
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS
LICENCIATURA EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA

Desarrollo de una nanoemulsión para una flavanona natural, su estudio *in silico* como posible tratamiento de psoriasis y el análisis microscópico de su eficacia en un modelo *in vivo* de inflamación crónica inducida con TPA

TESIS

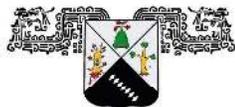
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA

PRESENTA

KARLA FERNANDA GONZÁLEZ PEDROZA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **GONZÁLEZ PEDROZA KARLA FERNANDA** con número de matrícula **10002928** cuyo título es:

“Desarrollo de una nanoemulsión para una flavanona natural, su estudio in silico como posible tratamiento de psoriasis y el análisis microscópico de su eficacia en un modelo in vivo de inflamación crónica inducida con TPA”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA.**

Cuernavaca, Mor a 02 de mayo de 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. MA.YOLANDA RIOS GÓMEZ
DRA. MAYRA YANETH ANTÚNEZ MOJICA
DRA. MA. LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ
DRA. ELIA MARCELA LÓPEZ CARDOSO
DRA. VALERI DOMÍNGUEZ VILLEGAS

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



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:2022-05-03 09:25:59 | Firmante

ViRtysbwrtzQqyLCHT2SOIOKpzCprXPUiURe6BVXDR292Zp5T7ewgMeKouTJfKOaThbAL9EyKfNQZTKXPfCh7VtlkEadtA9l+71IvPQocEdmm64v5JR8VTZpi0NC67w1//RuTcS2BXp9enuVSZFK3v3CiHm4ImR5Th6I45Brlb/qvFf6t1wEwVALseDsqtSkDKmewfIxoJc5JsLCZEKBVRe4CSGM+71QzGkewruahR/0el4gDuq/EpYS25WgmA1I7sWtc3X87l+Drsk+p1hYeScDIXm7kPnS8xn0VA8Z0Dmcjjiwxftf78xj6Wish6+GFOvDEdN+G0remj7hnw==

MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA | Fecha:2022-05-03 09:34:49 | Firmante

UT0vPs5VJV027U3+nPSHj6dTfr7nm4i9zcTJpO2eww2Bh9j08RSX572PQLvSKOXb3lwMKqnMGR5Byvmrt3jL2oFT9K50r8z5uolZLEFWLNetEU1dOfozDduMbD5HKwgVnTZ5/ICNT4lkQc3FxcpAYMMQIBgBdn61YF40MJx/oJlnLcSa1Q/B/9ISWxUUAQNSqzMBuTIRKOIIEEnBtMY7t7Pvy6O2a4w5C/PwM1vcgRhrOjar8EGTGwnca0BeanXRqTNHLsaQz3XtI77AxjPzXogrsrd3kZQUQUphweu7Wjn8TDMxSD3jzGrzcGZQDGz6V+vo7FaUZNwWn+QTFYM4Kw==

MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2022-05-03 10:11:30 | Firmante

Q+cbQoXX4psqHMEozMR7FmB1jdqGGkPjXsPIIWN91EdnHTLri4CDc0TqeF6FemtzldvLkRPjBld5OGSYFYzgwot+VXpO3bDdPEJyILZgvNS+hl+q6H5SgCHMR2nIEbuQGlpOIqNI6pcMBhdoHf/r7PSI2gzkBjH8ldRTTUraOTEAEICoLJHH93m+jJTUmtITmUufldpdtU8Jewo7IU4//y26Ry8gWne7b7o7zliERk1cgpfdJ6qjWqSukf26NdN1BGYiCwxaljjxzjXFuaifyf7dZ2UdnMme30RAOVQydZXR9g37hNI6ArZq0KGvngU3TwrQV5e3AVXxjuSeughA==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2022-05-04 15:45:48 | Firmante

qzpzHqn+R9ehcNDO55pdv8Se/NaqySoJfBnkI27FKP26xtJex8Ly2XUZ8xO/4J9IYDadJBBHH3mhZJ8876aySW8867cWlkWhAMCh7DPDFdOSTlClcdHraSp1BcjkDugycJWaM2OYejG4DBTiRbsKM0Y0GTEk7HnxnpRUp58bXrC7CPqy0y4/vZl2nM8GkJd0d61TSZOu56+p1GrTbPD+L2rsDxLRfL6Ez5MrSLdAJD98Ae9XS0X61YUj0NFJqgNTGn1b07pWOD1mBPv5PXGEdzdy+uz+SvEyZnjeA5djvSy/MP22rfceY05kOUxp0dN77lw6f8d89LkX5DCK7epiyig==

ELIA MARCELA LOPEZ CARDOSO | Fecha:2022-05-04 17:05:22 | Firmante

MRrxAr3zuZan9CjRBOPVZdxrm1LEesYILQBFJJpJudJ+IHdoGCFwel5DufdA7yEys3QgbdjPpQQ59cp4iDVBRdEpExGSla/DOhKunklRcpv95p2ITmxi6djsY/h0xP1V3iyU4OFjkvgp9Pgd0YIUa6YhB3/E4Q3d0fLXoym0l+gL4JpGOUOdM2aJIAkP/e3oIKjZDISXyaaDYgXimotcP110N2K6cu/h2f53DuhUR3INRub1UUjX98eDm4GwM/4zp6Uu1SdW/6mlSyBL7U4uwLqsgHZF94r1qPD0nV738YhadaXtQR+/IAtJlgb+uhCex6XZ29/BdSWHC4ixw==

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



Izbs0wBQX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/AUNpqTXbC89uOVz7QXLELaeagNrsIT2>



DEDICATORIAS

“A las migajas de mi pan tostado, por ser mi *ikigai*.”

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Química del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, UAEM. A la Dra. Ma. Luisa del Carmen Garduño, por permitirme ser partícipe en uno de sus proyectos y guiarme en el proceso de la presente investigación. Al M. en C. Johnny Méndez Franco y al Dr. Jorge Iván Amaro, quienes formaron parte importante en mi formación como estudiante y persona.

Me gustaría expresar mi más sentido agradecimiento

Al jurado revisor

Dra. Ma Yolanda Ríos Gómez (Presidente)

Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mujica (Secretario)

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez (Vocal)

Dra. Elia Marcela López Cardoso (Suplente)

Dra. Valeri Domínguez Villegas (Suplente)

Al Comité Tutorial

Presidente: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

Secretario: Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

Vocal: Dra. Elia Marcela López Cardoso

Por los consejos y lecciones brindadas que han sido de gran ayuda para la culminación de esta tesis.

Me gustaría agradecer, a mi primer motivo desde el verano de investigación, a la interminable paciencia, a los múltiples dramas, a la motivación infinita, a mi compañía, y a la razón de mi desesperación y risas. Por eso y más, Capi, Cami, Pepero, Luisita, León y Dicuka M.

Gracias.



El presente trabajo de investigación se desarrollará en el Laboratorio 325: Química de Productos Básica y Aplicada del Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas de la universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección de la *Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez*.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Piel	15
2.2. Psoriasis	17
2.3. Artritis psoriásica	18
2.4. Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> para el estudio de sustancias antipsoriasis.....	19
2.5. Tratamientos para Psoriasis	22
2.5.1. Tratamientos tópicos.....	23
2.5.2. Fototerapia.....	24
2.5.3. Medicamentos sistémicos	25
2.5.4. Medicina alternativa	28
2.5.5. <i>Productos Naturales como Agentes Terapéuticos</i>	30
2.6. Flavonoides	32
2.6.1. <i>Biosíntesis de flavonoides</i>	33
2.6.2 <i>Actividades terapéuticas de flavonoides</i>	34
2.6.2.1. Actividad anticancerígena.....	35
2.6.2.2. Protección frente a mutágenos activos.....	35
2.6.2.3. Actividad antioxidante.....	35
2.7. <i>Eysenhardtia platycarpa</i> y flavanonas aisladas.	36
2.7.1. <i>Antecedentes farmacológicos de E. platycarpa y flavanonas aisladas</i>	36
2.8. Tecnología Farmacéutica.....	42
2.8.1. <i>Sistemas nanoestructurados de liberación controlada</i>	43
2.8.1.1. Nanoemulsiones (NEs).....	44
2.8.2. Parches transdérmicos	44
2.8.2.1. Beneficios del uso de parches transdérmicos	44
2.9. Antecedentes de formulaciones nanoestructurada de productos naturales	45
2.9.1. Citototoxicidad <i>in vitro</i> de triterpenoides en nanopartículas.....	45
2.9.2. Desarrollo de sistemas nanoestructurados para aplicaciones tópicas de flavanonas.....	46
2.9.3. Diseño y optimización de nanoplataformas de ácido oleanólico (OA) y ursólico (UA) para aplicaciones antiinflamatorias oculares	46
2.10. Flavononas formuladas en sistemas nanoestructurados	46

2.10.1. Flavanonas isoprenílicas antiinflamatorias libres y vehiculizadas en sistemas nanoestructurados	47
2.10.2. Flavanonas en sistemas nanoestructurados para el tratamiento de psoriasis	48
2.11. Modelos computacionales empleados para la predicción de la actividad biológica de moléculas orgánicas.....	48
2.12. Quimioinformática	49
2.13. Estudios <i>In silico</i> y su aplicación	50
3. JUSTIFICACIÓN	53
4. HIPÓTESIS	54
5. OBJETIVOS	55
5.1 Objetivo general.....	55
5.2. Objetivos particulares	55
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
6.1. Flavanona natural	56
6.2. Desarrollo de la nanoemulsión (NEs).....	56
6.3 Medición de tamaño de gotícula	57
6.4 Caracterización visual de las NEs	57
6.5 Caracterización morfométrica de NEs	57
6.6. Estudio <i>in silico</i>	58
6.7. Estudios <i>in vivo</i> de eficacia antiinflamatoria crónica.....	59
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
7.1. Desarrollo de las formulaciones nanoestructuras: Nanoemulsiones.....	61
7.2. Surfactantes empleados en la preparación de las nanoemulsiones.	62
7.3. Preparación de las nanoemulsiones.....	63
7.4. Analisis visual y morfométrico determinado el tamaño de gotícula empleando el equipo Nano Z-sizer.....	64
7.4.1. Formulación 1 Blanca (F1B)	65
7.4.2. Formulación 1 con la Flavanona (F1F).....	67
7.4.3. Formulación 2 Blanca (F2B)	69
7.4.4. Formulación 2 con Flavanona (F2F)	71
7.4.5. Formulación 3 Blanca (F3B)	73
7.4.6. Formulación 3 con Flavanona (F3F)	75
7.4.7. Formulación 2 con Metotrexato (F2M).....	77

7.5. Estudio <i>In silico</i>	81
7.5.1. Construcción en perspectiva 3D de las moléculas en estudio	81
7.5.2. Análisis de las propiedades fisicoquímicas y predicción de potencial farmacológico empleando las plataformas <i>Molinspiration</i> , <i>PassOnline</i> y <i>SwissTargerPrediction</i>	83
7.6. Evaluación <i>in vivo</i> antiinflamatoria crónica	86
8. CONCLUSIONES	90
9. PERSPECTIVAS	91
10. BIBLIOGRAFÍA	92

FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la piel. ⁴ (La piel, Stanford Children's Health, 2020)	15
Figura 2. Afectaciones de la psoriasis en el cuerpo. ⁷	17
Figura 3. Diagrama esquemático que ilustra algunas de las características clave de la patogenia de la psoriasis. (Danilenko, D.M. 2008) ¹²	20
Figura 4. Ejemplos de retinoides. ¹⁸ (Lopeztricas, 2016)	25
Figura 5. Estructura química de Metotrexato. ¹⁹ ("Metotrexato", 2013)	26
Figura 6. Estructura química de ciclosporina. ²⁰ (López Tricas, 2020)	26
Figura 7. Medicamentos que alteran el sistema inmunitario. ²¹ ("Infliximab - Chemical Composition, Chemistry Information, Uses and Benefits", 2020), ²² ("D0A2UV", 2020), ²³ ("Apremilast", 2020), ²⁴ Golimumab, Rituximab, Etanercept y otros. ¹⁴	27
Figura 8. Medicamentos sistémicos adicionales para el tratamiento de psoriasis. ("Thioguanine", 2020) ²⁵ ("Hydroxyurea", 2020). ²⁶	28
Figura 9. Ácidos grasos omega 3, presentes en el pescado. ²⁷ (Germana, 2013).....	29
Figura 10. Planta de <i>Aloe vera</i> . ²⁸ ("Missouri Botanical Garden", n.d.)	29
Figura 11. Planta <i>Berberis aquifolium</i> ²⁹ ("Missouri Botanical Garden", n.d.)	30
Figura 12. Estructura química de la Capsaicina, procedente de chiles. ³³	31
Figura 13. Estructura química básica de los flavonoides y de las	32
Figura 14. Biosíntesis de Flavonoides. ³⁸	34
Figura 15. Estructuras de la flavanonas naturales. ⁴⁰	36
Figura 16. Sistemas nanoestructurados empleados para la	43
Figura 17. Procedimiento para la preparación de las nanoemulsiones.	63
Figura 18. Trasvasado y filtración de las nanoemulsiones.	64
Figura 19. Determinación del tamaño de gotícula de las formulaciones.	65
Figura 20. Formulación 1 Blanca (F1B)	66
Figura 21. Formulación 1 Flavanona (F1F).....	68
Figura 22. Formulación 2 Blanca (F2B)	70
Figura 23. Formulación 2 Flavanona (F2F).....	72
Figura 24. Formulación 3 Blanca (F3B)	74
Figura 25. Formulación 3 Flavanona (F3F).....	76
Figura 26. Formulación 2 Metotrexato (F2F)	78
Figura 27. Representación 3D de las estructuras químicas analizadas	82
Figura 28. Análisis de los signos macroscópicos de la piel en un modelo <i>in vivo</i>	87
Figura 28. Análisis de los signos macroscópicos de la piel en un modelo <i>in vivo</i> (Continuación)	87

Figura 28. Análisis de los signos macroscópicos de la piel en un modelo *in vivo*. (Continuación)88

Figura 29. Fragmento de Imagen del análisis morfológico por microscopía estereoscópica del Péptido P155 (Niu, L. *et al* 2020)⁹⁰ 89

TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> empleados para el desarrollo de psoriasis. (Bocheńska, K. <i>et al</i> , 2017) ¹¹	22
Tabla 2. Lista de corticoides empleados para el tratamiento de psoriasis ordenados según su potencia farmacológica. ¹⁶ (Aguirrezabala, Aizpura, Abizuri & Alfonso, <i>et al</i> 2011) (continuación).	24
Tabla 3. Actividad antioxidante de extractos de especies del género <i>Eysenhardtia</i> . ⁴³	38
(Narváez <i>et al</i> , 2008).....	38
Tabla 4. Actividad antioxidante reportada para compuestos de tipo flavonoide y cumarinas. subcoriacin (1), (+)-catechin (2), (α)-epicatechin (3), (+)-afzelechin (4), eriodictyol (5), (+)-catechin 3-O- β -D-galactopyranoside (6) and quercetin 3-O- β -Dgalactopyranoside (7) ⁴³	38
Tabla 6. Formulaciones nanoestructuradas elaboradas para el presente proyecto.....	62
Tabla 7. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación F1B	66
Tabla 8. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación F1F	68
Tabla 9. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación F2B	70
Tabla 10. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación F2F	72
Tabla 11. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación F3B	74
Tabla 12. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación F3F	76
Tabla 13. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación F2M	78
Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas estructurales.	83
Tabla 15. Datos predictivos de la bioactividad.	84

GRÁFICAS

Gráficas 1a - 1d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación	67
Gráficas 2a - 2d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación	69
Gráficas 3a - 3d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación	71
Gráficas 4a – 4c. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación.....	73
Gráficas 5a – 5d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación	75
Gráficas 6a – 6d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación	77
Gráficas 7a – 7d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación	79

1. INTRODUCCIÓN

La psoriasis es una enfermedad crónica inflamatoria que afecta la piel, que se identifica por descamaciones y brotes enrojecidos. Este padecimiento se atribuye a la proliferación de queratocitos epidérmicos, y fallos en la regulación epidermis-dermis, así como en el sistema inmunitario. En la piel las citoquinas son producidas por queratinocitos, y son las responsables del papel proinflamatorio en compañía de las células T. Están dentro del grupo de las glucoproteínas que son producidas en la fase de iniciación de la respuesta inmune.

Se calcula que alrededor de 2 % y 3 % de la población mundial sufre de psoriasis y en México, existen alrededor de 2 millones de pacientes. El papel hereditario es importante ya que alrededor de un 30 % de pacientes con psoriasis tienen antecedentes familiares con esta afectación. La psoriasis puede clasificarse en tres tipos: Psoriasis leve, Psoriasis moderada y Psoriasis grave. Además de presentar descamaciones y enrojecimientos, la psoriasis puede desencadenar Artritis psoriásica, así como posibles enfermedades cardiovasculares y sobrepeso.

Existen distintas opciones terapéuticas en el mercado que reducen la inflamación y aclaran la piel, ya sea aplicados de forma tópica, con fototerapia o mediante medicamentos sistémicos recetados de acuerdo con la gravedad del problema y perfil del paciente. Además de contar con distintos medicamentos, existen los tratamientos alternativos que van desde una dieta especial, cremas, y hasta hierbas; sin embargo, aún no existe uno que erradique la enfermedad.

Es por ello que se realiza la presente investigación, que tiene como objetivo principal el desarrollo de una nanoemulsión para la flavanona natural (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**), de la cual se realizó su evaluación intrínseca y formulada en un modelo *in vivo* de inflamación crónica de oreja de ratón, en la que además se caracterizará morfométricamente mediante una inflamación crónica inducida con TPA en oreja de ratón. El flavonoide natural ya se encuentra identificado y caracterizado por distintas técnicas analíticas. También se considerarán dos diferentes matrices de formulación ya antes reportadas por Domínguez-Villegas, V. *et al*, 2014 y Alvarado, H. *et al*, 2015. Así como gracias al desarrollo tecnológico, permitió estudio *in silico* mediante un software quimioinformático con el cual se identificaron propiedades fisicoquímicas, así como su blanco terapéutico,

2. ANTECEDENTES

2.1. Piel

La piel es la primera barrera de defensa frente al exterior, por eso aprender a cuidarla es tan importante, así como conocer los síntomas y tratamientos de sus enfermedades como pueden ser: la dermatitis, la psoriasis, el picor o el melanoma, entre otras.¹

En el mundo, alrededor del 2 y 3 % de la población sufre psoriasis, mayormente psoriasis en placas. En México se calculan que existen aproximadamente 2 millones de pacientes con psoriasis en forma moderada a severa.²

Se sabe que la psoriasis es un padecimiento que se encuentra también asociada problemas de inflamación crónica y se han encontrado pacientes que desarrollan artritis psoriásica

La piel humana es un órgano indispensable que recubre al esqueleto, que brinda protección contra el medio externo, como radiación y ultravioleta, agentes infecciosos (figura 1).^{3,4}

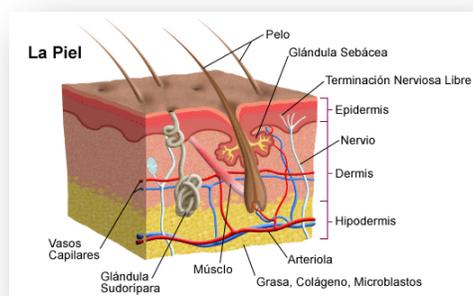


Figura 1. Anatomía de la piel.⁴ (La piel, Stanford Children's Health, 2020)

La piel está constituida por 3 capas: Epidermis, dermis e hipodermis, mismas que a continuación se describen.^{5,6}

Epidermis: Capa más externa, conformada por tejido epitelial. Está constituida por células que maduran para formar el estrato córneo, las cuales están constituidas por queratina, que brinda permeabilidad a la piel, y evita pérdidas hídricas, así como fortalece la barrera de protección contra agentes externos que se apliquen en la zona. Se integra por 5 capas en su interior:

1. Estrato basal: Capa más profunda, y lugar en el que se forman los queratinocitos
2. Estrato espinoso: Filas de queratinocitos unidos por tonofibrillas que dan elasticidad y resistencia a la piel
3. Estrato granuloso: Compuesta por queratinocitos ascendidos, que funcionan su membrana con la membrana plasmática para producir secreciones ricas en lípidos, evitando pérdidas de agua
4. Estrato lucido: Se encuentra únicamente en pieles gruesas. Compuesto por 3 capas de queratinocitos
5. Capa córnea: Integrada por los queratinocitos finales o muertos. De aspecto similar a escamas.

Dermis: tejido conectivo, compuesto por proteínas fibrosas que mantienen la rugosidad y resistencia a la piel. Incluye elastina y proteoglicanos, así como vasos sanguíneos, receptores nerviosos, glándulas sudoríparas y sebáceas. Está conformada por 2 capas:

1. Estrato capilar: Contiene papilas dérmicas con vasos sanguíneos, receptores táctiles
2. Estrato reticular: Compuesto por fibras de colágeno gruesas, con filas de colágeno.

Hipodermis: tejido adiposo subcutáneo que se separa en bloques conglomerados de la piel, incluidos algunos músculos.

2.2. Psoriasis

De origen etimológico en el griego, *Psora* = sarna, *ia* = cualidad, *sis* = acción. La psoriasis es una enfermedad crónica inflamatoria afectiva de la piel, que se caracteriza por la presencia de descamaciones y enrojecimientos, usualmente en placas. Puede llegar a producir incapacidad y en algunos casos, afectaciones psicológicas para quienes la padecen. No existe una edad específica en la que puede aparecer, sin embargo, suele iniciar en un periodo de entre 15 y 35 años en el paciente. La psoriasis afecta principalmente al área de los codos, rodilla y cuero cabelludo, como se observa en la figura 2.



