ia nanoencapsulada, para corroborar la actividad de las casiopeínas encapsuladas.
- Evaluar la toxicidad y eficacia de la nanoformulación optimizada en ratones hembra BALB/C.

# II Materiales y métodos

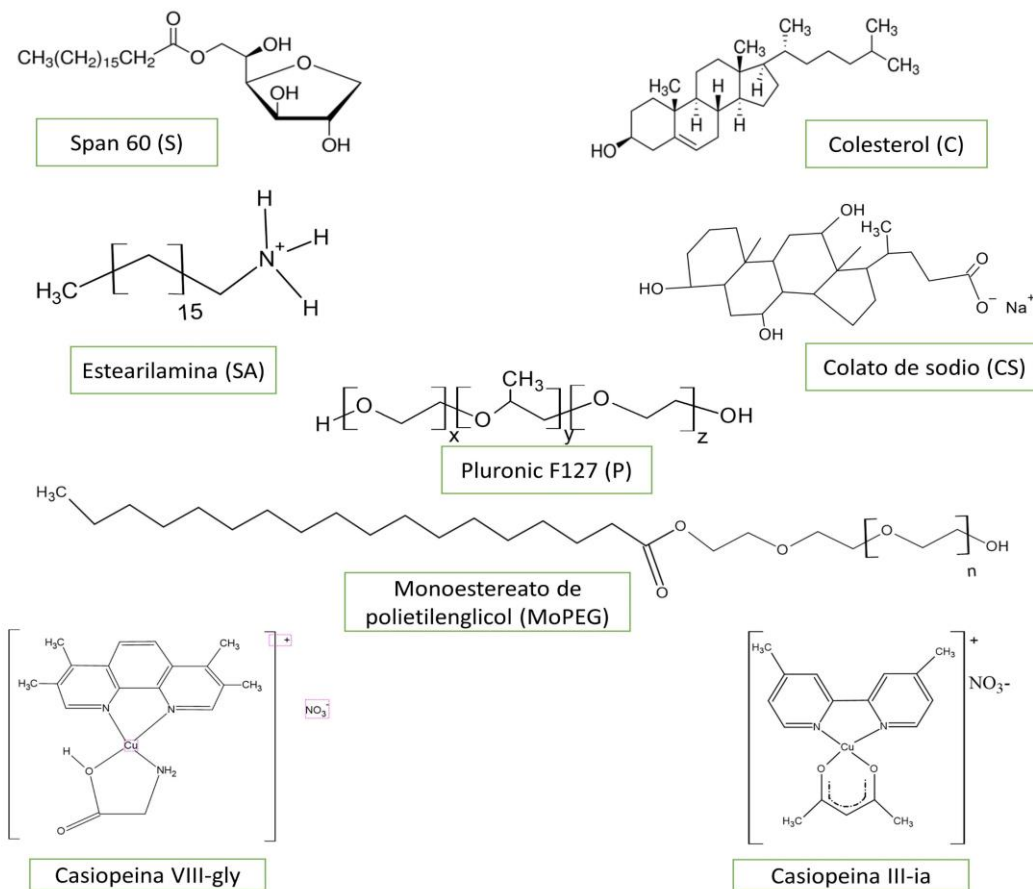
En el esquema 1 se presenta la metodología general para la obtención de la nanoformulación de la Casiopeína III-ia y mezcla sinérgica de la Casiopeína III-ia y Casiopeína VIII-gly aplicando herramientas de calidad por diseño.



**Esquema 1.** Esquema general de la obtención de los niosomas con Casiopeína III-ia y mezcla sinérgica de Casiopeína III-ia y VIII-gly.

## 2.1 Materiales

La Casiopeína® III-ia CAS [223930-33-4] y la Casiopeína VIII-gly fueron sintetizadas en el laboratorio 210, del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, de la Facultad de Química de la UNAM, de acuerdo con la patente reportada [96]. Para la formulación de los niosomas se utilizó monoestereato de sorbitan (Span® 60) y colesterol con un peso molecular de 430.63 g/mol y 386.65 g/mol respectivamente. Las moléculas evaluadas para otorgar la estabilidad física fueron estearilamina (SA, 269.51 g/mol), colato de sodio (CS, 430.55 g/mol), monoestereato de polietilenglicol (MoPEG, 2044 g/mol) y Pluronic® F127 (P, 12600 g/mol). Los reactivos anteriores fueron adquiridos de Sigma-Aldrich México. El éter etílico fue adquirido de Baker-México. Todos los reactivos fueron utilizados sin purificación previa. Las estructuras de los compuestos utilizados se presentan en la Figura 14.



**Figura 14.** Estructuras químicas de los compuestos a utilizar para la formación de los niosomas y estructuras químicas de las Casiopeínas.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Calidad por diseño: Análisis de riesgo

Se construyó un diagrama de Ishikawa o diagrama de espina de pescado, con el objetivo de identificar todas las variables potenciales (a partir de la formulación y el método de formación de los niosomas) que pueden afectar al producto. El diagrama de Ishikawa ayudó a identificar que variables tienen impacto sobre los CQAs (tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación, potencial zeta e índice de polidispersidad) y por lo tanto el efecto que tienen sobre el perfil de calidad del producto. Una vez identificadas dichas variables, se llevó a cabo una matriz de análisis de riesgo (RRMA, por sus siglas en inglés) para identificar el impacto de las variables individuales obtenidas a partir del diagrama de Ishikawa. La interdependencia entre los atributos de cada CPP y CMA y cómo estos afectan los CQAs fue clasificado en impacto de alto, medio o bajo riesgo en la calidad del producto [87].

#### 2.2.1.1 Perfil de calidad del producto (QTPPs)

QTPPs es el perfil de calidad deseado de un producto y está asociado a la calidad, seguridad y eficacia del producto. La Tabla 2 describe los QTPPs para la Casiopeína III-ia nanoencapsulada.

**Tabla 2.** Perfil de calidad del producto para Cas III-ia nanoformulación.

QTPP	Objetivo	Justificación
<b>Forma de dosificación</b>	Solución inyectable	Misma forma de dosificación de la patente. Número de solicitud de la patente: (MX/a/2017/016444) [96].
<b>Indicación terapéutica</b>	Tratamiento para cáncer (compuesto por entrar a fase clínica I)	Las Casiopeínas han mostrado actividad en líneas tumorales de cáncer cervicouterino (HeLa, SiHa), mama (MCF-7), colon (HCT15) y neuroblastoma (CHP-212) [6]. Además, demostró actividad sobre adenocarcinoma de colon HCT15 xenotransplantado en ratones desnudos [15].

<b>Diseño de dosificación</b>	Liberación modificada a partir de los sistemas coloidales	Una liberación modificada podría favorecer la incorporación al sitio de acción del compuesto mediante el efecto de permeación y retención mejorada (EPR, por sus siglas en inglés) [29,35,97].
<b>Ruta de administración</b>	Intravenosa	Misma ruta de administración de la patente. Con el objetivo de evitar el efecto de primer paso [96].
<b>Método de producción</b>	Método de inyección del disolvente. El fármaco será encapsulado durante la formación de los niosomas.	En el método de inyección del disolvente no es necesario la reducción del tamaño de partícula por medio de sonicación, ya que, dependiendo de las condiciones, el diámetro de las partículas puede estar entre 50 y 500 nm [46,49]. Lo anterior representa un menor gasto energético. Además, la escalabilidad industrial podría tener una mayor factibilidad.
<b>Excipientes que afectan los CQA</b>	Span 60 (monoestereato de sorbitan), colesterol y la molécula que otorga estabilidad física	Los excipientes son críticos en la formación del niosoma, eficiencia de encapsulación, potencial zeta y tiempo de circulación sanguínea [90,98,99].
<b>Estabilidad física</b>	Estables al menos por 6 meses, bajo condiciones de degradación acelerada a 40 °C y 75 % de humedad relativa, de acuerdo con la NOM-073-SSA1-2015	El tamaño de partícula y PDI estable por un periodo de tiempo está relacionado con el perfil de calidad y seguridad del producto [38,100].
<b>Sistema contenedor cerrado</b>	Vial estéril de vidrio	Con el objetivo de asegurar el tiempo de vida del producto y asegurar su calidad durante el almacenamiento [96,101].



### 2.2.1.2 Atributos críticos de Calidad (CQAs)

Los atributos críticos de calidad se definen considerando la vía de administración, las características físicas y químicas del fármaco y la seguridad requerida para el producto. Los CQAs establecidos para la nanoformulación de los niosomas con Cas III-ia son presentados en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Atributos críticos de calidad para la nanoformulación de Cas III-ia y mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly.

<b>CQA</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Es CQA</b>	<b>Justificación</b>
<b>Apariencia</b>	Solución incolora	No	El color y apariencia no son importantes para la calidad del producto.
<b>Tamaño de partícula</b>	150 nm	Si	Tamaños de partícula por debajo de 50 nm pueden sufrir fenestración en órganos como el hígado y rápido aclaramiento renal. Por otro lado, tamaños por encima de 200 nm podrían presentar retención en el hígado. Tamaños entre 100 y 150 nm han presentado un mayor tiempo en circulación sanguínea [27,38].
<b>Potencial zeta</b>	±30 mV	Si	La estabilidad física de los sistemas vesiculares depende de la superficie de carga total. Los niosomas en disolución requieren estabilidad física para su almacenamiento y la circulación sistemática [38,102].

<b>Índice de polidispersidad (PDI)</b>	Bajo	Si	Niosomas con altos valores de PDI pueden modificar el perfil de liberación del fármaco, además heterogeneidad en el tamaño de partícula podría incrementar la toxicidad del nanoacarreador.
<b>Eficiencia de encapsulación (EE)</b>	Máxima	Si	Altas eficiencias de encapsulación disminuyen la concentración de fármaco libre, por lo tanto, su toxicidad y su interacción con las proteínas sanguíneas.
<b>Disolventes residuales</b>	Mínimo	Si	Disolventes residuales deben de ser considerados dada su toxicidad inherente. El uso de éter etílico en la formación de los niosomas presenta ventajas. Se trata de un disolvente clase 3, que de acuerdo con las guías ICH, presenta una menor toxicidad. De acuerdo con los datos recabados, en estudios de genotoxicidad de tiempos cortos, el éter etílico ha sido menos tóxico en comparación con el metanol o el diclorometano. Se recomienda un uso máximo de 5, 000 ppm [103].

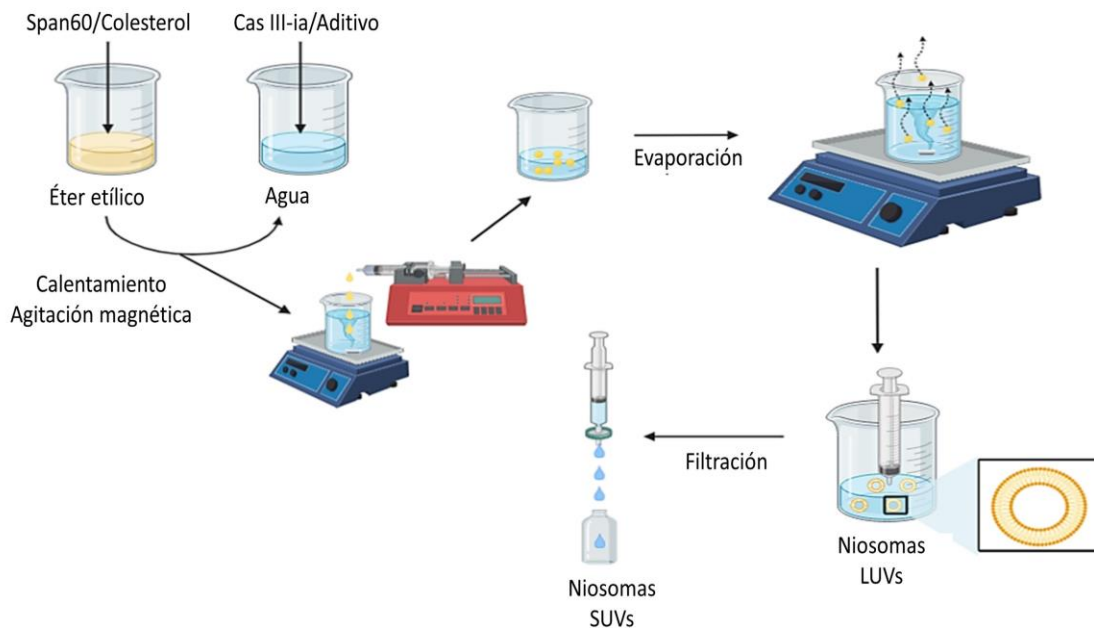
### *2.2.1.3 Parámetros críticos del proceso (CPPs) y atributos críticos del material (CMAs)*

CPPs y CMAs son variables del proceso y de la formulación que afectan directamente los CQAs y deberían ser monitoreados y controlados para asegurar la calidad. Los CPPs y los CMAs, obtenidos a partir de la materia prima y el método de formación de los niosomas, fueron identificados con el

diagrama de Ishikawa y se evaluó su nivel de impacto (alto, medio o bajo) sobre los CQAs (tamaño de partícula, EE, PDI y carga superficial) con una matriz de riesgo.

### 2.2.2 Formación de los niosomas

Una vez que se definió el perfil de calidad y los atributos de calidad del producto. Los niosomas con Casiopeínas y sin Casiopeínas fueron preparados utilizando el método de inyección del éter [49,104] con modificaciones, tal como se describe a continuación: Span 60 y colesterol (relación molar 1:1) [56,105], fueron disueltos en éter etílico. La Casiopeína III-ia y la mezcla de Casiopeína III-ia/Casiopeína VIII-gly fueron disueltas en agua destilada. Los compuestos evaluados para la estabilidad física del sistema fueron disueltos en el disolvente orgánico (colato de sodio y esterealamina) o en agua destilada (pluronic F127 y monoestereato de polietilenglicol), de acuerdo con su solubilidad. Posteriormente, la disolución orgánica fue agregada a la disolución acuosa, por goteo lento mediante una bomba de infusión (kdScientific modelo 100 series), bajo agitación magnética. El disolvente orgánico fue removido de la disolución acuosa con agitación magnética y a temperatura ambiente durante una hora. De esta manera, se obtuvieron vesículas grandes unilamelares (LUVs), por lo que, la suspensión resultante fue filtrada a través de filtro de jeringa (Merck Millex™, PES 0.22 µm) con el objetivo de obtener niosomas pequeños unilamelares (SUVs). El blanco de niosomas fue preparado de la misma forma que el niosoma con Casiopeínas. En el Esquema 2 se ilustra la metodología para la formación de los niosomas.



**Esquema 2.** Método formación de los niosomas mediante el método de inyección del éter.

Con las variables obtenidas y definidas a partir del análisis de riesgo, se llevó a cabo el diseño experimental. Previo al desarrollo de los diseños se llevó a cabo una evaluación de la interacción, usando espectroscopía UV-Visible, de los compuestos a utilizar para la formación de los niosomas con las Casiopeínas, con el objetivo de observar si dichas sustancias presentaban interacciones fuertes con las moléculas de cobre. Además, se evaluó la interacción de la Casiopeína III-ia con la membrana de Poliéstersulfona (PES), mediante espectroscopía UV-Visible, para corroborar la integridad de las Casiopeínas posterior a la filtración. Se desarrolló un análisis térmico para evidenciar que no existía una degradación térmica de las Casiopeínas a la temperatura de transición de fases del span 60 (60 °C). Las condiciones experimentales se describen en el apartado 2.2.4.5 y 2.2.4.6. Además, previo a realizar el diseño experimental, se evaluaron las cuatro sustancias propuestas (SA, CS, MoPEG y P), bajo condiciones previamente reportadas [106]. De acuerdo con los resultados reportados en el apartado 3.1.1.1.2, se encontró que el pluronic F127 era el aditivo que presentó una menor polidispersidad y un mayor potencial zeta, por lo cual los diseños experimentales y la formación de los niosomas optimizados se llevaron a cabo con este copolímero. Con base en lo anterior, para la concentración total de span60/colesterol/pluronic F127 (S/C/P): el pluronic F127 fue usado en un rango de 2.5-5 % de concentración molar; el colesterol y el span 60

se utilizó en un rango de 47.5-48.5 % para cada uno, considerando una relación molar entre ellos de 1:1.

### 2.2.3. Calidad por diseño: Diseño experimental

Una vez que se identificaron y clasificaron todas las variables que pueden tener impacto sobre los CQAs, un diseño de cribado (Plackett-Burman) y un diseño factorial fueron utilizados con el objetivo de modelar y optimizar la nanoformulación de niosomas con Casiopeina III-ia y mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly. Los diseños experimentales fueron creados y analizados con el software estadístico Minitab 17 (State College, Pennsylvania, USA). Para todas las corridas experimentales, los niosomas con y sin Cas III-ia, se realizaron de acuerdo con los descrito en la sección 2.2.2.

#### *2.2.3.1 Diseño Plackett-Burman*

De acuerdo con el diagrama de Ishikawa y la matriz de riesgo, son nueve variables las que tienen un mayor impacto en la formación de los niosomas, por lo cual fueron evaluadas en un primer diseño (Plackett-Burman) con el objetivo de identificar los factores más importantes que afectan los CQAs. Los factores evaluados fueron: tiempo de evaporación (A), velocidad de agitación durante la evaporación (B), temperatura de inyección (C), velocidad de inyección (D), velocidad de agitación durante la inyección (E), volumen del disolvente (F), concentración de Cas III-ia (G), concentración de Span/Colesterol/Pluronic F127 (S/C/P) (H) y concentración del Pluronic F127 (P) (I). Las respuestas evaluadas fueron tamaño de partícula ( $Y_1$ ), índice de polidispersidad ( $Y_2$ ), carga superficial ( $Y_3$ ) y eficiencia de encapsulación ( $Y_4$ ). Cada factor fue evaluado a un nivel bajo (-1) y un nivel alto (+1). Tres puntos centrales (0) fueron agregados al diseño para agregar curvatura al modelo. De acuerdo con estudios de potencia y tamaño de muestra, 15 corridas experimentales, 1 réplica, 1 bloque y 3 puntos centrales fueron suficientes para generar el diseño con una resolución III. Los diagramas de Pareto y análisis de varianza fueron usados para demostrar la influencia de cada factor sobre la respuesta. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Diseño Plackett-Burman. Donde: **Tamaño de partícula:** Y<sub>1</sub> **PDI:** Y<sub>2</sub> **Carga superficial:** Y<sub>3</sub>  
**Eficiencia de encapsulación:** Y<sub>4</sub>. Donde S/C/P es Span60/colesterol/Pluronic F127.

Nivel	Evaporación		Inyección				Formulación				Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>
	A	B	C	D	E	F	G	H	I					
-1	30	50	40	10	50	2.5	60	200	2.5					
0	60	100	50	30	100	3.75	130	600	3.75					
1	90	150	60	50	150	5	200	1000	5					
Corrida	A	B	C	D	E	F	G	H	I					
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	219 ± 29.80	0.478 ± 0.08	-234	07.53 ± 1.03	
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	229 ± 01.87	0.279 ± 0.00	-333	19.65 ± 0.08	
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	227 ± 01.90	0.378 ± 0.00	-331	31.07 ± 0.09	
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	139 ± 02.10	0.214 ± 0.01	-307	21.44 ± 0.10	
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	206 ± 05.00	0.317 ± 0.04	-284	16.33 ± 0.14	
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	321 ± 07.86	0.354 ± 0.05	-342	40.94 ± 0.05	
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	189 ± 09.01	0.435 ± 0.03	-281	10.98 ± 0.82	
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	199 ± 09.89	0.421 ± 0.06	-269	19.19 ± 0.77	
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	340 ± 03.65	0.281 ± 0.01	-333	19.68 ± 0.35	
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	123 ± 00.38	0.268 ± 0.01	-255	10.79 ± 0.79	
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	329 ± 08.98	0.403 ± 0.02	-328	15.36 ± 0.07	
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	197 ± 02.88	0.303 ± 0.02	-332	22.86 ± 0.13	
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	230 ± 05.97	0.367 ± 0.04	-310	16.35 ± 0.26	
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	190 ± 02.32	0.240 ± 0.00	-277	10.50 ± 0.17	
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	236 ± 02.88	0.365 ± 0.03	-312	16.90 ± 0.08	

Evaporación: **A:** tiempo (min); **B:** velocidad de agitación (rpm) Inyección: **C:** temperatura (°C); **D:** velocidad de inyección (mL/hora); **E:** velocidad de agitación (rpm); **F:** volumen del disolvente (mL) Formulación: **G:** Concentración de Cas III-ia(μM); **H:** Concentración de S/C/P (μM); **I:** concentración de P. **Tamaño de partícula:** Y<sub>1</sub> **PDI:** Y<sub>2</sub> **Carga superficial:** Y<sub>3</sub> **Eficiencia de encapsulación:** Y<sub>4</sub>. Donde S/C/P es Span60/colesterol/Pluronic F127.

### 2.2.3.2 Diseño factorial 2<sup>k</sup>

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir del diseño de cribado, los tres principales efectos (concentración de S/C/P, concentración del fármaco y velocidad de agitación durante la inyección) fueron usadas para llevar a cabo un diseño factorial de dos niveles con tres factores. Las variables que no fueron estadísticamente significativas o no tuvieron un mayor impacto sobre los efectos evaluados fueron fijadas en algún valor de acuerdo con la descripción de la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones para la formación de los niosomas en el diseño factorial 2<sup>3</sup>.

<b>Evaporación</b>	Tiempo	60 min	Tiempo estimado para la evaporación de éter etílico
	Velocidad de agitación	50 rpm	Agitaciones bajas generan un menor costo energético
<b>Inyección</b>	Temperatura	50 °C	Temperatura de transición de fases (T <sub>c</sub> ) del Span 60 es 60 °C. Se ha visto que el colesterol puede reducir la T <sub>c</sub> del tensoactivo [99]
	Velocidad de inyección	40 mL/h	Chiraz y colaboradores reportaron que la velocidad de inyección no tiene un efecto significativo en el tamaño promedio de la vesícula [107].
	Velocidad de agitación	<b>Variable</b>	
	Volumen del disolvente	2.5 mL	Volúmenes de disolvente más bajos a 2.5 mL puede incrementar el tamaño de partícula dada la rápida evaporación del disolvente. Volúmenes más grandes que 2.5 mL podría implicar un mayor disolvente residual
<b>Formulación</b>	Concentración de CasIII-ia	<b>Variable</b>	
	Concentración de S/C/P	<b>Variable</b>	

Concentración de P 3% Se ha recomendado una concentración del aditivo de 2.5-5 %. Ya que se ha reportado que mayores concentraciones se puede inhibir la formación de los niosomas [45].

Una vez establecidas las tres variables a evaluar para llevar a cabo el diseño factorial (Tabla 6) se realizaron pruebas de potencia y tamaño de muestra. En total se realizaron 20 corridas experimentales que fueron divididos en cuatro bloques con dos réplicas cada bloque y 4 puntos centrales en total, con un diseño base de 3,8 con una resolución de diseño de IV. Las 20 corridas fueron creadas y los resultados fueron analizados con Minitab 17.

**Tabla 6.** Diseño factorial y diseño central compuesto para la optimización de la nanoformulación de la Cas III-ia. **Tamaño de partícula:** Y<sub>1</sub> **PDI:** Y<sub>2</sub> **Carga superficial:** Y<sub>3</sub> **Eficiencia de encapsulación:** Y<sub>4</sub>. Donde S/C/P es Span60/colesterol/Pluronic F127.

Nivel	Concentración de S/C/P	Concentración de Cas III-ia	Velocidad de agitación	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	
-1	200	60	50					
0	600	130	100					
1	1000	200	150					
Corrida	Bloque							
1	1	1	-1	1	144 ± 2.20	0.19 ± 0.023	-332	40.44 ± 0.22
2	1	-1	-1	-1	158 ± 3.84	0.22 ± 0.027	-341	29.52 ± 0.29
3	1	0	0	0	223 ± 2.15	0.25 ± 0.020	-308	17.78 ± 0.97
4	1	-1	1	1	163 ± 1.24	0.22 ± 0.013	-301	11.26 ± 0.25
5	1	1	1	-1	350 ± 2.92	0.27 ± 0.006	-293	04.50 ± 0.33
6	3	1	-1	1	169 ± 0.21	0.21 ± 0.006	-392	35.72 ± 0.27
7	3	-1	-1	-1	166 ± 2.63	0.22 ± 0.028	-404	24.46 ± 0.29
8	3	-1	1	1	143 ± 2.70	0.26 ± 0.025	-315	15.02 ± 0.26
9	3	1	1	-1	387 ± 11.24	0.46 ± 0.047	-293	04.21 ± 0.40
10	3	0	0	0	204 ± 2.62	0.27 ± 0.007	-345	14.96 ± 1.34
11	2	-1	1	-1	178 ± 3.23	0.30 ± 0.039	-292	15.38 ± 0.37



12	2	1	1	1	170 ± 2.31	0.30 ± 0.019	-305	15.36 ± 0.56
13	2	-1	-1	1	148 ± 2.06	0.23 ± 0.009	-379	28.98 ± 0.31
14	2	0	0	0	209 ± 3.58	0.31 ± 0.038	-320	13.40 ± 0.83
15	2	1	-1	-1	140 ± 0.87	0.24 ± 0.006	-356	32.35 ± 0.50
16	4	1	1	1	233 ± 4.26	0.32 ± 0.029	-312	07.61 ± 0.18
17	4	-1	1	-1	233 ± 3.75	0.35 ± 0.051	-275	09.90 ± 0.21
18	4	-1	-1	1	157 ± 1.83	0.33 ± 0.042	-371	30.34 ± 0.08
19	4	0	0	0	240 ± 2.20	0.26 ± 0.003	-303	09.64 ± 0.50
20	4	1	-1	-1	174 ± 4.09	0.31 ± 0.012	-365	30.83 ± 0.11
21	--	40	130	100	189 ± 7.00	0.25 ± 0.008	-342	20.21 ± 0.57
22	--	1160	10	100	223 ± 2.00	0.23 ± 0.010	-297	23.06 ± 0.54
23	--	600	32	100	149 ± 0.66	0.21 ± 0.008	-377	35.56 ± 0.06
24	--	600	228	100	260 ± 2.06	0.27 ± 0.015	-307	12.69 ± 0.24
25	--	600	130	30	298 ± 6.72	0.29 ± 0.010	-358	27.77 ± 0.32
26	--	600	130	170	267 ± 0.50	0.26 ± 0.011	-351	12.06 ± 0.00
27	--	600	130	100	246 ± 3.11	0.36 ± 0.006	-341	22.77 ± 1.23
28	--	600	130	100	247 ± 4.43	0.29 ± 0.043	-360	19.69 ± 1.79

### 2.2.3.3 Diseño central compuesto (CCD)

El diseño central compuesto fue obtenido a partir de la extensión del diseño factorial, donde se agregaron puntos axiales (también llamados puntos de estrella) que fueron añadidos con el propósito de obtener gráficas de superficie de respuesta. Lo anterior permitió mejorar la potencia estadística al añadir ocho corridas experimentales (dos puntos centrales y seis puntos axiales) al diseño factorial previamente realizado. En este sentido, el CCD permite optimizar la respuesta y obtener un mejor entendimiento del sistema y sus variables. Con los resultados obtenidos del diseño factorial y del CCD (Tabla 6), se obtuvieron ecuaciones de predicción con lo cual fue posible el mapeo de cada variable en el espacio del diseño, lo que permitió seleccionar la configuración óptima para cada factor. El diseño fue creado y analizado con el software Minitab 17.

#### 2.2.4.- Formulación optimizada: Caracterización de niosomas con casiopeínas

Posterior al análisis de riesgo y al diseño experimental, la formulación optimizada fue caracterizada por varias técnicas para determinar la morfología y las características físicas, tamaño de partícula, encapsulación del fármaco, liberación del fármaco, estudios de actividad *in vitro* e *in vivo*.

##### *2.2.4.1.- Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)*

Con el objetivo de obtener el tamaño de partícula e índice de polidispersidad, tanto para las corridas de los diseños experimentales como para las muestras optimizadas, se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). Para tamaño de partícula, PDI y potencial zeta, se utilizó el equipo Zetasizer Nano Zen 3600 con un ángulo de dispersión de 173°, la viscosidad del agua utilizada es de 0.8872 y el índice de refracción de 1.496 a 25 °C, se utilizó una celda zeta dip. Se midieron tres réplicas independientes para cada muestra a temperatura ambiente. La dispersión niosomal no fue diluida.

##### *2.2.4.2.- Carga superficial*

La superficie electrocinética fue determinada mediante la carga superficial de la partícula. Lo anterior fue medido con detector de carga de partícula Mutek PCD 03. Una muestra de los niosomas fue diluida con agua desionizada (2.5 mL de muestra/7.5 mL de agua).

##### *2.2.4.3.- Eficiencia de encapsulación (EE)*

La eficiencia de encapsulación permitió cuantificar el fármaco encapsulado. Las muestras fueron centrifugadas a 12,150 x g a 4 °C, durante una hora. La cantidad de Cas III-ia no encapsulada que se encontró en el sobrenadante fue cuantificado espectrofotométricamente (espectrofotómetro UV-visible de arreglo de diodos 8452A) a  $\lambda = 294$  nm. Para cada lote, un blanco de niosomas (sin Cas III-ia) fue preparado con la misma concentración de niosomas. Se construyeron curvas de calibración para cuantificar el porcentaje del compuesto en encapsulado, en un rango de concentración de  $8 \times 10^{-6}$  M -  $8 \times 10^{-4}$  M. La eficiencia de encapsulación fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EE = \frac{\text{Cantidad de CasIII – ia encapsulada}}{\text{Cantidad total de Cas III – ia utilizada para la preparación de los niosomas}} \times 100$$

#### *2.2.4.4.- Microscopía electrónica*

La morfología de los niosomas fue analizada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) [JOEL-JEM-2010] por tinción negativa y mediante microscopía electrónica de transmisión acoplada a barrido (STEM) [Bruker Nano GmbH-12498]. Una gota de la muestra de niosomas con y sin Casiopeínas fue directamente colocada sobre una rejilla de níquel FC con película continua de carbono. La rejilla se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se colocó una gota de acetato de uranilo al 1 % (p/v) para la tinción negativa.

#### *2.2.4.5.- Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)*

Los estudios de FTIR y FTIR-AR fueron llevados a cabo para verificar la encapsulación de la Cas III-ia. Los niosomas/Cas III-ia, niosomas/mezcla de Cas III-ia/VIII-gly, blanco de niosomas y Casiopeínas sin encapsular fueron caracterizados mediante la pastilla de KBr para FTIR (Nicolet Avatar 320, Thermo Scientific). El análisis se realizó en modo transmitancia con un rango espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

La espectroscopía ATR-FTIR se utilizó para observar las bandas características de la Casiopeínas y de los niosomas con Casiopeínas. Las muestras liofilizadas (niosomas/Cas III-ia, niosomas/mezcla Cas III-ia/VIII-gly, blanco de niosomas y Casiopeínas libre) fueron evaluadas en un equipo Nicolet iS5 con un accesorio para ATR iD5 Thermo Scientific. El análisis se realizó en modo transmitancia con un rango espectral de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### *2.2.4.6.- Análisis térmico*

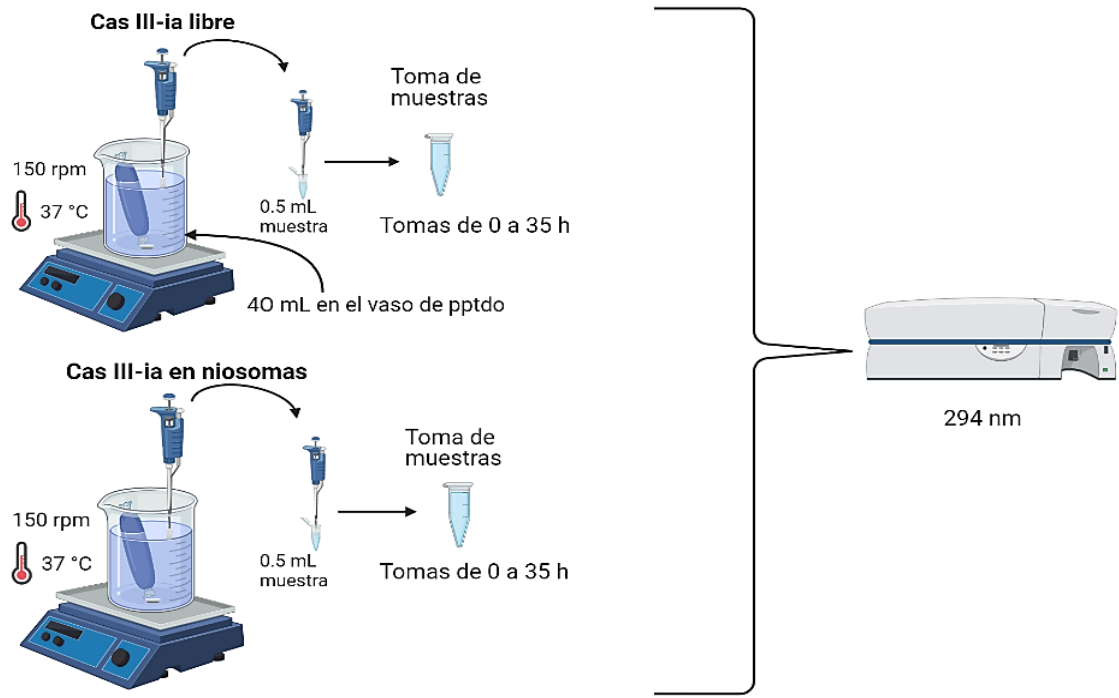
Calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) fueron utilizados para caracterizar el comportamiento térmico de los niosomas y los niosomas con Casiopeínas. Para los estudios de DSC (DSC/700 Mettler Toledo), una muestra liofilizada de 2 mg fue colocada en una charola de aluminio con un rango de calentamiento de 20 a 300 °C a una velocidad constante de calentamiento de 10 °C/min. Para los estudios de TGA (TGA 4000 system, PerkinElmer, 100-240 V/50-60 Hz), una muestra de 10 mg fue calentada en un rango de 10 a 550 °C a una velocidad de calentamiento constante de 10 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

#### 2.2.5.- Estudios de estabilidad física

Con el objetivo de evaluar la estabilidad física de los niosomas, tres réplicas de la nanoformulación optimizada (niosomas con y sin Casiopeínas) fueron colocadas en un vial de vidrio de 3 mL. Cada muestra (n=3) fue colocada en una cámara de temperatura y humedad controlada marca MAYASA modelo CEHT 12000, a 40 °C y 75 % de humedad relativa. El tamaño de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidad fue medido al inicio y a los tres meses de inicio del análisis. El proceso fue llevado de acuerdo con lo descrito en la norma mexicana NOM-073-SSA1-2015.

#### 2.2.6.- Estudios de liberación *in vitro*

Se evaluó el perfil de liberación de la Casiopeína III-ia utilizando el método de diálisis. Una bolsa de diálisis de celulosa regenerada de 12-14 kDa (SpectrumLabs, Asheville, NC) fue hidratada y lavada durante una hora y media. La bolsa fue sellada y colocada en un vaso de precipitado conteniendo 40 mL de buffer de fosfatos (compartimento receptor) y se mantuvo a  $37 \pm 0.5$  °C con agitación constante de 160 x g. Una muestra de 0.5 mL del niosoma con Cas III-ia fue colocada dentro de la bolsa de diálisis (compartimento donador). Se tomaron muestras del compartimento receptor a determinados periodos de tiempo hasta alcanzar las 35 horas. El volumen tomado del compartimento receptor fue reemplazado por con un volumen de amortiguador igual al removido. Una muestra de niosomas sin Cas III-ia y Cas III-ia libre fueron evaluadas bajo las mismas condiciones. La liberación del fármaco fue determinada mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 294 nm. Para la cuantificación de la Cas III-ia liberada, se usaron curvas de calibración. En la Figura 15, se presenta la metodología utilizada para los estudios de liberación.



**Figura 15.** Esquema de estudios de liberación del fármaco, mediante el método de la bolsa de diálisis.

Los datos obtenidos a partir del análisis de liberación *in vitro* fueron ajustados a distintos modelos y ecuaciones cinéticas, con el objetivo de conocer el mecanismo de liberación del fármaco de los sistemas vesiculares. A continuación, se describen los modelos cinéticos utilizados:

Cinética de orden cero

Se libera la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo. Se representa por una ecuación lineal de la forma:

$$L_t = L_0 + k_0 \cdot t$$

Donde:  $L_t$ : Liberación del fármaco en el tiempo  $t$ ;  $L_0$ : Cantidad inicial del fármaco presente en los niosomas;  $t$ : tiempo;  $k_0$ : constante cinética

## Cinética de primer orden

La velocidad de liberación es proporcional a la cantidad de fármaco remanente en el sistema nanoparticulado. Se representa por la siguiente ecuación:

$$\ln(L_t) = -k_1 \cdot t + \ln(L_0)$$

Donde:  $k_1$ : constante cinética de primer orden

## Modelo de Higuchi:

Este modelo describe la liberación del fármaco como un proceso de difusión a través de la matriz de la nanopartícula. Esta difusión está basada en la ley de Fick, que depende de la raíz cuadrada del tiempo. La ecuación del modelo de Higuchi es la siguiente:

$$L_t = k_H t^{1/2}$$

Donde  $k_H$ : Constante de disolución de Higuchi

## Modelo de Korsmeyer-Peppas

Modelo matemático que describe si la liberación del fármaco puede estar basado en una difusión fickiana o no fickiana. Se utiliza la ecuación:  $L_t = Kt^n$  ó  $\ln(L_t) = \ln k + n \cdot \ln(t)$

Donde:  $n$ = exponente de difusión;  $k$ : constante de liberación, y depende de la geometría del sistema.

Con este modelo se puede conocer si la liberación se da por medio de un mecanismo Fickiano ( $n=0.5$ ), siendo la difusión el principal mecanismo implicado, o a un mecanismo de difusión anómalo (no Fickiano) con  $n>0.5$ . Valores cercanos a 1 indican que la liberación se realiza a velocidad constante debido a procesos de hinchamiento y relajación de las cadenas poliméricas, lo que se denomina transporte "Caso II". Cuando el valor de  $n$  se encuentra entre 0.5 y 1, son indicativos de un mecanismo más complejo dominado por procesos de difusión y relajación de las cadenas poliméricas, denominado transporte "anómalo". En el caso de las esferas, Peppas y Ritger en 1987 propusieron un valor diferente para  $n$ , siendo 0.43 para la difusión Fickiana y 0.85 para transporte tipo Caso II.

### 2.2.7. Estudios *in vitro* en células

Los estudios de citotoxicidad *in vitro* fueron llevados a cabo para evaluar el efecto de la Cas III-ia nanoencapsulada en una línea tumoral de cáncer de mama triple negativo hormonal independiente (MDA-MB-231). Brevemente, se cultivaron células en placas de 96 pozos con  $2 \times 10^4$  células cada pocillo y 100  $\mu\text{L}$  del medio. Las placas se incubaron a 37 °C y a una atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ , después de 24 h, el medio fue retirado y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de las dispersiones de blanco de niosomas, niosomas con Cas III-ia, niosomas con mezcla de Cas III-ia/VIII-gly, Cas III-ia libre y mezcla de Cas III-ia/VIII-gly libre con un rango de concentración de 1 a 106  $\mu\text{M}$ . Los cultivos celulares fueron expuestos a los tratamientos durante 24 y 48 horas. Finalmente, el medio fue retirado y las placas fueron fijadas y posteriormente teñidas con sulforrodamina B para evaluar la viabilidad celular según el procedimiento descrito por Skehan [108].

### 2.2.8.- Estudios *In vivo* en ratones BALB/C

Los estudios *in vivo* fueron realizados utilizando 36 ratones hembra BALB/c de 5 semanas de edad que fueron donados por el bioterio de la FES Zaragoza. Los ratones estuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22 °C), una humedad relativa de 50-60 %, ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Los ratones tuvieron acceso a comida y agua ad libitum. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las regulaciones nacionales para uso y cuidado de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo experimental bajo el cual se llevó a cabo el estudio fue aprobado por el comité de ética de las FES-Zaragoza (FEZ-CE/22-118-08). Los ratones fueron implantados con  $1 \times 10^4$  células 4t1 de un modelo de cáncer de mama metastásico, contenido en 100  $\mu\text{L}$  de suero libre de RPMI. La disolución fue inyectada vía subcutánea cerca de la almohadilla mamaria (4° par). Posterior a la aparición del tumor (cerca de los 10 días después de la implantación), los tratamientos fueron administrados vía intraperitoneal (ip). Los 30 animales fueron divididos en 6 grupos: control; solución de glucosa al 5 % (SG); Cas III-ia (6 mg/kg) 6 dosis, una cada 4 días; cis-Pt 4 dosis, una cada 7 días; niosomas/SG (1.45 mg/kg) 4 dosis, una cada 4 días; niosomas/Cas III-ia (1.45 mg/kg/6 mg/kg) 6 dosis una cada 4 días. Los animales se pesaron al inicio y final del tratamiento; los tumores fueron pesados y medidos al final del tratamiento. El porcentaje de peso perdido y la toxicidad fue calculado para cada animal.

# III RESULTADOS Y DISCUSIONES

## 3.1- Aplicación de Calidad por Diseño

Un producto farmacéutico debe cumplir un perfil de calidad, el cual está basado principalmente en la ruta de administración, la forma de dosificación y la aplicación terapéutica, entre otras. Lo anterior define los atributos críticos de calidad del producto (CQAs, por sus siglas en inglés) de tal modo que se garantice la seguridad, eficacia y calidad del producto final. Por su parte, la selección de los nanoacarreadores debe estar en función de su fácil escalabilidad, aplicación y compatibilidad con el metalofármaco a encapsular. En el caso de compuestos solubles en agua, como la Cas III-ia, el uso de niosomas como nanoacarreador, resulta de interés, ya que además de que, dada su ventaja de presentar altos porcentajes de encapsulación de fármacos hidrofílicos, se pueden utilizar tensoactivos no iónicos que ya se encuentren aprobados para su uso como excipientes farmacéuticos y, dependiendo de su estructura química, pueden no presentar una reactividad con la Cas III-ia, tal es el caso del Span60, colesterol y pluronic F127. La presencia de las cabezas hidrofílicas y las cadenas hidrofóbicas del Span60 da como resultado la formación de una estructura de doble capa, lo que permite encapsular compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Aunque los niosomas presentan diversas ventajas y se ha dado una amplia investigación en su uso en nanomedicina en los últimos años [109], pueden presentar un alto número de variables para su formulación dependiendo de su diseño. Por lo tanto, se requiere de un buen control sobre las variables de nanoacarreadores para optimizar la formulación de los metalofármacos. Con el uso de calidad por diseño, se espera que los nanoacarreadores puedan disminuir la brecha del paso de los metalofármacos a la clínica. Calidad por diseño permite obtener productos repetibles y reproducibles, utilizando herramientas como análisis de riesgo (Diagrama de Ishikawa y matriz de riesgo) así como en conocimientos científicos previos y diseño del proceso con el objetivo de optimizar una nueva formulación [110].

