

Cuernavaca, Mor., 29 de octubre de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Preparación de compuestos bioactivos a partir de una flavanona natural, su evaluación antiinflamatoria *in vivo* en el modelo de TPA y el desarrollo de una formulación nanoestructurada para aplicación percutánea**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jessica García Vega. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUIS ENRIQUE ALBERTO CAÑEDO Y DORANTES | Fecha:2021-11-13 12:27:53 | Firmante

ziXStT9uK43UsuG0F/63LLInW4sfn85erUS6q0ZcyyYlHqvAwzxsNz6oZNgODm2HFrlJEbKq6ZFJ33v5544nVFHjg8NEd+gylGTraG9ZtR5vMnQBEBdm40yGsEoMBIsNKKVbU37S
+wRMu9p9/IEt2z6KtjD2Dcgp6a2rhQo9+vKbjWnkqK0VKJl4ofzqWAI/K5Hv2k6zStJqYmSVxi9p8ZDiu1GIYR+HynAxHKTt73qhyVFmMpjEDdf8sZv3gR3yhPLLiEkWJkoS5YbTnddM
w3Qw00R8/V1ATg51CpVVONIT2x3lxPC05QNFyMTeU/hcf7WWwHAakYH98Hvsr/y1EQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[wQX1UjkEc](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/tsQGb94WkALh5BCez6kV5onbD50wG4x9>



Cuernavaca, Mor., 29 de octubre de 2021.

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Secretario de Investigación

Facultad de Medicina

Presente:

Estimado Dr. Esquivel, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Preparación de compuestos bioactivos a partir de una flavanona natural, su evaluación antiinflamatoria *in vivo* en el modelo de TPA y el desarrollo de una formulación nanoestructurada para aplicación percutánea**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jessica García Vega. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Vera Lucia Petricevich



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VERA LUCIA PETRICEVICH | Fecha:2021-11-17 14:28:13 | Firmante

mr7nkuCoPUFVnAwUOio/8XhZCBRzDXQiH9Go5xNE+/joSKHCsfTIJGWnvwG3R9E8Wm/hEuYjgO3XSxwL5biN9BwjdfzOMC7s0VduEpuTQR0wnxd9NKf+Md+VSFvz1Poul5PpRwhf+KvDtxQsx8DeOw5pLf69HwXaTJHWEM5Ois8jFg32EiQLrIJ6ALEji+Y/r9RqjBkHLeXRJFhChC3/8ndS1Wmffd5yPOVted+nnluUiiQznrKjNUTZj2vNwiek+Yrtl2iWNUYNcUMUtpd lu8rvTsYjPWcBx53XOL62mJ03fICZ0DoeuSFO0dqMMvSWJf+qhQsawv+qLYW5+05B6Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Vb84c7WvH

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mv1Ps8IWSzlwC30d0x9zY1tTxMBXsEE8>



Cuernavaca, Mor., 29 de octubre de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Preparación de compuestos bioactivos a partir de una flavanona natural, su evaluación antiinflamatoria *in vivo* en el modelo de TPA y el desarrollo de una formulación nanoestructurada para aplicación percutánea**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jessica García Vega. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Valeri Domínguez Villegas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS | Fecha:2021-11-12 14:25:37 | Firmante

CgRA5rfMIGETQx9Ktbi3uLK3Sy32p1M9/Sk95Ne2SaDpGsiSd7aa99sTOJVuCrNvNvdK92KH7mU5fPrGWTRiQYxMOD3v0qb4FFXOsMfVi3QQi/8u2Bo55igNRLDm3oSLZka1anqp
HUwqhZs1fioCucHcdgXIJWWSkuAFxb5karEHZEdz2JdU+vDQUOsTeczl4LUEffu4Kv+KM1d7tbCSTv6V2ewwlgvsOSm9DSvxxqic1IS/hxa1lIjAWoFg9Z0tex6rohdaZ7laYsx71A4
pmwZ2Sa2+03SDzkM9Es45JE5noX0qyQcHYEm4GCj5lq71CQ9QwN3VCt+1zxTxokMA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Stv9FjBp6](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/bqXT8x6EYrFqLveAskxbiYYiI5f4PlwY>



Cuernavaca, Mor., 29 de octubre de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Preparación de compuestos bioactivos a partir de una flavanona natural, su evaluación antiinflamatoria *in vivo* en el modelo de TPA y el desarrollo de una formulación nanoestructurada para aplicación percutánea**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jessica García Vega. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2021-11-12 18:43:14 | Firmante

OKA4ldFL7oAiiKvpcWWpzhNsiDjZsRPUaArNumyzYR3j5HENGzSxbBDrmcCJ0j8X7DVg3f3KVu+dO/21/YZlgWZtL009FA8hBbn4Bkzy+UKZ1bFscTNXA66QKe6DemQz/pyYof9FVA+h8u3czg3FWW4zIaVtU0i6khnJomDA1WtSibDprt+8/i/IT9udHuNX1RLBrntzbkZYS0nGmGjWnrKy3J90EfSCZ8xCshiGw4myL9S1FhnsCJxwkzv3Kzicoqjyp3oDLAPKpDg8cJLQpv/DbIjPi7R8IDMW5Me03RM7Qu1/KHKKcQfshHbrOpZpxDIF9xVYLAtdGWPh/q+g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[b0sEI8nTO](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dp7SI6bn0U4OrnNR4tFUOYWni04Ocp07>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN

COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

Preparación de compuestos bioactivos a partir de una flavanona natural, su evaluación antiinflamatoria *in vivo* en el modelo de TPA y el desarrollo de una formulación nanoestructurada para aplicación percutánea.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA:

Q. I. JESSICA GARCÍA VEGA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO NOVIEMBRE DE 2021

El presente trabajo de investigación se desarrolla en el laboratorio 325: Química de Productos Naturales Básica y Aplicada del Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2019-2021

Miembros del jurado

Dr. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Dra. Vera Lucia Petricevich

Dra. Valeri Domínguez Villegas

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

Agradecimiento de fuentes de financiamiento

Becario CONACyT No. 735138



Dedicatorias y Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar gracias a Dios, por permitirme lograr mis metas, y especialmente por darme la oportunidad de llegar a este momento de mi vida con las personas que me quieren.

Dedico mi tesis a mi mamá por ser mi gran apoyo, pues sin ella no lo habría logrado. Porque siempre estás a mi lado, por acompañarme en las noches de estudio, por siempre tener esas palabras de aliento y por ser mi compañera de vida.

A mi hermano, le agradezco por ayudarme en todo momento y darme las fuerzas para poder lograr mis objetivos.

Agradecimientos Académicos

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez por darme la oportunidad de trabajar en conjunto, por siempre apoyarme y sobre todo tenerme paciencia. Le agradezco por siempre estarme guiando en el transcurso de mi tesis.

Les agradezco a todos mis profesores que me dieron clases ya que siempre me estuvieron apoyando y dándome los mejores consejos para lograr mis objetivos.

Les agradezco al **Dr. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes**, a la **Dra. Vera Lucia Petricevich** y a la **Dra. Valeri Domínguez Villegas** por ser parte de mi jurado. Y aunque ya no este entre nosotros le agradezco al **Dr. Jesús Santa Olalla Tapia** que siempre estuvo ahí dándome ánimos y consejos, fue y será un gran catedrático, y lo recordaré con gran cariño.

A CONACyT por la beca otorgada Num. 735138

Al personal de la Maestría en Medicina Molecular en particular a Imelda Álvarez por las gestiones realizadas

Índice general

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE GRÁFICAS.....	vii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Inflamación.	2
2.1.1 Ácido araquidónico.....	4
2.1.1.1 Vía de la ciclooxigenasa.....	4
2.1.1.2 Vía de las lipooxigenasas.	4
2.1.2 Células que participan en el proceso inflamatorio.	5
2.1.2.1 Las prostaglandinas.....	6
2.1.2.2 Las citoquinas.....	8
2.1.2.3 Especies reactivas de nitrógeno (RNS): El óxido nítrico (NO).	9
2.1.3 Enfermedades inflamatorias.	10
2.2 Tratamientos de inflamación.....	11
2.2.1 Los antiinflamatorios esteroides.....	11
2.2.2. Los antiinflamatorios no esteroides (AINEs).	11
2.2.2.1. Mecanismo de acción.....	12
2.2.2.2. Inhibición de la ciclooxigenasa (COX).....	12
2.2.3. Compuestos antiinflamatorios de origen natural.	13
2.3. Antiinflamatorios comerciales.....	14
2.3.1. Diclofenaco sódico.....	15
2.3.1.1. Presentación farmacéutica.....	15
2.3.1.2 Farmacocinética y farmacodinamia.....	15
2.3.1.2.1 Farmacocinética.....	15
2.3.1.2.2 Farmacodinamia.....	16
2.4 Fármacos tópicos antiinflamatorios.....	17
2.5 Piel.....	18
2.5.1 Epidermis.	18
2.5.2. Dermis.....	20
2.5.3 Hipodermis.....	20
2.6 Los modelos <i>in silico</i> una herramienta para el conocimiento farmacológico.....	21

2.6.1 Acoplamiento molecular entre ligando y receptor.....	22
2.6.1.1 Molinspiration.....	23
2.6.1.2. SwissTargetPrediction.....	26
2.6.1.3. PASS Online.....	27
2.7 Diseño molecular de fármacos.....	29
2.7.1 Estrategias generales de farmacomodulación.....	29
2.7.2 Finalidad de la farmacomodulación.....	30
2.7.2.1 Estudio preliminar de las relaciones estructura-actividad.....	30
2.7.2.2 Modificación del espectro de acción.....	30
2.7.2.3 Modificación de la farmacocinética.....	30
2.7.2.4 Modificación de la distribución.....	31
2.7.2.5 Aumento de la estabilidad química.....	31
2.7.2.6 Desarrollo de sustitutos y copias terapéuticas.....	31
2.7.3 Técnicas de farmacomodulación.....	32
2.7.3.1 Aproximación disyuntiva.....	32
2.7.3.2 Aproximación modulativa.....	32
2.7.3.3 Aproximación conjuntiva.....	34
2.7.4 Influencia de los grupos funcionales en el diseño molecular de fármacos.....	35
2.8 Sistema de liberación controlada.....	37
2.9 Desarrollo de emulsiones y nanoemulsiones.....	39
2.9.1. Nanoemulsiones.....	40
2.9.1.1. Selección de los componentes de la nanoemulsión.....	42
2.10. Flavonoides.....	44
2.10.1. Biosíntesis de los flavanoides.....	47
2.10.2. Flavanonas.....	47
2.11. Planta: <i>Eysenhardtia platycarpa Pennell & Safford</i>	48
2.11.1. Descripción botánica.....	48
2.11.2. Clasificación Taxonómica.....	50
2.11.3. Distribución Geográfica.....	50
2.11.4. Usos tradicionales.....	50
2.11.5. Antecedentes químicos.....	51
2.12.6. Preparación de farmacomodulados.....	51
2.12.7. Antecedentes farmacológicos.....	51
2.12.7.1. Toxicidad frente a <i>Artemia salina</i>	51
2.12.7.2. Citotoxicidad en líneas celulares.....	52

2.12.7.3. Actividad hipoglucemiante y antidiabética.....	52
2.12.7.4. Actividad antimicrobiana.....	52
2.12.7.5. Actividad antioxidante.....	53
2.12.7.6. Actividad antiinflamatoria.....	54
2.12.7.7 Aplicación de sistemas nanoestructurados en flavanonas de <i>E. platycarpa</i>	54
2.12.7.8 Estudio preliminar sobre el desarrollo de un dispositivo transdérmico, estudio en reposo y estudio dinámico.....	55
2.12.7.9 Detección de los niveles de citocinas.....	56
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	57
4. OBJETIVOS	58
4.1 Objetivo general.....	58
4.2 Objetivos particulares.....	58
5. HIPÓTESIS.....	59
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	60
6.1. Consideraciones Generales.....	60
6.1.1. Análisis <i>in silico</i>	60
6.1.2 Aislamiento de la flavanona natural.....	60
6.1.3 Caracterización estructural.....	60
6.1.4. Determinación de tamaño de gotícula.....	61
6.2. Obtención de la flavanona (2 <i>S</i>)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1).....	61
6.3. Técnicas de separación.....	61
6.4. Preparación de los compuestos farmacomodulados.....	61
6.4.1 Preparación de (2 <i>S</i>)-5,7-diacetil-6-metil-8-prenilflavanona (1a).....	62
6.4.2. Preparación de (2 <i>S</i>)-5-hidroxi-7-metoxi-6-metil-8-prenilflavanona (1b).....	63
6.4.3. Preparación de (8 <i>S</i>)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dihidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (1c).....	63
6.4.4. Preparación de (8 <i>S</i>)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dehidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (1d).....	64
6.5. Elaboración de nanoemulsiones.....	64
6.6. Caracterización de los sistemas nanoestructurados.....	65
6.6.1. Caracterización visual de las NEs.....	65
6.6.2 Carcaterización mediante Z-Sizer.....	65
6.7. Evaluación antiinflamatoria.....	66
6.7.1. Eficacia antiinflamatoria intrínseca.....	66
6.8. Análisis y métodos estadísticos.....	67
7. RESULTADOS.....	68

7.1. Análisis <i>in silico</i>.....	68
7.1.1. Análisis mediante <i>Molinspiration</i>	68
7.1.2. Análisis mediante <i>SwissTargetPrediction</i>	70
7.1.3. Análisis mediante <i>PASS Online</i>	72
7.1. Obtención de (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (1).....	76
7.2. Obtención de los compuestos farmacomodulados.	76
7.2.1 (2S)-5,7-diacetil-6-metil-8-prenilflavanona (1a).....	76
7.2.2. (2S)-5-hidroxi-7-metoxi-6-metil-8-prenilflavanona (1b).	77
7.2.3. (8S)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dihidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (1c).....	78
7.2.4. (8S)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dehidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (1d).	78
7.3. Resultados de la evaluación antiinflamatoria.	80
7.3.1. Eficacia antiinflamatoria intrínseca.....	80
7.4. Preparación de las nanoemulsiones.	81
7.5. Resultados de la caracterización de los sistemas nanoestructurados.....	82
7.5.2 Determinación de tamaño de gotícula por medio de <i>Z-Sizer</i>	82
7.5.1.1. Nanoemulsión blanca (NEB).....	83
7.5.1.2. Nanoemulsión con Indometacina (NEINDO).	84
7.5.1.3. Nanoemulsión con la flavanona natural 1 (NE1).	84
7.5.1.4. Nanoemulsión con modulado éster 1a (NE1a).....	85
7.5.1.5. Nanoemulsión con modulado alquilado 1b (NE1b).	86
7.5.1.6. Nanoemulsión con modulado ciclizado 1c (NE1c).	87
8. DISCUSIÓN.....	88
8.1 Análisis <i>in Silico</i>	88
8.2 Obtención de los derivados (1a-1d) a partir de la flavanona natural (1).....	89
8.3 Eficacia antiinflamatoria intrínseca.....	90
8.4 Preparación de las nanoemulsiones	90
9. CONCLUSIONES	92
10. BIBLIOGRAFÍA	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroides
AR	Artritis reumatoide
Ca⁺²	Ión calcio
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CCPF	Cromatografía en capa fina preparativa
CCPR	Columna a presión reducida
COX	Ciclooxigenasa
EPOC	Pulmonar obstructiva crónica
HPETE	Hidroxi-peroxieicosatetraenoicos
IL	Interleucina
LOX	Lipooxigenasas
LTs	Leucotrienos
NE	Nanoemulsión
NP	Nanopartícula
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
OW	Fase externa acuosa
PGs	Prostaglandinas
PGL₂	Prostaciclina
STT	Sistemas Terapéuticos Transdérmicos
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	Acetato de tetradecanoil forbol
TXs	Troboxanos
W/O	Fase externa oleosa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diapédesis del neutrófilo.....	3
Figura 2. Estructura de prostaglandinas.....	6
Figura 3. Mecanismo de señalización en la biosíntesis de las PGs.	7
Figura 4. Estructura de Diclofenaco sódico.....	15
Figura 5. Componentes de la epidermis.....	19
Figura 6. Herramientas de software de quimioinformática.	23
Figura 7. <i>Molinspiration</i> cheminformatics.	25
Figura 8. <i>SwissTargetPrediction</i>	27
Figura 9. <i>PASS Online</i>	29
Figura 10. Representación de los tipos de nanopartículas utilizados.....	38
Figura 11. Nanoemulsión. Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM).....	41
Figura 12. Estructura general de los compuestos flavonoides.....	44
Figura 13. Estructuras químicas de las distintas clases de flavonoides.	45
Figura 14. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides.	46
Figura 15. Biosíntesis de los flavonoides.	47
Figura 16. <i>Eysenhardtia platycarpa</i> en su hábitat natural, Tetipac, Guerrero (Fotografía propiedad de Garduño Ramírez, M.L., 2007, proximidades del municipio de Tetipac, Guerrero).....	49
Figura 17. Flores de <i>Eysenhardtia platycarpa</i>	49
Figura 18. Mapa de distribución de <i>E. platycarpa</i> en México (Enciclopedia of Life., 2011).	50
Figura 19. Estructuras de la flavanonas naturales.....	51
Figura 20. Estructura química del compuesto TPA.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de la inflamación aguda frente a la crónica.....	3
Tabla 2. Clasificación termodinámica de diferentes tipos de emulsiones	40
Tabla 3. Actividad antioxidante de extractos de especies del género <i>Eysenhardtia</i> (Narváez et al, 2008).	53
Tabla 4. Actividad antioxidante reportada para compuestos de tipo flavonoide y cumarinas (Narváez et al, 2008).	53
Tabla 5. Descripción de los componentes de la nanoemulsión.....	65
Tabla 6. Datos fisicoquímicos obtenidos a partir de la plataforma <i>Molinspiration</i> para (1 , 1a-1d) e Indometacina.....	69
Tabla 7. Datos de bioactividad obtenidos a partir de a partir de la plataforma <i>Molinspiration</i> para (1 , 1a-1d) e Indometacina.	70
Tabla 8. Predicción de los porcentajes de interacción con blancos moleculares biológicos con los cuales podrían tener interacción importante los compuestos (1), (1a-1d) e indometacina y las propiedades moleculares consideradas para el diseño molecular considera.....	71
Tabla 9. Valores de Pa y Pi obtenidos por <i>PASS Online</i> para los compuestos en estudio (1 , 1a-1d) e indometacina; considerando la probabilidad de ser activo hasta el 70 %.	73
Tabla 10. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN- ¹ H) de la flavanona natural y los farmacomodulados.	79

Tabla 11. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de carbono (RMN- ¹³ C) de la flavanona natural y los farmacomodulados.	80
Tabla 12. Resultados de la evaluación antiinflamatoria intrínseca.	80
Tabla 13. Valores promedio de tamaños de gotícula e índice de polidispersión de las nanoemulsiones NEB, NEIND, NE1, NE1a-NE1d a 25 °C.	83

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Cascada del ácido araquidónico.	5
Esquema 2. Esquema general de las reacciones para la obtención de los modulados.	62

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Z-Sizer de la nanoemulsión (NEB).	83
Gráfica 2. Z-Sizer de la nanoemulsión (NEINDO).	84
Gráfica 3. Z-Sizer de la nanoemulsión (NE1).	85
Gráfica 4. Z-Sizer de la nanoemulsión (NE1a).	86
Gráfica 5. Z-Sizer de la nanoemulsión (NE1b).	86
Gráfica 6. Z-Sizer de la nanoemulsión (NE1c).	87

1. RESUMEN

La preparación de compuestos bioactivos a partir de productos naturales son puntos de partida viables en el diseño de quimiotecas de calidad. En el pasado los productos naturales fueron el origen de muchos fármacos, pero en la actualidad siguen siendo considerados una fuente inagotable de moléculas activas en la búsqueda de nuevas cabezas de serie para el descubrimiento de nuevos fármacos.

Se sabe que la aplicación percutánea también conocida como aplicación transdérmica ha resultado de mucha ayuda en la administración de fármacos para pacientes que requieren un tratamiento sostenido, ofrecen numerosas ventajas que los medicamentos de administración oral o mediante inyección no pueden proporcionar. No dañan el tracto gastrointestinal ni el hígado como los medicamentos orales, evitan el dolor de las inyecciones y controlan la dosis para reducir los efectos secundarios causados por la absorción de fármacos temporalmente excesiva, de manera que alivian la ansiedad y ofrecen un mayor bienestar a los pacientes. En el ámbito comercial diversos pacientes cuentan con un tratamiento comercializado en esta novedosa presentación farmacéutica para padecimientos como: asma, cardiopatías sistémicas, hipertensión y analgesia local; para este último caso el parche (Voltaren® parche 24H) cuenta con el diclofenaco sódico como principio activo que corresponde a un antiinflamatorio que posee actividades analgésicas y antipiréticas y está indicado por vía oral e intramuscular para el tratamiento de enfermedades reumáticas agudas, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artrosis, lumbalgia, gota en fase aguda, inflamación postraumática y postoperatoria, cólico renal y biliar, migraña aguda, y como profilaxis para dolor postoperatorio y dismenorrea. Sin embargo, el uso prolongado de este fármaco ha tenido también importantes aspectos en lo referente a reacciones adversas y efectos secundarios como el deterioro renal que se encuentra ya reportado al exceder la dosificación prescrita por el médico.

La estrategia de farmacomodulación es una posibilidad en el diseño de nuevos compuestos orgánicos con posible aplicación terapéutica y permite la preparación de compuestos derivados a partir de un compuesto líder, que en este caso corresponde a una flavanona natural.

El empleo de principios activos de origen natural y sus derivados ha demostrado ser una alternativa potencial para atender la inflamación neuronal como sistémica pensando en los padecimientos antes

mencionados y considerando el avance en el desarrollo de formulaciones nanoestructuradas que conducen a la liberación controlada de los fármacos el desarrollo de un parche transdérmico de una serie de flavanonas activas como agentes antiinflamatorias permitirá acercarse cada vez más a una posible alternativa terapéutica.

Las flavanonas obtenidas de la especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa* han dado oportunidad al avance de la investigación en el diseño de fármacos empleando la estrategia de diseño de farmacomodulación. Con ello el diseño experimental del presente proyecto de tesis conducirá a la preparación y caracterización de una serie de compuestos derivados a partir de la flavanona natural 2-(S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona, a los cuales se les realizará la determinación de la eficacia antiinflamatoria intrínseca *in vivo* empleando el modelo de inducción de la inflamación con TPA, la preparación de formulaciones nanoestructuras y su estudio morfométrico, encaminado todo ello para su posible aplicación percutánea.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Inflamación.

La inflamación es un proceso tisular (diversos estímulos pueden ocasionar una lesión tisular, ya sean de tipo exógeno o endógeno) constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y, por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos.¹

Las fases de la inflamación se pueden dividir en 5 etapas:

- 1. Liberación de mediadores.** Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito, bajo la actuación de determinados estímulos.
- 2. Efecto de los mediadores.** Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- 3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.** Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- 4. Regulación del proceso inflamatorio.** Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- 5. Reparación.** Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.¹

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La inflamación aguda es inducida por daño tisular debido a un traumatismo, compuestos nocivos o invasión microbiana. El proceso de inflamación aguda está mediado por células inmunitarias, importantes proteínas de señalización celular llamadas citocinas y otras moléculas pequeñas. Las anafilatoxinas, pequeñas moléculas inmunomediadoras liberadas en el sitio de la inflamación, estimulan los mastocitos para que liberaren histamina, serotonina y prostaglandinas, que hacen que los vasos sanguíneos se expandan

(vasodilatación) y se vuelvan más permeables. Esta respuesta permite que las células inmunitarias, como los neutrófilos, migren hacia el tejido afectado a través de la pared capilar (diapédesis) y respondan al agente ofensivo (**Figura 1**). Los neutrófilos son el componente principal de pus; los signos clínicos adicionales de inflamación aguda incluyen hinchazón, enrojecimiento, dolor y calor en el lugar del ataque.²

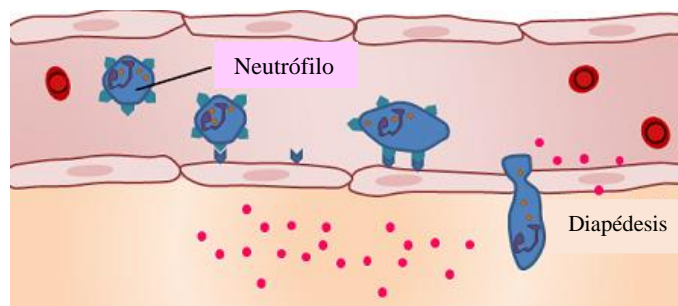


Figura 1. Diapédesis del neutrófilo.²

La inflamación crónica, por el contrario, puede ser la única respuesta inflamatoria observada en ciertas infecciones virales y reacciones de hipersensibilidad, particularmente si la causa de la inflamación es persistente (**Tabla 1**). En la inflamación crónica, las células inmunes primarias son los macrófagos y los linfocitos T, que producen citocinas y enzimas que causan un daño más duradero a las células. En la inflamación crónica, la resolución de la infección aguda da paso a un daño y destrucción tisular en curso, que se manifiesta como fibrosis tisular.²

Tabla 1. Características de la inflamación aguda frente a la crónica.

	Inflamación aguda	Inflamación crónica
Células	Infección: Neutrófilos. Alergia: eosinófilos, mastocitos.	Macrófagos, linfocitos.
Mediadores químicos	Complemento, cininas, prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas (interleucina 1, interleucina 6) de varias células inmunes, interferón gamma de células T	Citocinas de macrófagos y linfocitos T
Lesión	Erupción, pus, absceso	Erupción, fibrosis, granuloma
Ejemplos clínicos	Abscesos (cerebro; piel), reacción alérgica (anafilaxis)	Afecciones autoinmunes (lupus; artritis reumatoide), fibrosis quística

2.1.1 Ácido araquidónico.

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono que procede de la hidrólisis de fosfolípidos estructurales de la membrana celular en un proceso catalizado por la fosfolipasa A₂. El ácido araquidónico puede sintetizarse a partir del ácido linoleico, uno de los ácidos grasos esenciales requeridos por la mayoría de los mamíferos. El ácido araquidónico se encuentra en el origen de 2 rutas enzimáticas independientes: la *ruta de la ciclooxigenasa*, conducente a la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) y prostaciclina (PGI₂) y la *ruta de la lipooxigenasa*, que da lugar a los leucotrienos (LTs).³

2.1.1.1 Vía de la ciclooxigenasa.

La síntesis de prostaglandinas ocurre en forma gradual por un complejo de enzimas microsómicas de distribución muy amplia. En esta vía de síntesis, la primera enzima es la endoperóxido de prostaglandina, llamada también ciclooxigenasa. Existen 2 isoformas de la enzima que son reconocidas por sus iniciales COX-1, COX-2, claramente identificadas; sin embargo, existe la isoforma COX-3 que se encuentra en estudio y de ella se hablará más adelante. La primera se expresa en forma constitutiva prácticamente en todas las células y presenta gran ubicuidad; sin embargo, la COX-2 no aparece en forma constitutiva en las células, pero puede ser inducida por citocinas, factores de crecimiento y endotoxinas, efecto que es bloqueado por la administración de corticosteroides.