Figura 2. Afectaciones de la psoriasis en el cuerpo.⁷

(Jiménez Gómez, Ballester Martínez, Perez Gala & Gárate Ayastuy, 2014)

Las descamaciones, así como los brotes enrojecidos, se atribuyen a una hiperproliferación de queratocitos epidérmicos y a los fallos en la regulación epidermis-dermis, microvascularización cutánea y el sistema inmunitario. Las células T y las citoquinas proinflamatorias juegan un papel importante, así como el factor hereditario, ya que existen una predisposición genética para el desarrollo de psoriasis en el cual hay una mayor incidencia cuando existen parientes con esta enfermedad, tanto de primer como de segundo grado. Se estima que alrededor del 30 % de los pacientes tienen antecedentes familiares con psoriasis.⁸

En la piel la citoquina es producida por queratinocitos, y participa en respuestas inmunes de procesos inflamatorios. Son glucoproteínas producidas en la fase de iniciación de la respuesta inmune, y tienen como objetivo la regulación y respuesta de procesos inflamatorios. Estas se producen por la activación de leucocitos, células neurales, fibroblastos y células endoteliales.³

La psoriasis se puede clasificar en 3 tipos:

1. **Psoriasis leve**, la cual es estable en placas, y afecta menos del 10 % de la superficie corporal.
2. **Psoriasis moderada**, las afectaciones cubren del 10 al 25 % del cuerpo, a excepción de zonas con pliegues delgados, como cara, manos, pies y genitales.
3. **Psoriasis grave**: afecta más del 25 % del cuerpo. Suele presentarse limitación de movilidad, eritrodermia psoriásica.

2.3. Artritis psoriásica

Las personas que sufren de afecciones psoriásicas; tienen un riesgo mayor de desarrollar otras patologías, entre ellas las enfermedades cardiovasculares, depresión, sobrepeso, y la artritis psoriásica.⁹

La artritis psoriásica es una enfermedad del tipo musculoesquelética, asociada con el padecimiento de psoriasis. Es una artritis inflamatoria, progresista y destructiva. Es capaz de adoptar formas diversas, usualmente indistinguibles de gastropatías.⁹

Esta clase de artritis se presenta en un 10 % de los pacientes que padecen psoriasis en la piel, inclusive antes de mostrar signos de presentarla. En ocasiones la artritis psoriásica puede afectar partes del cuerpo diferentes, como el ojo o hueso.¹⁰

La gravedad de la artritis no tiene relación con la extensión de lesión en la piel, y el primer síntoma dérmico que puede presentarse es la aparición de placas de piel enrojecida, incapacidad de movilizar la articulación y en ocasiones deformaciones asimétricas.¹⁰

2.4. Modelos *in vivo* e *in vitro* para el estudio de sustancias antipsoriasis

En la actualidad, los conocimientos sobre los mecanismos responsables de la psoriasis han generado un número cada vez mayor de dianas farmacológicas y ha permitido la búsqueda de nuevos fármacos. Para tal fin, se han desarrollado diferentes modelos relevantes tanto *in vitro* como *in vivo* de psoriasis que favorecen evidenciar tanto el mecanismo de acción como el posible control de los efectos sobre la piel.

La psoriasis como se sabe puede presentarse de cinco formas diferentes: en placas, guttata, inversa, pustulosa y eritrodérmica.¹¹ La forma más común, es la placa psoriásica, que suele presentar lesiones cutáneas escamosas rojas o blancas con una epidermis acantótica engrosada. Se cree que estas afectaciones se encuentran relacionadas con las citocinas inflamatorias como se muestra en la figura 3, en donde se cree que la psoriasis en individuos genéticamente susceptibles se desencadena por estímulos específicos, como traumatismos o infecciones bacterianas, que a su vez inducen a las células dendríticas (DC) residentes, macrófagos y células T a producir citocinas que inician una cascada de eventos que conducen a las señas de identidad de la psoriasis: activación de células inmunitarias, acantosis epidérmica desregulada y angiogénesis. La IL-12 producida por DC y macrófagos induce una respuesta inmune Th1, caracterizada por la producción de IFN γ , mientras que la IL-23 de DC y macrófagos induce una respuesta inmune Th17, caracterizada por la producción de IL-17 e IL-22. Estas citocinas, a su vez, inducen los cambios característicos de los queratinocitos epidérmicos psoriásicos, incluida la regulación al alza de NF- κ B, la inducción de pStat3 nuclear y la inducción de psoriásica. Los macrófagos activados por TNF- α producen citocinas adicionales que inducen cambios epidérmicos psoriásicos, así como VEGF, que estimula la angiogénesis. Los macrófagos activados y los queratinocitos psoriásicos también producen quimiocinas que reclutan leucocitos de la vasculatura para infiltrar la placa psoriásica en desarrollo. DC = célula dendrítica; IFN γ = interferón gamma; IL = interleucina; NF- κ B = factor nuclear-kappa B; pStat3 = transductor de

fosfo-signal y activador de la transcripción 3; Th = célula T colaboradora; TNF- α = factor de necrosis tumoral- α ; VEGF = factor de crecimiento endotelial vascular.¹²

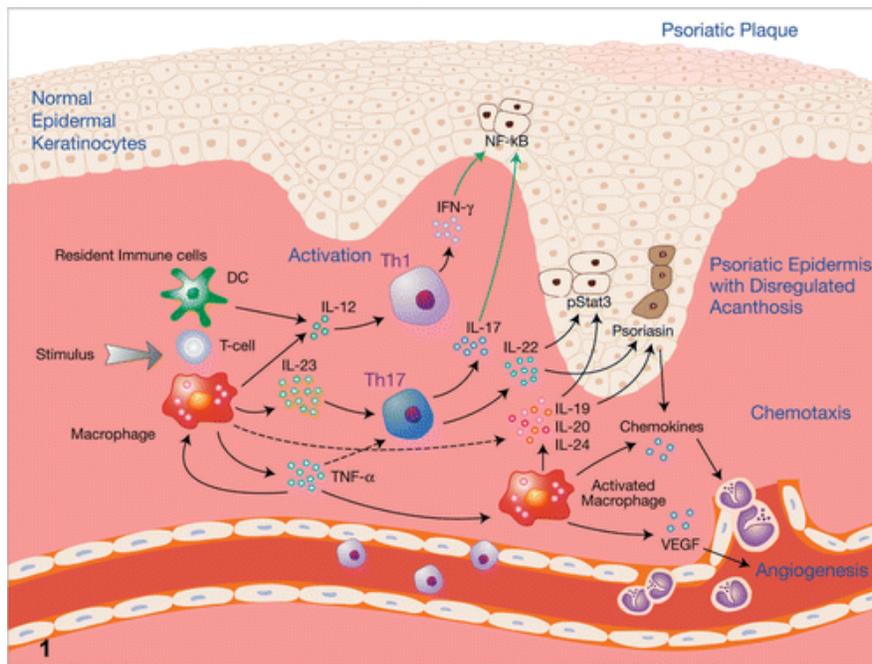


Figura 3. Diagrama esquemático que ilustra algunas de las características clave de la patogenia de la psoriasis. (Danilenko, D.M. 2008)¹²

Se han realizado varios intentos de reproducir la enfermedad en modelos *in vitro* e *in vivo* para obtener conocimientos más detallados sobre los mecanismos de patogénesis de la enfermedad, así como las estrategias terapéuticas.

La investigación preliminar *in vivo* se utiliza a menudo para explicar el mecanismo patogénico de las enfermedades y probar la eficacia de nuevas sustancias. En los últimos años, se han desarrollado algunos modelos animales que imitan la psoriasis. Los estudios *in vivo* actuales casi siempre utilizan modelos de ratón, se conocen los **modelos espontáneos** en los cuales debido a diferentes mutaciones genéticas se provocan lesiones en la piel debido a la falta de afluencia de células T, los **modelos de ingeniería genética** generan individuos genéticamente modificados que debido a su alteración genética presentan daños comparables a la patología

psoriásica, los **modelos de transplant y transferencia inmunitaria** a través de xenotransplante de piel humana psoriásica o transferencia inmune de células T y los **modelos de inducción directa** en donde se ha empleado la aplicación tópica de imiquimod, la inyección intradérmica de la citocina IL-23 entre otras sustancias inductoras de inflamación.^{11,13}

Por su parte para, los modelos *in vitro*, se utilizan sistemas de modelos de cultivo epidérmicos humanos reconstituidos, mediante los cuales los queratinocitos epidérmicos son cultivados en la interfaz aire-líquido, se diferencian y estratifican para imitar la epidermis escamosa normal. Los queratinocitos epidérmicos en este modelo se pueden obtener de individuos con psoriasis o normales, y luego tratarse con una variedad de citocinas y/o factores de crecimiento (p. Ej., IL-20, IL-22, oncostatina-M), de modo que el tejido resultado logre desarrollar características que puedan imitar la epidermis psoriásica. Si bien estos sistemas modelo *in vitro* tienen limitaciones obvias en el sentido de que carecen de leucocitos y vasos sanguíneos, aún han demostrado su utilidad en el estudio de muchos aspectos de la epidermis psoriásica, incluida la diferenciación de queratinocitos y la respuesta a los estímulos inductores.¹¹

Tanto los modelos *in vivo* como los modelos *in vitro* presentan ventajas y desventajas debido a que la patogenia de la psoriasis es muy compleja, cada modelo se basa en un mecanismo patogénico ligeramente diferente y cada uno tiene sus similitudes con la psoriasis, así como sus limitaciones. La tabla 1 muestra las ventajas y desventajas de los diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* aplicados para el descubrimiento de nuevas sustancias para el tratamiento de la psoriasis.¹¹

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los modelos *in vivo* e *in vitro* empleados para el desarrollo de psoriasis. (Bocheńska, K. *et al*, 2017)¹¹

Características	Modelos <i>in vitro</i>	Modelos <i>in vivo</i>
Pros	Fácil acceso a las células Complejidad reducida Utilización de tejido humano Evita la necesidad de animales Se pueden medir las respuestas celulares individuales	Imagen histopatológica similar y compleja. Gran cantidad de factores que interactúan y vías de señalización para estudios de manipulación o pruebas de nuevos fármacos. Cantidad variada de modificaciones, según el propósito de la investigación.
Contras	Excluye las influencias del microambiente y podría inducir a error. Excluye las influencias del macroambiente	Diferencias entre la piel humana y animal y la inmunidad. La limitación resultante de la naturaleza poligénica de la enfermedad: dificultades en una reconstrucción completa del fenotipo por mutación única Influencia de factores ambientales.
Mejor uso del modelo	Evaluación de la fisiología celular, viabilidad, fenotipo, función y respuestas a estimuladores e inhibidores	Adecuado para investigar las múltiples interacciones entre las células de la piel, el endotelio vascular y la respuesta inmune.

2.5. Tratamientos para Psoriasis

Existen muchas opciones terapéuticas; sin embargo, aún no se cuenta con un tratamiento que pueda erradicar la enfermedad. Los tratamientos contra la psoriasis son complejos, y es necesario para el paciente la aplicación de distintos fármacos, de forma sistémica, y según la gravedad del problema, repetidas veces al día. La elección del tratamiento dependerá de la gravedad y perfil beneficio-riesgo.¹⁴

Los tratamientos para la psoriasis reducen la inflamación y aclaran la piel. Los tratamientos pueden dividirse en tres tipos principales: tratamientos tópicos, fototerapia y medicamentos sistémicos.¹⁵

2.5.1. Tratamientos tópicos

Si se usan solas, las cremas y los ungüentos que aplicas en la piel son eficaces para tratar la psoriasis leve a moderada. Cuando la enfermedad es más extensa, es probable que las cremas se combinen con medicamentos sistémicos o fototerapia.¹⁶

En la tabla 2 se enlistan, según la potencia, los corticoides tópicos que se encuentran actualmente a la venta en el mercado farmacéutico.¹⁶

Tabla 2. Lista de corticoides empleados para el tratamiento de psoriasis ordenados según su potencia farmacológica.¹⁶ (Aguirrezabala, Aizpura, Abizuri & Alfonso, *et al* 2011)

Corticoides tópicos		
POTENCIA MUY ALTA		
Clobetasol propionato	Clarelux	0,5 mg/g espuma 100 g
	Clobex	Clobex 0,5 mg/g champú 60 y 125 ml
	Clovate	0,05 % crema 15 y 30 g
	Decloban	0,05 % pomada 15 y 30 g
POTENCIA ALTA		
Beclometasona (salicilato)	Dereme	0,025 % crema, gel y loción 30 y 60 g, y loción capilar de 60 ml
Beclometasona (dipropionato)	Menaderm simple	0,025 % pomada 30 y 60 g 0,025% ungüento 60 g 0,025 % loción 60 ml
Betametasona (valerato)	Betnovate	0,1 % crema 15 y 30 g
	Bettamousse	0,1 % espuma 100 g
	Celestoderm V	0,05 % y 0,1% crema 30 y 60 g
Betametasona (dipropionato)	Diproderm	0,05 % crema y pomada 30 y 60 g 0,05% sol 60 ml
Desoximetasona	Flubason	0,25 % hemicrema 20 g
Diflorasona diacetato	Murode	0,05 % crema y gel 15 y 30 g
Diflucortolona valerato	Claral	0,1 % crema, pomada y ungüento 30 y 60 g EXO 3% pomada y ungüento de 30 g EXO
Fluclorolona acetónido	Cutanit	0,2 % crema 30 g

Tabla 2. Lista de corticoides empleados para el tratamiento de psoriasis ordenados según su potencia farmacológica.¹⁶ (Aguirrezabala, Aizpura, Abizuri & Alfonso, *et al* 2011) (continuación).

Corticoides tópicos		
POTENCIA ALTA		
Fluocinolona acetónido	Co Fluocin fuerte	0,1 % crema 15 y 30 g
	Cortiespec	0,025 % crema 30 g
	Fluocid forte	0,2 % crema 15, 30 y 60 g
	Fluodermo fuerte	0,2 % crema 15 g
	Flusolgen	0,025 % solución 30 ml EXO
	Gelidina	0,025 % gel 30 y 60 g
	Synalar	0,025 % crema 30 y 60 g 0,025% espuma 60 g 0,01% crema 30 y 60 g 0,2 % crema 30 y 60 g
Fluocinónido	Novoter	0,05 % crema 30 y 60 g
Fluocortolona monohidrato	Ultralam M	0,20, 2 % crema 30
Flupamesona	Flutenal	0,3 % crema y pomada de 30 y 60 g 0,15% loción pedi 60 m
Hidrocortisona aceponato	Suniderma	0,127 % crema y pomada de 30 y 60 g
Metilprednisolona aceponato	Adventan	0,1 % crema, pomada y ungüento 30 y 60 g 0,1% emulsión y solución 50 g
Mometasona furoato	EFG	0,1 % solución 30 y 60 ml
	Elica	0,1 % crema de 30 y 60 g
	Elocom	0,1 % crema y pomada 30 y 60 g
Prednicarbato	Batmen y Peitel	0,25 % crema, pomada, ungüento 30 y 60 g 0,25% solución 60 ml y solución aplicador
Fluocinolona acetónido / Betametasona valerato	Alergical crema	0,001 %/0,05 % crema 30 g EXO

2.5.2. Fototerapia

Fototerapia: Este tratamiento se lleva a cabo mediante radiación UVB, en combinación con análogos de la vitamina A de carácter sistémico. De esta forma se reducen las posibilidades de presentar quemaduras.¹⁶

Fotoquimioterapia: Consiste en una exposición a la radiación UVA, posterior a la administración oral o tópica de un psoraleno. Esta técnica presenta una mejor eficacia y efecto en comparación de la fototerapia.¹⁶

Fototerapia y Fotoquimioterapia: Son tratamientos que se llevan a cabo bajo la supervisión de un dermatólogo, y se recurren a ellos cuando los tratamientos tópicos ya han sido utilizados, pero

no se han obtenido los resultados esperados. Estas opciones terapéuticas reducen el riesgo de aparición de psoriasis en varios meses, y suelen mejorar las lesiones cutáneas.¹⁶

2.5.3. Medicamentos sistémicos

Si tienes psoriasis extensa o resistente a otros tipos de tratamiento, el médico puede recetarte medicamentos orales o inyectables. Esto se conoce como «tratamiento sistémico». Debido a los efectos secundarios graves, algunos de estos medicamentos se usan solamente por períodos breves y pueden alternarse con otras formas de tratamiento.¹⁴

Retinoides. Si tienes psoriasis grave que no responde a otras terapias, este grupo de medicamentos relacionados con la vitamina A puede ser de ayuda. Los efectos secundarios pueden comprender inflamación de los labios y caída del cabello. Y dado que los retinoides, tales como la acitretina (Soriatane), pueden provocar defectos congénitos graves, las mujeres deben evitar el embarazo durante al menos tres años después de tomar el medicamento, en la figura 4 se muestran algunos ejemplos de retinoides.¹⁴

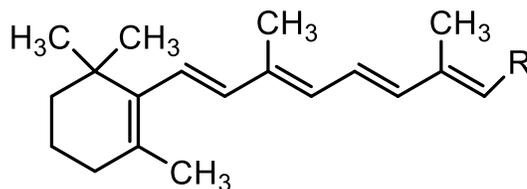


Figura 4. Ejemplos de retinoides.¹⁸ (Lopeztricas, 2016)

Metotrexato. El metotrexato (Rheumatrex, figura 5) se administra por vía oral y ayuda a la psoriasis al disminuir la producción de células cutáneas y reducir la inflamación. En algunas personas, también puede desacelerar la progresión de la artritis psoriásica. Generalmente, el metotrexato es bien tolerado en dosis bajas, aunque puede causar malestar estomacal, pérdida de apetito y fatiga. Cuando se usa durante períodos largos, puede causar una serie de efectos secundarios graves, que comprenden daño hepático grave y disminución de la producción de plaquetas y glóbulos rojos y blancos.¹⁴

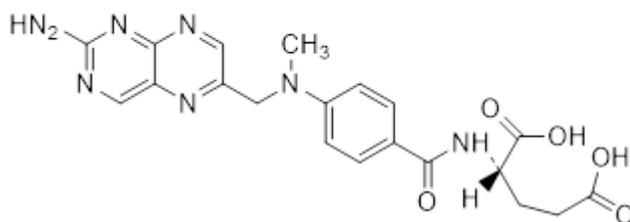


Figura 5. Estructura química de Metotrexato.¹⁹ ("Metotrexato", 2013)

Ciclosporina. (Gengraf, Neoral, figura 6) inhibe el sistema inmunitario y su eficacia es similar a la del metotrexato, pero solo puede tomarse durante un corto plazo. Otros medicamentos inmunodepresores, la ciclosporina aumenta el riesgo de contraer infección y padecer otros problemas de salud, incluso el cáncer. Produce sensibilidad que conllevan a problemas de riñón y presión arterial alta; el riesgo aumenta con dosis altas y terapia a largo plazo.¹⁴

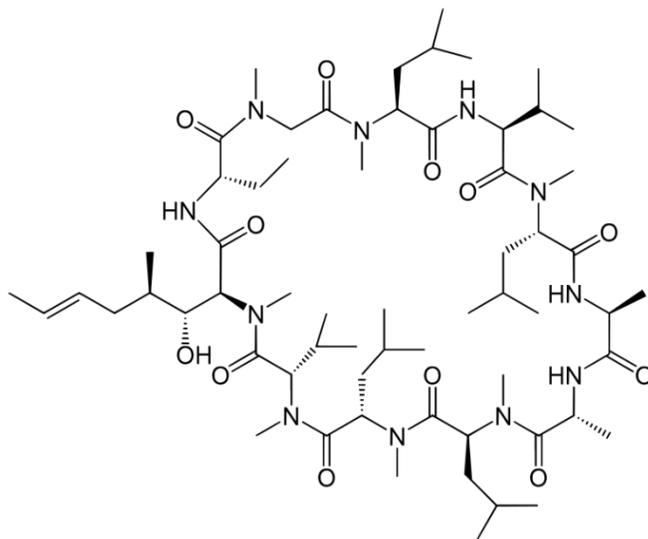


Figura 6. Estructura química de ciclosporina.²⁰ (López Tricas, 2020)

Medicamentos que alteran el sistema inmunitario (biosimilares). Para el tratamiento de la psoriasis moderada a grave se han aprobado varios de estos medicamentos. Estos comprenden etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade), adalimumab (Humira), ustekinumab (Stelara), golimumab (Simponi), apremilast (Otezla), secukinumab (Cosentyx) e ixekizumab (Taltz). La

mayoría de estos medicamentos son inyectables (el apremilast se administra por vía oral) y, normalmente, se usan en personas que no han respondido a la terapia tradicional o que tienen artritis psoriásica asociada. Los medicamentos biológicos deben usarse con precaución, ya que tienen efectos intensos en el sistema inmunitario y pueden ocasionar infecciones que ponen en peligro la vida. En particular, las personas que siguen estos tratamientos deben someterse a una prueba de detección de tuberculosis, en la figura 7 se muestran las estructuras químicas de estos principios activos.¹⁴

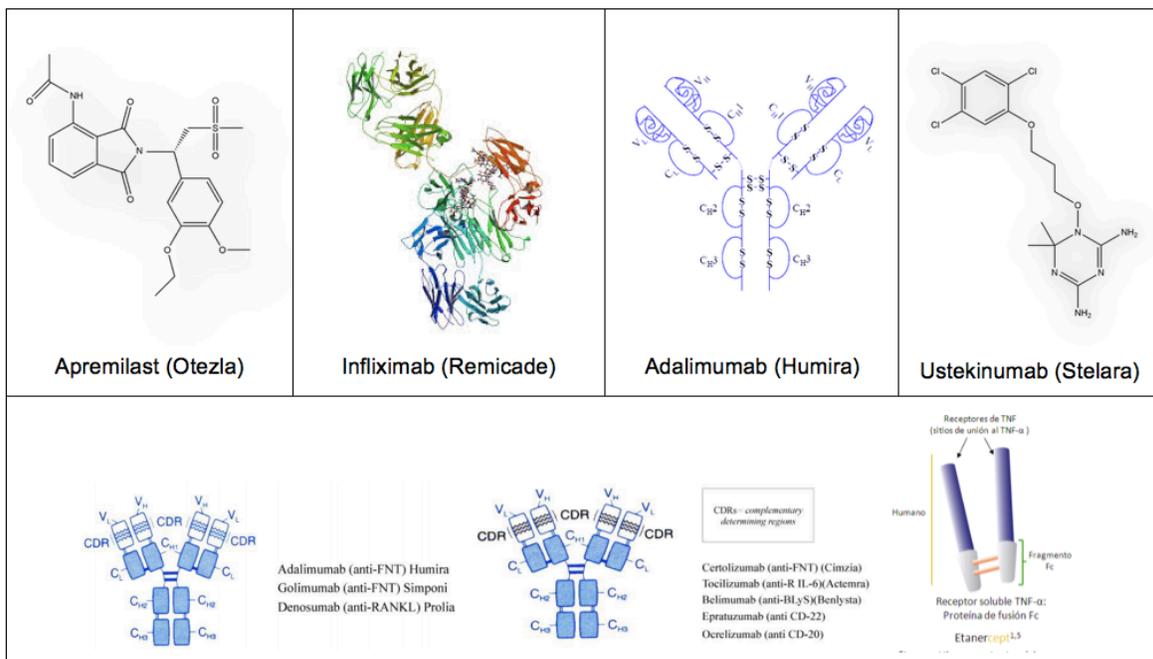
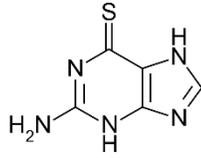
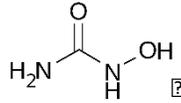


Figura 7. Medicamentos que alteran el sistema inmunitario.²¹ ("Infiximab - Chemical Composition, Chemistry Information, Uses and Benefits", 2020),²² ("D0A2UV", 2020),²³ ("Apremilast", 2020),²⁴ Golimumab, Rituximab, Etanercept y otros.¹⁴

Otros medicamentos. La tioguanina (Tabloid) y la hidroxiurea (Droxia, Hydrea) son medicamentos que pueden usarse cuando no pueden administrarse otros (Figura 8).¹⁴



Tioguanina (Tabloid)



Hidroxiurea (Droxia, Hydrea)

Figura 8. Medicamentos sistémicos adicionales para el tratamiento de psoriasis.