### 3.1.1 Análisis de riesgo

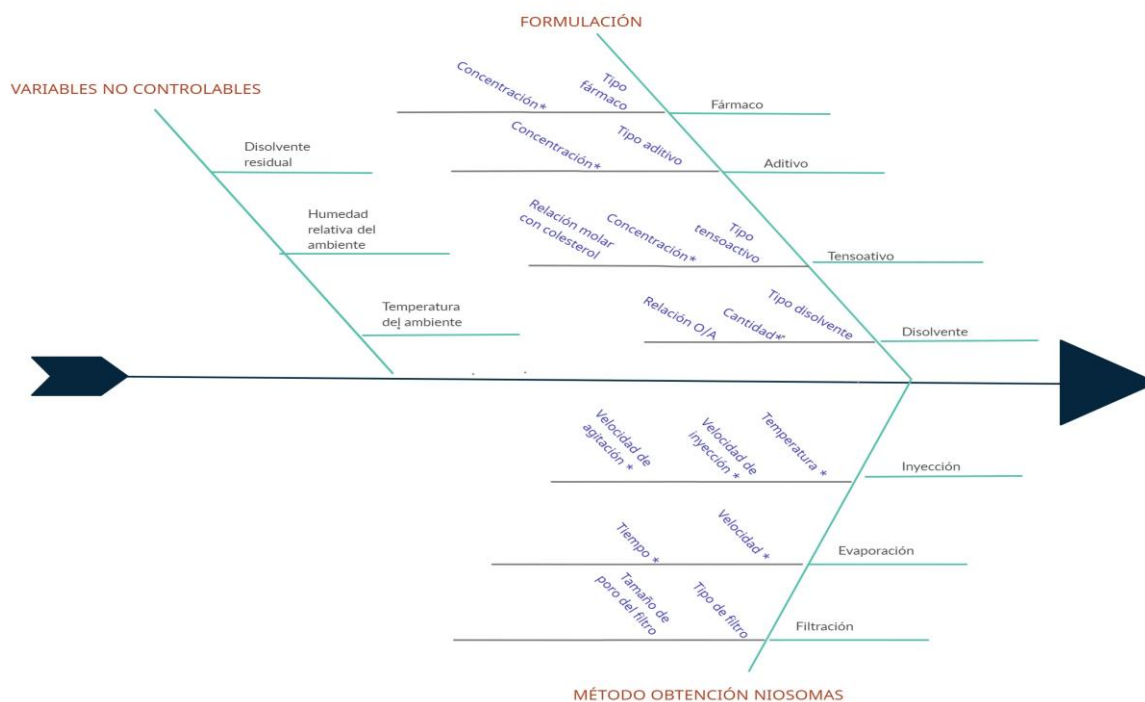
El análisis de riesgo permitió encontrar y evaluar aquellas variables involucradas en el proceso de obtención del niosoma con Casiopeínas III-ia y VIII-gly. Una herramienta que es ampliamente usada es el diagrama de Ishikawa, que puede ayudar a observar las variables que tienen un alto impacto sobre los CQAs (tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación, índice de polidispersidad y carga



superficial). Dichas variables fueron definidas en función de los excipientes, el fármaco y la concentración de estos, así como el método de formación de las vesículas y aquellas variables que no pueden ser controladas.

### 3.1.1.1 Diagrama de Ishikawa

El diagrama de Ishikawa o diagrama de causa-efecto (Figura 16), permitió establecer las variables que tienen efecto sobre los CQAs evaluados. Los factores fueron agrupados dentro de tres secciones (basados en CPPs y CMAs) los cuales fueron relativos a la formulación de los niosomas (Casiopéina III-ia y propiedades de los materiales a utilizar); preparación de los niosomas (método de inyección del éter) y variables no controlables (humedad relativa, temperatura ambiental y disolvente residual). Aquellas variables que fueron marcadas con asterisco fueron las evaluadas durante un diseño de cribado (Plackett-Burman). Las variables no marcadas con asteriscos fueron las no controlables (dependientes del ambiente) y las variables que fueron fijados en un valor continuo o categórico se establecieron de acuerdo con experimentos previamente realizados o de acuerdo con la bibliografía (Tabla 7).



**Figura 16.** Análisis de riesgo mediante un diagrama de Ishikawa, para las variables de entrada de los materiales y los parámetros críticos del proceso sobre los CQAs.

**Tabla 7.** Variables fijas en un valor categórico o continuo, de acuerdo con estudios previos y bibliografía.

<b>Variable</b>	<b>Valor categórico o continuo</b>	<b>Justificación</b>	<b>Referencias</b>
<b>Tipo de fármaco</b>	Casiopéina III-ia y mezcla sinérgica de Cas VIII-gly y Cas III-ia	La Cas III-ia es el compuesto con más estudios preclínicas.	[6,26]
<b>Tipo de tensoactivo</b>	Span 60. En el apartado 3.1.1.1 se presenta la evaluación de la interacción del tensoactivo con la Casiopéina III-ia y VIII-gly	Se ha observado que con el uso Span 60 se obtienen altas eficiencias de encapsulación.	[51]
<b>Relación molar tensoactivo/colesterol</b>	Relación 1:1. En el apartado 3.1.1.1 se presenta la evaluación de la interacción del colesterol con la Casiopéina III-ia y VIII-gly	Se ha observado que cuando se utiliza una relación molar 1:1 (tensoactivo:colesterol) se obtienen vesículas estables	[56,111]
<b>Tipo de aditivo</b>	Pluronic F127. En el apartado 3.1.1.2 se presenta la evaluación de distintos aditivos para la formación de los niosomas	El Pluronic F127 presentó los mejores resultados de PDI y potencial zeta	
<b>Tipo de disolvente</b>	Éter etílico	El éter etílico es un disolvente de clase 3, lo que indica que tiene un bajo potencial tóxico.	[112]
<b>Tipo de filtro</b>	Poliéter-sulfona (PES) (Apartado 3.1.1.1.1)	Al evaluar la interacción por espectroscopía UV-	

		Visible, con filtros de diversos materiales se encontró que el PES no presentó interacciones fuertes con las casiopeínas.	
<b>Tamaño de poro del filtro</b>	200 nm	Una filtración con un tamaño de poro de 200 nm, permite que las vesículas sean pequeñas unilamelares. Además, ayudó a la esterilización del producto.	

#### 3.1.1.1.1 Análisis previos a la formación de los niosomas: Análisis espectroscópico y térmico

Interacción de Casiopeínas con el filtro de PES: Con el objetivo de reducir el tamaño de partícula y esterilizar las dispersiones coloidales de los niosomas. Las formulaciones obtenidas fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$  de Poliéstersulfona (PES). Sin embargo, debido a la naturaleza estructural de las Casiopeínas, fue necesario verificar que no existiera interacción entre los compuestos a encapsular y el filtro de PES, por lo que se evaluó una concentración conocida de Cas III-ia y Cas VIII-gly mediante espectrofotometría UV-Visible antes y después de su paso por el filtro. Se encontró que las bandas asociadas a este compuesto no presentaban cambios (Figura A1), empero, se observó una disminución en la absorbancia de la muestra. La diferencia en concentración de las Casiopeínas antes y después de la filtración se presentan en la Figura A2. De acuerdo con una t-student pareada la concentración de las Casiopeínas antes y posterior a la filtración fueron estadísticamente significativas, por lo que la diferencia en la concentración de la Casiopeína III-ia fue considerada para los cálculos de eficiencia de encapsulación y para el perfil de liberación. La retención de Casiopeína en el filtro podría estar asociado a interacciones débiles, debido a las cargas parcialmente negativas generadas por la sulfona y el carácter catiónico de los compuestos de coordinación.

Análisis espectroscópico: Mediante análisis espectroscópico se evaluó si existía interacciones fuertes entre la Casiopeína III-ia y la Casiopeína VIII-gly con los compuestos a utilizar para otorgar estabilidad a los niosomas, la interacción del span 60 y colesterol se evaluó previamente [106]. Al realizar los estudios espectroscópicos mediante UV-visible, se corroboró que la esfera de coordinación de las Casiopeínas no fue modificada por efecto de los excipientes (Figura A3 y A4), ya que no se observó un desplazamiento en la longitud de onda en las bandas observadas en la región visible, lo que indica que no hubo un cambio en la esfera de coordinación del cobre. No obstante, en la región UV se observó un desplazamiento batocrómico de 220 a 230 nm para la Cas III-ia cuando se encontraban interaccionando con la estearilamina y el monoestereato de PEG, que puede estar asociado a transiciones electrónicas  $\pi$ - $\pi^*$ , mientras que para la Cas VIII-gly no se observaron desplazamientos. El incremento o disminución de la absorbancia puede estar asociada a evaporación del disolvente. Los resultados obtenidos indican que no existe una interacción fuerte que pueda afectar la estructura química de las Casiopeínas.

Análisis térmico: Con el análisis termogravimétrico se evaluó que las Casiopeínas no sufrieran degradación durante la formación de los niosomas. Lo anterior, considerando que la temperatura de transición de fases del Span 60 es a 60 °C. En la Figura A5 se puede observar que no existe algún pico de degradación a la temperatura evaluada (60 °C) para ninguno de los compuestos de coordinación, por lo que la temperatura de formación de los niosomas no causa una degradación térmica de las Casiopeínas. Los resultados anteriores permitieron encapsular las Casiopeínas en los sistemas niosomales.

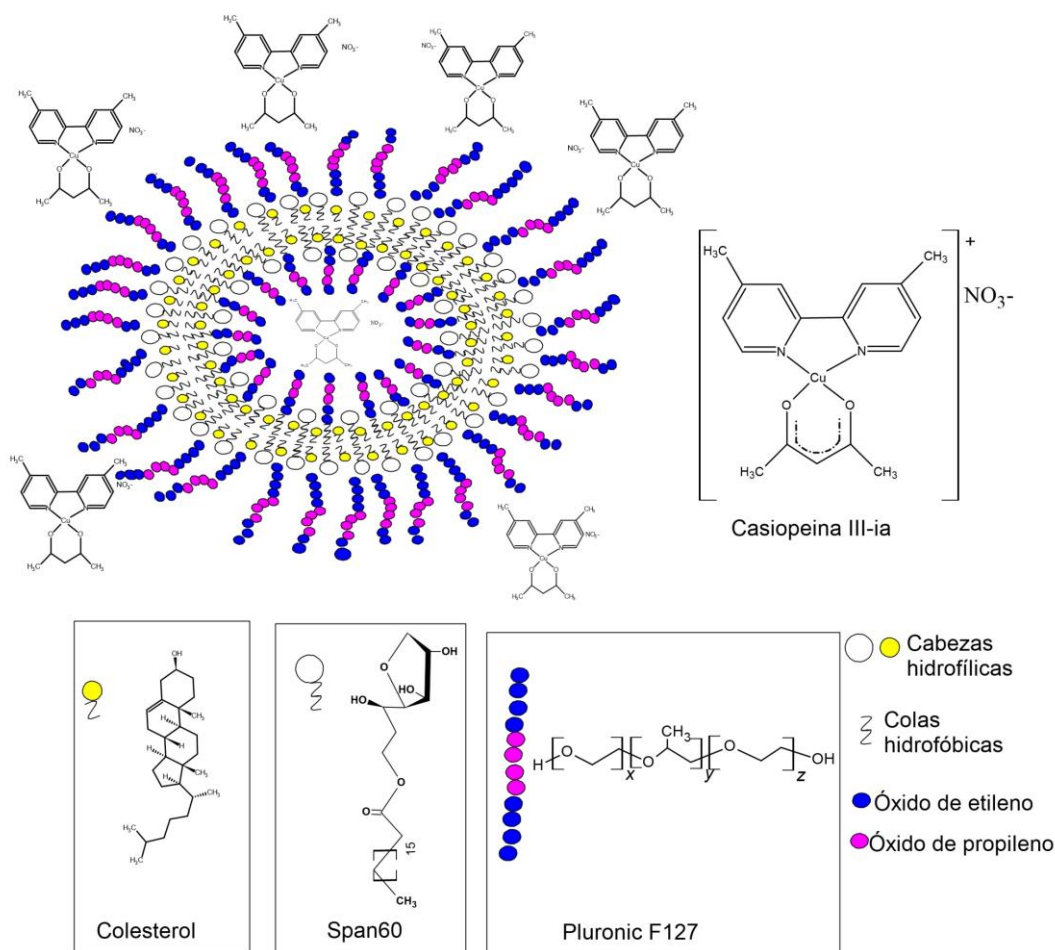
#### 3.1.1.1.2 Análisis previos a la formación de los niosomas: Evaluación del estabilizante físico (aditivo).

Se llevó a cabo la preparación de los sistemas niosomales (sin Casiopeínas) con el objetivo de encontrar el compuesto que otorgara una mejor estabilidad física a las vesículas. Los principales criterios evaluados fueron potencial zeta (mayor o igual a  $\pm 30$  mV) y tamaño de partícula. De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 8), los niosomas preparados con el Pluronic F127 presentaron tamaños de partículas entre 150 y 200 nm, el índice de polidispersidad (PDI) fue menor en comparación con los demás aditivos y el potencial zeta fue alrededor de -30 mV; por lo que el Pluronic fue el compuesto utilizado como aditivo para la formación de los niosomas durante el primer diseño experimental.

**Tabla 8.** PDI, potencial zeta y tamaño de partícula para los sistemas niosomales obtenidos con diversas moléculas. El tamaño de partícula obtenido mediante dispersión dinámica de luz se encuentra en la Figura A6.

<b>Aditivo</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>	<b>Tamaño de partícula (nm)</b>
Colato de sodio	0.517 ± 0.082	-17.4 ± 2.19	495.3 ± 231.8
Esterealamina	0.518 ± 0.146	-12.5 ± 2.14	426 ± 264.6
Monoestereato de Polietilenglicol	0.313 ± 0.028	-13.9 ± 3.66	208.5 ± 46.39
<b>Pluronic F127</b>	<b>0.223 ± 0.036</b>	<b>-33.8 ± 1.98</b>	<b>179.8 ± 8.575</b>

Se ha reportado que el Pluronic F127 presenta bajos índices de polidispersidad en la formación de niosomas y la estabilidad física está dada por impedimento estérico por las cadenas de polióxido de etileno (PEO) y polióxido de propileno (PPO). Asimismo, se ha reportado que cuando se encuentra en forma de monómero puede inhibir el sistema retículo endotelial, lo que permite que permanezca más tiempo en circulación sanguínea [61]. Las cargas negativas en el potencial zeta están dadas por las cargas parcialmente negativas de las cadenas de PPO y PEO. En la Figura 17 se presenta la propuesta de formación de los niosomas con Span60, colesterol y pluronic F127, con la encapsulación de Cas III-ia.



**Figura 17.** Propuesta de formación de los niosomas con Span 60 y colesterol, en presencia de pluronic F127.

### 3.1.1.2 Matriz de riesgo

Las principales variables que afectan la encapsulación de la Cas III-ia en los niosomas, fueron obtenidas mediante el diagrama de Ishikawa. Dichas variables fueron clasificadas, de manera cualitativa, en un impacto alto, medio o bajo, mediante una matriz de riesgo que vincula la probabilidad de ocurrencia y severidad del daño. Lo anterior, con el objetivo de identificar el impacto de los CMAs y CPPs sobre los CQAs. En las Tablas 9 y 10 se presentan las interrelaciones estimadas de los factores críticos seleccionados de CMAs y CPPs. Un riesgo alto no sería aceptable considerando seguridad y eficacia. El riesgo medio es aceptable, pero se requiere investigación, mientras que el riesgo bajo no requiere investigación extra [87]. La clasificación del impacto de cada factor se realizó con base en reportes previos que permitieron obtener conocimiento del desarrollo del espacio e identificar los factores de alto riesgo que pueden impactar la nanoformulación.

**Tabla 9.** Análisis de riesgo basado en atributos críticos del material

	Fármaco	Aditivo (Pluronic F127)	Relación molar con colesterol	Tensoactivo (Span 60)	Disolvente	Referencias
CQAs						
<b>Tamaño de partícula</b>	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Alto	[45–47,49,51,55,57,67,99]
<b>Eficiencia de encapsulación</b>	Alto	Alto	Medio	Alto	Bajo	[46,51,52,54,55,58,63,98,113]
<b>PDI</b>	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Alto	[67,114].
<b>Potencial zeta</b>	Medio	Alto	Bajo	Medio	Bajo	[62,63,99,115]

**Tabla 10.** Análisis de riesgo basado en parámetros críticos del proceso

	Inyección	Evaporación	Filtración	Referencias
CQAs				
<b>Tamaño de partícula</b>	Alto	Bajo	Alto	[112,116–119]
<b>Eficiencia de encapsulación</b>	Medio	Bajo	Medio	[116,118]
<b>PDI</b>	Alto	Bajo	Alto	
<b>Potencial zeta</b>	Medio	Bajo	Medio	

Tomando en cuenta la matriz de riesgo, se obtuvieron las variables a evaluar que presentan un mayor impacto sobre los CQAs. Se dividieron en dos categorías:

- Formulación: Concentración de Cas III-ia; concentración de S/C/P; concentración de pluronic F127.

- Método de producción: tiempo de evaporación del disolvente; velocidad de agitación durante la evaporación; temperatura de inyección; velocidad de inyección; velocidad de agitación durante la inyección y volumen de disolvente.

### 3.1.2. Diseño experimental

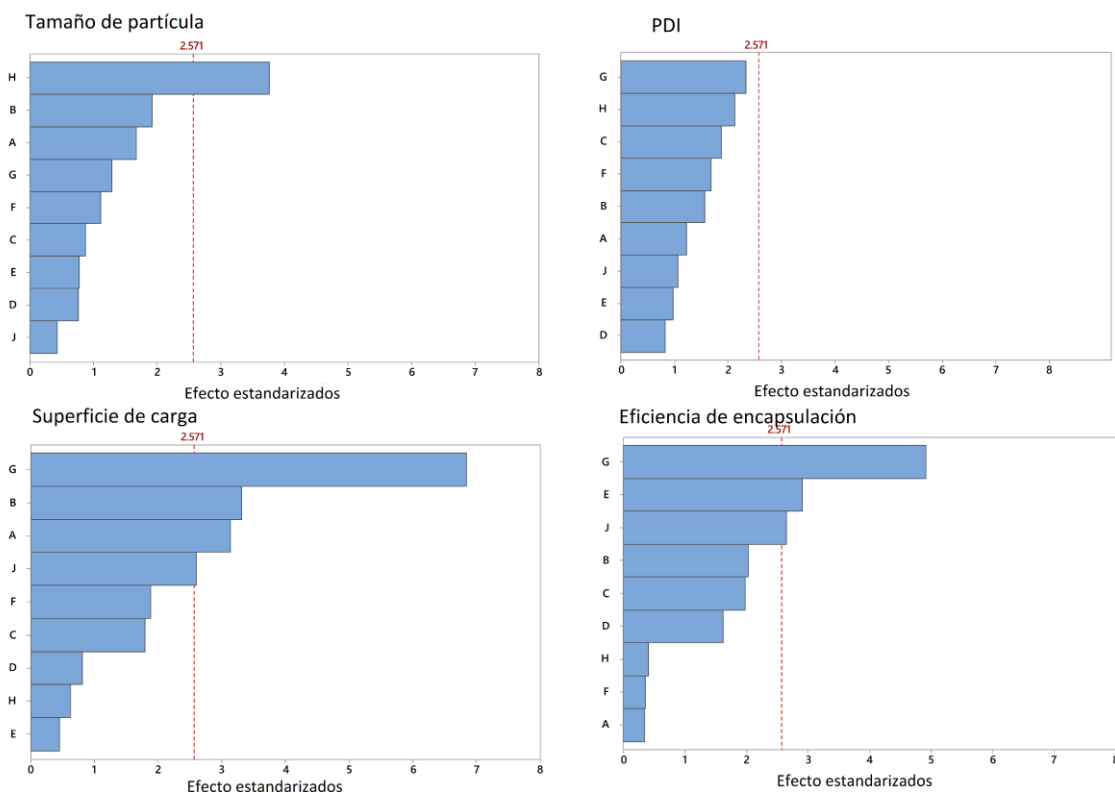
Los diseños experimentales se realizaron usando la Cas III-ia. Una vez que se definieron las variables principales con el análisis de riesgo, se llevaron a cabo los diseños experimentales con el objetivo de evaluar como las variables y su interacción afectan los CQAs. Un primer diseño, Plackett-Burman, fue realizado para el cribado de variables que permitió discernir aquellas variables que si tienen impacto sobre la formulación. Posteriormente, un diseño factorial y un diseño central compuesto se llevaron a cabo para modelar y optimizar la nanoformulación.

#### *3.1.2.1 Diseño Plackett-Burman*

El diseño Plackett-Burman se llevó a cabo con el objetivo de cribar y seleccionar las variables principales que afectan a los CQAs. Según los estudios de potencia y el tamaño de la muestra, para las nueve variables evaluadas fueron necesarias 15 corridas experimentales con tres puntos centrales y una réplica. Los experimentos se realizaron aplicando las condiciones experimentales específicas para cada corrida (Tabla 4) y los resultados se analizaron con el software Minitab 17. El diseño Plackett-Burman permite obtener diagramas de Pareto de efectos normalizados que ayuda a identificar las causas que tienen mayor efecto sobre los CQAs. Lo anterior, en conjunto con un análisis de varianza, permitió encontrar las variables que fueron estadísticamente significativas. Además, pruebas de normalidad y gráficas de residuos permitieron observar la normalidad de los datos y la bondad de ajuste (gráfica A7). Para los diagramas de Pareto (Figura 18), las variables se organizan mostrando primero aquellas con los efectos más altos y las variables por encima de la línea roja fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), lo que se confirmó con el análisis de varianza. En este sentido, se encontró que las tres variables más frecuentes y estadísticamente significativa fueron la concentración de la Casiopeína III-ia, la concentración de S/C/P y la velocidad de inyección, las cuales tuvieron mayor impacto en la eficiencia de encapsulación, PDI, el tamaño de partícula y la carga superficial. Lo anterior, coincide con otros estudios, donde se ha visto que el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación es altamente dependiente del peso molecular del fármaco a encapsular [65]. Además, cuando se evaluó tamoxifeno encapsulado en niosomas, se



observó que, al incrementar la concentración del fármaco el tamaño de partícula sufría cambios considerables [120]. En estudios realizados con liposomas, se ha observado que el tamaño de partícula, PDI y eficiencia de encapsulación son dependientes de la concentración de los fosfolípidos y estructura química de éstos [121].



**Figura 18.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados ( $\alpha=0.05$ ) de tamaño de partícula, PDI, superficie de carga y eficiencia de encapsulación para el diseño Plackett-Burman. Donde A: tiempo de evaporación, B: velocidad de agitación durante la evaporación; C: Temperatura de inyección; D: Velocidad de inyección; E: velocidad de agitación durante la inyección; F: Volumen de disolvente; G: concentración del fármaco; H: Concentración de S/C/P; J: Concentración de Pluronic F127.

Una vez que se obtuvieron las variables con mayor impacto sobre las CQAs, se llevó a cabo un diseño factorial para modelar de manera adecuada el comportamiento de los CQAs en función de las variables halladas.

### 3.1.2.2 Diseño Factorial

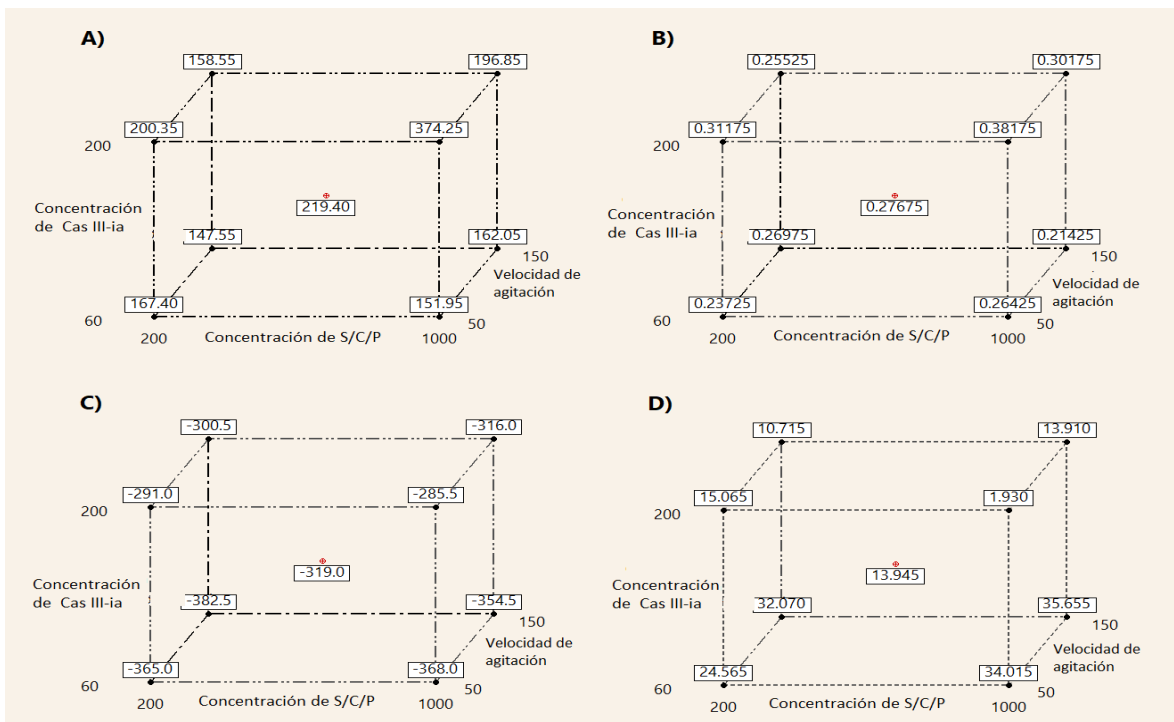
Los tres principales efectos obtenidos a partir del diseño de Plackett-Burman, fueron evaluados en un diseño factorial de dos niveles con tres factores. Las variables que no fueron estadísticamente significativas o no tuvieron un mayor impacto en los CQAs evaluados fueron fijados en algún valor de acuerdo con la descripción de la Tabla 11.

**Tabla 11-** Condiciones para la formación de los niosomas durante el diseño factorial 2<sup>3</sup>

Evaporación	Tiempo	60 minutos	Tiempo estimado de evaporación del éter etílico.
	Velocidad de agitación	50 rpm	Velocidades de agitación bajas requieren un bajo costo energético.
Inyección	Temperatura	50 °C	Temperatura de transición de fases (Tc) del Span 60 es 60 °C. Sin embargo, se ha visto que el colesterol puede reducir la temperatura de transición de fases (Tc) [99].
	Velocidad de inyección	40 mL/h	Chiraz y colaboradores reportaron que la velocidad de inyección no tiene un efecto significativo sobre el tamaño de las vesículas [107].
	<b>Velocidad de agitación</b>	<b>Variable</b>	
	Volumen del disolvente	2.5 mL	Un pequeño volumen de disolvente podría causar partículas más grandes debido a una rápida evaporación. Un volumen más alto que 4 mL podría causar más disolvente residual.
Formulación	<b>Concentración de Cas III-ia</b>	<b>Variable</b>	
	Concentración de S/C/P	<b>Variable</b>	

	Concentración de Pluronic F127	3 %	Una concentración del aditivo de 2.5-5 % molar se recomienda. Si hay una mayor concentración podría inhibir la formación de los niosomas. [45].
--	--------------------------------	-----	---

Con el uso de pruebas de potencia y tamaño de la muestra, veinte corridas experimentales fueron llevadas a cabo, dividido en cuatro bloques, con dos réplicas y un punto central en cada bloque, con una base de diseño de 3,8. De acuerdo con gráficas de normalidad y gráficas de residuos, los datos tienen un comportamiento normal (Figura A8). Para todos los casos (excepto para PDI), se observó un buen ajuste al modelo lineal obtenido mediante el diseño factorial; donde  $R^2$  fue 97.35 %, 75.15 %, 97.77 % y 92.91 % para tamaño de partícula, PDI, EE y superficie de carga, respectivamente, lo que indica que el diseño puede modelar adecuadamente el comportamiento de las respuestas en función de las tres variables. Las gráficas de cubo (Figura 19) fueron obtenidas a partir de diseño factorial, y muestra la relación entre los factores y las respuestas (PDI, carga superficial, eficiencia de encapsulación y tamaño de partícula).

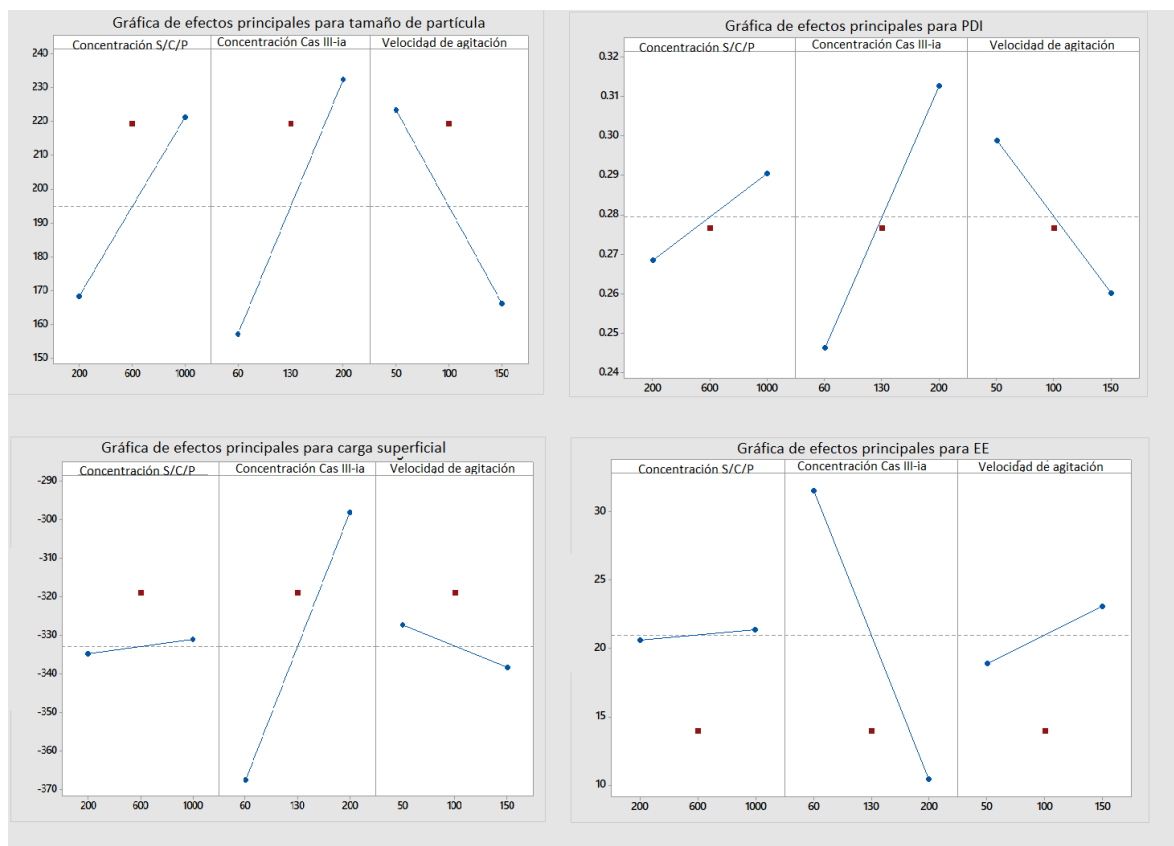


**Figura 19.** Gráfica de cubos obtenidas a partir del diseño factorial  $2^3$ . Donde A) Tamaño de partícula; B) PDI; C) Potencial de carga y D) Eficiencia de encapsulación.

En la Figura 19 se puede observar que la concentración del fármaco presenta el mayor efecto en las respuestas evaluadas, siendo evidente que la concentración de Cas III-ia es directamente proporcional al tamaño de partícula y PDI e inversamente proporcional para la EE y la superficie de carga. Por su parte, la velocidad de agitación y la concentración de S/C/P no generan un cambio considerable en ninguno de los efectos evaluados. No obstante, mediante diagramas de Pareto (Figura A8) y análisis de varianza (Tabla 1, A2), se encontró que todas las variables y sus interacciones son estadísticamente significativas, por lo cual tienen que ser tomadas en cuenta durante la formulación optimizada. Se ha reportado que la concentración del tensoactivo es uno de los principales factores que influyen en el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación [88,122]. Sin embargo, con los resultados obtenidos, se determinó que la mayor influencia la tiene el fármaco encapsulado. En este sentido, García y colaboradores [65] reportaron que el tamaño de partícula depende directamente del peso molecular del compuesto a ser nanoencapsulado.

Se obtuvieron gráficas factoriales de medias ajustadas a partir del diseño factorial. Estas gráficas muestran la relación entre la respuesta con las variables individuales. En la Figura 20 se puede observar que las líneas paralelas al eje "x", formadas por el nivel más bajo y el más alto (puntos de esquina), indican que la respuesta no cambia de acuerdo con los factores evaluados. Por otro lado, si las líneas son perpendiculares al eje "x", entonces la respuesta varía de acuerdo con los valores del factor evaluado. Para todas las respuestas evaluadas (PDI, EE, partícula de tamaño y superficial de carga), la concentración de Cas III-ia es perpendicular al eje x, lo que indica que es la variable con mayor efecto y confirma lo observado mediante los gráficos de cubo. Cuando la concentración de Cas III-ia aumenta, la eficiencia de encapsulación disminuye y el tamaño de partícula aumenta al igual que el PDI, donde, aunque existe un aumento, la variación se encuentra en un rango de 0.24 a 0.31, lo que nos habla de sistemas homogéneos. Además, se observa que cuando la concentración de Cas III-ia aumenta, la carga superficial tiende a valores más cercanos al cero, probablemente debido a que la Casiopeína se concentra en la superficie del niosoma, lo que se discutirá más adelante. Además, se observó que, para la carga superficial y eficiencia de encapsulación, es mínimo el efecto que causan la concentración de S/C/P y la velocidad de agitación. A partir de las gráficas factoriales de medias ajustadas, es posible observar si el sistema presenta curvatura y por lo tanto podría ser ajustado a un modelo cuadrático. En las mismas gráficas (Figura 20) se pueden observar puntos rojos que representan los puntos centrales que permite observar la presencia de la curvatura de los datos; si los puntos centrales se encuentran alejados de las líneas de los puntos de esquina, entonces los datos tienen curvatura y podrían tener un mejor ajuste al modelo cuadrático que

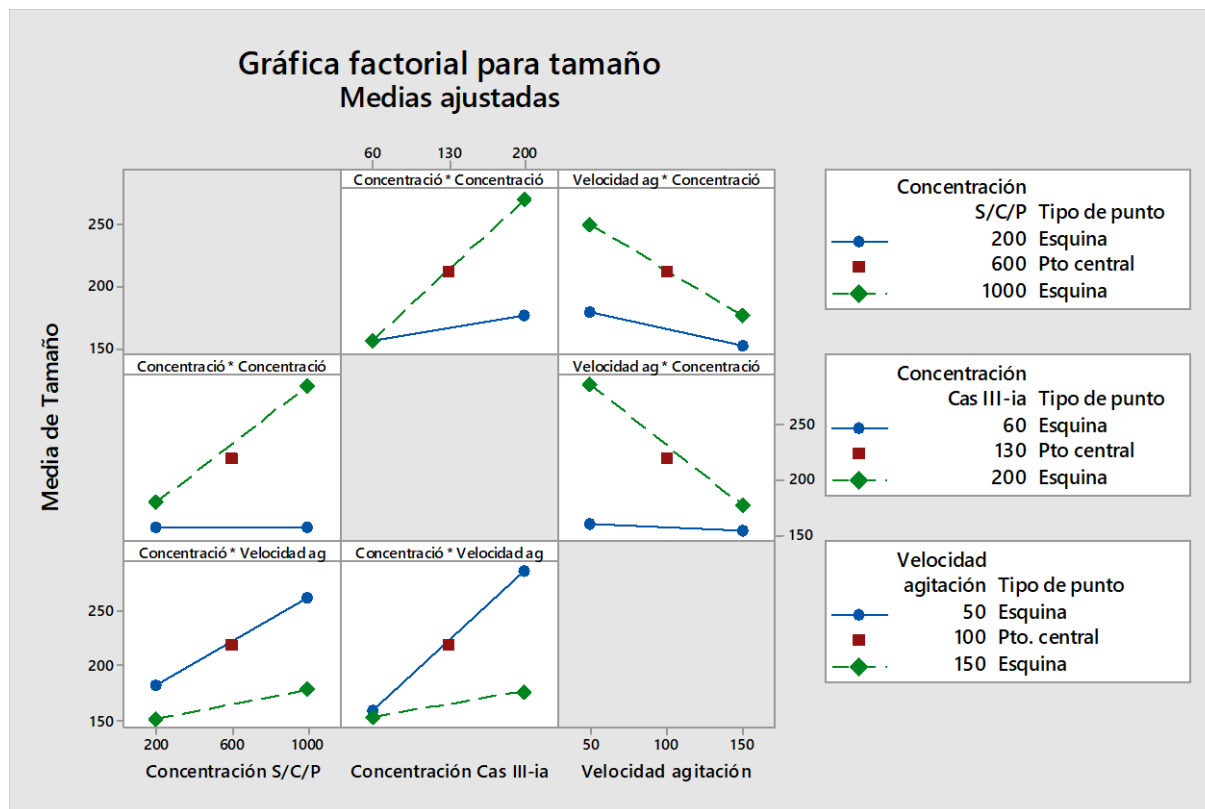
puede ser obtenido a través de un diseño central compuesto (CCD, por sus siglas en inglés). De acuerdo con las gráficas, para las respuestas de tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación y superficie de carga, un ajuste a un modelo cuadrático podría significar un mejor modelado de los datos. Lo anterior fue confirmado mediante el análisis de varianza, donde la curvatura fue estadísticamente significativa.



**Figura 20.** Gráfica de efectos principales para tamaño de partícula, PDI, superficie de carga y EE.

La gráfica de interacciones para tamaño de partícula (Figura 21), permite observar cómo es la influencia de la interacción de dos variables sobre una respuesta. Si las líneas de los niveles más altos y más bajos de una de las variables son paralelas, entonces no existe interacción entre los factores. Cuanto menos paralelas sean estas líneas, mayor será la interacción entre las variables. En la gráfica de la Figura 21 se puede observar que cuando la concentración de Cas III-ia es 60  $\mu\text{M}$  no existe una variación en el tamaño de partícula, aun cuando la concentración de S/C/P aumenta de 200 a 1000  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, cuando la concentración de Cas III-ia es de 200  $\mu\text{M}$ , si la concentración de S/C/P aumenta a 1000  $\mu\text{M}$  el tamaño de partícula aumenta. Este efecto también es observado cuando se evalúa la interacción de la concentración de Cas III-ia con la velocidad de agitación durante la

inyección. Lo anterior indica una interacción entre las variables. En las gráficas se puede observar que cuando se evalúa la concentración de Cas III-ia con alguna variable, las líneas tienen a ser perpendiculares. Mediante el diagrama de Pareto (Figura A8) se observó que las interacciones entre los efectos principales fueron estadísticamente significativas, lo que fue confirmado con los análisis ANOVA. Las gráficas de interacción para eficiencia de encapsulación, PDI y carga superficial, son presentadas en la Figura A9.



**Figura 21.** Gráfica de interacción del cambio del tamaño de partícula en función de la interacción de dos variables.

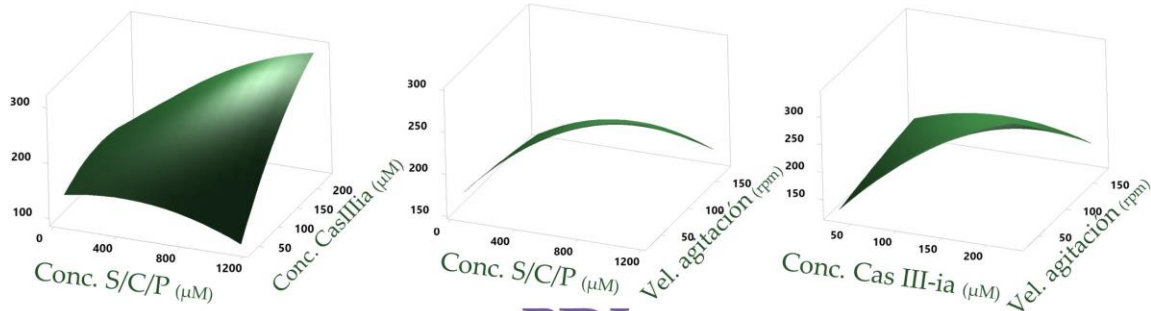
Como se mencionó con anterioridad, mediante el análisis de varianza y las gráficas de efectos principales se observó que el sistema presenta curvatura, por lo que su modelado podría ser más adecuado mediante ecuaciones cuadráticas. Lo anterior se puede obtener mediante un diseño central compuesto a través de la extensión del diseño factorial, al cual se agregan puntos axiales con el propósito de obtener gráficas de superficie de respuesta, que nos permitan observar de manera adecuada el comportamiento de las respuestas en función de la interacción de las variables. Además,

permite el ajuste al modelo cuadrático con las variables lineales, interacción entre variables y términos cuadráticos de variables continuas.

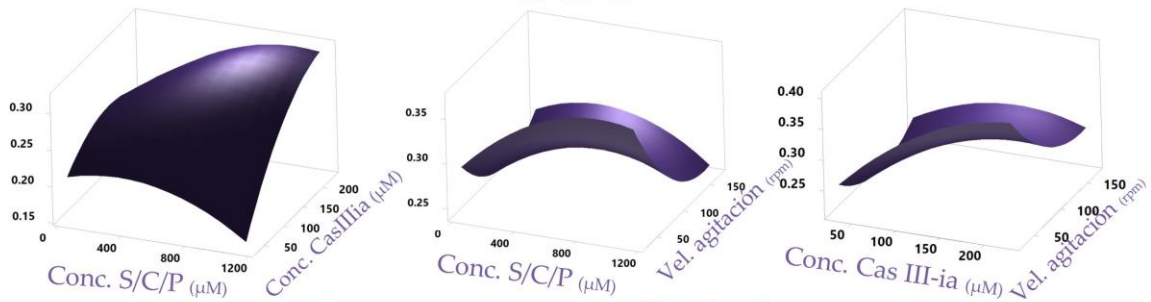
### *3.1.2.2 Diseño Central compuesto*

Para llevar a cabo el diseño central compuesto, ocho corridas experimentales (dos puntos centrales y seis puntos axiales) fueron agregadas al diseño factorial previamente realizado (Tabla 6). Lo que permitió optimizar la respuesta para un mejor ajuste y un mayor entendimiento, con el mapeo de la región de una superficie de respuesta y seleccionando la configuración óptima para cada factor. Los puntos axiales agregados permitieron estimar la curva en términos de primer y segundo orden. Las 20 corridas experimentales realizadas previamente (a partir del diseño factorial) y las ocho nuevas corridas experimentales (del diseño central compuesto) fueron llevadas a cabo y analizadas con el programa Minitab (Tabla 6). A partir de gráfica de residuos y curvas de normalidad, se observó que el diseño fue realizado de manera adecuada (Figura A11). En la gráfica de superficie de respuesta (Figura 22) se observan las interacciones entre las variables. Para todos los casos, el aumento de la concentración de Cas III-ia implica un cambio significativo en las respuestas. Por ejemplo, para la eficiencia de encapsulación se observa que cuando la concentración de la Cas III-ia aumenta, la EE disminuye, independientemente de la variable con la cual se encuentra interaccionando. Lo anterior también puede observarse a partir de gráficas de contorno (Figura A10).