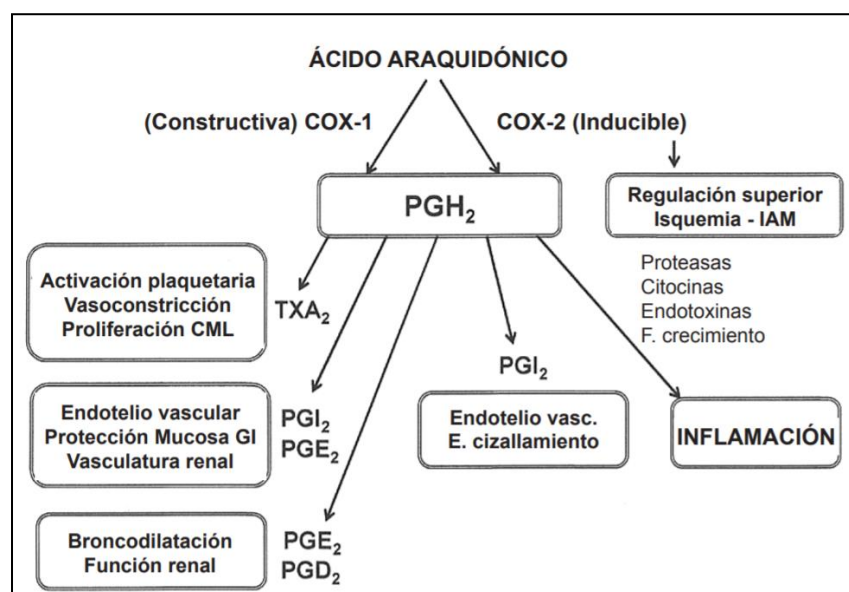
Las ciclooxigenasas actúan sobre el ácido araquidónico y provocan dos acciones diferentes: una que oxigena y produce una estructura en anillo y forma el endoperóxido cíclico PGG₂ y una actividad de peroxidasa que transforma PGG₂ en PGH₂. Los endoperóxidos G y H son químicamente inestables, pero por acción enzimática se transforman en diversos productos que incluyen prostaglandinas (PGE₂, PGD₂ y PGF₂ a o prostaciclina (PGI₂) y tromboxano (TXA₂).⁴

2.1.1.2 Vía de las lipooxigenasas.

Las lipooxigenasas catalizan la oxigenación de ácidos poliédricos hasta originar los hidroxiperóxidos lípidos. El ácido araquidónico, que contiene varias dobles ligaduras en su configuración, es su sustrato, el cual es metabolizado hasta dar diversos productos con el grupo hidroxiperoxi en distintas posiciones.⁴

Los metabolitos provenientes del ácido araquidónico reciben el nombre de ácidos de hidroxiperoxieicosatetraenoicos (HPETE). Las lipooxigenasas difieren en su especificidad; así, por ejemplo, las plaquetas cuentan sólo con 12-lipooxigenasas y sintetizan 12-HPETE; pero los leucocitos contienen 5 lipooxigenasas y además 12-lipooxigenasas y producen por lo tanto 5-HPETE y 12-HPETE. Los HPETE son análogos inestables a PGG₂/PGH₂, y son metabolizados por diversas enzimas.⁴

La 5-lipooxigenasa constituye una de las enzimas más importantes de este grupo, pues a partir de ellas se sintetizan los leucotrienos. Cuando se incrementan las cantidades de Ca⁺² intracelular, la 5-lipooxigenasa se une con la proteína que la activa y dicha unión activa la enzima que aumenta la síntesis de 5-HPETE y leucotrienos.⁴



Esquema 1. Cascada del ácido araquidónico.⁵

2.1.2 Células que participan en el proceso inflamatorio.

Existen dos tipos de células implicadas en la inflamación, unas que se encuentran en forma permanente en los tejidos, como son los mastocitos y las células endoteliales, y otras que pueden migrar y acceden al sitio afectado desde la sangre, como son los neutrófilos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y linfocitos. Estas células producen una gran cantidad de moléculas activas que, de manera directa o indirecta, son mediadores del proceso inflamatorio.⁶

2.1.2.1 Las prostaglandinas.

Las prostaglandinas dan una mezcla de ácidos liposolubles. Estos ácidos se conocen por la sigla PG seguida de las letras E, F, A o B y un índice numérico que puede ser seguido de una letra griega. Las PGs son reguladores bien conocidos del crecimiento de la célula. Constituyen una familia de compuestos que se generan en muchos tejidos, se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción de diferentes enzimas como las ciclooxigenasas (COXs). La vía por la cual el ácido araquidónico se metaboliza a eicosanoides depende del tejido, del estímulo y de la presencia de inductores o inhibidores endógenos y farmacológicos.⁶

En 1962, Bergström y Samuelsson, dilucidaron las estructuras de varias PGs como el caso de PGE₁ y la PGF₁, pronto se identificaron otras PGs y se supo que son ácidos carboxílicos de 20 átomos de carbono y que poseen un anillo de cinco miembros, grupos oxigenados en el anillo y una, dos o tres insaturaciones en las cadenas laterales (**Figura 2**), congéneres del ácido 15(*S*)-hidroxi-13-transprotenóico. Saber que las PGs constituyen solo una parte de los productos fisiológicamente activos del metabolismo del ácido araquidónico, permitió el descubrimiento del tromboxano A₂ (TXA₂), de la prostaciclina (PGI₂) y de los leucotrienos (LTs).⁶

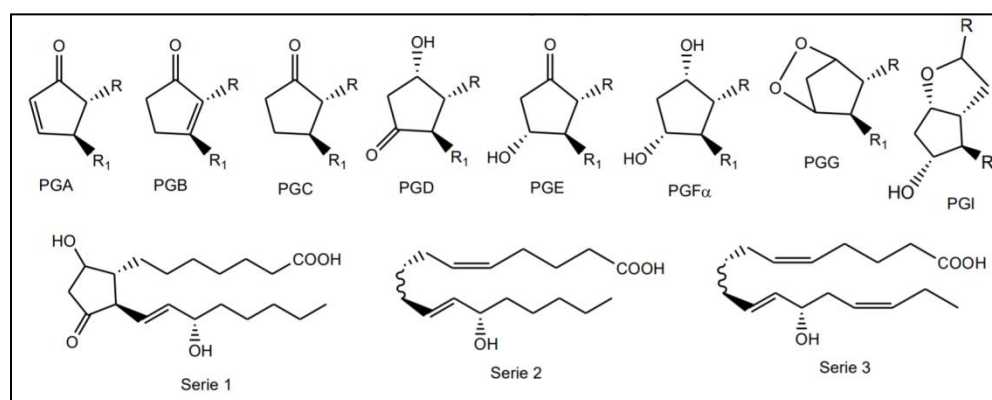


Figura 2. Estructura de prostaglandinas.⁶

Las hormonas, autacoides y otras sustancias, intensifican la biosíntesis de los eicosanoides al interactuar con los receptores en la membrana plasmática, los cuales acoplan con las proteínas reguladoras de unión, como la proteína G. El resultado es la activación de fosfolipasas o incremento de las concentraciones de ión calcio (Ca^{+2}) intracelular que culmina con la activación de las fosfolipasas. Se piensa que estímulos físicos hacen también que penetre Ca^{+2} a la célula que activa a la fosfolipasa A₂ (PLA₂), la cual hidroliza

el enlace éster de fosfolípidos de membrana con la liberación de ácido araquidónico, el cual es metabolizado rápidamente hasta obtener productos oxigenados, por acción de las COX, o algunas lipooxigenasas (LOX) o citocromo P₄₅₀ (cyp 450) y producción de PGs, TXs y/o LTs (**Figura 3**).⁶

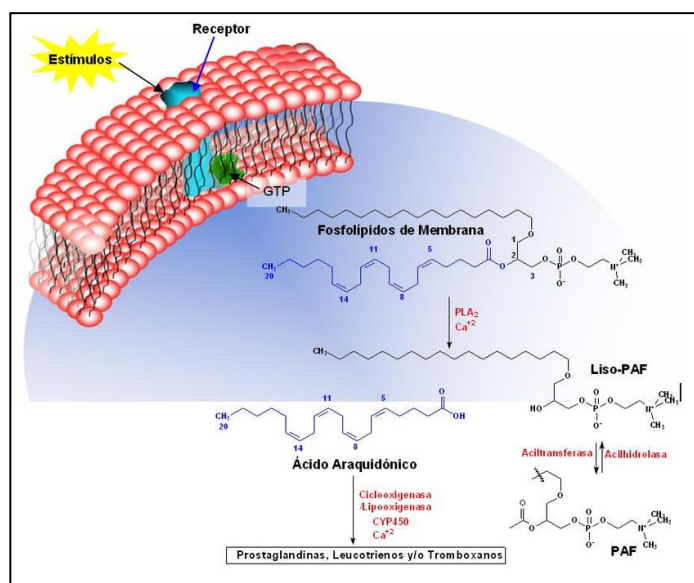


Figura 3. Mecanismo de señalización en la biosíntesis de las PGs.⁶

Existen tres isoformas de la enzima ciclooxigenasa que son: COX-1, COX-2 y COX-3. La enzima COX-1 se expresa de manera constitutiva en casi todas las células. La enzima COX-2 no se encuentra normalmente, pero pueden ser inducida por estímulos proinflamatorios, algunos factores séricos, citocinas y factores de crecimiento y se considera que es principalmente responsable de la síntesis de los mediadores prostanoideos del dolor, la inflamación y la fiebre, efecto que es inhibido por la administración de glucocorticoides (GCs) como la dexametasona. Por otro lado, la enzima COX-3, una isoforma de la COX-1, conocida con el nombre de la COX-1b o variante de la COX-1 (COX-1v), al parecer juega un papel en el proceso antiinflamatorio y su inhibición explicaría el alivio del dolor y la reducción de la fiebre producida por los AINEs. Las COXs poseen dos actividades diferentes: una de sintasa de endoperóxido que oxigena y produce una estructura en anillo, en el ácido graso precursor para formar endoperóxido cíclico de PGG₁, y una actividad de peroxidasa que transforma la PGG₁ en PGH₁. Las PGG₁ y PGH₁ son muy inestables, por acción enzimática se transforman en PGI, TXA, PGE, PGF y PGD.⁶

2.1.2.2 Las citoquinas.

Las citoquinas representan un grupo multifuncional de sustancias mensajeras que transportan información de una célula a otra, responsable de la inducción de varias enzimas, como por ejemplo el óxido nítrico sintetasa (NOS) y la anteriormente mencionada COX-2. Pertenecen a una familia de proteínas secretadas por las células de inmunidad innata y adaptativa que median muchas de sus funciones. Se ha identificado más de 100 miembros de la familia de citoquinas y sus receptores específicos. Generalmente las citoquinas pueden ser clasificadas como pro o antiinflamatorias dependiendo de la vía en la que participen en la inflamación; por ejemplo, en el grupo de las citoquinas proinflamatorias tenemos la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las IL-6 e IL-8, involucradas en la iniciación y amplificación de los procesos inflamatorios, determinantes fisiopatológicos de la sepsis y el shock séptico; en el endotelio estas citoquinas, favorecen la expresión de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas y adherinas) para monocitos y neutrófilos, permitiendo su posterior migración tisular. En el grupo de las citoquinas antiinflamatorias tenemos la IL-10, el factor-transformador de crecimiento (TGF y el activador natural del receptor de la interleucina 1 (IRA), los cuales modulan negativamente los eventos inflamatorios.⁶

Las citoquinas son producidas tanto por células fijas como por células del sistema circulatorio (mastocitos, macrófagos y neutrófilos). Una citoquina a su vez induce su propia producción y la de otras citoquinas, a través de la activación de algunos factores de transcripción nuclear como son: el factor nuclear kappa B (NF- κ B), el factor activador de proteína-1 (AP-1) y algunas proteínas con actividad quinasa (PK), como proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la proteína quinasa C (PKC), que regulan muchos genes indispensables para el mantenimiento de la inflamación. Un grupo de quimiocinas, como son: IL8, eotaxin, oncogén relacionado con el crecimiento (GRO), el neutrófilo quimioattractor-1 inducido por citoquinas (CINC-1) y el regulador de la activación de expresión y secreción de células T normales (RANTES), con la habilidad de incrementar la llegada de leucocitos al sitio de inflamación vía interacción con receptores acoplados con GTP. Las citoquinas también pueden ser responsables por la inducción de algunos receptores como es el caso del factor activador plaquetario (PAF) y de IL-2 y de moléculas de adhesión como las E-selectinas, e integrinas, la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y la molécula 1 de adhesión de las células vasculares (VCAM-1).⁶

Las citoquinas TNF- α e IL1 constituyen los principales mediadores de respuesta biológica a los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos y otros estímulos infecciosos. Estas citoquinas producen muchas de las mismas reacciones inflamatorias que incluyen inducción de fiebre, sueño y anorexia, movilización y activación de leucocitos polimorfonucleares, inducción de las enzimas COXs y lipooxigenasa, incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular, activación de linfocitos B y T y células asesinas naturales, y estimulación en la producción de otras citoquinas. Por otro lado, estos agentes también pueden contribuir en la fibrosis y degeneración tisular propias de la fase proliferativa crónica de la inflamación, estimulación de la proliferación de fibroblastos, inducción de colagenasa y activación de osteoblastos y osteoclastos. Ambas, TNF- α e IL-1, incrementan la expresión de varios tipos de genes, probablemente o en parte quizá, por medio de activación de factores de transcripción tales como NF- κ B y AP-1. NF- κ B existe en la mayoría de las células como complejos homo y heterodiméricos de p50 y p65 subunidades proteínicas y permanece inactivo en el citoplasma de las células asociado con la proteína inhibidora de NF- κ B (I B). Una vez activado, el NF- κ B puede migrar al núcleo y estimular la transcripción específica de determinados genes mediadores de procesos inflamatorios, respuesta autoinmune, proliferación celular, y apoptosis (genes reguladores de la producción de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular y enzimas proinflamatorias como iNOS y COX-2). NF-B, juega un importante rol en la inflamación, por regulación de los genes involucrados en estos procesos (Gilmore, 2006). Las citoquinas, quimiocinas y sus receptores, así como también algunas proteínas citoplasmáticas como la serina/treonina k (IKK, enzima que fosforila I B y consecuentemente activa NF-B), el sistema enzimático fosfatidil-inositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt, que a su vez activa IKK) y el complejo I B/NF- κ B, están involucrados en la fisiopatología de muchas enfermedades inflamatorias, incluyendo: sepsis, AR, arteriosclerosis, EPOC (en inglés se llama COPD, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) y asma; es por ello, que estas moléculas constituyen un excelente blanco para la búsqueda de fármacos antiinflamatorios.⁶

2.1.2.3 Especies reactivas de nitrógeno (RNS): El óxido nítrico (NO).

Tras conocerse que el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) es el óxido nítrico (escrito NO o simplemente NO), se incrementó el interés por esta molécula. El NO regula numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la neurotransmisión, la contractilidad del músculo liso, la reactividad plaquetaria y la actividad citotóxica de las células inmunes. Por otro lado, se ha encontrado elevados niveles de NO en patologías como artritis reumatoidea, inflamación crónica intestinal, shock séptico, enfermedad de

Alzheimer, enfermedad de Parkinson, isquemia cerebral e infarto del miocardio. Esto proporciona los fundamentos para el diseño de fármacos que modulen selectivamente concentraciones de NO.⁶

El NO es un gas radical libre de fácil difusión, con vida media de 10 a 20 segundos, producido de forma endógena por una gran variedad de células. Es sintetizado en cantidades equimoleculares por una familia de óxido-reductasas conocidas como NOS, a partir del aminoácido L-arginina, NADPH y oxígeno. Se conocen tres isoenzimas de la NOS, una de ellas es inducible (iNOS), también denominada de tipo II (NOS II); es una enzima no dependiente de calcio, la cual puede ser inducida en macrófagos, hepatocitos, neutrófilos y en células de la musculatura lisa y del endotelio vascular, como respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como el interferón gamma, el TNF- α y el LPS bacteriano y ser inhibida por GCs. La isoforma iNOS cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares. El NO puede funcionar como una molécula proinflamatoria, mediante la activación de las enzimas COX y con ello aumentar la producción de las PGs.⁶

Existen otras isoformas de la enzima NOS, la de tipo constitutiva endotelial (eNOS, también conocida como NOS III) y la constitutiva/variable neuronal (nNOS o NOS I). Estas enzimas producen NO en pequeñas cantidades y son las responsables de los niveles normales de este gas en el organismo, entre cuyas funciones resaltamos su participación en diversos procesos de neurotransmisión, la transducción de señales y la relajación del músculo liso vascular y su participación como una sustancia antiinflamatoria a través de varios mecanismos, por ejemplo, el NO puede inhibir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular, lo que impide su entrada al tejido lesionado.⁶

2.1.3 Enfermedades inflamatorias.

Ciertas patologías cursan con procesos inflamatorios tales como: la artritis reumatoidea, el asma, enfermedad inflamatoria intestinal, la EPOC, bronquiectasias (ej. fibrosis quística), tuberculosis, enfermedad inflamatoria pélvica, psoriasis, uretritis, cervicitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, entre otras.⁶

Hoy en día se conoce que una excesiva respuesta proinflamatoria (o deficiente respuesta antiinflamatoria) es importante en un gran número de patologías. Igualmente, una deficiente respuesta proinflamatoria (o

excesiva respuesta antiinflamatoria) podría resultar insuficiente para eliminar organismos patógenos invasores, lo que conduciría igualmente a efectos deletéreos. Un resultado adverso adicional de la respuesta antiinflamatoria es el periodo de relativa inmunosupresión (además conocido como inmunoparálisis o síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria después de un daño).⁶

El prolongado síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria puede ser asociado con una excesiva morbilidad y mortalidad debido al aumento del riesgo para infecciones nosocomiales.⁶

2.2 Tratamientos de inflamación.

Existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios: los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides y los analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorio no esteroideos (AINEs).⁶

2.2.1 Los antiinflamatorios esteroideos.

Los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides son los más potentes antiinflamatorios, actúan sobre la inflamación por diversos caminos, por ejemplo, reducen el número y la activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos que incluyen las IL-3 y 5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eotaxina y la citoquina RANTES (citoquina expresada y secretada en células T normales), entre otras. También reducen la proliferación de linfocitos T, e inducen la apoptosis de los mismos, al disminuir la acción de la IL-2. Disminuyen también la cantidad de monocitos (células presentadoras de antígeno), células dendríticas, mastocitos, y otras células inflamatorias, y por lo tanto inducen una disminución en la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios. Estos efectos son producidos por diversos mecanismos, que incluyen entre otros la síntesis de proteínas con efecto antiinflamatorio y la inhibición de la síntesis de numerosos factores proinflamatorios y de crecimiento. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona, entre otros.⁶

2.2.2. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Los AINEs son un grupo de agentes de estructura química diferente que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la enzima COX. Estas drogas comparten acciones farmacológicas y efectos indeseables semejantes.⁶

Los AINEs son sustancias capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación, algunos también ejercen acciones antipiréticas y analgésicas, pero son sus propiedades antiinflamatorias las que los hacen útiles en el tratamiento de trastornos en los cuales el dolor está relacionado con la intensidad del proceso inflamatorio.⁶

En los últimos años las investigaciones han revelado que los efectos indeseables de los AINEs, tales como la toxicidad gastrointestinal y renal, se debían al menos en parte, a la inhibición de la síntesis de PGs en el estómago o en la médula renal. El hecho de la existencia de las dos isoenzimas de la COX en el organismo podría explicar los efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la COX-2 y los efectos indeseables (como los gastrointestinales y renales), por la inhibición de la COX-1.⁶

2.2.2.1. Mecanismo de acción.

Tener presente el apartado de mecanismo de acción de los AINEs, ayuda a entender y prevenir los posibles riesgos y efectos secundarios. Los AINE tras su absorción y un primer paso hepático se unen fuertemente a la albúmina. Este hecho tiene interés en situaciones de hipoalbuminemia, como en la cirrosis o en artritis crónicas activas, planteando ajustar la dosis por el incremento de mayor concentración de fármaco libre. A dosis equivalentes, la eficacia de los distintos AINE es similar, aunque existe una respuesta individual variable. También el riesgo de posibles efectos secundarios es variable entre los distintos AINE y los propios pacientes. Esta variabilidad incluye aspectos como la absorción, distribución y metabolismo de los fármacos, e incluso en los diversos mecanismos de acción propuestos.⁷

2.2.2.2. Inhibición de la ciclooxigenasa (COX).

Es el mecanismo principal, evitando la producción de prostaglandinas, que actúan como mediadores de la inflamación a nivel periférico y central. Inhiben la prostaglandina-sintetasa, afectando a la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano.⁷ Se conocen 3 formas de la enzima COX: COX-1, COX-2 y COX-3.

a) COX-1. Es una enzima constitutiva que se encuentra en la mayoría de los tejidos. Se encarga de regular procesos como la protección gástrica, agregación plaquetaria, función renal y la homeostasis vascular. Por tanto, su inhibición puede provocar efectos secundarios a estos niveles.

b) COX-2. Esta enzima habitualmente no se detecta en los tejidos y aparece de forma inducida en estados de inflamación. Su expresión se inhibe por todos los AINE y también por los corticoides. En estos casos, los llamados AINE selectivos, al inhibir preferentemente la COX-2, consiguen una acción antiinflamatoria sin los efectos secundarios, especialmente gástricos, al no inhibir la enzima COX-1. Efectos no mediados por prostaglandinas. Hay estudios que resaltan estos efectos, en relación a propiedades fisicoquímicas de los AINE necesarias para la función celular, inhibición de la función de los neutrófilos en la inflamación o la inhibición de mediadores proinflamatorios como el óxido nítrico inducido por citoquinas.⁷

c) COX-3. La enzima COX-3 cuenta dentro de sus propiedades la de ser constitutiva como la COX-1 y no inducida como la COX-2, igualmente su concentración es inversa a la concentración de peróxidos en los tejidos. La COX-3 y las PCOX son sintetizadas a partir del gen que codifica la COX-1, la COX-3 ubicada en el cromosoma 9, diferencia de la COX-1 en la retención de 1 intron en su mRNA. Este cambio estructural hace que la COX-3 se oriente a nivel celular hacia el retículo endoplasmático y la envoltura nuclear; la COX-3 posee capacidad de realizar glicosilación similar a la realizada por la COX-1 y COX-2, es decir, tiene la capacidad de sintetizar PGs a partir del AA.⁸

2.2.3. Compuestos antiinflamatorios de origen natural.

Existen muchos trabajos sobre evaluación de la actividad antiinflamatoria que se han realizado tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Estos estudios se han realizado guiados a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*.⁶

Los productos naturales, también conocidos como metabolitos secundarios, son producto de una serie de reacciones químicas que aparentemente no tienen una función directa en procesos esenciales pero que, sin embargo, se ha demostrado que tienen actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antidiabética, anticancerígena, entre otros. Se pueden agrupar en cuatro clases principales:

- Terpenos, (hormonas, pigmentos o aceites esenciales).
- Compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos).
- Glicósidos (saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos).
- Alcaloides.

2.3. Antiinflamatorios comerciales.

Los antiinflamatorios no esteroideos son un grupo variado y químicamente heterogéneos de fármacos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, por lo que reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente. Todos ejercen sus efectos por acción de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Los antiinflamatorios naturales, segregados por el propio organismo, son los derivados de los corticoides, sustancias de origen esteroideo de potente acción antiinflamatoria, pero que cursan con importantes efectos secundarios. En oposición a los corticoides, el término "no esteroideo" se aplica a los AINE para recalcar su estructura química no esteroidea y la menor cantidad de efectos secundarios. Como analgésicos se caracterizan por no pertenecer a la clase de los narcóticos y actuar bloqueando la síntesis de prostaglandinas.⁹

Los antiinflamatorios no esteroideos disponibles en el mercado inhiben la actividad tanto de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) como a la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y, por lo tanto, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.

El AINE prototipo es la aspirina y le acompañan una gran variedad de ácidos orgánicos, incluyendo derivados del ácido propílico (como el ibuprofeno y naproxen), derivados del ácido acético (como la indometacina) y ácidos enólicos (como la piroxicam), todos competidores con el ácido araquidónico por el sitio activo de la ciclooxigenasa.⁹ Los AINEs se pueden agrupar en varias clases químicas:¹⁰

Salicilatos	Ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, diflunisal, salicilato de sodio.
Ácidos acéticos	Ketorolaco, indometacina, tolmetina, nabumetona, sulindaco, etodolaco
Ácidos fenilacéticos	Diclofenaco, * Lumiracoxib
Ácidos propiónicos	Flubiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, naproxeno, ibuprofeno
Ácidos fenámicos	Meclofenamato
Sulfonamidas	* Celecoxib , * valdecoxib ,
Sulfonas	* Rofecoxib , * etoricoxib
Ácidos enólicos	Piroxicam, meloxicam
Otros	Paracetamol ¹⁰

*Inhibidores selectivos COX-2

2.3.1. Diclofenaco sódico.

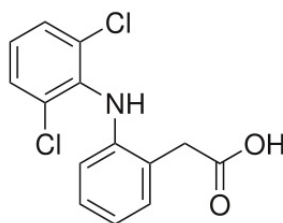


Figura 4. Estructura de Diclofenaco sódico.¹¹

2.3.1.1. Presentación farmacéutica.

Voltaren 24 H®. Parche transdérmico.

Forma farmacéutica y formulación: Cada parche contiene 15 mg (7 x 10 cm) o 30 mg (14 x 10 cm).

Indicaciones terapéuticas: **Analgésico y antiinflamatorio de uso tópico:** VOLTAREN® 24 H alivia el dolor en los casos de inflamación traumática o reumática ocasionada por golpes, torceduras y esguinces, dolores musculares, dolor reumático, inflamación de tendones y ligamentos. Formas localizadas de reumatismo en tejidos blandos como tendinitis (por ejemplo, codo de tenista). También es utilizado para el alivio del dolor asociado con artrosis leve de la rodilla.

2.3.1.2 Farmacocinética y farmacodinamia.

2.3.1.2.1 Farmacocinética.

Absorción y distribución: La cantidad de diclofenaco absorbida sistemáticamente del parche de VOLTAREN® 24 H es similar a la absorbida cuando se aplica una cantidad equivalente de VOLTAREN® Emulgel 99.7 % del diclofenaco está unido a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina (99.4 %).

Metabolismo: La biotransformación del diclofenaco involucra parcialmente la glucoronidación de la molécula intacta, pero especialmente hidroxilaciones simples y múltiples lo que resulta en abundantes metabolitos fenólicos, muchos de los cuales son convertidos a glucoronidos conjugados.

Dos de los metabolitos fenólicos son biológicamente activos, aunque en mucho menor grado que el diclofenaco.

Eliminación: La aclaramiento sistémica total del diclofenaco a partir del plasma es de 263 ± 56 ml/min. La vida media plasmática terminal es de 1-2 horas. Cuatro de los metabolitos, incluyendo los dos metabolitos activos, también tiene una vida media plasmática corta de 1-3 horas. Un metabolito el 3'-hidroxi-4'-metoxi-diclofenaco, tiene una vida media más larga, pero es virtualmente inactivo. El diclofenaco y sus metabolitos son excretados principalmente en la orina.

Características en los pacientes: No se espera una acumulación de diclofenaco o sus metabolitos en pacientes con falla renal. En pacientes con hepatitis crónica o con cirrosis no descompensada la cinética y el metabolismo del diclofenaco o sus metabolitos es el mismo que en pacientes sin enfermedad hepática.

2.3.1.2.2 Farmacodinamia.

Productos tópicos para las articulaciones y el dolor muscular. Preparaciones antiinflamatorias no esteroideas para uso tópico. El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo con amplias propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. Su mecanismo de acción primordial es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

El parche de VOLTAREN® 24 H es un parche de matriz que contiene la sustancia activa antiinflamatoria y analgésica, diclofenaco. El parche tópico está diseñado para tener una acción analgésica y antiinflamatoria local en el sitio de aplicación.¹²

Como se ha visto, existe una gran variedad de antiinflamatorios comerciales que tienen también actividad analgésica y antipirética, este grupo de antiinflamatorios pertenece a los AINES los cuales tienen el mismo mecanismo de acción (inhibición de la ciclooxigenasa 1 y la ciclooxigenasa 2). Estos antiinflamatorios pueden ser administrados de diferentes formas, una de ellas puede ser por administración tópica. Estos antiinflamatorios tópicos han dado un campo de investigación para poder administrar aquellos compuestos que no se pueden administrar vía oral, así como también lograr que tenga una acción sistémica y no solo local.

2.4 Fármacos tópicos antiinflamatorios.

Conceptualmente parece razonable dudar de que un fármaco de este tipo aplicado sobre la piel en la cercanía de un proceso inflamatorio pueda penetrar hasta alcanzar concentraciones terapéuticas en el área a tratar, y existen pocos estudios clínicos comparativos entre diferentes principios activos y formulaciones concretas. Los efectos secundarios producidos por los antiinflamatorios tópicos suelen ser poco frecuentes y generalmente revierten al dejar la medicación.¹³

Los antiinflamatorios tópicos son especialmente eficaces en patología que afectan a músculos, tendones y ligamentos. Su uso también permite, en muchos casos, evitar la toma prolongada de un fármaco antiinflamatorio por vía oral y disminuir por tanto los riesgos de efectos secundarios bien conocidos y frecuentes, como son las alteraciones gastrointestinales. Al alcanzar niveles plasmáticos muy bajos, se minimizan los efectos sistémicos y las interacciones con otros tratamientos. Estas moléculas asocian a su acción antiinflamatoria un efecto analgésico. Aunque ambas acciones están habitualmente presentes, la relación de potencia entre ambas puede variar bastante de una molécula a otra. Podemos encontrarlos comercializados bajo distintas formas farmacéuticas que van desde las cremas, pomadas y geles (que son las presentaciones más comunes) a spray, rool-on, linimentos e incluso parches adhesivos.¹³

La eficacia por vía tópica de cada principio activo en concreto no dependerá exclusivamente de su potencia farmacológica intrínseca sino también de su capacidad para ser absorbido y alcanzar la lesión. Es muy importante, por tanto, una adecuada formulación galénica. Los principios activos más utilizados son los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como el diclofenaco sódico (con marcas como Voltadol, Voltaren, Dolotren, etc., y genéricos, entre los que el más vendido es el de Kern), el etofenamato (Flogoprofen, Zenavan, entre otros), el ketoprofeno (Fastum, entre otros), dexketoprofeno (Enangel, entre otros), el ibuprofeno, entre otros. Sin olvidar formulaciones analgésico-antiinflamatorias clásicas a base de sustancias como el alcanfor y los salicilatos (de metilo, de dietilamina, entre otros). También se clasifican en este grupo los productos tópicos formulados a base de capsaicina, una oleorresina que es componente activo de varias especies de plantas del género *Capsicum*. Su acción radica en su capacidad para inhibir la liberación, en las terminaciones centrales y periféricas de las fibras tipo C, del neuropéptido sustancia P, principal neurotransmisor de ciertos estímulos dolorosos. Como consecuencia, disminuye la actividad de las neuronas sensitivas y bloquea la transmisión del dolor, especialmente del

dolor crónico y activos y formulaciones concretas, pero la práctica médica habitual y su uso durante décadas permiten defender su utilidad terapéutica.¹³

Los efectos secundarios que pueden presentar los antiinflamatorios que se administran vía tópica son pocos y los que se llegan a presentar pueden eliminarse en cuanto se suspende el tratamiento. Para estos antiinflamatorios se debe tener una formulación que sea adecuada para poder ser administrado, ya que el fármaco debe de atravesar las capas de la piel para poder llevar a cabo la acción, por lo tanto, es importante conocer la fisiología de la piel.