(“Thioguanine”, 2020)²⁵ (“Hydroxyurea”, 2020).²⁶

2.5.4. Medicina alternativa

Existen distintos tratamientos alternativos que afirman aliviar los síntomas de la psoriasis, como dietas especiales, cremas, suplementos dietéticos y hierbas. No está comprobada la eficacia de ninguno de estos tratamientos. Pero algunos tratamientos alternativos se consideran, por lo general, seguros y pueden ser útiles para algunas personas al reducir los signos y síntomas, como la picazón y la descamación. Estos tratamientos serían más adecuados para las personas con la enfermedad más leve, en placa, pero no para aquellas con pústulas, eritrodermia o artritis.¹⁴

Aceite de pescado. Los ácidos grasos omega-3 que contienen los suplementos de aceite de pescado pueden reducir la inflamación causada por la psoriasis, aunque los resultados de los estudios no son concluyentes. Tomar 3 gramos o menos de aceite de pescado por día suele considerarse seguro y puede ser beneficioso.¹⁴ (figura 9)

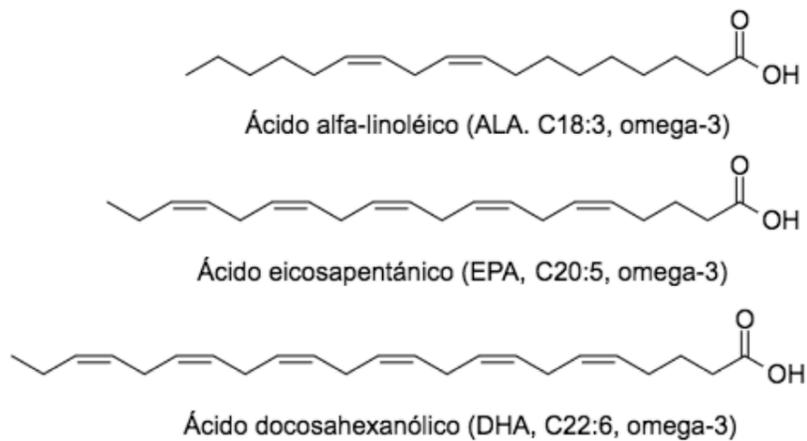


Figura 9. Ácidos grasos omega 3, presentes en el pescado.²⁷ (Germana, 2013)

***Aloe vera*.** La crema con extracto de aloe, tomada de la planta de *Aloe vera* (figura 10), puede reducir el enrojecimiento, la descamación, la picazón y la inflamación. Puede que deba usarse la crema varias veces por día durante un mes o más para notar mejorías en la piel.¹⁴



Figura 10. Planta de *Aloe vera*.²⁸ ("Missouri Botanical Garden", n.d.)

Uva de Oregón. La uva de Oregón, (figura 11) también llamada «bérbero», corresponde a la planta *Berberis aquifolium*, tiene aplicaciones tópicas que pueden reducir la inflamación y aliviar los síntomas de la psoriasis.¹⁴



Figura 11. Planta *Berberis aquifolium*²⁹ (“Missouri Botanical Garden”, n.d.)

2.5.5. Productos Naturales como Agentes Terapéuticos.

Los productos naturales constituyen un material de suma importancia para la obtención de moléculas innovadoras, ya sea para utilizarse directamente a la molécula como agente terapéutico, o que sufran modificaciones químicas para mejorar su acción farmacológica. Entre alguno de ellos se encuentran:

Bavachromanol (Chalkona): Compuesto extraído de las semillas de la *Psorea Corylifolia* Linn (familia Leguminosae), que es una planta herbal, a la cual se le han atribuido inmensas actividades medicinales, aplicadas en las enfermedades de la piel como psoriasis, leucoderma y lepra.³⁰

Furanocumarinas: son un grupo natural y sintético de compuestos que son usados para el tratamiento de fototerapia de algunas enfermedades como linfomas y algunos desordenes autoinmunes. Estas moléculas tienen propiedades farmacológicas que son, incluso, activadas sin radiación, y han mostrado utilidad en el tratamiento para la esclerosis múltiple, debido a su capacidad para bloquear los canales de potasio.³¹

La actividad anti proliferativa que han mostrado distintos compuestos se relaciona con la capacidad de foto inducción en lesiones selectivas en el ADN, y que, además, es un mecanismo eficaz para el tratamiento de psoriasis y micosis fungoide.³²

Capsaicina (alcaloide): Sustancia que mitiga el dolor y hormigueo relacionado con psoriasis al drenar neurotransmisores del nervio táctil. Así como la reducción de la transmisión del dolor, e interviene en el mecanismo de inflamación.³³

En algunas aplicaciones de capsaicina tópica se ha demostrado que disminuye la cantidad de la sustancia P, que es un importante neurotransmisor de los impulsores nociceptivos en las fibras tipo C sensitivas.³³

La capsaicina puede encontrarse en la pimienta Cayena y en algunos chiles picantes. (figura 12)³³



Figura 12. Estructura química de la Capsaicina, procedente de chiles.³³
(Acasuso Diaz, Collantes Estevez & Jordi, 2020)

2.6. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo esencial de compuestos polifenólicos, con un núcleo flavánico que lo caracteriza. Es una de las clases más comunes de compuestos disponibles en verduras, frutas, y bebidas de origen vegetal.³⁴⁻³⁶

Los flavonoides son sustancias fenólicas hidroxiladas. Son una subdivisión de grupos polifenólicos que tiene una estructura de benzo- γ pirona, que representan metabolitos secundarios. Se les atribuye distintos efectos antioxidantes asociados con enfermedades como el cáncer, Alzheimer, aterosclerosis.³⁴⁻³⁶

Los flavonoides están asociados con un amplio espectro de efectos benéficos para la salud, y que se ha vuelto componente indispensable en la aplicación cosmética, farmacológica y medicinales. Debido a su carácter antioxidante, antiinflamatorio, anti mutagénico, antimicrobiano, anticancerígeno, capacidad de captación de radicales libres, así como la capacidad para inhibir enzimas, como la aldosa reductasa.³⁴⁻³⁶

Basados en su estructura química (ver figura 13), se puede categorizar a los flavonoides en 6 diferentes clases: flavonas, iso-flavonas, flavanoles, antocinidinas, flavonoles y flavanonas.³⁶

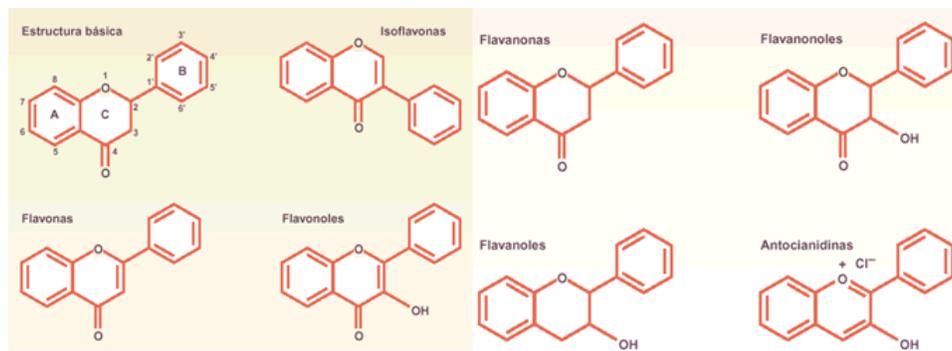


Figura 13. Estructura química básica de los flavonoides y de las distintas subfamilias.³⁶ (Álvarez Castro & Orallo Cambeiro, 2003)

Flavonas: doble enlace entre la 2a y 3a posición, una cetona en la 4^a posición del anillo C, y en ocasiones, un grupo hidroxilo en la 5^a posición del anillo A.^{37, 38}

Flavanonas: su diferencia estructural entre las flavonas y flavanonas se encuentra en el anillo C, pues este está saturado. Poseen actividades antiinflamatorias y cardiovasculares.^{37, 38}

Isoflavonas: se caracterizan por tener la unión de los anillos B y C en la 3^a posición. Son conocidos por poder imitar la actividad de la hormona estrógeno por su similitud estructural.^{37, 38}

Flavonol: el grupo hidroxilo se encuentra en la 3^a posición en el anillo C, y a veces existe en forma glicosidada.^{37, 38}

Flavanol: también conocido como flavan-3-oles debido al enlace del grupo hidroxilo en la 3^a posición del anillo C. Poseen dos centros quirales en la 2^a y 3^a posición de la molécula.^{37, 38}

Antocianósidos: Los antocianósidos son heterósidos (también se denominan antocianinas) cuyos aglicones (antocianidinas o antocianidoles) derivan del ión flavilio (2-fenil benzopirilio).^{37, 38}

2.6.1. Biosíntesis de flavonoides

La biosíntesis de estos metabolitos secundarios se origina en las plantas por medio de una ruta mixta, ruta del ácido shikímico y la ruta del acetato malonato. En donde se origina un acoplamiento del 4-hidroxicinamoil-CoA con 3 moléculas de malonil-CoA, cuyo intermediario puede o no puede ser reducido a través de una enzima reductasa y NADPH. Los intermediarios sufrirán una reacción tipo Claisen, catalizada por la enzima sintasa, formando las chalconas.³⁸ Las flavanonas continuarán su síntesis a partir de las chalconas por medio de una serie de reacciones que involucrarán ataques nucleofílicos de los hidroxilos α y β de las chalconas. (figura 14)³⁸

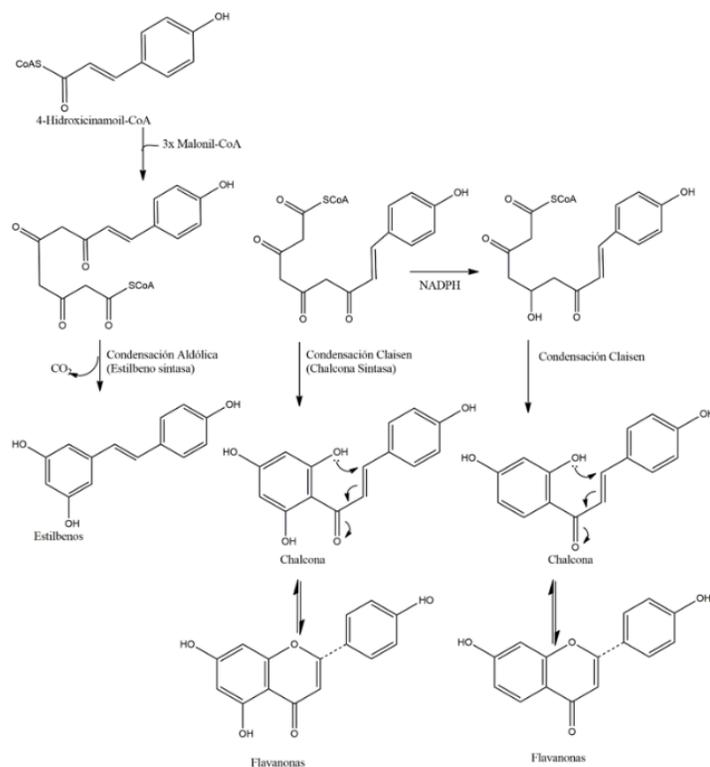


Figura 14. Biosíntesis de Flavonoides.³⁸

2.6.2 Actividades terapéuticas de flavonoides

Los flavonoides se caracterizan por tener la capacidad de modular distintas enzimas, interferir en los mecanismos de señalización y participar en procesos celulares, todo esto debido a sus características tanto fisicoquímicas como estructurales. La presencia de grupos hidroxilos aromáticos reactivos, permite el establecimiento de puentes de hidrógeno, formación de enlaces covalentes e inclusive la posibilidad de formar puentes con iones metálicos como el hierro (Fe^{2+}), que permitirá interactuar con moléculas simples, como radicales o reacciones de oxidación y reducción.³⁸

Entre las actividades terapéuticas que se les atribuye a los flavonoides a continuación se mencionan algunas de ellas.

2.6.2.1. Actividad anticancerígena.

Algunos flavonoides inhiben el paso del agente precursor a mutágeno durante la elaboración de los alimentos, así como dificultan la absorción del promotor tumoral en el tubo digestivo. Muchos de estos efectos cancerígenos podrían deberse al resultado de la modulación de enzimas metabólicas hepáticas. Las enzimas del citocromo P450, enzima que participa en la fase I del metabolismo, pueden representar la primera fase de acción frente a moléculas de carácter exógeno, por lo que puede modificar el metabolismo de algunos mutágenos. Los flavonoides pueden interrumpir la metabolización de los agentes mutagénicos o de sus precursores, por una doble vía. Induciendo la síntesis de enzimas metabólicas de fase I como de fase II, por lo que se consideran inductores bifuncionales. Este patrón, sobre enzimas metabólicas, puede variar en función de la vía de administración, así como de la vía de administración.³⁸

2.6.2.2. Protección frente a mutágenos activos.

Algunos flavonoides, además de ser caracterizados por la inhibición de procarcinógenos, también actúan capturando a mutágenos, interponiéndose entre este y su diana de acción. La eficacia inhibidora varía según el mutágeno frente al que actúen, así como de la estructura química del flavonoide y la polaridad de esta.³⁹

2.6.2.3. Actividad antioxidante.

Los flavonoides destacan por su efecto antioxidante, ya que pueden inhibir la peroxidación lipídica. La acción antioxidante de los flavonoides se debe a su capacidad de poder reducir radicales libres y quelar metales, que, por consiguiente, impedirá reacciones catalizadoras de radicales libres.³⁹

Los flavonoides también son responsables de acciones: diuréticas, antiespasmódicas, antiulcerosa gástrica y antiinflamatoria.³⁹

2.7. *Eysenhardtia platycarpa* y flavanonas aisladas.

La especie *Eysenhardtia platycarpa* ha sido objeto de estudio en el grupo de investigación desde el año 2004. 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: (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**), (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**2**) (2S)-5,7-dihidroxi-6-prenil-flavanona (**3**), (2S)-5,7-dihidroxi-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**4**), (2S)-5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil-flavanona (**5**), entre otros compuestos (Figura 15).⁴⁰

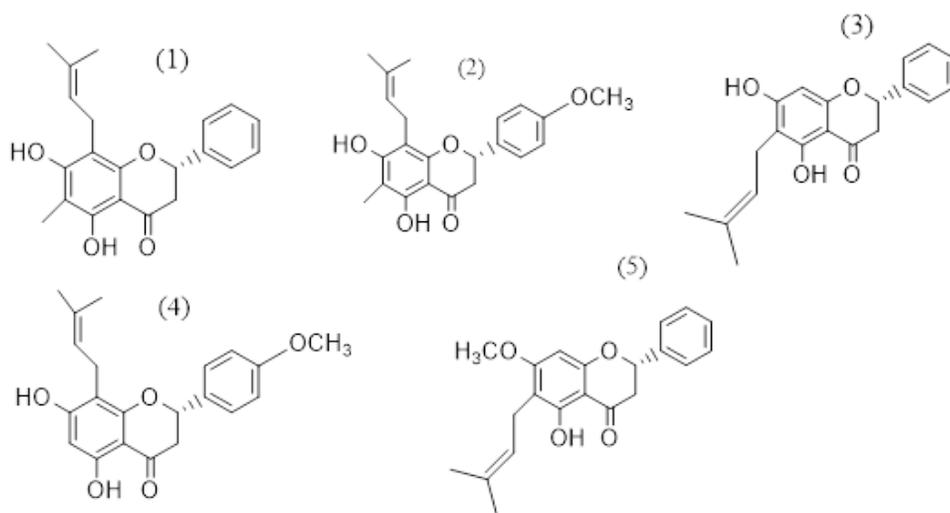


Figura 15. Estructuras de la flavanonas naturales.⁴⁰

2.7.1. Antecedentes farmacológicos de *E. platycarpa* y flavanonas aisladas

La planta *E. platycarpa* ha sido estudiada para determinar diferentes propiedades farmacológicas entre ellas, en 2004 la toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto metanólico

de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa* y de las flavanonas (2S)-5,7-dihidroxi-6-prenil flavanona (**3**) y (2S)-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**).⁴¹

La actividad antiinflamatoria realizada por Carrillo en 2004 de las flavanonas (**3**) y (**4**) 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.⁴¹

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.⁴²

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-11α,12α-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.⁴²

Por otra parte, en 2008, 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 4.⁴³

Tabla 3. Actividad antioxidante de extractos de especies del género *Eysenhardtia*.⁴³
(Narváez *et al*, 2008).

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

Tabla 4. Actividad antioxidante reportada para compuestos de tipo flavonoide y cumarinas. subcoriacin (1), (+)-catechin (2), (α)-epicatechin (3), (+)-afzelechin (4), eriodictyol (5), (+)-catechin 3-O-β-D-galactopyranoside (6) and quercetin 3-O-β-Dgalactopyranoside (7) ⁴³
(Narváez *et al*, 2008).

Antioxidant activity of coumarin and flavan-3-ols			GSH ± SEM (µg GSH mg protein ⁻¹)	
Compound	AOAEC ₅₀ ± SEM (µM)	DPPH EC ₅₀ ± SEM (µM)	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 ± 0.006
Quercetin (reference)	18.1± 1.1	14.3±1.1	0.88 ± 0.01	0.86 ± 0.02

En 2009, Camacho-Corona *et al*, reportaron actividad antimicrobiana sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y tres aislamientos clínicos multidrogoresistentes (345, M-12 y M-20) evaluando 35 metabolitos secundarios aislados de 11 de plantas, entre ellas *E. platycarpa*. La flavanona 5,7-dihidroxi-8-prenil flavanona y 5,7 hidihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1) fueron consideradas en el estudio y los valores de MIC (µg/mL) reportados para la flavanona (1) fueron: Para H37Rv mayor a 50; para 345 un valor de 200, para M-12 un valor de 200 y finalmente para M-20 un valor mayor a 200, considerando que para estreptomycin (fármaco de referencia) se obtuvieron valores de MIC (µg/mL) por debajo de 25 para las cepas ensayadas.⁴⁴

Andrade en 2013, preparó la serie de farmacomodulados esterificado, metilado, ciclizado y ciclizado vinílico a partir de los compuestos (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) y (2S)-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 (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona y el derivado ciclizado vinílico de (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxiflavanona.⁴⁵

En 2013 Cárdenas, en 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 (**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 la de polisulfona y sin ella, resultando una menor concentración permeada a través de la membrana de polisulfona pero con mayor control de liberación.⁴⁶

En 2014, Domínguez-Villegas reportó la actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA para las flavanonas (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) con un porcentaje de inhibición de la inflamación de 12.24 ± 00.00 ; para (2S)-5,7-dihidroxi-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 (**5**) 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.⁴⁷

Domínguez-Villegas y colaboradores en 2014 realizaron trabajos sobre el aislamiento de flavanonas de la planta *Eysenhardtia platycarpa* con potencial actividad farmacológica las cuales

fueron: 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1); 5,7-dihidrorxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (2); 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (3); y 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (5), desarrolladas bajo sistemas de nanoemulsión y nanopartículas poliméricas con tamaños de gota menores a 70 nm, demostraron que la actividad antiinflamatoria de las cuatro. 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.⁴⁷

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, las cuales fueron obtenidas del extracto metanólico de hojas de *Eysenhardtia platycarpa* para elucidar su mecanismo de acción; 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

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 (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1) y (2S)-5,7-dihidrorxi-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 (2S)-5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (3); y (2S)-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

Garduño-Ramírez y colaboradoras en 2015, implementaron el modelo *in vivo* para el desarrollo de psoriasis considerando la inducción de la inflamación crónica *in vivo* con la aplicación de TPA en oreja de ratón por 21 días; para ese proceso de implementación se emplearon los grupos: control blanco (vehículos), control positivo (metotrexato) y el grupo de prueba la flavanona (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1); dicho estudio no fue publicado y se retoma en el presente proyecto de tesis. Este modelo fue utilizado posteriormente para la realización de la investigación con Limón, D. y colaboradores en 2019.⁴⁹

Andrade en 2017, preparó nanopartículas poliméricas con PLGA y nanoemulsiones de la serie de compuestos farmacomodulados obtenidos a partir del compuesto (3) y evaluó los compuestos sobre la línea celular MiaPaCa-2.⁵⁰

Andrade en 2017, preparó una nueva serie de farmacomodulados sobre el compuesto (2S)-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.⁵¹

En 2018, Terreros formuló en una nanoemulsion 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 µg/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.⁵²

En el presente año 2020, Salgado-Bustos, Paola y colaboradores, presentaron la validación del método HPLC para la cuantificación de flavanonas preniladas (2S) -5,7-dihidroxi-6-3-metil-2-buten-1-il)-2-fenil-2,3-dihidro-4H-1-benzopirán-4-ona y derivados (2S)-5,7-bis(acetiloxi)-6-(3-metil-2-buten-1-il)-2-fenil-2,3-dihidro-4H-1-benzopirán-4-ona; (2S) - 5 - hidroxí-7 -metoxi -6- (3-metil-2-buten-1-il) -2-fenil-2,3- dihidro - 4H-1-benzopirán-4-ona; (8S) – 5 - hidroxí-2,2-dimetil-8-fenil-3,4,7,8-tetrahidro-2H,6H-benzo [1,2-b: 5,4-b'] dipirán-6-ona; y (8S)-5-hidroxí-2,2-dimetil-8-fenil-7,8-dihidro-2H, 6H-Benzo [1,2-b: 5,4-b'] dipirán-6-ona aplicado en estudios biofarmacéuticos. Las relaciones lineales se prueban con coeficientes de correlación significativos ($R^2 > 0.999$) en el rango de 1.56 a 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ con límites bajos de detección y cuantificación, en promedio de 0,4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y 1.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. El método de validación utilizado en este trabajo es muy exacto y preciso, con valores inferiores al 15 %. Los valores de desviación estándar relativa de repetibilidad del sistema instrumental se demuestran con menos del 0.6% para todas las flavanonas estudiadas. Por tanto, el método de aplicabilidad de la cuantificación de las flavanonas preniladas se estableció utilizando la permeación de la piel humana en el sistema de células de Franz. Durante el método descrito anteriormente, no se observó interferencia de los componentes de la piel humana en los estudios de permeación *ex vivo*.⁵³

2.8. Tecnología Farmacéutica

Los productos naturales han sido usados en la industria farmacéutica a lo largo de los años. Como se ha mencionado en apartados anteriores, estos compuestos naturales han cobrado importancia debido a sus potenciales efectos terapéuticos contra cáncer, infecciones microbianas, inflamaciones y otras condiciones.