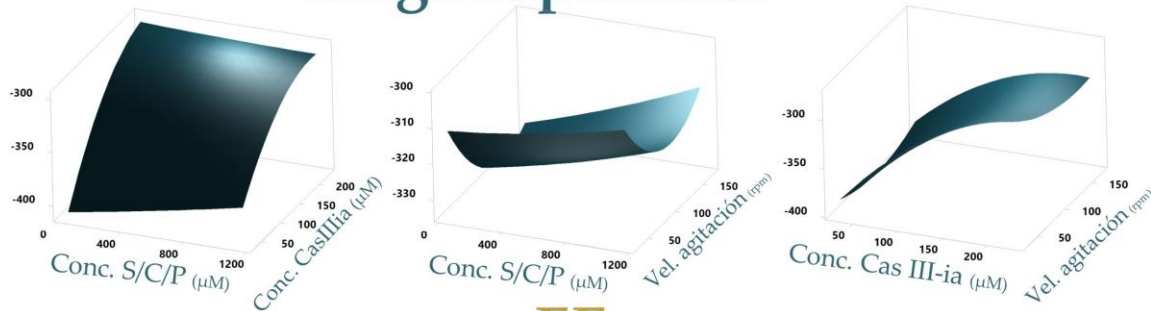
## Tamaño de partícula



## PDI



## Carga superficial



## EE

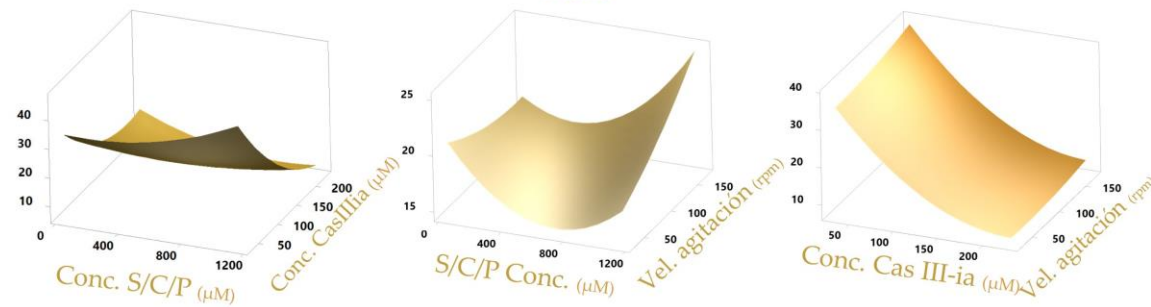


Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta para tamaño de partícula, PDI, superficie de carga y eficiencia de encapsulación.



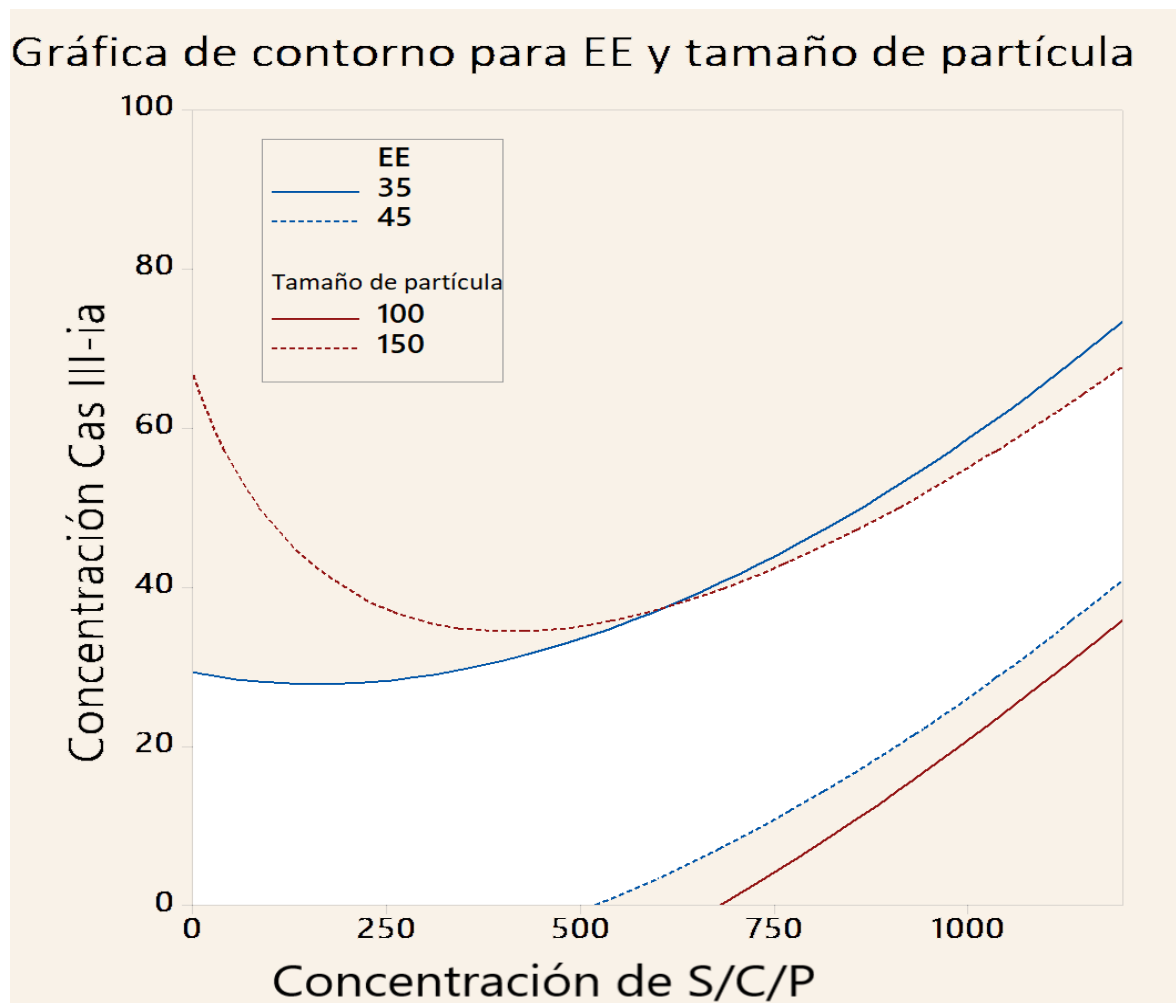
Todas las variables tuvieron un impacto significativo en tamaño de partícula, pero no todos tuvieron influencia en otras respuestas, de acuerdo con los resultados obtenidos con el ANOVA (Tabla 2, A2). Lo anterior indica que la concentración del fármaco es el factor clave en el diseño de los niosomas, tal como se observó en el diseño factorial. Se observó un buen ajuste estadístico, lo que indica que el modelo es apropiado para modelar el comportamiento de los CQAs, cuando se encapsula la Cas III-ia en los sistemas niosomales. Pruebas de normalidad y gráficas de residuos indican que el diseño se llevó a cabo de manera adecuada. Las ecuaciones de regresión de unidades no codificadas para todas las respuestas son presentadas en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Ecuaciones de regresión de unidades no codificados obtenidas a través del diseño central compuesto, donde: **A:** Concentración S/C/P, **B:** Concentración de Cas III-ia y **C:** velocidad de agitación.

<b>Ecuaciones de regresión</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Tamaño de partícula</b> = 57.3 + 0.1578*A + 1.868*B - 0.581*C - 0.000130*A <sup>2</sup> - 0.00441*B <sup>2</sup> + 0.00723*C <sup>2</sup> + 0.000952*A*B - 0.00066*A*C - 0.00748*B*C	95.13 %
<b>PDI</b> = 0.1720 + 0.000082*A + 0.0011*B + 0.00011*C - 0.000002*B <sup>2</sup> + 0.00002*C <sup>2</sup> + 0.000001*A*B - 0.000001*A*C - 0.000004*B*C	66.59 %
<b>Superficie de carga</b> = - 455 0.0263*A + 0.931*B + 0.925*C + 0.000043*A <sup>2</sup> - 0.00093*B <sup>2</sup> - 0.00437*C <sup>2</sup> + 0.000156*A*B + 0.000062*A*C - 0.00129*B*C	76.87 %
<b>EE</b> = 46.75 - 0.0060*A - 0.2448*B - 0.101*C + 0.000012*A <sup>2</sup> + 0.000643*B <sup>2</sup> + 0.000402*C <sup>2</sup> - 0.000103*A*B + 0.000065*A*C - 0.000054*B*C	88.79 %

Con el diseño central compuesto, se obtienen gráficas de contorno superpuesta, en el cual visualmente se pueden identificar las variables factibles para múltiples respuestas. Es decir, se pueden observar las configuraciones de las variables, con lo que se pueden obtener los CQAs deseables. Para esto, se especifica un límite inferior y superior para cada respuesta con respecto a dos variables continuas, mientras que las demás variables se mantienen en una configuración específica. Para la formulación de Casiopeínas en los niosomas, los CQAs más importantes fueron tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación. Se ha reportado que tamaños de partícula entre 100 y 200 nm muestran una adecuada fenestración a través del torrente sanguíneo[36,38]. Por otro lado, una máxima eficiencia de encapsulación permite que el fármaco tenga una menor interacción con las proteínas de la sangre, así como un mayor tiempo en circulación sanguínea. En este sentido,

los límites inferiores y superiores se establecen de acuerdo con los CQAs previamente establecidos. En la Figura 23, se puede observar la gráfica de contorno superpuesta para eficiencia de encapsulación y tamaño de partícula, donde se estableció un límite inferior y superior de 100 y 150 nm respectivamente para tamaño de partícula, mientras que para la eficiencia de encapsulación se estableció 35 % como límite inferior y 45 % como límite superior (dado el espacio de diseño estudiado). La velocidad de agitación durante la inyección se fijó en 170 rpm debido a que se observó que era la variable con menor efecto sobre la nanoformulación. El área blanca de la gráfica es la región factible formada por las dos variables continuas, donde a condiciones dadas de concentración de S/C/P y concentración de Cas III-ia, pueden obtenerse tamaños de partícula de 100 o 150 nm y eficiencias de encapsulación de 35 a 45 %.

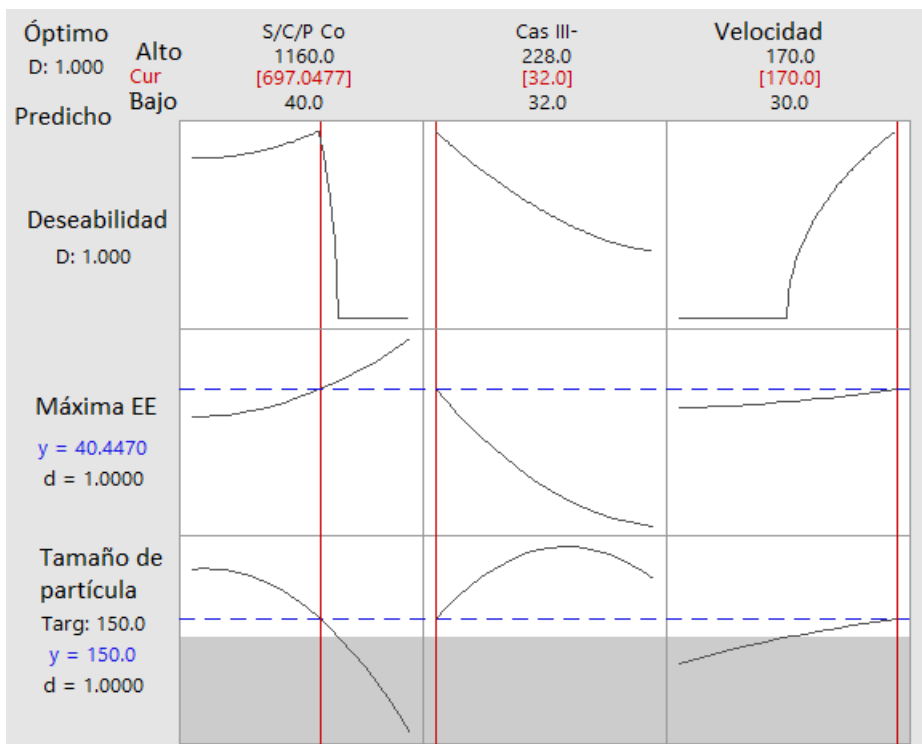


**Figura 23.-** Gráfica de contorno superpuesta para variables múltiples (EE y tamaño de partícula), en función de la concentración de Cas III-ia y la concentración S/C/P.

Los diseños experimentales indican que la concentración del fármaco es el factor principal en el diseño de los niosomas. La concentración S/C/P y la velocidad de agitación durante la inyección tiene un bajo impacto en el tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, sin embargo, deben ser considerados para la formulación de Cas III-ia en niosomas. Con las ecuaciones obtenidas (Tabla 12) se encontraron las condiciones de operación para obtener un tamaño de partícula de 150 nm y una máxima eficiencia de encapsulación.

### **3.2. Formulación optimizada de niosomas con Cas III-ia**

El comportamiento de los CQAs fue modelado en función de las tres variables (concentración S/C/P, concentración de Cas III-ia y velocidad de agitación durante la inyección) a partir de ecuaciones cuadráticas obtenidas mediante el diseño central compuesto. Las ecuaciones cuadráticas ayudaron a describir el efecto principal individual y la interacción de las variables en las respuestas (CQAs). A partir del análisis de variancia, gráficas de residuos y gráficas de normalidad se determinó que las ecuaciones cuadráticas obtenidas son adecuadas para la predicción y optimización de la nanoformulación (Figura A11). Basado en los resultados anteriores, una gráfica de optimización (Figura 24) obtenida a partir del software Minitab 17 fue usada para identificar la mejor combinación de las variables que en conjunto permiten obtener los valores requeridos de CQAs (partícula de tamaño de 150 nm y máxima eficiencia de encapsulación).



Respuesta	Ajuste	DE Ajuste	95 % IC	95 % IP
EE	40.44	3.87	(32.14, 48.73)	(28.35, 52.52)
Tamaño	150.0	19.1	(109.0, 191.0)	(90.2, 209.8)

**Figura 24.** Gráfica de optimización para las respuestas de los principales CQAs, con las variables de entrada en algún valor para obtener las condiciones de CQAs necesarias.

La validación de la metodología aplicada de QBD fue confirmada por la selección de las condiciones operacionales para preparar una formulación optimizada de los niosomas con Cas III-ia (Tabla 13). Además, con las ecuaciones obtenidas se pueden predecir otras formulaciones dentro del espacio del diseño.

**Tabla 13.** Condiciones óptimas de preparación de la nanoformulación de niosomas con Cas III-ia optimizada.

Condiciones de las variables	Valor de CQAs
697 $\mu$ M de concentración de S/C/P	Máxima EE (40%)
32 $\mu$ M de concentración de CasIII-ia	Tamaño de partícula 150 nm
170 rpm de velocidad de agitación	

La Tabla 14 muestra los resultados (valores predichos y observados) obtenidos a partir de las condiciones experimentales de optimización para un tamaño de partícula de 150 nm y una eficiencia de encapsulación máxima (40 %). Los resultados mostraron que los valores experimentales son similares a los predichos. Resultados de pruebas repetibles y reproducibles han sido reportados para sistemas nanoacarreadores en los que se han aplicado herramientas de QbD [72,123,124].

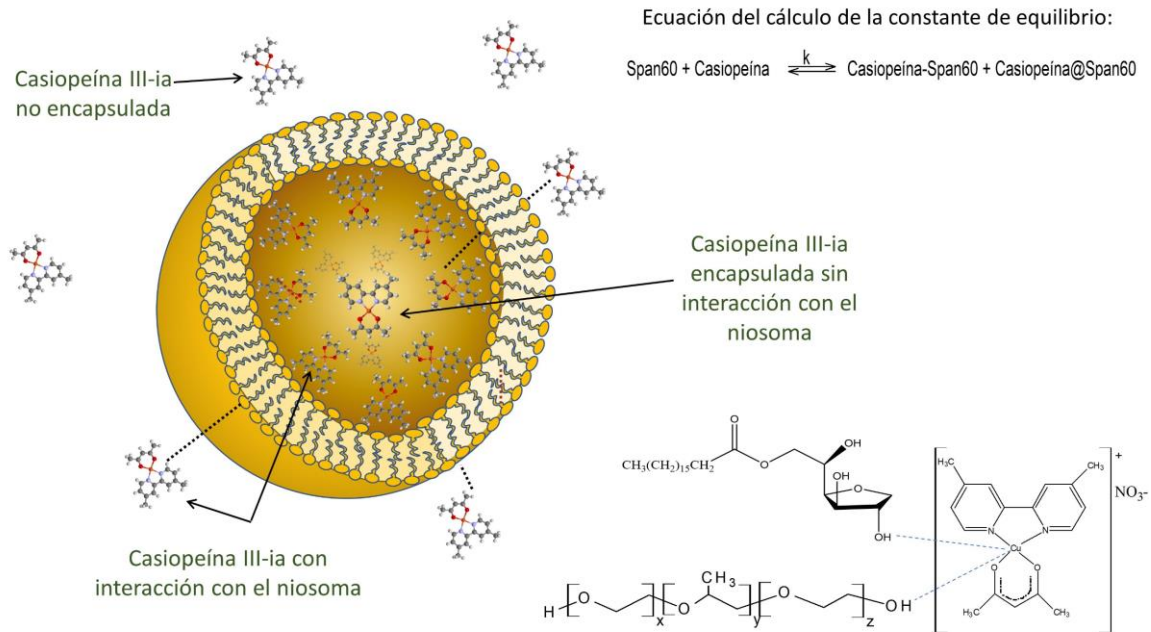
**Tabla 14.** Tamaño de partícula, EE, potencial zeta y PDI de la nanoformulación optimizada de niosomas con y sin Cas III-ia (n = 3).

	Tamaño de partícula (nm)		EE (%)		Potencial zeta (mV)	PDI
	Observada	Predicha	Observada	Predicha		
Niosomas con CasIII-ia	150.4 ± 4.66	150 ± 19.10	39.89 ± 4.99	40.44 ± 3.87	-13.8 ± 1.25	0.234 ± 0.01
Niosomas con mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly	167.3 ± 4.99	---	---	---	-13.3 ± 4.22	0.24 ± 0.05
Blanco de niosomas	215 ± 1.92	-	-	-	-23.4 ± 1.95	0.231 ± 0.01

Para el tamaño de partícula, los valores predichos y experimentales fue de 150 nm (Figura A12). Sin embargo, como se observó, el tamaño de partícula incrementa cuando los niosomas no contenían Cas III-ia (215 nm); este efecto observado es lo contrario a lo comúnmente reportado para compuestos hidrofílicos nanoencapsulados. Usualmente, se ha observado que cuando se encapsulan fármacos hidrofílicos el tamaño de partícula incrementa [125]. El decremento en el tamaño de partícula con la presencia de Cas III-ia podría estar dada por la presencia de enlaces de hidrógeno de la interacción entre los compuestos de cobre y las cabezas hidrofílicas del Span60 y las cadenas del Pluronic F127; sin embargo, esta hipótesis deberá ser confirmada por otros estudios. Además, las moléculas de Cas III-ia podrían estar formando interacciones intermoleculares, conduciendo a decremento en el tamaño de partícula. Se ha observado que la encapsulación de Cas III-ia en nanopartículas de quitosano presenta el mismo comportamiento, con una eficiencia de encapsulación del 6 % [43]. En este trabajo, la eficiencia de encapsulación obtenida fue del 40 % y puede estar dada por el impedimento estérico generado por las cadenas del pluronic F127 ya que, probablemente, las moléculas de Cas III-ia están compitiendo con las cadenas del polímero y están

formando interacciones débiles con ellas. Lo anterior podría explicar el potencial zeta obtenido de -13.8 mV comparada con el potencial zeta de -23.4 mV del niosoma sin Cas III-ia. Por lo tanto, se propone que Cas III-ia podría estar en la superficie de las vesículas, lo que podría disminuir el potencial zeta. Algunos métodos computacionales como DFT o dinámica de partículas disipativas podrían ayudar a confirmar la hipótesis de la interacción entre las moléculas de la Cas III-ia y los compuestos que forman el niosoma; por el momento, estos estudios quedan como perspectiva para este trabajo. Cuando la mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly fue incorporada a los niosomas, se observó que el tamaño de partícula fue aproximadamente de 160 nm, por lo que no existe una modificación sustancial en el tamaño de partícula, por efecto de la mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly.

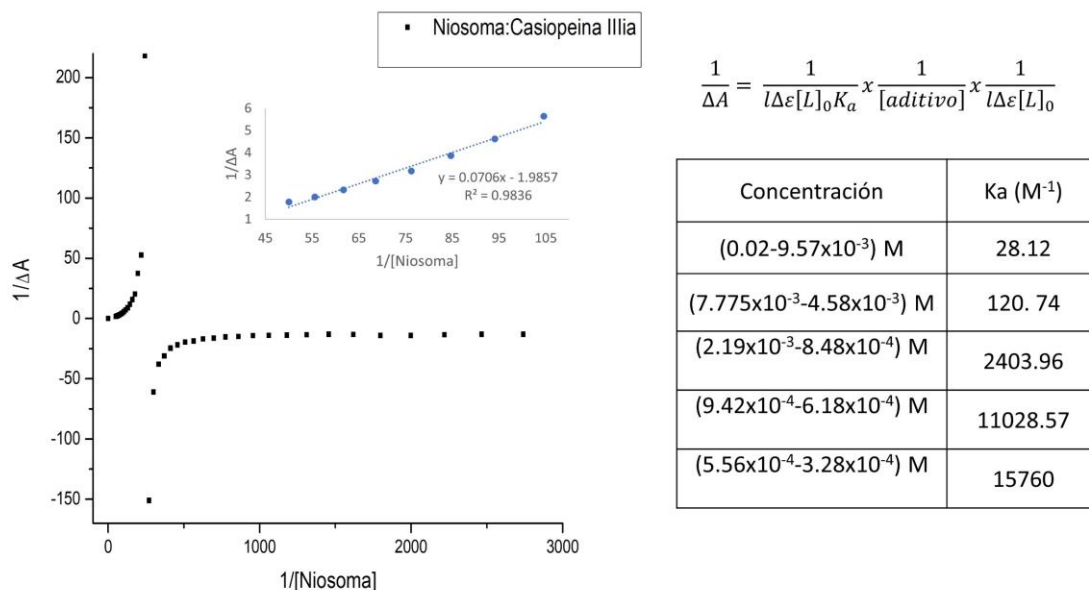
Además, se llevó a cabo un estudio cuantitativo de la interacción de la Cas III-ia con los niosomas (Figura 25), en el que, se varió la concentración de la Casiopeína y la concentración del niosoma se fijó en 660  $\mu$ M. Se asume que la Casiopeína III-ia puede estar encapsulada con o sin interacciones con la membrana del niosoma y se puede encontrar Casiopeína III-ia no encapsulada con y sin interacciones con el niosoma. El análisis de datos se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Hao y Li [51]. Con los estudios anteriores, se calculó la constante de equilibrio y se encontró que el 20 % de la concentración total de la Casiopeína III-ia podría estar interaccionando con la membrana niosomal, lo que explicaría la disminución en el potencial zeta cuando la Casiopeína es incorporada a los niosomas. Se propone que el cobre de la Casiopeína, al tener dos sitios vacantes de manera apical, podría estar interaccionando, mediante interacciones débiles, con los grupos -OH de las cabezas hidrófilas del Span 60 y los -OH del polióxido de etileno del Pluronic F127. Como se mencionó, los grupos -OH pueden estar proporcionando una carga parcialmente negativa a la partícula, la cual se ve disminuida por efecto del carácter catiónico de la Cas III-ia.



**Figura 25.** Posible interacción de la Casiopéina III-ia con los niosomas. Cálculo de la constante de equilibrio a partir del método propuesto por Hao y colaboradores [51].

Con el objetivo de conocer el comportamiento de la interacción de la Casiopéina III-ia con los niosomas, mediante la cuantificación por espectrofotometría UV-Visible, se calculó la constante de asociación de la Cas III-ia con la membrana niosomal. Para esto, se obtuvo la diferencia de absorbancia de la Cas III-ia ( $9 \times 10^{-5}$  M) en presencia de diferentes concentraciones de niosomas ( $2 \times 10^{-3}$  -  $3.6 \times 10^{-5}$  M) en un medio acuoso a 294 nm (Figura 26). Se determinó que la constante de asociación de la Cas III-ia es inversamente proporcional a la concentración del niosoma. Lo que sugiere que a una mayor concentración de la Cas III-ia, la interacción con la membrana niosomal será menor, lo que podría explicar la eficiencia de encapsulación del 40 %. Este fenómeno podría estar asociado al Pluronic F127, ya que al ser altamente dependiente de la concentración podría ocasionar la baja interacción de las vesículas con la Casiopéina III-ia. Es decir, una mayor concentración del Pluronic, podría indicar una menor encapsulación, ya que como se puede observar en los diagramas de Pareto del diseño factorial, la concentración del Pluronic F127 fue estadísticamente significativa para la encapsulación de la Casiopéina. Lo anterior explica la diferencia en la eficiencia de encapsulación del niosoma sin pluronic (75 %), previamente reportado en comparación con el 40 % de encapsulación encontrado en este estudio. Pese a lo anterior, el

Pluronic ha resultado ser un buen candidato para su uso como aditivo, de acuerdo con los estudios de estabilidad física (apartado 3.3.4).



**Figura 26.** Cálculo de la constante de equilibrio. Diferencia de absorbancia de la Casiopeína III-ia ( $9 \times 10^{-5}$  M) sin y con niosomas a diferentes concentraciones ( $2 \times 10^{-2}$ –  $3.6 \times 10^{-5}$  M) en agua a 294 nm.

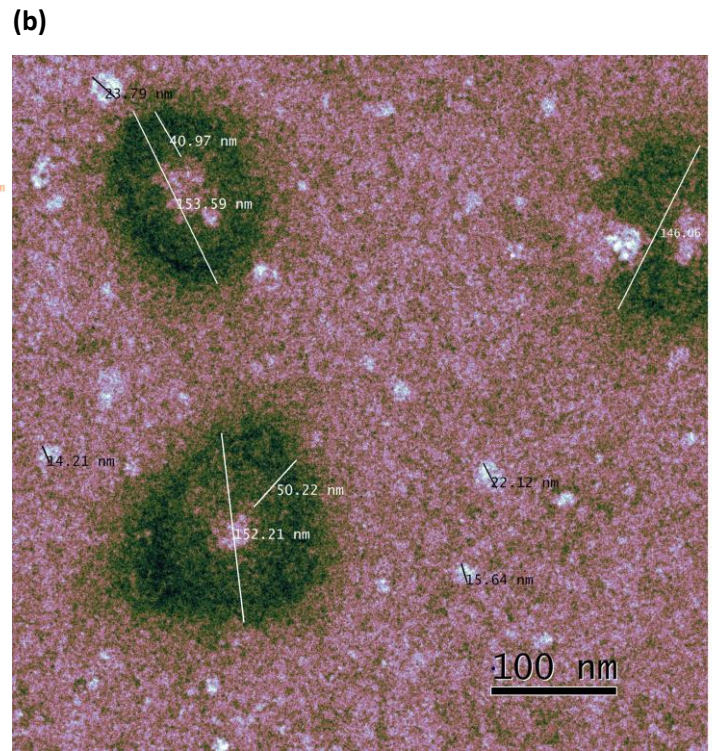
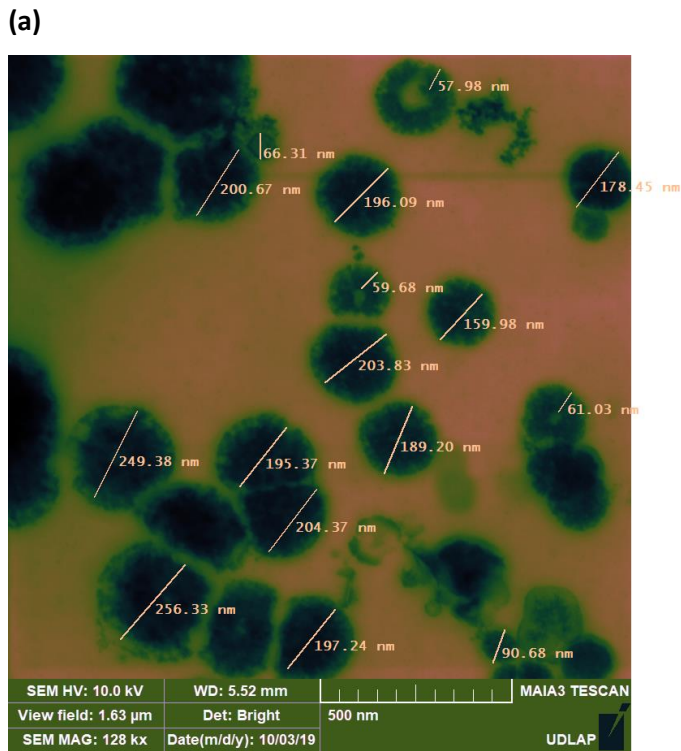
### 3.3.- Caracterización de la nanoformulación optimizada

#### 3.3.1.- Microscopía electrónica

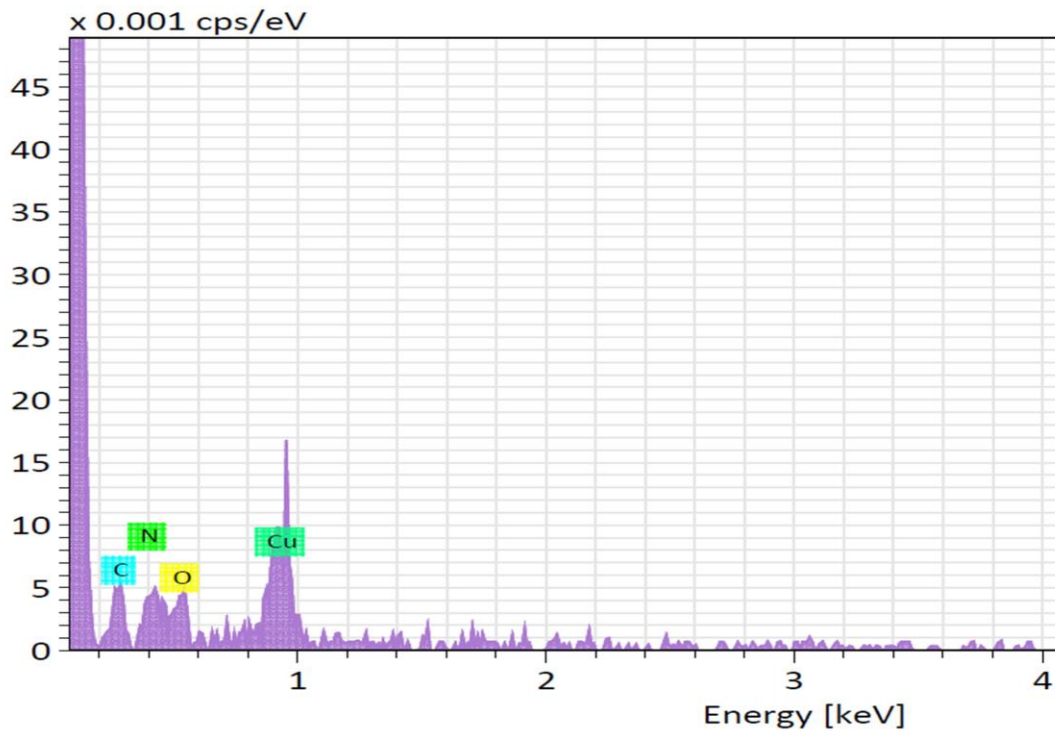
La formulación optimizada fue obtenida y caracterizada, mediante microscopía electrónica (TEM y STEM), donde se observaron sistemas esféricos característicos de sistemas vesiculares [126]. La Cas III-ia en la parte acuosa de la vesícula es observado a través de las imágenes de STEM (Figura 27a). Se puede observar en las micrografías obtenidas en ambas técnicas (STEM y TEM) la presencia del compuesto dentro (TEM) y en la periferia (STEM) de la vesícula que se observa dentro de las áreas más claras dado el contraste generado por los átomos de cobre. La presencia de cobre fue confirmada mediante espectroscopía de energía dispersiva (EDS) (Figura 27 c). En las micrografías obtenidas mediante TEM (Figura 27b) las regiones más brillantes observadas en las vesículas indican que el acetato de uranilo (tinción negativa) se encuentra inmerso en el centro del niosoma,



demostrando que la vesiculación se llevó a cabo. Además, se observaron tamaños de partícula de alrededor de 150 nm, lo que concuerda con los resultados obtenidos a partir de dispersión dinámica de luz (Figura A12). Los resultados mostraron que el espesor de la membrana formado por Span60/colesterol/pluronic F127 es alrededor de 50 nm; la formación de esta bicapa también ha sido observada en otros trabajos [127]. El tamaño del espesor probablemente está asociado a la inclusión de monómeros de pluronic F127 en la membrana niosomal, ya que se ha observado que este copolímero tiene la capacidad de formar vesículas [128]. Lo anterior podría ser corroborado mediante estudios de interacción de la membrana, tal como el estudio realizado por Ritwiset y colaboradores [129]. Además, se observó la formación de micelas del pluronic F127 (Figura A13), ya que su concentración micelar crítica se encuentra por debajo de la concentración a la cual se utilizó para la formación de los niosomas, obteniéndose micelas alrededor de 6 nm. Lo anterior debe ser tomado en cuenta dado que las micelas pueden sufrir fenestración a órganos como pulmones [38]. No obstante, en las pruebas *in vivo*, no se observó una toxicidad inherente a los sistemas vesiculares. La formación de las micelas, además de las vesículas, cuando se utilizó Span 60, colesterol y pluronic, también fue observado por Roy y colaboradores [130].



**(c)**

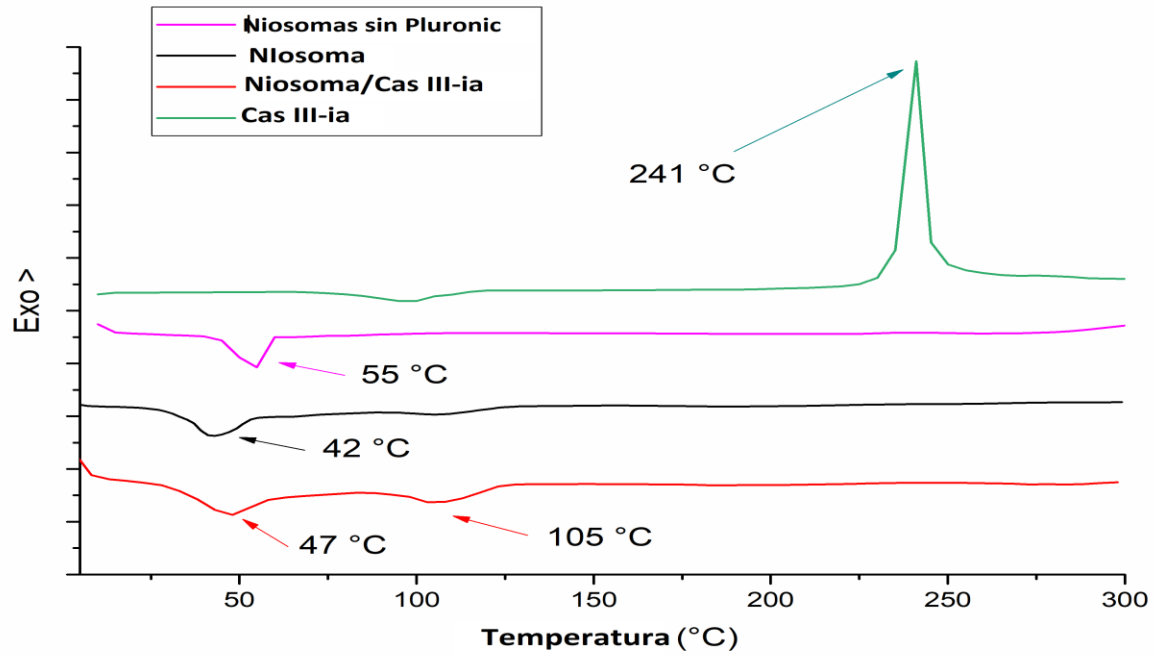


**Figura 27.** Imágenes de **(a)** STEM, **(b)** TEM y **(c)** EDS de la nanoformulación optimizada de niosomas con Cas III-ia y mezcla sinérgica de Cas III-ia/Cas VIII-gly.

### 3.3.2.- Análisis térmico

A partir de la nanoformulación optimizada, análisis térmicos de DCS y TGA fueron llevados a cabo para los niosomas con y sin Casiopeína III-ia y VIII-gly, así como para las Casiopeínas sin encapsular (Figura 28). En el termograma de DSC se puede observar un pequeño pico endotérmico para Cas III-ia alrededor de 85 °C dada la deshidratación de Cas III-ia. Lo anterior fue confirmado mediante TGA, donde se observa la derivada del peso perdido correspondiente a la pérdida de dos moléculas de agua del compuesto. La curva de DCS de niosomas sin Cas III-ia muestra un amplio pico endotérmico a 42 °C, dados los cambios conformacionales y la subsecuente pérdida de cristalinidad de las moléculas de span 60, colesterol y pluronic F127 durante la vesiculación [131,132]. La incorporación de Cas III-ia dentro de los niosomas produjo un desplazamiento en el pico de transición de 47 °C. Dicho incremento puede estar asociado con la existencia de Cas III-ia dentro del niosoma que podría estar cambiando la conformación de la vesícula. El pico endotérmico en el niosoma a 105 °C está asociado con la incorporación del pluronic dentro de la membrana niosomal. Lo anterior soporta la hipótesis que las moléculas de Cas III-ia se encuentran interactuando con la membrana del niosoma. Un pico exotérmico a 241 °C fue observado mediante DSC para la Cas III-ia libre, que corresponde al pico de degradación del ligante del acetilacetato de la Cas III-ia, tal como fue reportado por Miranda [133]. Lo anterior fue confirmado mediante TGA a través de la pérdida de peso del compuesto. Cuando se evaluaron los niosomas con Cas III-ia no se observó el pico a 241 °C ni en DSC ni en TGA. Este comportamiento fue también observado cuando la Cas III-ia fue encapsulada en quitosano y se atribuyó a la incorporación de Cas III-ia dentro de la vesícula [133]. Además, se observó la degradación de los niosomas a 380 °C en TGA. En la Figura A14, se pueden observar los termogramas para los niosomas con las mezclas de Cas III-ia/Cas VIII-gly donde se encontró el mismo comportamiento que con la Cas III-ia.

(a)



(b)

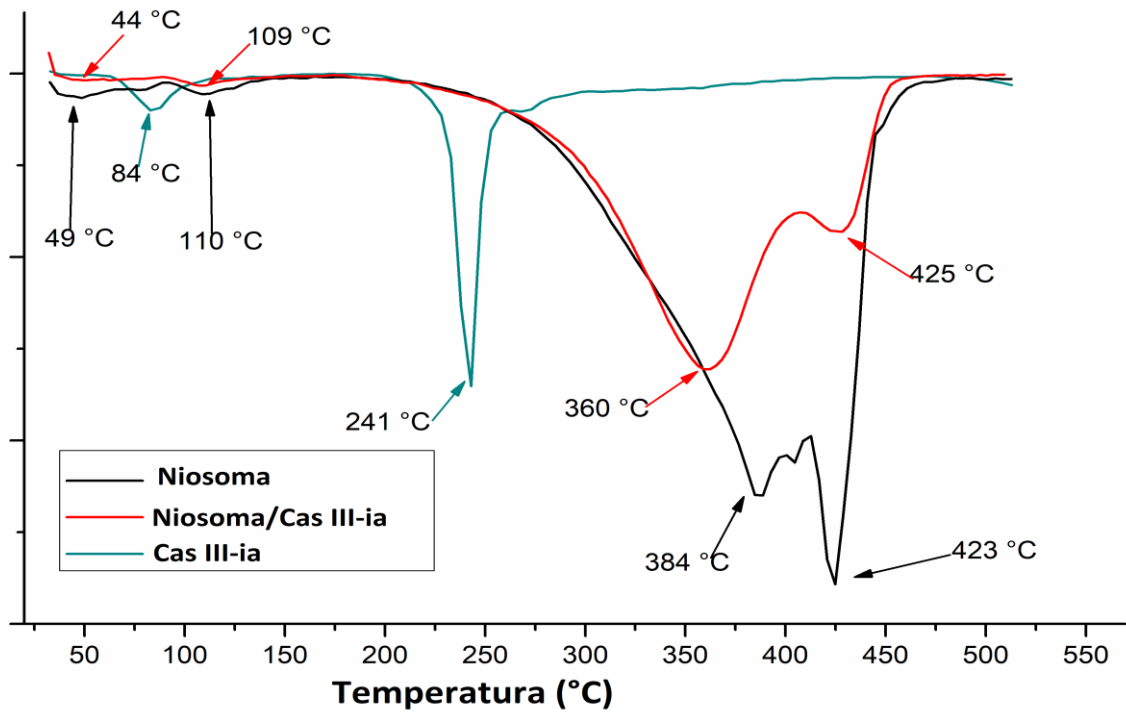
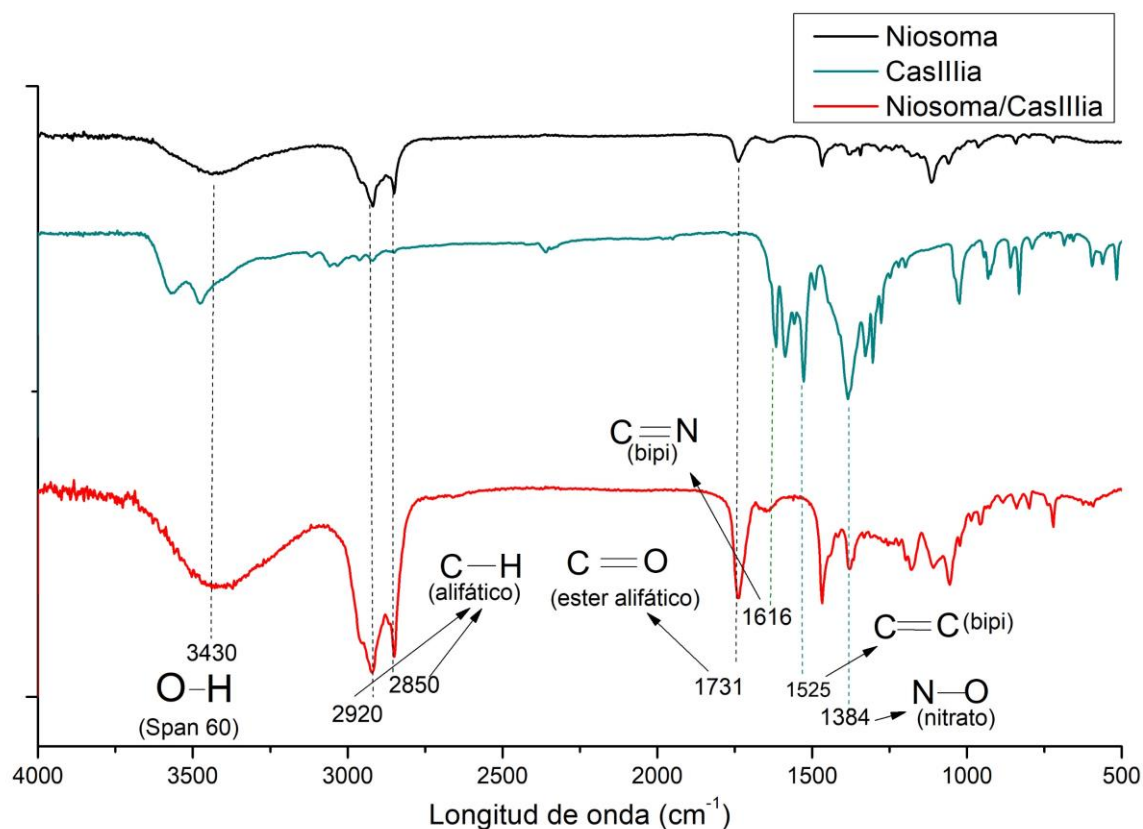


Figure 28. Termogramas de (a) DSC y (b) TGA de Cas III-ia, de niosomas con y sin Cas III-ia.