2.5 Piel.

La piel es un órgano indispensable para la vida animal. Consta de tres capas bien diferenciadas: epidermis, dermis e hipodermis, cada una de las cuales desempeñan una serie de funciones, interrelacionándose entre sí.¹⁴

No es uniforme en toda su superficie, existiendo variaciones topográficas debidas a sus diferentes funciones. La piel es un órgano que presenta una amplia variedad de funciones, incluyendo la protectora, la termorreguladora, la sensitiva, la secretora, la inmunológica, la producción de vitamina D y la excretora.¹⁴

2.5.1 Epidermis.

La epidermis es un epitelio plano poliestratificado y queratinizado que cubre la totalidad de la superficie corporal. Es la capa de la piel con mayor número de células y con una dinámica de recambio extraordinariamente grande. Presenta un espesor variable, con un valor medio de 0,1 mm., pudiendo alcanzar en zonas como las plantas de los pies y las palmas de las manos espesores de hasta 1 o 2 mm. Está normalmente compuesta por cuatro capas diferentes que desde el exterior hacia el interior serían:

- Capa córnea (stratum corneum).
- Capa granular (stratum granulosum).
- Capa de células espinosas (stratum spinosum).
- Capa basal (stratum basale).
- Capa lúcida (stratum lucidum).

El estrato córneo está considerado la barrera que separa el organismo del medio externo, se comporta como una barrera semipermeable en la penetración de sustancias, por eso, constituye la principal barrera en la absorción percutánea de fármacos.¹⁵

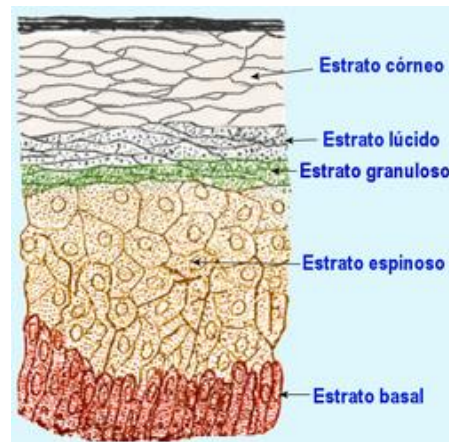


Figura 5. Componentes de la epidermis.¹⁵

La epidermis tiene cinco capas.

a) Las **capas de células espinosas y basales** están formadas por células vivas que continuamente se reproducen por división mitótica. Estas células ocuparán el espacio de las células erosionadas en la capa córnea y se les llama conjuntamente la capa germinativa.

b) Las otras tres capas constituyen la **capa córnea** y comprenden ya a células muertas. En la **capa granulosa**, las células sintetizan la queratohialina, la sustancia precursora de la queratina, la cual se acumula en gránulos en el citoplasma dando esta característica la denominación a esta capa. La **capa lúcida**, que se encuentra normalmente en la parte gruesa de la piel de las palmas de las manos y plantas de los pies, no existe en la piel delgada. Consiste entre tres y cinco filas de células muertas, claras y planas que contienen aún actividad enzimática. El estrato córneo está formado por células aplanadas y restos de células situadas unas sobre otras en forma de tejas y fuertemente empaquetadas, que han perdido núcleo y orgánulos citoplasmáticos quedando compuestas casi exclusivamente por filamentos de queratina agrupados en haces denominados monofilamentos. Está formado por 15 a 20 estratos celulares, de los cuales el último se va perdiendo por descamación. Este proceso de continuo desgaste y reemplazo renueva la totalidad de la capa epidérmica en un periodo aproximado de 30 días, desde que se produce la división celular hasta que la célula cae desprendida de la superficie de la piel.¹⁵

2.5.2. Dermis.

La dermis es la estructura de soporte de la piel y le proporciona resistencia y elasticidad. Está formada básicamente de tejido conectivo fibroelástico. La matriz extracelular contiene una elevada proporción de fibras, no muy compactadas, de colágeno (>75%), elastina y reticulina. Es un tejido vascularizado que sirve de soporte y alimento a la epidermis. Constituye la mayor masa de la piel y su grosor máximo es de unos 5 mm. Histológicamente, se divide en dos capas, que desde el exterior al interior son:

- La capa papilar (*stratum papillare*).
- La capa reticular (*stratum reticulare*).

La capa papilar recibe ese nombre por la presencia de proyecciones hacia el interior de la epidermis, estas proyecciones se denominan papilas dérmicas y se alternan con los procesos interpapilares de la epidermis. En las papilas se encuentran las asas capilares (sistema circulatorio) que proporcionan los nutrientes a la epidermis avascular. La capa papilar también contiene numerosas terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos.

La capa reticular es más gruesa que la papilar, y recibe ese nombre por el entramado o retícula de las fibras colágenas que forman gruesos haces entrelazados con haces de fibras elásticas. Esta estructura es la que proporciona elasticidad y capacidad de adaptación a movimientos y cambios de volumen.¹⁵

2.5.3 Hipodermis.

La hipodermis, llamada también panículo adiposo o tejido celular subcutáneo, está constituido por células grasas, que se conocen con el nombre de adipocitos, los cuales se disponen en lóbulos separados por tejido conectivo llamados septos o tabiques interlobulillares. El complejo pilosebáceo está formado por: complejo pilosebáceo, glándulas sudoríparas y uñas. Las glándulas sudoríparas se dividen en: folículo piloso, glándula sebácea y músculo erector del pelo.

El folículo piloso está constituido por tres segmentos: superior o infundíbulo, medio o istmo e inferior o bulbo piloso. El infundíbulo comprende desde la desembocadura del conducto sebáceo hasta el orificio folicular y se queratiniza por intermedio de gránulos queratohialinos. El istmo comprende desde la desembocadura del conducto sebáceo hasta la inserción del músculo erector del pelo, es la porción más corta del folículo. El extremo inferior o parte inferior o bulbo va desde la inserción del músculo erector

hasta el bulbo piloso, constituye la parte más compleja del folículo piloso, ya que está formada por varias estructuras: papila dérmica, matriz del pelo, pelo propiamente dicho y vainas radiculares.¹⁶

La papila dérmica (papila capilar dérmica) es la responsable del crecimiento del pelo y es rica en mucopolisacáridos ácidos. La matriz capilar da origen al pelo propiamente dicho y a la vaina radicular interna. Las células que forman la matriz son de citoplasma muy basófilo y entre ellas están distribuidos los melanocitos que dan el color al pelo. El pelo propiamente dicho está formado de dentro hacia fuera por médula, corteza y cutícula. La médula capilar sufre queratinización gradual por pérdida de los núcleos y de esta manera se produce queratina dura. La cutícula capilar situada por fuera de la corteza. Las vainas radiculares son dos: interna y externa, la interna está constituida por tres hojas: cutícula, capa de Huxley y capa de Henle. Todas estas capas se queratinizan por medio de gránulos trichialinos, los cuales son escasos en la cutícula, pero numerosos en la de Huxley y Henle. La vaina radicular interna se desintegra al llegar al istmo. La vaina radicular externa se extiende desde la base del bulbo piloso hasta la desembocadura del conducto sebáceo, donde constituye la epidermis superficial que tapiza el infundíbulo. Las células que la constituyen son de citoplasma claro por tener grandes cantidades de glucógeno.¹⁶

Los fármacos que se logran formular adecuadamente para que puedan penetrar la piel y lograr pasar las barreras que está misma tiene, y así obtener la acción deseada; deben de pasar por una serie de estudios y análisis, dentro de los cuales se emplean métodos *in vivo* e *in vitro*. Pero en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos se está empleando el método *in silico*, el cual ha sido una buena herramienta para poder predecir el comportamiento del fármaco dentro del cuerpo humano y de cómo va a interactuar con las diversas estructuras internas.

2.6 Los modelos *in silico* una herramienta para el conocimiento farmacológico.

La modelización de los fenómenos naturales no es una práctica que se inició en los últimos años. Sin embargo, con el avance de la tecnología, la posibilidad de modelizar los fenómenos naturales se ha hecho cada vez más común, debido a la velocidad a la que se pueden resolver los modelos con la ayuda de las ciencias informáticas. La interrelación de las ciencias biológicas con las ciencias de la computación y la ingeniería han permitido construir y resolver modelos matemáticos que permiten llevar a una computadora un determinado fenómeno.¹⁷

Los experimentos *in silico* son novedosos, ya que incorporan la computadora y los softwares de simulación, pero no son novedosos en la ciencia. El avance de los modelos *in silico* ha sido importante y ya hay quienes plantean el reemplazo de experimentos con animales por experimentos en simuladores. En muchas áreas de la ciencia se ha planteado la duda sobre los modelos *in vivo* o *in vitro*.

En cambio, el uso de algoritmos adecuados puede conducir a resultados fiables en mucho menos tiempo. La utilización de modelos Q(SAR) (*quantitative structure activity relationship*) y Q(STR) (*quantitative structure properties relationships*) para relacionar la estructura de una sustancia con su actividad o la estructura con sus propiedades es prometedor. Si bien estos modelos tienen deficiencias, la utilización combinada de más de un software dentro de estas metodologías puede aportar resultados más fiables que los experimentos *in vivo* o *in vitro*. Los beneficios de la combinación de modelos son evidentes en innumerables trabajos de la farmacodinamia y farmacocinética.¹⁷

Dentro de las herramientas que podemos utilizar para emplear los modelos *in silico* se encuentran los siguientes programas:

- a) *Molinspiration*. Ofrece una amplia gama de herramientas de software de quimioinformática.
- b) *SwissTargetPrediction*. Permite estimar los objetivos macromoleculares más probables de una molécula pequeña, asumida como bioactiva.
- c) *PASS Online*. predice más de 4000 tipos de actividad biológica, incluidos efectos farmacológicos, mecanismos de acción, efectos tóxicos y adversos, interacción con enzimas y transportadores metabólicos, influencia en la expresión génica, etc.

2.6.1 Acoplamiento molecular entre ligando y receptor.

El acoplamiento (*docking*) molecular es un método computacional que busca formas de unión entre ligandos potenciales (un fármaco) y un blanco macromolecular (normalmente células, proteínas o procesos químicos), cuya estructura es conocida experimentalmente. Particularmente, el acoplamiento molecular se aplica para encontrar la orientación y posición de un ligando en el sitio activo de su blanco macromolecular, sin conocer el resultado final, es decir, la conformación tridimensional de la unión ligando-receptor. Esta última es normalmente estudiada por la cristalografía de rayos X, o analizando los complejos de energía de la resonancia magnética nuclear.

El objetivo de la técnica consiste en encontrar la unión más probable entre el ligando y el receptor, es decir, la que menos energía requiera (a menor energía, más fuerte la unión) así como el sitio idóneo de unión molecular. Es evidente que, al conocer esta respuesta, el investigador está en posición de llevarla a la experimentación *in vivo* y así corroborar sus resultados obtenidos *in silico*.

Esta forma de trabajo experimental ha resultado de gran valía para entender de qué manera los fármacos que utilizamos diariamente alcanzan su objetivo dentro de nuestro cuerpo, y también facilita el desarrollo de nuevos fármacos con características bien definidas o con objetivos seleccionados previamente.¹⁸

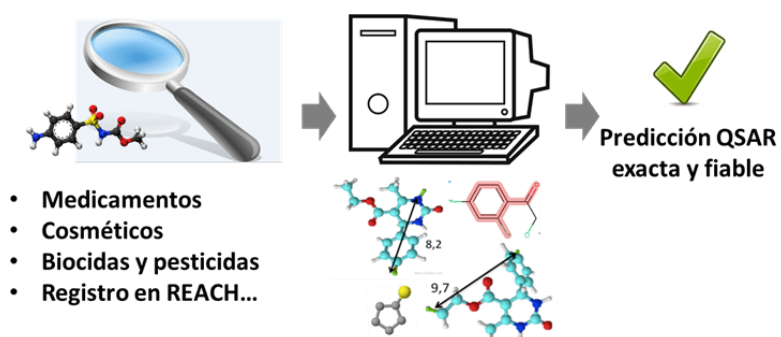


Figura 6. Herramientas de software de quimioinformática.¹⁹

En cualquier esfuerzo por descubrir, desarrollar o reutilizar moléculas bioactivas, se ha vuelto clave identificar las proteínas objetivo. Hoy en día, se puede proporcionar un apoyo eficiente mediante enfoques bio / quimioinformáticos establecidos para estimar los objetivos más probables de moléculas pequeñas. Estos métodos de predicción de objetivos (también denominados pesca de objetivos) pueden clasificarse en una de las dos categorías tradicionales de diseño molecular asistido por ordenador, es decir, haciendo uso de la estructura tridimensional de la proteína (basada en la estructura) o no (basada en ligandos).²⁰

Existen algunas herramientas que pueden ayudar en el estudio *in silico* que a continuación se mencionan.

2.6.1.1 Molinspiration.

Molinspiration ofrece una amplia gama de herramientas de software de quimioinformática que respaldan la manipulación y el procesamiento de moléculas, incluida la conversión de SMILES y SDFfile, normalización de moléculas, generación de tautómeros, fragmentación de moléculas, cálculo de varias

propiedades moleculares necesarias en QSAR, modelado molecular y diseño de fármacos, representación de moléculas de alta calidad, herramientas de bases de datos moleculares que admiten búsquedas de subestructura y similitudes. Nuestros productos también son compatibles con el cribado virtual basado en fragmentos, la predicción de bioactividad y la visualización de datos. Las herramientas de *Molinspiration* están escritas en Java, por lo que se pueden utilizar prácticamente en cualquier plataforma informática.²¹

El **área de superficie polar molecular (PSA)** es un parámetro muy útil para la predicción de las propiedades de transporte de fármacos. El área de la superficie polar se define como la suma de las superficies de los átomos polares (generalmente oxígenos, nitrógenos e hidrógenos unidos) en una molécula. Se ha demostrado que este parámetro se correlaciona muy bien con la absorción intestinal humana, la permeabilidad de las monocapas de Caco-2 y la penetración de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, el cálculo de PSA de forma clásica lleva bastante tiempo, debido a la necesidad de generar una geometría molecular 3D razonable y determinar la superficie en sí. Además, los cálculos requieren un software especializado para generar las estructuras moleculares en 3D y determinar la superficie. En la era actual de desarrollo de fármacos moldeado por el cribado de alto rendimiento y la química combinatoria, se requiere un cribado rápido de biodisponibilidad de bibliotecas virtuales que constan de cientos de miles, incluso millones de moléculas. Esa es la razón por la que en nuestro kit de herramientas de predicción de propiedades moleculares se implementa el llamado área de superficie polar topológica - TPSA.²¹

El **coeficiente de partición octanol-agua logP** se utiliza en estudios QSAR y en el diseño racional de fármacos como medida de hidrofobicidad molecular. La hidrofobicidad afecta la absorción de fármacos, la biodisponibilidad, las interacciones hidrofóbicas fármaco-receptor, el metabolismo de las moléculas, así como su toxicidad. LogP se ha convertido también en un parámetro clave en los estudios del destino ambiental de los productos químicos. El método para la predicción de logP desarrollado en *Molinspiration* (miLogP2.2 - noviembre de 2005) se basa en contribuciones de grupo. Estos se han obtenido ajustando logP calculado con logP experimental para un conjunto de entrenamiento de más de doce mil, en su mayoría moléculas similares a fármacos. De esta manera se han obtenido valores de hidrofobicidad para 35 pequeños fragmentos "básicos" simples, así como valores para 185 fragmentos más grandes, caracterizando la contribución del enlace de hidrógeno intramolecular a logP e

interacciones de carga. La metodología de molinspiración para el cálculo de logP es muy robusta y es capaz de procesar prácticamente todas las moléculas orgánicas y la mayoría de las moléculas organometálicas. Para el 50,5% de las moléculas, se predice logP con un error $<0,25$, para el 80,2% con un error $<0,5$ y para el 96,5% con un error $<1,0$. Solo para el 3,5% de las estructuras se predice logP con un error $>1,0$. Los parámetros estadísticos enumerados anteriormente clasifican a Molinspiration miLogP como uno de los mejores métodos disponibles para la predicción de logP.²¹

El **volumen molecular** determina las características de transporte de las moléculas, como la absorción intestinal o la penetración de la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, el volumen se usa a menudo en estudios QSAR para modelar propiedades moleculares y actividad biológica. Se pueden utilizar varios métodos para calcular el volumen molecular, incluidos los métodos que requieren la generación de geometrías moleculares 3D, o métodos de contribución de fragmentos como la aproximación de volumen de McGowan. El método para calcular el volumen de moléculas desarrollado en Molinspiration se basa en contribuciones de grupo. Estos se han obtenido ajustando la suma de las contribuciones de los fragmentos al volumen 3D "real" para un conjunto de entrenamiento de aproximadamente doce mil, en su mayoría moléculas similares a fármacos. Las geometrías moleculares 3D para un conjunto de entrenamiento se optimizaron completamente mediante el método semiempírico AM1. El volumen calculado se expresa en Angstroems cúbicos (\AA^3).²¹

The image shows a collage of screenshots from the Molinspiration website. On the left, a navigation menu lists: Molinspiration Products and Services, Calculation of Molecular Properties and Prediction of Bioactivity, Galaxy 3D Structure Generator, Molecular Database - Substructure and Similarity Search, Molinspiration Publications, Molinspiration FAQ, and About Molinspiration. The central logo reads 'molinspiration cheminformatics'. Below the logo are several promotional boxes:

- Molinspiration Cheminformatics Software:** Describes the range of tools for molecule manipulation, SMILES/SDfile conversion, normalization, and property calculation (logP, PSA, etc.).
- Free Web Tools for Cheminformatics Community:** Promotes online services for property calculation and target prediction.
- More than 4500 Citations in Scientific Papers!** Highlights the software's use in industry and academia.
- Molinspiration now also on Touch Devices:** Shows the software running on a smartphone and tablet.
- Molinspiration Molecule Viewer:** Shows a grid of molecular structures and their 2D representations.

Figura 7. Molinspiration cheminformatics.²¹

2.6.1.2. *SwissTargetPrediction*.

La predicción de objetivos basada en ligandos ha demostrado ser muy eficaz y rápida en la predicción de objetivos proteicos correctos de compuestos en contextos de descubrimiento de fármacos. La cuantificación de la similitud entre compuestos por diferentes medios permitió validar la intuitiva 'hipótesis de similitud molecular' que postula proteínas comunes dirigidas por moléculas similares.²⁰

SwissTargetPrediction es una herramienta basada en la web, en línea desde 2014, para realizar la predicción de objetivos basada en ligandos para cualquier molécula pequeña bioactiva. La interfaz gráfica fácil de usar protege a los no expertos de las trampas metodológicas y a los especialistas de los tediosos esfuerzos técnicos. Esto permite que cualquiera pueda realizar una selección inversa de bibliotecas químicas previamente preparadas con cuidado.²⁰

El motor único detrás de *SwissTargetPrediction*, ampliamente detallado en otro lugar, calcula la similitud entre los compuestos de consulta del usuario y los compilados en colecciones seleccionadas y depuradas de activos conocidos en ensayos de unión experimentales bien definidos. La cuantificación de la similitud es doble. En ambos casos, consiste en calcular una comparación por pares de vectores 1D que describen estructuras moleculares: la medida 2D utiliza el índice de Tanimoto entre huellas digitales binarias basadas en trayectorias (FP2), mientras que la medida 3D se basa en una distancia de Manhattan. cantidad de similitud entre Electroshape 5D (ES5D) vectores flotantes.²⁰

El modelo *SwissTargetPrediction* se entrenó ajustando una regresión logística múltiple en varios subconjuntos relacionados con el tamaño de activos conocidos para ponderar los parámetros de similitud 2D y 3D en una denominada puntuación combinada. Una puntuación combinada superior a 0,5 predice que es probable que las moléculas compartan un objetivo proteico común. En el cribado inverso, la puntuación combinada permite calcular para cualquier molécula de consulta, asumida como bioactiva, la probabilidad de apuntar a una proteína determinada.²⁰

Swiss Institute of Bioinformatics | Hogar | Preguntas más frecuentes | Ayuda | Descargar | Contacto | Descargo de responsabilidad | old.swisstargetprediction.ch

Este sitio web le permite estimar los objetivos macromoleculares más probables de una molécula pequeña, asumida como bioactiva. La predicción se basa en una combinación de similitud 2D y 3D con una biblioteca de 370.000 activos conocidos en más de 3000 proteínas de tres especies diferentes.

La herramienta web se describe en detalle aquí: SwissTargetPrediction: datos actualizados y nuevas características para la predicción eficiente de objetivos proteicos de moléculas pequeñas, *Nucl. Acids Res.* (2019). Para obtener información técnica sobre el algoritmo de predicción, puede consultar: Dar forma al panorama de interacción de moléculas bioactivas, *Bioinformática* (2013) 29: 3073-3079.

Seleccione una especie

- Homo sapiens
- Mus musculus
- Rattus norvegicus

Pega una SONRISA en este cuadro o dibuja una molécula

Ejemplos:

(Proporcione una SONRISA antes de enviar)

Marvin JS
by ChemAxon

Figura 8. *SwissTargetPrediction*.²²

2.6.1.3. PASS Online.

El espectro de actividad biológica de un compuesto químico es el conjunto de diferentes tipos de actividad biológica que reflejan los resultados de la interacción del compuesto con diversas entidades biológicas. La actividad biológica se define cualitativamente ("sí" / "ninguna") sugiriendo que el espectro de actividad biológica representa la propiedad "intrínseca" de una sustancia dependiendo únicamente de su estructura y características fisicoquímicas. Aunque esto puede ser una generalización, brinda la posibilidad de combinar información de muchas fuentes diferentes en el mismo conjunto de entrenamiento, lo cual es necesario porque ninguna publicación en particular cubre de manera integral todas las diversas facetas de la acción biológica de un compuesto.²³

PASS (Predicción de espectros de actividad para sustancias) es un producto de software diseñado como una herramienta para evaluar el potencial biológico general de una molécula orgánica parecida a un fármaco. *PASS* proporciona predicciones simultáneas de muchos tipos de actividad biológica basadas en la estructura de compuestos orgánicos. Por lo tanto, *PASS* se puede utilizar para estimar los perfiles de actividad biológica de moléculas virtuales, antes de su síntesis química y prueba biológica.

Pa (probabilidad de "ser activo") estima la probabilidad de que el compuesto estudiado pertenezca a la subclase de compuestos activos (se asemeja a las estructuras de las moléculas, que son las más típicas en un subconjunto de "activos" en el entrenamiento *PASS* colocar).

Pi (probabilidad "de estar inactivo") estima la probabilidad de que el compuesto estudiado pertenezca a la subclase de compuestos inactivos (se asemeja a las estructuras de las moléculas, que son las más típicas en un subconjunto de "inactivos" en el entrenamiento *PASS* colocar).

IEP (Invariant Error of Prediction) es el error promedio de predicción que se obtiene para todo el conjunto de entrenamiento *PASS* en el procedimiento de validación cruzada de dejar uno fuera.²³

El procedimiento de validación cruzada de exclusión (LOO CV) se realiza utilizando todo el conjunto de entrenamiento *PASS* para la validación de la calidad de la predicción. El espectro de actividad biológica se predice para cada compuesto usando las relaciones estructura-actividad calculadas a partir de los datos para todos los demás compuestos. El resultado de la predicción se compara con datos experimentales conocidos para el compuesto estudiado. El procedimiento se repite para todos los compuestos del conjunto de entrenamiento *PASS*; a continuación, se calculan los valores medios de precisión invariable de predicción ($IAP = 1 - IEP$) para cada actividad biológica y para todas las actividades biológicas.²³

La solidez del algoritmo *PASS* significa que *PASS* proporciona estimaciones razonables de las relaciones estructura-actividad a pesar de que el conjunto de entrenamiento *PASS* está incompleto (o algunos errores en los datos).

MOLfile es un formato de archivo creado por MDL (más tarde Symyx, ahora Accelrys), para contener información sobre los átomos, enlaces, conectividad y coordenadas de una molécula. El archivo MOL consta de información de encabezado, la tabla de conexión (CT) que contiene información sobre el átomo, luego las conexiones y tipos de enlaces, seguidos de secciones para obtener información más compleja.

SDfile pertenece a una familia de formatos de archivo de datos químicos desarrollados por MDL; está destinado especialmente a información estructural. "SDF" significa archivo de datos de estructura, y los

archivos SDF realmente envuelven el formato MOLfile. Los compuestos múltiples están delimitados por líneas que constan de cuatro signos de dólar (\$\$\$\$). Una característica del formato SDF es su capacidad para incluir datos asociados.²³

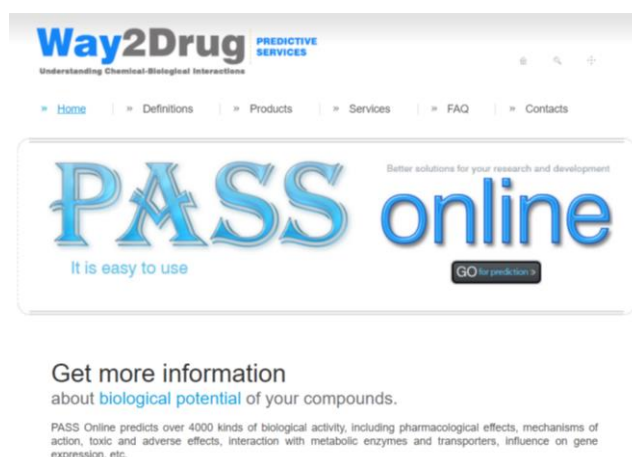


Figura 9. PASS Online.²³

Los modelos *in silico* son de gran ayuda ya que permiten avances en la ciencia y los cuales no generan grandes gastos. Y se pueden utilizar varios modelos simultáneamente para obtener mejores resultados. Estos modelos *in silico* se pueden apoyar en lo que es el diseño molecular de fármacos ya que a partir de una cabeza de serie con acción farmacológica se puede realizar modificaciones en la estructura del compuesto y antes de llevar a cabo los ensayos *in vivo* y/o *in vitro* se pueden realizar los estudios *in silico*.

2.7 Diseño molecular de fármacos.

2.7.1 Estrategias generales de farmacomodulación.

La llamada *modificación molecular* o *farmacomodulación* que, aun siendo un método en gran parte empírico, presenta una serie de ventajas que lo han hecho popular. La primera de ellas, inherente a la propia farmacomodulación, es la mayor probabilidad de mejorar las propiedades farmacológicas en los congéneres del cabeza de serie, habida cuenta de la estrecha relación estructural entre los compuestos resultantes. Por otra parte, en la mayoría de los casos es posible obtener compuestos más simples que mantengan o mejoren la actividad del cabeza de serie y para los que puedan emplearse rutas sintéticas comunes, o aproximaciones combinatorias de las mismas, con el consiguiente ahorro de tiempo y dinero. Por otra parte, el empleo de un mismo método de valoración farmacológica o bioquímica para toda la

serie de compuestos presente también un incuestionable interés, tanto económico como científico, ya que permite una mejor comparación de las actividades y posibilita el establecimiento de relaciones estructura-actividad más fiables.³

2.7.2 Finalidad de la farmacomodulación.

La farmacomodulación suele explorar las propiedades de una cabeza de serie en relación a los siguientes aspectos:

- a) Estudio preliminar de las relaciones estructura-actividad.
- b) Modificación del espectro de acción.
- c) Modificación de la farmacocinética.
- d) Modificación de la distribución.
- e) Aumento de la estabilidad química.
- f) Desarrollo de sustitutos y copias terapéuticas.

2.7.2.1 Estudio preliminar de las relaciones estructura-actividad.

Mediante modificaciones estructurales de la cabeza de serie o prototipo, pueden obtenerse series de fármacos que permitan la gradación de algunas de sus propiedades farmacológicas. Del estudio de dichas series, podrán establecerse criterios para la determinación de las características estructurales más idóneas para una determinada acción.

2.7.2.2 Modificación del espectro de acción.

Se entiende por “espectro de acción” el conjunto de acciones, con sus respectivas potencias, que presentan un determinado compuesto. La farmacomodulación puede ser útil tanto para potenciar la acción principal como para potenciar o enmascarar determinados efectos secundarios.

2.7.2.3 Modificación de la farmacocinética.

Fundamentalmente, se pretende modificar la distribución plasmática del fármaco sin afectar sustancialmente su espectro de acción. Así, es posible modificar la relación dosis-efecto de un modelo mediante modificaciones estructurales que alteran la velocidad de metabolismo y/o de excreción.

2.7.2.4 Modificación de la distribución.

En muchos casos la modificación molecular tiene como objeto la modulación de la distribución del fármaco entre los diferentes tejidos y órganos para conseguir una localización preferente en aquellos en que deba producirse la acción.