Un avance en el área de los productos naturales ha sido la incorporación de nanopartículas, avance que ha incrementado la biodisponibilidad de los principios activos con esta nueva tecnología.

2.8.1. Sistemas nanoestructurados de liberación controlada

La nanotecnología ha desarrollado la capacidad de manipular las partículas, que permitiría dirigir el fármaco a áreas específicas del cuerpo, y controlar la liberación del compuesto activo.⁵⁴

Las nanopartículas con liberación controlada han demostrado aumentar significativamente la biodisponibilidad de estos productos, de forma *in vitro* e *in vivo*.⁵⁴

La cantidad y velocidad a la que se libera un fármaco a partir de la nano formulación depende de distintos factores, como el tipo, tamaño y cantidad de fármaco.⁵⁵

Los sistemas nanoestructurados (figura 16) proponen que la liberación debe desarrollarse de tal modo que se identifique el sitio blanco, se dirija a él y se haga la entrega del fármaco, pero de una manera controlada en respuesta a distintos estímulos internos, como pH, presencia de enzimas, etc. Además de asegurarse que el medicamento llegue al sitio de acción, también tiene la ventaja de que sea a concentraciones determinadas dentro de un rango terapéutico efectivo, y que esta concentración permanezca constante durante el tiempo que sea necesario.⁵⁶

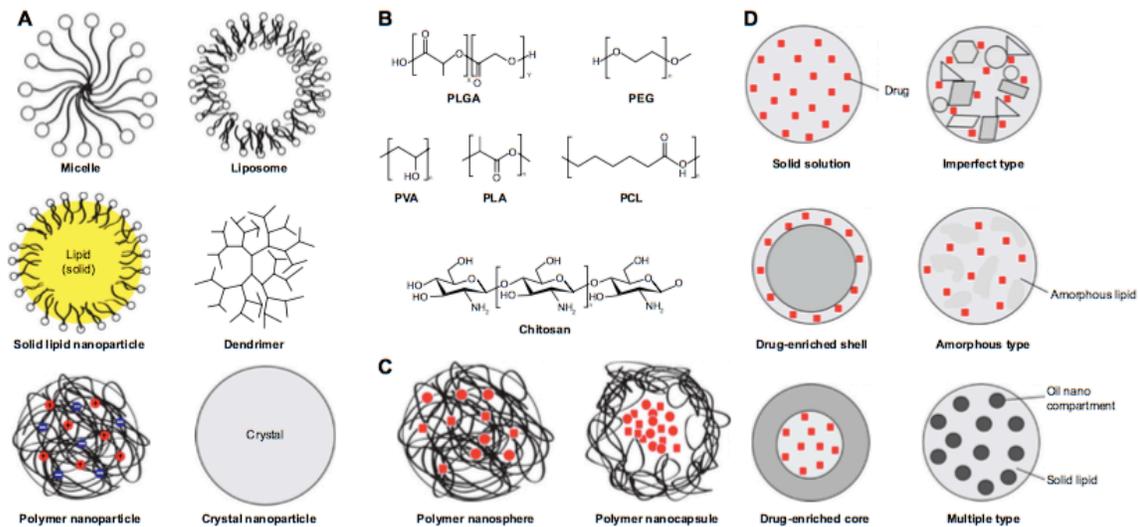


Figura 16. Sistemas nanoestructurados empleados para la liberación controlada de fármacos.⁵⁴ (Watkins, R, *et al*,2015)

2.8.1.1. Nanoemulsiones (NEs)

Una nanoemulsión es un sistema disperso que se constituye de dos o más componentes que son inmiscibles entre sí, uno de ellos disperso dentro del otro en forma de gotas que son estabilizadas por un surfactante, con un rango de tamaño de gotícula de 20 a 200 nm, y con baja polidispersidad. Propiedades que proporcionan estabilidad cinética, pero termodinámicamente inestables, que requieren energía para su formación, y debido a esto, se recurre a métodos fisicoquímicos o métodos de dispersión.⁵⁷

Debido a estas propiedades, las nanoemulsiones han sido puestas bajo lupa en la aplicación en industrias químicas, cosméticas, alimentarias y especialmente en las farmacéuticas, ya que, debido a su tamaño, las nanoemulsiones pueden penetrar superficies rugosas que facilitarían la administración cutánea de la droga, y evitaría la degradación química o enzimática del intestino en el primer paso de la metabolización.⁵⁸

2.8.2. Parches transdérmicos

Los parches transdérmicos (STT) son formas farmacéuticas de aplicación tópica que permiten dosificar los fármacos durante un periodo de tiempo definido, cuyo objetivo será tener una acción sistémica sobre un órgano o sistema determinado.⁵⁹

Los STT son integrados por una capa externa de recubrimiento impermeable que protege la formulación, una matriz de principio activo y sustancias que facilitarán la absorción del fármaco, una lámina adhesiva y otra capa protectora.⁵⁹

2.8.2.1. Beneficios del uso de parches transdérmicos

Entre las ventajas innovadoras del empleo de los parches se encuentran: la liberación controlada de los principios activos, además de que proporcionan niveles plasmáticos constantes y sostenidos. Evitan la desactivación de los principios activos por enzimas digestivos, así como

la metabolización por el pasó al hígado. Además de que hay una mayor comodidad en su administración y versatilidad, reducción de efectos secundarios y se mejora el uso de las sustancias de vida media corta.⁶⁰

2.9. Antecedentes de formulaciones nanoestructurada de productos naturales

Debido a las múltiples propiedades farmacológicas que muchos productos naturales han mostrado, como antiinflamatorios, antiproliferativos, fotoprotectores, despigmentantes, antienvjecimiento, entre otras, su vía de administración tópica ha sido ampliamente estudiada

Alvarado, H. L. y colaboradores en 2015, desarrollaron y optimizaron una nanoemulsión cuya administración sería dérmica, de una mezcla de triterpenos pentacíclicos naturales y sintéticos con actividad antiinflamatoria reconocida. Se llevaron a cabo estudios de permeabilidad real y cutánea utilizando células de difusión de Franz, ajustando la cinética real de ambas formulaciones al modelo Korsmeyer-Peppas. En el cual no se observó diferencia significativa entre los parámetros de permeación de las dos nanoemulsiones. Se concluyó que la cantidad de fármaco retenido en la piel fue superior a la cantidad de fármaco que había penetrado, lo que favorecería una acción local. Se demostró que las formulaciones desarrolladas no eran de carácter tóxico ni irritante para la piel, corroborando su uso para el tratamiento de afecciones inflamatorias.⁶¹

2.9.1. Citotoxicidad *in vitro* de triterpenoides en nanopartículas

Los ácidos oleanólicos y ursólico se encuentran dentro de la familia de los triterpenoides, y han sido reconocidos por sus propiedades anticancerígenas. Se ha demostrado que, al ser cargados en nanopartículas poliméricas, estos pueden mejorar su actividad citotóxica.⁶¹

2.9.2. Desarrollo de sistemas nanoestructurados para aplicaciones tópicas de flavanonas

Los fármacos antiinflamatorios se han popularizado debido a las muchas enfermedades inflamatorias que se están volviendo comunes en la sociedad. Por lo que se han desarrollado formulaciones de flavanonas aisladas de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa* que han demostrado una fuerte actividad farmacológica en sistemas de nanoemulsión y nanopartículas, las cuales son de uso tópico, que muestran perfiles de liberación en estado estacionario a lo largo del tiempo, demostrando indudablemente una mayor eficacia, así como propiedades, al estar en sistemas nanométricos.⁴⁷

2.9.3. Diseño y optimización de nanoplataformas de ácido oleanólico (OA) y ursólico (UA) para aplicaciones antiinflamatorias oculares

Estos triterpenos pentacíclicos (OA y UA) han despertado gran interés como agentes terapéuticos antiinflamatorios.⁶¹

La optimización de nanopartículas poliméricas (NPs) cargadas con mezclas naturales y sintéticas, para la administración oftálmica mostraron resultados óptimos y estables con propiedades fisicoquímicas adecuadas, así como una distribución homogénea, demostrando que las cantidades de fármaco retenidas en el tejido corneal, así como la liberación, fueron mayores en las pruebas de nanopartículas cargadas naturalmente en comparación con las sintéticas.⁵⁸

2.10. Flavanonas formuladas en sistemas nanoestructurados

Dominguez-Villegas, V. y colaboradores, en 2014, concluyeron mediante distintos análisis, que los compuestos de las flavanonas [(2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**); (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4-metoxi-flavanon (**2**), (2S)-5,7-dihidroxi-6-prenil flavanona (**3**) y (2S)-5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil flavanone (**5**)] en sistemas nanoestructurados, pueden mejorar la penetración del compuesto activo sobre la piel, esto debido al tamaño de gotícula, así como la presencia de promotores de permeación. Se llevó a cabo la evaluación de la actividad

antiinflamatoria, con NEs cargadas con las flavanonas y NP polimérico, que fueron analizados por TPA inducido en edema de oreja de ratón siguiendo el protocolo V. Domínguez-Villegas y col., utilizando como referencia medicamentos antiinflamatorios estándar. En su estudio mencionan que cada flavanona utilizada se cargó con una concentración fija, concluyendo que el atrapamiento de antiinflamatorios no esteroides en sistemas de suministro de partículas, sí representa una alternativa innovadora que minimizaría los efectos secundarios, así como la preservación de su eficacia, lo cual proporcionaría una liberación controlada efectiva.⁶²

Mientras que Andrade-Carrera, B. realizó un estudio en el cual se aisló de las hojas de la *Eysenhardtia platycarpa* la (2S) -5,7-dihidroxi-6- (3-metil-2-buten-1-il) -2-fenil-2,3-dihidro-4H-1-benzopirán-4-ona (**3**), de la cual se generaron nuevos derivados químicos con actividad citotóxica; mismos que se formularon en sistemas de nanométricos con tamaño de partícula y polidispersión adecuados, siendo evaluados frente a la línea celular de cáncer de páncreas. De los cuales se demostró que dos de los cuatro derivados, en nanopartículas exhibieron citotoxicidad óptima, por lo que fueron propuestos como candidatos a agentes anticancerosos.⁵⁰

2.10.1. Flavanonas isoprenílicas antiinflamatorias libres y vehiculizadas en sistemas nanoestructurados

Se aislaron cuatro flavanonas isoprenílicas de la especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa*. Se evaluó su eficacia antiinflamatoria y antioxidante en modelos TPA oreja de ratón. Se elaboraron nanoformulaciones: nanoemulsiones (NEs) y nanopartículas (NPs) de estas cuatro flavanonas. Obteniéndose un patrón denso de principio activo. A partir de las NPs y NEs se encontró que los compuestos vehiculizados en nanopartículas liberan más rápido que en nanoemulsiones. Siendo la flavanona (2S)- 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil flavanona (**3**) vehiculizada en nanoemulsión y nanopartículas poliméricas, la que mejor presentó resultados de permeación y actividad antiinflamatoria, por lo que es un candidato óptimo para considerarse un potente agente antiinflamatorio de uso tópico.⁶²

2.10.2. Flavanonas en sistemas nanoestructurados para el tratamiento de psoriasis

En 2019, Limón, D. y colaboradores realizaron un estudio que demostró que las flavanonas agliconas son compuestos con mayor absorción cutánea a comparación de las otras subclases. Esto permitió el desarrollo potencial de flavanonas aplicadas tópicamente para tratar piel inflamada. Está reportado que las flavanonas son efectivas en el tratamiento de padecimientos relacionados con la piel como la psoriasis.⁶³

Los tratamientos tópicos son limitados debido a los efectos secundarios que suelen aparecer, como irritación, fototoxicidad, inmunosupresión cancerígena.⁶⁴

Ahmed Alalaiwe y su equipo de investigación (2020) determinó la liberación *in vitro* de flavanonas seleccionadas (Flavanona aplicada y sus derivados, incluyendo naringenina, hesperetina, 6-hidroxi-flavanona, flavanona y 6-Bromoflavona). Como resultado se concluyó que la naringenina logró una mejora notable en la barrera defectuosa de la piel, también hubo una inhibición notable de los queratinocitos activados y los signos de lesión psoriasisiforme se atenuaron.⁶⁴

2.11. Modelos computacionales empleados para la predicción de la actividad biológica de moléculas orgánicas

Los modelos de predicción computacional, también llamados herramientas predictivas, juegan un papel destacado en el repertorio de metodologías que guían la investigación tecnológica farmacéutica, se utilizan para estudiar sustancias existentes e hipotéticas, prediciendo resultados de comportamiento farmacológico, farmacocinético y toxicológico.⁶⁵

Estas herramientas predictivas ya han sido recomendadas por agencias reguladoras para estudios de desarrollo tecnológico con el fin de verificar la toxicidad teórica de sustancias en el metabolismo de mamíferos, además de permitir la creación de una base de datos de relaciones entre estructura química y actividad biológica.⁶⁵

2.12. Quimioinformática

La Química es la ciencia que estudia la materia, su composición y propiedades, además de estudiar los procesos de transformación mediante reacciones y cambios; dentro de ella se encuentran distintos campos profesionales de estudio. Éstas ramas y campos que la conforman son: Química Inorgánica, Química Orgánica, Bioquímica, Fisicoquímica, a su vez con mayor especificidad de éstas últimas se derivan: la cristalografía, Astroquímica, Química Organometálica, Estereoquímica, Química Farmacéutica, Química Medicinal, Quimiurgia, Química Ambiental, Química de Alimentos y Quimioinformática, entre otras.⁶⁵

Es así como a lo largo del tiempo y con el avance tecnológico y la información ya generada sobre la investigación de compuestos orgánicos con aplicación terapéutica, han permitido el desarrollo de nuevos modelos, y plataformas para la obtención de datos concretos, así como el desarrollo de nuevos blancos moleculares y compuestos bioactivos. De esta manera se desarrolló la Quimioinformática, misma que permite la obtención de datos relevantes sobre la investigación de nuevas moléculas orgánicas con potenciales terapéuticos, y de esta manera al combinar herramientas informáticas, tecnológicas, y conocimiento de moléculas bioactivas ha permitido el diseño racional de principios activos para la aplicación farmacéutica, obteniendo un mejor uso de recursos y tiempo para el desarrollo y obtención de nuevos medicamentos.⁶⁶⁻⁶⁷

Por su parte, Monge Vega *et al.*, 2004 menciona que la quimioinformática facilita la resolución de problemas como el cálculo de estructuras y reacciones moleculares, apoyado de simulaciones de procesos químicos, enriqueciendo las representaciones químicas, buscando más allá de sus estructuras, capturando sus propias estructuras biológicas, y apoyado de simulaciones de procesos químicos.^{50, 68}

Cada uno de los programas quimioinformáticos utilizados para el desarrollo del presente trabajo de tesis, proporciona propiedades intrínsecas moleculares de cada compuesto analizado para conocer sus propiedades fisicoquímicas y sus posibles propiedades farmacológicas, permitiendo establecer de forma predictiva blancos terapéuticos, de forma sencilla y eficiente.^{64,66}

2.13. Estudios *In silico* y su aplicación

A la forma de recreación de estructuras complejas por medio de las computadoras se le ha dado el nombre de modelos *in silico*, haciendo alusión a la estructura interna de sílice.

En los estudios *in silico*, el objetivo es diseñar nuevos derivados basados en la estructura de un compuesto líder y evaluarlos en modelos *in silico* a través de filtros quimioinformáticos y estudios de acoplamiento molecular que permitan identificar las propiedades fisicoquímicas y sus posibles blancos terapéuticos.⁶⁹ Contribuyendo a entender mecanismos de acción y la mejora de las propiedades de los mismos. Un ejemplo de optimización es la de fármacos provenientes de productos naturales, mejorando las características de estos medicamentos, como la reducción de efectos secundarios.⁷⁰

Para realizar dicho estudio se pueden emplear diversas plataformas existentes en internet de acceso gratuito o mediante membresía. En dichas plataformas se incorporan dos o más moléculas en tercera dimensión para conocer sus distintas interacciones entre ellas, para predecir la estructura intermolecular que se genera con dichas moléculas. En cuanto a sus algoritmos, pueden ser capaces de generar un gran número de posibles estructuras gracias a las interacciones que se encuentren en los análisis de complejos de proteína-ligando. Los ligandos pueden ser construidos utilizando ChemsSketch y su geometría optimizada en 3D utilizando el mismo programa.^{69, 71}

Molinspiration ofrece una amplia gama de herramientas de software para la manipulación y procesamiento de moléculas, incluidas 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 soportan subestructuras y búsquedas de similitud. Molinspiration también admite detección virtual basada en fragmentos, predicción de bioactividad y visualización de datos. Las herramientas de Molinspiration están escritas en Java, por lo tanto, se pueden usar prácticamente en cualquier plataforma de computadora.⁷²

El método que implementa *Molinspiration* es el uso estadístico para comparar estructuras de ligandos representativos activos, con su objetivo particular de estructuras de moléculas inactivas para identificar características de subestructura (que a su vez determinan propiedades fisicoquímicas) típicas de moléculas activas.⁷³

PASS OnLine (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.⁷⁴

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).⁷⁴

P_a (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).⁷⁴

P_i (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).⁷⁴

SwissTargetPrediction se basa en la observación de que es más probable que moléculas bioactivas similares compartan objetivos similares. Por lo tanto, los objetivos de una molécula se pueden predecir identificando proteínas con ligandos conocidos que son muy similares a la molécula de consulta. En esta estrategia basada en ligandos, un desafío importante es identificar y cuantificar con precisión la similitud entre la molécula de consulta y los ligandos conocidos. Los primeros enfoques se han centrado en determinar la similitud química mediante el uso de huellas dactilares moleculares (a veces llamado similitud 2D). Si bien los compuestos que muestran una alta similitud bajo estas medidas tienen claramente una mayor probabilidad de interacciones con objetivos similares, la biofísica del reconocimiento molecular sugiere que la similitud en la forma del ligando o la distribución del potencial electrostático también podría conducir a un efecto similar.⁷⁵

En la nueva versión, las predicciones se realizan mediante la búsqueda de moléculas similares, en 2D y 3D, dentro de una colección más grande de 376 342 compuestos que se sabe que son activos experimentalmente en un conjunto extendido de 3068 dianas macromoleculares. Una implementación de backend eficiente permite acelerar el proceso que devuelve resultados para una molécula similar a un fármaco en proteínas humanas en 15-20 s.⁷⁶

3. JUSTIFICACIÓN

La psoriasis es una enfermedad crónica que se puede tratar y con ello reducir en gran medida las lesiones y las molestias que presentan las personas que la padecen. En México se estima que 2.5 millones de personas padecen alguno de los tipos de psoriasis. Actualmente, se cuenta con diferentes tratamientos convencionales de administración tópica, sistémica y fototerapia de fármacos como metotrexato, ciclosporina o acitretino, por mencionar algunas; los pacientes acuden también a tratamientos alternativos como son las plantas medicinales y sus metabolitos secundarios que han demostrado un papel importante en el tratamiento y en el descubrimiento de nuevos agentes potenciales contra la psoriasis. Curiosamente, en América y Europa, alrededor del 50 % de los sujetos afectados por la psoriasis utilizan medicina complementaria y/o alternativa, incluidas las medicinas de origen vegetal. Por otra parte, las nuevas tecnologías en nanomedicina han permitido ya formular en sistemas nanoestructurados de liberación controladas algunos de los principios activos empleados en los tratamientos de psoriasis y se ha comprobado que los nuevos sistemas tópicos de administración de fármacos tienen mejores beneficios terapéuticos que medicamentos existentes de formulación convencional, debido a que resultan seguros y cuentan con una entrega efectiva de nuevos medicamentos para satisfacer las necesidades del cuerpo, particularmente para pacientes con psoriasis. Las nanoemulsiones están bien caracterizadas y son un sistema prometedor de suministro de medicamentos tópicos para pacientes con psoriasis. Ha habido intentos recientes de usar nanoemulsiones para mejorar las existentes formulaciones tópicas de medicamentos para tratar la psoriasis. De hecho, una serie de estudios sobre nanoemulsiones como administración tópica de antipsoriáticos ya se han reportado. Es entonces que con el presente proyecto de tesis se aportará conocimiento sobre el desarrollo de nuevas formulaciones nanoestructuradas empleando diferentes surfactantes y/o co-surfactantes para establecer una formulación novedosa monofásica, translúcida y monomodal para ser considerada como un posible tratamiento de psoriasis, aunado a ello, se aporta un estudio *in silico* realizado con diferentes compuestos de origen naturales antipsoriasis, metotrexato y la flavanona natural en estudio para identificar un blanco terapéutico específico empleando las plataformas *Molinspiration*, *PASSOnline* y *SwissTargetPrediction* y finalmente, se realiza el análisis microscópico de los resultados obtenidos de la implementación del modelo *in vivo* para psoriasis empleando como tratamiento la flavanona natural (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona aplicada por vía transdérmica, comparando cual fue el beneficio obtenido en la piel de las orejas tratadas con la flavanona natural con respecto al resultado con obtenido con metotrexato.