### 3.3.3.- Estudios espectroscópicos de FTIR

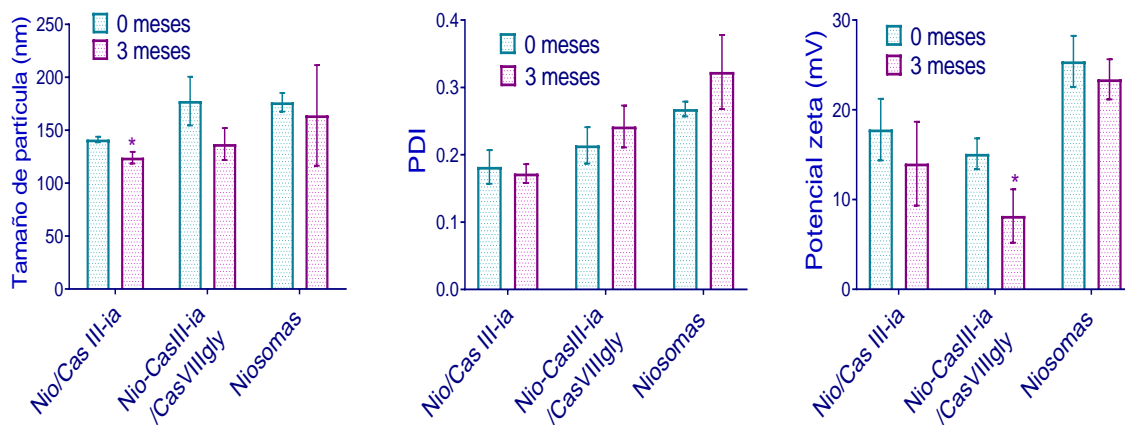
Los espectros de FTIR (Figura 29) muestran las bandas características de bupiridina y acetilacetato de Cas III-ia a  $1616\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a vibraciones de la banda C=N de la bupiridina; a  $1525\text{ cm}^{-1}$  vibraciones C=C; a  $1587\text{ cm}^{-1}$ , vibraciones correspondiente al grupo carbonil del acetilacetato. Por otro lado, en el espectro de los niosomas vibraciones de estiramiento del enlace O-H  $\text{cm}^{-1}$  (Span60 y Pluronic F127) son observadas a  $3430\text{ cm}^{-1}$ . Bandas a  $2920\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  son atribuidas a estiramientos vibracionales de C-H de grupos alifáticos saturados (Span 60 y Pluronic) y la banda a  $1731\text{ cm}^{-1}$  a estiramientos del grupo funcional de éster alifático correspondiente a Span60. La banda a  $1384\text{ cm}^{-1}$  corresponde al ion nitrato; esta banda aparece en ambos espectros (Cas III-ia y niosoma con Cas III-ia), mientras que las bandas características de Cas III-ia no son observadas en el espectro del niosoma con Cas III-ia, excepto el ion nitrato, lo que podría indicar la encapsulación del compuesto. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en los termogramas de TGA y DSC. Sin embargo, a través de FTIR-ART (Figura A15), se observó que las bandas características de C=N en diiminas en la Cas III-ia se encuentran presentes después de la encapsulación del compuesto, indicando la posible presencia del compuesto en la membrana del niosoma, lo que podría explicar el decremento en el potencial zeta cuando la Cas III-ia es incorporada en las vesículas. Mediante estudios de FTIR, Miranda encontró que la Cas III-ia incorporada en nanopartículas de quitosano, no mostraba las bandas características de la Cas III-ia, lo que sugiere que el compuesto de cobre se encuentra incorporada a las nanopartículas de quitosano [133]. Cuando la Cas VIII-gly fue incorporada en los sistemas niosomales, se observó el mismo comportamiento en el espectro de FTIR, tal como se puede apreciar en la Figura A16.



**Figura 29.** Espectros de FTIR de Cas III-ia (línea roja), blanco de niosoma (línea azul) y niosoma con Cas III-ia (línea negra).

### 3.3.4.- Estudios de estabilidad acelerada en *in vitro*

Se realizaron estudios de estabilidad acelerada (40 °C Y 75 % de humedad relativa con n= 3, de acuerdo con la NOM-073-SSA1-2015) para los niosomas con y sin Cas III-ia y mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly. La estabilidad física de las muestras fue evaluada para el tamaño de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidad (Figura 30). De acuerdo con los resultados, después de tres meses, para los niosomas, niosomas con Cas III-ia y niosomas con Cas III-ia/Cas VIII-gly, se observó un decremento en el tamaño de partícula, potencial zeta y PDI para los niosomas con Cas III-ia, y un decremento en el tamaño de partícula y potencial zeta para los niosomas con mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly. El decremento en el tamaño de partícula fue estadísticamente significativo sólo para niosomas/Cas III-ia y la disminución en potencial zeta fue estadísticamente significativo sólo para niosomas/Cas III-ia-Cas VIII-gly.



**Figura 30.** Estudios de estabilidad acelerada (40 °C y 75 % de humedad relativa) para Cas III-ia en niosomas, mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly en niosomas y blanco de niosomas para la formulación optimizada. Las barras marcadas con asterisco fueron estadísticamente significativas (t-student no pareada).

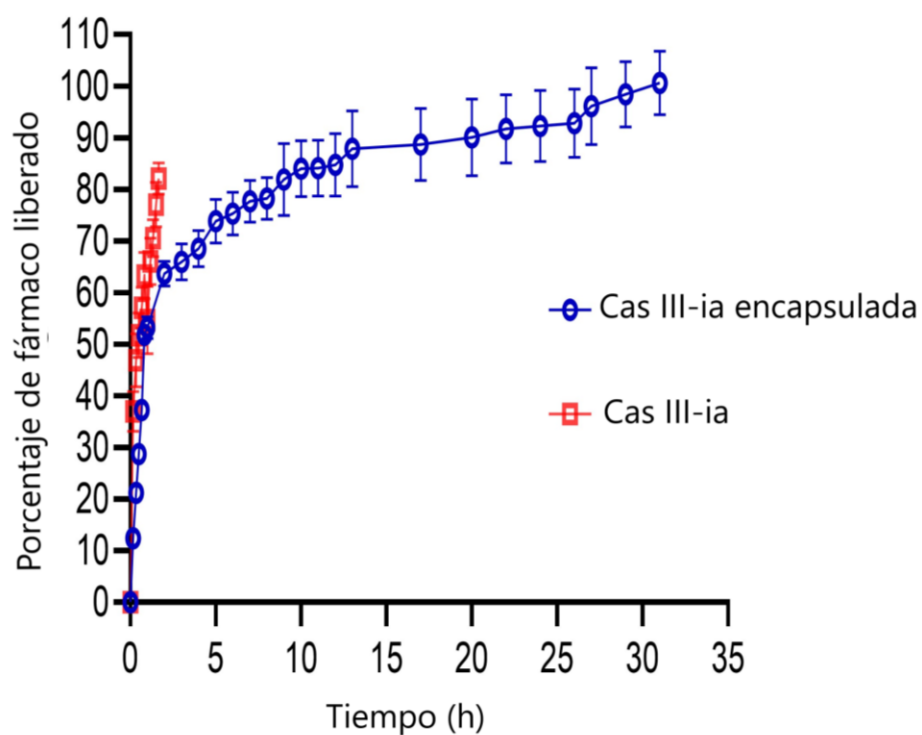
El decremento en el potencial zeta y tamaño de partícula pueden estar asociado al pluronic F127 dado que éste es un copolímero que es dependiente de la temperatura. Un aumento de la temperatura a 40 °C podría causar la deshidratación de bloque hidrofóbico de polióxido de propileno (PPO), originando que las cadenas de polímero se acerquen. Lo anterior provoca que el tamaño de partícula y el potencial zeta disminuya en el niosoma con Casiopeínas y el blanco de niosoma. Además, el descenso en el potencial zeta en los niosomas con Casiopeínas puede ser atribuido a que se llega a un equilibrio entre las moléculas de Cas III-ia y la membrana del niosoma. Se ha observado cambios en el valor del potencial zeta para niosomas con Pluronic L64, cuando hay una variación de la temperatura [134].

Aunque se observó un decremento estadísticamente significativo en el tamaño de partícula, esta se encuentra aún en un rango de 100 a 150 nm, por lo que es candidato para su uso en la administración intravenosa [135]. Pese al decremento del potencial zeta, el decremento en el tamaño de partícula y el PDI indican que no hay coalescencia de las nanopartículas dado el impedimento estérico causado por las cadenas largas de polióxido de propileno y las cadenas de polióxido de etileno del pluronic F127, que indica que los niosomas con Cas III-ia tienen estabilidad física, al menos por tres meses a condiciones aceleradas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, donde los niosomas han mostrado ser estables por al menos 90 días

[110,136]. Al realizar estudios de la estabilidad a 4 °C (Figura A17), se observó de manera general, un aumento en el tamaño de partícula, una disminución del potencial zeta y un aumento del PDI para todas las formulaciones, siendo estadísticamente significativo únicamente para el niosoma con Cas III-ia. Este mismo comportamiento fue reportado por Varaporn y colaboradores, con niosomas que contenían dicetilfosfato o estearilamina como molécula estabilizante [71]. El aumento del tamaño de partícula a 4 °C, en contraste con la disminución del tamaño de partícula a condiciones aceleradas, podría estar dado por la relajación de las cadenas del PPO y del PEO del copolímero, inducido por la temperatura menor de almacenamiento (4 °C), donde las cadenas de PEO y PPO se encuentran hidratadas y son relativamente solubles en el agua [137], induciendo una posible interacción entre las cadenas poliméricas del copolímero, provocando de este modo una mayor polidispersidad, aumento de tamaño de partícula y una disminución del potencial zeta.

### 3.3.5.- Estudios de liberación *in vitro*

El perfil de liberación de Cas III-ia (Figura 31) a través de los niosomas, tuvo un comportamiento bifásico con una rápida liberación (efecto burst (explosión)) en las primeras horas, seguido de una liberación más lenta hasta las 33 horas por lo que se obtuvo una liberación modificada.

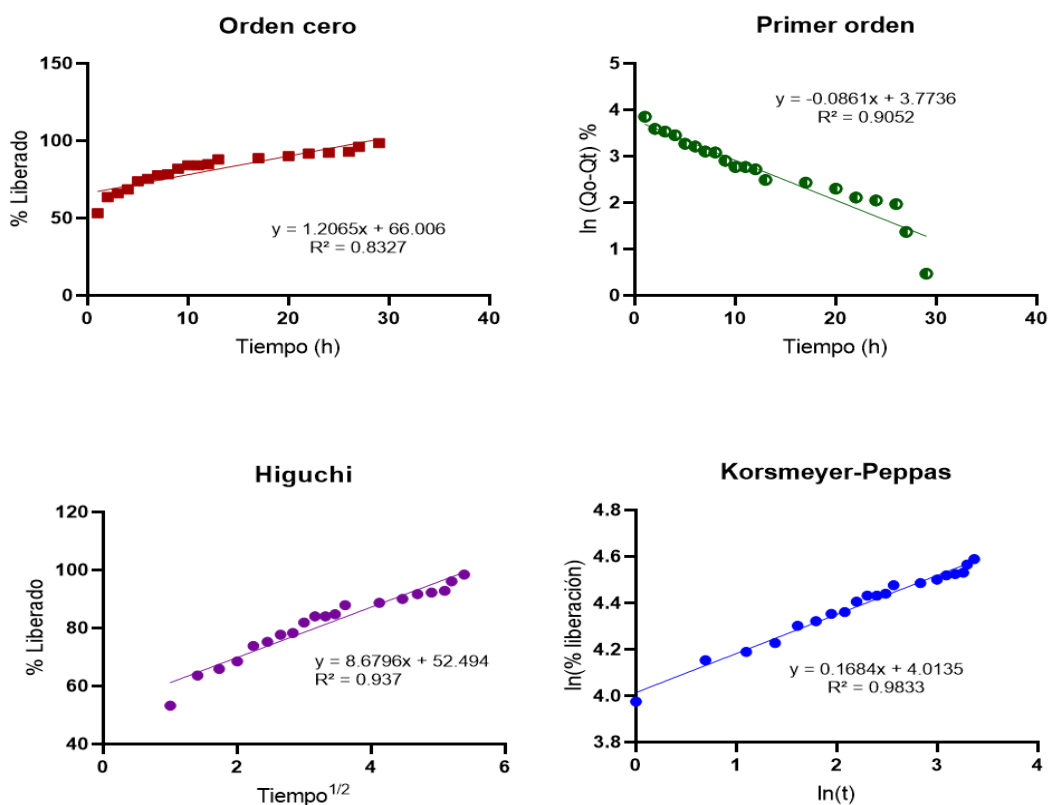


**Figure 31.** Perfil de liberación del fármaco nanoencapsulado (línea azul) y perfil de liberación Cas III-ia libre (línea roja) (n=3).



Las interacciones intermoleculares, la encapsulación del fármaco y el fármaco no encapsulado tienen influencia en la liberación modificada del fármaco y el efecto burst. Considerando el 40 % de encapsulación obtenido, el efecto burst es causado por la Cas III-ia no encapsulada (alrededor del 60 %) que pasa rápidamente a través de la bolsa de diálisis. Posteriormente, se observa una liberación más lenta que podría estar asociado con la Cas III-ia no encapsulada que se encuentra formando interacciones débiles con la membrana del niosoma. La liberación más prolongada es consecuencia de la Cas III-ia encapsulada. Por otra parte, como se observa en la línea roja, el 90 % de la Cas III-ia no encapsulada (sin formulación con niosoma, usada como control) difundió de la bolsa de diálisis en la primera hora del estudio, lo que indica que la celulosa regenerada (de la bolsa de diálisis) no interfiere en el paso de la membrana. La liberación modificada de la Cas III-ia a través de los niosomas es característica de los sistemas vesiculares, tales como liposomas y niosomas [126,138].

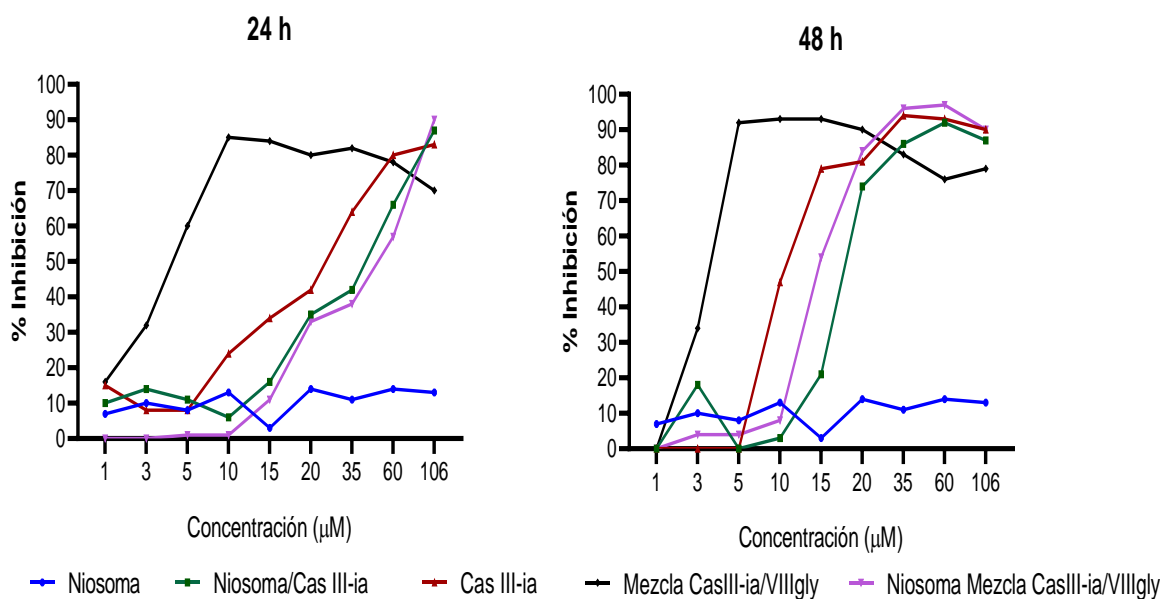
Al evaluar el perfil de liberación de la Cas III-ia de los niosomas, los datos fueron ajustados a una cinética de orden cero, de primer orden, al modelo de Higuchi y al modelo de Korsmeyer-Peppas (Figura 32). Los resultados indicaron que el mejor ajuste fue obtenido con el modelo de Korsmeyer-Peppas, lo que significa que la liberación está gobernada principalmente por mecanismo de difusión de Fick. Lo anterior también ha sido reportado para fármacos encapsulados en niosomas y liposomas [68,139].



**Figura 32.** Ajuste realizado de los datos de liberación de la Cas III-ia a partir de los niosomas, a diversos modelos cinéticos.

### 3.3.6.- Ensayos de citotoxicidad

Ensayos *in vitro* fueron llevados a cabo en una línea celular de cáncer triple negativo (MDA-MB-231). La Cas III-ia, mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly, Cas III-ia encapsulada, mezcla de Cas III-ia/VIII-gly encapsuladas y el blanco de niosoma fueron evaluadas a diferentes concentraciones a 24 y 48 horas de incubación después del tratamiento, usando el método de sulforrodamina B [108]. La Figura 33 muestra un decremento en la actividad de la Cas III-ia y la mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly cuando se encuentra encapsulado comparado co las Casiopeínas que no están encapsuladas, lo anterior es observado tanto a las 24 como a las 48 h de incubación. Por otra parte, los niosomas sin Casiopeínas no mostraron actividad a las concentraciones y tiempos evaluados.



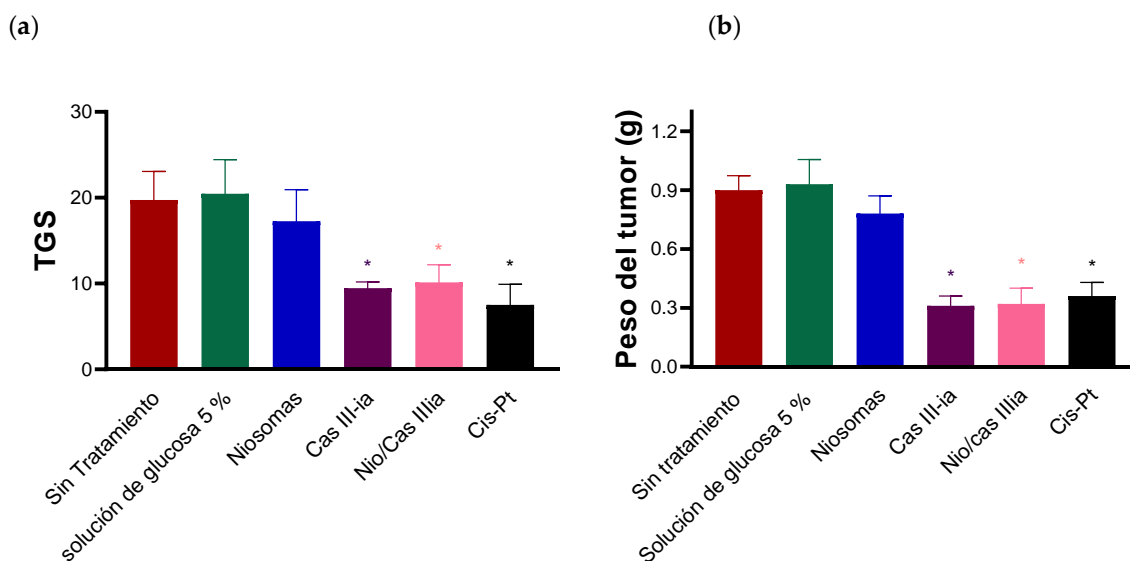
**Figura 33.** Ensayos de citotoxicidad en la línea celular MDA-MB-231 tratadas con Cas III-ia, mezcla de Cas III-ia/VIII-gly encapsuladas, no encapsuladas y el blanco de niosomas a diferentes concentraciones a 24 y 48 h de incubación.

El incremento con respecto al tiempo de la actividad *in vitro* de la Cas III-ia encapsulada puede estar relacionado con el tiempo que tarda el fármaco en liberarse de los sistemas niosomales, de acuerdo con lo observado en los estudios de liberación. Como resultado, una actividad mejorada es observada para la Casiopeína III-ia y mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly encapsuladas a las 48 horas de realizar el estudio, con respecto a las 24 horas de evaluación. Shaker y colaboradores [55] mostraron que el efecto citotóxico en células MCF-7 (cáncer de mama) de tamoxifeno cargados en niosomas es afectado por el tiempo de liberación del fármaco de los sistemas niosomales. La no actividad en la línea tumoral MDA-MB-231 de los niosomas mostrado en ensayos *in vitro* es consistente con lo observado en los ensayos *in vivo*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Agarwal y colaboradores [140] quienes demostraron que los niosomas tienen una baja actividad en líneas celulares de cáncer y en líneas celulares sanas. Por otro lado, Haroun y colaboradores [67] observaron una toxicidad más baja (en cáncer de mama) en niosomas funcionalizados con PEG cargados con brucina (alcaloide natural) en comparación con brucina libre. Ellos atribuyeron este comportamiento al efecto de retención y permeación mejorada, que puede incrementar la posibilidad de los niosomas de llegar al sitio de acción. Además, la funcionalización con PEG provee

un mayor tiempo de circulación de los niosomas [67]. El mismo comportamiento ha sido observado con nanopartículas que contienen Pluronic F127 en la formulación.

### 3.3.6.- Ensayos *in vivo*

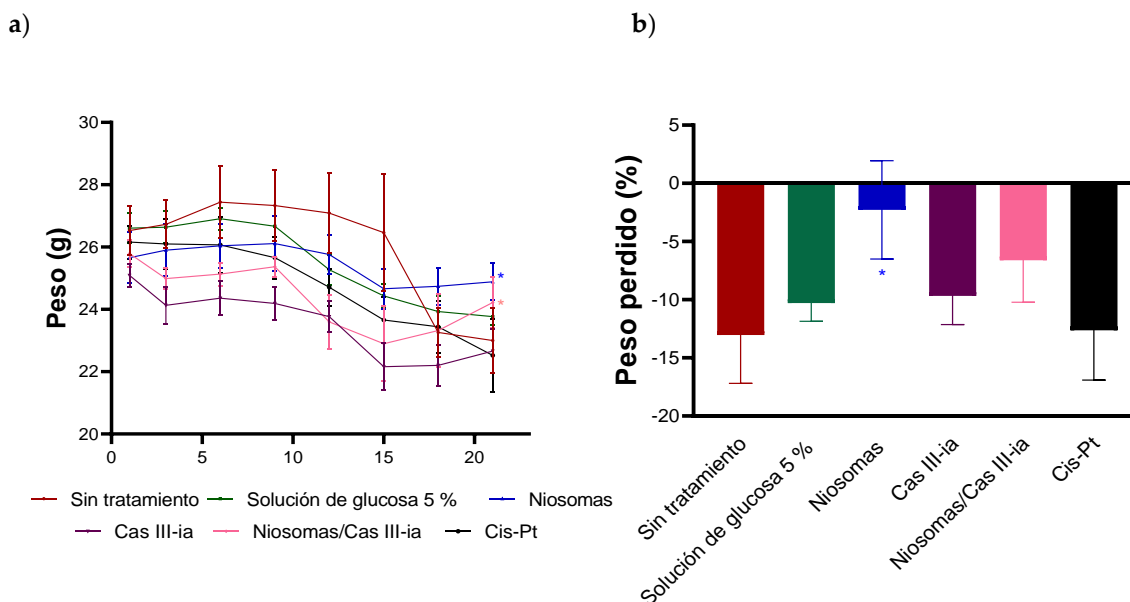
Se realizaron estudios *in vivo* en ratones hembra BALB/c trasplantados con células (4t1) de un modelo de cáncer de mama. El estudio se realizó con el objetivo de encontrar el efecto de la Casiopeína III-ia y la Casiopeína III-ia encapsulada. El cis-Pt fue utilizado como fármaco control. De acuerdo con los resultados obtenidos, tanto el cis-Pt como la Cas III-ia libre y la Cas III-ia encapsulada, disminuyeron la velocidad de crecimiento del tumor (Figura 34a), siendo los tres grupos estadísticamente significativos con respecto al grupo control. La disminución del volumen tumoral, con los tratamientos aplicados, fue confirmada con el peso del tumor (Figura 34b) que fue determinado al finalizar el tratamiento.



**Figura 34.** (a) Velocidad de crecimiento tumoral (TGS, por sus siglas en inglés) que fue calculado a partir del tamaño de tumor basado en la diferencia entre el día 21 y el día 1. b) Peso del tumor primario para cada grupo con tratamiento. Los grupos marcados con asterisco fueron estadísticamente significativos (t-student no pareada).

Además, el peso del ratón fue evaluado al inicio y final del tratamiento, donde se observó que sólo los grupos tratados con los niosomas con Cas III-ia y blanco de niosomas recuperaron su peso posterior al tratamiento. La recuperación del peso de los ratones del grupo tratado con la Cas III-ia

encapsulada fue estadísticamente significativo con respecto al grupo tratado con Cas III-ia libre (Figura 35a), lo que indica una menor toxicidad cuando la Casiopeína se encuentra encapsulada. Lo anterior fue evaluado usando el porcentaje de peso perdido como un indicativo de la toxicidad (Figura 35b), que fue calculado de la siguiente manera:  $[(\text{peso al día 21}/\text{peso al día 0})-1] \times 100$ . Se encontró que únicamente el niosomas fue estadísticamente significativo (t-student no pareada) con respecto al grupo control. A pesar de que los niosomas con Cas III-ia no fueron estadísticamente significativos, este grupo mostró una tendencia a causar una menor toxicidad en comparación con la Casiopeína III-ia libre. Además, aunque los tres tratamientos (cis-Pt, Cas III-ia libre y Cas III-ia encapsulada) mostraron una actividad similar en la disminución del tumor, es necesario considerar la frecuencia de administración de los compuestos, donde para el cis-Pt se administró cuatro dosis, una cada siete días en comparación con la Cas III-ia no encapsulada y la Cas III-ia encapsulada, cuya administración fue seis dosis, una cada cuatro días, lo cual indica que se tiene una mayor toxicidad del cis-Pt.



**Figura 35.** (a) Peso inicial y final de los ratones BALB/C antes, durante y después del tratamiento. b) La toxicidad fue medida con el porcentaje de peso perdido del ratón, que fue un indicativo de toxicidad. Grupos marcados con asterisco fueron estadísticamente significativo (t-student no pareada).

Al evaluar el efecto antimetastásico (Figura A18), se encontró que tanto la Casiopeínas III-ia encapsulada, no encapsulada y el cis-Pt, presentan una reducción, estadísticamente significativo, en

el número de macrometástasis, en pulmón y corazón, en comparación con el grupo control. Aunque el grupo de niosomas sin Casiopeínas no presentó una reducción estadísticamente significativa, se puede observar una disminución del número de macrometástasis. Además, de acuerdo con datos obtenidos a partir del cálculo del crecimiento tumoral (Tabla 3, A2), el blanco de niosomas presenta una menor velocidad de crecimiento con respecto al grupo sin tratamiento y el grupo con solución de glucosa. De acuerdo con los resultados obtenidos, se plantea que se puede administrar una dosis mayor de Casiopeína nanoencapsulada, lo cual podría causar un mayor efecto sobre el crecimiento tumoral, efecto antimetastásico y una menor toxicidad.

## IV Conclusiones

Se utilizó QbD para el desarrollo y optimización de una nueva nanoformulación de niosoma con Cas III-ia y niosoma con la mezcla sinérgica de Cas III-ia/Cas VIII-gly con potencial aplicación en el tratamiento de cáncer mediante una administración intravenosa.

Para cumplir el objetivo anterior, en una primera etapa, se definió el QTPP y se utilizó como guía para el desarrollo farmacéutico. El diagrama de Ishikawa y el análisis RRMA se realizaron a partir de la selección de materiales y métodos para la formación de niosomas, y los CQAs, CPPs, CMAs y diseños experimentales se definieron basados en las normas ICH de QbD para la predicción y optimización de una formulación.

De acuerdo con un primer diseño experimental (Plackett-Burman, cribado de variables), se encontró que las principales variables a considerar son la concentración del fármaco, la concentración del niosoma y la velocidad de agitación durante la inyección. Estas variables se evaluaron en un diseño factorial  $2^3$ , en el cual se observó el impacto de las variables sobre los CQAs, resultando ser la concentración de Cas III-ia, el parámetro con mayor impacto en los CQAs principales, y se observó que las interacciones entre las variables resultaron ser significativas. Sin embargo, se observó, mediante una curvatura en el diseño, que se tendría un mejor ajuste a un diseño central compuesto.

Lo anterior, permitió optimizar las condiciones necesarias para obtener los valores deseados de las CQAs principales (tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación). Las condiciones operativas fueron  $697 \mu\text{M}$  de S/C/P,  $32 \mu\text{M}$  de Cas III-ia y una velocidad de 170 rpm. El tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación obtenidos se predijeron, según los gráficos de optimización, en 150 nm y 40%, respectivamente, resultando formulaciones repetibles y reproducibles.

Se realizaron estudios termogravimétricos (TGA y DSC) y espectroscópicos (FTIR) para confirmar la incorporación del compuesto en el sistema. Los estudios de microscopía mostraron que los niosomas son esferas con tamaños homogéneos. Los niosomas con y sin Cas III-ia son físicamente estables durante al menos 3 meses en condiciones aceleradas.

Se observó una liberación modificada bifásica gobernada por difusión de la Cas III-ia de los niosomas, lo anterior, coincide con los resultados obtenidos en la línea celular MDA-MB-231, mostrando una mayor actividad de Cas III-ia encapsulado a las 48 h de estudio.

En los estudios *in vivo*, además, se observó que el Cas III-ia encapsulada muestra una menor toxicidad respecto al cis-Pt y la Cas III-ia no encapsulada. La reducción de la toxicidad podría permitir la administración de una dosis mayor para mejorar la eficacia.

Este trabajo abre una ventana de oportunidad para la formulación de compuestos de coordinación en niosomas utilizando herramientas de calidad que permitan su optimización. Las condiciones óptimas obtenidas mediante QbD podrían mejorar el proceso de escalamiento.



# Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud OPS Cáncer, Datos y Cifras.
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER; 2021;
3. Skeel, R.T.; Khleif, S.N. Handbook of Cancer Chemotherapy; Skeel, R.T., Khleif, S.N., Eds.; Eighth.; Philadelphia, 2011; ISBN 978-1-60831-782-0.
4. Chu, E.; DeVita, V.T. Physicians Cancer Chemotherapy Drug Manual; Jones and Bartlett Learning: United States, 2018; ISBN 9781-1-284-14496-3.
5. Estanqueiro, M.; Amaral, M.H.; Conceic, J.; Manuel, J.; Lobo, S. Biointerfaces Nanotechnological Carriers for Cancer Chemotherapy : The State of the Art. Colloids Surf B Biointerfaces **2015**, 126, 631–648, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.12.041.
6. González-Ballesteros, M.M.; Mejía, C.; Ruiz-Azuara, L. Metallodrugs: An Approach against Invasion and Metastasis in Cancer Treatment. FEBS Open Bio 2022, 12, 880–899.
7. Peña, Q.; Wang, A.; Zaremba, O.; Shi, Y.; Scheeren, H.W.; Metselaar, J.M.; Kiessling, F.; Pallares, R.M.; Wuttke, S.; Lammers, T. Metallodrugs in Cancer Nanomedicine. Chem Soc Rev 2022, 51, 2544–2582.
8. Williams, D.R. Metals, Ligands, and Cancer. Chem Rev **1972**, 72, 203–213, doi:10.1021/cr60277a001.
9. Figueroa-Depaz, Y.; Pérez-Villanueva, J.; Soria-Arteche, O.; Martínez-Otero, D.; Gómez-Vidales, V.; Ortiz-Frade, L.; Ruiz-Azuara, L. Casiopeinas of Third Generations: Synthesis, Characterization, Cytotoxic Activity and Structure–Activity Relationships of Mixed Chelate Compounds with Bioactive Secondary Ligands. Molecules **2022**, 27, doi:10.3390/molecules27113504.
10. Godínez-Loyola, Y.; Bernad-Bernad, M.J.; Gracia-Mora, J.; Robles-Zepeda, R.E.; Ruiz-Azuara, L. New 3rd Generation of Casiopeinas Family Compounds with Indomethacin as a Secondary Ligand: Synthesis, Characterization, Antiproliferative Activity, and Nanoencapsulation. Proc West Mark Ed Assoc Conf **2019**, 22, 57, doi:10.3390/proceedings2019022057.

11. Chavez-Gonzalez, A.; Centeno-Llanos, S.; Moreno-Lorenzana, D.; Sandoval-Esquivel, M.A.; Aviles-Vazquez, S.; Bravo-Gomez, M.E.; Ruiz-Azuara, L.; Ayala-Sanchez, M.; Torres-Martinez, H.; Mayani, H. Casiopeina III-Ea, a Copper-Containing Small Molecule, Inhibits the in Vitro Growth of Primitive Hematopoietic Cells from Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk Res* **2017**, *52*, 8–19, doi:10.1016/j.leukres.2016.11.001.
12. Castillo-Rodríguez, R.A.; Palencia, G.; Anaya-Rubio, I.; Gallardo-Pérez, J.C.; Jiménez-Farfán, D.; Escamilla-Ramírez, Á.; Zavala-Vega, S.; Cruz-Salgado, A.; Cervantes-Rebolledo, C.; Gracia-Mora, I.; et al. Anti-Proliferative, pro-Apoptotic and Anti-Invasive Effect of the Copper Coordination Compound Cas III-La through the Induction of Reactive Oxygen Species and Regulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway in Glioma. *J Cancer* **2021**, *12*, 5693–5711, doi:10.7150/jca.59769.
13. Gracia-Mora, I.; Ruiz-Ramirez, L.; Tinoco-Mndez, M.; Mtirquez-Quifiones, A.; Romero-De Lira, L.; Marin-Hern, A.; Madas-Rosales, L.; Elena Bravo-Gdmez, M. PLATINUM, NOVEL ANTITUMOR MIXED CHELATE COPPER COMPOUNDS, CASIOPEINAS, EVALUATED BY AN IN VITRO HUMAN AND MURINE CANCER CELL LINE PANEL. *Metal Based.Drugs* **2001**, *8*, 18–28.
14. Alemón-Medina, R.; Bravo-Gómez, M.E.; Gracia-Mora, M.I.; Ruiz-Azuara, L. Comparison between the Antiproliferative Effect and Intracellular Glutathione Depletion Induced by Casiopeína IIgly and Cisplatin in Murine Melanoma B16 Cells. *Toxicology in Vitro* **2011**, *25*, 868–873, doi:10.1016/j.tiv.2011.02.007.
15. Carvallo-Chaigneau, F.; Trejo-Solís, C.; Gómez-Ruiz, C.; Rodríguez-Aguilera, E.; Macías-Rosales, L.; Cortés-Barberena, E.; Cedillo-Peláez, C.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L.; Madrid-Marina, V.; et al. Casiopeina III-la Induces Apoptosis in HCT-15 Cells in Vitro through Caspase-Dependent Mechanisms and Has Antitumor Effect in Vivo. *BioMetals* **2008**, *21*, 17–28, doi:10.1007/s10534-007-9089-4.
16. Resendiz-Acevedo, K.; García-Aguilera, M.E.; Esturau-Escofet, N.; Ruiz-Azuara, L. <sup>1</sup>H -NMR Metabolomics Study of the Effect of Cisplatin and Casiopeina IIgly on MDA-MB-231 Breast Tumor Cells. *Front Mol Biosci* **2021**, *8*, doi:10.3389/fmolb.2021.742859.
17. Bravo-gómez, M.E.; García-ramos, J.C.; Gracia-mora, I.; Ruiz-azuara, L. Antiproliferative Activity and QSAR Study of Copper ( II ) Mixed Chelate [ Cu ( N – N )( Acetylacetonato ) ] NO

- 3 and [ Cu ( N – N )( Glycinato )] NO 3 Complexes ,. J Inorg Biochem **2009**, 103, 299–309, doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006.
18. Bravo, M.E. Estudio QSAR de Quelatos Mixtos de Cobre (II) [Cu(N-N)(Acetilacetato)]NO<sub>3</sub> y [Cu(N-N)(Glicinato)]NO<sub>3</sub>, Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
  19. Azuara, L.R. Ficha Técnica de La Casiopeína III-Ia Sometida a COFEPRIS; 2014;
  20. Alonso, A. Estudio de La Reactividad de La Casiopeína II-Gly y Casiopeína III-Ia Con Cisteína, Glutati3n y 2-Mercaptoetanol., Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
  21. Uribe, T. Estabilidad de Casiopeína III-Ia y Casiopeína II-Gly a Una Temperatura. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
  22. Bravo-G3mez, M.E.; de la Paz, A.L.H.; Gracia-Mora, I. Antineoplastic Evaluation of Two Mixed Chelate Copper Complexes (Casiopeínas<sup>®</sup>) in HCT-15 Xenograft Model. J Mex Chem Soc **2013**, 57, 205–211.
  23. Leal-García, M.; García-Ortuño, L.; Ruiz-Azuara, L.; Gracia-Mora, I.; Luna-Delvallar, J.; Sumano, H. Assessment of Acute Respiratory and Cardiovascular Toxicity of Casiopeinas in Anaesthetized Dogs. Basic Clin Pharmacol Toxicol **2007**, 101, 151–158, doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00038.x.
  24. Centeno-Llanos, S.M. Evaluaci3n de La Hematototoxicidad Del Compuesto Antineoplásico Casiopeína III-Ia. **2012**, 61.
  25. Fuentes, I. Farmacocinética Preclínica de Casiopeína III-Ia y Su Uni3n a Proteínas Plasmáticas. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
  26. Davila-Manzanilla, S.G.; Figueroa-de-Paz, Y.; Mejia, C.; Ruiz-Azuara, L. Synergistic Effects between a Copper-Based Metal Casiopeína III-Ia and Cisplatin. Eur J Med Chem **2017**, 129, 266–274, doi:10.1016/j.ejmech.2017.01.045.
  27. Stylianopoulos, T.; Jain, R.K. Design Considerations for Nanotherapeutics in Oncology. Nanomedicine **2015**, 11, 1893–1907, doi:10.1016/j.nano.2015.07.015.
  28. Park, K. Nanotechnology: What It Can Do for Drug Delivery Nano and Micro Systems; 2007; Vol. 120;.

29. Parveen, S.; Sahoo, S.K. Polymeric Nanoparticles for Cancer Therapy. *J Drug Target* **2008**, *16*, 108–123, doi:10.1080/10611860701794353.
30. Aleya, L.; Abdel-Daim, M.M. Advances in Nanotechnology, Nanopollution, Nanotoxicology, and Nanomedicine. *Environmental Science and Pollution Research* **2020**, *27*, 18963–18965, doi:10.1007/s11356-020-08800-6.
31. Caster, J.M.; Patel, A.N.; Zhang, T.; Wang, A. Investigational Nanomedicines in 2016: A Review of Nanotherapeutics Currently Undergoing Clinical Trials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2017**, *9*, doi:10.1002/wnan.1416.
32. Pérez-Herrero, E.; Fernández-Medarde, A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, *93*, 52–79, doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
33. Ali, I.; Rahis-Uddin; Salim, K.; Rather, M.; Wani, W.; Haque, A. Advances in Nano Drugs for Cancer Chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 135–146, doi:10.2174/156800911794328493.
34. Damasco, J.A.; Ravi, S.; Perez, J.D.; Hagaman, D.E.; Melancon, M.P. Understanding Nanoparticle Toxicity to Direct a Safe-by-Design Approach in Cancer Nanomedicine. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1–41, doi:10.3390/nano10112186.
35. Nazir, S.; Hussain, T.; Ayub, A.; Rashid, U.; MacRobert, A.J. Nanomaterials in Combating Cancer: Therapeutic Applications and Developments. *Nanomedicine* **2014**, *10*, 19–34, doi:10.1016/j.nano.2013.07.001.
36. Ikeda-Imafuku, M.; Wang, L.L.-W.; Rodrigues, D.; Shaha, S.; Zhao, Z.; Mitragotri, S. Strategies to Improve the EPR Effect: A Mechanistic Perspective and Clinical Translation. *Journal of Controlled Release* **2022**, *345*, 512–536, doi:10.1016/j.jconrel.2022.03.043.
37. Yokoyama, M. Drug Targeting with Nano-Sized Carrier Systems. *Journal of Artificial Organs* **2005**, *8*, 77–84, doi:10.1007/s10047-005-0285-0.
38. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat Biotechnol* **2015**, *33*, 941–951, doi:10.1038/nbt.3330.

39. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*.
40. Shi, B.; Fang, C.; Pei, Y. Stealth PEG-PHDCA Niosomes: Effects of Chain Length of PEG and Particle Size on Niosomes Surface Properties, in Vitro Drug Release, Phagocytic Uptake, in Vivo Pharmacokinetics and Antitumor Activity. *J Pharm Sci* **2006**, *95*, 1873–1887, doi:10.1002/jps.20491.
41. Bregoli, L.; Movia, D.; Gavigan-Imedio, J.D.; Lysaght, J.; Reynolds, J.; Prina-Mello, A. Nanomedicine Applied to Translational Oncology: A Future Perspective on Cancer Treatment. *Nanomedicine* **2016**, *12*, 81–103, doi:10.1016/j.nano.2015.08.006.
42. Morán, E. Formulación de Casiopeína III Ia(R) Por Medio de Nanopartículas Como Un Sistema de Liberación Modificada, Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
43. Miranda, J. Estudio y Caracterización de Un Sistema de Liberación Controlada de Casiopeína III-Ia. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
44. Aguilar Jiménez, Z. Nanoencapsulación de Casiopeína III-Ia En Un Sistema Niosomal y Estudio de Su Liberación in Vitro, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
45. Marianecchi, C.; Rinaldi, F.; Carafa, M.; Marianecchi, C.; Di, L.; Rinaldi, F.; Celia, C.; Paolino, D.; Alhaique, F.; Esposito, S.; et al. Niosomes from 80s to Present : The State of the Niosomes from 80s to Present : The State of the Art. **2013**, *205*, 187–206, doi:10.1016/j.cis.2013.11.018.
46. Rajera, R.; Nagpal, K.; Singh, S.K.; Mishra, D.N. Niosomes: A Controlled and Novel Drug Delivery System. *Biological {&}pharmaceutical bulletin* **2011**, *34*, 945–953, doi:10.1248/bpb.34.945.
47. Kumar, G.P.; Rajeshwarrao, P. Nonionic Surfactant Vesicular Systems for Effective Drug Delivery—an Overview. *Acta Pharm Sin B* **2011**, *1*, 208–219, doi:10.1016/j.apsb.2011.09.002.
48. Nasir, A.; Harikumar, S.; Amanpreet, K. Niosomes: An Excellent Tool for Drug Delivery. *International journal of research in pharmacy and chemistry* **2012**, *2*, 479–487.

49. Moghassemi, S.; Hadjizadeh, A. Nano-Niosomes as Nanoscale Drug Delivery Systems: An Illustrated Review. *Journal of Controlled Release* **2014**, *185*, 22–36, doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.015.
50. Attwood, D.; Florence, A.T. Physical Pharmacy. In *physical pharmacy*; UK, 2008; pp. 43–62 ISBN 8185790345.
51. Hao, Y.M.; Li, K. Entrapment and Release Difference Resulting from Hydrogen Bonding Interactions in Niosome. *Int J Pharm* **2011**, *403*, 245–253, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.027.
52. Sankhyan, A.; Pawar, P.K. Metformin Loaded Non-Ionic Surfactant Vesicles: Optimization of Formulation, Effect of Process Variables and Characterization. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy* **2013**, *21*, 7, doi:10.1186/2008-2231-21-7.
53. Serment-Guerrero, J.; Cano-Sanchez, P.; Reyes-Perez, E.; Velazquez-Garcia, F.; Bravo-Gomez, M.E.; Ruiz-Azuara, L. Genotoxicity of the Copper Antineoplastic Coordination Complexes Casiopeinas®. *Toxicology in Vitro* **2011**, *25*, 1376–1384, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008.
54. Nasr, M.; Mansour, S.; Mortada, N.D.; Elshamy, a a Vesicular Aceclofenac Systems: A Comparative Study between Liposomes and Niosomes. *J Microencapsul* **2008**, *25*, 499–512, doi:10.1080/02652040802055411.
55. Shaker, D.S.; Shaker, M. a.; Hanafy, M.S. Cellular Uptake, Cytotoxicity and in-Vivo Evaluation of Tamoxifen Citrate Loaded Niosomes. *Int J Pharm* **2015**, *493*, 285–294, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.07.041.
56. Uchegbu, I.F.; Vyas, S.P. Non-Ionic Surfactant Based Vesicles (Niosomes) in Drug Delivery. *Int J Pharm* **1998**, *172*, 33–70, doi:10.1016/S0378-5173(98)00169-0.
57. Waddad, A.Y.; Abbad, S.; Yu, F.; Munyendo, W.L.L.; Wang, J.; Lv, H.; Zhou, J. Formulation, Characterization and Pharmacokinetics of Morin Hydrate Niosomes Prepared from Various Non-Ionic Surfactants. *Int J Pharm* **2013**, *456*, 446–458, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.040.
58. Mozafari, M.R. Niosomes as Nanocarrier Systems. In *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*; Australia, 2007; pp. 67–81 ISBN 9781402062889.

59. Ishida, T.; Kiwada, H. Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon upon Repeated Injection of PEGylated Liposomes. *Int J Pharm* **2008**, *354*, 56–62, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.005.
60. Figueiras, A.; Domingues, C.; Jarak, I.; Santos, A.I.; Parra, A.; Pais, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Kabanov, A.; Cabral, H.; et al. New Advances in Biomedical Application of Polymeric Micelles. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14081700.
61. Alakhova, D.Y.; Kabanov, A. v. Pluronic and MDR Reversal: An Update. *Mol Pharm* **2014**, *11*, 2566–2578, doi:10.1021/mp500298q.
62. Sharma, V.; Anandhakumar, S.; Sasidharan, M. Self-Degrading Niosomes for Encapsulation of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs: An Efficient Carrier for Cancer Multi-Drug Delivery. *Materials Science and Engineering: C* **2015**, *56*, 393–400, doi:10.1016/j.msec.2015.06.049.
63. Yang, H.; Deng, A.; Zhang, J.; Wang, J.; Lu, B. Preparation, Characterization and Anticancer Therapeutic Efficacy of Cisplatin-Loaded Niosomes. *J Microencapsul* **2013**, *30*, 237–244, doi:10.3109/02652048.2012.717116.
64. He, R.-X.; Ye, X.; Li, R.; Chen, W.; Ge, T.; Huang, T.-Q.; Nie, X.-J.; Chen, H.-J.-T.; Peng, D.-Y.; Chen, W.-D. PEGylated Niosomes-Mediated Drug Delivery Systems for Paeonol: Preparation, Pharmacokinetics Studies and Synergistic Anti-Tumor Effects with 5-FU. *J Liposome Res* **2017**, *27*, 161–170, doi:10.1080/08982104.2016.1191021.
65. García-Manrique, P.; Machado, N.D.; Fernández, M.A.; Blanco-López, M.C.; Matos, M.; Gutiérrez, G. Effect of Drug Molecular Weight on Niosomes Size and Encapsulation Efficiency. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, *186*, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110711.
66. El-Ridy, M.S.; Badawi, A. a.; Safar, M.M.; Mohsen, A.M. Niosomes as a Novel Pharmaceutical Formulation Encapsulating the Hepatoprotective Drug Silymarin. *Int J Pharm Pharm Sci* **2012**, *4*, 549–559.
67. Haroun, M.; Elsewedy, H.S.; Shehata, T.M.; Tratat, C.; al Dhubiab, B.E.; Venugopala, K.N.; Almostafa, M.M.; Kochkar, H.; Elnahas, H.M. Significant of Injectable Brucine PEGylated Niosomes in Treatment of MDA Cancer Cells. *J Drug Deliv Sci Technol* **2022**, *71*, doi:10.1016/j.jddst.2022.103322.

68. Barani, M.; Hajinezhad, M.R.; Sargazi, S.; Rahdar, A.; Shahraki, S.; Lohrasbi-Nejad, A.; Bairo, F. In Vitro and in Vivo Anticancer Effect of PH-Responsive Paclitaxel-Loaded Niosomes. *J Mater Sci Mater Med* **2021**, *32*, 147, doi:10.1007/s10856-021-06623-6.
69. Witika, B.A.; Bassey, K.E.; Demana, P.H.; Siwe-Noundou, X.; Poka, M.S. Current Advances in Specialised Niosomal Drug Delivery: Manufacture, Characterization and Drug Delivery Applications. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*.
70. Mahale, N.B.; Thakkar, P.D.; Mali, R.G.; Walunj, D.R.; Chaudhari, S.R. Niosomes: Novel Sustained Release Nonionic Stable Vesicular Systems - An Overview. *Adv Colloid Interface Sci* **2012**, *183–184*, 46–54, doi:10.1016/j.cis.2012.08.002.
71. Junyaprasert, V.B.; Teeranachaideekul, V.; Supaperm, T. Effect of Charged and Non-Ionic Membrane Additives on Physicochemical Properties and Stability of Niosomes. *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9*, 851–859, doi:10.1208/s12249-008-9121-1.
72. Rapalli, V.K.; Khosa, A.; Singhvi, G.; Girdhar, V.; Jain, R.; Dubey, S.K. Application of QbD Principles in Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems. In *Pharmaceutical Quality by Design: Principles and Applications*; Elsevier, 2019; pp. 255–296 ISBN 9780128157992.
73. Mohamed, H.B.; El-Shanawany, S.M.; Hamad, M.A.; Elsabahy, M. Niosomes: A Strategy toward Prevention of Clinically Significant Drug Incompatibilities. *Sci Rep* **2017**, *7*, 1–14, doi:10.1038/s41598-017-06955-w.
74. European Medicines Agency (EMA) Committee for Human Medicinal Products ICH Guideline Q8 (R2) on Pharmaceutical Development; 2017;
75. Li, J.; Qiao, Y.; Wu, Z. Nanosystem Trends in Drug Delivery Using Quality-by-Design Concept. *Journal of Controlled Release* **2017**, *256*, 9–18, doi:10.1016/j.jconrel.2017.04.019.
76. Rawal, M.; Singh, A.; Amiji, M.M. Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development. *Pharm Res* **2019**, *36*.
77. Colombo, S.; Beck-Broichsitter, M.; Bøtker, J.P.; Malmsten, M.; Rantanen, J.; Bohr, A. Transforming Nanomedicine Manufacturing toward Quality by Design and Microfluidics. *Adv Drug Deliv Rev* **2018**, *128*, 115–131.



78. Zhang, L.; Mao, S. Application of Quality by Design in the Current Drug Development. *Asian J Pharm Sci* **2017**, *12*, 1–8, doi:10.1016/j.ajps.2016.07.006.
79. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2); 2009;
80. Zagalo, D.M.; Sousa, J.; Simões, S. Quality by Design (QbD) Approach in Marketing Authorization Procedures of Non-Biological Complex Drugs: A Critical Evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2022**, *178*, 1–24, doi:https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.07.014.
81. Bastogne, T. Quality-by-Design of Nanopharmaceuticals – a State of the Art. *Nanomedicine* **2017**, *13*, 2151–2157, doi:10.1016/j.nano.2017.05.014.
82. Singh, B.; Saini, S.; Lohan, S.; Beg, S. Systematic Development of Nanocarriers Employing Quality by Design Paradigms. In *Nanotechnology-based approaches for targeting and delivery of drugs and genes*; Mishra, V., Kesharwani, P., Cairul Iqbal, M., Iyer, A., Eds.; London, 2017; pp. 110–142.
83. Zagalo, D.M.; Silva, B.M.A.; Silva, C.; Simões, S.; Sousa, J.J. A Quality by Design (QbD) Approach in Pharmaceutical Development of Lipid-Based Nanosystems: A Systematic Review. *J Drug Deliv Sci Technol* **2022**, *70*, 103207, doi:https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103207.
84. European Medicines Agency (EMA) ICH Guideline Q9 on Quality Risk Management. **2014**, *44*, 1–20.
85. Sangshetti, J.N.; Deshpande, M.; Zaheer, Z.; Shinde, D.B.; Arote, R. Quality by Design Approach: Regulatory Need. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *10*, S3412–S3425, doi:10.1016/j.arabjc.2014.01.025.
86. Thakur, K.; Mahajan, A.; Sharma, G.; Singh, B.; Raza, K.; Chhibber, S.; Katare, O.P. Implementation of Quality by Design (QbD) Approach in Development of Silver Sulphadiazine Loaded Egg Oil Organogel: An Improved Dermatokinetic Profile and Therapeutic Efficacy in Burn Wounds. *Int J Pharm* **2020**, *576*, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118977.

87. Waghule, T.; Dabholkar, N.; Gorantla, S.; Rapalli, V.K.; Saha, R.N.; Singhvi, G. Quality by Design (QbD) in the Formulation and Optimization of Liquid Crystalline Nanoparticles (LCNPs): A Risk Based Industrial Approach. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2021**, *141*.
88. Xu, X.; Khan, M.A.; Burgess, D.J. A Quality by Design (QbD) Case Study on Liposomes Containing Hydrophilic API: I. Formulation, Processing Design and Risk Assessment. *Int J Pharm* **2011**, *419*, 52–59, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.012.
89. Zhang, L.; Mao, S. Application of Quality by Design in the Current Drug Development. *Asian J Pharm Sci* **2017**, *12*, 1–8, doi:10.1016/j.ajps.2016.07.006.
90. García-Manrique, P.; Matos, M.; Gutiérrez, G.; Estupiñán, O.R.; Blanco-López, M.C.; Pazos, C. Using Factorial Experimental Design to Prepare Size-Tuned Nanovesicles. *Ind Eng Chem Res* **2016**, *55*, 9164–9175, doi:10.1021/acs.iecr.6b01552.
91. Zidan, A.S.; Ibrahim, M.M.; El Megrab, N.A. Optimization of Methotrexate Loaded Niosomes by Box–Behnken Design: An Understanding of Solvent Effect and Formulation Variability. *Drug Dev Ind Pharm* **2017**, doi:10.1080/03639045.2017.1318907.
92. Kassem, M.A.; El-Sawy, H.S.; Abd-Allah, F.I.; Abdelghany, T.M.; El-Say, K.M. Maximizing the Therapeutic Efficacy of Imatinib Mesylate-Loaded Niosomes on Human Colon Adenocarcinoma Using Box-Behnken Design. *J Pharm Sci* **2017**, *106*, 111–122, doi:10.1016/j.xphs.2016.07.007.
93. González-Rodríguez, M.L.; Mouram, I.; Cózar-Bernal, M.J.; Villasmil, S.; Rabasco, A.M. Applying the Taguchi Method to Optimize Sumatriptan Succinate Niosomes as Drug Carriers for Skin Delivery. *J Pharm Sci* **2012**, *101*, 3845–3863, doi:10.1002/jps.23252.
94. Cacicedo, M.L.; Ruiz, M.C.; Scioli-Montoto, S.; Ruiz, M.E.; Fernández, M.A.; Torres-Sanchez, R.M.; Baran, E.J.; Castro, G.R.; León, I.E. Lipid Nanoparticles-Metvan: Revealing a Novel Way to Deliver a Vanadium Compound to Bone Cancer Cells. *New Journal of Chemistry* **2019**, *43*, 17726–17734, doi:10.1039/c9nj01634a.
95. Patel, V.; Bardoliwala, D.; Lalani, R.; Patil, S.; Ghosh, S.; Javia, A.; Misra, A. Development of a Dry Powder for Inhalation of Nanoparticles Codelivering Cisplatin and ABCC3 siRNA in Lung Cancer. *Ther Deliv* **2021**, *12*, 651–670, doi:10.4155/tde-2020-0117.

96. Ruiz-Azuara, L. Composición Parental de Casiopeína y Uso de La Misma. IMPI No. Solicitud MX/a/2017/016444 2017.
97. Allen, T.M.; Cullis, P.R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* (1979) **2004**, 303, 1818–1822, doi:10.1126/science.1095833.
98. Mohamed, H.B.; El-Shanawany, S.M.; Hamad, M.A.; Elsabahy, M. Niosomes: A Strategy toward Prevention of Clinically Significant Drug Incompatibilities. *Sci Rep* **2017**, 7, doi:10.1038/s41598-017-06955-w.
99. Chen, S.; Hanning, S.; Falconer, J.; Locke, M.; Wen, J. Recent Advances in Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes): Fabrication, Characterization, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2019, 144, 18–39.
100. Zhao, Z.; Ukidve, A.; Krishnan, V.; Mitragotri, S. Effect of Physicochemical and Surface Properties on in Vivo Fate of Drug Nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* **2019**, 143, 3–21, doi:10.1016/j.addr.2019.01.002.
101. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Liposome Drug Products Chemistry, Guidance for Industry 2018.
102. Beddoes, C.M.; Case, C.P.; Briscoe, W.H. Understanding Nanoparticle Cellular Entry: A Physicochemical Perspective. *Adv Colloid Interface Sci* 2015, 218, 48–68.
103. Medicines Agency, E. ICH Guideline Q3C (R6) on Impurities: Guideline for Residual Solvents Step 5;
104. BAILLIE, A.J.; FLORENCE, A.T.; HUME, L.R.; MUIRHEAD, G.T.; ROGERSON, A. The Preparation and Properties of Niosomes—Non-ionic Surfactant Vesicles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1985**, 37, 863–868, doi:10.1111/j.2042-7158.1985.tb04990.x.
105. Sabry, S.; el hakim Ramadan, A.; Abd elghany, M.; Okda, T.; Hasan, A. Formulation, Characterization, and Evaluation of the Anti-Tumor Activity of Nanosized Galangin Loaded Niosomes on Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Rats. *J Drug Deliv Sci Technol* **2021**, 61, doi:10.1016/j.jddst.2020.102163.

106. Aguilar-Jiménez, Z.; Doctorado, Y.; Químicas, E.C. NANOENCAPSULACIÓN DE CASIOPEÍNA® III-IA EN UN SISTEMA NIOSOMAL Y ESTUDIO DE SU LIBERACIÓN IN VITRO, Universidad Nacional Autónoma de México : Ciudad de México, 2016.
107. Jaafar-Maalej, C.; Diab, R.; Andrieu, V.; Elaissari, A.; Fessi, H. Ethanol Injection Method for Hydrophilic and Lipophilic Drug-Loaded Liposome Preparation. *J Liposome Res* **2010**, *20*, 228–243, doi:10.3109/08982100903347923.
108. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. ARTICLES New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening; 1990; Vol. 82;.
109. Muzzalupo, R.; Mazzotta, E. Do Niosomes Have a Place in the Field of Drug Delivery? *Expert Opin Drug Deliv* **2019**, *16*, 1145–1147, doi:10.1080/17425247.2019.1663821.
110. Junyaprasert, V.B.; Teeranachaideekul, V.; Supaperm, T. Effect of Charged and Non-Ionic Membrane Additives on Physicochemical Properties and Stability of Niosomes. *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9*, 851–859, doi:10.1208/s12249-008-9121-1.
111. Uchegbu, I.F.; Florence, A.T. Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes): Physical and Pharmaceutical Chemistry. *Adv Colloid Interface Sci* **1995**, *58*, 1–55, doi:10.1016/0001-8686(95)00242-1.
112. European Medicines Agency ICH Guideline Q3C (R6) on Impurities: Guideline for Residual Solvents. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use **2019**, *31*, 24.
113. Masjedi, M.; Montahaei, T. An Illustrated Review on Nonionic Surfactant Vesicles (Niosomes) as an Approach in Modern Drug Delivery: Fabrication, Characterization, Pharmaceutical, and Cosmetic Applications. *J Drug Deliv Sci Technol* 2021, 61.
114. Tavano, L.; Aiello, R.; Ioele, G.; Picci, N.; Muzzalupo, R. Niosomes from Glucuronic Acid-Based Surfactant as New Carriers for Cancer Therapy: Preparation, Characterization and Biological Properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2014**, *118*, 7–13, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.03.016.

115. Sezgin-Bayindir, Z.; Antep, M.N.; Yuksel, N. Development and Characterization of Mixed Niosomes for Oral Delivery Using Candesartan Cilexetil as a Model Poorly Water-Soluble Drug. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16*, 108–117, doi:10.1208/s12249-014-0213-9.
116. Duong, V.A.; Nguyen, T.T.L.; Maeng, H.J. Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules* **2020**, *25*.
117. Higuchi, T.; Yabu, H.; Shimomura, M. Simple Preparation of Hemispherical Polystyrene Particles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2006**, *284–285*, 250–253, doi:10.1016/j.colsurfa.2005.10.042.
118. Schubert, M.A.; Müller-Goymann, C.C. Solvent Injection as a New Approach for Manufacturing Lipid Nanoparticles-Evaluation of the Method and Process Parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2003**, *55*, 125–131, doi:10.1016/S0.
119. Rao, J.P.; Geckeler, K.E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2011**, *36*, 887–913.
120. Abdelbary, A.A.; Aboughaly, M.H.H. Design and Optimization of Topical Methotrexate Loaded Niosomes for Enhanced Management of Psoriasis: Application of Box-Behnken Design, in-Vitro Evaluation and in-Vivo Skin Deposition Study. *Int J Pharm* **2015**, *485*, 235–243, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.03.020.
121. Were, L.M.; Bruce, B.D.; Davidson, P.M.; Weiss, J. Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 8073–8079, doi:10.1021/jf0348368.
122. Mirzaei-Parsa, M.J.; Najafabadi, M.R.H.; Haeri, A.; Zahmatkeshan, M.; Ebrahimi, S.A.; Pazoki-Toroudi, H.; Adel, M. Preparation, Characterization, and Evaluation of the Anticancer Activity of Artemether-Loaded Nano-Niosomes against Breast Cancer. *Breast Cancer* **2020**, *27*, 243–251, doi:10.1007/s12282-019-01014-w.

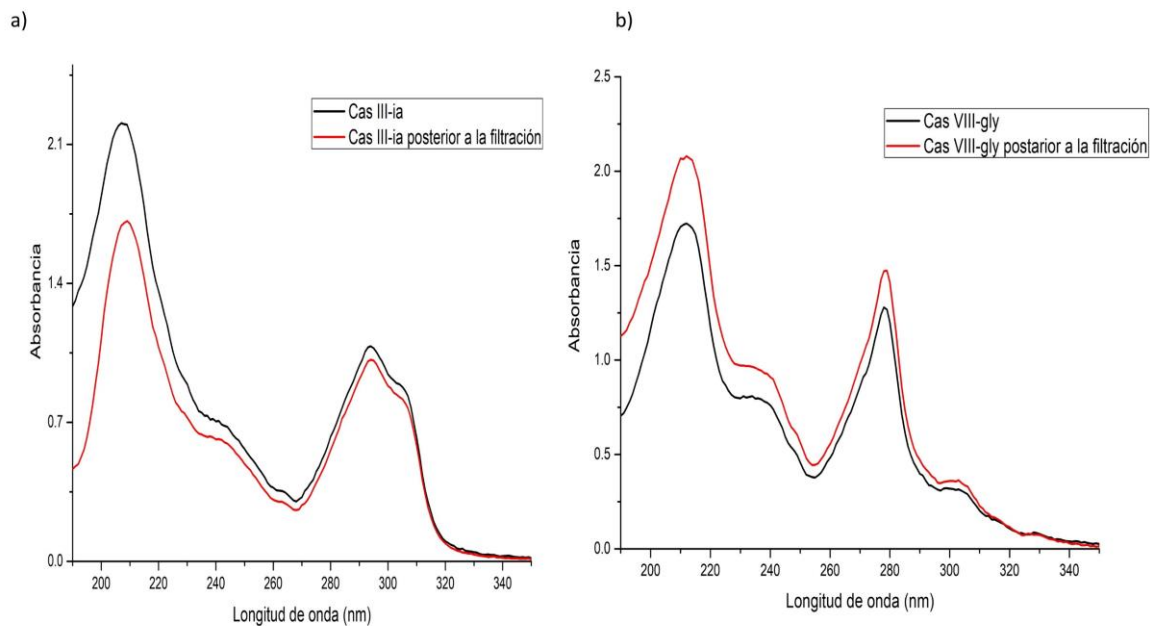
123. Shehata, T.M.; Elsewedy, H.S. Paclitaxel and Myrrh Oil Combination Therapy for Enhancement of Cytotoxicity against Breast Cancer; QbD Approach. *Processes* **2022**, *10*, doi:10.3390/pr10050907.
124. Rathod, M.; Suthar, D.; Patel, H.; Shelat, P.; Parejiya, P. Microemulsion Based Nasal Spray: A Systemic Approach for Non-CNS Drug, Its Optimization, Characterization and Statistical Modelling Using QbD Principles. *J Drug Deliv Sci Technol* **2019**, *49*, 286–300, doi:10.1016/j.jddst.2018.11.017.
125. Akhilesh, D.; Bini, K.B.; Kamath, J. v Review on Span-60 Based Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) as Novel Drug Delivery. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **2012**, *3*, 6–12.
126. Barani, M.; Mirzaei, M.; Torkzadeh-Mahani, M.; Adeli-sardou, M. Evaluation of Carum-Loaded Niosomes on Breast Cancer Cells: Physicochemical Properties, In Vitro Cytotoxicity, Flow Cytometric, DNA Fragmentation and Cell Migration Assay. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-43755-w.
127. Ghosh, S.; Ghatak, C.; Banerjee, C.; Mandal, S.; Kuchlyan, J.; Sarkar, N. Spontaneous Transition of Micelle-Vesicle-Micelle in a Mixture of Cationic Surfactant and Anionic Surfactant-like Ionic Liquid: A Pure Nonlipid Small Unilamellar Vesicular Template Used for Solvent and Rotational Relaxation Study. *Langmuir* **2013**, *29*, 10066–10076, doi:10.1021/la402053a.
128. Antunes, F.E.; Gentile, L.; Oliviero, C.; Tavano, L.; Ranieri, G.A. Gels of Pluronic F127 and Nonionic Surfactants from Rheological Characterization to Controlled Drug Permeation. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2011**, *87*, 42–48, doi:10.1016/j.colsurfb.2011.04.033.
129. Ritwiset, A.; Kongsuk, S.; Johns, J.R. Molecular Structure and Dynamical Properties of Niosome Bilayers with and without Cholesterol Incorporation: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Appl Surf Sci* **2016**, *380*, 23–31, doi:10.1016/j.apsusc.2016.02.092.
130. Roy, A.; Kundu, N.; Banik, D.; Sarkar, N. Comparative Fluorescence Resonance Energy-Transfer Study in Pluronic Triblock Copolymer Micelle and Niosome Composed of Biological Component Cholesterol: An Investigation of Effect of Cholesterol and Sucrose on the FRET

- Parameters. *Journal of Physical Chemistry B* **2016**, 120, 131–142, doi:10.1021/acs.jpcc.5b09761.
131. Ritwiset, A.; Kongsuk, S.; Johns, J. Molecular Structure and Stability of the Sorbitan Monostearate (Span60) Monolayers Film at the Water-Air Interface: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J Mol Liq* **2014**, 195, 157–164, doi:10.1016/j.molliq.2014.02.032.
132. Wilkhu, J.S.; Ouyang, D.; Kirchmeier, M.J.; Anderson, D.E.; Perrie, Y. Investigating the Role of Cholesterol in the Formation of Non-Ionic Surfactant Based Bilayer Vesicles: Thermal Analysis and Molecular Dynamics. *Int J Pharm* **2014**, 461, 331–341, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.11.063.
133. Miranda-Calderón, J.E.; Macías-Rosales, L.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L.; Faustino-Vega, A.; Gracia-Mora, J.; Bernad-Bernad, M.J. Effect of Casiopein III-Ia Loaded into Chitosan Nanoparticles on Tumor Growth Inhibition. *J Drug Deliv Sci Technol* **2018**, 48, 1–8, doi:10.1016/j.jddst.2018.07.004.
134. Tavano, L.; Oliviero Rossi, C.; Picci, N.; Muzzalupo, R. Spontaneous Temperature-Sensitive Pluronic®based Niosomes: Triggered Drug Release Using Mild Hyperthermia. *Int J Pharm* **2016**, 511, 703–708, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.064.
135. Hickey, J.W.; Santos, J.L.; Williford, J.M.; Mao, H.Q. Control of Polymeric Nanoparticle Size to Improve Therapeutic Delivery. *Journal of Controlled Release* **2015**, 219, 536–547, doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.006.
136. Akbarzadeh, I.; Farid, M.; Javidfar, M.; Zabet, N.; Shokoohian, B.; Arki, M.K.; Shpichka, A.; Noorbazargan, H.; Aghdaei, H.A.; Hossein-khannazer, N.; et al. The Optimized Formulation of Tamoxifen-Loaded Niosomes Efficiently Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. *AAPS PharmSciTech* **2022**, 23, 57, doi:10.1208/s12249-022-02212-0.
137. Kabanov, A. v; Batrakova, E. v; Alakhov, V.Y. Pluronic® Block Copolymers as Novel Polymer Therapeutics for Drug and Gene Delivery. *Journal of Controlled Release* **2002**, 82, 189–212, doi:10.1016/S0168-3659(02)00009-3.

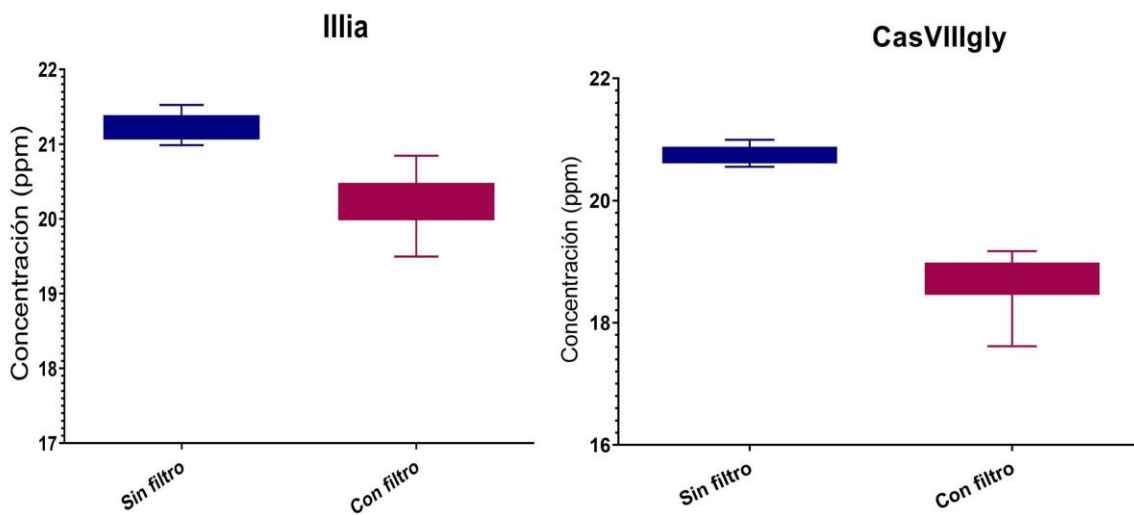
138. Pardakhty, A.; Varshosaz, J.; Rouholamini, A. In Vitro Study of Polyoxyethylene Alkyl Ether Niosomes for Delivery of Insulin. *Int J Pharm* **2007**, *328*, 130–141, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.08.002.
139. Jain, A.; Jain, S.K. In Vitro Release Kinetics Model Fitting of Liposomes: An Insight. *Chem Phys Lipids* **2016**, *201*, 28–40, doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.10.005.
140. Agarwal, S.; Mohamed, M.S.; Raveendran, S.; Rochani, A.K.; Maekawa, T.; Kumar, D.S. Formulation, Characterization and Evaluation of Morusin Loaded Niosomes for Potentiation of Anticancer Therapy. *RSC Adv* **2018**, *8*, 32621–32636, doi:10.1039/c8ra06362a.
141. Tsukihara, H.; Nakagawa, F.; Sakamoto, K.; Ishida, K.; Tanaka, N.; Okabe, H.; Uchida, J.; Matsuo, K.; Takechi, T. Efficacy of Combination Chemotherapy Using a Novel Oral Chemotherapeutic Agent, TAS-102, Together with Bevacizumab, Cetuximab, or Panitumumab on Human Colorectal Cancer Xenografts. *Oncol Rep* **2015**, *33*, 2135–2142.
142. Pan, Q.; Chen, M.; Li, J.; Wu, Y.; Zhen, C.; Liang, B. Antitumor Function and Mechanism of Phycoerythrin from *Porphyra Haitanensis*. *Biological Research* **2013**, 87–95.



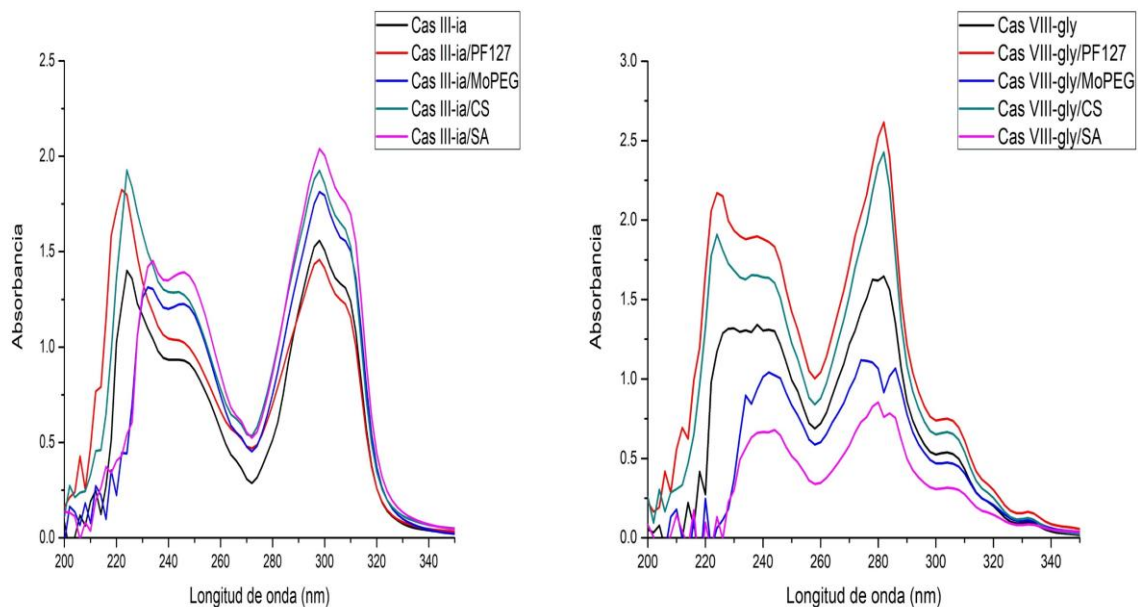
# APÉNDICE 1



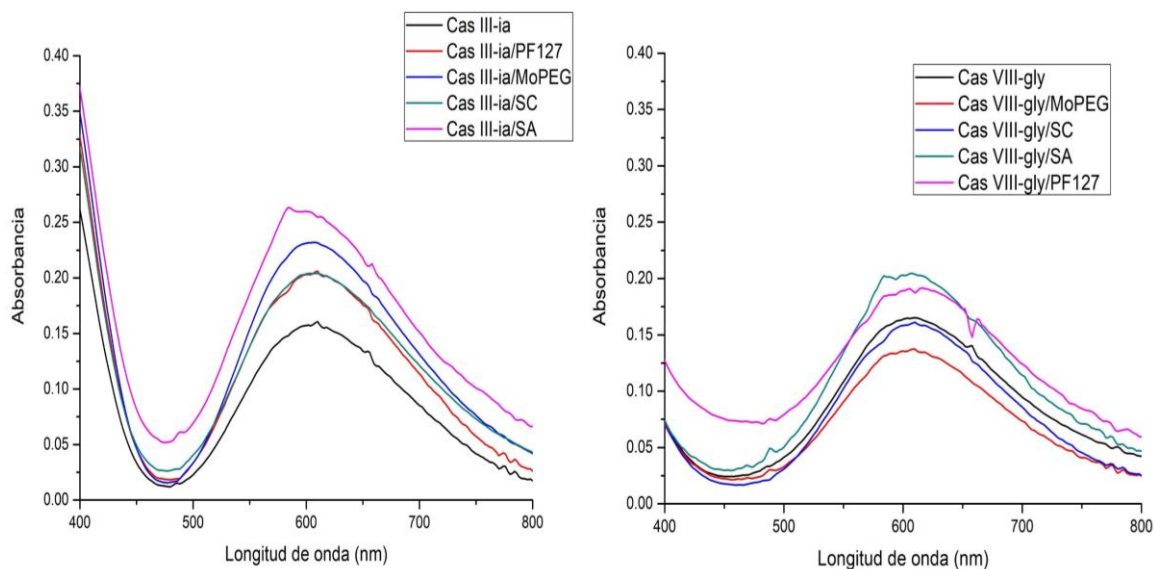
**Figura A1.** Espectro de la región Ultravioleta con concentración de 20 ppm en disolución acuosa de la a) Casiopeína III-ia y b) Cas VIII-gly



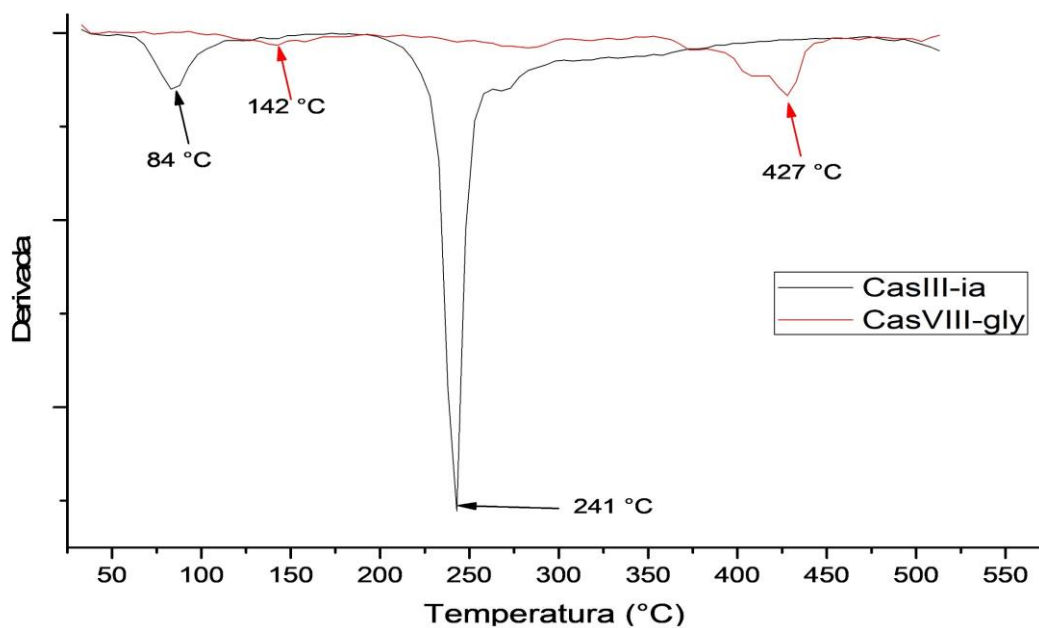
**Figura A2.** Cuantificación de Casiopeína III-ia y Casiopeína VIIIgly, cuando es son pasadas a través de un filtro de PES. Cuantificación mediante espectrofotometría UV n= 3 réplicas con 3 repeticiones.



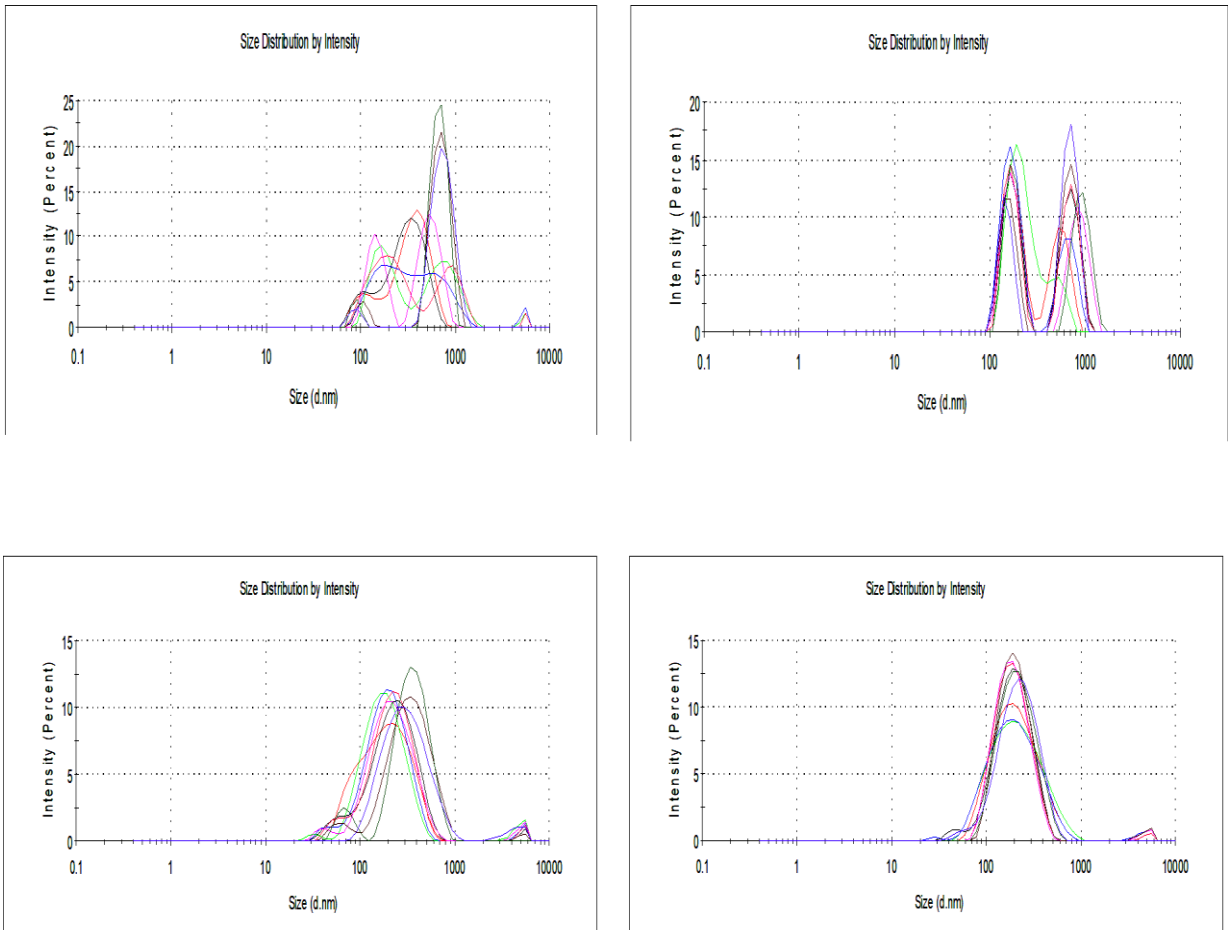
**Figura A3.** Espectro UV de la Casiopeína III-ia y Casiopeína VIII-gly (90  $\mu$ M), mezcla de Casiopeína III-ia/aditivo (90  $\mu$ M/20  $\mu$ M) y mezcla de casiopeína VIII-gly/aditivo (90  $\mu$ M/20  $\mu$ M) en una mezcla de diclorometano:metanol (1:1).