Un método alternativo para modificar la distribución de un fármaco consiste en el empleo de *grupos transportadores*. Un grupo transportador es un fragmento que se une por enlace covalente con el fármaco y que permite la distribución de este a través de mecanismos de transporte selectivos que son propios del grupo transportador.³

Una estrategia más sofisticada consiste en la utilización de los mecanismos de pinocitosis por los que muchas proteínas penetran en la célula. Idealmente, la unión del fármaco a una de esas proteínas daría lugar a la formación de vesículas intracelulares que, por un proceso de hidrólisis lisosomal, liberaría el fármaco en el interior de la célula.

El control de la distribución de un fármaco puede llevarse a cabo por aplicación de técnicas biofísicas. Son ejemplos de ello el empleo de formas encapsuladas en *liposomas* y *nanopartículas* (nanoesferas y nanocápsulas), así como de *implantes* en los que el fármaco se une a un soporte polimérico que sirve de transportador o reserva.³

2.7.2.5 Aumento de la estabilidad química.

En muchos casos resulta necesario dotar al fármaco prototipo de una mayor estabilidad química, fundamentalmente frente al medio ácido, de modo que sea posible su administración por vía oral.

2.7.2.6 Desarrollo de sustitutos y copias terapéuticas.

La necesidad de mantener la primacía tanto en la patentabilidad como en la comercialización dentro de un determinado campo terapéutico, suele conducir a las compañías farmacéuticas al desarrollo de sustitutos de alguno de sus fármacos ya consolidados.³

2.7.3 Técnicas de farmacomodulación.

Antes de considerar las diferentes posibilidades de farmacomodulación, la primera decisión al respecto se basa en la elección de los criterios a seguir. Así, en la función de la complejidad estructural de la cabeza de serie y de su tamaño, puede resultar más conveniente su simplificación (aproximación disyuntiva), la conservación de un grado de complejidad semejante (aproximación modulativa) o bien la introducción de elementos estructurales adicionales (aproximación conjuntiva).

2.7.3.1 Aproximación disyuntiva.

Las aproximaciones disyuntivas se basan en la reducción de la estructura del modelo hasta no conservar de ella más que el fragmento esencial para la acción o *farmacóforo*. En general, la farmacomodulación disyuntiva se aplica a aquellos modelos de estructura más compleja, en especial productos naturales de núcleo policíclico, en los que se procede a la apertura de uno o más ciclos, generalmente con supresión de partes de la molécula que se considera innecesarias o no esenciales para la actividad.³

2.7.3.2 Aproximación modulativa.

Las aproximaciones modulativas tienden a conservar los aspectos estructurales esenciales del modelo realizando una transformación limitada del mismo. Sin embargo, es necesario insistir en este punto que las modificaciones estructurales, por simples que parezcan, pueden incidir en las propiedades fisicoquímicas globales de la molécula.

- a) *Apertura de anillos*. La apertura de anillos se ha utilizado frecuentemente en el contexto del diseño de copias terapéuticas y presentan un interés cuestionable.
- b) *Formación de anillos*. Esta aproximación es una de las más útiles para el estudio de la conformación activa en moléculas flexibles. Dado que el resultado es una molécula con menor libertad conformacional, uno de los inconvenientes más frecuentes de esta modificación es el derivado de la introducción de elementos estructurales que pueden alterar tanto la actividad como las propiedades fisicoquímicas de la molécula original.
- c) *Variación del tamaño de anillo*. Es una de las modificaciones que menores alteraciones terapéuticas suele implicar, por lo que es una de las más utilizadas en las copias terapéuticas.
- d) *Reorganización de anillos*. Es quizás el tipo de farmacomodulación que conduce a variaciones más originales con respecto a la estructura del prototipo. Una primera aproximación consiste en

la transformación de anillos de tamaño medio o grande en sistemas fusionados, espiránicos o con puente, de semejante lipofilia a la del prototipo.

- e) *Homología*. Se entienden por homólogos aquellas moléculas que difieren entre sí por un grupo metileno.
- f) *Vinilogía*. Este fenómeno se atribuyó a las propiedades del grupo vinilo como “canal conductor de propiedades electrónicas” entre los grupos carbonilo e hidroxilo.

Gran parte de los problemas asociados a los vinílogos radican en su mayor reactividad metabólica, así como en la posibilidad de dar lugar a metabolitos tóxicos debido a la reactividad del doble enlace conjugado. Por otra parte, los cambios geométricos en la molécula resultante pueden ser profundos y la actividad impredecible.

- g) *Isomerización*. Puede tratarse de una isomería de doble enlace (paso de estereoquímica *Z* a *E* o viceversa), isómeros de posición o isomerización de grupos funcionales.
- h) *Ramificación, alquilación y desalquilación*. La alquilación y la desalquilación conducen a cambios en la polaridad de la molécula, siendo especialmente importantes cuando afectan a grupos hidroxilo o amino, en los que pueden alterarse la capacidad de formar enlaces por puente de hidrógeno. En cuanto a las ramificaciones, además de influir sobre la lipofilia, pueden dar lugar a cambios conformacionales o estéreo que alteran sustancialmente la actividad del modelo.
- i) *Saturación de dobles enlaces*. Este tipo de modificación puede alterar tanto la conformación del fármaco como su capacidad para formar enlaces con la diana, con consecuencias importantes sobre la acción.
- j) *Bioisostería*. La bioisostería constituye uno de los métodos más frecuentes de farmacomodulación modulativa. Esencialmente, se refiere a la equivalencia entre átomos o grupos de átomos atendiendo a criterios diversos, tales como el tamaño, distribución electrónica, efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de la molécula, etc.

Es importante tener en cuenta que el término “bioisómeros” carecerá de sentido si no indicamos la propiedad o propiedades que hacen comparables a una pareja de especies químicas. Así, por ejemplo, dos isómeros clásicos de acuerdo con la *ley de Grimm*, tales como -OH y -Cl, pueden considerarse bioisómeros en volumen, pero no en cuanto a la capacidad de formación de enlaces con la diana, en su lipofilia o en su distribución electrónica.

Entre los parámetros más significativos que cabe considerar en relación a la bioisostería cabe mencionar:

- a) Tamaño o volumen de los grupos.
- b) Ángulos de hibridación.
- c) Distribución electrónica, polarizabilidad, efectos inductivos, cargas, dipolos y otras propiedades relativas a los efectos electrónicos. La equivalencia en este concepto permite considerar bioisómeros a los pares de sistemas cíclicos catecol/benzimidazol, piridina/nitrobenzoceno o iridinio/anilino.
- d) Solubilidad en lípidos (lipofilia), como en los grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{S}-$, o bien $-\text{CH}_3$ y $-\text{Cl}$, o en sistemas más complejos como benceno o tiofeno.
- e) Acidez ($\text{p}K_a$), como en las funciones ácido carboxílico, sulfonamida y el heterociclo tetrazol, cuyo protón ionizable tiene un valor de $\text{p}K_a$ semejante (Figura 7.32).
- f) Capacidad de formar enlaces de hidrógenos, como en los grupos $-\text{OH}$ de fenol, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}-$ (metanosulfonamido) y $\text{R-NH-CO-NH}-$ (ureido), en los que las agrupaciones $-\text{OH}$ o $-\text{NH}-$ son débilmente ácidas y buenos dadores en enlaces de hidrógeno.³

2.7.3.3 Aproximación conjuntiva.

Este tipo de farmacomodulación consiste en la reunión de elementos estructurales de varios modelos con la idea de obtener un nuevo compuesto que presente propiedades farmacológicas comunes con las de los prototipos. Dichos elementos estructurales, unidos entre sí mediante enlaces covalentes, pueden proceder de la combinación de *dos moléculas idénticas*, lo que recibe el nombre de *duplicación molecular*, o de *dos moléculas diferentes*, lo que constituye un *híbrido* o *combinación molecular*. En el diseño de este tipo de moléculas es importante tener en cuenta el curso metabólico del compuesto resultante. Así, son posibles dos situaciones:

- a) Los componentes precursores pueden regenerarse mediante un proceso metabólico. En este caso, la modificación conjuntiva se ha de considerar equivalente a un *profármaco*, teniendo como ventaja, con respecto a la administración de los constituyentes por separado, una mejor farmacocinética o, simplemente, una mejora en las propiedades galénicas.
- b) Los componentes precursores no se regeneran metabólicamente. Los ejemplos de este tipo de modificaciones son abundantes. Así, las *duplicaciones no reversibles metabólicamente* tratan de explorar la presencia de una zona accesoria y simétrica en la macromolécula receptora. Esta zona accesoria sería importante para el aumento de afinidad del análogo duplicado con el receptor.³

Dentro de las técnicas de farmacomodulación es importante considerar la importancia que tienen los grupos funcionales ya que estos proporcionan propiedades y comportamientos específicos que permiten que las moléculas del fármaco ejerzan los efectos farmacodinámicos y farmacocinéticos deseados. Para una molécula de fármaco dada, juegan un papel importante en: solubilidad general en agua / lípidos, ruta de administración, capacidad de interactuar con objetivos biológicos específicos, mecanismo de acción, ruta del metabolismo y eliminación, duración de la acción, idoneidad para una situación terapéutica específica y tendencia a causar efectos adversos o interacciones farmacológicas.²⁴

2.7.4 Influencia de los grupos funcionales en el diseño molecular de fármacos.

Es posible alterar los grupos funcionales para mejorar la actividad, aumentar la absorción, disminuir los efectos adversos o proporcionar otros beneficios terapéuticos.

Hay tres propiedades químicas principales que deben considerarse para cada grupo funcional. Cada grupo funcional tiene un efecto electrónico, un efecto de solubilidad y un efecto estérico que debe tenerse en cuenta al evaluar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas generales de cualquier molécula de fármaco dada. La presencia o ausencia de grupos funcionales adyacentes puede afectar drásticamente las propiedades químicas de un grupo funcional específico.²⁴

Efectos electrónicos. El efecto electrónico de un grupo funcional se mide por su capacidad para donar sus electrones a átomos adyacentes o grupos funcionales o para extraer o retirar electrones de átomos adyacentes o grupos funcionales. Hay dos componentes principales que comprenden el efecto electrónico general de un grupo funcional, su capacidad de participar en resonancia y sus efectos inductivos intrínsecos.

Efectos de solubilidad. La solubilidad global en agua y / o lípidos de una molécula de fármaco afecta su ruta (s) de administración, distribución dentro del cuerpo, metabolismo, duración de la acción y ruta (s) de eliminación. Esta solubilidad general es una suma compuesta de las contribuciones de cada grupo funcional presente dentro de la estructura del fármaco.

Grupos funcionales solubles en agua. Los grupos funcionales que mejoran la solubilidad en agua de una molécula de fármaco a menudo se denominan grupos funcionales hidrófilos. Las dos propiedades

principales que contribuyen a la solubilidad en agua de un grupo funcional son su capacidad para ionizar y / o su capacidad para formar enlaces de hidrógeno. La ionización de grupo funcional imparte un aumento en la solubilidad en agua de una molécula de fármaco. Los enlaces de hidrógeno también son muy importantes para las interacciones entre un medicamento y su objetivo biológico.

Grupos funcionales solubles en lípidos. Los grupos funcionales que mejoran la solubilidad en lípidos de una molécula de fármaco a menudo se denominan grupos funcionales hidrófobos o lipófilos. Los grupos funcionales que carecen de la capacidad de ionizar o formar enlaces de hidrógeno tienden a impartir una medida de solubilidad en lípidos a una molécula de fármaco.²⁴

Efectos estéricos. Cada grupo funcional tiene un tamaño finito o dimensión estérica que contribuye a la conformación general o la forma tridimensional de una molécula de fármaco dada. Obviamente, algunos grupos funcionales son más grandes y voluminosos que otros, y es imposible que dos átomos o grupos funcionales ocupen el mismo espacio. Además, el tamaño y la forma de cada grupo funcional deben poder adaptarse a los sitios de unión presentes en su objetivo biológico. La adición de grupos funcionales a una molécula de fármaco basada principalmente en sus efectos estéricos puede proporcionar una serie de beneficios terapéuticos para una molécula de fármaco que incluyen:

Mayor selectividad para su objetivo biológico. La selectividad de un fármaco hacia un receptor específico depende de los grupos funcionales que contiene el fármaco, puede ser que la presencia o ausencia de un grupo funcional le confiera más selectivo sobre un objetivo biológico en particular.

Interacciones de unión mejoradas con su objetivo biológico. La interacción entre una molécula de fármaco y su objetivo biológico se basa en la capacidad de la molécula de fármaco de adoptar una conformación complementaria a la forma tridimensional del objetivo biológico. Algunas drogas tienen una cantidad considerable de flexibilidad y pueden orientar sus grupos funcionales en una variedad de conformaciones diferentes.

Alteración favorable de su tasa de metabolismo. El impedimento estérico es una estrategia común utilizada para bloquear o ralentizar una ruta metabólica específica. En este enfoque, se agregan átomos

adicionales adyacentes al grupo funcional que experimenta el metabolismo para bloquear la interacción de la molécula del fármaco con la enzima que lleva a cabo la transformación metabólica.²⁴

Una estrategia importante para mejorar las propiedades farmacológicas es el empleo de diseño molecular de fármacos, este es un método que es muy útil en donde se modifica la parte de la estructura de un compuesto, esto puede ser de gran ayuda para poder administrar fármacos con un sistema de liberación controlada y así tener una concentración óptima para llevar a cabo la acción deseada.

2.8 Sistema de liberación controlada.

La liberación controlada de sustancias activas se basa en la idea de proveer la cantidad óptima del agente activo, en el momento preciso y en el lugar adecuado. El concepto surgió de la necesidad de administrar una sustancia de forma continua durante cierto periodo de tiempo para obtener el efecto buscado.²⁵

La liberación de un medicamento puede ser diseñada para controlar su acción: en función del tiempo (control temporal) o en función del lugar acción (control de distribución o local). En el control temporal, los sistemas buscan liberar el medicamento durante un tiempo definido (esto es ventajoso para sustancias que son rápidamente metabolizadas o eliminadas por el organismo). Por otro lado, el control de distribución busca liberar el medicamento cuando el dispositivo se encuentra en el lugar apropiado (target-site) del organismo. Este tipo de sistemas tiene la ventaja de evitar la distribución del medicamento donde no es necesario (disminuyendo su toxicidad en ciertos órganos) y aumentar su eficacia pues permite su disponibilidad donde es requerido.²⁵

En el sector farmacéutico, los sistemas lograban una liberación continua del principio activo al mezclarlo con ceras o parafinas, utilizando sustancias porosas o recubriendo las tabletas de materiales insolubles. Todos estos métodos se mostraron efectivos en retardar la liberación del medicamento siendo su inconveniente la baja reproducibilidad de resultados debido a su sensibilidad ante condiciones externas.²⁵

Si bien el concepto de liberación controlada puede ser presentado de una forma simple y sencilla, diseñar dispositivos, formulaciones o sistemas que logren reproducir el comportamiento buscado puede resultar extremadamente complicado. En los últimos años, los avances en la ciencia de polímeros y de materiales han aportado herramientas clave para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada. En

muchos casos, el mecanismo y la velocidad de liberación de una sustancia activa a través de una matriz polimérica pueden ser controlados únicamente por las propiedades del material, siendo casi independiente de los factores externos.²⁵

Las principales ventajas que aporta el uso de sistemas de liberación controlada en la dosificación de sustancias activas incluyen:

- Concentración uniforme y/o prolongada del nivel de la sustancia activa, reduciendo el riesgo de una sobredosis o una dosis insuficiente.
- Optimización del uso de la sustancia activa.
- Localización del principio activo mediante el uso de dispositivos, limitando efectos secundarios y daños laterales.
- Reducción de la frecuencia de administración.²⁵

En los sistemas de liberación controlada (**figura 10**), recientemente el uso de nanoemulsiones está despertando un gran interés tanto en la comunidad científica como en la industria alimenticia, debido a que representa una aplicación eficiente y viable para proteger y liberar sustancias activas.

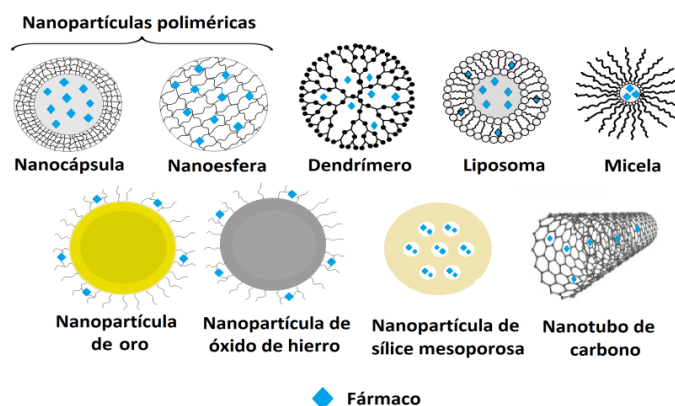


Figura 10. Representación de los tipos de nanopartículas utilizados.²⁶

Los sistemas coloidales utilizados en la administración cutánea suelen estar basados en lípidos e incluyen nanoemulsiones (NE), liposomas o vesículas flexibles, portadores de lípidos nanoestructurados (NLC) y nanopartículas de lípidos sólidos (SLN). Estos nanosistemas pueden ofrecer el potencial de mejorar la biodisponibilidad y la eficacia, dirigir la administración a las regiones de la piel y los folículos, aumentar

la estabilidad del activo y facilitar la formulación de compuestos lipófilos poco solubles en agua. También pueden tener un papel en combinación con otras tecnologías de mejora de la penetración.²⁷

2.9 Desarrollo de emulsiones y nanoemulsiones

Una emulsión es un sistema coloidal de un líquido disperso en otro líquido. Tal dispersión se mantiene por un tiempo en forma de gotas, con ayuda de un agente emulsionante. El agente emulsionante es afín a ambas fases y se localiza en la interfase de las gotas formadas evitando su coalescencia. Es decir, es una unión forzada de por lo menos dos sustancias líquidas que son inmiscibles entre sí de manera natural, formando dos fases: una fase se denomina fase dispersa (las gotas) y la otra es llamada fase dispersante (fase continua).²⁸

Según la naturaleza de la fase dispersa y la fase dispersante, existen dos tipos de emulsiones: emulsiones agua-en-aceite y emulsiones aceite-en-agua. En las emulsiones agua-en-aceite (denominada W/O por sus iniciales en inglés) la fase dispersa es agua y la fase dispersante es aceite, el contenido de agua es típicamente menor al 25 %. En las emulsiones aceite-en-egua (denominada O/W) el contenido del componente acuoso es generalmente mayor a 31 % pudiendo tener hasta un 80 % de agua; en este tipo de emulsión la fase dispersa es un aceite y la fase dispersante es agua. En general, se cumple la ley de Bancroft que dice que la fase dispersante es aquella en la que es soluble el emulsificante.²⁸

Existen también las emulsiones múltiples, son aquellas en las que la fase interna es también una emulsión; la simbología para señalarlas es W/O/W si se trata de una emulsión múltiple de agua-en-aceite-en-agua y O/W/O si se trata de una emulsión múltiple de aceite-en-agua-en-aceite.²⁸ En la **tabla 2** se muestra la clasificación que proponen los fisicoquímicos sobre los diferentes tipos de emulsiones de acuerdo con su comportamiento termodinámico y con ello proporcionando determinado tamaño de gotícula. En esta clasificación es importante resaltar que no se toma en consideración la presencia de un emulsificante (tensioactivo) que permita darle estabilidad a la emulsión y que al momento de incorporar este componente el tamaño de gotícula y la estabilidad cambian.²⁹

Tabla 2. Clasificación termodinámica de diferentes tipos de emulsiones de acuerdo con su tamaño.²⁹

Tipo de emulsión	Intervalo de diámetro	Estabilidad termodinámica	Relación superficie/masa m²/g	Apariencia
Macroemulsión	0.1 a 100 μm	Inestable	0.07 a 70	Turbio/opaco
Nanoemulsión	20 a 100 nm	Inestable	70 a 330	Transparente
Microemulsión	5 a 50 nm	Estable	130 a 1300	Transparente

Al momento de considerar la aplicación específica de estas emulsiones y la consideración de adicionar tensioactivos el campo de aplicación es vasto, en la construcción, los polímeros, metalúrgica, alimentaria o farmacéutica.

2.9.1. Nanoemulsiones.

Las nanoemulsiones son dispersiones de, por lo menos, dos fases líquido-líquido, con tamaño de gota inferior a 0.5 micras y han sido denominadas, según la época y los grupos que las han estudiado, como “emulsiones ultrafinas”, “microemulsiones inestables”, “emulsiones sub-micrométricas” o “emulsiones finamente dispersas”. Estas denominaciones son correctas, pero no se usan con frecuencia y la terminología más aceptada y comúnmente utilizada para describir estas dispersiones de tamaño de gota pequeño es “miniemulsiones” o “nanoemulsiones”. Cabe señalar que nanoemulsión es también un término erróneo pues el tamaño de gota de estos sistemas está en el rango entre 20 y 500 nm, lo que es mucho mayor que 1 nm, si nos apegamos al estricto término de medición lineal nanómetro. Sin embargo, el término “nano” es mucho más atractivo que el de “mini” y por ello ha prevalecido en la literatura, tanto por motivos científicos como comerciales.³⁰

Las nanoemulsiones en su aplicación dentro de la nanomedicina se consideran como dispersiones coloidales traslucidas de dos líquidos inmiscibles estabilizadas por un tensoactivo, con un tamaño de gota comprendido entre los 20 y los 200 nm. Este pequeño tamaño de gota hace que la nanoemulsión posea una elevada estabilidad cinética, frente al cremado, sedimentación, floculación y coalescencia. A pesar de su elevada estabilidad cinética, son termodinámicamente inestable, siendo necesaria la aportación de energía para su formación.³¹ En este espacio de aplicación dentro de la nanomedicina encontramos que el rango del tamaño de gotícula de las nanoemulsiones responde a la necesidad de la incorporación del

miscelo a la célula, por lo cual el requerimiento de la estabilidad cinética y el tamaño de gotícula responden al blanco terapéutico específico, y este rango de 20 a 200 nm se consideró para tratamientos oncológicos.

En la preparación de nanoemulsiones dependiente de su aplicación dentro de la industria alimentaria y farmacéutica, una nanoemulsión aceite-agua (O/W) se considera nanoemulsión si el tamaño de gotícula se encuentra en una escala de 50–1000 nm.³²

Se han reportado también otras denominaciones a las emulsiones de acuerdo con el proceso de preparación como se reporta en la patente de Solans, C. *et al* 2004; en donde se denomina “microemulsión” a aquella emulsión que se forma espontáneamente al mezclar sus componentes y tienen un tamaño de gotícula inferior a 20 nm. Menciona así mismo que dentro de la industria existe gran interés por otra emulsión denominada “nanoemulsión” que se han obtenido con tamaño de gotícula entre 20 y 500 nm.³³

La **figura 11** muestra la imagen de una fotografía fija de las gotículas de una nanoemulsión tomada a través de la microscopia de transmisión electrónica (TEM por sus siglas en inglés).

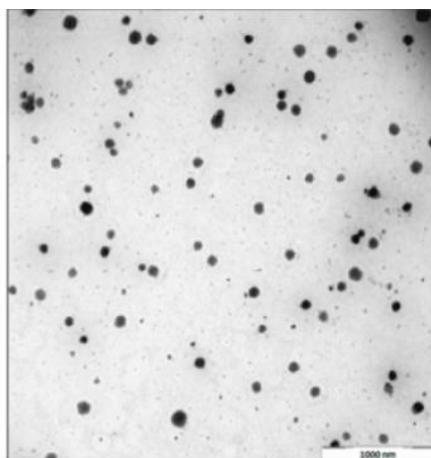


Figura 11. Nanoemulsión. Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM).³¹

La preparación de las nanoemulsiones se encuentra en función de la fuente utilizada para suministrar la energía requerida podemos distinguir dos métodos de preparación:

Métodos de alta energía: utiliza homogenización de alta presión, ultrasonidos entre otros, que rompen las gotas de la emulsión. La adición de tensoactivo permite disminuir la energía necesaria para la formación de la nanoemulsión. No obstante, el tensoactivo también pueden producir coalescencia de las gotas recién formadas debido a la colisión entre ellas. El tamaño de partícula obtenido dependerá del instrumento empleado, así como del tiempo y temperatura utilizado durante la preparación y de los propios componentes de la fórmula. Este método de preparación permite tener un mayor control sobre el tamaño de gota y una mayor veracidad de ingredientes disponibles.³¹

Métodos de baja energía: también llamados métodos de condensación. Estos aprovechan la energía contenida en el sistema para formar gotas de pequeño tamaño. La emulsificación se lleva a cabo cambiando los parámetros que afectan al balance hidro-lipófilico del sistema, como la temperatura y composición, por este motivo la selección de los excipientes a utilizar es un paso crítico. Así se pueden distinguir dos procedimientos: a temperatura constante (variando la composición) o bien a composición constante (variando la temperatura). Este último método también es conocido como método de la temperatura de inversión de fases, siendo el método de baja energía más utilizado. Las nanoemulsiones pueden clasificarse como la fase externa acuosa (OW) o de fase externa oleosa (W/O), en función de cuál sea el componente mayoritario de la fase continua en la formulación, agua o aceite, respectivamente.³¹

Ventajas de las nanoemulsiones sobre otras formas de dosificación: aumento de la absorción y disminución de la variabilidad en el tracto gastrointestinal, solubilización fármacos tanto lipófilos e hidrófilos, aumento de la biodisponibilidad y mejora de perfil fármaco cinética, utilización en diversas rutas de administración, rápida y eficiente penetración del fármaco, enmascaramiento de sabores desagradables, protección frente hidrólisis y oxidación del fármaco, buena aceptación por parte del paciente, requieren comparativamente menos energía para su formación, elevada estabilidad cinética y se pueden esterilizar mediante filtración.³¹

2.9.1.1. Selección de los componentes de la nanoemulsión.

Los componentes utilizados para la preparación de las nanoemulsiones deben ser seguros, no tóxicos y no irritantes, según los que aparecen en la lista de componentes generalmente reconocidos como seguro (Generally Regarded As Safe, GRAS). En este sentido es de especial interés la elección del surfante, ya

que suelen ser los compuestos más irritantes, y se encuentran en una relativamente elevada concentración, necesaria para la estabilización del sistema coloidal.³¹

-Fase oleosa: En primer lugar se selecciona la fase oleosa es la responsable de la solubilización de fármacos hidrófobos. En este caso es conveniente seleccionar el aceite en el cual el fármaco presente una mayor solubilidad. Así pues para la selección de esta fase, se realiza un screening de aceites. Para evaluar la solubilidad en estos, se disuelve un exceso de fármaco en un volumen determinado, se agita o sonica y se deja en un agitador rotatorio durante 48-72 horas hasta alcanzar el equilibrio. Finalmente la concentración de fármaco solubilizado por el aceite es analizado mediante una técnica analítica apropiada.³¹

-Tensoactivo: Tras la selección de la fase oleosa se ha de seleccionar el tensoactivo apropiado. Con el fin de racionalizar el comportamiento de los tensoactivos se determinó su balance hidro-lipofílico (HLB). Este tiene en cuenta la contribución relativa del fragmento hidrófilo e hidrófobo en la molécula del tensoactivo. Los tensoactivos con HLB se considera liófilos y favorecen la formación de emulsiones de fase externa oleosa. Los co-tensoactivos, son tensoactivos generalmente alcoholes o ésteres alcohólico de cadena corta, que se añaden con el fin de reducir aún más tensión interfacial, facilitando la emulsificación del sistema. La adición de un co-tensoactivo, generalmente aumenta la estabilidad del sistema y la solubilidad del compuesto en el mismo.³¹

Los nanoemulsiones suelen contener un contenido de tensoactivo relativamente bajo con una menor irritación de la piel. Mejoran la permeación en la piel por: (i) su alta capacidad de solubilización de compuestos tanto lipofílicos como hidrofílicos aumentan la capacidad de carga y la aplicación de la dosis; (ii) su gran superficie y buen contacto con la piel, junto con su naturaleza oclusiva, aseguran el contacto superficial con el estrato córneo; (iii) sus componentes oleosos y tensoactivos pueden tener un efecto de mejora de la permeación directa sobre la estructura lipídica del estrato córneo.²⁷

Como se ha visto el desarrollo de las nanoemulsiones abre una ventana para el estudio de nuevas formulaciones de aquellos compuestos que no son solubles en agua o como por ejemplo los compuestos que no se pueden administrar por vía oral ya que podrían ser tóxicos o irritantes. Las nanoemulsiones de pueden aplicar para los compuestos que apenas se están desarrollando, que son obtenidos de los

compuestos naturales (metabolitos secundarios) como por ejemplo el grupo de los flavonoides que se encuentran en diversas plantas, vegetales y frutos.