4. HIPÓTESIS

El desarrollo de una formulación nanoestructura de tipo nanoemulsión para la flavanona natural (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona, permitirá contar con una fórmula monofásica, monomodal y de tamaño de gotícula considerable para fines terapéuticos, su estudio *in silico* permitirá identificar si cuenta con las propiedades fisicoquímicas semejantes a las que presentan tanto compuestos naturales antipsoriasis como metotrexato identificando algún blanco terapéutico específico y mediante el análisis por microscopía de los resultados obtenidos del experimento *in vivo* de inducción de la inflamación crónica inducida con TPA en oreja de ratón permitirá evidenciar la eficacia antipsoriásica de la flavanona en estudio con respecto a metotrexato.

Al desarrollar una formulación nanoestructura de tipo nanoemulsión para la flavanona natural (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona, esta será monofásica, monomodal y de tamaño de gotícula considerable para fines terapéuticos; su estudio *in silico* permitirá identificarla como una molécula con propiedades fisicoquímicas idóneas para interactuar con blancos terapéuticos específicos antipsoriasis y el análisis microscópico de los resultados obtenidos del experimento *in vivo* evidenciará su eficacia frente a productos naturales reportados y metotrexato como fármaco de referencia.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Desarrollar una nanoemulsión para la flavanona natural (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**), así como realizar el estudio *in silico* sobre sus propiedades fisicoquímicas y blancos terapéuticos específicos, para considerar su potencial antipsoriasis, aunado con el análisis microscópico de los resultados obtenidos del experimento *in vivo* de inducción de la inflamación crónica inducida con TPA en oreja de ratón y con ello, evidenciar su eficacia frente a productos naturales reportados y metotrexato como fármaco de referencia.

5.2. Objetivos particulares

- Preparar las nanoemulsiones con la flavanona natural en estudio y de metotrexato.
- Caracterizar morfométricamente las formulaciones preparadas.
- Realizar un estudio *in silico* que permita identificar si la flavanona en estudio cuenta con las propiedades fisicoquímicas semejantes a las que presentan tanto compuestos naturales antipsoriasis como metotrexato identificando algún blanco terapéutico específico.
- Analizar por microscopía los resultados obtenidos del experimento *in vivo* de inducción de la inflamación crónica inducida con TPA en oreja de ratón permitirá evidenciar la eficacia antipsoriásica de la flavanona en estudio con respecto a metotrexato.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Flavanona natural

Se dispone actualmente del flavonoide natural en estudio (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) y se encuentra identificado y caracterizado por su punto de fusión y sus datos de espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C con experimentos DEPT, HMBC y HMQC.

6.2. Desarrollo de la nanoemulsión (NEs)

Se consideran tres diferentes matrices de formulación para la preparación de la nanoemulsión, una reportada por Dominguez-Villegas, V. *et al*, 2014, otra reportada por Alvarado, H. *et al*, 2015 y una tercera no reportada; una vez que se prepararon las tres formulaciones por triplicado, generando así las siguientes formulaciones: F1: **F1B**, F2: **F2B**, F3: **F3B**, F4: **F1F**, F5: **F2F**, F6: **F3F**; F1, F2 y F3 fueron nanoemulsiones libre de fármaco, F4, F5 y F6 nanoemulsiones con la flavanona natural (0.5 mg/ml) y F7, F8 y F9 fueron nanoemulsiones con el fármaco de referencia que en el presente proyecto fue metotrexato (0.5 mg/ml) y para su preparación se consideraría la formulación que mejores resultados presentara; fue así que se dejó al final del análisis la preparación de ésta formulación y de todas las formulaciones se determinó el tamaño de gotícula empleando el protocolo reportado por Andrade-Carrera, B. *et al*, 2017 empleando el equipo Nano Z-Sizer. La tabla 5 muestra los componentes generales de las nanoemulsiones preparadas.

Tabla 5. Descripción de los componentes de la nanoemulsión.

Componente	Descripción
Flavanona o Metotrexato	Principio activo
Componente 1	Tensoactivo/Surfactante
Componente 2	Co-tensoactivo/Co-surfactante
Componente 3	Emoliente
Componente 4	Humectante

6.3 Medición de tamaño de gotícula

El análisis del tamaño de las gotículas de las emulsiones se realizó mediante una espectroscopía de correlación fotónica con el equipo Zetasizer HSA 3000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). Como fuente de luz se utiliza un láser de estado sólido. Las mediciones de la espectroscopía de correlación fotónica se realizaron con un ángulo de dispersión de 90°, a una temperatura de 25 °C. Las muestras se colocaron en cubetas de poliestireno de 10 mm de camino óptico. Se prepararon tres experimentos distintos con la emulsión y los datos se expresarán como la media \pm la desviación estándar (SD).

6.4 Caracterización visual de las NEs

En la realización de la inspección visual para distinguir las composiciones homogéneas translúcidas de las heterogéneas o turbias, las NEs se consideraron monofásicas, si se observó una única fase serán homogéneas y translúcidas. Por el contrario, si se observaron dos fases serán bifásicas o bien si presentaron de turbidez.

6.5 Caracterización morfométrica de NEs

Para la caracterización morfométrica de las NEs, se utilizó el instrumento de medición Z-sizer Malvern, que tiene como función determinar el tamaño de gotícula, la polidispersión, el porcentaje de gotículas de diferente tamaño y el diámetro de las gotículas. El tamaño de la fase dispersa de una formulación se midió mediante la técnica "*Light Scattering*", que indica las fluctuaciones de la intensidad de la luz que incide en las gotículas dispersas en la formulación a ensayar. Las gotículas que forman parte de una nanoemulsión, se mueven mediante un movimiento Browniano durante el análisis, y la intensidad de la luz incidida ($I(t)$) fluctúa rápidamente con el tiempo, dando el promedio del tamaño de las gotículas dispersas. Cuando se presenta una sola población de gotículas se considera monomodal y si presenta dos poblaciones se considera bimodal.

6.6. Estudio *in silico*

Para el estudio *in silico* los compuestos considerados en el presente proyecto fueron: Para la realización del estudio *in silico* se consideraron los siguientes compuestos: Naringenina (**1**), Hesperetina (**2**), 6-hidroxiflavanona (**3**), Flavanona (**4**), 6-bromoflavona (**5**), (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**6**), (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**7**), (2S)-5,7-dihidroxi-6-prenil-**(8)**, (2S)-5,7-dihidroxi-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**9**), (2S)-5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil-flavanona (**10**),⁶² y los fármacos anti-inflamatorios Indometacina (**11**), Metotrexato (**12**) y Diclofenaco (**13**) y se llevó a cabo empleando de las plataformas *Molinspiration*, *SwissTargetsPrediction* y *PASS Online*.

Mediante la plataforma *Molinspiration* se construyeron las moléculas en estudio corroborando la construcción 3D con la estructura disponible en PUBCHEM para obtener la secuencia SMILE correspondiente, así como también para metotrexato como molécula antipsoriasis de referencia.

Los cálculos de predicciones de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas en estudio se realizaron empleando la secuencia SMILE obtenida y empleando los simuladores *Molinspiration* y *SwissTargetPrediction*, considerando las siguientes propiedades fisicoquímicas: **A**) Fórmula molecular, **B**) Peso Molecular (g/mol), **C**) Núm. de enlaces aceptores de hidrógeno (nON), **D**) Núm. de enlaces donadores de hidrógeno (nOHNH), **E**) Área de Superficie Polar Molecular (A^2), **F**) Volumen Molecular (A^3); por otra parte considerar los blancos terapéuticos de mayor probabilidad.

Por otra parte, los cálculos de predicción de posibles blancos farmacológicos de las moléculas en estudio se emplearon las plataformas *Molinspiration* y *PASS Online*.

6.7. Estudios *in vivo* de eficacia antiinflamatoria crónica.

La eficacia antiinflamatoria crónica de la flavanona en estudio libre (intrínseca) se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Limón D., *et al* 2019 y cumpliendo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 al implementar el modelo.⁴⁹

El edema en la oreja de los ratones se indujo con TPA en los diferentes grupos ratones macho CD-1, cada grupo con una n = 5. Se administró vía cutánea el agente inductor de la inflamación que corresponde al TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), disuelto en etanol en ambos lados de la oreja derecho (oreja de tratamiento) y en la oreja izquierda se administraron únicamente los vehículos (etanol, acetona o la nanoemulsión libre). Se prepararon tanto la solución del flavonoide en estudio como del fármaco de referencia en acetona (0.5 mg/ml), como también se dispuso de las formulaciones correspondientes: Formulación Blanca (libre de fármaco) (**FB**), formulación con el flavonoide (**FF**) y formulación con el fármaco de referencia (metotrexato) (**FM**) a una concentración de 0.5 mg/ml.

Los grupos de la experimentación fueron los siguientes:

Grupo 1 (G1): Ratones sanos (solución etanol y acetona),

Grupo 2 (G2): Ratones con inducción inflamatoria e hiperplasia, características de piel psoriásica con TPA sin inhibidor inflamatorio,

Grupo 3 (G3): Ratones con inducción inflamatoria e hiperplasia, características de piel psoriásica con TPA y con el inhibidor inflamatorio comercial (metotrexato) (TPA y fármaco de referencia)

Grupo 4 (G4): Ratones con inducción inflamatoria e hiperplasia, características de piel psoriásica con TPA y con el inhibidor inflamatorio (molécula estudiada) (TPA y la flavanona natural en estudio).

La administración tópica de los tratamientos se realizó diariamente a la misma hora de los 4 grupos, por un periodo de 10 días y los días 2, 4, 6, 8, 10 se sacrificará 1 ratón de cada grupo por dislocación cervical, se cortaron secciones circulares (7 mm de diámetro) de las orejas derecha e izquierda, y las secciones se guardarán en viales ámbar con formol para su posterior análisis por microscopía estereoscópica.⁴⁹

6.8. Análisis de los signos macroscópicos de la piel en el modelo crónico *in vivo*

Para el análisis de los signos macroscópicos de la piel en el modelo crónico *in vivo*, que imita la psoriasis, se realizó la aplicación percutánea diaria de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en oreja de ratón durante 21 días. Mediante el análisis fotográfico realizado empleando el Microscopio Binocular estereoscópico, oculares WF 10X - 20 mm, binocular recta ajustable 360° con ajuste de distancias interpupilar de 55 - 75 mm, objetivo: 2X (20 aumentos totales). Para la edición de las fotografías se empleó el software AmScope MD35 con cámara USB digital con una resolución de 640 x 480 píxeles efectivos para microscopio compatible con Windows XP/Vista/7/8/10. Esto se realizó para los cuatro grupos experimentales (n = 3).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Desarrollo de las formulaciones nanoestructuras: Nanoemulsiones

De las diferentes formulaciones nanoestructuradas existentes, para el presente trabajo de investigación se eligió el desarrollo de nanoemulsiones debido a sus propiedades fisicoquímicas que evitan la degradación química o enzimática de los principios activos formulados en ellas y por su amplia aplicación en industrias químicas, cosméticas, alimentarias y especialmente en las farmacéuticas.⁵⁸

Para el desarrollo de las nanoemulsiones en las cuales se formula la flavanona 1 al 0.5 %, se tomó en cuenta que las nanoemulsiones se forman como emulsiones con gotículas cuyo tamaño entra en la escala nanométrica, en la que tanto las gotículas de los componentes lipofílicos como las gotículas del componente hidrofílico están finamente dispersas en la fase opuesta con la ayuda de un surfactante (tensioactivo) apropiado o bien, con la mezcla apropiada de surfactante y co-surfactante, que suelen ser moléculas capaces de estabilizar el sistema; la ventaja de las moléculas de un surfactante y/o co-surfactante radica en que cuentan con grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, con los cuales interaccionan con los componentes de la formulación y el principio activo dando como resultado un sistema con elevada estabilidad cinética frente a la sedimentación, floculación y coalescencia, pero como son termodinámicamente inestables, es necesaria la aportación de energía para su formación; en el caso del presente trabajo se consideró el uso de ultrasonido para la formación de las nanoemulsiones.⁶²

La estrategia aplicada en el desarrollo de las formulaciones para la flavanona en estudio en el presente trabajo de investigación, se basó en el cambio de surfactante y/o co-surfactante, preparando 3 formulaciones distintas (**F1**, **F2** y **F3**). En la tabla 6 se muestran las claves de las formulaciones preparadas. Cabe mencionar que por cuestiones de confidencialidad no es posible revelar la identidad de los componentes de las formulaciones; sin embargo, por cuestiones académicas se podrá mencionar cuales fueron en general los surfactantes y/o co-surfactantes que figuran en cada una de las formulaciones y que dieron origen a los resultados obtenidos que a continuación se describirán.

Tabla 6. Formulaciones nanoestructuradas elaboradas para el presente proyecto.

Formulaciones Blancas	Formulaciones al 0.5 %	Surfactante*
F1B	F1F	Labrafac
F2B	F2F	Aceite de castor / Transcutol
F3B	F3F	Tween 20

* Las formulaciones cuentan con más de tres componentes y son formulaciones que guardan confidencialidad de información; sin embargo, para fines académicos se menciona la adición de un co-surfactante clave para la composición. Los co-surfactantes labrafac y transcutol fueron proporcionados por Gattefossé S.A. (Saint-Priest, Francia), a través del convenio de colaboración específico entre el Lab. 325 del CIQ, IICBQ, UAEM y el Depto. de Farmacia, Tec. Farmacéutica y Físicoquímica de la Fac. de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, UB. Tween 20 fue adquirido en Sigma Aldrich.

7.2. Surfactantes empleados en la preparación de las nanoemulsiones.

Las nanoemulsiones preparadas tuvieron variaciones correspondientes de al menos uno de sus componentes; la formulación 1 se considera la formulación inicial y las formulaciones 2 y 3 modificadas. La formulación 2 tuvo una variación de dos componentes: el surfactante y el co-surfactante, variando labrafac lipophile por transcutol más otro co-surfactante y la formulación 3 únicamente varió en el remplazo de labrafac lipophile por tween 20. Las formulaciones se prepararon por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Cuando se habla de nanoemulsiones, se está mencionando uno de los sistemas más complejos de componentes y que incluyen un grado de dificultad muy alto por las innumerables alternativas de carácter físicoquímicas que representan al seleccionar un surfactante o tensoactivo; todo ello dependerá del diseño experimental que se establezca, si se requiere más oleosa de acuerdo con la penetración cutánea que se desea, la estabilidad de la misma, la presencia de álcalis, ácidos y otros electrolitos, entre otras. Por ello que las formulaciones desarrolladas contemplan un cambio significativo en el valor del Balance Hidrofílico-Lipofílico (*Hydrophilic-Lipophilic Balance* HLB).⁷⁷ Esta selección nos permite encontrar la mezcla de

surfactante y co-surfactantes adecuados con respecto a las características del principio activo que se desea formular.

7.3. Preparación de las nanoemulsiones

Para la preparación de las nanoemulsiones se tomó en cuenta lo descrito por Domínguez-Villegas, V. 2014, en la parte experimental. Empleando ultrasonido como fuente de energía para la preparación.

En la figura 17 se muestra el procedimiento que se realizó para la preparación de las nanoemulsiones, mismas que se prepararon por triplicado.



Figura 17. Procedimiento para la preparación de las nanoemulsiones.

Se pesaron los componentes en el orden y proporciones establecidas, posteriormente se llevaron a un proceso de ultrasonido por un tiempo determinado, al concluir se colocaron las formulaciones en baño de agua a 32 °C, nuevamente se sonicaron y finalmente se congelaron a -20 °C. Transcurridas 24 horas, se descongelaron y se atemperaron a 25 °C para tasvase y filtración; y posteriormente se realizó su análisis visual y morfométrico determinando el tamaño de gotícula para las formulaciones preparadas (**F1B, F1F, F2B, F2F, F3B y F3F**).

El procedimiento aplicado en esta etapa de la investigación no presentó ninguna dificultad al aplicar la estrategia de preparación empleando ultrasonido como fuente de energía, esta

estrategia se ampliamente utilizada para la elaboración de nanoemulsiones y presenta resultados significativos en la obtención de nanoemulsiones homogéneas, monomodales y monofásicas.⁸¹

7.4. Analisis visual y morfométrico determinado el tamaño de gotícula empleando el equipo Nano Z-sizer.

Una vez preparadas las formulaciones y descongeladas, fueron filtradas empleando una jeringa esteril para su manipulación y un filtro de 0.45 μm y se trasvasaron a las microceldas para su análisis visual y morfométrico como se muestra en la figura 18.

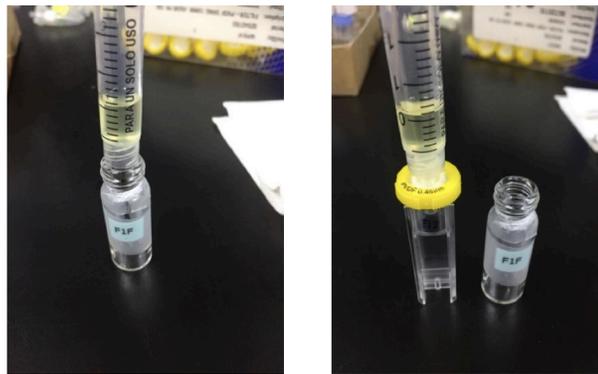


Figura 18. Trasvasado y filtración de las nanoemulsiones.

Una vez trasvasadas a las microceldas, las formulaciones se congelaron por 24 horas para eliminar cualquier burbuja que se generara en el trasvase. Transcurrido ese periodo de tiempo las formulaciones se descongelaron y atemperaron para su análisis, la figura 19 muestra la operación del equipo Nano Z-sizer y el límite requerido para la determinación del tamaño de gotícula. El método que se estableció para el análisis del tamaño de gotícula de las formulaciones contempla 15 lecturas por cada muestra y a su vez por triplicado, por lo cual las gráficas obtenidas representan 45 lecturas por cada formulación.⁸²

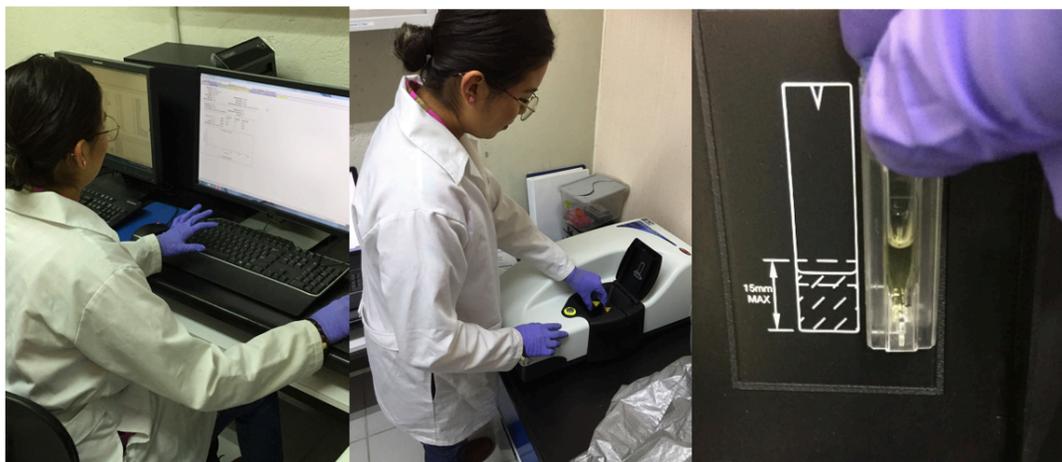


Figura 19. Determinación del tamaño de gotícula de las formulaciones.

El empleo del equipo Z-sizer Nano permitió la obtención de los gráficos que representan las poblaciones obtenidas de las formulaciones preparadas, el equipo se encuentra certificado en cuanto a su instalación y operación lo cual permite la confiabilidad de las determinaciones de tamaño de gotícula realizadas. La técnica que emplea es la dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) es una técnica de medición precisa y establecida para la caracterización de tamaños de partículas en suspensiones y nanoemulsiones. Se basa en el movimiento browniano de las partículas: esto establece que las partículas más pequeñas se mueven más rápido, mientras que las más grandes se mueven más lentamente en un líquido. La luz dispersada por partículas contiene información sobre la velocidad de difusión y, por tanto, sobre la distribución del tamaño.⁸³

7.4.1. Formulación 1 Blanca (F1B)

En la figura 20 es posible observar la formulación 1 blanca (**F1B**), que mediante su análisis visual fue posible identificar que la formulación es bifásica, lo cual evidencia que la nanoemulsión no se formó adecuadamente y que por ello se requiere el desarrollo de una nueva formulación considerando el cambio de surfactante.