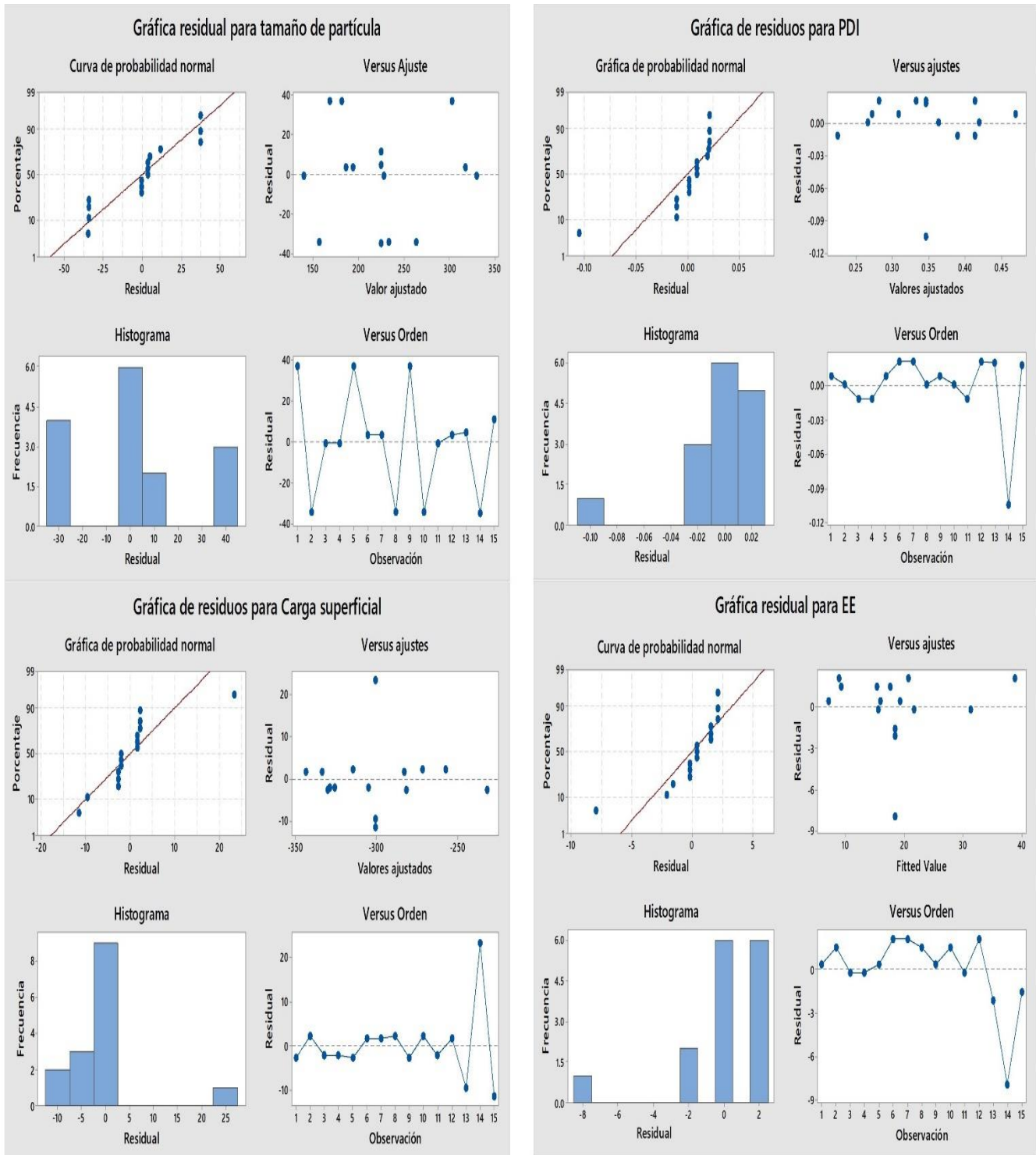
**Figura A4.** Espectro Visible de la casiopeína III-ia y casiopeína VIII-gly (3 mM), mezcla de Casiopeína III-ia/aditivo (3.6 mM/0.6 mM) y mezcla de casiopeína VIII-gly/aditivo (3.6 mM/0.6 mM) en una mezcla de diclorometano:metanol (1:1).



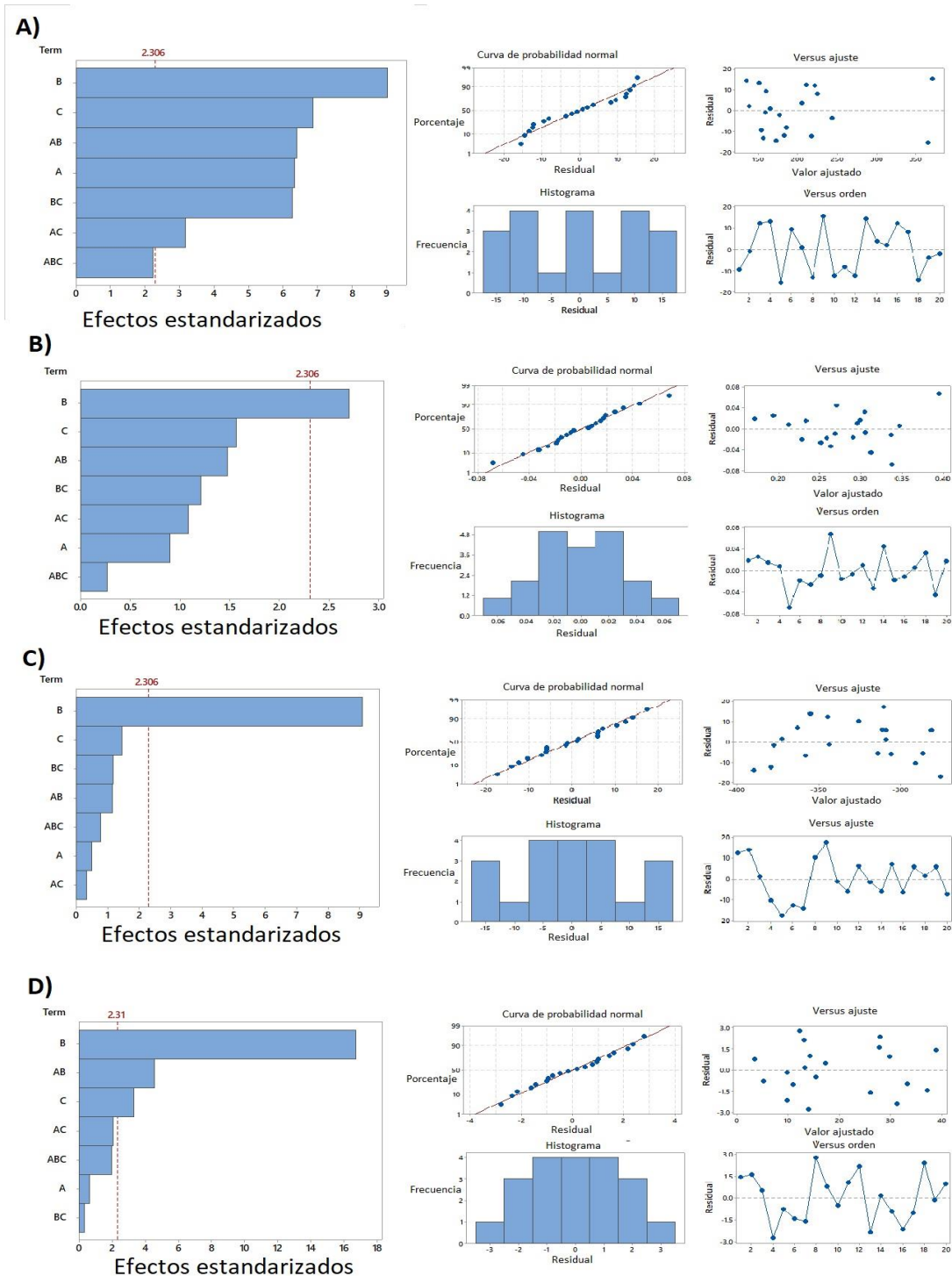
**Figura A5.** Gráfica de la velocidad de cambio de la masa con respecto a la temperatura para la Casiopeínas III-ia y VIIIgly, con una rapidez de calentamiento de 10 °C/minuto bajo atmósfera de nitrógeno.



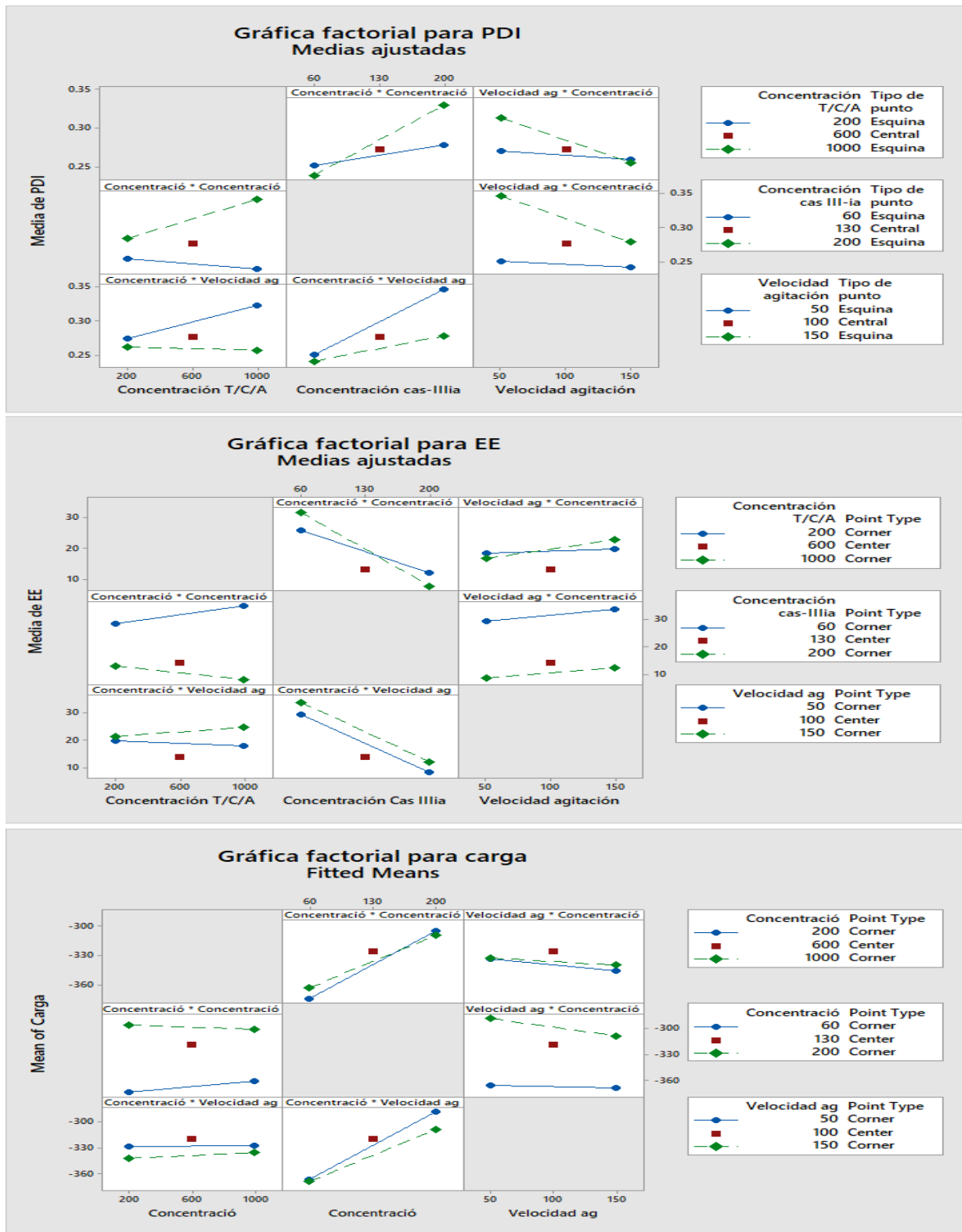
**Figura A6.** Dispersión dinámica de luz para el tamaño de partícula con diferentes aditivos. Concentración total 400  $\mu\text{M}$  de Span60:colesterol (1:1, relación molar). El aditivo se utilizó al 5 % de la concentración molar total.



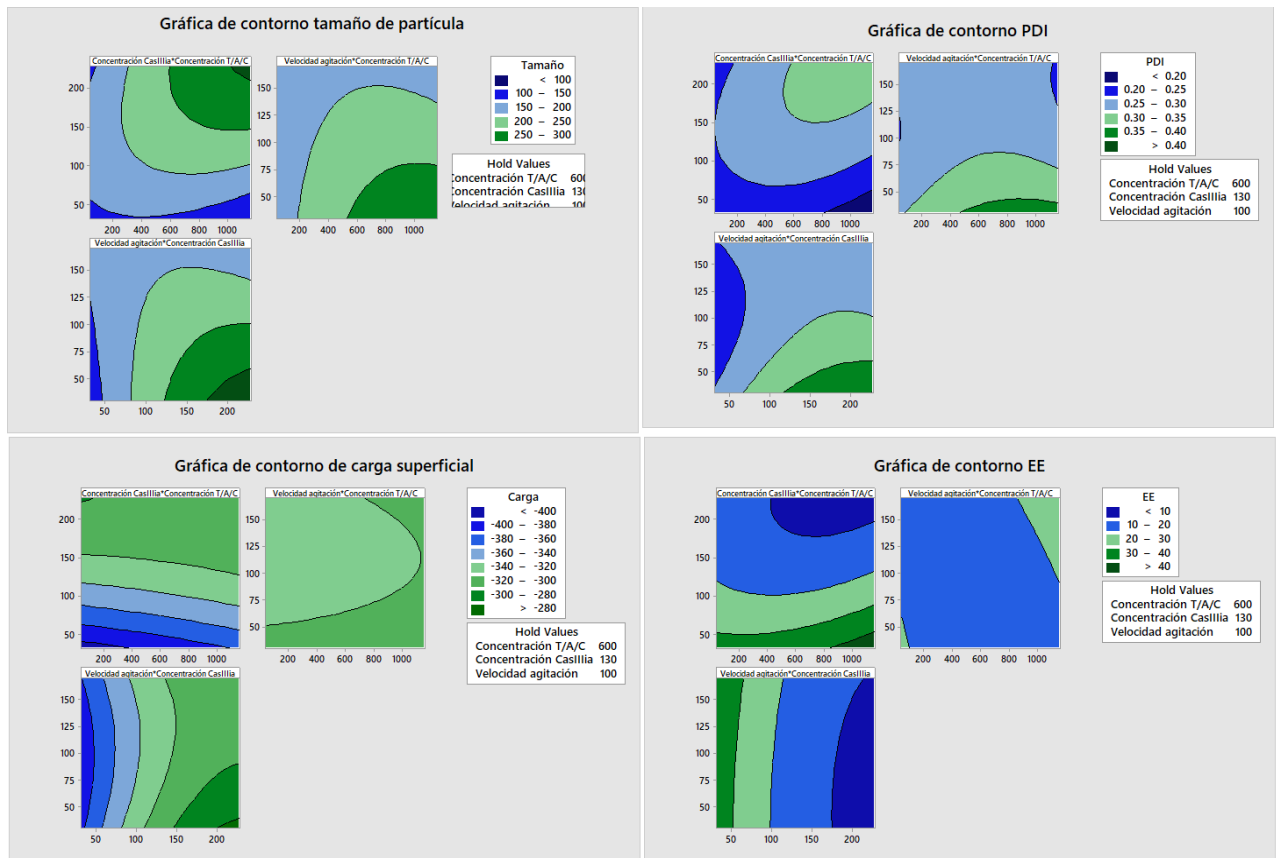
**Figura A7.** Curvas de normalidad y de residuos de efectos estandarizados para tamaño de partícula, PDI, carga superficial y eficiencia de encapsulación para el diseño Plackett-Burman.



**Figure A8.** Diagramas de Pareto, curvas de normalidad y gráficas residuos de efectos estandarizados ( $\alpha = 0.05$ ) para el diseño factorial  $2^3$ . Donde, **A)** tamaño de partícula, **B)** PDI, **C)** Carga superficial y **D)** Eficiencia de encapsulación. Donde **A:** concentración de S/C/P; **B:** Concentración de Cas III-ia; **C:** Velocidad de agitación durante la inyección.

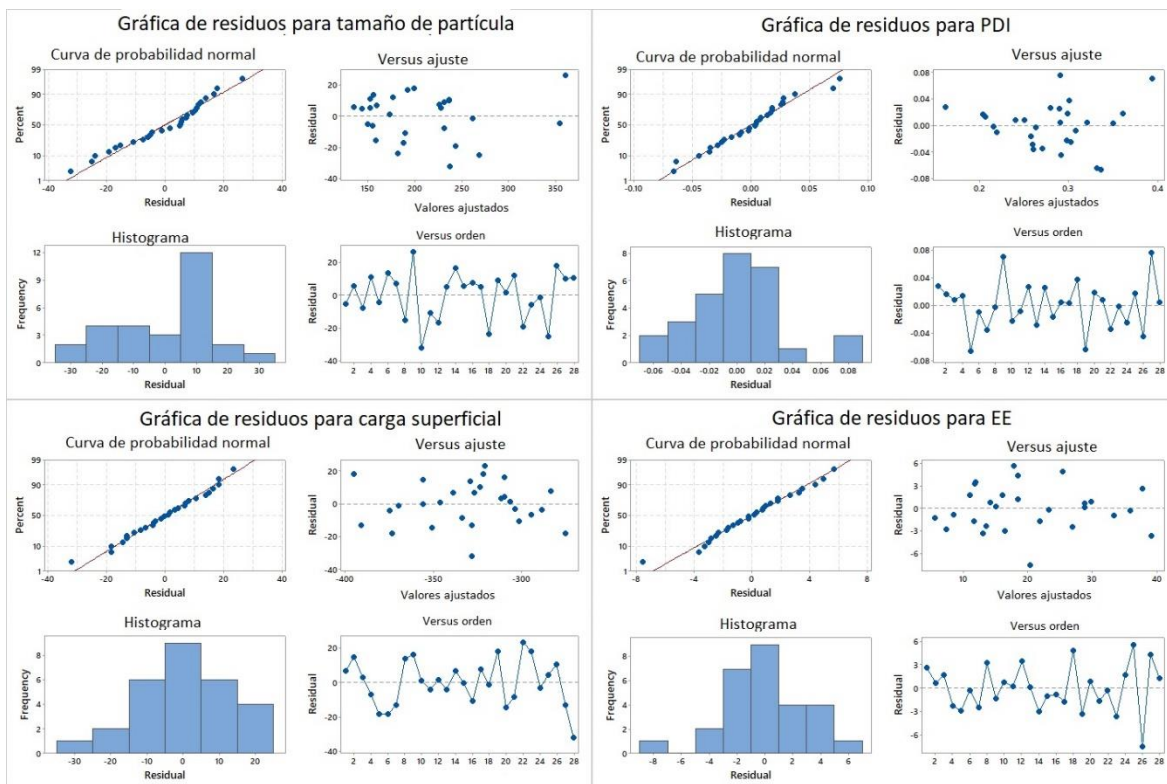


**Figura A9.** Gráfica de interacción del cambio de eficiencia de encapsulación, carga superficial y PDI, en función de la interacción de dos variables.

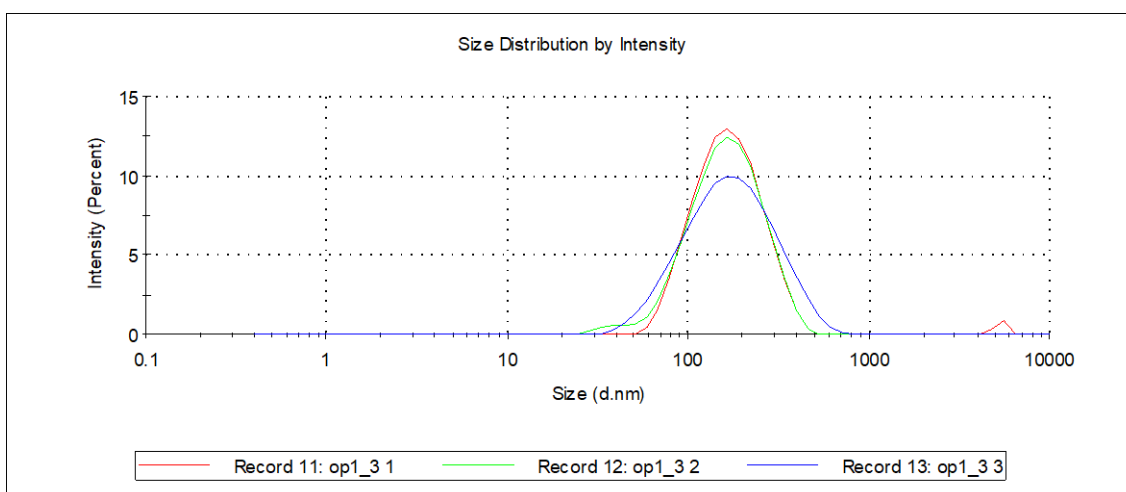


**Figura A10.** Gráfica de contorno del comportamiento de las respuestas (EE, carga superficial, PDI y tamaño de partícula) en función de dos variables con un valor fijo para una variable.

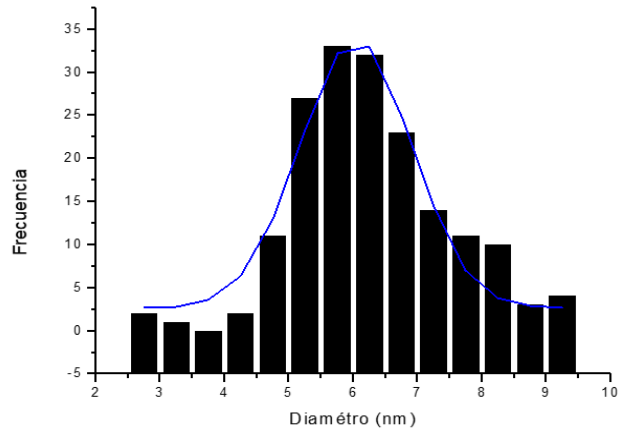
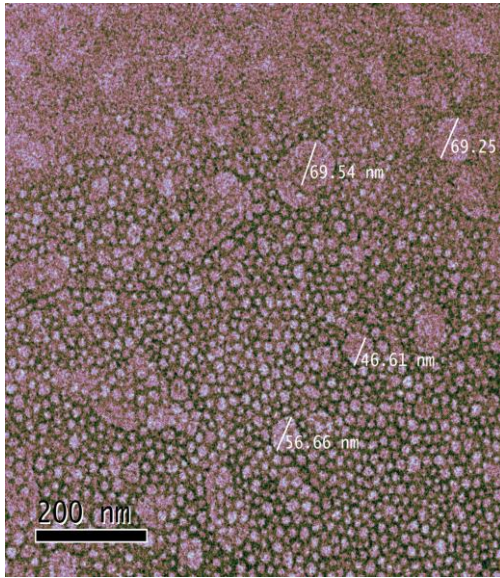




**Figure A11.** Curvas de normalidad y gráficas de residuos de efectos estandarizados ( $\alpha = 0.05$ ) del diseño central compuesto, para tamaño de partícula, superficie de carga, eficiencia de encapsulación y PDI para el diseño central compuesto.



**Figura A12.** Gráfica obtenida por dispersión Dinámica de Luz (DLS) de tamaño de partícula en intensidad para la nanoformulación optimizada.



Tamaño de partícula (nm)
6.03±1.57

Figura A13. Formación de micelas a partir del pluronic F127. Calculadas con Image J.

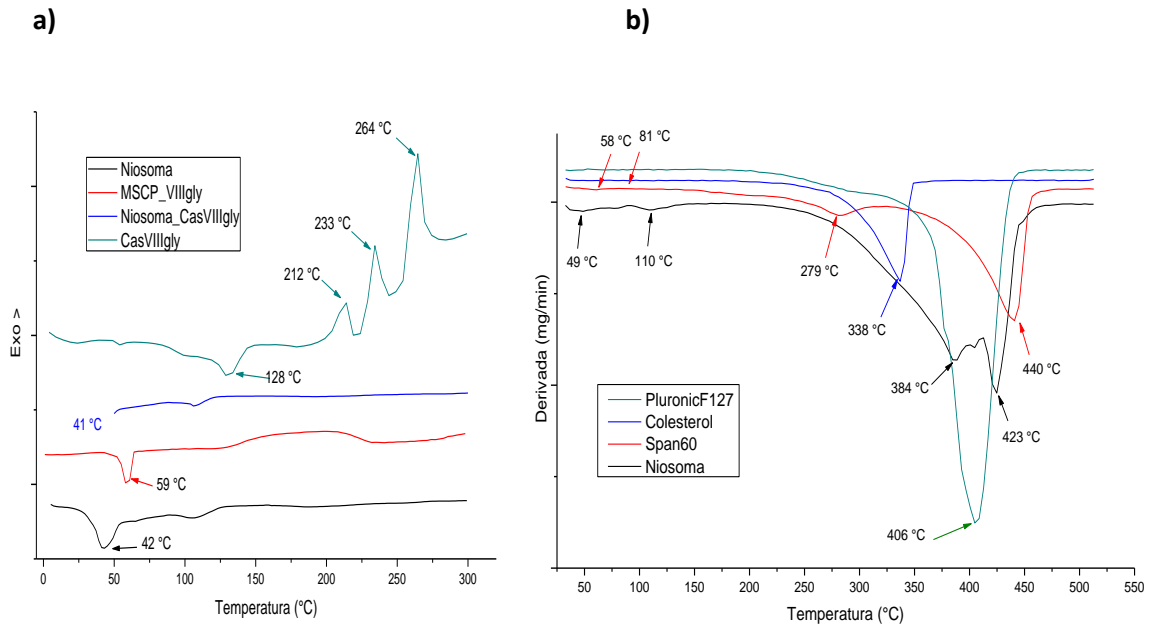
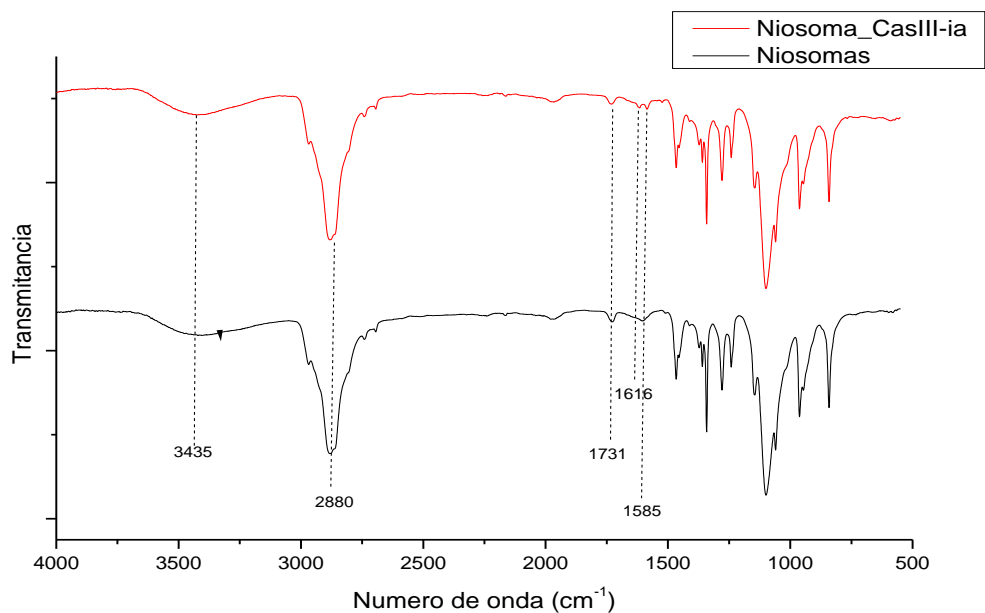
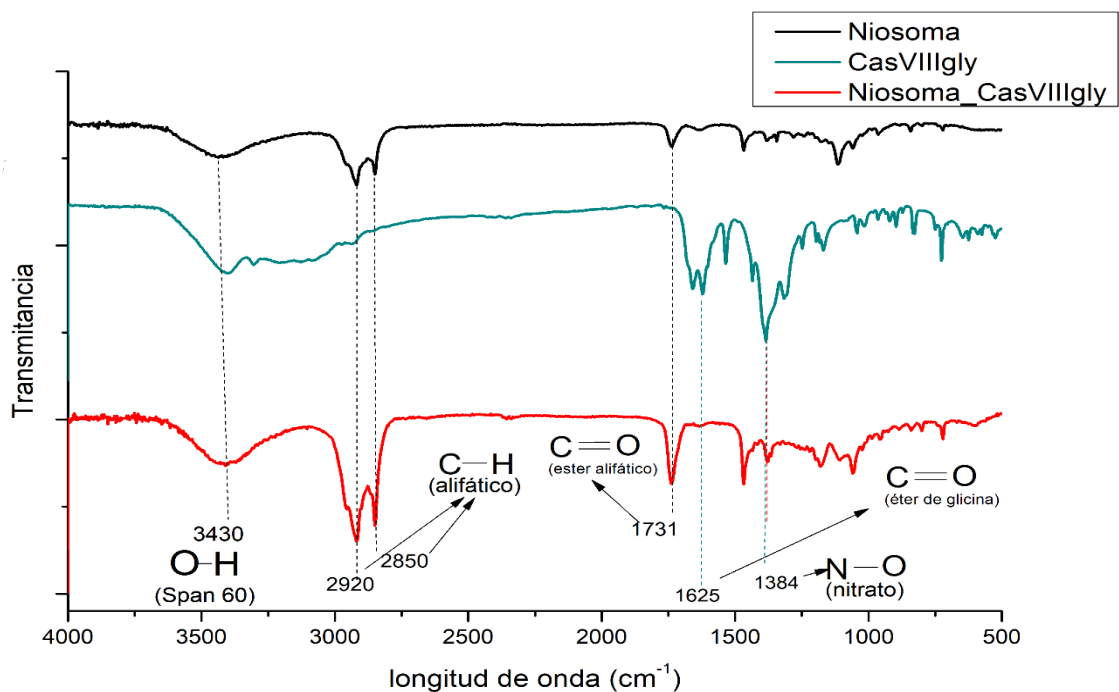


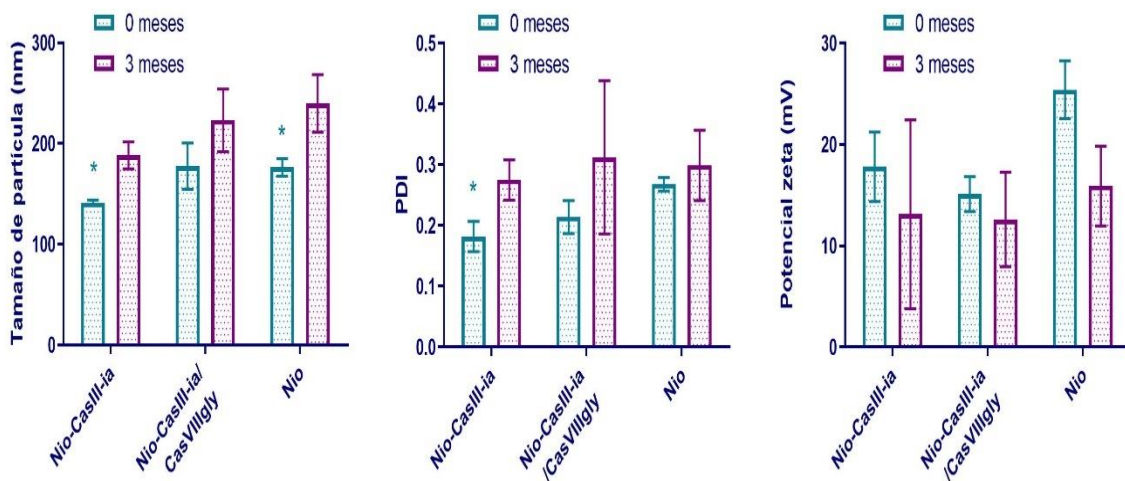
Figure A14. Termogramas de (a) DSC y (b) TGA de CasIII-VIII-gly, de niosomas con y sin Cas VIII-gly.



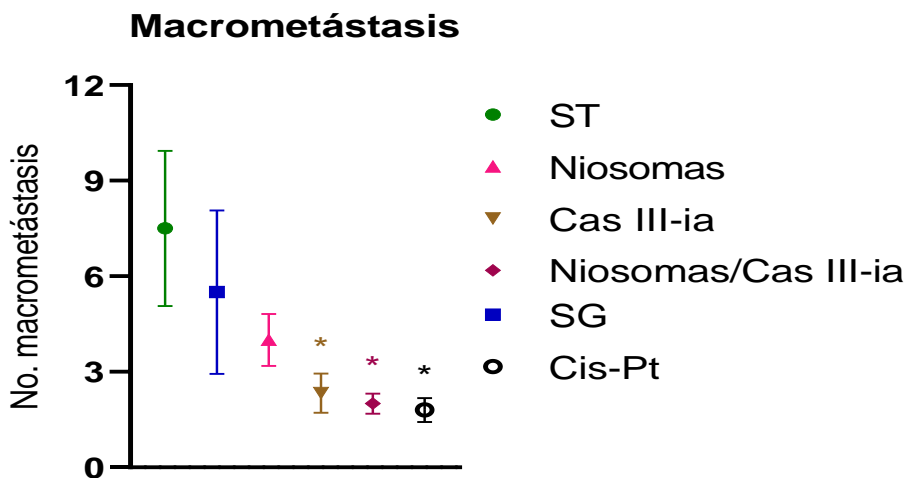
**Figura A15.** Espectros de FTIR-ATR de Cas III-ia (línea roja), blanco de niosoma (línea azul) y niosoma con Cas III-ia (línea negra).



**Figura A16.** Espectros de FTIR de Cas VIII-gly (línea roja), blanco de niosoma (línea azul) y niosoma con Cas VIII-gly (línea negra).



**Figura A17.** Estudios de estabilidad acelerada a 4 °C para Cas III-ia en niosomas, mezcla de Cas III-ia/Cas VIII-gly en niosomas y blanco de niosomas para la formulación optimizada. Las barras marcadas con asterisco fueron estadísticamente significativas (t-student no pareada).



**Figura A18.** Gráfica del número de macrometástasis en pulmón y corazón (las barras de error representan el error estándar). A partir de pruebas de t-student se encontró que la Casiopeína III-ia, Niosomas/Cas III-ia y el Cis-pt fueron estadísticamente significativa con respecto al grupo sin tratamiento. (La prueba t-student se llevó a cabo con el error estándar).

# APENDICE 2:

**A2. Tabla 1.** Resultados de ANOVA de unidades codificadas, del diseño factorial 2<sup>3</sup>, para tamaño de partícula, índice de polidispersidad, superficie de carga y eficiencia de encapsulación, para niosomas con Cas III-ia.

## Tamaño de partícula

Source value	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-
Model	11	81643	7422.1	26.70	
0.000					
Blocks	3	3940	1313.2	4.72	
0.035					
Linear	3	46919	15639.6	56.25	
0.000					
S/C/P concentration	1	11157	11156.6	40.13	
0.000					
CasIIIia concentration	1	22658	22657.8	81.49	
0.000					
speed rate	1	13105	13104.5	47.13	
0.000					
2-Way Interactions	3	25116	8372.0	30.11	
0.000					
S/C/P concentration*CasIIIia concentration	1	11358	11358.2	40.85	
0.000					
S/C/P concentration*speed rate	1	2790	2790.5	10.04	
0.013					
CasIIIia concentration*speed rate	1	10967	10967.3	39.45	
0.000					
3-Way Interactions	1	1370	1370.3	4.93	
0.057					
S/C/P conc*CasIIIia conc*speed rate	1	370	1370.3	4.93	
0.057					
Curvature	1	1926	1925.7	6.93	
0.030					
Error	8	2224	278.0		
Total	19	83867			

## Índice de polidispersidad

Source P-Value	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value
Model	11	0.058120	0.005284	2.20
0.136				
Blocks	3	0.013236	0.004412	1.84
0.219				
Linear	3	0.025421	0.008474	3.53
0.068				
S/C/P concentration	1	0.001936	0.001936	0.81
0.396				
CasIIIia concentration	1	0.017556	0.017556	7.31
0.027				
speed rate	1	0.005929	0.005929	2.47
0.155				
2-Way Interactions	3	0.011606	0.003869	1.61
0.262				

S/C/P concentration*CasIIIia concentration	1	0.005256	0.005256	2.19
0.177				
S/C/P concentration*speed rate	1	0.002809	0.002809	1.17
0.311				
CasIIIia concentration*speed rate	1	0.003540	0.003540	1.47
0.259				
3-Way Interactions	1	0.000174	0.000174	0.07
0.795				
S/C/P conc*CasIIIia conc*speed rate	1	0.000174	0.000174	0.07
0.795				
Curvature	1	0.000024	0.000024	0.01
0.923				
Error	8	0.019221	0.002403	
Total	19	0.077341		

### Carga superficial

Source Value	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-
Model	11	24330.0	2211.8	9.52	
0.002					
Blocks	3	3320.2	1106.7	4.77	
0.034					
Linear	3	19722.5	6574.2	28.31	
0.000					
S/C/P concentration	1	56.2	56.2	0.24	
0.636					
CasIIIia concentration	1	19182.2	19182.2	82.60	
0.000					
speed rate	1	484.0	484.0	2.08	
0.187					
2-Way Interactions	3	655.3	218.4	0.94	
0.465					
S/C/P concentration*CasIIIia concentration	1	306.3	306.3	1.32	
0.284					
S/C/P concentration*speed rate	1	25.0	25.0	0.11	
0.751					
CasIIIia concentration*speed rate	1	324.0	324.0	1.40	
0.271					
3-Way Interactions	1	135.2	135.2	0.58	
0.467					
S/C/P conc*CasIIIia conc*speed rate	1	135.2	135.2	0.58	
0.467					
Curvature	1	616.1	616.1	2.65	
0.142					
Error	8	1857.8	232.2		
Total	19	26187.8			

### Eficiencia de encapsulación

Source P-Value	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value
Model	11	2247.72	204.34	31.85
0.000				
Blocks	3	61.37	20.46	3.19
0.084				

Linear	3	1865.63	621.88	96.92
0.000				
S/C/P concentration	1	2.39	2.39	0.37
0.558				
CasIIIia concentration	1	1792.89	1792.89	279.42
0.000				
speed rate	1	70.35	70.35	10.96
0.011				
2-Way Interactions	3	159.92	53.31	8.31
0.008				
S/C/P concentration*CasIIIia concentration	1	131.96	131.96	20.57
0.002				
S/C/P concentration*speed rate	1	27.38	27.38	4.27
0.073				
CasIIIia concentration*speed rate	1	0.57	0.57	0.09
0.773				
3-Way Interactions	1	24.63	24.63	3.84
0.086				
S/C/P conc*CasIIIia conc*speed rate	1	24.63	24.63	3.84
0.086				
Curvature	1	158.85	158.85	24.76
0.086				
Error	8	51.33	6.42	
Total	19			

**A2. Tabla 2.** Resultados de ANOVA de unidades codificadas para tamaño de partícula, PDI, carga superficial y eficiencia de encapsulación para niosomas con Cas III-ia para del diseño central compuesto.

### Tamaño de partícula

Source	Value	P-Value	DF	Adj SS	Adj MS	F-
Model	16.97	0.000	13	90559.8	6966.1	
Blocks	4.38	0.017	4	7195.5	1798.9	
Linear	42.46	0.000	3	52286.4	17428.8	
S/C/P Concentration	27.11	0.000	1	11127.1	11127.1	
Cas III-ia concentration	70.31	0.000	1	28858.8	28858.8	
Speed rate	29.97	0.000	1	12300.5	12300.5	
Square	3.26	0.053	3	4020.0	1340.0	
S/C/P Concentration*S/C/P Concentration	3.81	0.071	1	1565.2	1565.2	
Cas III-ia conc*Cas III-ia conc	4.26	0.058	1	1748.3	1748.3	
Speed rate*Speed rate	0.03	0.869	1	11.7	11.7	
2-Way Interaction	20.40	0.000	3	25116.0	8372.0	

S/C/P Conc*Cas III-ia conc			1	11358.2	11358.2
	27.67	0.000			
S/C/P Concentration*Speed rate			1	2790.5	2790.5
	6.80	0.021			
Cas III-ia concentration*Speed rate			1	10967.3	10967.3
	26.72	0.000			
Error			14	5746.2	410.4
Lack-of-Fit			13	5746.1	442.0
	2455.58	0.016			
Pure Error			1	0.2	0.2
Total				27	96306.0

### Índice de polidispersidad

Source	Value	P-Value	DF	Adj SS	Adj MS	F-
Model			13	0.071747	0.005519	
	2.49	0.052				
Blocks			4	0.020899	0.005225	
	2.35	0.104				
Linear			3	0.032435	0.010812	
	4.87	0.016				
S/C/P Concentration			1	0.001058	0.001058	
	0.48	0.501				
Cas III-ia concentration			1	0.019185	0.019185	
	8.64	0.011				
Speed rate			1	0.012191	0.012191	
	5.49	0.034				
Square			3	0.006659	0.002220	
	1.00	0.422				
S/C/P Concentration*S/C/P Concentration			1	0.002082	0.002082	
	0.94	0.349				
Cas III-ia conc*Cas III-ia conc			1	0.002293	0.002293	
	1.03	0.327				
Speed rate*Speed rate			1	0.002848	0.002848	
	1.28	0.276				
2-Way Interaction			3	0.011605	0.003868	
	1.74	0.204				
S/C/P Concentration*Cas III-ia conc			1	0.005256	0.005256	
	2.37	0.146				
S/C/P Concentration*Speed rate			1	0.002809	0.002809	
	1.27	0.280				
Cas III-ia concentration*Speed rate			1	0.003540	0.003540	
	1.59	0.227				
Error			14	0.031079	0.002220	
Lack-of-Fit			13	0.028487	0.002191	
	0.85	0.703				
Pure Error			1	0.002592	0.002592	
Total				27	0.102827	

### Carga superficial

Source	Value	P-Value	DF	Adj SS	Adj MS	F-
--------	-------	---------	----	--------	--------	----



Model			13	27345.9	2103.5
Blocks	6.20	0.001	4	3213.8	803.4
Linear	2.37	0.103	3	22268.8	7422.9
S/C/P Concentration	21.89	0.000	1	434.2	434.2
Cas III-ia concentration	1.28	0.277	1	21340.6	21340.6
Speed rate	62.93	0.000	1	494.0	494.0
Square	1.46	0.247	3	1220.8	406.9
S/C/P Concentration*S/C/P Concentration	1.20	0.346	1	2.0	2.0
Cas III-ia conc*Cas III-ia conc	0.01	0.940	1	1045.0	1045.0
Speed rate*Speed rate	3.08	0.101	1	294.8	294.8
2-Way Interaction	0.87	0.367	3	655.3	218.4
S/C/P Concentration*Cas III-ia conc	0.64	0.599	1	306.3	306.3
S/C/P Concentration*Speed rate	0.90	0.358	1	25.0	25.0
Cas III-ia concentration*Speed rate	0.07	0.790	1	324.0	324.0
Error	0.96	0.345	14	4747.5	339.1
Lack-of-Fit			13	4567.0	351.3
Pure Error	1.95	0.514	1	180.5	180.5
Total			27	32093.4	

### Eficiencia de encapsulación

Source	Value	P-Value	DF	Adj SS	Adj MS	F-
Model	11.19	0.000	13	2443.16	187.94	
Blocks	1.50	0.255	4	100.97	25.24	
Linear	40.84	0.000	3	2058.72	686.24	
S/C/P Concentration	0.31	0.587	1	5.20	5.20	
Cas III-ia concentration	121.17	0.000	1	2036.00	2036.00	
Speed rate	1.04	0.325	1	17.52	17.52	
Square	3.36	0.049	3	169.24	56.41	
S/C/P Concentration*S/C/P Concentration	2.34	0.148	1	39.30	39.30	

Cas III-ia conc*Cas III-ia conc	5.96	0.029	1	100.08	100.08
Speed rate*Speed rate	0.06	0.803	1	1.09	1.09
2-Way Interaction	3.17	0.057	3	159.92	53.31
S/C/P Conc*Cas III-ia conc	7.85	0.014	1	131.96	131.96
S/C/P Concentration*Speed rate	1.63	0.223	1	27.38	27.38
Cas III-ia concentration*Speed rate	0.03	0.856	1	0.57	0.57
Error			14	235.23	16.80
Lack-of-Fit			13	230.49	17.73
Pure Error	3.74	0.386	1	4.74	4.74
Total			27	2678.39	

**A2. Tabla 3.** Actividad antitumoral y cambios en el peso de las ratonas implantadas con cáncer de mama 4t1, después del tratamiento con Cas III-ia, Niosomas/Cas III-ia y Cis-pt.