2.10. Flavonoides.

El nombre de los flavonoides es el nombre genérico de un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales.³⁴ Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos. Poseen un origen biosintético común (en el caso de los flavonoides, a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos) y, por ese motivo, un mismo elemento estructural básico con diferentes grados de oxidación, dando lugar a las distintas familias estructurales: flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas (o flavanoles), antocianos, isoflavonas, chalconas y auronas.³⁵

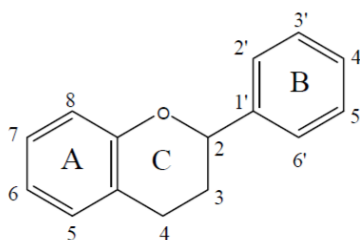


Figura 12. Estructura general de los compuestos flavonoides.³⁶

Las diferentes modificaciones químicas que tienen lugar dentro de cada una de estas clases, tales como hidrogenaciones, hidroxilaciones, sulfuraciones, metilaciones y acetilaciones, así como la incorporación de distintos restos azucarados, dan lugar a la gran diversidad de flavonoides que se pueden encontrar en la naturaleza. La mayoría de los flavonoides se encuentran en forma de heterósidos, y entre los azúcares que entran a formar parte de su estructura se incluyen la D-glucosa, la L-ramnosa, la glucoramnosa, la galactosa y la arabinosa. La presencia generalizada de los flavonoides en los alimentos implica su consumo regular en una dieta normal, aunque varía la cantidad diaria dependiendo de los hábitos dietéticos de una población determinada.³⁵

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (**figura 12**). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las

propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C-3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.³⁷

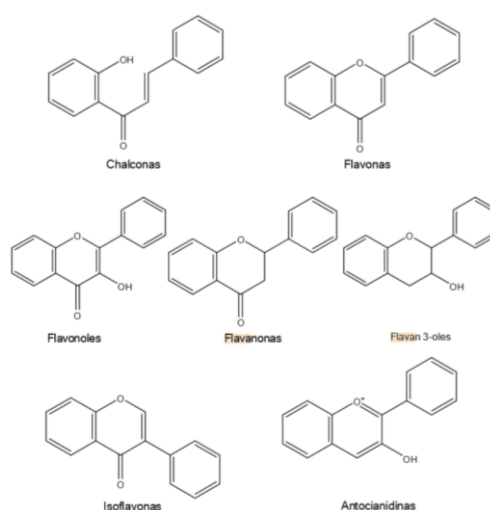


Figura 13. Estructuras químicas de las distintas clases de flavonoides.³⁶

Tres características estructurales son importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u *O*-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5. La quercitina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera (**figura 13**). A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C-3 y con menor frecuencia al C-7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como *O*-glicósidos, siendo la *D*-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la *D*-galactosa, la *L*-ramnosa, la *L*-arabinosa, la *D*-xilosa, así como el ácido *D*-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama

aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo.³⁷

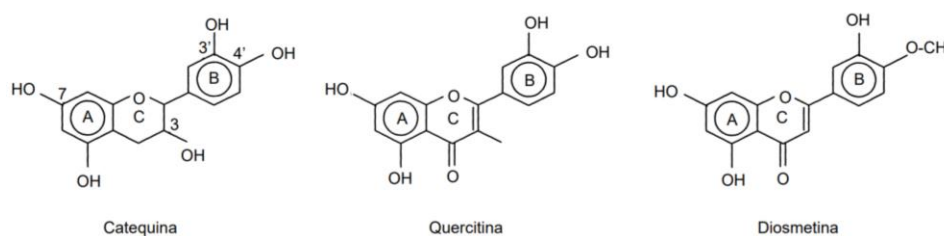


Figura 14. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides.

Los flavonoides son una clase importante de productos naturales; en particular, pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de plantas, que se encuentran ampliamente en frutas, verduras y ciertas bebidas. Tienen diversos efectos bioquímicos y antioxidantes favorables asociados con diversas enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer (EA), la aterosclerosis, etc. Los flavonoides están asociados con un amplio espectro de efectos que promueven la salud y son un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutraceuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas. Esto se debe a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti mutagénicas y anticancerígenas, junto con su capacidad para modular las funciones clave de las enzimas celulares. También se sabe que son potentes inhibidores de varias enzimas, como la xantina oxidasa (XO), la ciclooxigenasa (COX), la lipoxigenasa y la fosfoinositida 3-quinasa.³⁸

En la naturaleza, los compuestos flavonoides son productos extraídos de plantas y se encuentran en varias partes de la planta. Los flavonoides son utilizados por los vegetales para su crecimiento y defensa contra las plagas. Pertenecen a una clase de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Constituyen una de las clases más características de compuestos en plantas superiores. Muchos flavonoides se reconocen fácilmente como pigmentos de flores en la mayoría de las familias de angiospermas. Sin embargo, su aparición no se limita a las flores, sino que se encuentran en todas las partes de las plantas. Los flavonoides también se encuentran abundantemente en alimentos y bebidas de origen vegetal, como frutas, verduras, té, cacao y vino.³⁸

2.10.1. Biosíntesis de los flavonoides.

Los flavonoides se sintetizan a través de la ruta fenilpropanoide, la transformación de la fenilalanina en 4-cumaroil-CoA, que finalmente entra en la ruta de biosíntesis de flavonoides (**Figura 15**). La primera enzima específica para la ruta de los flavonoides, la chalcona sintasa, produce andamios de chalcona de los que se derivan todos los flavonoides. Aunque la vía central para la biosíntesis de los flavonoides se conserva en las plantas, dependiendo de la especie, un grupo de enzimas, tales como isomerasas, reductasas, hidroxilasas y varias dioxigenasas dependientes de Fe^{2+} / 2-oxoglutarato modifican el esqueleto flavonoide básico, Las diferentes subclases de flavonoides (Martens et al., 2010). Por último, las tranferasas modifican el esqueleto del flavonoide con azúcares, grupos metilo y / o restos acilo, modulando la actividad fisiológica del flavonoide resultante al alterar su solubilidad, reactividad e interacción con dianas celulares.³⁹

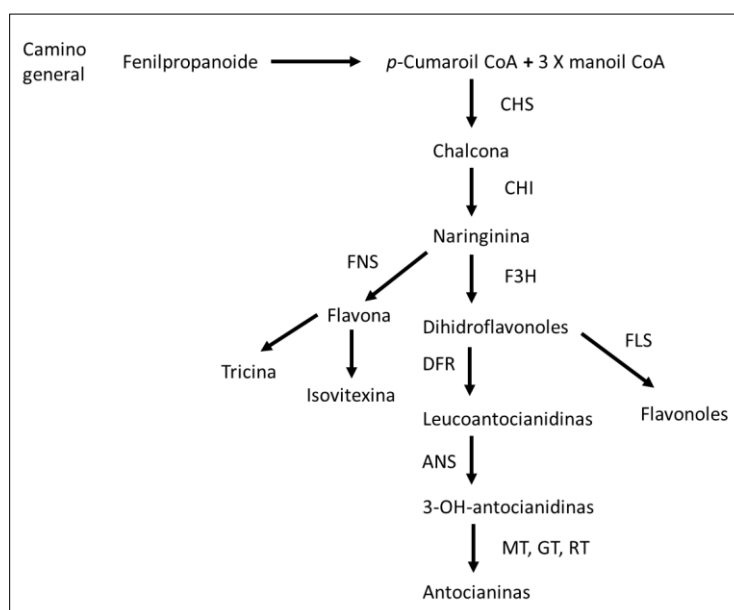


Figura 15. Biosíntesis de los flavonoides.⁴⁰

2.10.2. Flavanonas.

Las flavanonas, son precursores de otros flavonoides más complejos, pero se encuentran como tales en altas concentraciones en los cítricos. Las más importantes son naringenina, presente en el zumo de naranja, limón o pomelo, dándole un sabor amargo; liquiritigenina, presente en el regaliz; y eriodictiol, se presenta en el guisante actuando como quimioatrayente para interactuar con agrobacterias (Mitscher *et al*, 1983).⁴¹

De acuerdo a todos los antecedentes medicinales que presentan los flavonoides, en el presente trabajo de investigación se aborda el estudio de un grupo específico de flavonoides que corresponde a las flavanonas preniladas naturales. Es por ello, que a continuación se presentan antecedentes químicos y farmacológicos de flavanonas preniladas.⁴¹

El descubrimiento de nuevas sustancias a partir de plantas con actividad terapéutica constituye una meta de la humanidad. El reino vegetal contiene un enorme potencial de moléculas por descubrir; se estima que más del 90 % de las especies no han sido estudiadas. La naturaleza ha demostrado ser una fuente importante de compuestos anticancerígenos efectivos: como por ejemplo medicamentos derivados de microorganismos y de plantas. Los productos naturales representan el 50 % de los fármacos de uso clínico en países desarrollados, el 25 % de los cuales derivan de plantas superiores; por ello, las plantas tienen una larga historia de uso en el tratamiento del cáncer, la inflamación y otras enfermedades relacionadas, como artritis reumatoides, enfermedad de Alzheimer y asma entre otras; sin embargo, se han visto aún con cierto escepticismo principalmente cuando dichas plantas presentan flavonoides como metabolitos secundarios (Graf *et al* 2005; Rzedowski, J, 2006; Stoclet *et al*, 2011; Yochum *et al*, 1999;).⁴¹

Las flavanonas son compuestos interesantes por las actividades biológicas demostradas en modelos *in vivo* e *in vitro*. Se sabe que algunas especies de la familia fabacea cuentan con la producción de este tipo de metabolitos como es el caso de la planta *Eysenhardtia platycarpa*.

2.11. Planta: *Eysenhardtia platycarpa* Pennell & Safford.

E. platycarpa se ha descrito como fuente de importantes compuestos de tipo flavonoide. A continuación, se menciona la descripción botánica de la planta.

2.11.1. Descripción botánica.

Árbol de 10 m de altura, con tronco de más de 25 cm de diámetro, de corteza delgada y esponjosa (**figura 16**); planta moderadamente pubescente; hojas de 10 a 20 cm de largo; folíolos 15 a 25 pares, principalmente de 10 a 18 mm de largo, pubescentes o casi glabros, con muchas glándulas pequeñas, pedicelos de 1 mm de largo; cáliz de 3 a 3.2 mm de largo, siempre pubescente; corola 6 a 8 mm de largo, los lóbulos al secarse se tornan con manchas o rayas rojizas; fruto 12 a 13 mm de largo o más por 3.5 a

4 mm de ancho, glabro, glandular-punteado, ascendente en los racimos (**figura 17**), se propaga mediante semillas (SAGARPA, 2011).⁴²



Figura 16. *Eysenhardtia platycarpa* en su hábitat natural, Tetipac, Guerrero (Fotografía propiedad de Garduño Ramírez, M.L., 2007, proximidades del municipio de Tetipac, Guerrero).



Figura 17. Flores de *Eysenhardtia platycarpa*.⁴²

2.11.2. Clasificación Taxonómica.

La clasificación taxonómica de *E. platycarpa* está conformada de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Eysenhardtia*

Especie: *Eysenhardtia platycarpa* Pennell & Saff.

2.11.3. Distribución Geográfica.

Especie característica y abundante de selva baja caducifolia, se distribuye en los estados de Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Puebla y Oaxaca de la república mexicana mostrados en la **figura 18** (Enciclopedia of Life., 2011).



Figura 18. Mapa de distribución de *E. platycarpa* en México (Enciclopedia of Life., 2011).

2.11.4. Usos tradicionales.

Algunos de sus usos en la medicina tradicional han sido como diurético y antidiabético. También se ha reportado con actividad antiséptica y para el tratamiento de infecciones de riñón y la vejiga. Se conoce como “Ocoicui” “taray”, "palo dulce", y "palo azul" (Narváez *et al*, 2007).⁴³

2.11.5. Antecedentes químicos.

La especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa* ha sido objeto de estudio anteriormente en el grupo de investigación. De esos estudios se ha logrado el aislamiento y caracterización de 5 flavanonas isopreniladas mayoritarias a partir del extracto metanólico de las hojas y las ramas de esta especie: 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**2**) 5,7-dihidroxi-6-prenil-flavanona (**3**), 5,7-dihidroxi-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**4**), 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil-flavanona (**5**), entre otros compuestos (**figura 19**) (Narváez *et al*, 2008).

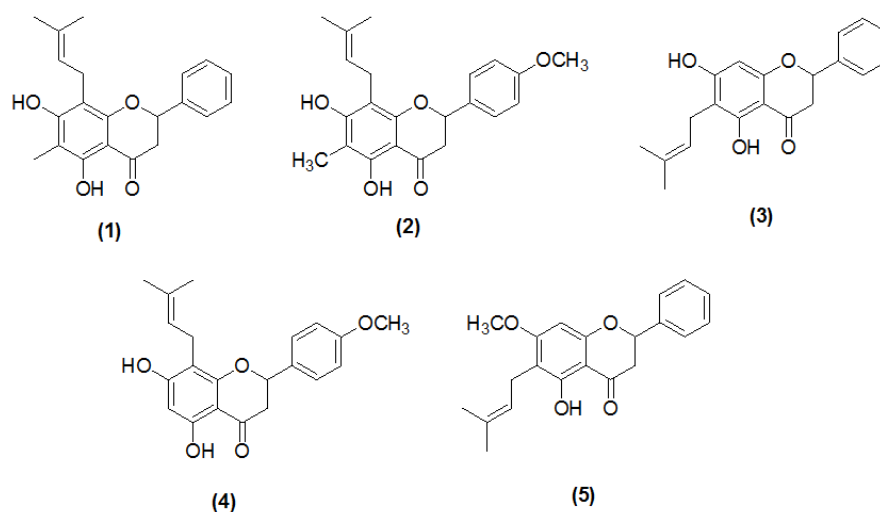


Figura 19. Estructuras de la flavanonas naturales.

2.12.6. Preparación de farmacomodulados.

Andrade en 2013 y 2017, realizó una estrategia de diseño molecular para la preparación de farmacomodulados en busca de agentes citotóxicos, por lo cual se prepararon los derivados acetilados, metilados, ciclizados y vínilogo-ciclizados, de las flavanonas **1**, **2** y **3**.

2.12.7. Antecedentes farmacológicos.

2.12.7.1. Toxicidad frente a *Artemia salina*.

Para el año 2004, Carrillo, en su tesis de licenciatura, desarrolló el modelo de toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto metanólico de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa* y de las flavanonas (2*S*)-5,7-dihidroxi-6-prenil flavanona (**3**) y (2*S*)-5,7-dihidroxi-8-prenil-4'-metoxi-flavona (**4**), encontrando valores de dosis letal promedio (DL₅₀) menor a 17.78 ppm para el extracto, mayor a 1000 μM para la flavanona (**3**) y menor a 10 μM para la flavanona (**4**).⁴⁴

2.12.7.2. Citotoxicidad en líneas celulares.

Andrade en 2013, preparó la serie de farmacomodulados esterificado, metilado, ciclizado y ciclizado vinílico a partir de los compuestos 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**2**). Se ensayaron estos compuestos sobre las líneas celulares Hela y Vero, resultando al menos 2 de los compuestos selectivos sobre la célula cancerosa HeLa, que fueron el derivado metilado de 5,7-dihidroxi-6metil-8-prenil flavanona y el derivado ciclizado vinílico de 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil- 4'-metoxiflavanona.

Andrade en 2017, preparó una nueva serie de farmacomodulados sobre el compuesto 5,7-dihidroxi-6-prenil-flavanona (**3**), y los sometió a ensayos de citotoxicidad frente a las líneas celulares: Vero, HEK-293, Mia-PaCa-2, M21 y HeLa.

2.12.7.3. Actividad hipoglucemiante y antidiabética.

En el año 2006, Narvaez *et al*, reportaron la actividad hipoglucemiante (en ratas sanas) y antidiabética (en ratas diabetizadas con estreptozotocina (STZ)) de los extractos de las hojas, las ramas y la madera de *E. platycarpa*, observando que los extractos de las hojas y las ramas presentan disminución del nivel de glucosa en sangre de manera significativa, tanto en ratas sanas como diabetizadas, con porcentajes de variación de glucemia en la dosis más alta ensayada (300 mg/kg). Se alcanzó una disminución de glucosa del -60.8 ± 4.5 % a las 9 horas posteriores a la administración oral en el modelo de STZ.⁴⁵

De acuerdo con el reporte de Narváez (2007), se han realizado estudios hipoglucemiante y antidiabético en el modelo de estreptozotocina sobre la influencia del triterpeno pentacíclico 3-O-acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13- β -ólido aislado de las ramas de la planta *E. platycarpa*, en donde se encontró una diferencia significativa al disminuir los niveles de glucosa en sangre y los niveles de malonaldehído (MDA) al tratar a los animales de experimentación con 100 mg/kg de peso del triperpeno mencionado.⁴⁵

2.12.7.4. Actividad antimicrobiana.

En 2009, Camacho-Corona *et al*, reportaron actividad sobre cepas multi-drogo resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* evaluando 35 metabolitos secundarios aislados de 11 de plantas, entre ellas *E. platycarpa*, de la cual se consideró a la flavanona 5,7-dihidroxi-8-prenil flavanona. Para la flavanona (**4**) los valores reportados de MIC (μ g/mL) sobre las cepas H37Rv mayor a 50, 345 con valor de 200, M-

12 con valor de 200 y M-20 con valor mayor a 200, reconociendo que para estreptomycin se obtuvieron valores de MIC por debajo de 25 para las cepas ensayadas.⁴⁶

2.12.7.5. Actividad antioxidante.

Por otra parte, también se han reportado estudios sobre la actividad antioxidante con diferentes métodos de extractos metanólicos y compuestos de especies del género *Eysenhardtia* que incluyen a *E. platycarpa* y de *E. subcoriacea* mostrados en las **tablas 3 y 4** (Narváez *et al*, 2008).⁴⁷

Tabla 3. Actividad antioxidante de extractos de especies del género *Eysenhardtia* (Narváez *et al*, 2008).

Antioxidant and DPPH Radical Scavenger Activities of Extracts from <i>Eysenhardtia</i> Species					
Plant species	Part used (g)	AOA (EC ₅₀) ^{a)}		DPPH (EC ₅₀) ^{b)}	
		CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH
<i>E. platycarpa</i>	Leaves (300)	nd	28.3±3.8	nd	102.3±3.4
	Branches (2500)	nd	27.8±5.1	nd	79.6±3.5
	Bark (500)	nd	21.6±2.9	nd	21.2±0.1
<i>E. punctata</i>	Leaves (373)	>100	86.4±11.2	690.2±8.7	94.6±4.8
	Branches (1522)	88.6±6.9	56.7±7.3	476.7±6.8	55.1±6.1
<i>E. subcoriacea</i>	Leaves (1300)	>100	26.2±5.8	>1000	43.5±0.5
	Branches (920)	58.3±7.7	20.8±4.7	113.5±2.8	39.8±0.5
	Bark (550)	26.9±4.9	22.2±3.7	96.5±4.6	9.2±0.1

EC₅₀=the concentration of organic extracts (ppm) required to reduce at 50% the a) pancreatic lipid peroxidation (expressed as antioxidant activity=AOA) and b) DPPH absorption at 512 nm. Values are from three independent determinations and are expressed as means±S.E.M. Quercetin (EC₅₀): AOA=18.1±2.1 μM, DPPH=14.3±1.1 μM, nd: not determined. Untreated group=0.02±0.01 nmol MDA mg protein⁻¹.

Tabla 4. Actividad antioxidante reportada para compuestos de tipo flavonoide y cumarinas (Narváez *et al*, 2008).

Antioxidant activity of coumarin and flavan-3-ols				
Compound	AOA EC ₅₀ ± SEM (μM)	DPPH EC ₅₀ ± SEM (μM)	GSH ± SEM (μg GSH mg protein ⁻¹)	
			Untreated (0.88 ± 0.05)	APPH (0.22 ± 0.06*)
1	9.11 ± 1.1	51.2 ± 2.3	0.99 ± 0.05*	0.92 ± 0.05*
3	11.4 ± 0.3	10.1 ± 2.5	1.02 ± 0.03*	1.09 ± 0.24*
4	11.2 ± 0.3	71.2 ± 1.3	1.15 ± 0.02*	1.01 ± 0.02*
5	37.1 ± 0.7	32.5 ± 1.2	0.87 ± 0.01	0.85 ± 0.02
7	7.3 ± 0.6	16.8 ± 2.3	0.86 ± 0.09	0.85 ± 0.06
Quercetin (reference)	18.1 ± 1.1	14.3 ± 1.1	0.88 ± 0.01	0.86 ± 0.02

Each value represents the mean of three independent assays ± standard error of the mean (SEM).

* Turkey's multiple comparison test showed a significant difference compared to the untreated group ($p < 0.001$).

2.12.7.6. Actividad antiinflamatoria.

La actividad antiinflamatoria realizada por Carrillo en 2004 de las flavanonas (3) y (4) obtenidas del extracto metanólico de las hojas de *E. platycarpa* se desarrolló en el modelo de TPA en oreja de ratón, encontrando un % de inhibición de edema de 46.43 y 51.79 %, respectivamente; esta actividad resulta moderada si se considera la actividad observada para indometacina de 91.6 %, en el mismo reporte de Carrillo.⁴⁴

En 2014, Domínguez-Villegas reportó la actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA para las flavanonas 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1) con un porcentaje de inhibición de la inflamación de 12.24 ± 00.00 ; para 5,7-dihidroxioxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (2) de 68.35 ± 1.45 ; para 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (3) de 66.67 ± 1.55 ; y para 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (4) de 46.43 ± 1.54 , evaluadas de forma intrínseca, es decir, libre de formulación sólo vehiculizadas en acetona para su facilidad de solubilidad y aplicación tópica.⁴¹

Quintana en 2015, en su trabajo de investigación de Maestría logró identificar las moléculas del proceso inflamatorio que son reguladas por la actividad de flavanonas preniladas naturales: 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (1), 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (2), 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (3), 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil-flavanona (5), las cuales fueron obtenidas del extracto metanólico de hojas de *Eysenhardtia platycarpa* para elucidar su mecanismo de acción; en donde las cuatro flavanonas ensayadas mostraron actividad antiinflamatoria en el modelo de inducción de la inflamación con carragenina en pata de ratón, con base en los resultados obtenidos se sugirió que la actividad antiinflamatoria obtenida por efecto de las flavanonas se da por la inhibición de la enzima PLA₂: así mismo, esta actividad se favorece por la producción de interleucina IL-10, mencionando que las diferentes posiciones que guardan los sustituyentes en las estructuras de las flavanonas juegan un papel importante en la actividad observada.⁴⁸

2.12.7.7 Aplicación de sistemas nanoestructurados en flavanonas de *E. platycarpa*.

Domínguez-Villegas y colaboradores en 2014, realizaron trabajos sobre el aislamiento de flavanonas de la planta *Eysenhardtia platycarpa* con un potencial de su actividad farmacológica las cuales fueron: 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1); 5,7-dihidroxioxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (2); 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (3); y 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (4), desarrolladas bajo sistemas

de nanoemulsión y nanopartículas poliméricas con tamaños de gota menores a 70 nm, demostraron que la actividad antiinflamatoria de las cuatro flavanonas que fueron aisladas de *Eysenhardtia platycarpa*. Muestran que la vehiculización en nanopartículas presenta una gran ventaja en el mejoramiento de efectos terapéuticos y como consecuencia de la administración vía tópica presentan una mejor permeación y gran acumulación en el sitio de acción de la inflamación evidenciaron que las formulaciones poseen propiedades antiinflamatorias adecuadas considerando que la flavanona (**3**) cargada en NE y NP mostró mejor resultado de liberación y permeación sobre la piel así como una notable actividad en la disminución de la inflamación. Adicional a ello, fue posible observar que las formulaciones nanoestructuradas permitieron mejorar la eficacia antiinflamatoria de las flavanonas cuando se aplicaron de forma intrínseca. Así es factible considerar que una liberación controlada de las flavanonas dispuestas en sistemas nanoestructurados permitirán un mejor tránsito de los compuestos a través de la piel para llegar a su sitio de acción. Andrade en 2017, preparó nanopartículas poliméricas con PLGA y nanoemulsiones de la serie de compuestos farmacomodulados obtenidos a partir del compuesto (**3**).⁴¹

2.12.7.8 Estudio preliminar sobre el desarrollo de un dispositivo transdérmico, estudio en reposo y estudio dinámico.

En 2013 Cárdenas, a través de su tesis de Químico Industrial, desarrolló un dispositivo preliminar de membrana impermeable de polisulfona como control de liberación de fármacos; este dispositivo fue cargado con una formulación nanométrica de la flavanona (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) y otro con diclofenaco sódico. El ensayo consistió en determinar la cantidad liberada en un sistema en reposo (liberación dentro de un vaso de precipitados) y en un sistema dinámico (colocando un magneto de agitación en el vaso de precipitados) resultando una mayor liberación de la flavanona (**1**) en el estudio dinámico; adicional a ello, Cárdenas ensayó la liberación de la flavanona (**1**) desde el prototipo de dispositivo en células de Franz para determinar qué concentración se liberaba de la flavanona (**1**) con una membrana de control como es la membrana de polisulfona y sin ella, resultando una menor concentración permeada a través de la membrana de polisulfona pero con mayor control de liberación.

En 2018, Terrero formuló en una nanoemulsión la flavanona (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) obteniendo un valor de tamaño de gotícula de 632.03 ± 54.90 nm, con una polidispersión de 0.40 ± 0.35 , y realizó el estudio de permeación *ex vivo* en piel porcina reportando una concentración

de 2.65 ± 1.66 $\mu\text{g/ml}$ en el registro de las 24 horas y un porcentaje de inhibición de la inflamación de 16.13 ± 1.40 con una dosis aplicada desde el parche transdérmico de prueba de 0.4 mg por parche.⁴⁹

2.12.7.9 Detección de los niveles de citocinas.

Quintana en 2015, en su trabajo de investigación de Maestría logró destacar que la posición del sustituyente prenilo en las flavanonas tiene un papel importante en la actividad antiinflamatoria. Ya que las flavanonas (2*S*)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) y 5,7-dihidrox-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**2**) con el prenilo **8** del anillo A tiene mayor actividad antiinflamatoria y estimulan una mayor producción de IL-10 con respecto a 7-dihidroxi-6-prenilflavanona (**3**); y 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (**5**) que tiene el sustituyente prenilo en el carbono **6** del anillo A. por otro lado, la presencia del grupo metoxilo en las flavanona (**3**) y (**4**), estimulo la producción temprana de IL-10. Si bien las cuatro flavanonas, tuvieron actividad antiinflamatoria y estimularon la producción de IL-10, la flavanona (**1**) es la que presentó mayor actividad antiinflamatoria.⁴⁸

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inflamación ha sido atendida por excelencia mediante la administración oral de fármacos comerciales y recientemente por vía percutánea como el caso del parche transdérmico voltaren 24H, lo cual abre un nuevo campo en el desarrollo de medicamentos; aunado a ello se sabe del avance en el desarrollo de formulaciones nanoestructuradas que conducen a la liberación controlada de los fármacos con su posible aplicación percutánea a través de parches transdérmicos, en el caso particular del presente trabajo de tesis se trabaja en una serie de flavanonas activas como agentes antiinflamatorias que dará pauta para acercarse cada vez más a una posible alternativa terapéutica.

De las flavanonas obtenidas de la especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa* se consideró a la flavanona natural (2*S*)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona para la aplicación de un estudio *in silico* y de la estrategia de diseño de farmacomodulación reconociendo que ésta flavanona natural, con sus propiedades fisicoquímicas de origen, no proporcionaban una eficacia antiinflamatoria notable en el modelo *in vivo* ensayado como se puede ver en los antecedentes, de hecho su baja eficacia antiinflamatoria con respecto al resto de las flavanonas naturales permitieron observar que una serie de modificaciones estructurales bajo diseño daban la oportunidad de avanzar en la investigación y por ello el diseño de fármacos empleando por un lado la estrategia del análisis *in silico* para reconocer sus propiedades fisicoquímicas y la posible actividad biológica que proporcionan las herramientas y plataformas actuales de predicción podrían ayudar a reconocer su los derivados propuestos contaban con posibilidades terapéuticas, y por otro lado, la estrategia de diseño molecular como lo es la farmacomodulación permite establecer las condiciones propicias para mejorar estructuralmente mediante derivatización la eficacia de aquel compuesto líder como lo era la flavanona natural. Con ello el diseño experimental del presente proyecto de tesis conducirá a la preparación y caracterización de una serie de compuestos derivados a partir de la flavanona natural (2*S*)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona, a los cuales se les realizará la determinación de la eficacia antiinflamatoria intrínseca *in vivo*, la preparación de formulaciones nanoestructuras y su estudio morfométrico, en la búsqueda de nuevas moléculas antiinflamatoria para su posible aplicación percutánea.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

A partir de la flavanona natural (2*S*)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**1**), preparar una nueva familia de compuestos análogos modulados (farmacomodulados) de tipo: éster (**1a**), metoxilado (**1b**), ciclizado (**1c**) y vinílogo-ciclizado (**1d**) primeramente a través de su análisis *in silico* y posteriormente mediante su preparación en laboratorio, evaluar de forma intrínseca su potencial antiinflamatorio en el modelo *in vivo* por inducción de inflamación con TPA en oreja de ratón y posteriormente formularlos en nanoemulsión para obtener sus características morfométricas idóneas para su posible aplicación percutánea.