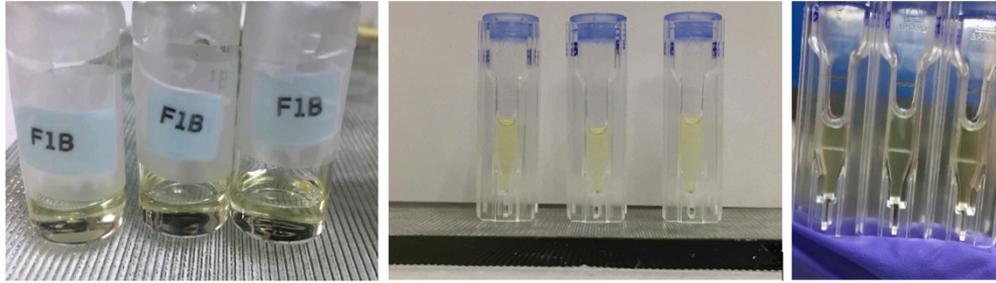


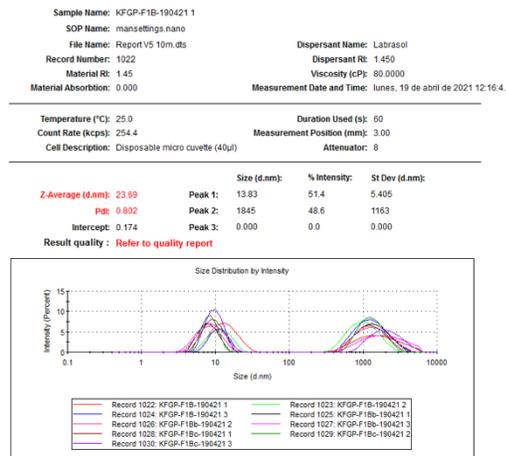
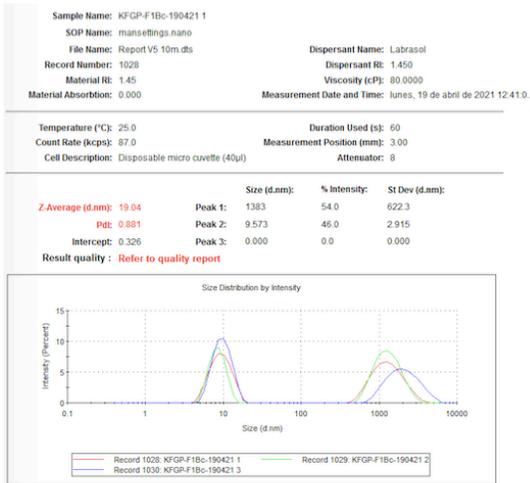
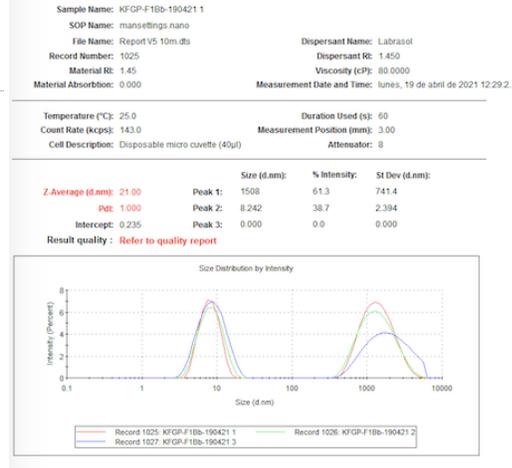
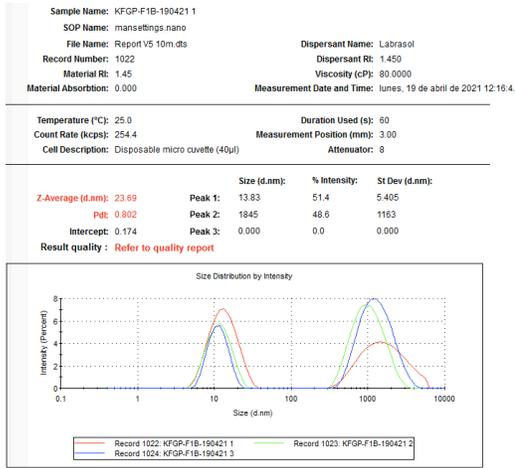
Figura 20. Formulación 1 Blanca (**F1B**)

- a) Vial con **F1B**; b) Microcelda con **F1B** vista de frente y
c) Microcelda con **F1B** vista a contraluz.

Aun cuando no se formó la nanoemulsión se realizó su análisis morfométrico y se determinó el tamaño de gotícula como lo muestran las gráficas 1a – 1d. Se observa una distribución bimodal en donde existen dos poblaciones de gotículas, la tabla 7. muestra los valores correspondientes.

Tabla 7. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación **F1B**.

Clave	Población 1 (nm)	Población 2 (nm)	% de Intensidad P1 / P2	Indice de Polidispersión (PDI)
KFGP-F1Ba	1845±1163	13.83±5.405	51.4 / 48.6	0.802
KFGP-F1Bb	1508±741.4	8.242±2.394	61.3/38.7	1.000
KFGP-F1Bc	1383±622.3	9.573±2.915	54.0/64.0	0.881
Promedio	1578.66± 842.23	10.54±3.57	55.56/50.43	0.894



Gráficas 1a - 1d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación **F1B** mediante Z-sizer.

7.4.2. Formulación 1 con la Flavanona (F1F).

En la figura 21 es posible observar la formulación 1 con la flavanona (1) (**F1F**), que mediante su análisis visual fue posible identificar que la formulación es bifásica al igual que la formulación **F1B**, lo cual evidencia que la nanoemulsión no se formó adecuadamente y que por ello se requiere el desarrollo de una nueva formulación considerando el cambio de surfactante.

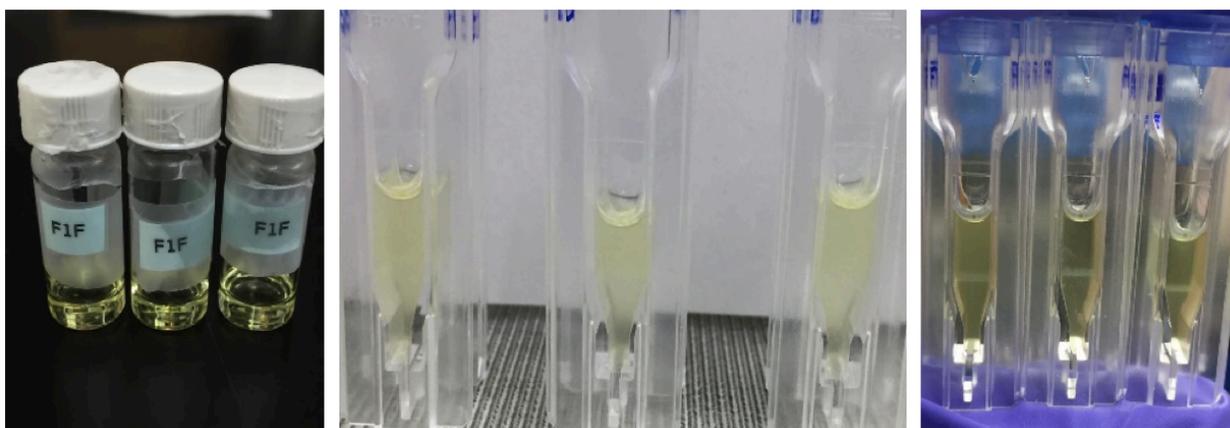


Figura 21. Formulación 1 Flavanona (**F1F**)

- a) Vial con **F1F**; b) Microcelda con **F1F** vista de frente
y c) Microcelda con **F1F** vista a contraluz.

Aun cuando no se formó la nanoemulsión se realizó su análisis morfométrico y se determinó el tamaño de gotícula como lo muestran las gráficas 2a – 2d. Se observa una distribución bimodal en donde existen dos poblaciones de gotículas, la tabla 8. muestra los valores correspondientes.

Tabla 8. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación **F1F**.

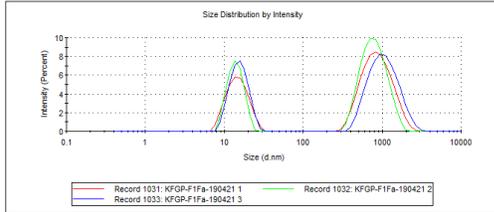
Clave	Población 1 (nm)	Población 2 (nm)	% de Intensidad P1 / P2	Indice de Polidispersión (PDI)
KFGP-F1Fa	924.3 ± 401.5	15.11 ± 4.59	66.9/33.1	1.000
KFGP-F1Fb	1137 ± 519.8	10.13 ± 2.218	54.9/45.1	0.760
KFGP-F1Fc	748.8 ± 255.5	12.57 ± 2.608	64.7/35.3	1.000
Promedio	936.43±392.26	12.60 ± 3.138	62.16/37.83	0.92

Sample Name: KFGP-F1Fa-190421 1
 SOP Name: mansettings.nano
 File Name: Report V5 10m.dts
 Record Number: 1031
 Material Rf: 1.45
 Material Absorbion: 0.000
 Dispersant Name: Labrasol
 Dispersant Rf: 1.450
 Viscosity (cP): 80.0000
 Measurement Date and Time: lunes, 19 de abril de 2021 12:50:5...

Temperature (°C): 25.0
 Count Rate (kcps): 267.4
 Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)
 Duration Used (s): 60
 Measurement Position (mm): 3.00
 Attenuator: 8

	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 42.11	Peak 1: 924.3	66.9	401.5
PdI: 1.000	Peak 2: 15.11	33.1	4.549
Intercept: 0.314	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

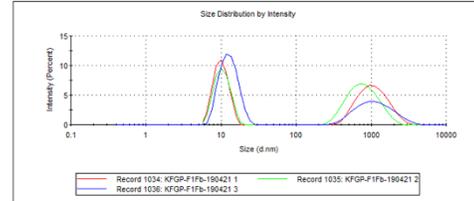


Sample Name: KFGP-F1Fb-190421 1
 SOP Name: mansettings.nano
 File Name: Report V5 10m.dts
 Record Number: 1034
 Material Rf: 1.45
 Material Absorbion: 0.000
 Dispersant Name: Labrasol
 Dispersant Rf: 1.450
 Viscosity (cP): 80.0000
 Measurement Date and Time: lunes, 19 de abril de 2021 12:59:5...

Temperature (°C): 25.0
 Count Rate (kcps): 698.2
 Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)
 Duration Used (s): 60
 Measurement Position (mm): 3.00
 Attenuator: 10

	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 22.93	Peak 1: 1137	54.9	519.8
PdI: 0.760	Peak 2: 10.13	45.1	2.218
Intercept: 0.328	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

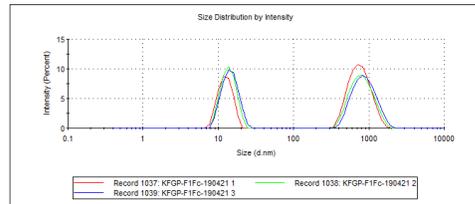


Sample Name: KFGP-F1Fc-190421 1
 SOP Name: mansettings.nano
 File Name: Report V5 10m.dts
 Record Number: 1037
 Material Rf: 1.45
 Material Absorbion: 0.000
 Dispersant Name: Labrasol
 Dispersant Rf: 1.450
 Viscosity (cP): 80.0000
 Measurement Date and Time: lunes, 19 de abril de 2021 01:11:0...

Temperature (°C): 25.0
 Count Rate (kcps): 220.2
 Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)
 Duration Used (s): 70
 Measurement Position (mm): 3.00
 Attenuator: 9

	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 34.08	Peak 1: 784.8	64.7	255.5
PdI: 1.000	Peak 2: 12.57	35.3	2.608
Intercept: 0.473	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

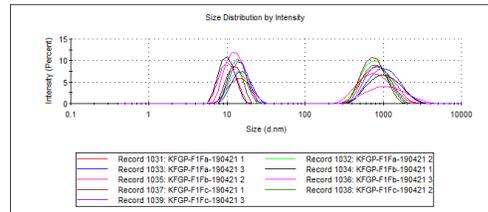


Sample Name: KFGP-F1Fa-190421 1
 SOP Name: mansettings.nano
 File Name: Report V5 10m.dts
 Record Number: 1021
 Material Rf: 1.45
 Material Absorbion: 0.000
 Dispersant Name: Labrasol
 Dispersant Rf: 1.450
 Viscosity (cP): 80.0000
 Measurement Date and Time: lunes, 19 de abril de 2021 12:50:5...

Temperature (°C): 25.0
 Count Rate (kcps): 267.4
 Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)
 Duration Used (s): 60
 Measurement Position (mm): 3.00
 Attenuator: 8

	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 42.11	Peak 1: 924.3	66.9	401.5
PdI: 1.000	Peak 2: 15.11	33.1	4.549
Intercept: 0.314	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report



Gráficas 2a - 2d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación F1F mediante Z-sizer.

7.4.3. Formulación 2 Blanca (F2B)

En el caso de la formulación blanca **F2B**, es posible identificar con el análisis visual que es monofásica y traslúcida, lo cual es un indicativo de la incorporación adecuada de los componentes para la elaboración de la formulación, en la figura 22 se observan dichas formulaciones.

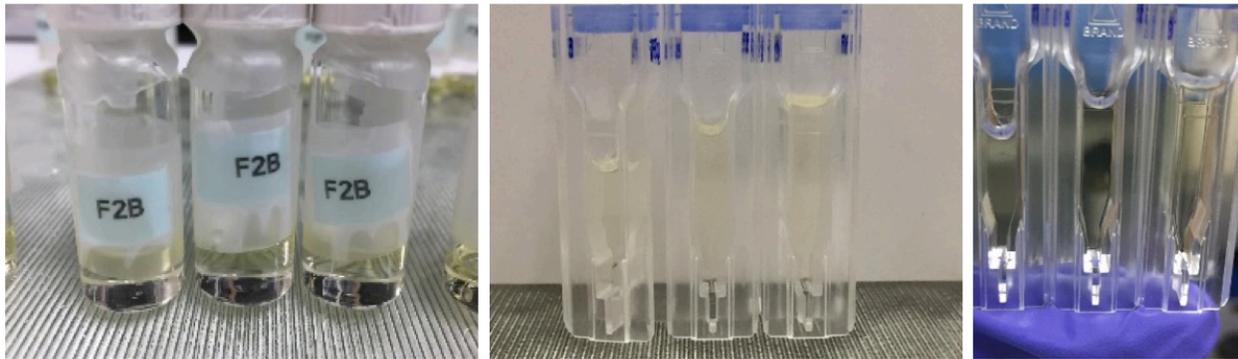


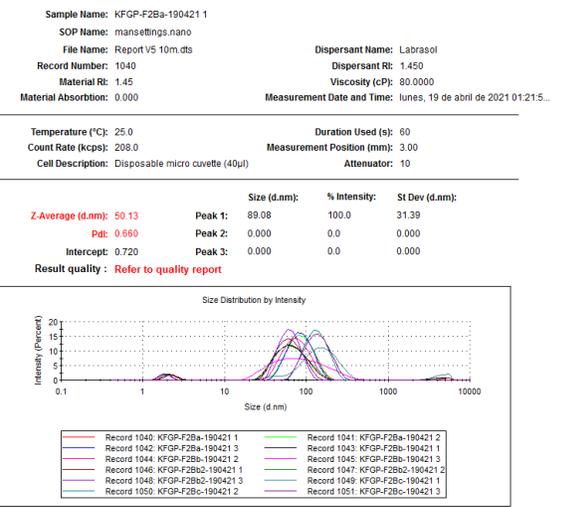
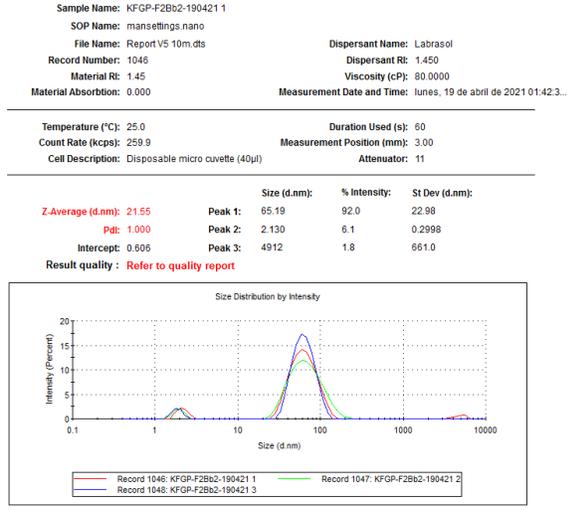
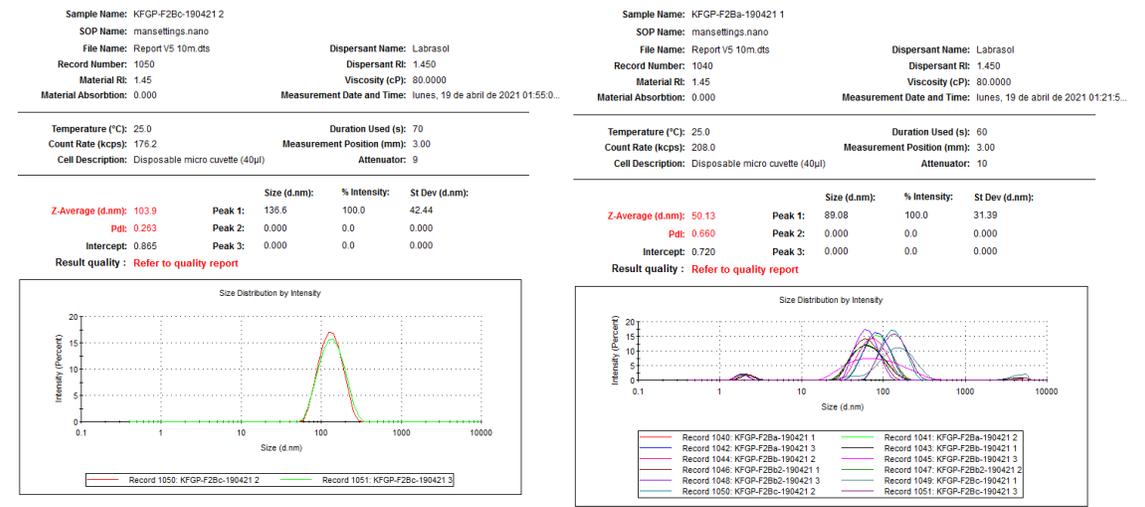
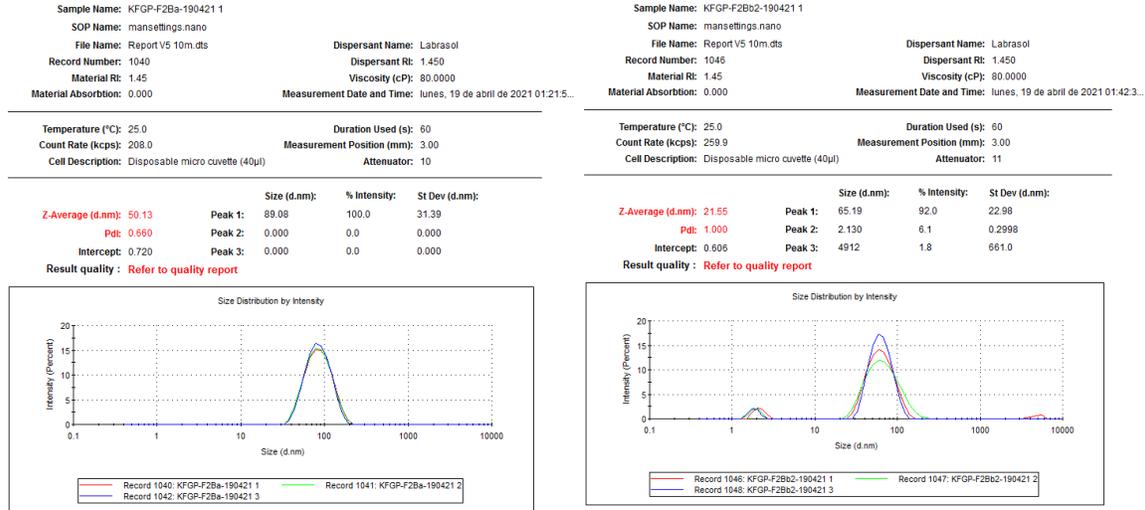
Figura 22. Formulación 2 Blanca (**F2B**)

- a) Vial con **F2B**; b) Microcelda con **F2B** vista de frente
y c) Microcelda con **F2B** vista a contraluz.

La tabla 9, muestra el tamaño de gotícula obtenido para la formulación **F2B**, en donde el promedio de la población 1 de los tres replicados es de 96.95 ± 32.27 nm. En las gráficas 3a-3d, en el replicado **KFGP-F2B** se observa una segunda población de 2.130 ± 0.2998 nm con una intensidad de 6.1 que indica un leve sesgo de la incorporación del co-surfactante que en este caso fue transcutil.

Tabla 9. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación **F2B**.

Clave	Población 1 (nm)	Población 2 (nm)	% de Intensidad P1 / P2	Indice de Polidispersión (PDI)
KFGP-F2Ba	89.08 ± 31.39	0	0	0.660
KFGP-F2Bb	65.19 ± 22.98	2.130 ± 0.2998	92.0/6.1	1.000
KFGP-F2Bc	136.6 ± 42.44	0	0	0.263
Promedio	96.95 ± 32.27	2.130 ± 0.2998	92.0/6.1	0.641



Gráficas 3a - 3d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación F2B mediante Z-sizer.

7.4.4. Formulaci3n 2 con Flavanona (F2F)

En el caso de la formulaci3n con la flavanona (1) **F2B**, es posible identificar con el an3lisis visual que es monof3sica y trasl3cida al igual que la formulaci3n **F2B**, lo cual es un indicativo de la incorporaci3n adecuada de los componentes para la elaboraci3n de la formulaci3n, en la figura 23 se observan dichas formulaciones, cabe mencionar que en esta ocasi3n el estudio se realiz3 por duplicado.