Grupo	Dosis (mg/Kg)	RTV	VTC	TGI (%)	BWC	VIT
Sin tratamiento		474.28±61.81	19.73±3.33	0	-13.02±4.15	
Solución de glucosa 5 %		3287.26±2796.80	20.45±3.99	-593	-10.29±1.57	108.21±18.44
Niosomas	1.5 mg/Kg	1,780.61±1,048.72	17.25±3.67	-275	-2.27±4.22	89.78±11.77
Cas III-ia	6 mg/kg	396.18±32.41	9.46±0.72	16.46	-9.66±2.47	34.57±5.48
Nio/Cas III-ia	6 mg/Kg	368.18±113.07	10.14±2.05	22.37	-6.61±3.60	36.81±7.83
Cis-Pt	4 mg/kg	270.77±196.22	7.51±2.39	42.90	-12.63±4.27	38.92±8.63

Los valores calculados fueron realizados con base en la bibliografía. RTV: Volumen relativo del tumor; TGI: Coeficiente de Inhibición del crecimiento del tumor al día 21 [141]; BWC: Cambio del peso corporal [141]; VTC: Velocidad de crecimiento tumoral; VTI: Velocidad inhibición del tumor [142].



Article

# Development and In Vitro and In Vivo Evaluation of an Antineoplastic Copper(II) Compound (Casiopeina III-ia) Loaded in Nonionic Vesicles Using Quality by Design

Zenayda Aguilar-Jiménez, Mauricio González-Ballesteros, Silvia G. Dávila-Manzanilla, Adrián Espinoza-Guillén and Lena Ruiz-Azuara \*

Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Mexico City DF 04510, Mexico

\* Correspondence: lenar701@gmail.com



Citation: Aguilar-Jiménez, Z.;

González-Ballesteros, M.;

Dávila-Manzanilla, S.G.;

Espinoza-Guillén, A.; Ruiz-Azuara, L.

Development and In Vitro and In

Vivo Evaluation of an Antineoplastic

Copper(II) Compound (Casiopeina

III-ia) Loaded in Nonionic Vesicles

Using Quality by Design. *Int. J. Mol.*

*Sci.* **2022**, *23*, 12756. [https://doi.org/](https://doi.org/10.3390/ijms232112756)

[10.3390/ijms232112756](https://doi.org/10.3390/ijms232112756)

Academic Editor: Michael Danquah

Received: 20 September 2022

Accepted: 19 October 2022

Published: 22 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In recent decades, the interest in metallodrugs as therapeutic agents has increased. Casiopeinas are copper-based compounds that have been evaluated in several tumor cell lines. Currently, casiopeina III-ia (CasIII-ia) is being evaluated in phase I clinical trials. The aim of the present work is to develop a niosome formulation containing CasIII-ia for intravenous administration through a quality-by-design (QbD) approach. Risk analysis was performed to identify the factors that may have an impact on CasIII-ia encapsulation. The developed nanoformulation optimized from the experimental design was characterized by spectroscopy, thermal analysis, and electronic microscopy. In vitro drug release showed a burst effect followed by a diffusion-dependent process. The niosomes showed physical stability for at least three months at 37 °C and 75% relative humidity. The in vitro test showed activity of the encapsulated CasIII-ia on a metastatic breast cancer cell line and the in vivo test of nanoencapsulated CasIII-ia maintained the activity of the free compound, but showed a diminished toxicity. Therefore, the optimal conditions obtained by QbD may improve the scaling-up process.

**Keywords:** nanocarriers; quality by design; niosome; cancer; Casiopeina III-ia; copper

## 1. Introduction

The use of metallodrugs for the treatment of cancer has been of great interest in recent years. Even though platinum-based compounds are widely used for chemotherapy, there is still a low interest in the clinical use of metal-based drugs. This is attributed to their inherent toxicity. In this respect, the use of nanomedicine can be an alternative to reduce their toxic effects. Peña et al., reported that from the total number of articles published involving “nano”/“chemotherapy”/“metals”, 40% corresponded to essential metals, including copper which accounted for 10% of the search [1]. For example, cisplatin is one of the most used compounds for the treatment of several types of cancer. Nevertheless, the adverse effects have led to a search for diverse alternatives, such as endogenous metal-based drugs that include the copper-based compounds, casiopeinas [2]. On the other hand, casiopeinas are a family of more than 100 copper mixed-chelate coordination compounds with polypharmacological activities [3–6]. These compounds have been evaluated in cultures of murine tumor cell lines of melanoma, glioma, and leukemia. Additionally, they have shown activity in several human tumor cell cultures (colon, cervical, breast, lung, neuroblastoma, Lewis lung, and glioblastoma multiforme carcinoma) and presented efficacy in in vivo tests of xenograft tumor models with a colon carcinoma HCT-15 tumor [7–9]. CasIII-ia [Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonate)(NO<sub>3</sub>)] stands out amongst this group due to its solubility in water and lower toxicity than the more active analogs in preclinical studies [6]. Moreover, it exhibited a wide therapeutic range; thus, it was selected to start in a clinical phase I trial in Mexico [10,11]. Pharmacokinetic studies made

in Wistar rats and rabbits presented low drug blood concentration. Additionally, protein binding studies in human plasma proved that a decrease in CasIII-ia concentrations leads to an increase in protein binding [12,13]. The compiled background allowed us to propose the nanoencapsulation of CasIII-ia. In this sense, when CasIII-ia was loaded into chitosan nanoparticles [14], it was observed that CBF1/Hsd mice transplanted with B16 melanoma tumors had an increased life span compared to the animals which received the free drug. However, a high polydispersity particle size was obtained (150 nm–10  $\mu$ m). Additionally, the encapsulation percentage was low due to the hydrophilicity of CasIII-ia [14].

Niosomes, like liposomes, are vesicular systems that can encapsulate both hydrophilic and lipophilic drugs. Niosomes are formed mainly by a nonionic surfactant that is less expensive than phospholipids and chemically stable; unlike phospholipids, surfactants do not require specific handling conditions [15]. One of the most widely used surfactants is Span 60<sup>®</sup> (S) since it allows a greater drug encapsulation efficiency [16,17]. Besides the surfactant, cholesterol (C) may increase the rigidity of the membrane, whereas Pluronic F127 (P) improves the physical stability of the vesicles [18,19].

Furthermore, the nanoformulation of metallodrugs represents one of the main challenges in the development of nanoparticles due to the metal's capacity to react with the nanocarriers, which modifies the overall properties of the drug [1]. Therefore, the physicochemical and structural characteristics of the drug to be encapsulated must be considered. In addition, understanding the conditions and general factors involved in the final design of nanoparticles will allow modulating their physicochemical and biologic properties [20,21]. To have consistency in those properties, the design, synthesis, manufacturing, and formulation of the pharmaceutical product must follow a systematic approach that uses quality-by-design (QbD) tools [22–24]. In the last five years, studies on the use of tools involved in quality by design (QbD) have been reported for platinum and vanadium [25,26].

Therefore, the present work proposes a nanoformulation consisting of niosomes bearing CasIII-ia designed and optimized with QbD tools for its IV administration. The advantages of the application of QbD in niosome formation and metal-based drug encapsulation is underlined.

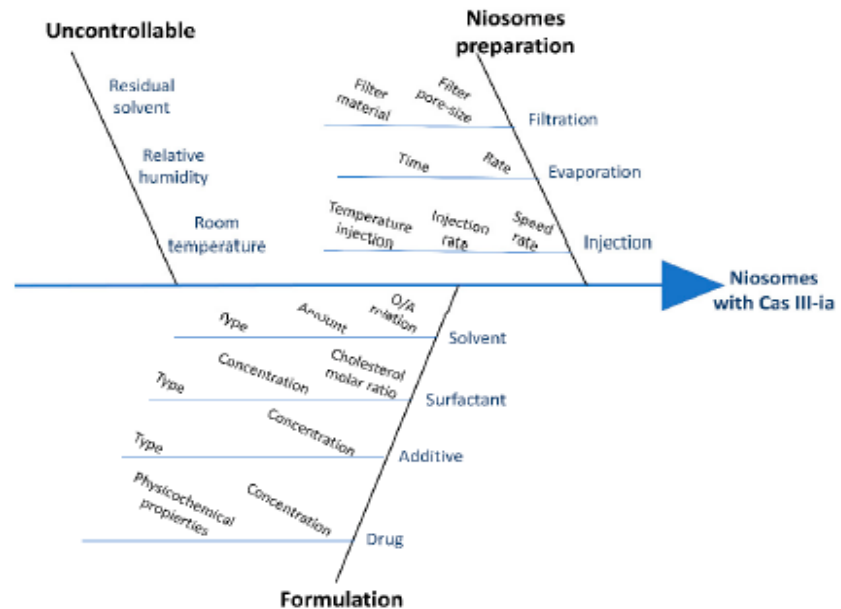
## 2. Results

### 2.1. Quality-by-Design Approach

#### 2.1.1. Risk Analysis (RA)

Among the quality target product profile (QTPP) elements, critical quality attributes (CQAs) and critical process parameters (CPPs), as well as the critical material attributes (CMAs) in the initial RA, were performed. The Ishikawa diagram (Figure 1) allowed the identification of all the potential factors of formulation and process parameters that influence the CQAs. The factors were collected and grouped into three sections (based on CPPs and CMAs, from the Ishikawa diagram), as they are related to the niosome formulation (drug and material properties), niosome preparation (ether injection method), and uncontrollable variables (relative humidity, room temperature, and residual solvent). After the identification of the risk with the Ishikawa diagram, a risk analysis was performed with RRMA, which is a qualitative tool for linking the likelihood of occurrence with the severity of harm to identify the impact of CMAs and CPPs on CQAs. Tables 1 and 2 present the estimated interrelationships of the selected critical factors for CMA and CPP factors. High risk represents risk that is not acceptable due to safety/efficacy issues; medium risk is acceptable but needs investigation; and low risk means no further investigation is needed [27]. The classification of the impact of each factor was realized based on previous reports, which allowed us to obtain knowledge of space development and identify the principal high-risk factors that may impact the formulation of metal-based drug encapsulation in niosomes. Then, variables were evaluated in experimental designs to find which had the greatest impact on the CQAs. The variables were divided into two categories: formulation and method of production. The variables obtained were as follows: CasIII-ia concentration; S/C/P concentration; Pluronic F127 concentration; time during evaporation; speed during

evaporation; temperature injection; injection speed; speed during injection; and solvent volume.



**Figure 1.** Ishikawa diagram for CasIII-ia formulation in niosomes with critical material attributes and critical process parameters.

**Table 1.** Risk analysis based on critical material attributes.

	Drug	Additive (Pluronic F127)	Cholesterol Molar Ratio	Surfactant (Span 60)	Solvent	References
CQAs						
Particle size	High	Low	Low	Medium	High	[28–32]
Encapsulation efficiency	High	High	Medium	High	Low	[15,16,30,33–36]
PDI	High	Low	Low	Medium	High	[31]
Zeta potential	Medium	High	Low	Medium	Low	[36–38]

**Table 2.** Risk analysis based on critical parameter process.

	Injection	Evaporation	Filtration	References
CQAs				
Particle size	High	Low	High	[39–41]
Encapsulation efficiency	Medium	Low	Medium	[39,41]
PDI	High	Low	High	
Zeta potential	Medium	Low	Medium	

**2.1.2. Experimental Design**

Once the risk analysis was performed and the main variables were defined, experimental designs were carried out to evaluate the effects of each factor on responses. The Plackett–Burman design was used to screen variables, whereas the factorial design and central composite design helped to predict and optimize the nanoformulation.

### Plackett–Burman Design

Variables defined from the Plackett–Burman design (Table S1) were analyzed through Pareto charts of standardized effects, normalized tests, residue graphs, and ANOVAs. Variables are organized according to the effect: the highest effects appear beyond the red lines in the Pareto diagrams for particle size, PDI, surface charge, and encapsulation efficiency. Three main variables were selected according to their statistical significance ( $p < 0.05$ ) and more frequent effect on the responses (observed in Pareto charts). Based on the results, drug concentration, niosome concentration, and the speed rate during injection were selected to be evaluated in a second design.

### Factorial Design $2^k$

The optimization of the nanoformulation of a factorial design  $2^3$  was executed. The three main variables obtained by the Plackett–Burman design were carried out in a two-level factorial design with three factors (Table S2). Pareto charts and variance analysis allowed us to identify which variables and interactions are statistically significant (Figure S1).

Variables and their interactions, on the CQAs, can be expressed quantitatively through a regression model. Then, linear regression equations were obtained for each response evaluated to obtain the best values of niosome formation from the desired values of CQAs. In general, for all cases (except for PDI), a good fit to the linear model was obtained where  $R^2$  for each CQA was 97.35%, 75.15%, 97.77%, and 92.91% for particle size, PDI, EE, and surface charge, respectively. From the factorial design, central points can be added to evaluate whether a quadratic model might have a better fit for the data obtained from the experimental runs through a central composite design (CCD).

### Central Composite Design

The CCD is obtained from an extension of the factorial design to which axial points are added to make the adjustment of the quadratic model possible with the linear variables, two-variable interaction, and quadratic terms of the continuous variables. The CCD helps to better understand and optimize the response. Eight experimental runs (two were central points and six were axial points) were added to the factorial design previously made. The twenty runs previously made (factorial design) and the new eight runs (CCD) performed were analyzed through Minitab 17 (Table S2). In the surface plot (Figure 2), the interactions between the variables are observed and those that are statistically significant were obtained by the analysis of variance, where it was observed that all factors influence particle size; however, for the other responses it was found that only the CasIII-ia concentration had a  $p$ -value  $< 0.05$ .

Quadratic equations helped to describe the individual main effect and the interaction effect of factors on the responses (CQAs). From the analysis of variance, residual, and normality plots (Figure S3) it was determined that the quadratic equations obtained are adequate for the prediction and optimization of the nanoformulation (Table S3). Based on the results, an optimization plot (Figure S2), obtained from the Minitab software, was used for identifying the combination of variable settings that jointly optimize the required values of CQAs (particle size of 150 nm and maximum encapsulation efficiency).

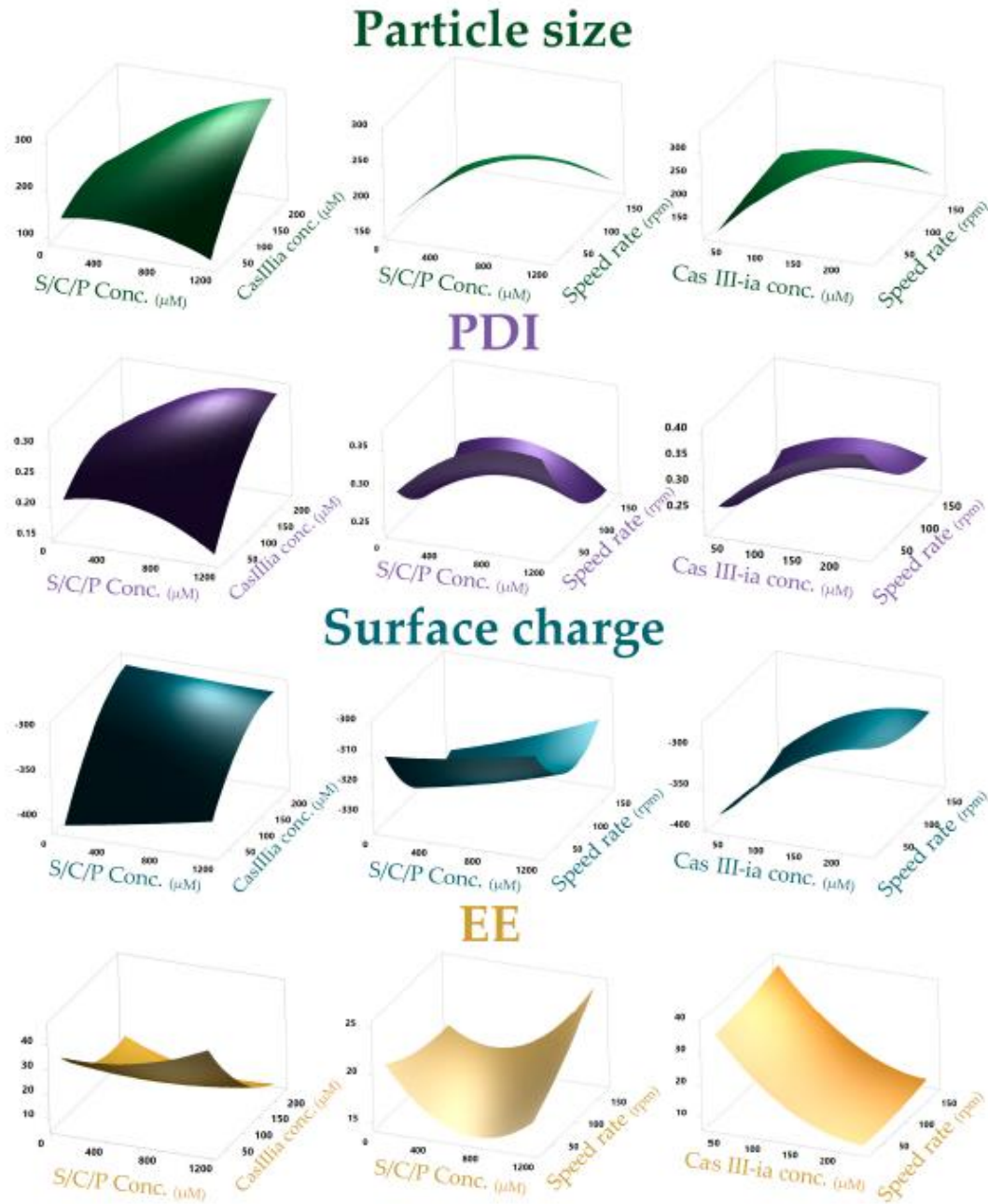


Figure 2. A 3D—response surface plot portraying the effect of the input variables on particle size, PDI, encapsulation efficiency, and surface charge.

## 2.2. Preparation of Optimized Nanoformulation

The validation of the applied QbD methodology was confirmed by selecting the operational conditions to prepare the optimized formulation of niosomes with CasIII-ia (Table 3).

**Table 3.** The niosome preparation conditions for optimized formulation ( $n = 3$ ).

Variables Conditions	CQAs Value
697 $\mu$ M of S/C/P concentration 32 $\mu$ M of CasIII-ia 170 rpm of speed rate	Maximum EE (40%) Particle size of 150 nm

Table 4 shows the results (predicted and observed values) obtained from the optimized conditions. It is possible to observe that the optimal conditions of particle size (150 nm) and encapsulation efficiency (40%) were obtained. Results show that experimental values are similar to predicted values.

**Table 4.** Particle size, EE, zeta potential, and PDI niosome with and without optimized CasIII-ia ( $n = 3$ ).

	Particle Size (nm)		EE (%)		Zeta Potential (mV)	PDI
	Observed	Predicted	Observed	Predicted		
Niosomes with CasIII-ia	150.4 $\pm$ 4.66	150 $\pm$ 19.10	39.89 $\pm$ 4.99	40.44 $\pm$ 3.87	-13.8 $\pm$ 1.25	0.234 $\pm$ 0.01
Niosome blank	215 $\pm$ 1.92	-	-	-	-23.4 $\pm$ 1.95	0.231 $\pm$ 0.01

## 2.3. Optimized Nanoformulation Characterization

### 2.3.1. Electronic Microscopy

Spheric niosome morphology was observed with electronic microscopy. CasIII-ia inside the aqueous part of the vesicle is observed through the images obtained by STEM (without negative staining) (Figure 3a). In both TEM and STEM micrographs, the presence of the compound inside (TEM) and in the periphery (STEM) of the vesicles is indicated within the lighter areas due to the contrast generated by the copper atoms. Energy-dispersive spectroscopy (EDS) confirmed the presence of copper (Figure S4). In the micrographs obtained by TEM (with negative staining) (Figure 3b), bright regions (light) can be observed in the vesicles that could indicate that the uranyl acetate is immersed in the center of the vesicle (acoustical region), demonstrating that the vesiculation was carried out. Moreover, particle sizes around 150 nm were observed, which is consistent with the results observed by dynamic light scattering (Figure S5).

### 2.3.2. Thermal Analysis

From the optimized nanoformulation, DCS and TGA (Figure 4) were carried out for the niosome without CasIII-ia, niosome with CasIII-ia, and free CasIII-ia. In DSC, a small endothermic peak is observed for CasIII-ia around 85  $^{\circ}$ C due to the dehydration of CasIII-ia, and this was confirmed by TGA with the weight loss of the two water molecules. The DSC curve of niosomes without CasIII-ia shows a broad endothermic peak at 42  $^{\circ}$ C, which is due to conformational changes and the subsequent loss of crystallinity in the Span 60, cholesterol, and Pluronic F127 molecules during the vesiculation [42,43]. Incorporation of CasIII-ia in niosomes produced a displacement of the transition peak at 47  $^{\circ}$ C. The foregoing may be associated with the existence of CasIII-ia within the niosome, which could change the conformation of vesicles. The endothermic peak in niosomes at 105  $^{\circ}$ C is associated with the incorporation of Pluronic in the niosomal system. When the niosome does not contain Pluronic F127, this peak is not observed. Niosomes with CasIII-ia showed the highest intensity peak at 105  $^{\circ}$ C, which may be due to the interaction of CasIII-ia with



the niosome membrane. This supports the hypothesis that CasIII-ia molecules are found interacting with the niosomal membrane. An exothermic peak at 241 °C was observed in DSC for free CasIII-ia, corresponding to the degradation of the acetylacetonate ligand of CasIII-ia as reported elsewhere [14]. The latter was confirmed by TGA through weight loss. When the niosome with CasIII-ia was evaluated, the peak at 241 °C was not observed in either DSC or TGA. This behavior was also observed when the CasIII-ia was encapsulated in chitosan and was attributed to the incorporation of CasIII-ia inside the vesicle [14]. Moreover, the organic degradation (of niosome compounds) was observed at 380 °C in TGA.

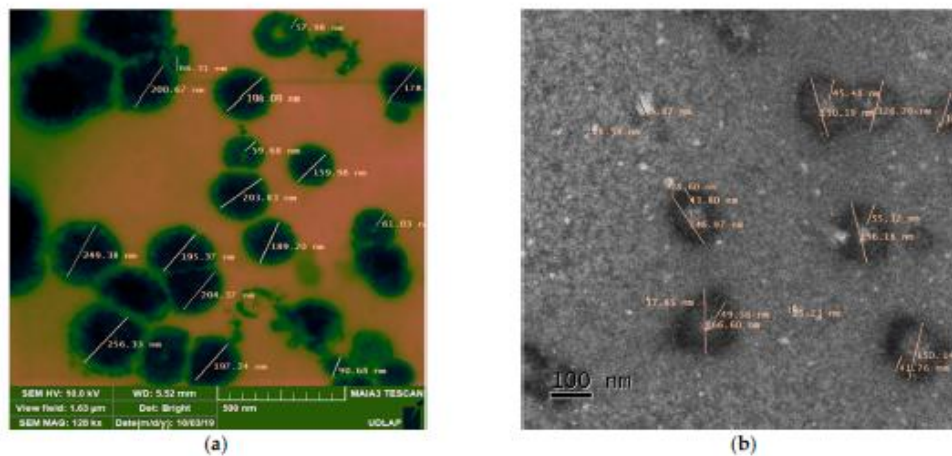


Figure 3. (a) STEM and (b) TEM images of the developed CasIII-ia niosomal formulation.

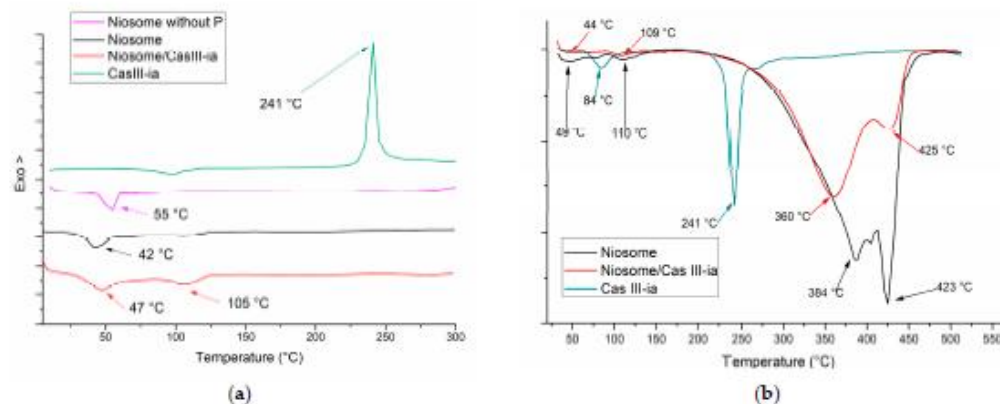
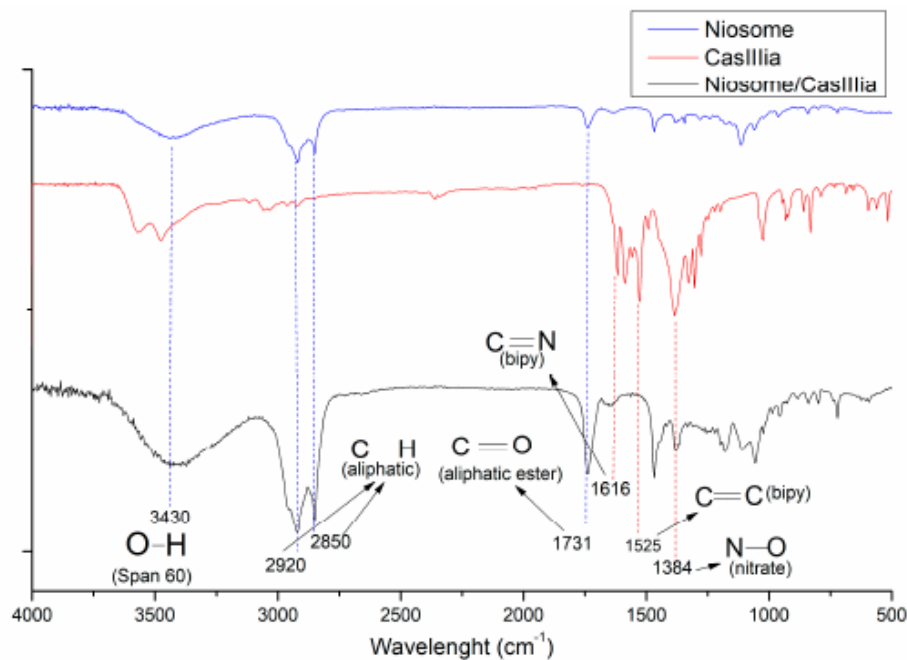


Figure 4. (a) DSC and (b) TGA thermogram of CasIII-ia, niosome with and without CasIII-ia.

### 2.3.3. FTIR Studies

FTIR spectra (Figure 5) showed in the red line the characteristic bands of bipyridine and acetylacetonate of CasIII-ia (at  $1616\text{ cm}^{-1}$ , vibrations correspond to the  $\text{C}=\text{N}$  bond of bipyridine; at  $1525\text{ cm}^{-1}$ , vibrations  $\text{C}=\text{C}$ ; at  $1587\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the carbonyl group of the acetylacetonate). On the other hand, in the niosome spectra, stretching

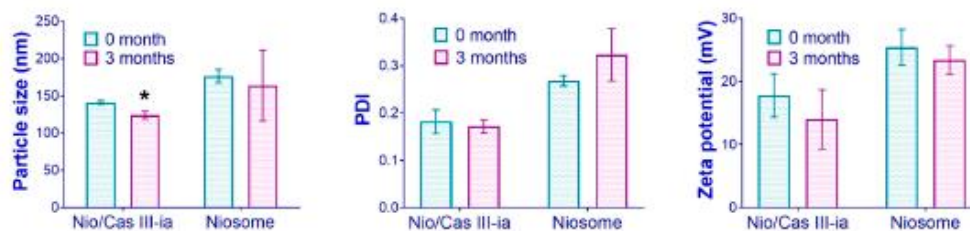
vibrations of the O-H bond (Span 60 and Pluronic F127) are observed at  $3430\text{ cm}^{-1}$ . Bands at  $2920\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$  are attributed to the C-H stretch vibrations of the saturated aliphatic group (Span 60 and Pluronic) and in the band at  $1731\text{ cm}^{-1}$ , the carbonyl stretches of the aliphatic ester functional group correspond to Span60. The band at  $1384\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the nitrate ion; this band appears in both spectra (CasIII-ia and niosome with CasIII-ia), whereas the characteristic bands of CasIII-ia are not observed in the niosome spectra with CasIII-ia, except nitrate ion, which is probably due to the encapsulation of the compound in concordance with the results obtained in the thermograms. However, through FTIR-ATR (Figure S6), it was observed that the characteristic bands of C = N in diimines in the CasIII-ia are present after the encapsulation of the compound, indicating a possible presence of the compound in the niosome membrane, which could explain the decrease in the zeta potential of the niosome when CasIII-ia is incorporated. Chitosan with CasIII-ia in FTIR studies does not show the characteristic bands of the drug inside the chitosan nanoparticle. This suggests that CasIII-ia can be loaded into chitosan nanoparticles [14].



**Figure 5.** FTIR spectra of CasIII-ia (red line), niosome blank (blue line), and niosome with CasIII-ia (black line).

#### 2.3.4. Stability Studies

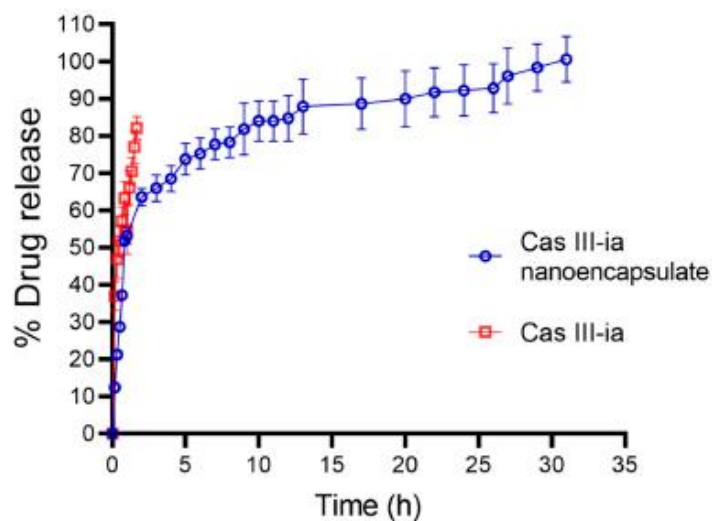
Accelerated stability studies ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $75\%$  RH with  $n = 3$ , according to NOM-073-SSA1-2015) were carried out for niosomes with and without CasIII-ia. The physical stability of the samples was evaluated by particle size, zeta potential, and polydispersity index (Figure 6). Following the results, after three months, for niosomes and niosomes with CasIII-ia, there was a decrease in particle size and zeta potential, and a decrease in the polydispersity index only for niosomes with CasIII-ia. The decrease in particle size was statistically significant only for Nio/CasIII-ia.



**Figure 6.** Accelerated stability studies (40 °C and 75% RH) for CasIII-ia in niosome-optimized formulation. The unpaired *t*-test was used to evaluate statistically significant groups (marked with an asterisk).

### 2.3.5. In Vitro Drug Release

The release profile of CasIII-ia (Figure 7) through the nanocarrier was biphasic with a fast release (burst effect) in the first hours, followed by a slower release for up to 33 h in accordance with a prolonged release. To evaluate the release profile of CasIII-ia from the niosome, the data obtained were fitted to zero-order, first-order, Higuchi model, and Korsmeyer–Peppas model kinetics (Table S4). The results indicated that the best fit was obtained with the Korsmeyer–Peppas model, meaning that the release of CasIII-ia is mainly governed by a Fick diffusion mechanism. The latter has been reported for drugs that are encapsulated in liposomes and niosomes [44,45].

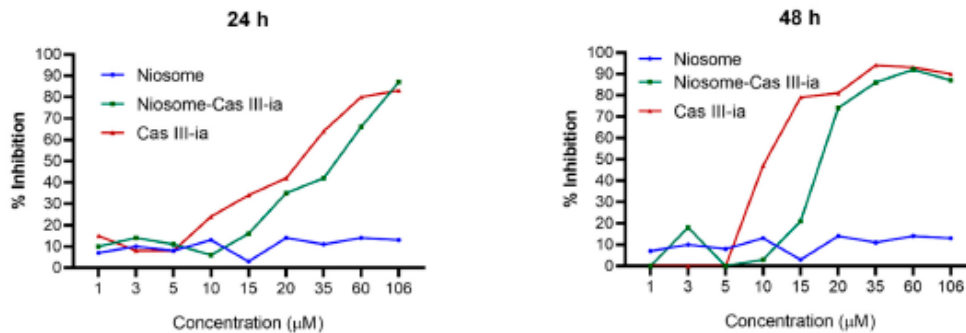


**Figure 7.** Drug release profile of nanoencapsulated CasIII-ia (blue line) and profile of free CasIII-ia (red line) ( $n = 3$ ).

### 2.3.6. Cytotoxicity Assay

In vitro assays were performed on a triple-negative breast cancer tumor line (MDA-MB-231). Encapsulated CasIII-ia and the niosome blank were evaluated at different concentrations at 24 or 48 h after treatment, using the sulforhodamine B method [46]. Figure 8 shows a slight decrease in the activity of CasIII-ia as a product of encapsulation, compared to free CasIII-ia in both timeframes. However, encapsulated CasIII-ia reached 50% of

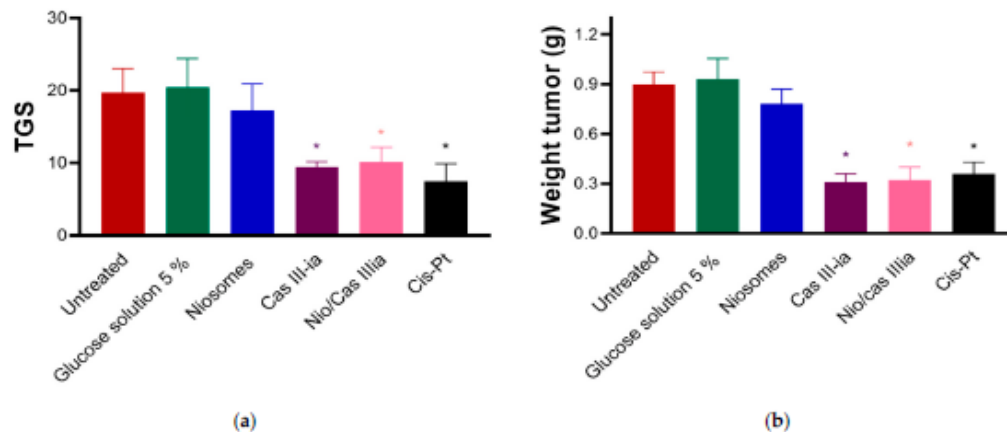
inhibition at a lower concentration when exposed to the cells for 48 h than for 24 h. In contrast, the niosome without CasIII-ia showed no activity at the concentrations and times evaluated.



**Figure 8.** Cytotoxic effect of MDA-MB-231 cell line treated with free CasIII-ia, CasIII-ia niosomal formulation, and niosome blank at different concentrations and times.

### 2.3.7. In Vivo Assays

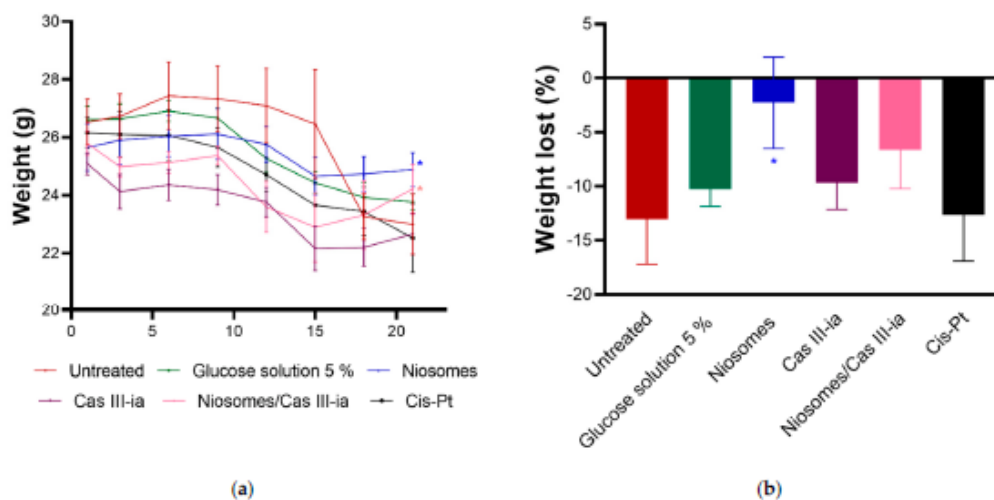
In vivo study assays of CasIII-ia were performed in female BALB/c mice ( $n = 7$ ). Cis-Pt was used as a control. Nonencapsulated CasIII-ia, nanoencapsulated CasIII-ia, and cis-Pt decreased the tumor growth speed (Figure 9a). Additionally, a decrease in the final weight of the primary tumor (Figure 9b) was observed, with all three treatments being statistically significant with respect to the untreated group.



**Figure 9.** (a) Tumor growth speed (TGS) was calculated from tumor size based on the difference between day 21 and day 1. The unpaired *t*-test was used to evaluate statistically significant groups (marked with an asterisk). (b) Primary tumor weight for each treatment group. The unpaired *t*-test was used to evaluate statistically significant groups (marked with an asterisk).

In addition, the weight of the mice was evaluated at the end of the treatment, where it was observed that only the groups treated with the niosome with CasIII-ia and niosome without CasIII-ia recovered their post-treatment weight. The effect was statistically significant with respect to the group treated with CasIII-ia. (Figure 10a), indicating lower

toxicity. This was evaluated using the percentage of weight loss, as an indicator of toxicity (Figure 10b), which was calculated as follows:  $[(\text{weight at day 21}/\text{weight at day 0}) - 1] \times 100$ . An unpaired *t*-test found that only the niosome-treated group was statistically significant concerning the untreated group. Despite the niosome with CasIII-ia being not statistically significant, this group shows a trend of lower toxicity.



**Figure 10.** (a) The initial and final weight of BALB/c mice before, during, and after treatment (b) Toxicity was measured by the percentage of weight loss of mice. The percent weight loss, as an indicator of toxicity, was calculated for each animal as follows:  $[(\text{weight at day 21}/\text{weight at day 0}) - 1] \times 1000$ . The unpaired *t*-test was used to evaluate statistical significance among groups (marked with an asterisk).

Figure 10a shows there is less weight loss with the encapsulated CasIII-ia regarding the nonencapsulated CasIII-ia and cis-Pt. There was no significant difference between the niosome target and the 5% glucose solution, which could indicate low niosome activity.

### 3. Discussion

Nanocarriers can increase the rate to cross the gap for metallodrugs in clinical applications. The selection of carriers that are simple, easily scalable, approved, and compatible with the target metallodrugs will facilitate the clinical translation [1]. For the water-soluble compound CasIII-ia, a niosomal system with already approved and unreactive excipients (Span 60, cholesterol, and Pluronic F127) was used. The presence of the hydrophilic head and hydrophobic chain of Span 60 results in the formation of a double-layer structure that provides the host for hydrophilic and hydrophobic drugs. Niosomes are nanocarriers with a wide range of applications, and are mainly used in nanomedicine [47]. Niosomes contain a high number of variables for their formulation; therefore, strict control over variables of nanocarriers is required for optimizing the metallodrug formulation. In this sense, the use of quality-by-design tools allows for the optimization of metallodrug formulation through the definition of CQAs that impact QTTPs. For example, particle size and encapsulation efficiency (CQAs) are important factors for IV administration (QTTPs). In this sense, particle sizes between 100 and 200 nm are required, as they have been reported to show adequate fenestration through blood vessels [48,49]. High encapsulation efficiencies could decrease the binding of drugs to proteins. Consequently, the variables that impact the principal CQAs were evaluated in a screening design (Plackett–Burman). Subsequently, factorial and

central composite designs were utilized for formulation optimization. The experimental designs indicate that drug concentration is the key factor in the design of these niosomes. We observed that the particle size and encapsulation efficiency, principally, depend on the molecular weight of the compound to be nanoencapsulated, as reported by previous works [50]. S/C/P concentration and speed rate during injection have a lower impact on particle size and encapsulation efficiency. The behavior of the CQAs was modeled as a function of the three variables. A formulation with the operational conditions for a particle size of 150 nm and maximum encapsulation efficiency was realized. Experimental values are in accord with predicted values, indicating that the formulation is repeatable and reproducible. In addition, equations obtained may predict other formulations within the design space. For particle size, the predicted and experimental value was 150 nm. However, as was observed, the particle size increased when the niosomes were without CasIII-ia (215 nm); such an effect is the opposite of what has been reported for nanoencapsulated hydrophilic compounds. Usually, it is observed that when hydrophilic drugs are encapsulated, the particle size increases [51]. The decrease in particle size in the presence of CasIII-ia may be due to the presence of hydrogen bond interactions between the copper compound and the hydrophilic heads of Span 60 and Pluronic F127 chains; however, this hypothesis remains to be confirmed. Additionally, CasIII-ia molecules could be forming intermolecular interactions, leading to a decrease in particle size. CasIII-ia loaded into chitosan nanoparticles presents the same behavior, but has an encapsulation efficiency of 6% [14]. In this work, the efficiency encapsulation obtained of 40% may be due to the steric hindrance that could generate the chains of Pluronic F127 where the molecules are probably competing with the chains of the polymer and forming weak interactions with them. The latter would explain the obtained zeta potential of  $-13.8$  mV compared to the zeta potential of  $-23.4$  mV of the niosomes without CasIII-ia. Thus, we hypothesize that CasIII-ia may be on the surface of the vesicles, which diminishes the zeta potential. Computational methods such as DFT or particle dissipative dynamics would help to confirm the hypotheses of the interactions between drug molecules and those that make up the niosome; at the moment, this part is beyond the scope of this work. The intermolecular interaction and drug encapsulation had an influence on the modified drug delivery and the burst effect. Considering that 40% encapsulation was obtained, the burst effect could be due to the nonencapsulated CasIII-ia rapidly passing through the dialysis bag. Subsequently, a slower release of nonencapsulated CasIII-ia was found to form weak interactions with the niosome membrane. The longest release was a consequence of the encapsulated CasIII-ia. In contrast, almost 90% of the free-control CasIII-ia diffused out of the dialysis bag in the first hour of the study. The latter is characteristic of vesicular systems, such as liposomes and niosomes [52,53].