4.2 Objetivos particulares.

1. Analizar *in silico* la serie de compuestos propuesta mediante diferentes herramientas computacionales disponibles como son: *Molinspiration*, *SwissTargetPrediction* y *PASS on line* para identificar sus propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas predecibles para su posible aplicación como compuestos antiinflamatorios.
2. Preparar y caracterizar estructuralmente la nueva familia de compuestos farmacomodulados a partir de la flavanona isoprenilada de origen natural (2*S*)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**1**), considerando las reacciones de acetilación, metilación, ciclización y vinílogo-ciclización.
3. Evaluar el potencial antiinflamatorio de la flavanona natural (**1**), los farmacomodulados (**1a-1d**) e Indometacina, de forma intrínseca (libres de formulación), empleando el modelo *in vivo* de inducción de inflamación por TPA en oreja de ratón y analizar los resultados antiinflamatorios obtenidos para considerar al compuesto de mayor efecto antiinflamatorio competitivo frente al fármaco de referencia.
4. Formular la flavanona natural (**1**) y sus farmacomodulados (**1a-1d**) en nanoemulsión para establecer mediante su caracterización morfométrica la obtención de formulaciones nanoestructuradas homogéneas e idóneas para su aplicación percutánea.

5. HIPÓTESIS

A partir de la flavanona natural (2*S*)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) se prepararán sus derivados éster (**1a**), alquilado (**1b**), ciclizado (**1c**) y vinílico ciclizado (**1d**), y al ser evaluados de forma intrínseca en el modelo *in vivo* de inflamación por inducción con TPA en oreja de ratón mejorará la eficacia antiinflamatoria del compuesto líder (**1**) y será posible obtener compuestos que presenten porcentajes de inhibición de la inflamación semejante al obtenido por la aplicación de indometacina. Así mismo si logrará la preparación de nanoemulsiones monofásicas con tamaño de gotícula inferiores a una micra para ser consideradas para su posible aplicación percutánea.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. Consideraciones Generales.

6.1.1. Análisis *in silico*

Para el análisis *in silico* se emplearán las plataformas: *Molinsiration*, *SwissTargetPrediction* y *PASS Online* disponibles de línea. Con los datos obtenidos mediante este análisis será posible identificar las propiedades fisicoquímicas moleculares y la predicción de su bioactividad.

El análisis *in silico* de la flavanona natural (**1**), sus derivados (**1a-1d**) e indometacina, se realizarán para obtener sus propiedades fisicoquímicas estructurales y las predicciones de actividades farmacológicas en la búsqueda de nuevas moléculas antiinflamatorias, empleando las plataformas: *Molinspiration*, *SwissTargetPrediction* y *PASS Online*; reconociendo los criterios básicos necesarios para su aplicación terapéutica y las potenciales actividades farmacológicas que conduzcan a su aplicación antiinflamatoria.

6.1.2 Aislamiento de la flavanona natural.

La cromatografía en columna a presión reducida (CCPR) se efectuará empleando sílica gel 60 GF₂₅₄ de Merck. Las cromatografías en columna (CC) se realizarán con sílica gel 60 Merck en una proporción de 30 g de sílica por cada gramo de muestra analizada. El monitoreo de las columnas cromatográficas y de la pureza de los productos de reacción se llevará a cabo por cromatografía en capa fina (CCF) en cromatofolios de aluminio TLC de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck. Las cromatografías en capa fina preparativa (CCFP) se efectuarán en cromatofolios de aluminio de alta resolución HPTLC de sílica gel 60 F₂₅₄ de Merck. Los métodos de visualización que se utilizarán son luz ultravioleta originada por una lámpara portátil Mineralight 254/366 nm modelo UVGL-25; y como reactivo cromogénico, una solución de 12 g de sulfato cérico amoniacal y 22 ml de ácido sulfúrico concentrado en 350 g de hielo. Los puntos de fusión se determinarán en un equipo Fisher-Johns.

6.1.3 Caracterización estructural.

Los espectros de infrarrojo se expresan en cm⁻¹ y se determinan en un espectrofotómetro Bruker con detector Vector 22, en pastilla de KBr.

Los espectros por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y RMN ^{13}C se obtienen a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente, en un espectrómetro Mercury 400 MHz y un espectrómetro Varian INOVA-400 los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C a 200 MHz y 75 MHz, respectivamente, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) están reportados en partes por millón; las constantes de acoplamiento (J) se encuentran en Hertz.

Los espectros de masas presentan fragmentos de masa/carga y se obtienen en un equipo de gases Agilent 6890 acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5973N por ionización de impacto electrónico EM-IE a un voltaje ionizante de 70 eV.

6.1.4. Determinación de tamaño de gotícula.

Los tamaños de gotículas (nanoemulsiones) se determinan por medio de espectroscopia de correlación de fotones utilizando un Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Marlvern, GB).

6.2. Obtención de la flavanona (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1).

A partir del extracto metanólico de la especie *Eysenhardtia platycarpa*, se aisló y caracterizó la flavanona natural que será la estructura líder para la obtención de los derivados planteados en el presente proyecto. Se tomará en cuenta la estrategia propuesta por Andrade, B. 2013 y Andrade-Carrera, B. *et al* 2017.

6.3. Técnicas de separación.

Del fraccionamiento ya realizado previamente al extracto metanólico de las hojas de *E. platycarpa* se realizará cromatografías en capa fina para la detección con muestra de referencia de aquellas fracciones que contengan la flavanona de interés. Así se logrará la recuperación de la flavanona. Las CCF se va a desarrollar en un sistema de elución 8:2 Hexano:Acetato de Etilo contando con la muestra de referencia.⁴⁴

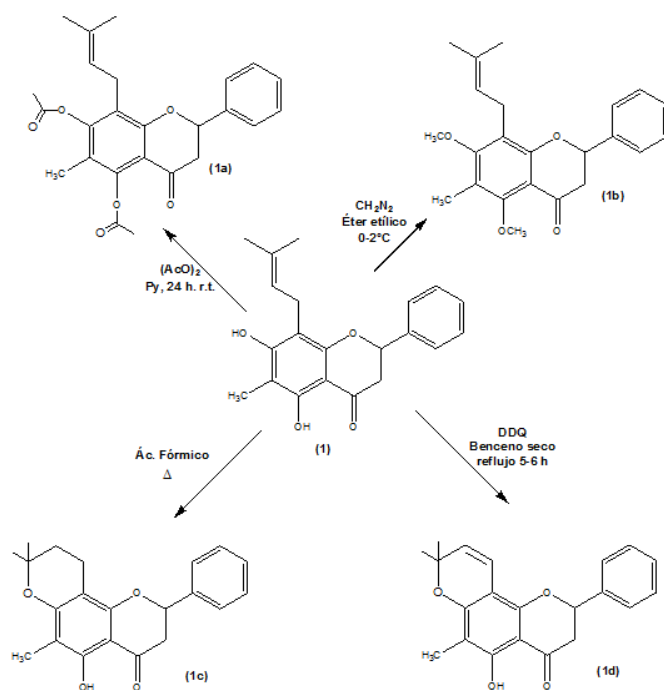
6.4. Preparación de los compuestos farmacomodulados.

Los grupos hidroxilo que se encuentran en la flavanona natural (1) pueden ser transformados por medio de diferentes reacciones, ya sea de esterificación o de metilación para obtener grupos acetatos o metilésteres, respectivamente, la ciclización para anclar el libre giro del grupo prenilo y la ciclización viníloga para generar rigidez en la molécula cambiando la hibridación de los carbonos de sp^3 a sp^2 lo

que incrementa adicionalmente su electronegatividad. Basándose la preparación en Andrade, B. 2013 considerando las concentraciones de materia prima empleadas como las condiciones de reacción.⁵⁰

Esquema 2

Por lo que se realizaron reacciones de semisíntesis para hacer las modificaciones estructurales consideradas y una vez obtenidos los compuestos modulados se continuó con el análisis e interpretación de las señales espectroscópicas y espectrométricas correspondientes comparando el producto natural y sus modulados. Los desplazamientos químicos que se producen en las señales espectroscópicas fueron indicadores de la posición, del entorno químico y el grado de asociación en los nuevos modulados obtenidos.

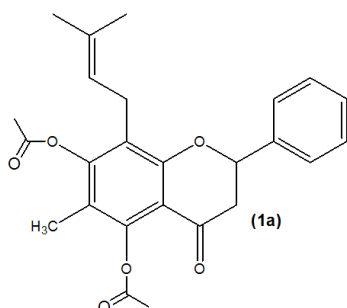


Esquema 2. Esquema general de las reacciones para la obtención de los modulados.

6.4.1 Preparación de (2S)-5,7-diacetil-6-metil-8-prenilflavanona (1a).

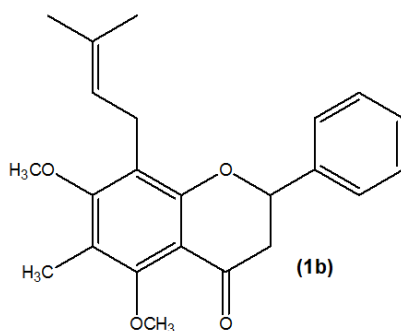
La flavanona natural (1) se puso a reaccionar en una mezcla (1:2) piridina:anhídrido acético con agitación constante por 24 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de agitación, la mezcla de reacción fue disuelta con hielo para finalizar la reacción y se realizó el proceso de separación del producto por

filtración o por extracción; para obtener el compuesto **1a** y se determinaron sus parámetros físicos, espectroscópicos y espectrométricos, correspondientes.⁵⁰



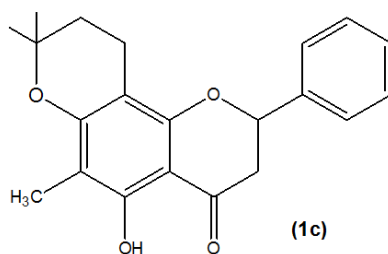
6.4.2. Preparación de (2S)-5-hidroxi-7-metoxi-6-metil-8-prenilflavanona (1b).

Dando seguimiento a la metodología en la preparación del modulado metilado se colocó el compuesto (**1**), bajo las condiciones de reacción en éter dietílico y adicionando una solución del diazometano preparado suspendido en éter, hasta que el color amarillo persista, la solución se dejó reposar por 5 horas; a continuación, el disolvente se removerá a presión reducida hasta sequedad y lograr así la conclusión de la transformación de la materia prima en el modulado metilado (**1b**).⁵⁰



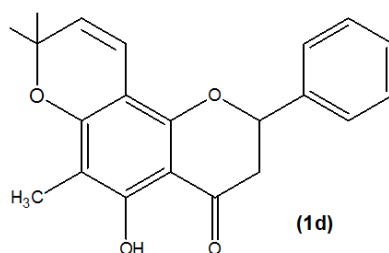
6.4.3. Preparación de (8S)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dihidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (1c).

Para lograr la ciclización de la cadena isoprenílica con el grupo fenólico, se preparó una solución de ácido fórmico con la flavanona (**1**), esta mezcla se calentó en baño de agua a 60 °C con agitación constante durante un periodo de 2 horas y se dejó reposar por 6 horas a temperatura ambiente para posteriormente recristalizar en baño de hielo y realizar la extracción orgánica del producto para obtener el compuesto modulado (**1c**).⁵⁰



6.4.4. Preparación de (8S)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dehidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (**1d**).

La preparación del modulado vinílogo-ciclizado del compuesto (**1d**), se llevó a cabo de la siguiente manera: el compuesto (**1**) se sometió a reacción en un matraz de 3 bocas con 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) en benceno seco a reflujo a una temperatura de 78 °C por un periodo de 5 horas, concluida la reacción se filtró en caliente y se lavó con CH₂Cl₂ obteniéndose un crudo de reacción, mismo que por recristalización permitió obtener el modulado vinílogo-ciclizado (**1d**), una vez concluida la reacción se determinará sus propiedades físicas y espectroscópicas.⁵⁰



6.5. Elaboración de nanoemulsiones.

La nanoemulsión se preparó por disolución de componentes especializados proporcionados por la empresa farmacéutica Gattefosc y la flavanona y los modulados al 5 %, generando así las nanoemulsiones correspondientes (**NE1**, **NE1a-NE1d** y **NEINDO**). La proporción óptima de cada uno de los componentes de la nanoemulsión fue determinada anteriormente en un trabajo de investigación previo, la identidad de los componentes que muestra la **tabla 5** quedan bajo confidencialidad, de acuerdo al convenio específico que existe entre la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y la Universidad de Barcelona, los datos como las cantidades y componentes utilizados en este proyecto de investigación no pueden ser revelados completamente para la preparación de las nanoemulsiones.

Tabla 5. Descripción de los componentes de la nanoemulsión.

Componente	Descripción
Flavanona o modulado	Principio activo
Componente 1	Tensoactivo
Componente 2	Co-tensoactivo
Componente 3	Emoliente
Componente 4	Humectante

Una vez elaborada la mezcla de componentes con el principio activo, se coloca 10 minutos en un baño ultrasónico y posteriormente 15 minutos en un baño de agua a 32 °C y nuevamente 10 minutos más en el baño ultrasónico. La emulsión resultante se congela a -20 °C durante un periodo de 24 h. Transcurridas las 24 h la emulsión se descongela, resulta una formulación transparente, clara y monofásica, lo que es indicativo de una emulsión estable.⁴¹

Asimismo, se determinó el tamaño de gotícula para establecerlas en el rango nanométrico; para ello se empleó el equipo Z-sizer como determinador del tamaño de gotícula.

6.6. Caracterización de los sistemas nanoestructurados.

El proceso de caracterización de las nanoemulsiones se realizó de forma visual y a través de su análisis por la técnica de *Dinamic Light Scatering* para determinar el tamaño de gotícula.

6.6.1. Caracterización visual de las NEs.

Se realizó la inspección visual para distinguir entre las composiciones homogéneas transparentes de las heterogéneas o turbias, si las NEs se encuentran en una zona monofásica, se observó una única fase, por el contrario, si no se encuentra en esta zona, se distinguieron dos fases o turbidez en la nanoemulsión.

6.6.2 Carcaterización mediante Z-Sizer

Para la caracterización de los sistemas nanoestructurados obtenidos, se utilizó el instrumento de medición Z-SIZER MALVERN, el cual determina el tamaño de gotícula, el índice de polidispersión, el porcentaje de gotículas de diferente tamaño y el valor promedio del diámetro de la media de las gotículas.

El tamaño de la fase dispersa de una formulación se mide mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*). Esta técnica mide las fluctuaciones de la intensidad de la luz que incide

en las gotículas dispersas de la formulación a ensayar. Las gotículas que forman parte de una nanoemulsión o formulación nanoestructurada se mueven mediante un movimiento Browniano y la intensidad de la luz incidida ($I(t)$) fluctúa rápidamente con el tiempo. De esta manera, se puede conseguir una función entre $I(t)$ y el tiempo. Un sistema informático recoge esta función y proporciona la media de la fase dispersa y la distribución en esta.

Para la determinación del tamaño de gotícula se utiliza la espectroscopía de correlación fotónica (PCS) en el Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Esta técnica calcula el diámetro promedio (Φ) de la gotícula y el índice de polidispersión (PDI) que indica la distribución del tamaño de gotícula. Esta técnica determina el tamaño de gotícula midiendo la rapidez de fluctuación de la intensidad de la luz láser difractada por las gotículas cuando se difunden a través del fluido. Las mediciones de la espectroscopía de correlación fotónica se realizaron con un ángulo de detección de 90° que permite una mejor intensidad relativa de dispersión. Las muestras se colocaron en microcubetas de poliestireno de 10 mm de camino óptico. Se realizaron tres experimentos distintos con los sistemas nanoestructurados y los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar (SD).

6.7. Evaluación antiinflamatoria.

El modelo a emplear para la determinación de la actividad antiinflamatoria fue el modelo *in vivo* de inducción de la inflamación por TPA en oreja de ratón.

6.7.1. Eficacia antiinflamatoria intrínseca.

Para la evaluación antiinflamatoria *in vivo*, se ensayaron por triplicado los compuestos libres de forma intrínseca, únicamente disueltos en una solución orgánica y empleando el modelo *in vivo* desarrollado por De Young en 1989. Se aplicó vía tópica 1 mg de compuesto por oreja y se desarrolló todo el experimento de acuerdo con la metodología descrita por De Young.⁴¹

Se empleó una solución de 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (**figura 20**) como agente inductor de la inflamación tomando en consideración el modelo *in vivo* desarrollado por De Young en 1989. Por lo que en la oreja derecha del animal se aplicaron 10 μ l de la solución de TPA cuya concentración es de 2.5 μ M; posteriormente, se aplicó la solución orgánica dispensando 1 mg por oreja de cada compuesto

de prueba y en la oreja izquierda se aplicaron sólo 10 µl de etanol y de la solución orgánica libre de compuesto como oreja control.⁴¹

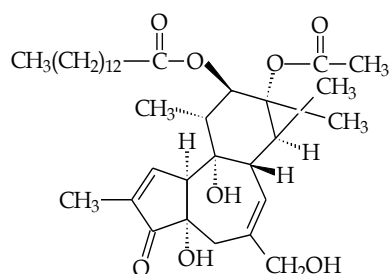


Figura 20. Estructura química del compuesto TPA.

Los animales de experimentación utilizados en la evaluación antiinflamatoria serán ratones macho de la cepa CD-1 de pesos corporales de entre los 22 y 25 g, las evaluaciones se realizarán bajo condiciones de Bioterio y el procedimiento de eutanasia de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

La cuantificación de la respuesta antiinflamatoria se obtendrá por la diferencia de peso de la oreja control con sólo los 10 µl de etanol y la oreja con el agente inductor de la inflamación TPA. Donde los valores del porcentaje de inhibición se obtendrán bajo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(A/B) \times 100] - 100$$

6.8. Análisis y métodos estadísticos

Se empleará el análisis de varianza *ANOVA* para determinar si existe diferencia significativa entre las poblaciones de los grupos control y de referencia con los de diferentes tratamientos a un valor de significancia $p < 0.05$.

7. RESULTADOS.

7.1. Análisis *in silico*.

7.1.1. Análisis mediante *Molinspiration*.

Para el estudio molecular *in silico*, es imprescindible comprender las propiedades fisicoquímicas de las moléculas: es por ello que a través de la plataforma Molinspiration fue posible contar con los datos básicos para la flavanona (**1**) y para los farmacomodulados (**1a-1d**), así como de indometacina. La **tabla 6**, muestra los datos obtenidos que representan: Coeficiente de partición de molinspiration (miLogP), área superficial polar topológica (TSPA), número de átomos (Natoms), peso molecular (M.Wt), número de enlaces aceptores de hidrógeno (nON), número de enlaces donantes de hidrógeno (nOHNH), número de infracciones o violaciones moleculares (NVio), número de enlaces rotativos (Nrob) y Volumen Molecular (Volumen).

Se sabe que la Regla de los cinco de Lipinski (Ro5) no es considerada para los productos naturales por tener en sí mismas comprendidas todas las propiedades fisicoquímicas idóneas para un ambiente fisiológico⁵¹; sin embargo, para compuestos semisintéticos y sintéticos deben aplicarse para reconocer si se cumplen en cierto límite los parámetros para una buena absorción oral o con la permeabilidad membranal considerados como la primera directriz en Química Medicina Nicolaou.⁵²

Esta regla predice si pudiera haber una mala absorción o permeación si la molécula presenta más de 5 enlaces donantes de hidrógeno, más de 10 enlace aceptores de hidrógeno, si el peso molecular peso es mayor de 500 y si el valor del coeficiente de partición calculado es mayor de 5 y para el caso de miLogP 4.15.⁵³

Es así que la **tabla 6**, muestra que el compuesto (**1b**) presenta un valor de miLogP superior con 5.08 y a su vez muestra una infracción molecular. En cuanto al número de enlaces rotatorios (Nrotb) el compuesto (**1a**) es el que presenta mayor número de ellos, lo cual se puede interpretar como la molécula con mayor flexibilidad del presente estudio. El resto de los parámetros muestran que las moléculas cumplen con la Regla de los cinco de Lipinski, indometacina al ser un fármaco sintético comercial también cumple.

Tabla 6. Datos fisicoquímicos obtenidos a partir de la plataforma *Molinspiration* para **(1, 1a-1d)** e Indometacina.

Compuesto	miLogP	TPSA	Natoms	M.Wt.	nON	nOHNH	nVio.	Nrotb	Volume
(1)	4.81	66.76	25	338.40	4	2	0	3	316.14
(1a)	4.35	78.92	31	422.48	6	0	0	7	389.17
(1b)	5.08	55.77	26	352.43	4	1	1	4	333.67
(1c)	4.60	55.77	25	338.40	4	1	0	1	312.16
(1d)	3.83	55.77	25	338.40	4	1	0	1	312.21
Indometacina	3.99	68.54	25	357.79	5	1	0	4	303.24

Coefficiente de partición de *molinspiration* (**miLogP**), área superficial polar topológica (**TPSA**), núm. de átomos (**Natoms**), peso molecular (**M.Wt**), núm. de enlaces aceptores de hidrógeno (**nON**), núm. de enlaces donantes de hidrógeno (**nOHNH**), núm. de infracciones o violaciones moleculares (**NVio**), núm. de enlaces rotativos (**Nrotb**) y Volumen Molecular (**Volume**).

Por otra parte, *Molinspiration* permite la predicción de actividades biológicas aportando un cálculo de la puntuación de bioactividad; reconociendo que entre más cercano a 1 sea el valor mayor probabilidad de contar con dicha bioactividad. Es así que se muestra la bioactividad como posible ligando para receptores acoplados a proteína G (**GPCR-L**), modulador de canales iónicos (**ICM**), inhibidor de quinasa (**KI**), ligando para receptores nucleares (**NR-L**), inhibidor de proteasa (**PI**) y en general inhibidor enzimático (**EI**).

La **tabla 7**, muestra los valores obtenidos del cálculo de puntuación de bioactividad obtenido por *molinspiration* para los compuestos **(1, 1a-1d)** e indometacina; con los resultados obtenidos es posible identificar cual es la bioactividad predictiva para cada uno de ellos.

Tabla 7. Datos de bioactividad obtenidos a partir de a partir de la plataforma *Molinspiration* para (1, 1a-1d) e Indometacina.

Bioactividad	(1)	(1a)	(1b)	(1c)	(1d)	Indometacina
GPCR-L	0.23	0.10	0.20	0.29	0.05	0.24
ICM	-0.12	-0.16	-0.15	-0.04	-0.23	-0.31
KI	-0.21	-0.25	-0.21	-0.30	-0.56	-0.11
NR-L	0.70	0.51	0.63	0.71	0.37	0.42
PI	0.11	0.04	0.07	0.27	-0.13	-0.11
EI	0.44	0.29	0.40	0.36	0.33	0.30

Ligando para receptores acoplados a proteína G (**GPCR-L**), modulador de canales iónicos (**ICM**), inhibidor de quinasa (**KI**), ligando para receptores nucleares (**NR-L**), inhibidor de proteasa (**PI**) y en general inhibidor enzimático (**EI**).

7.1.2. Análisis mediante *SwissTargetPrediction*

Las diferentes técnicas de diseño de fármacos asistido por computadora son importantes para respaldar de manera eficiente el desarrollo experimental de nuevos fármacos, las propiedades calculadas y predictivas dependen de las características de las moléculas en estudio y con ello es posible aproximarse con la farmacodinamia o la farmacocinética de las estructuras moleculares que se investigan. La **tabla 8**, muestra los blancos moleculares biológicos más relevantes obtenidos a través de la plataforma *SwissTargetPrediction*, con los cuales podrían tener interacción importante los compuestos (1), (1a-1d) e indometacina y las propiedades moleculares consideradas para el diseño molecular considerando la biodisponibilidad oral. De la predicción obtenida a partir de la plataforma *SwissTargetPrediction* es posible observar que la interacción enzimática cuenta con el mayor porcentaje para los compuestos (1, 1a y 1b), seguido de un alto porcentaje de posible interacción con receptores nucleares y para el caso de (1c) los dos blancos más destacados son la liasa y receptores nucleares, finalmente tanto el compuesto (1d) como indometacina tienen con mayor porcentaje de posible interacción con receptores acoplados a la familia A de la proteína G, seguido de su posible interacción con enzimas. Por otra parte, en la misma tabla 8 es posible apreciar que todas las moléculas analizadas caen en la zona permitida para una biodisponibilidad oral favorable al cumplir los rangos establecidos para ello: Lipofilicidad (**LIPO**): $-0.7 < XLOGP3 < +5.0$; Tamaño (**SIZE**): $150 \text{ g/mol} < MV < 500 \text{ g/mol}$; Polaridad (**POLAR**): $20 \text{ \AA} < TPSA < 130 \text{ \AA}$; Insolubilidad (**INSOLU**): $0 < \text{Log S (ESOL)} < 6$; Insaturación (**INSATU**): $0.25 < \text{fracción } C_{sp3} < 1$ y Flexibilidad (**FLEX**): $0 < \text{Num. enlaces rotatorios} < 9$.

Tabla 8. Predicción de los porcentajes de interacción con blancos moleculares biológicos con los cuales podrían tener interacción importante los compuestos (1), (1a-1d) e indometacina y las propiedades moleculares consideradas para el diseño molecular considera.

Molécula	Predicción de los porcentajes de interacción con blancos moleculares biológicos	Propiedades moleculares identificadas para el diseño molecular considerando la biodisponibilidad oral
(1)	<p> ■ Nuclear receptor ■ Cytochrome P450 ■ Primary active transporter ■ Enzyme ■ Hydrolase ■ Family A G protein-coupled receptor ■ Oxidoreductase ■ Secreted protein ■ Electrochemical transporter </p>	
(1a)	<p> ■ Primary active transporter ■ Nuclear receptor ■ Cytochrome P450 ■ Enzyme ■ Hydrolase ■ Protease ■ Family A G protein-coupled receptor ■ Taste family G protein-coupled receptor </p>	
(1b)	<p> ■ Nuclear receptor ■ Cytochrome P450 ■ Primary active transporter ■ Enzyme ■ Oxidoreductase ■ Hydrolase ■ Family A G protein-coupled receptor ■ Protease </p>	

Continuación Tabla 8.

(1c)	<p> ■ Nuclear receptor ■ Primary active transporter ■ Cytochrome P450 ■ Oxidoreductase ■ Family A G protein-coupled receptor ■ Enzyme ■ Taste family G protein-coupled receptor ■ Lyase </p>	
(1d)	<p> ■ Kinase ■ Family A G protein-coupled receptor ■ Other nuclear protein ■ Voltage-gated ion channel ■ Electrochemical transporter ■ Membrane receptor ■ Enzyme ■ Toll-like and IL-1 receptors ■ Other cytosolic protein </p>	
Indometacina	<p> ■ Nuclear receptor ■ Enzyme ■ Secreted protein ■ Oxidoreductase ■ Family A G protein-coupled receptor ■ Primary active transporter </p>	

7.1.3. Análisis mediante *PASS Online*.

Para el análisis de la predicción de actividad biológica de diferentes moléculas es posible utilizar la plataforma *PASS Online*. *PASS* (Predicción de espectros de actividad para sustancias) es un producto de *software* diseñado como una herramienta para evaluar el potencial biológico general de una molécula orgánica parecida a un fármaco. *PASS* proporciona predicciones simultáneas de muchos tipos de actividad biológica basadas en la estructura de compuestos orgánicos. Por lo tanto, *PASS* se puede utilizar para estimar los perfiles de actividad biológica de moléculas virtuales, antes de su síntesis química y prueba biológica. **Pa** (probabilidad de "ser activo") estima la probabilidad de que el compuesto estudiado

pertenezca a la subclase de compuestos activos (se asemeja a las estructuras de las moléculas, que son las más típicas en un subconjunto de "activos" en la biblioteca de *PASS*). **Pi** (probabilidad "de estar inactivo") estima la probabilidad de que el compuesto estudiado pertenezca a la subclase de compuestos inactivos (se asemeja a las estructuras de las moléculas, que son las más típicas en un subconjunto de "inactivos" en la biblioteca de *PASS*). La **tabla 9**, muestra los valores de Pa y Pi para los compuestos en estudio (**1**, **1a-1d**) e indometacina; considerando la probabilidad de ser activo hasta el 70 %. Como es posible observar en la **tabla 9**, todos los compuestos presentan una alta probabilidad de actividad antioxidante y antiinflamatoria entre otras actividades que directa o indirectamente se encuentran relacionadas con la actividad antiinflamatoria.

Tabla 9. Valores de **Pa** y **Pi** obtenidos por *PASS Online* para los compuestos en estudio (**1**, **1a-1d**) e indometacina; considerando la probabilidad de ser activo hasta el 70 %.