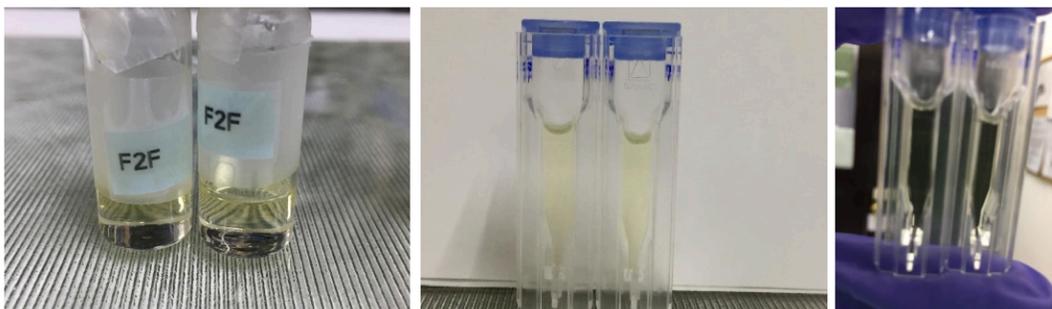


Figura 23. Formulación 2 Flavanona (**F2F**)

- a) Vial con **F2F**; b) Microcelda con **F2F** vista de frente
y c) Microcelda con **F2F** vista a contraluz.

El comportamiento observado para la formulación **F2F**, en donde el promedio de la población 1 de los dos replicados es de 103.71 ± 38.12 nm. En las gráficas 4a-4c, en el replicado **KFGP-F2F** se observa nuevamente una segunda población de 9.658 ± 1.845 nm con una intensidad de 7.3 que indica un leve sesgo de la incorporación del co-surfactante. La incorporación de las moléculas de la flavanona (**1**) en la formulación incrementa el tamaño de gotícula comparado con la formulación blanca **F2B**, pero no resulta una diferencia significativa en un valor de significancia de $p < 0.05$, (Población 1 de la **F2B** = 96.95 ± 32.27 y Población 1 de la **F2F** = 103.71 ± 38.12). (Tabla 10)

Tabla 10. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación **F2F**.

Clave	Población 1 (nm)	Población 2 (nm)	% de Intensidad P1 / P2	Indice de Polidispersión (PDI)
KFGP-F2Fa	98.33 ± 34.60	0	100	0.613
KFGP-F2Fb	109.1 ± 41.65	9.658 ± 1.845	92.7/7.3	1.000
KFGP-F2Fc	ND	ND	ND	ND
Promedio	103.71 ± 38.12	9.658 ± 1.845	96.35/7.3	0.8065

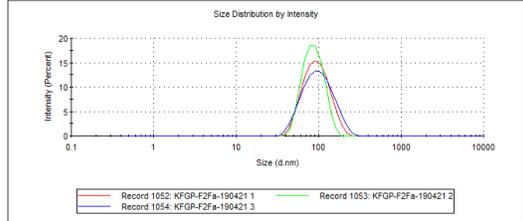
ND= No Determinado

Sample Name: KFGP-F2Fa-190421 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Report V5 10m.dts
Record Number: 1052
Material Rf: 1.45
Material Absorbion: 0.000
Dispersant Name: Labrasol
Dispersant Rf: 1.450
Viscosity (cP): 80.0000
Measurement Date and Time: lunes, 19 de abril de 2021 02:16:3...

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 173.9
Cell Description: Disposable micro cuvette (40ul)
Duration Used (s): 80
Measurement Position (mm): 3.00
Attenuator: 10

Z-Average (d.nm):	Peak 1:	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
56.16	98.33	98.33	100.0	34.60
Pdl: 0.613	0.000	0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.660	0.000	0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

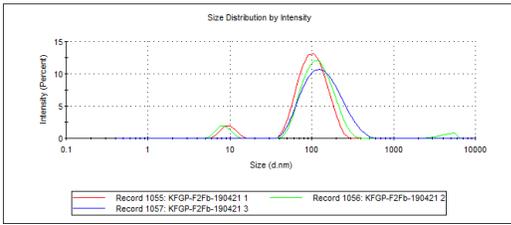


Sample Name: KFGP-F2Fb-190421 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Report V5 10m.dts
Record Number: 1055
Material Rf: 1.45
Material Absorbion: 0.000
Dispersant Name: Labrasol
Dispersant Rf: 1.450
Viscosity (cP): 80.0000
Measurement Date and Time: lunes, 19 de abril de 2021 02:27:1...

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 187.4
Cell Description: Disposable micro cuvette (40ul)
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 3.00
Attenuator: 10

Z-Average (d.nm):	Peak 1:	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
44.18	109.1	109.1	92.7	41.65
Pdl: 1.000	9.658	9.658	7.3	1.845
Intercept: 0.574	0.000	0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

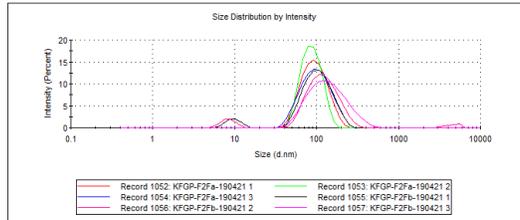


Sample Name: KFGP-F2Fa-190421 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Report V5 10m.dts
Record Number: 1052
Material Rf: 1.45
Material Absorbion: 0.000
Dispersant Name: Labrasol
Dispersant Rf: 1.450
Viscosity (cP): 80.0000
Measurement Date and Time: lunes, 19 de abril de 2021 02:16:3...

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 173.9
Cell Description: Disposable micro cuvette (40ul)
Duration Used (s): 80
Measurement Position (mm): 3.00
Attenuator: 10

Z-Average (d.nm):	Peak 1:	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
56.16	98.33	98.33	100.0	34.60
Pdl: 0.613	0.000	0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.660	0.000	0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report



Gráficas 4a – 4c. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación F2F mediante Z-sizer.

7.4.5. Formulación 3 Blanca (F3B)

En el análisis visual de la formulación F3B, se observa como una formulación monofásica y traslúcida, lo cual es un indicativo de la incorporación adecuada de los componentes para la elaboración de la formulación, en la figura 24 se observan dichas formulaciones.

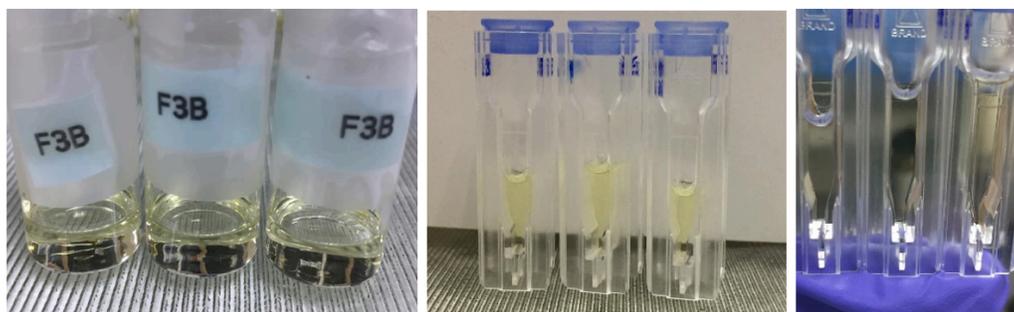


Figura 24. Formulación 3 Blanca (**F3B**)

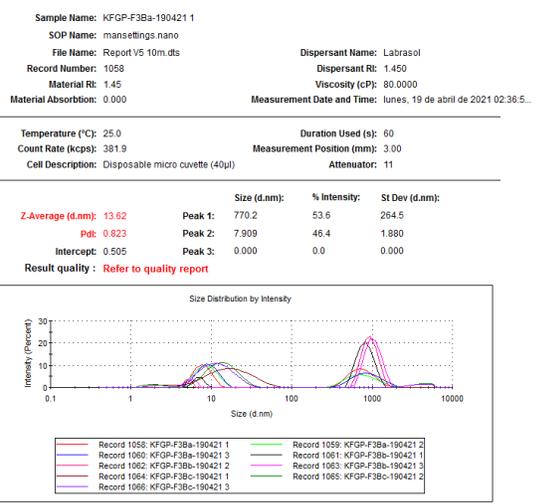
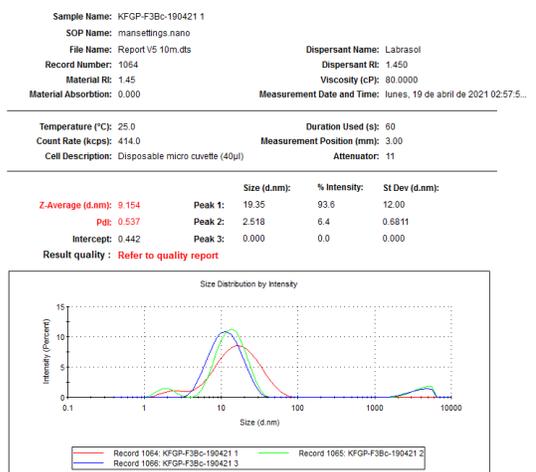
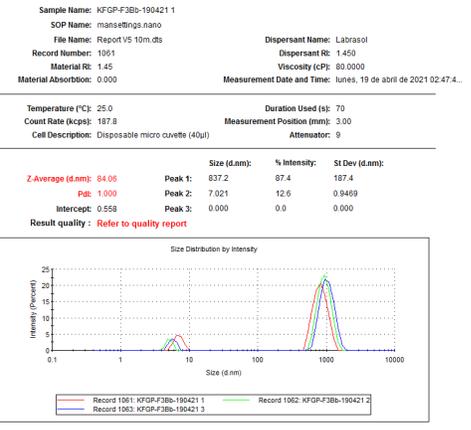
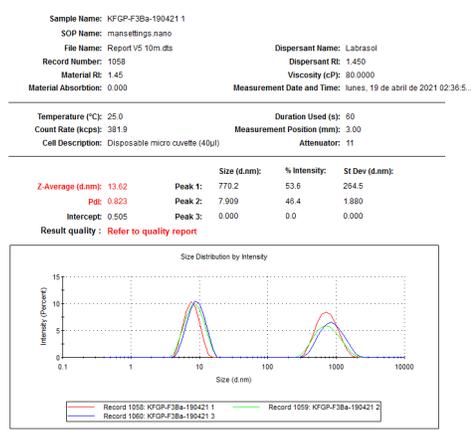
a) Vial con **F3B**; b) Microcelda con **F3B** vista de frente

y c) Microcelda con **F3B** vista a contraluz.

Con la preparación de la formulación **F3B** cambiando el co-surfactante por tween 20, se observa un incremento considerable del tamaño de gotícula para la población 1 en las gráficas 5a-5d y en la tabla 11, en donde tomando en cuenta las lecturas del Z-sizer para para el estudio se observa que la formulación es bimodal con 2 poblaciones y como un porcentaje de intensidad considerable. A pesar de que en la gráfica 5c no se logra cuantificar el tamaño de gotícula de la población superior a 800 nm el equipo detecta dos poblaciones muy por debajo de los 800 nm que tendrían las mediciones **KFGP-F3Ba** y **KFGP-F3Bb**; observando el gráfico **KFGP-F3Bc** sí se observa una población, pero superior a los 1000 nm que ya no es cuantificada por el equipo, por lo cual puede pensarse que exista aglomeración de gotículas, como una explicación más probable. Se recomienda realizar nuevamente las mediciones para dicha fórmula.

Tabla 11. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación **F3B**.

Clave	Población 1 (nm)	Población 2 (nm)	% de Intensidad P1 / P2	Índice de Polidispersión (PDI)
KFGP-F3Ba	770.2 ± 264.5	7.909 ± 1.880	53.6/46.4	0.823
KFGP-F3Bb	837.2 ± 187.4	7.021 ± 0.9469	87.4/12.6	1.000
KFGP-F3Bc	19.35 ± 12.00	2.518 ± 0.6811	93.6/6.4	0.537
Promedio	542.25 ± 154.63	5.816 ± 1.169	78.2/21.8	0.786



Gráficas 5a – 5d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación F3B mediante Z-sizer

7.4.6. Formulación 3 con Flavanona (F3F)

En el caso de la formulación con la flavanona (1) **F3F**, es posible identificar con el análisis visual que es monofásica y traslúcida al igual que la formulación **F3B**, lo cual es un indicativo de la incorporación adecuada de los componentes para la elaboración de la formulación, en la figura 25 se observan dichas formulaciones, cabe mencionar que en esta ocasión el estudio se realizó por duplicado.

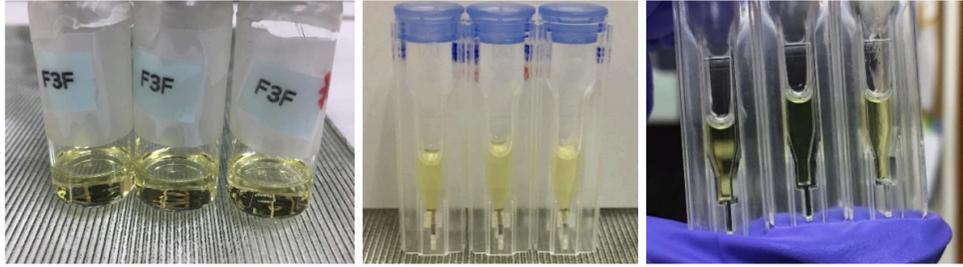


Figura 25. Formulación 3 Flavanona (**F3F**)

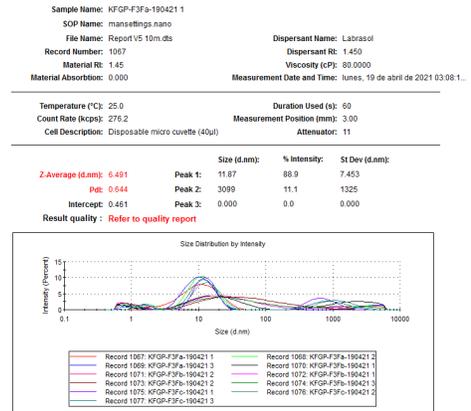
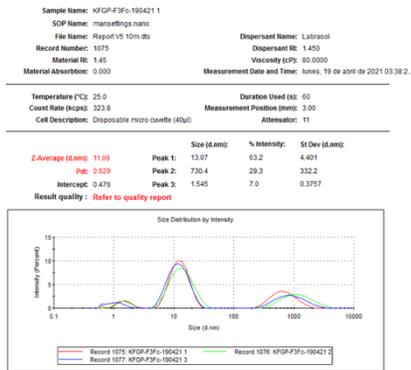
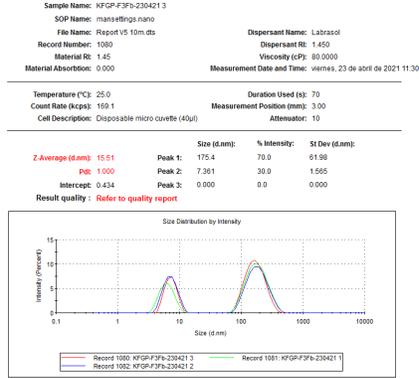
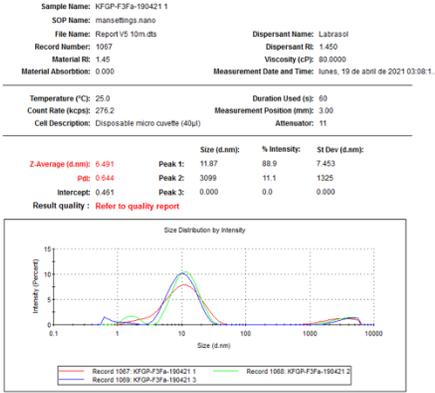
a) Vial con **F3F**; b) Microcelda con **F3F** vista de frente

y c) Microcelda con **F3F** vista a contraluz.

En el caso de la determinación del tamaño de gotícula mediante el Z-sizer, muestra dos poblaciones de acuerdo con las gráficas 6a-6d y en la tabla 12 en donde los porcentajes de población favorecen la preparación de gotículas en promedio de la población 1 de 10.99 ± 4.473 nm.

Tabla 12. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación **F3F**.

Clave	Población 1 (nm)	Población 2 (nm)	Población 3 (nm)	% de Intensidad P1 / P2	Indice de Polidispersión (PDI)
KFGP-F3Fa	11.87 ± 7.45	3099 ± 1325	----	88.9/11.1	0.644
KFGP-F3Fb	7.361 ± 1.56	175.4 ± 61.98	---	30/70	1.000
KFGP-F3Fc	13.76 ± 4.40	730.4 ± 332.2	1.545 ± 0.37	63.2/29.3/7.0	0.629
Promedio	10.99 ± 4.47	1033.08 ± 1497.71	1.545 ± 0.37	60.7/110.4/7.0	0.757



Gráficas 6a – 6d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación F3F mediante Z-sizer.

La alta variabilidad en el tamaño de gotícula de las diferentes poblaciones observadas para las formulaciones **F3B** y **F3F** en las tablas 11 y 12 y en las gráficas 5d y 6d, puede deberse a una posible incompatibilidad entre algunos de sus componentes presentes en la formulación; o bien, la formulación por naturaleza es inestable y tiende a una maduración de Ostwald.⁷⁷

7.4.7. Formulación 2 con Metotrexato (F2M)

Al identificar que la formulación nanoestructurada más estable correspondió a la formulación **F2**, con ella se preparó la formulación con metotrexato al 0.5 % (**F2M**); la formulación

F2M resultó monofásica y translúcida incorporando de forma adecuada los componentes de la formulación como se muestra en la figura 26.

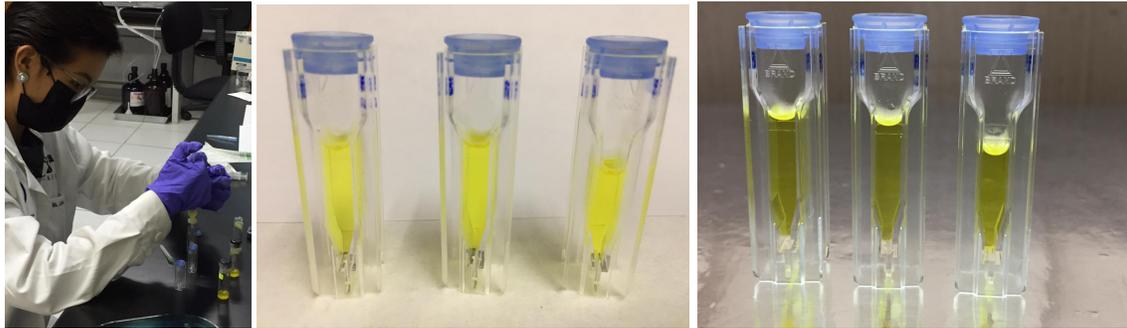


Figura 26. Formulación 2 Metotrexato (**F2F**)
a) Filtración de **F2M**, b) Microcelda con **F2M** vista de frente
y c) Microcelda con **F2M** vista a contraluz

Posteriormente, al análisis del tamaño de gotícula se establece que es monomodal, con un valor promedio de 158.7 nm, un porcentaje de intensidad de 100 % y un promedio de índice de polidispersión de 0.257, la tabla 13 muestra las mediciones de la formulación **F2M**.

Tabla 13. Tamaño de gotícula obtenidos para el análisis de la formulación **F2M**.

Clave	Población 1 (nm)	% de Intensidad P1	% de Intensidad P1 / P2	Indice de Polidispersión (PDI)
KFGP-F2Ma	146.6± 42.96	1.790 ± 0.226	92.4/7.6	0.628
KFGP-F2Mb	158.7 ± 47.96	00	100	0.257
KFGP-F2Mc	177.7 ± 41.15	00	100	0.197
Promedio	161 ± 44.02	1.790 ± 0.226	97.46/7.6	0.360

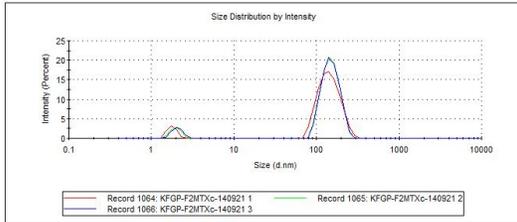
Las gráficas **7a-7d** muestran una población para la formulación de metotrexato **F2M** estableciendo con los parámetros obtenidos que cumple con los estándares para ser una formulación nanoestructurada para su aplicación terapéutica, mediante la vía de administración transdérmica.

Sample Name: KFGP-F2MTXc-140921 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: KFGP-F2Bc-19042021.dts
Record Number: 1064
Material Rt: 1.45
Material Absorbion: 0.000
Dispersant Name: Labrasol
Dispersant Rt: 1.450
Viscosity (cP): 80.0000
Measurement Date and Time: miércoles, 15 de septiembre de 20...

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 436.7
Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 3.00
Attenuator: 10

	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 88.82	Peak 1: 146.6	92.4	42.96
PdI: 0.628	Peak 2: 1.790	7.6	0.2262
Intercept: 0.727	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

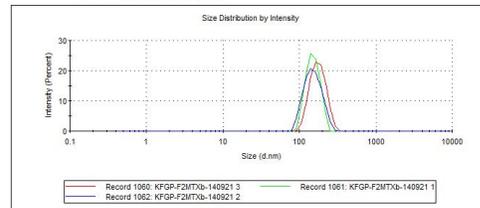


Sample Name: KFGP-F2MTXb-140921 3
SOP Name: mansettings.nano
File Name: KFGP-F2Bc-19042021.dts
Record Number: 1060
Material Rt: 1.45
Material Absorbion: 0.000
Dispersant Name: Labrasol
Dispersant Rt: 1.450
Viscosity (cP): 80.0000
Measurement Date and Time: miércoles, 15 de septiembre de 20...