The increase in the *in vitro* activity of encapsulated CasIII-ia with respect to time can be correlated with the drug release tests where a modified release was observed. It indicates that the longer the time, the greater the complete delivery of the drug and, therefore, the greater the activity of the compound. Shaker and collaborators mention that the cytotoxic effect in MCF-7 cells (breast cancer) of tamoxifen loaded in niosomes is affected by the release time of the compound from the niosomal vesicles [33]. The nonactivity in the MDA-MB-231 tumor line of niosomes shown in *in vitro* assays is consistent with what was observed in *in vivo* studies. These results agree with Agarwal et al., who showed that niosomes have low activity in cancer cell lines and normal cells [54]. On the other hand, Haroun and collaborators observed lower toxicity (in breast cancer) in niosomes functionalized with PEG loaded with brucine (natural alkaloid) in comparison with free brucine [31]. They attributed this behavior to the enhanced and permeation retention effect, which increases the possibility of the niosomes reaching the site of action. In addition, the functionalization with PEG provides a longer circulation time of the niosomes [31]. The same behavior is observed with nanoparticles containing Pluronic F127 in the formulation.

In regard to the antitumor activity, *cis*-Pt and encapsulated and free-control CasIII-ia showed similar activities; however, *cis*-Pt showed the highest toxicity considering the

frequency of administration: every 7 days, four doses (cis-Pt) vs. every 4 days, six doses (encapsulated and free-control CasIII-ia).

The optimized and predicted formulation was obtained and characterized. The spheric shape of niosomes observed in TEM and STEM is characteristic of the vesicular system [52]. Results showed that the thickness of the membrane formed by the Span 60/cholesterol/Pluronic F127 is around 50 nm. This bilayer formation has also been observed by microscopy in other works [55].

Physical stability studies showed a decrease in zeta potential and in particle size. Copolymer Pluronic F127 is temperature-dependent. A rise in temperature at 40 °C could cause the dehydration of hydrophobic polypropylene oxide (PPO) blocks, causing the polymer chains to potentially come closer. The latter would cause the particle size and zeta potential to decrease in the blank niosome and niosome with CasIII-ia. A further decrease in the zeta potential in niosomes with CasIII-ia could be attributable to reaching an equilibrium between CasIII-ia and the niosome membrane. It has been observed that a negative zeta potential changes the value for niosomes with Pluronic L64 based on the temperature [56]. Although the particle size decreased and was statistically significant, the size is found to be between 100 and 150 nm, which is suitable for its use in intravenous administration [57]. Despite the decrease in the zeta potential, the decrease in particle size indicates there is no coalescence of the nanoparticles due to the steric hindrance caused by the long poly(propylene oxide) and poly(ethylene oxide) chains of Pluronic F127, which indicates physical stability for the niosomes with CasIII-ia for at least three months. These results agree with the reports made by other authors where niosomes are stable for at least 90 days [58,59].

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Materials

Casiopaina<sup>®</sup> III-ia was synthesized at the National Autonomous University of Mexico. CAS [223930–33–4], the copper (II) complex was prepared following the reported patent [60]. Span 60<sup>®</sup> (S), cholesterol (C), and Pluronic F127<sup>®</sup> (P) were purchased from Sigma-Aldrich (Ciudad de México, Mexico). The analytical grade ethylic ether was purchased from Baker (Ciudad de México, Mexico). All reagents were used without further purification.

##### 4.2. Methods

###### 4.2.1. Quality-by-Design Approach: Risk Analysis

The Ishikawa diagram was constructed to identify all potential variables (formulation and formation method), which can have an impact on the CQAs (particle size, encapsulation efficiency, zeta potential, and polydispersity index) of the product, and therefore, alter the QTPPs. Later, a relative risk-based matrix analysis (RRMA) was performed based on a qualitative tool to identify the impact of an individual variable obtained from the Ishikawa diagram. The interdependence of the attribute of each CPP and CMA between CQAs was classified into high-, medium-, and low-risk attributes based on the impact on the finished product quality [27].

###### Quality Target Product Profile (QTPP)

QTPPs define the relationship between quality, security, and efficacy. Outlining the QTPP will define the CQAs, affecting the final product quality considerably. Table 5 describes the QTPP of nanoencapsulated CasIII-ia.

###### Critical Quality Attributes (CQAs)

The CQAs defined consider the IV administration, the physical and chemical characteristics of CasIII-ia, and the security of the product. CQAs are presented in Table 6.

**Table 5.** Quality target product profile for CasIII-ia nanoformulation.

QTPP	Target	Justification
Dosage form	Injectable solution	Patent same dose form. Patent solicitude (MX/a/2017/016444) [61].
Therapeutic indication	Cancer treatment (phase I clinical trial of CasIII-ia)	Casiopainas have shown activity in tumor lines of cervical (HeLa, SiHa), breast (MCF-7), colon (HCT15), and neuroblastoma (CHP-212) cancers [9]. Moreover, CasIII-ia has shown tumor reduction in a nude mouse xenotransplanted (HCT-15) [62].
Dosage design	A modified-release dosage from a colloidal system	Modified release to favor reaching the site of action of the compound by enhanced permeation and retention effect (EPR) [63–65].
Route of administration	Intravenous	Same route of administration as patent. Avoid the first-pass effect [61].
Production method	Solvent ether injection; drug entrapment during niosome formation	In the solvent injection method, the use of sonication is not necessary for the reduction of particle size because it depends on experimental conditions and could be between 50 and 500 nm [28,35]. This represents a lower energy expenditure. Additionally, industrial scalability could result in better feasibility.
CQA excipients	Span 60 (sorbitan monostearate), cholesterol and Pluronic F127 (poloxamer 407)	Excipients are critical for niosome formation, entrapment efficiency, zeta potential, and blood circulation time [32,34,66].
Stability	At least 6-month shelf-life at 40 °C and 75% RH; agrees with NOM-073-SSA1-2015	Measurement of particle size and PDI is related to the quality and safety profile of the preparation [48,67].
Container closure system	Sterile glass vial	To achieve the target shelf-life and to ensure quality during storage [61,68].

**Table 6.** Critical quality attributes for CasIII-ia nanoformulation.

CQA	Target	CQA	Justification
Appearance	Colorless liquid	No	Color and appearance are not important for quality.
Particle size	150 nm	Yes	Particle sizes between 20 and 50 nm present a high efficacy and safety. Sizes below 50 nm can suffer fenestration in organs such as the liver and fast-renal clearance. On the other hand, sizes above 200 nm could present spleen retention. Finally, sizes between 100 and 150 nm remain for a longer time in blood circulation [20,48].
Zeta potential	±30 mV	Yes	The physical stability of vesicular systems depends on the total surface charge. Niosomes in solution require physical stability for storage and systemic circulation [21,48].
Polydispersity index (PDI)	Low	Yes	Niosomes with high PDI values modify the drug release profile, which may increase the toxicity of the drug.
Encapsulation efficiency	Maximum	Yes	Encapsulation efficiency diminishes free casiopaina concentration and, consequently, its interaction with blood proteins.
Residual solvents	Minimum	Yes	Residual solvents are an important toxic factor. Ether ethylic is a class 3 solvent, in agreement with ICH guideline Q3C. Class 3 solvents have low toxic potential [40]. Available data indicate they are less toxic in acute or short-time studies and negative in genotoxicity studies [40].

#### Critical Process Parameters (CPPs) and Critical Material Attributes (CMAs)

CPPs and CMAs are variable parameters of the process that affect the CQAs and should be monitored or controlled for quality. CPPs and CMAs (from raw materials and



niosome formation) that could have a high impact on the CQA (particle size, EE, PDI, and superficial charge) were identified in the Ishikawa diagram.

#### 4.2.2. Niosome Formation

Once the profile, parameters, and attributes were defined, the niosomes were prepared using a modified ether injection method [28,69] described as follows: Span 60 and cholesterol (1:1 molar, [70,71]) were dissolved in ethyl ether. Pluronic F127 and CasIII-ia were dissolved in distilled water. The ether dissolution was added into a volume of CasIII-ia/Pluronic F127 solution water drop by drop using a syringe pump (kdScientific Model 100 series) on a magnetic stirrer. Then, the organic solvent was removed by a slow magnetic stirrer at room temperature for one hour. The suspension was filtered through a syringe filter (Merck Millex™, PES 0.22 µm). A blank of niosome was prepared in the same way. The conditions for Plackett–Burman and factorial design niosome formation are presented in Tables S1 and S2. For total Span 60/Cholesterol/Pluronic F17 (S/C/P) concentrations: Pluronic F127 was used in a range of 2.5–5% molar; cholesterol and Span 60 in a range of 47.5–48.5% molar each.

#### 4.2.3. Quality-by-Design Approach: Experimental Design (DoE)

Once the procedure of the niosome formation was recognized, Plackett–Burman and factorial designs were used to screen the variables and optimize the nanoformulation. Experimental designs were created and analyzed with Minitab 17 statistical software (State College, PA, USA). For all experimental designs, the niosomes were prepared according to Section 4.2.2.

##### Plackett–Burman Design

Nine variables were selected through the Ishikawa diagram. The variables were screened through a Plackett–Burman design to identify the most important factors that affect the CQAs. The factors evaluated were: time of evaporation (A), speed rate during evaporation (B), temperature of injection (C), injection rate (D), speed rate during injection (E), solvent volume (F), CasIII-ia concentration (G), S/C/P concentration (H), and P concentration (I). The responses evaluated were particle size ( $Y_1$ ), polydispersity index ( $Y_2$ ), superficial charge ( $Y_3$ ), and encapsulation efficiency ( $Y_4$ ). Each factor was evaluated at low (−1) and high (+1) levels and three central points (0) were added to detect curvature. ANOVA analysis and Pareto charts were used to demonstrate the influence of each factor on the response. The results are shown in Table S1.

##### Factorial Design $2^k$

Based on the screening study results, the three main effects obtained (S/C/P concentration, drug concentration, and speed rate during injection) were carried out in a two-level factorial design with three factors. The variables that were not statistically significant or did not have a major impact on the evaluated effects were fixed at some value, according to the description depicted in Table 7.

The factorial design considered tests of power and sample size. In total, 20 experimental runs were carried out divided into 4 blocks, with 2 replicates each and 4 central points, with a base design of 3.8. The twenty runs were made and analyzed using Minitab 17 (Table S2).

##### Central Composite Design (CCD)

The CCD was obtained from an extension of the factorial design to which axial points, called star points, points were added to obtain the response surface plot. To improve the statistical power, eight experimental runs (two central and six axial points) were added to the factorial design previously made. The CCD optimizes the response and allows a better understanding of the system and its variables. A mapping of each variable was performed

and, depending on the surface response, it was possible to select the optimal configuration for each factor. The new eight runs (CCD) were analyzed through Minitab 17 (Table S2).

**Table 7.** Conditions for niosome formation in factorial design 2<sup>3</sup>.

Evaporation	Time Speed rate	60 min 50 rpm	Estimated time for ethylic ether evaporation Low agitation is a minor energetic cost
Injection	Temperature	50 °C	Phase-transition temperature (T <sub>c</sub> ) of Span 60 is 60 °C. However, cholesterol can reduce phase-transition temperature (T <sub>c</sub> ) [32]. Chiraz et al. reported that the injection rate has no significant effect on the mean vesicle size [72].
	Injection rate Speed rate	40 mL/h Variable	
	Solvent volume	2.5 mL	Smaller solvent volumes can increase particle size due to fast evaporation. Higher volumes imply higher residual solvent.
Formulation	CasIII-ia concentration	Variable	A 2.5–5% additive concentration is recommended. Higher concentrations inhibit niosome formation [73].
	S/C/P concentration	Variable	
	P concentration	3%	

#### 4.2.4. Optimized Formulation: Niosome Characterizations

After the risk analysis and experimental design, the optimized formulation was characterized by several techniques to determine the morphological and physical characteristics, particle size, drug encapsulation, drug release, and in vivo and in vitro activity.

##### Particle Size and Polydispersity Index (PDI)

To establish the particle size and determine the polydispersity index, dynamic light scattering (DLS) was performed. For particle size, PDI, and zeta potential, a Zetasizer Nano Zen 3600 with scattering angle of 173°; water viscosity of 0.8872; and refractive index of 1.496 at 25 °C and zeta dip cell were used, respectively. Three independent samples from each sample were measured at room temperature. The niosomal dispersion was not diluted.

##### Superficial Charge

The electrokinetic surface was determined by means of particle charge. It was measured with a Mutek PCD 03 particle charge detector. A sample of niosomes was diluted with deionized water (2.5 mL sample/7.5 mL water).

##### Encapsulation Efficiency (EE)

Encapsulation efficiency allows for the quantification of the encapsulated drug. Briefly, a sample was centrifuged at 12,150 × g at 4 °C for one hour. The amount of unencapsulated CasIII-ia in the supernatant was measured spectrophotometrically (UV-visible diode array spectrophotometer 8452A) at λ = 294 nm. For each batch, a blank of niosomes was prepared with the same concentration of niosomes, but without the CasIII-ia. A calibration curve (range 8 × 10<sup>−6</sup> M–8 × 10<sup>−4</sup> M) was constructed for the quantification of the percentage of encapsulation. The encapsulation efficiency was calculated according to the following equation:

$$EE = \frac{\text{amount of encapsulated CasIII-ia}}{\text{total amount of CasIII-ia used for the preparation of niosome}} \times 100 \quad (1)$$

##### Electronic Microscopy

Niosome morphology was analyzed by transmission electron microscopy (JOEL JEM-2010) for negative staining and by scanning transmission electron microscopy (Bruker Nano GmbH D-12498). One drop of the sample was placed on a carbon continued-film nickel

grid and it was dried at room temperature. Finally, one drop of uranyl acetate 1% *w/v* was placed on the same grid.

#### Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

FTIR and ATR-FTIR were performed to verify the encapsulation of CasIII-ia. The obtained niosomes/CasIII-ia, blank niosomes, and free CasIII-ia were characterized with the classical pellet KBr method by FTIR (Nicolet Avatar 320, Thermo Scientific). Spectral transmittance over the spectral range from 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$  was evaluated.

For ATR-FTIR, a lyophilized sample (niosomes/CasIII-ia, blank niosomes, and free CasIII-ia) was evaluated in the Nicolet iS5 with an iD5 ATR accessory from Thermo Scientific. Spectral transmittance over the spectral range from 4000 to 500  $\text{cm}^{-1}$  was evaluated.

#### Thermal Analysis

Differential calorimetry scanning (DSC) and thermogravimetry analysis (TGA) were used to characterize the thermal behavior of niosomes and niosomes with CasIII-ia. For the DSC study (DSC/700 Mettler Toledo), a sample of 2 mg of lyophilized powder was crimped in a standard aluminum pan and heated from 20 to 300 °C at a heating constant rate of 10 °C/min. For the TGA study (TGA 4000 System, PerkinElmer, 100–240 V/50–60 Hz), a sample of 10 mg was weighed and heated from 10 to 550 °C at a heating constant rate of 10 °C/min under a nitrogen atmosphere.

#### 4.2.5. Physical Stability Study

To establish the physical stability of the niosomes, the optimized formulation obtained (CasIII-ia or blank niosome) was placed in a 3 mL glass vial. Each container (*n* = three) was placed in a temperature and humidity chamber, MAYASA model CEHT 12000, at 40 °C and 75% HR. The particle size, zeta potential, and polydispersity index were determined at zero and three months. The procedure was carried out as described in the Mexican Standard NOM-073-SSA1-2015.

#### 4.2.6. In Vitro Drug Release

In vitro drug release was evaluated with the dialysis bag method. A regenerated cellulose dialysis bag of 12–14 kDa (Spectrum Labs, Asheville, NC, USA) was hydrated and washed with water for half an hour. The dialysis bag was suspended in a 40 mL PBS and shook at  $37 \pm 0.5$  °C at  $160 \times g$ . A sample of 0.5 mL of the prepared niosomal with CasIII-ia dispersions was placed in the donor compartment. Then, samples were taken at fixed times for 35 h; the sample taken from the receiver compartment was replenished with the same volume. A sample of blank niosomes and a free CasIII-ia sample were evaluated under the same methodology. The drug release was assayed by spectrophotometry at 294 nm and the data were adjusted to zero-order, first-order, Higuchi and Korsmeyer–Peppas model.

#### 4.2.7. In Vitro Cell Assays

In vitro cytotoxicity experiments were performed to evaluate the effect of the CasIII-ia nanoformulations on hormonal-independent triple-negative breast cancer (MDA-MB-231). The process was carried out. Briefly, cells were harvested and cultivated in 96-well plates with  $2 \times 10^4$  cells each and 100  $\mu\text{L}$  of the medium. The plates were incubated at 37 °C and in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. The next day, the medium was withdrawn and 100  $\mu\text{L}$  of dissolutions containing niosomes, niosomes without CasIII-ia, or free CasIII-ia niosomes (range of 1–106  $\mu\text{M}$ ) were added. Cell cultures were exposed for 24 h or 48 h of treatment. Finally, the medium was retired, and plates were fixed and stained with sulforhodamine B to assess cell viability according to the procedure described by Skehan [46].

#### 4.2.8. In Vivo Test

The in vivo evaluation was realized using 36 5-week-old BALB/c female mice, donated by the FES Zaragoza animal house. Following the approved protocol of FEZ-CE/22-118-08, mice were implanted with 10,000 cells (4T1, metastatic breast cancer model) contained in 100  $\mu$ L of serum-free RPMI that was subcutaneously injected near the mammary pad (4th pair). After the appearance of the tumor (about 10 days after implantation), treatments were administered intraperitoneally (ip). The 30 animals were divided into 5 groups, distributed as followed: (A) control; (B) glucose solution 5% (SG); niosome/SG (1.45 mg/kg) 4 doses every 4 days; CasIII-ia (6 mg/kg) 6 doses every 4 days; cis-Pt (4 mg/kg) 4 doses every 7 days; niosome/CasIII-ia (1.45 mg/kg/6 mg/kg) 6 doses every 4 days. At the end of treatment, the animals were weighed and the tumor was measured in length and width. The percentage of weight loss and toxicity was calculated for each animal.

#### 5. Conclusions

The QbD tool was used for the development of the niosome/CasIII-ia with the potential for IV administration. The QTPP was defined and used as a guide for pharmaceutical development. The Ishikawa diagram and RRMA analysis were made from the selection of materials and methods for niosome formation, and the CQAs, CPPs, CMAs, and experimental designs were defined according to ICH standards of QbD for prediction and optimization of a formulation. The first experimental design was carried out (Plackett-Burman, variable screening), where it was found that the main variables to consider were drug concentration, niosome concentration, and agitation speed during the injection. These variables were evaluated in a factorial  $2^3$  design. It was found that the model presented a curvature, which is the reason why the design was adjusted to a central compound design, as it was possible to optimize the formulation of CasIII-ia with the niosomal systems. Drug concentration was the most important variable for niosome formulation. The operational conditions were 697  $\mu$ M of S/C/P, 32  $\mu$ M of CasIII-ia, and a 170 rpm speed rate. The obtained particle size and encapsulation efficiency were predicted according to the optimization graphs, at 150 nm and 40%, respectively; the particle size was less polydisperse and there was an improved encapsulation efficiency with respect to the chitosan nanoparticle. Thermogravimetric (TGA and DSC) and spectroscopic (FTIR) studies were carried out to confirm the incorporation of the compound inside the system. The microscopy studies showed that the niosomes are spheres with homogeneous sizes. Niosomes with and without CasIII-ia are physically stable for at least 3 months under accelerated conditions. A biphasic diffusion-governed release of CasIII-ia was observed, and this modified release coincides with the results obtained in the MDA-MB-231 cell line, where a higher activity of encapsulated CasIII-ia was observed at 48 h of study, giving a better distribution of the drugs that provide a better therapeutic effect. In the in vivo studies, also, it was observed that encapsulated CasIII-ia shows lower toxicity concerning cis-Pt and nonencapsulated CasIII-ia. A reduction in toxicity could allow a higher dose to be administered to improve effectiveness. This work opens up a window of opportunity for the formulation of coordination compounds in niosomes using quality tools that allow optimization. The optimal conditions obtained through QbD may improve the scaling-up process.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232112756/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.R.-A. and Z.A.-J.; methodology, Z.A.-J.; validation, A.E.-G., M.G.-B. and Z.A.-J.; formal analysis, Z.A.-J.; investigation, Z.A.-J. and M.G.-B.; resources, L.R.-A.; writing—original draft preparation, Z.A.-J.; writing—review and editing, Z.A.-J., L.R.-A. and S.G.D.-M.; supervision, L.R.-A.; funding acquisition, L.R.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by UNAM-PAIP 5000-9047 and CONACyT 314819. Zenayda Aguilar-Jiménez was supported by grants for doctoral studies from CONACyT Scholarship 335983.

**Institutional Review Board Statement:** A total of 36 healthy female (6–8 weeks old) BALB/c mouse strains were kept in the animal facilities at FES-Zaragoza, UNAM, under controlled conditions, including a temperature of 22 °C; a relative humidity of 50–60%; and 12 h dark–light cycle, with lights on between 7:00 a.m. and 9:00 p.m. The mice had free access to food and water ad libitum. All animals were handled in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the national regulations for the care and use of experimental animals (NOM-062-ZOO-1999). All experimental protocols were approved by the Ethics Committee of FES-Zaragoza FEZ-CE/22-118-08.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We would like to acknowledge David Diaz and Josefa Bernad-Bernad from UNAM for allowing the use of their laboratories for dynamic light scattering and the in vitro drug release study; Miguel Ángel-Méndez from UDLAP for STEM micrography; USAII-UNAM for TEM micrography and thermic analysis; José Aguilar-Jiménez for providing language help; Karen Reséndiz-Acevedo for their support in cytotoxicity studies; Luis Sánchez from FES Zaragoza and Miguel Zavala from UAM Xochimilco for their support in the in vivo tests; UAM Xochimilco UPEAL-biotherium for providing the female BALB/c mice; and Laura Padierna and Karyna Pérez-Saldaña from the Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S.A. de C.V for their generous donation of chemicals and culture media.

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

## References

- Peña, Q.; Wang, A.; Zaremba, O.; Shi, Y.; Scheeren, H.W.; Metselaar, J.M.; Kiessling, F.; Pallares, R.M.; Wuttke, S.; Lammers, T. Metallo-drugs in Cancer Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 2544–2582. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Allardyce, C.S.; Dyson, P.J. Metal-Based Drugs That Break the Rules. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 3201–3209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Proschak, E.; Stark, H.; Merk, D. Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 420–444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barbosa, A.R.; Caleffi-Ferracioli, K.R.; Leite, C.Q.F.; Garcia-Ramos, J.C.; Toledano-Magaña, Y.; Ruiz-Azuara, L.; Siqueira, V.L.D.; Pavan, F.R.; Cardoso, R.F. Potential of Casiopeinas<sup>®</sup> Copper Complexes and Antituberculosis Drug Combination against Mycobacterium Tuberculosis. *Chemotherapy* **2016**, *61*, 249–255. [\[CrossRef\]](#)
- Rufino-González, Y.; Ponce-Macotela, M.; Garcia-Ramos, J.C.; Martínez-Gordillo, M.N.; Galindo-Murillo, R.; González-Maciél, A.; Reynoso-Robles, R.; Tovar-Tovar, A.; Flores-Alamo, M.; Toledano-Magaña, Y.; et al. Antigiardiasis Activity of Cu(II) Coordination Compounds: Redox Imbalance and Membrane Damage after a Short Exposure Time. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *195*, 83–90. [\[CrossRef\]](#)
- Bravo-gómez, M.E.; Garcia-ramos, J.C.; Gracia-mora, I.; Ruiz-azuara, L. Antiproliferative Activity and QSAR Study of Copper (II) Mixed Chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 299–309. [\[CrossRef\]](#)
- Castillo-Rodríguez, R.A.; Palencia, G.; Anaya-Rubio, I.; Gallardo-Pérez, J.C.; Jiménez-Farfán, D.; Escamilla-Ramírez, Á.; Zavala-Vega, S.; Cruz-Salgado, A.; Cervantes-Rebolledo, C.; Gracia-Mora, I.; et al. Anti-Proliferative, pro-Apoptotic and Anti-Invasive Effect of the Copper Coordination Compound Cas III-La through the Induction of Reactive Oxygen Species and Regulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway in Glioma. *J. Cancer* **2021**, *12*, 5693–5711. [\[CrossRef\]](#)
- Resendiz-Acevedo, K.; García-Aguilera, M.E.; Esturau-Escofet, N.; Ruiz-Azuara, L. 1H-NMR Metabolomics Study of the Effect of Cisplatin and Casiopeina IIgly on MDA-MB-231 Breast Tumor Cells. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 742859. [\[CrossRef\]](#)
- González-Ballesteros, M.M.; Mejía, C.; Ruiz-Azuara, L. Metallo-drugs: An Approach against Invasion and Metastasis in Cancer Treatment. *FEBS Open Bio.* **2022**, *12*, 880–899. [\[CrossRef\]](#)
- Leal-García, M.; García-Ortuño, L.; Ruiz-Azuara, L.; Gracia-Mora, I.; Luna-Delvillar, J.; Sumano, H. Assessment of Acute Respiratory and Cardiovascular Toxicity of Casiopeinas in Anesthetized Dogs. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *101*, 151–158. [\[CrossRef\]](#)
- Serment-Guerrero, J.; Cano-Sanchez, P.; Reyes-Perez, E.; Velazquez-García, E.; Bravo-Gomez, M.E.; Ruiz-Azuara, L. Genotoxicity of the Copper Antineoplastic Coordination Complexes Casiopeinas<sup>®</sup>. *Toxicol. Vitr.* **2011**, *25*, 1376–1384. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Correia, I.; Borovic, S.; Cavaco, I.; Matos, C.P.; Roy, S.; Santos, H.M.; Fernandes, L.; Capelo, J.L.; Ruiz-Azuara, L.; Pessoa, J.C. Evaluation of the Binding of Four Anti-Tumor Casiopeinas<sup>®</sup> to Human Serum Albumin. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *175*, 284–297. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cañas-Alonso, R.C.; Fuentes-Noriega, I.; Ruiz-Azuara, L. Pharmacokinetics of Casiopeina IIgly in Beagle Dog: A Copper Based Compound with Antineoplastic Activity. *J. Biomed. Biomed.* **2010**, *2*, 28–34. [\[CrossRef\]](#)

14. Miranda-Calderón, J.E.; Macías-Rosales, L.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azua, L.; Faustino-Vega, A.; Gracia-Mora, J.; Bernad-Bernad, M.J. Effect of Casiopein III-Ia Loaded into Chitosan Nanoparticles on Tumor Growth Inhibition. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *48*, 1–8. [[CrossRef](#)]
15. Masjedi, M.; Montahaei, T. An Illustrated Review on Nonionic Surfactant Vesicles (Niosomes) as an Approach in Modern Drug Delivery: Fabrication, Characterization, Pharmaceutical, and Cosmetic Applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102234. [[CrossRef](#)]
16. Sankhyan, A.; Pawar, P.K. Metformin Loaded Non-Ionic Surfactant Vesicles: Optimization of Formulation, Effect of Process Variables and Characterization. *Daru J. Fac. Pharm.* **2013**, *21*, 7. [[CrossRef](#)]
17. Nasr, M.; Mansour, S.; Mortada, N.D. Elshamy, a Vesicular Acetoclofenac Systems: A Comparative Study between Liposomes and Niosomes. *J. Microencapsul.* **2008**, *25*, 499–512. [[CrossRef](#)]
18. Sakai, T.; Kurosawa, H.; Okada, T.; Mishima, S. Vesicle Formation in Mixture of a PEO-PPO-PEO Block Copolymer (Pluronic P123) and a Nonionic Surfactant (Span 65) in Water. *Colloids. Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *389*, 82–89. [[CrossRef](#)]
19. Manosroi, A.; Wongtrakul, P.; Manosroi, J.; Sakai, H.; Sugawara, E.; Yuasa, M.; Abe, M. Characterization of Vesicles Prepared with Various Non-Ionic Surfactants Mixed with Cholesterol. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2003**, *30*, 129–138. [[CrossRef](#)]
20. Stylianopoulos, T.; Jain, R.K. Design Considerations for Nanotherapeutics in Oncology. *Nanomedicine* **2015**, *11*, 1893–1907. [[CrossRef](#)]
21. Beddoes, C.M.; Case, C.P.; Briscoe, W.H. Understanding Nanoparticle Cellular Entry: A Physicochemical Perspective. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2015**, *218*, 48–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rawal, M.; Singh, A.; Amiji, M.M. Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development. *Pharm. Res.* **2019**, *36*, 153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bastogne, T. Quality-by-Design of Nanopharmaceuticals—A State of the Art. *Nanomedicine* **2017**, *13*, 2151–2157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. European Medicines Agency (EMA) Committee for Human Medicinal Products. *ICH Guideline Q8 (R2) on Pharmaceutical Development*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2017.
25. Cacicdo, M.L.; Ruiz, M.C.; Scioli-Montoto, S.; Ruiz, M.E.; Fernández, M.A.; Torres-Sanchez, R.M.; Baran, E.J.; Castro, G.R.; León, I.E. Lipid Nanoparticles-Metvan: Revealing a Novel Way to Deliver a Vanadium Compound to Bone Cancer Cells. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 17726–17734. [[CrossRef](#)]
26. Patel, V.; Bardoliwala, D.; Lalani, R.; Patil, S.; Ghosh, S.; Javia, A.; Misra, A. Development of a Dry Powder for Inhalation of Nanoparticles Codelivering Cisplatin and ABCC3 siRNA in Lung Cancer. *Ther. Deliv.* **2021**, *12*, 651–670. [[CrossRef](#)]
27. Waghule, T.; Dabholkar, N.; Gorantla, S.; Rapalli, V.K.; Saha, R.N.; Singhvi, G. Quality by Design (QbD) in the Formulation and Optimization of Liquid Crystalline Nanoparticles (LCNPs): A Risk Based Industrial Approach. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *141*, 111940. [[CrossRef](#)]
28. Moghassemi, S.; Hadjizadeh, A. Nano-Niosomes as Nanoscale Drug Delivery Systems: An Illustrated Review. *J. Control. Release* **2014**, *185*, 22–36. [[CrossRef](#)]
29. Waddad, A.Y.; Abbas, S.; Yu, F.; Muniyendo, W.L.L.; Wang, J.; Lv, H.; Zhou, J. Formulation, Characterization and Pharmacokinetics of Morin Hydrate Niosomes Prepared from Various Non-Ionic Surfactants. *Int. J. Pharm.* **2013**, *456*, 446–458. [[CrossRef](#)]
30. Hao, Y.M.; Li, K. Entrapment and Release Difference Resulting from Hydrogen Bonding Interactions in Niosome. *Int. J. Pharm.* **2011**, *403*, 245–253. [[CrossRef](#)]
31. Haroun, M.; Elsewedy, H.S.; Shehata, T.M.; Tratat, C.; Al Dhubiab, B.E.; Venugopala, K.N.; Almostafa, M.M.; Kochkar, H.; Elnahas, H.M. Significant of Injectable Brucine PEGylated Niosomes in Treatment of MDA Cancer Cells. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *71*, 103322. [[CrossRef](#)]
32. Chen, S.; Hanning, S.; Falconer, J.; Locke, M.; Wen, J. Recent Advances in Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes): Fabrication, Characterization, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *144*, 18–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Shaker, D.S.; Shaker, M.A.; Hanafy, M.S. Cellular Uptake, Cytotoxicity and in-Vivo Evaluation of Tamoxifen Citrate Loaded Niosomes. *Int. J. Pharm.* **2015**, *493*, 285–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mohamed, H.B.; El-Shanawany, S.M.; Hamad, M.A.; Elsbahy, M. Niosomes: A Strategy toward Prevention of Clinically Significant Drug Incompatibilities. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rajera, R.; Nagpal, K.; Singh, S.K.; Mishra, D.N. Niosomes: A Controlled and Novel Drug Delivery System. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, *34*, 945–953. [[CrossRef](#)]
36. Yang, H.; Deng, A.; Zhang, J.; Wang, J.; Lu, B. Preparation, Characterization and Anticancer Therapeutic Efficacy of Cisplatin-Loaded Niosomes. *J. Microencapsul.* **2013**, *30*, 237–244. [[CrossRef](#)]
37. Sharma, V.; Anandhakumar, S.; Sasidharan, M. Self-Degrading Niosomes for Encapsulation of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs: An Efficient Carrier for Cancer Multi-Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *56*, 393–400. [[CrossRef](#)]
38. Sezgin-Bayindir, Z.; Antep, M.N.; Yuksel, N. Development and Characterization of Mixed Niosomes for Oral Delivery Using Candesartan Cilexetil as a Model Poorly Water-Soluble Drug. *AAPS PharmSciTech.* **2015**, *16*, 108–117. [[CrossRef](#)]
39. Duong, V.A.; Nguyen, T.T.L.; Maeng, H.J. Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules* **2020**, *25*, 4781. [[CrossRef](#)]
40. European Medicines Agency ICH Guideline Q3C (R6) on Impurities: Guideline for Residual Solvents. *Int. Conf. Harmon. Tech. Regul. Regist. Pharm. Hum. Use* **2019**, *31*, 24.

41. Schubert, M.A.; Müller-Goymann, C.C. Solvent Injection as a New Approach for Manufacturing Lipid Nanoparticles-Evaluation of the Method and Process Parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *55*, 125–131. [CrossRef]
42. Ritwiset, A.; Krongasuk, S.; Johns, J.R. Molecular Structure and Dynamical Properties of Niosome Bilayers with and without Cholesterol Incorporation: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *380*, 23–31. [CrossRef]
43. Wilkhu, J.S.; Ouyang, D.; Kirchmeier, M.J.; Anderson, D.E.; Perrie, Y. Investigating the Role of Cholesterol in the Formation of Non-Ionic Surfactant Based Bilayer Vesicles: Thermal Analysis and Molecular Dynamics. *Int. J. Pharm.* **2014**, *461*, 331–341. [CrossRef] [PubMed]
44. Jain, A.; Jain, S. In Vitro Release Kinetics Model Fitting of Liposomes: An Insight. *Chem. Phys. Lipids.* **2016**, *201*, 28–40. [CrossRef] [PubMed]
45. Barani, M.; Hajinezhad, M.R.; Sargazi, S.; Rahdar, A.; Shahraki, S.; Lohrasbi-Nejad, A.; Bairo, F. In Vitro and in Vivo Anticancer Effect of pH-Responsive Paclitaxel-Loaded Niosomes. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2021**, *32*, 147. [CrossRef] [PubMed]
46. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. [CrossRef] [PubMed]
47. Muzzalupo, R.; Mazzotta, E. Do Niosomes Have a Place in the Field of Drug Delivery? *Expert Opin. Drug Deliv.* **2019**, *16*, 1145–1147. [CrossRef]
48. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941–951. [CrossRef]
49. Ikeda-Imafuku, M.; Wang, L.L.-W.; Rodrigues, D.; Shaha, S.; Zhao, Z.; Mitragotri, S. Strategies to Improve the EPR Effect: A Mechanistic Perspective and Clinical Translation. *J. Control. Release* **2022**, *345*, 512–536. [CrossRef]
50. Garcia-Manrique, P.; Machado, N.D.; Fernández, M.A.; Blanco-López, M.C.; Matos, M.; Gutiérrez, G. Effect of Drug Molecular Weight on Niosomes Size and Encapsulation Efficiency. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2020**, *186*, 110711. [CrossRef]
51. Akhilesh, D.; Bini, K.B.; Kamath, J. Review on Span-60 Based Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) as Novel Drug Delivery. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* **2012**, *3*, 6–12.
52. Barani, M.; Mirzaei, M.; Torkzadeh-Mahani, M.; Adeli-sardou, M. Evaluation of Carum-Loaded Niosomes on Breast Cancer Cells: Physicochemical Properties, In Vitro Cytotoxicity, Flow Cytometric, DNA Fragmentation and Cell Migration Assay. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
53. Pardakhty, A.; Varshosaz, J.; Rouholamini, A. In Vitro Study of Polyoxyethylene Alkyl Ether Niosomes for Delivery of Insulin. *Int. J. Pharm.* **2007**, *328*, 130–141. [CrossRef] [PubMed]
54. Agarwal, S.; Mohamed, M.S.; Raveendran, S.; Rochani, A.K.; Maekawa, T.; Kumar, D.S. Formulation, Characterization and Evaluation of Morusin Loaded Niosomes for Potentiation of Anticancer Therapy. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 32621–32636. [CrossRef] [PubMed]
55. Ghosh, S.; Ghatak, C.; Banerjee, C.; Mandal, S.; Kuchlyan, J.; Sarkar, N. Spontaneous Transition of Micelle-Vesicle-Micelle in a Mixture of Cationic Surfactant and Anionic Surfactant-like Ionic Liquid: A Pure Nonlipid Small Unilamellar Vesicular Template Used for Solvent and Rotational Relaxation Study. *Langmuir* **2013**, *29*, 10066–10076. [CrossRef] [PubMed]
56. Tavano, L.; Oliviero Rossi, C.; Picci, N.; Muzzalupo, R. Spontaneous Temperature-Sensitive Pluronic<sup>®</sup> based Niosomes: Triggered Drug Release Using Mild Hyperthermia. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 703–708. [CrossRef]
57. Hickey, J.W.; Santos, J.L.; Williford, J.M.; Mao, H.Q. Control of Polymeric Nanoparticle Size to Improve Therapeutic Delivery. *J. Control. Release* **2015**, *219*, 536–547. [CrossRef]
58. Junyaprasert, V.B.; Teeranachai-deekul, V.; Supapern, T. Effect of Charged and Non-Ionic Membrane Additives on Physicochemical Properties and Stability of Niosomes. *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9*, 851–859. [CrossRef]
59. Akbarzadeh, I.; Farid, M.; Javidfar, M.; Zabet, N.; Shokohian, B.; Arki, M.K.; Shpichka, A.; Noorbazargan, H.; Aghdaei, H.A.; Hossein-khannazer, N.; et al. The Optimized Formulation of Tamoxifen-Loaded Niosomes Efficiently Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. *AAPS PharmSciTech* **2022**, *23*, 57. [CrossRef]
60. Ruiz-Azuara, L. Process to Obtain New Mixed Copper Aminoacidate from Methylate Phenathroline Complexes to Be Used as Anticancerigenic Agents. U.S. Patent 5,576,326, 21 April 1992.
61. Ruiz-Azuara, L. Composición Parental de Casiopeina y Uso de La Misma. IMPI No. Solicitud MX/a/2017/016444, 2017.
62. Carvallo-Chaigneau, F.; Tejo-Solis, C.; Gómez-Ruiz, C.; Rodríguez-Aguilera, E.; Macías-Rosales, L.; Cortés-Barberena, E.; Cedillo-Peláez, C.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L.; Madrid-Marina, V.; et al. Casiopeina III-Ia Induces Apoptosis in HCT-15 Cells in Vitro through Caspase-Dependent Mechanisms and Has Antitumor Effect in Vivo. *BioMetals* **2008**, *21*, 17–28. [CrossRef]
63. Allen, T.M.; Cullis, P.R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* **2004**, *303*, 1818–1822. [CrossRef]
64. Parveen, S.; Sahoo, S.K. Polymeric Nanoparticles for Cancer Therapy. *J. Drug Target.* **2008**, *16*, 108–123. [CrossRef] [PubMed]
65. Nazir, S.; Hussain, T.; Ayub, A.; Rashid, U.; MacRobert, A.J. Nanomaterials in Combating Cancer: Therapeutic Applications and Developments. *Nanomedicine* **2014**, *10*, 19–34. [CrossRef] [PubMed]
66. García-Manrique, P.; Matos, M.; Gutiérrez, G.; Estupiñán, O.R.; Blanco-López, M.C.; Pazos, C. Using Factorial Experimental Design to Prepare Size-Tuned Nanovesicles. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, *55*, 9164–9175. [CrossRef]
67. Zhao, Z.; Ukidve, A.; Krishnan, V.; Mitragotri, S. Effect of Physicochemical and Surface Properties on in Vivo Fate of Drug Nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *143*, 3–21. [CrossRef] [PubMed]
68. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Liposome Drug Products Chemistry, Guidance for Industry. 2018. Available online: <https://www.fda.gov/media/70837/download> (accessed on 18 October 2022).

69. Baillie, A.J.; Florence, A.T.; Hume, L.R.; Muirhead, G.T.; Rogerson, A. The Preparation and Properties of Niosomes—Non-ionic Surfactant Vesicles. *J. Pharm. Pharmacol.* **1985**, *37*, 863–868. [[CrossRef](#)]
70. Sabry, S.; El hakim Ramadan, A.; Abd elghary, M.; Okda, T.; Hasan, A. Formulation, Characterization, and Evaluation of the Anti-Tumor Activity of Nanosized Galangin Loaded Niosomes on Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Rats. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102163. [[CrossRef](#)]
71. Uchegbu, I.E.; Vyas, S.P. Non-Ionic Surfactant Based Vesicles (Niosomes) in Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **1998**, *172*, 33–70. [[CrossRef](#)]
72. Jaafar-Maalej, C.; Diab, R.; Andrieu, V.; Elaissari, A.; Fessi, H. Ethanol Injection Method for Hydrophilic and Lipophilic Drug-Loaded Liposome Preparation. *J. Liposome Res.* **2010**, *20*, 228–243. [[CrossRef](#)]
73. Marianecchi, C.; Rinaldi, F.; Carafa, M.; Marianecchi, C.; Di, L.; Rinaldi, F.; Celia, C.; Paolino, D.; Alhaique, F.; Esposito, S.; et al. Niosomes from 80s to Present: The State of the Art. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2013**, *205*, 187–206. [[CrossRef](#)]