Flavanona 1		
Pa	Pi	Activity name
0,946	0,004	Membrane integrity agonist
0,926	0,002	UGT1A9 substrate
0,922	0,002	Lipid peroxidase inhibitor
0,904	0,003	CYP2C19 substrate
0,883	0,003	Reductant
0,860	0,002	NOS2 expression inhibitor
0,864	0,006	CYP2C substrate
0,857	0,002	Free radical scavenger
0,852	0,001	Skin whitener
0,861	0,017	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
0,833	0,004	UGT1A substrate
0,833	0,004	UDP-glucuronosyltransferase substrate
0,809	0,001	Melanin inhibitor
0,811	0,003	Cytochrome P450 stimulant
0,798	0,004	Cardiovascular analeptic
0,816	0,027	Ubiquinol-cytochrome-c reductase inhibitor
0,793	0,007	CYP1A substrate
0,782	0,008	Antiinflammatory
0,778	0,004	Antioxidant
0,767	0,004	UGT1A1 substrate
0,765	0,005	Chemopreventive
0,764	0,015	TP53 expression enhancer
0,753	0,018	Antineoplastic
0,739	0,007	Anticarcinogenic
0,738	0,010	CYP3A4 inducer
0,739	0,012	Respiratory analeptic
0,751	0,034	CYP2J substrate
0,720	0,006	Hepatoprotectant
0,725	0,013	Apoptosis agonist
0,711	0,004	UGT1A3 substrate
0,711	0,008	Antihypercholesterolemic
0,713	0,011	CYP3A inducer
0,703	0,005	Antiulcerative

Flavanona 1a		
Pa	Pi	Activity name
0,925	0,002	Lipid peroxidase inhibitor
0,879	0,016	Membrane integrity agonist
0,828	0,024	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
0,824	0,008	CYP2C substrate
0,803	0,007	Antiinflammatory
0,796	0,001	Skin whitener
0,793	0,013	Antineoplastic
0,793	0,003	Free radical scavenger
0,788	0,004	Reductant
0,788	0,012	TP53 expression enhancer
0,765	0,005	UGT1A9 substrate
0,744	0,011	Apoptosis agonist
0,738	0,007	UGT1A substrate
0,735	0,003	Expectorant
0,735	0,012	UDP-glucuronosyltransferase substrate
0,729	0,005	Antineoplastic (breast cancer)
0,726	0,005	CYP2C19 substrate
0,723	0,005	Antiulcerative
0,718	0,007	Hepatoprotectant
0,710	0,014	Respiratory analeptic
0,704	0,008	Anticarcinogenic

Flavanona 1b		
Pa	Pi	Activity name
0,934	0,002	UGT1A9 substrate
0,927	0,002	Lipid peroxidase inhibitor
0,922	0,006	Membrane integrity agonist
0,905	0,003	CYP2C19 substrate
0,896	0,002	Free radical scavenger
0,867	0,001	Skin whitener
0,848	0,002	NOS2 expression inhibitor
0,851	0,007	CYP2C substrate
0,849	0,019	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
0,832	0,005	UDP-glucuronosyltransferase substrate
0,822	0,004	UGT1A substrate
0,816	0,004	Reductant
0,798	0,004	Cardiovascular analeptic
0,792	0,003	UGT1A3 substrate
0,787	0,001	Melanin inhibitor
0,790	0,007	CYP1A substrate
0,800	0,033	Ubiquinol-cytochrome-c reductase inhibitor
0,762	0,004	UGT1A1 substrate
0,756	0,005	Chemopreventive
0,752	0,009	CYP3A4 inducer
0,742	0,005	Cytochrome P450 stimulant
0,744	0,007	Anticarcinogenic
0,740	0,011	Antiinflammatory
0,747	0,019	Antineoplastic
0,727	0,006	Hepatoprotectant
0,723	0,011	CYP3A inducer
0,720	0,013	Apoptosis agonist
0,709	0,005	CYP1A inhibitor
0,709	0,005	Antiulcerative
0,706	0,003	Expectorant
0,723	0,022	TP53 expression enhancer
0,702	0,002	CYP1A1 inhibitor

Flavanona 1c		
Pa	Pi	Activity name
0,930	0,002	Lipid peroxidase inhibitor
0,907	0,004	CYP1A substrate
0,893	0,002	Cytochrome P450 stimulant
0,876	0,004	CYP1A1 substrate
0,876	0,018	CYP2C12 substrate
0,856	0,004	CYP3A4 inducer
0,824	0,005	CYP3A inducer
0,801	0,008	CYP2B6 substrate
0,786	0,003	Free radical scavenger
0,780	0,004	Antioxidant
0,797	0,030	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
0,777	0,013	TP53 expression enhancer
0,755	0,005	Chemopreventive
0,759	0,010	Apoptosis agonist
0,743	0,011	Antiinflammatory
0,715	0,002	NOS2 expression inhibitor
0,718	0,008	CYP1A2 substrate
0,723	0,015	CYP2C substrate
0,718	0,023	CYP3A4 substrate
0,742	0,047	Membrane integrity agonist

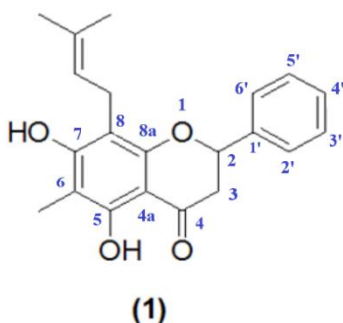
Flavanona 1d		
Pa	Pi	Activity name
0,902	0,005	HIF1A expression inhibitor
0,861	0,002	NOS2 expression inhibitor
0,862	0,003	Cytochrome P450 stimulant
0,844	0,002	Free radical scavenger
0,823	0,005	CYP1A substrate
0,813	0,006	CYP3A4 inducer
0,796	0,001	Skin whitener
0,793	0,001	Melanin inhibitor
0,790	0,004	Lipid peroxidase inhibitor
0,807	0,028	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
0,807	0,035	CYP2C12 substrate
0,778	0,007	CYP3A inducer
0,762	0,005	Chemopreventive
0,772	0,015	Antineoplastic
0,759	0,004	Antioxidant
0,757	0,006	CYP1A1 substrate
0,747	0,011	Apoptosis agonist
0,698	0,009	CYP1A2 substrate
0,701	0,017	CYP2C substrate

Indometacina		
Pa	Pi	Activity
0,850	0,003	Antipyretic
0,832	0,010	Gluconate 2-dehydrogenase (acceptor) inhibitor
0,755	0,004	Non-steroidal antiinflammatory agent
0,711	0,014	Antiinflammatory

Es así que el análisis *in silico* realizado a los compuestos (**1**, **1a-1d**), permite identificarlos con alta posibilidad de contar con actividad antiinflamatoria y contar con las propiedades fisicoquímicas necesarias para considerarlos potenciales agentes antiinflamatorios.

7.1. Obtención de (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**1**).

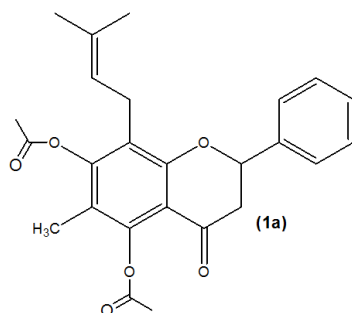
La flavanona (**1**) se obtuvo del extracto metanólico de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa*, a través de una cromatografía en columna abierta partiendo de 10 gramos de extracto; estos se adsorbieron en 10 gramos de sílica gel y se montó una columna con 150 gr de sílica gel 60, se eluyó la columna con un sistema Hexano: Acetato de etilo, iniciando con 100 % hexano y aumentando gradualmente la polaridad con proporciones de acetato de etilo. La flavanona (**1**) se obtuvo como un sólido amarillo (121 mg) se obtuvo en un sistema 96:04 Hexano:Acetato de etilo, su punto de fusión fue de 174 - 177 °C y su R_f = 0.454 (4:1 Hex: AcOEt), con estos datos fue autenticada con una muestra auténtica disponible en el laboratorio para su caracterización inequívoca mediante cromatografía en capa fina.



7.2. Obtención de los compuestos farmacomodulados.

7.2.1 (2S)-5,7-diacetil-6-metil-8-prenilflavanona (**1a**).

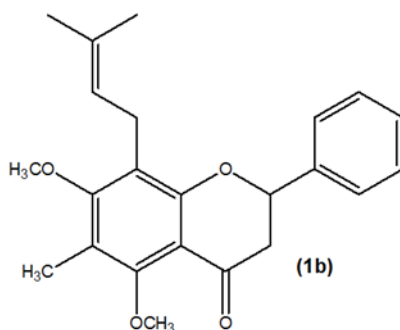
Siguiendo la metodología propuesta para la preparación del modulado éster se colocaron 10 mg (0.0295 mmol) del compuesto (**1**) bajo condiciones de acetilación y una vez concluida la reacción al observar el proceso de la misma mediante TLC se procedió a realizar la extracción correspondiente obteniéndose 22.6 mg del compuesto (**1a**) sólido amarillo con punto de fusión de 68.70 °C y un R_f = 0.45 (4:1 Hex:AcOEt).



El compuesto (**1a**) fue autenticado con una muestra auténtica disponible en el laboratorio para su caracterización inequívoca mediante cromatografía en capa fina.

7.2.2. (2*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-6-metil-8-prenilflavanona (**1b**).

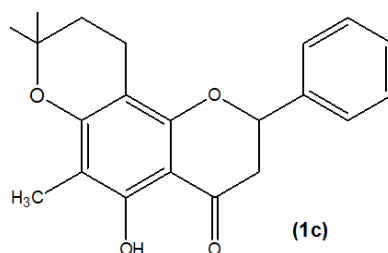
Dando seguimiento a la metodología en la preparación de los modulaos metilados se colocaron 14.5 mg (0.0428 mmol) del compuesto (**1**), bajo las condiciones de reacción en éter dietílico y adicionado 10 ml de la solución del diazometano preparado suspendido en éter, hasta lograr la conclusión de la transformación de la materia prima en el modulado metilado (**1b**) identificándolo como la (2*S*)-5-hidroxi-6-metil-7-metoxi-8-prenilflavanona obteniendo 15.1 mg y se obtuvo como un sólido amarillo y su punto de fusión fue de 108-111 °C con un $R_f = 0.73$ (2:3 Hex:CH₂Cl₂).



El compuesto (**1b**) fue autenticado con una muestra auténtica disponible en el laboratorio para su caracterización inequívoca mediante cromatografía en capa fina.

7.2.3. (8*S*)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dihidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (**1c**).

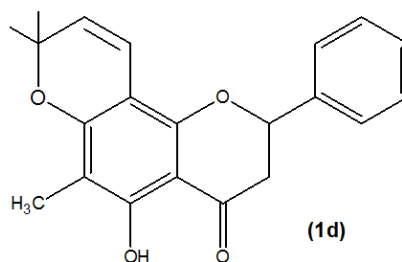
Se sometieron a reacción 17.5 mg (0.0517 mmol) del compuesto (**1**), bajo las condiciones de reacción para la preparación del modulado ciclizado con 10 ml de ácido fórmico 2 horas a reflujo a 60 °C en baño maría con agitación; transcurrida la reacción se dejó enfriar 6 horas y por recristalización en baño de hielo se obtuvieron 19.4 mg del correspondiente modulado (**1c**), como un sólido amarillo con punto de fusión de 51-53 °C y $R_f = 0.76$ (1:4 Hex : CH₂Cl₂).



El compuesto (**1c**) fue autenticado con una muestra auténtica disponible en el laboratorio para su caracterización inequívoca mediante cromatografía en capa fina.

7.2.4. (8*S*)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dehidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (**1d**).

La preparación del modulado vinílico ciclizado (**1d**), se llevó a cabo de la siguiente manera: 34.2 mg (0.1012 mmol) del compuesto (**1**), se sometieron a reacción en un matraz de 3 bocas de 100 ml con 94 mg de DDQ en 10 ml de benceno seco a reflujo a una temperatura de 78 °C por un periodo de 4 horas, concluida la reacción se filtró en caliente y se lavó con CH₂Cl₂ obteniéndose un crudo de reacción de peso 73.5 mg, mismo que por recristalización se obtuvieron 17 mg del modulado vinílico ciclizado (**1d**) como un líquido amarillo oscuro con $R_f = 0.48$ (3:7 Hex : CH₂Cl₂), una vez concluida la reacción se determinaron sus propiedades físicas y espectroscópicas reconociendo que este modulado ya ha sido reportado con anterioridad por Ahluwalia en 1988, corroborándose la identidad del modulado (**1d**) por comparación con los datos espectroscópicos reportados anteriormente encontrándose que se trata de la misma sustancia química.⁵⁰



El compuesto (**1d**) fue autenticado con una muestra auténtica disponible en el laboratorio para su caracterización inequívoca mediante cromatografía en capa fina.

Para los cuatro farmacomodulados se les realizó la comparación y el análisis por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-¹H) y Carbono 13 (RMN-¹³C), en las **tablas 10** y **11**, se presentan los datos correspondientes para estos compuestos disponibles en el laboratorio.⁵⁰

Tabla 10. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) de la flavanona natural y los farmacomodulados.

Hidrógeno	1 δ (ppm); <i>multi</i> ; <i>J</i> (Hz) 400 MHz	1a δ (ppm); <i>multi</i> ; <i>J</i> (Hz)	1b δ (ppm); <i>multi</i> ; <i>J</i> (Hz)	1c δ (ppm); <i>multi</i> ; <i>J</i> (Hz)	1d δ (ppm); <i>multi</i> ; <i>J</i> (Hz)
H-2	5.40; <i>dd</i> ; 12.8, 3	5.44; <i>dd</i> ; 12.8, 3.2	5.42; <i>dd</i> ; 12.8, 3.2	5.38; <i>dd</i> ; 12.8, 3.2	5.37; <i>dd</i> ; 12.8, 3.2
H-3 α	3.04; <i>dd</i> ; 20, 16	3.03; <i>dd</i> ; 16.8, 12.8	3.05; <i>dd</i> ; 17.2, 12.8	3.02; <i>dd</i> ; 17.2, 12.8	2.99; <i>dd</i> ; 16.8, 12.8
H-3 β	2.85; <i>dd</i> ; 20, 3	2.87; <i>dd</i> ; 16.8, 3.2	2.86; <i>dd</i> ; 17.2, 3.2	2.83; <i>dd</i> ; 17.2, 3.2	2.80; <i>dd</i> ; 16.8, 3.2
5 (-OH)	12.35 <i>s</i>	----	12.02; <i>s</i>	12.33; <i>s</i>	12.19; <i>s</i>
6 (-CH ₃)	2.04 <i>s</i>	2.03; <i>s</i>	2.10; <i>s</i>	1.98; <i>s</i>	1.96; <i>s</i>
7 (-OH)	6.30 <i>s</i>	----	----	---	----
-C ₆ H ₅	7.44 <i>m</i>	7.44; <i>m</i>	7.45; <i>m</i>	7.43; <i>m</i>	7.42; <i>m</i>
H-1''	3.38; <i>d</i> ; 8		3.31; <i>d</i> ; 6.8	2.64; <i>td</i> ; 7.2, 3.2	6.60; <i>d</i> ; 10
H-2''	5.25; <i>t</i> ; 8	4.89; <i>tc</i> ; 6.8, 1.2	5.21; <i>tc</i> ; 6.8, 1.2	1.79; <i>t</i> ; 6.8	5.47; <i>d</i> ; 10
3'' (-CH ₃)	1.84 <i>s</i>	1.77; <i>s</i>	1.79; <i>s</i>	1.35; <i>s</i>	1.42; <i>s</i>
3'' (-CH ₃)	1.78 <i>s</i>	1.67; <i>s</i>	1.69; <i>s</i>	1.25; <i>s</i>	1.40; <i>s</i>
5 (-OCOCH ₃)	----	2.03; <i>s</i>	----	----	----
7 (-OCH ₃)	----	---	3.75; <i>s</i>	----	----
7 (-OCOCH ₃)	----	2.33; <i>s</i>	----	----	----

Tabla 11. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de carbono (RMN-¹³C) de la flavanona natural y los farmacomodulados.

Carbono	1 δ (ppm)	1a δ (ppm)	1b δ (ppm)	1c δ (ppm)	1d δ (ppm)
C-2	78.83	79.32	78.76	78.60	78.80
C-3	43.70	45.50	43.97	43.76	43.66
C-4	196.04	198.179	197.34	196.25	196.21
C-4a	103.05	106.557	105.35	101.79	102.70
C-5	159.11	159.67	159.21	159.23	159.52
C-6	103.57	128.857	115.59	102.18	102.80
6 (-CH₃)	7.72	10.029	9.02	7.76	7.70
C-7	162.45	161.33	165.37	161.20	160.14
C-8	106.40	106.78	109.94	104.51	104.72
C-8a	158.36	156.86	158.23	157.25	156.37
C-1'	139.29	138.67	138.93	139.44	138.98
C-2'/C-6'	126.16	126.03	126.00	126.13	126.70
C-3'/C-5'	129.04	128.94	128.93	128.95	128.91
C-4'	128.80	128.94	128.90	128.95	128.70
C-1''	21.58	23.84	22.37	27.01	115.77
C-2''	121.81	121.31	122.87	126.13	126.09
C-3''	136.19	132.33	131.81	128.95	128.70
3'' (-CH₃)	26.11	25.88	18.16	16.18	28.77
3'' (-CH₃)	18.11	18.16	26.05	27.22	28.67
5 (-OCOCH₃)	----	----	----	----	----
5 (-OCOCH₃)	----	21.33	----	----	----
7 (-OCOCH₃)	----	169.11	----	----	----
7 (-OCOCH₃)	----	79.32	----	----	----

7.3. Resultados de la evaluación antiinflamatoria.

7.3.1. Eficacia antiinflamatoria intrínseca.

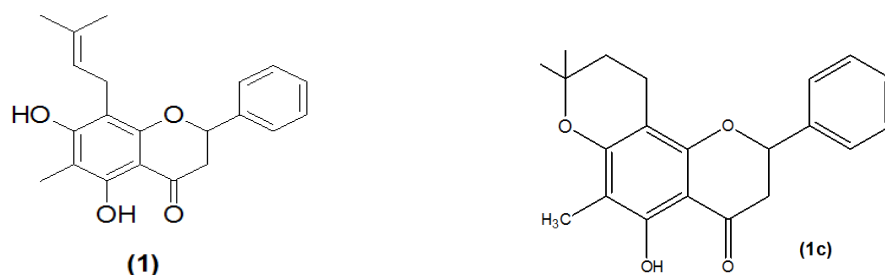
Una vez realizada la experimentación *in vivo* de los compuestos libres, los resultados obtenidos en la evaluación de antiinflamatoria empleando el modelo *in vivo* de inducción de inflamación por TPA en oreja de ratón descrito en la metodología se muestran en la **tabla 12**.

Tabla 12. Resultados de la evaluación antiinflamatoria intrínseca.

Compuesto	Porcentaje de inhibición de la inflamación
1	12.20 ± 1.12
1a	16.02 ± 1.47
1b	36.66 ± 2.02
1c	71.64 ± 7.86*
1d	37.79 ± 2.83
Indometacina	91.00 ± 0.46*

Análisis de varianza ANOVA *P<0.05 en comparación a la flavanona **1**.

Con los resultados obtenidos de la evaluación antiinflamatoria de los compuestos libres sin formular es posible identificar que la actividad antiinflamatoria aumento con respecto a la flavanona natural de partida (**1**) considerado compuesto líder o cabeza de serie, encontrando que el compuesto (**1c**) es el que presenta el mayor efecto con un porcentaje de inhibición de la inflamación de 71.64 ± 7.86 ; al identificar que se trata del modulado ciclizado es posible postular que la rigidez molecular favorece la interacción molecular con alguno de los blanco terapéuticos implicados en la inflamación.



7.4. Preparación de las nanoemulsiones.

Inicialmente se elaboró la nanoemulsión blanca (**NEB**), la cual presentó un color amarillo claro, a partir de esto fue posible formular por separado los diferentes compuestos (**1**), (**1a**), (**1b**), (**1c**) (**NE1**, **NE1a-NE1c**), obteniéndose para cada una de ellas un líquido fluido monofásico de un color amarillo claro y por su parte, la nanoemulsión de indometacina (**NEINDO**) mantuvo la coloración natural de los componentes de la formulación, siendo también monofásica, la caracterización realizada fue visual. (**figura 20**). Sin embargo, no fue posible la preparación de la nanoemulsión de **1d** (**NE1d**), quedando pendiente para un estudio posterior. (**figura 20**)



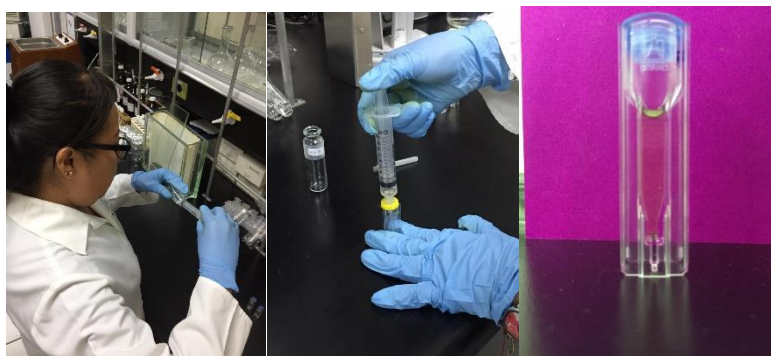


Figura 20. Preparación de las nanoemulsiones.

7.5. Resultados de la caracterización de los sistemas nanoestructurados.

7.5.1. Determinación de la caracterización visual.

Las nanoemulsiones se observaron en contraste contra una superficie lisa y se logró evidenciar que eran monofásicas y homogéneas por lo cual fue posible continuar con su caracterización mediante el equipo Z-sizer.

7.5.2 Determinación de tamaño de gotícula por medio de Z-Sizer.

La caracterización de las nanoemulsiones (**NEB, NEINDO, NE1, NE1a-NE1c**), consistió en determinar la medición del tamaño de gotícula a una temperatura de 25 °C, los resultados se muestran en la **tabla 13**, en este análisis se empleó el equipo Z-Sizer como se menciona en la metodología; cabe destacar que la caracterización se realizó por triplicado. (**figura 21**)

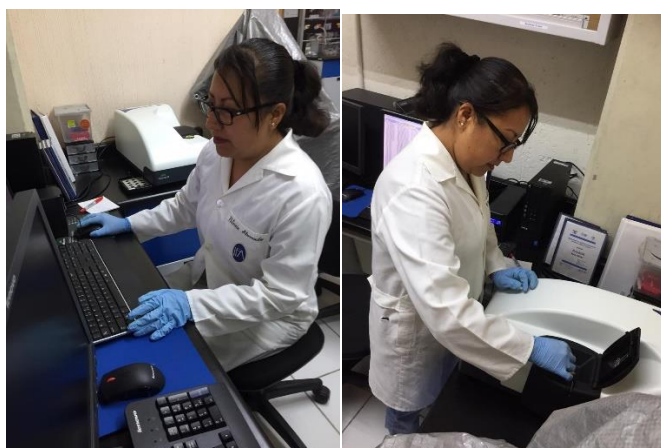


Figura 21. Determinación del tamaño de gotícula.

Tabla 13. Valores promedio de tamaños de gotícula e índice de polidispersión de las nanoemulsiones **NEB, NEIND, NE1, NE1a-NE1d** a 25 °C.

Nanoemulsión	Valores promedio de tamaño de gotícula (nm)	Índice de polidispersión (IPD)
NEB	13.07 ± 1.973	1.000
	534.3 ± 140.4	
NEINDO	581.00 ± 128.3	0.434
NE1	12.96 ± 2.945	1.000
	573.6 ± 173.3	
NE1a	633.7 ± 166.2	0.664
NE1b	17.93 ± 4.954	0.985
	381.8 ± 205.5	
NE1c	48.45 ± 10.85	1.000
	580.6 ± 213.8	
NE1d	ND	ND

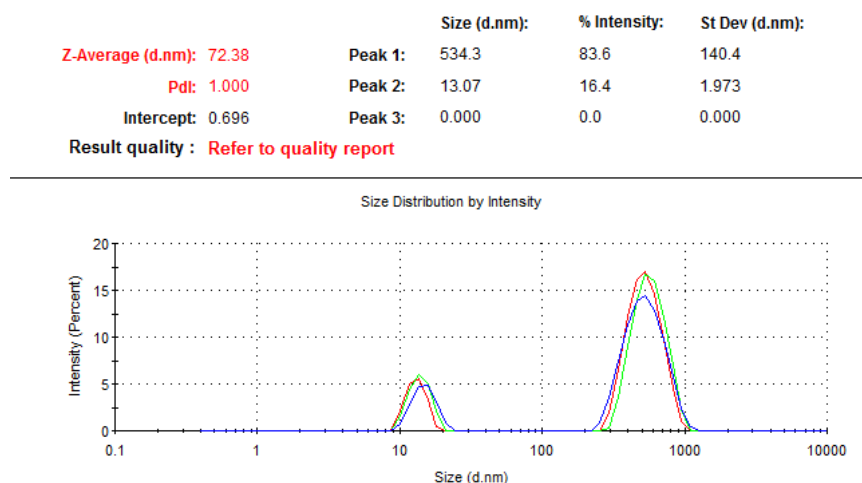
ND= No Determinado

A continuación, se describe la caracterización morfométrica de cada formulación.

7.5.1.1. Nanoemulsión blanca (NEB).

La nanoemulsión blanca permite establecer el referente de comparación con respecto al comportamiento morfométrico con respecto a las formulaciones elaboradas para los diferentes compuestos en estudio.

A una temperatura de 25 °C la **NEB** presentó un tamaño de gotícula de 534.3 ± 140.4 nm y un índice de polidispersión de 1.000 como se muestra en la **gráfica 1**.

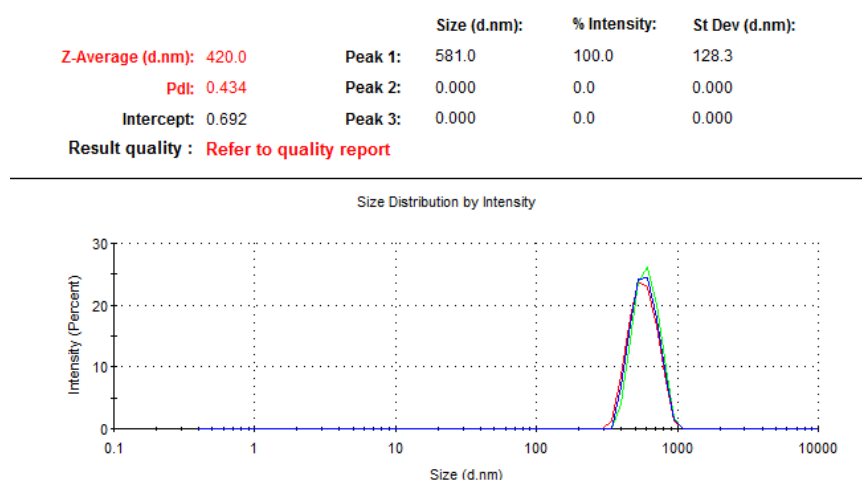


Gráfica 1. Z-Sizer de la nanoemulsión (NEB).

Se logró observar la presencia de una población de gotículas de 13.07 ± 1.973 nm, esta población de gotículas suele presentarse en la formulación libre cuando la presencia de tensoactivo es ligeramente superior a la requerida para la formulación ya que ese ligero exceso se requiere para las interacciones con el principio activo cuando se incorpore a la formulación, por ello no se considera de importancia al preparar formulaciones blancas en las cuales no se cuenta con la presencia del principio activo.²⁹

7.5.1.2. Nanoemulsión con Indometacina (NEINDO).

La determinación del tamaño de gotícula y del índice de polidispersión para la nanoemulsión con indometacina (NEINDO) a una temperatura de 25 °C, los valores obtenidos son 581.00 ± 128.3 nm y un índice de polidispersión de 0.434 como se muestra en la **gráfica 2**. La tendencia de las gotículas que el Z-Sizer proporciona para confirmar a nivel de la formulación que es monomodal.



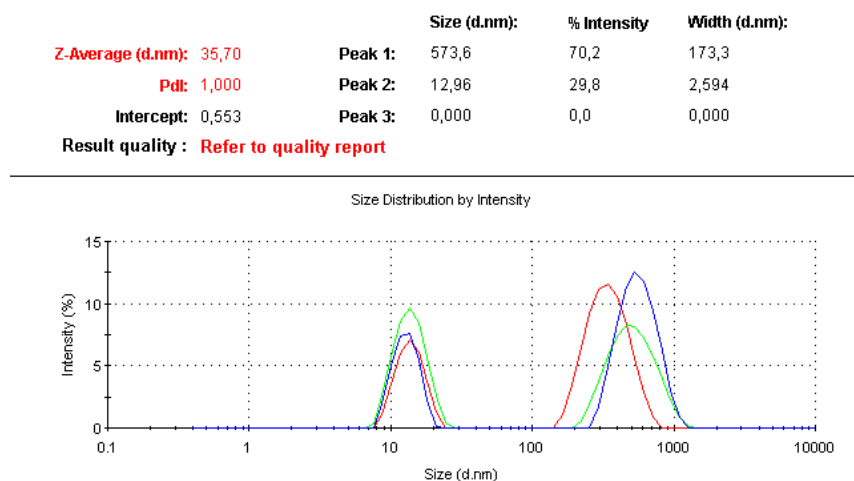
Gráfica 2. Z-Sizer de la nanoemulsión (NEINDO).

Como es posible observar en la gráfica anterior se presenta una única población en donde la totalidad de la formulación cuenta con una población promedio en donde las interacciones moleculares entre los componentes de la formulación y el principio activo incorporado son óptimas.

7.5.1.3. Nanoemulsión con la flavanona natural 1 (NE1).

Los valores del tamaño de gotícula y del índice de polidispersión para la nanoemulsión (NE1) a una temperatura de 25 °C son: 573.6 ± 173.3 nm y un índice de polidispersión de 1.000 como se muestra en

la **gráfica 3**. La tendencia de las gotículas que el Z-Sizer proporciona para confirmar a nivel de la formulación que es bimodal.



Gráfica 3. Z-Sizer de la nanoemulsión (NE1).

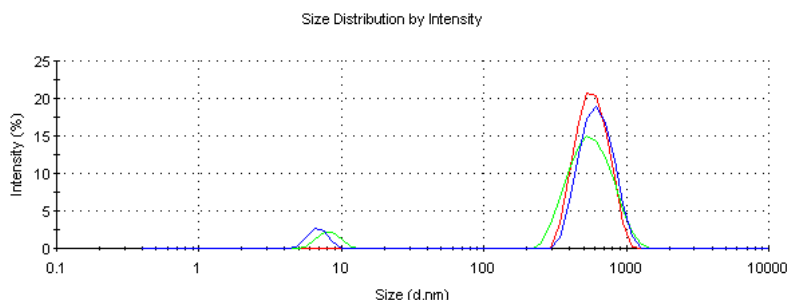
Para la formulación **NE1**, se observa una nanoemulsión bimodal que puede responder a dos fenómenos, el primero que quizás no se requería la misma cantidad de tensoactivo que el resto de las formulaciones;²⁹ o bien, que las interacciones moleculares entre el principio activo y los componentes de la formulación presenten interacciones que permitan la formación de dos tamaños de gotícula, este fenómeno de interacciones moleculares reducen la viscosidad de la nanoemulsión pero a la vez la vuelve más estable.^{31,54}

7.5.1.4. Nanoemulsión con modulado éster 1a (NE1a).

Los valores del tamaño de gotícula y del índice de polidispersión para la nanoemulsión (**NE1a**) a una temperatura de 25°C son: 633.7 ± 166.2 nm y un índice de polidispersión de 0.664 como se muestra en la **gráfica 4**. La tendencia de las gotículas que el Z-Sizer proporciona para confirmar a nivel de la formulación que es monomodal, considerando que la proporción de la población de tamaño de gotícula de 6.862 ± 0.9893 es menor al 10 %.

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 348,1	Peak 1: 633,7	92,6	166,2
Pdl: 0,664	Peak 2: 6,862	7,4	0,9893
Intercept: 0,579	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report



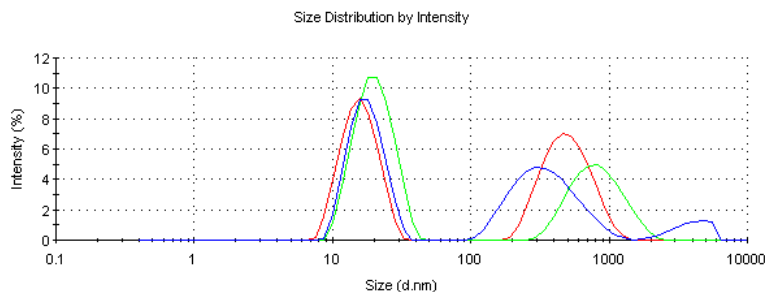
Gráfica 4. Z-Sizer de la nanoemulsión (NE1a).

7.5.1.5. Nanoemulsión con modulado alquilado 1b (NE1b).

Los valores del tamaño de gotícula y del índice de polidispersión para la nanoemulsión (NE1b) a una temperatura de 25 °C son: 17.93 ± 4.954 y 381.8 ± 205.5 nm y un índice de polidispersión de 0.985 como se muestra en la **gráfica 5**, solo en una de las repeticiones se observa un tamaño de gotícula superior a 3,000 nm probablemente por una lectura de aglomeración de gotículas. La tendencia de las gotículas que el Z-Sizer proporciona para confirmar a nivel de la formulación que es bimodal con alta dispersión. En el caso de la formulación del compuesto **1b** es posible observar que la formulación es bimodal y que responda a alguno de los dos fenómenos que se han explicado para el caso de la formulación **NE1**.

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 26,59	Peak 1: 17,93	48,3	4,954
Pdl: 0,985	Peak 2: 381,8	44,7	205,5
Intercept: 0,522	Peak 3: 3981	7,0	1083

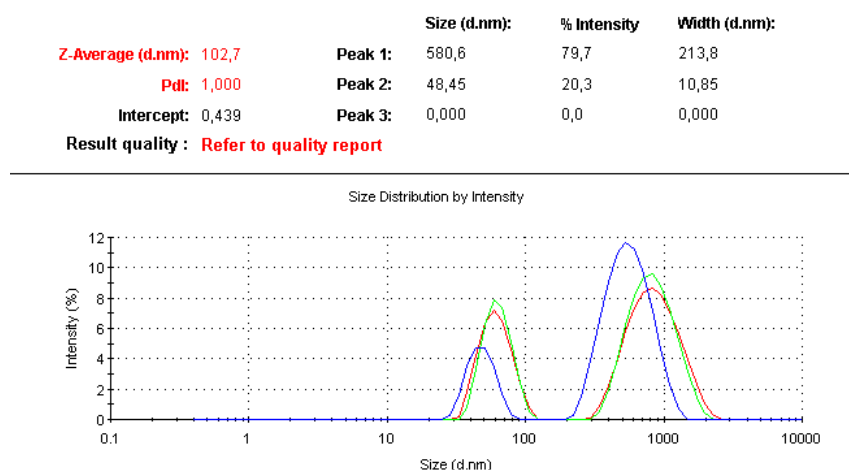
Result quality : Refer to quality report



Gráfica 5. Z-Sizer de la nanoemulsión (NE1b).

7.5.1.6. Nanoemulsión con modulador ciclizado 1c (NE1c).

Los valores del tamaño de gotícula y del índice de polidispersión para la nanoemulsión (NE1c) a una temperatura de 25°C son: 580.6 ± 213.8 nm y un índice de polidispersión de 1.000 ± 0.000 como se muestra en la **gráfica 6**. La tendencia de las gotículas que el Z-Sizer proporciona para confirmar a nivel de la formulación que es bimodal respondiendo de igual forma a los fenómenos explicados anteriormente.



Gráfica 6. Z-Sizer de la nanoemulsión (NE1c).

La preparación de las nanoemulsiones permiten reconocer que la naturaleza de cada compuesto con respecto a la concentración de los componentes de la formulación responden de diferente manera, esto permite reconocer que las interacciones moleculares juegan un papel importante en la formación de las gotículas.^{31,54}

En la literatura se han encontrado compuestos formulados en emulsiones bimodales como es el caso de taxanos lo que permite reconocer que estas formulaciones con una distribución bimodal logran su objetivo de utilizarse en aplicaciones terapéuticas.⁵⁵

8. DISCUSIÓN

8.1 Análisis *in Silico*

Con el análisis *in silico* fue posible identificar que los compuestos en estudio cumplen la Regla de las 5 de Lipinski,⁵³ lo cual permite considerar que a futuro podrías aplicarse por vía oral y tener una buena absorción y/o permeación membranal. Por ello, se considera que la tabla 6 representa las propiedades más importantes para el diseño molecular; se sabe que existen flavonoides formulados para su administración vía oral que tienen parámetros de absorción importantes cuando se realizaron pruebas *in vivo*, sabiendo también que son potenciales antiinflamatorios y que comparten propiedades similares con las flavanonas en estudio.⁵⁶ Por lo cual, con la predicción realizada con *Molinspiration* es posible pensar que las flavanonas (**1**), (**1a-1d**) podrían contar con una buena absorción si se administrara por vía oral. En cuanto a la bioactividad que ofrece *Molinspiration*, es posible identificar que los valores cercanos a 1, son los más promisorios y así la tabla 7, en la predicción muestra con mayor porcentaje la actividad como ligando de receptores nucleares y como inhibidores enzimáticos; con ello se reconoce que estos podrían ser mecanismos de acción por los cuales podrían actuar las flavanonas en estudio considerando su posible interacción con las citocinas, o bien, inhibiendo las enzimas involucradas en la cascada del ácido araquidónico.^{57,58} La flavanona natural (**1**) ya ha mostrado interacción tanto en la inhibición de Fosfolipasa A₂ (PLA₂) como ciclooxigenasa e interacción con la expresión de interleucinas de una forma de baja a moderada.

Con el análisis realizado mediante *SwissTargetPrediction*, confirma con alto porcentaje la interacción con los mismos blancos terapéuticos considerados por *Molinspiration*, por lo cual, es posible confirmar la posibilidad de contar con potenciales sustancias con actividad biológica sobre receptores nucleares y/o inhibición enzimática. *SwissTargetPrediction* también ofrece características importantes sobre aspectos farmacocinéticos, principalmente la alta biodisponibilidad de los compuestos ya que se confirma su cumplimiento de la regla de las 5 de lipinski. (Tabla 8)

Mediante *PASS Online* es posible predecir el espectro de actividad de las sustancias analizadas y proporciona los valores de Pa (Probabilidad de ser activo) y Pi (Probabilidad de ser inactivo). (tabla 9) El valor máximo que se consigue con esta plataforma predictiva es de 1 por lo cual se puede considerar como 100 % de probabilidad de ser activo cuando Pa sea igual a 1.0; es así que para este análisis se

decidió considerar la predicción por *PASS Online* hasta un valor de Pa entre 0.70 a 1.0; es decir, solo aquellas actividades en las cuales se tuviera hasta el 70 % de probabilidad de ser activo como se muestra en la tabla 9. bajo esta consideración, se encontró que todos los compuestos analizados podrían contar con la capacidad antiinflamatoria, antioxidante y/o antineoplásica entre otras. Este hecho concuerda con los datos obtenidos para algunas flavanonas anteriormente reportadas por Domínguez. V. 2014 y Andrade, 2013 y 2017. Por lo cual, los farmacomodulados en estudio podrían contar con actividad antiinflamatoria al ser evaluados en el modelo *in vivo* de TPA en oreja de ratón.

8.2 Obtención de los derivados (1a-1d) a partir de la flavanona natural (1)

Se logró la preparación de los farmacomodulados (**1a-1d**) siguiendo la metodología correspondiente. La caracterización de las moléculas se corroboró por comparación directa con muestras auténticas disponibles en el laboratorio y a través de su análisis por resonancia magnética nuclear. (tablas 10 y 11) Se confirma que las metodologías empleadas para todos los casos son reproducibles tanto en las condiciones de reacción como en las cantidades obtenidas de cada uno de ellos, confirmado la pureza de cada uno de ellos a través de cromatografía en capa fina.

La farmacomodulación como estrategia de diseño de fármacos permite modular algunos aspectos moleculares como el paso de la lipofilia con la formación del derivado éster, la electronegatividad al modificar un grupo hidroxilo por un éter metílico, la libertad conformacional al impedir el libre giro del grupo prenilo y la disposición de electrones de mayor energía como los electrones π al generar el derivado vinílico-ciclizado.³ Todas estas modificaciones se conducen hacia la mejora molecular de la flavanona natural que por sí mismo evaluada *in vivo* no presentaba un porcentaje de inhibición de la inflamación alto (12.20 ± 1.12) de acuerdo con lo reportado por Domínguez-Villegas, V. *et al* 2015. De aquí la importancia de no dejar fuera ningún producto natural que por sí mismo no tenga potencial farmacológico, ya que con la aplicación estratégica molecular ese hecho puede cambiar como en su momento lo afirmaba en 2012 el Dr. Arturo San Feliciano de la Universidad de Salamanca, España, catedrático dedicado a la Química Farmacéutica al encontrar derivados potenciales de moléculas que no poseían ninguna actividad.⁵⁹

8.3 Eficacia antiinflamatoria intrínseca

Los resultados de la evaluación en disolución realizada de los compuestos (**1**), (**1a-1d**) e indometacina en el modelo *in vivo* de inflamación inducida por TPA en oreja de ratón se muestran en la tabla 12, en donde puede observarse que el mejor porcentaje antiinflamatorio después de indometacina es el derivado (**1c**) una vez que se han aplicado sobre la piel en el tejido auricular (aplicación percutánea) obteniendo un porcentaje de inhibición de la inflamación de 71.64 ± 7.86 , considerado alto comparado con el porcentaje obtenido a partir de la flavanona natural (**1**) con un 12.20 ± 1.12 . Si se considera la estrategia de modulación empleada puede establecerse que el restar flexibilidad molecular y reducir los grados de libertad favorece la interacción con los blancos terapéuticos de mejor forma que la flavanona (**1**); analizando el resultado obtenido entre los compuestos ciclizados (**1c**) y (**1d**), se observa que el cambio de hibridación de sp^3 a sp^2 de los carbonos C-1'' y C-2'', no favorece la actividad ya que para (**1d**) se observa menor porcentaje de inhibición de la inflamación; por lo tanto, el aumento de la planaridad molecular no favorece la eficacia antiinflamatoria y por consiguiente el hecho de dispensar electrones π .³ Si se correlaciona este resultado con el resultado de la predicción de actividad antiinflamatoria obtenida por PASS Online es posible observar concordancia; ya que para el derivado (**1c**) el valor de Pa es igual a 0.743 y para (**1d**) es de 0.7. Por lo cual, es posible corroborar que las modificaciones estructurales si repercuten cuando se restan grados de libertad al anclar el grupo prenilo formando un anillo.

Por otra parte, se observa que los compuestos en estudio no resultan competitivos frente a indometacina ya que ninguno cuenta con un porcentaje de inhibición de la inflamación igual o superior a 91.00 ± 0.46 observado.

8.4 Preparación de las nanoemulsiones

Las formulaciones preparadas presentaron un color amarillo claro al realizar el análisis visual, así mismo, todas fueron monofásicas (**NEB**), (**NE1a-NE1c**) y (**NEINDO**). No fue posible prepara la formulación del compuesto (**1d**) por falta de disponibilidad de compuesto y completar el 0.5 % requerido para la formulación. Concluida la caracterización visual se procedió a la determinación del tamaño de gotícula; la tabla 13 muestra los valores obtenidos del diámetro correspondiente a cada distribución. Todas las formulaciones preparadas excepto la formulación de indometacina presentaron 2 poblaciones de nanopartículas ofreciendo una distribución bimodal y por su parte la nanoemulsión de indometacina fue

monomodal; este resultado responde a las interacciones fisicoquímicas entre el compuesto y los componentes de la formulación nanoestructurada que regularmente ocurre por cuestiones de solubilidad en el surfactante.⁶⁰ El tamaño de las gotículas que representan la población más distribuida oscila entre 381.8 ± 205.5 para (**NE1b**) y la mayor de 633.7 ± 166.2 para la (**NE1a**). Es importante reconocer que no se ha desarrollado un diagrama ternario para cada una de los derivados preparados en el presente proyecto de investigación, por esta razón la población de tamaño de gotícula inferior a 50 nm en todos los casos se debe a factores que deben tomarse en cuenta en el proceso de optimización de la formulación como son: la naturaleza del surfactante (aniónico, catiónico, no iónicos), el tiempo y proceso de agitación (ultrasonido, microondas, agitación magnética) para lograr una monodispersión homogénea y estable.⁶¹ Se ha demostrado que el cambio de surfactante favorece la monodispersión al momento de optimizar formulaciones nanoestructuradas experimentales, como es el caso para curcumina en donde el cambio de surfactante favorece la distribución monomodal.⁶¹

Para una aplicación percutánea de una nanoemulsión de alguno de los derivados preparados tendría que tomarse en cuenta la nanoemulsión (**NE1c**), ya que en la evaluación de forma intrínseca (en disolución) fue el compuesto con mayor porcentaje de inhibición de la inflamación, esperando una mayor biodisponibilidad una vez cargado en la formulación nanoestructurada como fue el caso de la flavanona natural (**1**) reportado por Domínguez, V, 2014, que al evaluarse en el modelo *in vivo* de inducción de TPA en oreja de ratón favoreció la biodisponibilidad del compuesto elevando la eficacia antiinflamatoria de un 12.24 ± 0.00 a un 88.29 ± 1.45 al formularla en una nanoemulsión.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvo la flavanona natural (2*S*)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**1**), así como los farmacomodulados: (2*S*)-5,7-diacetil-6-metil-8-prenilflavanona (**1a**), (2*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-6-metil-8-prenilflavanona (**1b**), (8*S*)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dihidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (**1c**) y (8*S*)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dehidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (**1d**). La obtención de los compuestos se corroboró con el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono 13, con excepción del compuesto **1a** que se está en espera de los resultados.

En los resultados de la inhibición de la inflamación en el modelo de TPA en oreja de ratón se obtuvo que la flavanona natural (**1**) tiene una inhibición de 12.20 ± 1.12 , lo cual demuestra que la eficacia antiinflamatoria es mínima, al preparar los farmacomodulados se esperaba que la inhibición de la inflamación aumentara, lo cual se demostró de acuerdo con los resultados obtenidos, para el compuesto (2*S*)-5,7-diacetil-6-metil-8-prenilflavanona (**1a**) a 16.02 ± 1.47 , el (2*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-6-metil-8-prenilflavanona (**1b**) a 36.66 ± 2.02 , en el caso de (8*S*)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dehidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (**1d**) a 37.79 ± 2.83 , y para el compuesto (8*S*)-5-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-dihidropirano-[4a,10a:6,7] flavanona (**1c**) el porcentaje de inhibición de la inflamación fue de 71.64 ± 7.86 , siendo el compuesto de mayor efecto antiinflamatorio seguido de la indometacina empleada como fármaco de referencia que obtuvo un valor de 91.35 ± 0.46 de porcentaje de inhibición. Estos resultados demuestran que al modificar la molécula de la flavanona natural (**1**) evaluados en el modelo de TPA en oreja de ratón a una concentración de 1 mg por oreja favorece el incremento de la actividad antiinflamatoria.

Se prepararon las nanoemulsiones a las cuales se les realizó el análisis de tamaño de gotícula y el índice de polidispersión (**IPD**). Los resultados demuestran que la nanoemulsión de indometacina (**NEIND**) tiene un IPD de 0.434 lo cual indica que se cuenta con una formulación monomodal y homogénea, ya que las nanoemulsiones que cuentan con valores de IPD igual a 1.000 su población de nanogotículas no es homogénea como fueron los casos de las formulaciones: **NE1**, **NE1b** y **NE1c**. La nanoemulsión **NE1a** presenta un IPD de 0.664 lo cual es posible interpretar que existe una homogeneidad intermedia. Los resultados de tamaño de gotícula que se obtuvieron y que se representan en las gráficas muestran que para las nanoemulsiones **NEB**, **NE1**, **NE1a**, **NE1b** y **NE1c** son formulaciones bimodales, lo que quiere decir que existen dos poblaciones con diferente tamaño de gotícula, la estabilidad de estas formulaciones

hasta el momento se ha mantenido sin cambio; por último, la formulación de indometacina (**NEINDO**) fue monomodal y homogénea.

Es así que la preparación de diferentes derivados químicos diseñados a partir de la estrategia de farmacomodulación y evaluados de forma intrínseca en un modelo *in vivo* con inducción de la inflamación con TPA en oreja de ratón se logró la obtención del derivado (**1c**) que al reducir los grados de libertad de la molécula líder de partida (flavanona natural (**1**)) de mejorar la eficacia antiinflamatoria y que al preparar una formulación nanoestructurada en forma de nanoemulsión se logran tamaños de gotícula inferiores a la micra por lo cual caen en el rango de formulaciones nanoestructuradas; que si bien, cuentan con actividad antiinflamatoria ensayada *in vivo*, a través de las predicciones consideradas del análisis *in silico* también podrían contar con actividad anticancerígena. Se piensa en ellas para una aplicación percutánea ya que los parámetros de permeación obtenidos para la flavanona natural (**1**) formulada en nanoemulsión permite a priori considerar que el derivado (**1c**) preparado podría ser un buen candidato para posteriores estudios biofarmacéuticos en espera de un agente antiinflamatorio aplicado por vía percutánea para enfermedades dermatológicas en los que el proceso inflamatorio se encuentre involucrado.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bordés Gonzáles, R., Martínez Beltrán, M., García Olivares, E. & Guisado Barrilao, R. El proceso inflamatorio. *Rev. Enfermería* **4**, 30–33 (1994).
2. Khan Academy, s. f. Immunology of acute vs. chronic inflammation. Available at: <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biological-sciences-practice/biological-sciences-practice-tut/e/assemblies-of-molecules--cells-and-groups-of-cells-within-single-cellular-and-multicellular-organisms>.
3. Delgado Cirilo, A., Minguillón Llombart, C. & Joglar Tamargo, J. Fármacos moduladores de los metabolitos del ácido araquidónico. Estrategias generales de farmacomodulación. in *Introducción a la química terapéutica* 399; 119-142 (2003).
4. Andrés O., P. R., Liulia, C. P., Victor, V. F., Vivian, S. G. & Teresita, I. O. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Cuba. Estomatol.* **35**, 56–61 (1998).
5. Michel, B. Antiinflamatorios no esteroides: efectos cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. *Arq. Bras. Cardiol.* **94**, (2010).
6. Harold Alberto, G. E., Karina Noreica, G. R. & José Domingo, M. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* **10**, 182–271 (2011).
7. Santos-Ramírez, C. *et al.* Antiinflamatorios no esteroideos (AINE). in *Enfermedades reumáticas: Actualización SVR* 923–933 (2013).
8. Vesga, O. E. P. Ciclooxygenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia. *Med UNAB* **7**, (2004).
9. AINES. Antiinflamatorios no esteroideos. Available at: <http://www.proyecto-salud.com.ar/shop/detallenot.asp?notid=9191>.
10. Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R. & Björn C, K. Farmacoterapia de inflamación, fiebre, dolor y gota. in *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica* (2018).
11. Química Alkano DICLOFENAC SODICO. Available at: <http://quimicaalkano.com/product/diclofenac-sodico/>.
12. PLM. VOLTARÉN 24 H Parche transdérmico.
13. Divins, M.-J. Antiinflamatorios tópicos. *Farm. Prof.* **31**, (2017).
14. Agustín, B. E., José, M. B. & Francisco M., C. Ma. Anatomía y fisiología de la piel. in *Manual de Dermatología* (2018).
15. Jesús, M. P. & María-José, N. B. LA PIEL: ESTRUCTURA Y FUNCIONES. *Open course ware*
16. Gisela, N. F. Histología de la piel. *Rev. la Fac. Med. UNAM* **46**, (2003).
17. Brenda Lorena, F., Mercedes, L. & Alfredo, R. INVESTIGACIÓN DE UN FENÓMENO NATURAL: ¿ESTUDIOS IN VIVO, IN VITRO O IN SILICO? *Actual. osteol.* **9**, 239–240 (2013).
18. Thomas, S., Evelyn, M. M. & Eduardo, S. S. Los modelos in silico, una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Elementos* **68**, 45–48 (2007).
19. Evaluación toxicológica mediante estudios relación estructura actividad cuantitativa (QSAR). (2017). Available at: <https://www.azierta.com/blog/toxicologia/evaluacion-toxicologica-mediante-estudios-relacion-estructura-actividad-cuantitativa-qsar>.
20. Antoine, D., Olivier, M. & Vincent, Z. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res.* **47**, W357–W364 (2019).
21. Molinspiration cheminformatics. Available at: <https://www.molinspiration.com/>.
22. SwissTargetPrediction. Available at: <http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>.

23. PASS ONLINE. Available at: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>.
24. Harrold, M. W. & Zavob, R. M. Functional Group Characteristics and Roles. in *Basic Concepts in Medicinal Chemistry* 618 (2018).
25. Claudia, I. & Javier, N. Matrices poliméricas para la liberación controlada de sustancias activas. *Rev. Química PUCP* **16**, (2002).
26. Nuria, L. G. Nanopartículas estímulo-respuesta para la liberación de fármacos. (Universidad Complutense, 2017).
27. Heather, A. E. B., Jeffrey, E. G., Yousuf, M., Sarika, N. & Michael, S. R. Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart Technologies. *BENTHAM Sci.* **16**, 444–460 (2019).
28. Aurea Guadalupe, G. V. Formulación y caracterización de nano-emulsiones de aceite de parafina tipo agua-en-aceite (W/O). (2014).
29. Hugo, E. A. & Eristeo, G. M. Emulsiones. in *Tecnología de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos* (2017).
30. Ana, F., Laura, M., Maria Teresa, C. & Jean Louis, S. NANOEMULSIONES – FORMACIÓN CON BAJA ENERGÍA. in *Nanotecnología: fundamentos y aplicaciones* (2015).
31. Francisco, F. C. Nanoemulsiones de nistatina para el tratamiento de candidiasis muco-cutáneas. (Universita Barcelona, 2012).
32. Kaur, K. NANOEMULSIONS AS DELIVERY VEHICLES FOR FOOD AND PHARMACEUTICALS. in *Formulation, Applications, and Characterization United Kingdom* 612 (2018).
33. Solans Marsa, C., Usón Sanchiz, N., García-Celma, M. J., Azemar Sazatornil, N. & Esquema Moret, J. Procedimiento para la preparación de nano-emulsiones de tipo agua en aceite (W/O) por métodos de emulsificación de condensación. *Oficina Española de Patentes y Marcas* (2004).
34. Ma.Tránsito, L. L. Flavonoides. *Offarm* **21**, 108–113 (2002).
35. Ballester, I., Camuesco, D., Gálvez, J., Sánches de Medina, F. & Zarzuelo, A. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. *Ars Pharm* **47**, 5–21 (2006).
36. Sonia Z., V. Compuestos fenólicos. in *Productos Naturales Vegetales* (2013).
37. Martínez-Flores, F., González-Gallego, J., M., C. J. & J., T. M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **17**, 271–278 (2002).
38. Panche, A. N., Diwan, A. D. & Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* **5**, (2016).
39. María L., F. F., Sebastián P., R. & Paula, C. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* **3**, (2012).
40. Ma., D., Sun, D., Wang, C., Li, Y. & Guo, T. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* **80**, 60–66 (2014).
41. Domínguez Villegas, V. Estudio biofarmacéutico de flavanonas isoprenílicas antiinflamatorias libres y vehiculizadas en sistemas nanoestructurados para aplicación tópica. (Universitat de Barcelona, 2014).
42. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). CHIQUINAY BLANCO *Lippia myriocephala* Schlechtendal & Cham.
43. Jose M., N. M. Búsqueda de sustancias con actividad antioxidante y antihiperlipidémica en especies selectas de la familia Fabaceae empleadas e la medicina tradicional. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).
44. M, Carrillo-Morales, M. Estudio químico y evaluaciones biológicas del extracto metanólico de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa* Pennel & Safford. (Universidad Veracruzana y UAEM, 2004).

45. Jose M., N. M., María Luisa, G.-R., Laura, A. & Guillermo, D. Antihyperglycemic Activity and Chemical Constituents of *Eysenhardtia platycarpa*. *J. Nat Prod* **69**, 1687–1691 (2006).
46. María del Rayo, C.-C. *et al.* Evaluation of Some Plant-derived Secondary Metabolites Against Sensitive and Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mex. Chem Soc.* **53**, 71–75 (2009).
47. Jose M., N. M., Fernando, N. & Guillermo, D. Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry* **69**, 451–456 (2008).
48. Isaura, Q. P. Implicación de flavanonas preniladas naturales en las vías de señalización molecular en el desarrollo de la inflamación. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2015).
49. Isaias Terrero, S. Estudios in vivo y ex vivo sobre la actividad antiinflamatoria y permeación de la flavanona 2(S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona formulada en una nanoemulsión. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2018).
50. Andrade-Carrera, B.; Clares, B.; Noé, V.; Mallandrich, M.; Calpena, A.; García, M.; Garduño-Ramírez, M. Cytotoxic Evaluation of (2S)-5,7-Dihydroxy-6-Prenylflavanone Derivatives Loaded PLGA Nanoparticles against MiaPaCa-2 Cells. *Molecules* **22**, 1553 (2017).
51. Jiménez, C. El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *An. Química* **109**, 134–141 (2013).
52. Nicolaou, K. C. Advancing the Drug Discovery and Development Process. *Angew. Int. Ed. Chemie* **53**, 9128–9140 (2014).
53. Christopher A., L., Franco, L., Beryl W., D. & Paul J., F. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26 (2001).
54. Francoise, N. & Marti-Mestres, G. *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*. (2000).
55. Quay Stevn, C. Bimodal emulsions of Taxanes and Butyrate Polyalcohol Esters. (2002).
56. Viskupičová, J., Ondrejovič, M. & Šturdík, E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *J. Food Nutr. Res.* **47**, 151–162 (2008).
57. Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Perez, D. L. & Basilio Heredia, J. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 921 (2016).
58. Ferrándiz, M. L. & Alcaraz, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Action* **32**, 293–288 (1991).
59. San Feliciano-Martín, A. Del producto natural iberoamericano al candidato a fármaco. *Actual Biol* **34 (96)**, 113–132 (2012).
60. Salager, J. L. Surfactantes: Tipos y Usos. *Laboratorio de Formulación, Interfases reológicas y Procesos. Universidad de los Andes*. (2002). Available at: <https://es.firp-ula.org/wp-content/uploads/2019/06/S300A.pdf>.
61. Alliod, O., Almouazen, E., Nemer, G., Fessi, H. & Charcosset, C. Comparison of three processes for parenteral nanoemulsion production: ultrasounds, micro uidizer and premix membrane emulsi cation. *J. Pharm. Sci.* **108 (8)**, 2708–2717 (2019).