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 328.7
Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 3.00
Attenuator: 9

	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 151.3	Peak 1: 177.7	100.0	41.15
PdI: 0.197	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.871	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

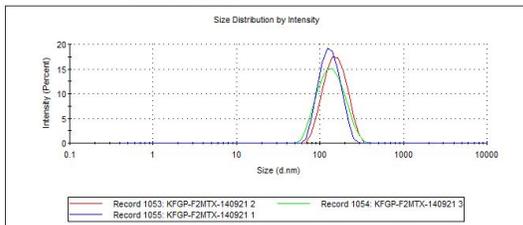


Sample Name: KFGP-F2MTXc-140921 2
SOP Name: mansettings.nano
File Name: KFGP-F2Bc-19042021.dts
Record Number: 1053
Material Rt: 1.45
Material Absorbion: 0.000
Dispersant Name: Labrasol
Dispersant Rt: 1.450
Viscosity (cP): 80.0000
Measurement Date and Time: miércoles, 15 de septiembre de 20...

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 244.2
Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 3.00
Attenuator: 9

	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 125.9	Peak 1: 158.7	100.0	47.96
PdI: 0.257	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.875	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

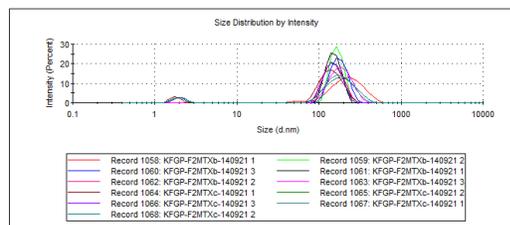


Sample Name: KFGP-F2MTXc-140921 2
SOP Name: mansettings.nano
File Name: KFGP-F2Bc-19042021.dts
Record Number: 1068
Material Rt: 1.45
Material Absorbion: 0.000
Dispersant Name: Labrasol
Dispersant Rt: 1.450
Viscosity (cP): 80.0000
Measurement Date and Time: miércoles, 15 de septiembre de 20...

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 409.8
Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 3.00
Attenuator: 10

	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 80.91	Peak 1: 195.3	91.2	74.29
PdI: 0.871	Peak 2: 1.998	8.8	0.3320
Intercept: 0.691	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report



Gráficas 7a – 7d. Determinación de tamaño de gotícula de la formulación F2M mediante Z-sizer.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la preparación de las formulaciones nanoestructuradas la formulación **F2** ha mostrado una alta eficiencia para lograr una formulación homogénea, traslúcida, monofásica y monomodales aunado con un tamaño de gotícula adecuado para una posible aplicación transdérmica, todo ellos si hacemos un recuento de los parámetros obtenidos y ya descritos.

Cabe señalar que la formulación **F2** fue desarrollada en el presente proyecto de investigación y por lo tanto, es una formulación novedosa tanto para la flavanona 1 como para metotrexato, lo cual representa un doble hallazgo para la investigación en desarrollo de formulaciones nanoestructuradas.

Se han desarrollado las siguientes formulaciones nanoestructuradas: a) Hidrogel en nanotubos,⁶³ b) Nanopartículas de oro,⁸⁴ c) Nanovesículas lipídicas⁸⁵ y d) nanopartículas de PLGA.⁸⁶ Es importante destacar que una formulación nanoestructurada en nanoemulsión de metotrexato fue empleada en un estudio clínico en el año 2016 para el tratamiento de artritis reumatoide.⁸⁷

Actualmente, se encuentra en curso un estudio clínico fase 4 de una microemulsión de metotrexato para el tratamiento de psoriasis;⁸⁸ lo cual demuestra que la investigación científica sobre el tratamiento de psoriasis en sistemas nanoestructurados en una investigación de frontera que permite situar el presente trabajo de investigación en los entornos internacionales más relevantes en este tema.

Por otra parte, la investigación sobre la aplicación de productos naturales como posible tratamiento para psoriasis también se encuentra en la frontera de las investigaciones a nivel mundial;⁸⁹ lo cual permite identificar que el presente trabajo de estudio aporta datos de interés para la comunidad científica.

7.5. Estudio *In silico*

7.5.1. Construcción en perspectiva 3D de las moléculas en estudio

Para la realización del estudio *in silico* se consideraron los siguientes compuestos: naringenina (**1**), hesperetina (**2**), 6-hidroxi-flavanona (**3**), flavanona (**4**), 6-bromoflavona (**5**), (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (Flavanona 1) (**6**), (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**7**), (2S)-5,7-dihidroxi-6-prenil-(**8**), (2S)-5,7-dihidroxi-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**9**), (2S)-5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil-flavanona (**10**), y los fármacos antiinflamatorios Indometacina (**11**), Metotrexato (**12**) y Diclofenaco (**13**) para identificar su posible potencial anti-psoriasis.^{62,64}

Mediante la plataforma *Molinspiration* se construyeron las estructuras químicas de los compuestos en estudio, la figura 27 muestra las representaciones 3D de ellas.

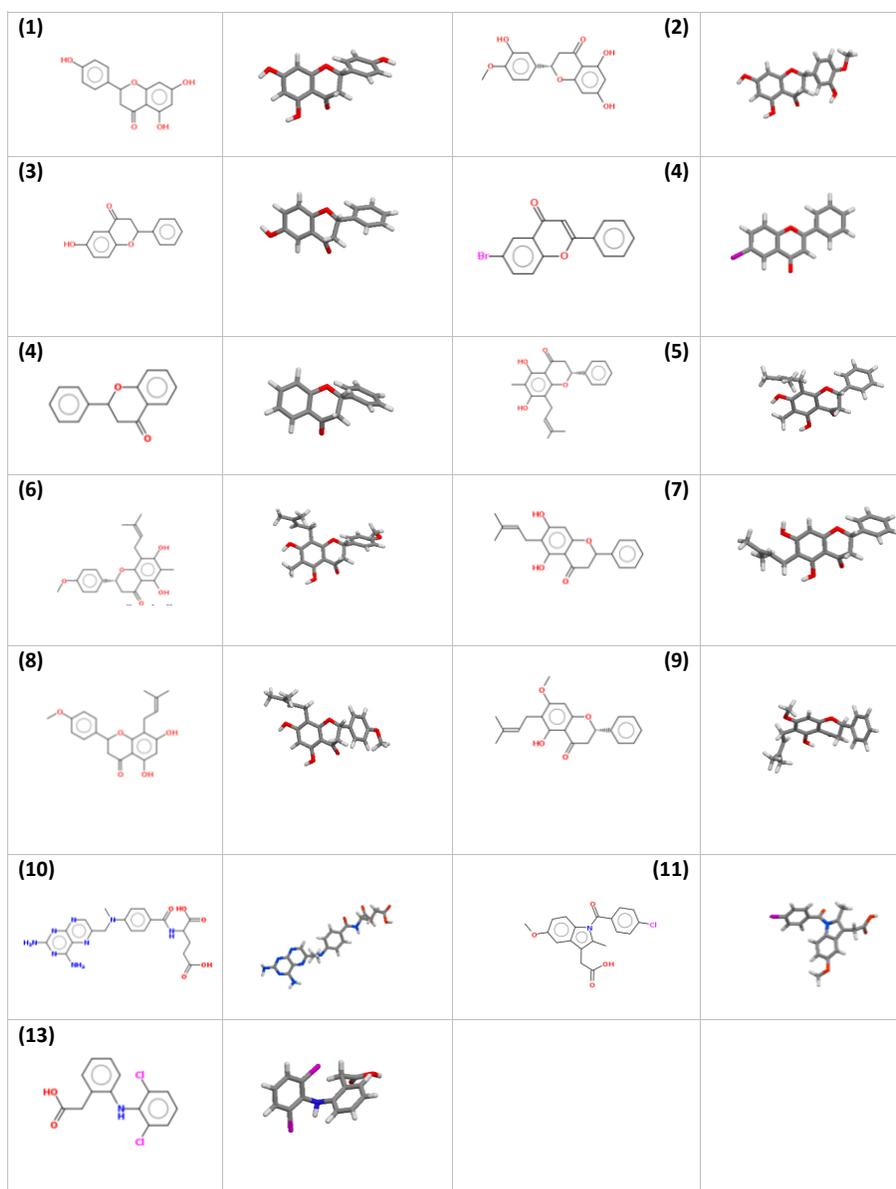


Figura 27. Representación 3D de las estructuras químicas analizadas para el estudio *in silico*.

El estudio *in silico* de los compuestos **1-13** permitió conocer las propiedades fisicoquímicas, así como la predicción de su actividad farmacológica. De acuerdo con la tabla 14 y 15. En el caso de las flavanonas (**6-10**), así como los flavonoides de referencia (**1-6**) cumplen con los criterios de la regla de Lipinski. Así mismo, las flavanonas en estudio (**7-10**) presentaron

una mejor actividad inhibitoria enzimática comparada con la del Metotrexato (**12**), fármaco de referencia (0.72), utilizado para el tratamiento de la psoriasis. Los valores obtenidos de las flavanonas fueron cercanos a 0 en inhibición de la quinasa, por lo que se esperaría que estas puedan intervenir en la producción de interleucinas IL-23 e IL-12, clave en el progreso de la psoriasis.

7.5.2. Análisis de las propiedades fisicoquímicas y predicción de potencial farmacológico empleando las plataformas *Molinspiration*, *PassOnline* y *SwissTargerPrediction*

Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas estructurales.

Comp.	A)	B)	C)	D)	E)	F)
1	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	5	3	86.99 ³	204.42 ³ / 230.26
2	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	6	3	96.22 ³	227.06 ³ / 263.62
3	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	240.25	3	1	46.53 ³	185.21 ³ / 214.23
4	C ₁₅ H ₁₂ O ₂	224.25	2	0	26.30 ³	184.53 ³ / 206.21
5	C ₁₅ H ₉ BrO ₂	301.13	2	0	26.30 ³	195.16 ³ / 217.88
6	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338.40	4	2	66.76	316.14
7	C ₂₂ H ₂₄ O ₅	368.42	5	2	75.99	341.69
8	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	324.37	4	2	66.76	299.58
9	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	354.40	5	2	75.99	325.13
10	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338.40	4	1	55.76	317.11
11	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357.80	5	1	68.54	303.24
12	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅	454.44	13	7	210.55	387.36
13	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296.14	3	2	49.33	238.73

A) Fórmula molecular, **B)** Peso Molecular (g/mol), **C)** Núm. de enlaces aceptores de hidrógeno (nOH), **D)** Núm. de enlaces donadores de hidrógeno (nOHNH), **E)** Área de Superficie Polar Molecular (A²), **F)** Volumen Molecular (A³).

Tabla 15. Datos predictivos de la bioactividad.

Comp.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	0.03	-0.20	-0.26	0.42	-0.12	0.21	ND	0.55	3.01	1.75
2	0.01	-0.27	-0.35	-0.01	-0.30	0.03	ND	0.55	3.22	2.24
3	-0.02	-0.33	-0.49	0.25	-0.28	0.14	ND	0.55	2.66	2.07
4	-0.14	-0.43	-0.63	0.01	-0.38	0.04	ND	0.55	2.66	2.41
5	-0.41	-0.35	-0.12	-0.33	-0.63	-0.07	ND	0.55	2.87	2.88
6	0.23	-0.12	-0.21	0.70	0.11	0.44	12.2 ± 1.1	0.55	3.74	3.17
7	0.18	-0.16	-0.22	0.62	0.06	0.37	68.4 ± 1.5	0.55	3.89	3.56
8	0.23	-0.05	-0.19	0.72	0.11	0.46	66.7 ± 1.1	0.55	3.60	3.23
9	0.16	-0.11	-0.17	0.64	0.07	0.38	46.4 ± 1.5	0.55	3.76	2.55
10	0.20	-0.07	-0.20	0.63	0.08	0.41	75.3 ± 1.5	0.55	3.72	3.72
11	0.24	-0.34	-0.11	0.42	-0.11	0.30	91.3 ± 0.4	0.85	2.51	2.76
12	0.51	0.23	0.38	-0.38	0.27	0.72	ND	0.11	3.58	1.01
13	0.14	0.20	0.17	0.09	-0.10	0.25	90.5 ± 0.6	0.85	2.23	1.98

I. Ligando GPCR, II. Modulador de canal iónico, III. Inhibidor de Quinasa, IV. Ligando de receptor nuclear, V. Inhibidor de proteasa, VI. Inhibidor enzimático VII. % de inhibición de la inflamación en TPA (1mg/oreja),⁴ ND = No Determinado, VIII. biodisponibilidad, IX. accesibilidad sintética, X. LogP

El estudio *in silico* de los compuestos **1-13**, permitió el cálculo de las propiedades y la predicción de potenciales actividades farmacológicas, las tablas 16-17 presentan los datos obtenidos. Se observó que tanto las flavanonas (**6-10**) como los flavonoides (**1-5**), cumplen con los criterios de la regla de Lipinski. Además, se observa (tabla 14), que existe una similitud con los valores de las flavanonas reportadas (1-6) y de las flavanonas extraídas de *Eysenhardtia platycarpa* (**6-10**), con un peso molecular similar, así como el número de aceptores y donores de hidrógeno. Estos resultados no fueron observados en el Metotrexato (**12**), medicamento de referencia en este proyecto, violando 1 regla de Lipinski; al tener más de 10 átomos aceptores de hidrógeno, y así mismo, la importancia de también cumplir con las reglas de Veber, que dicho compuesto infringe, teniendo un Área molecular mayor a 140 Å. La metodología para obtener el TPSA, se basa en la suma de contribuciones superficiales tabuladas de los fragmentos polares. El metotrexato (**12**), al no cumplir con todas las reglas, tanto de Lipinski como Veber, presentará una pobre absorción y permeabilidad en el tejido, resultado que puede afectar la biodisponibilidad, así como una posible toxicidad en el organismo, ya que el área de superficie molecular

correlaciona la absorción intestinal humana y la penetración en la barrera hematoencefálica.⁷³⁻⁷⁴ El valor obtenido del análisis realizado con la plataforma *SwissTarget Prediction*, arrojó un valor de biodisponibilidad de 0.11 para Metotrexato, mientras que la flavanona de estudio (**6**) presentó un valor de biodisponibilidad de 0.55, al igual que la Naringenina (**1**) y la 6-bromoflavona (**5**), moléculas ya reportadas en la literatura como farmacológicamente activas en inhibición inflamatoria, ya antes propuestas como moléculas antipsoríicas,⁶⁴ reiterando la posibilidad de considerar a la Flavanona 1 (**6**) como tratamiento terapéutico, corroborando los resultados anteriormente discutidos. Por otro lado, la importancia del coeficiente de partición radica en que al ser un parámetro fisicoquímico, permitirá determinar el valor cuantitativo del grado de lipófila de la molécula (hidrofobicidad), con lo que se inferirá el comportamiento entorno a fluidos del organismo a cierta temperatura, y con base en los resultados obtenidos de la plataforma *SwissTarget prediction*, la flavanona 1 (**6**) presentó un LogP de 3.17 contra el metotrexato (**12**) de 1.01, indicando una mejor hidrofobicidad, lo que apuntaría a una mejor absorción en las membranas biológicas, tomando como referencia las moléculas citadas⁶⁴, Naringenina (**1**) con (1.75), 6-Bromoflavona (**5**) 2.88, moléculas cuya absorción fue determinada mediante células de Franz, que estudios previos sugieren que el esqueleto base de los flavonoides es beneficioso para la penetración tópica, así como su mayor penetración debido a un menor número de enlaces de hidrógeno.⁶⁴

Uno de los principales determinantes de la psoriasis es el locus PSORS 1 (segmento cromosomal), que se ubica en la región del cromosoma 6p21, contribuyendo a un 30-50 % de la susceptibilidad genética de la enfermedad, dicha región contiene los genes antígenos de histocompatibilidad HLA-Cx6, alelo receptor inhibitorio de KIR2DL1. A pesar de aun no conocerse todos los mecanismos de detonación de la enfermedad, se considera que son moléculas que reconocen al antígeno o autoantígeno, y lo presentan a los linfocitos T. Una vez llevada a cabo esta acción desregulada, se da una respuesta en las cascadas mediadas por los linfocitos, dando como resultado las lesiones cutáneas.⁹⁰ De acuerdo con los valores obtenidos de las actividades farmacológicas, se observó una mayor actividad en el ligando receptor nuclear de la flavanona 1 (**6**) a comparación del metotrexato (**12**), con los valores de 0.70 (**6**) vs -0.38 (**12**), en el caso de la flavanona de interés; valor cercano a 1 (Molinspiration), que sugeriría una inhibición de las cascadas de activación de linfocitos T, así como de las IL-12, IL-23 y TNF- α , contundentes para la sobreexpresión de las lesiones psoriásicas, logrando la alternativa terapéutica esperada.

Las proteínas cinasas, son enzimas intracelulares que mediante la fosforilación activan o desactivan otras proteínas, a través de ATP, una de ellas es la Jano quinasa (JAK). La importancia de clínica las JAK, es que participan en distintas vías de señalización, particularmente en funciones mediadas por interleucinas, que toman parte de forma directa o indirecta en enfermedades autoinmunes, entre ellas, la vía de señalización de la interleucina IL-23, interleucina principal en la psoriasis. Las JAK se unen a receptores transmembranales, al unirse a la citocina, estas se activan, desencadenando una producción de citoquinas, por lo que, al obtener resultados de 0.44 (6), -0.07 (5) y 0.21 (1), supone una posible inhibición en la señalización enzimática, ratificando la clara proposición de considerarse como una molécula de amplia actividad antiinflamatoria y antipsoriasis. Logrando una alternativa para casos moderados a severos de psoriasis.⁹¹

7.6. Evaluación *in vivo* antiinflamatoria crónica

Se empleó el modelo *in vivo* con aplicación percutánea diaria de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en oreja de ratón durante 21 días simulando el desarrollo de psoriasis de acuerdo con la metodología descrita por Limón, D. *et al* 2019.⁴⁹ Grupos experimentales (n = 3) fueron: **G1**: ratones sanos (solución acetónica), **G2**: inducción inflamatoria e hiperplasia, características de piel psoriásica con TPA sin inhibidor inflamatorio, **G3** y **G4**: metotrexato (TPA y fármaco de referencia) y molécula estudiada (TPA y la flavanona natural en estudio).

Al realizar el análisis y comparar los grupos **G1** y **G2** se observó un aumento gradual y significativo del grosor de la oreja y aparición sucesiva de asperezas, descamación, cambio de color de la piel a un tono marrón, esto confirma que la psoriasis forma hiperplasia inducida en el grupo **G2**. El metotrexato en solución acetónica causó un daño tisular menor en comparación con el grupo **G2**, un cambio en la textura de la piel, descamación moderada, pero no se observó descamación. Al analizar el tratamiento con flavanona (1) en solución acetónica y compararlo con el grupo **G2**, se observa que la textura del tejido se mantiene regular sin cambio de color, baja caída del cabello y descamación moderada el día 21, el tejido no resulta rígido como en el grupo **G2**. Como se muestra en la figura 28.

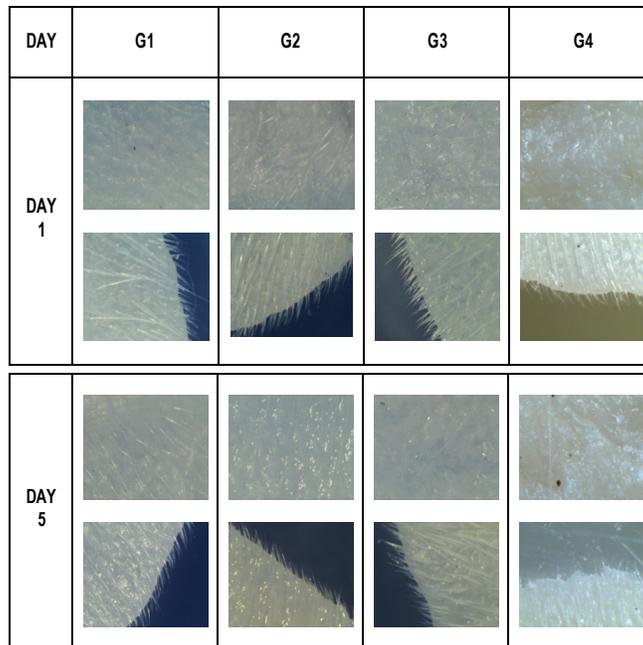


Figura 28. Análisis de los signos macroscópicos de la piel en un modelo *in vivo*

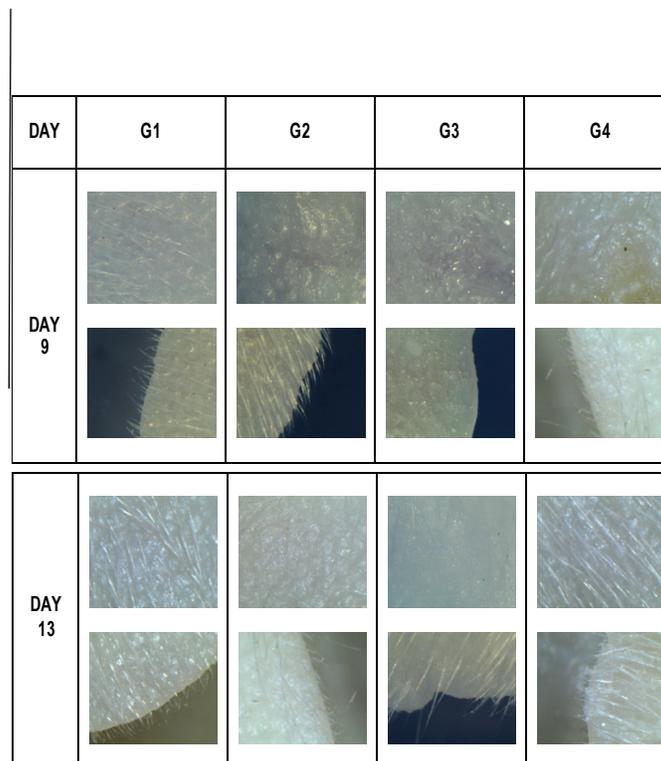


Figura 28. Análisis de los signos macroscópicos de la piel en un modelo *in vivo* (Continuación)

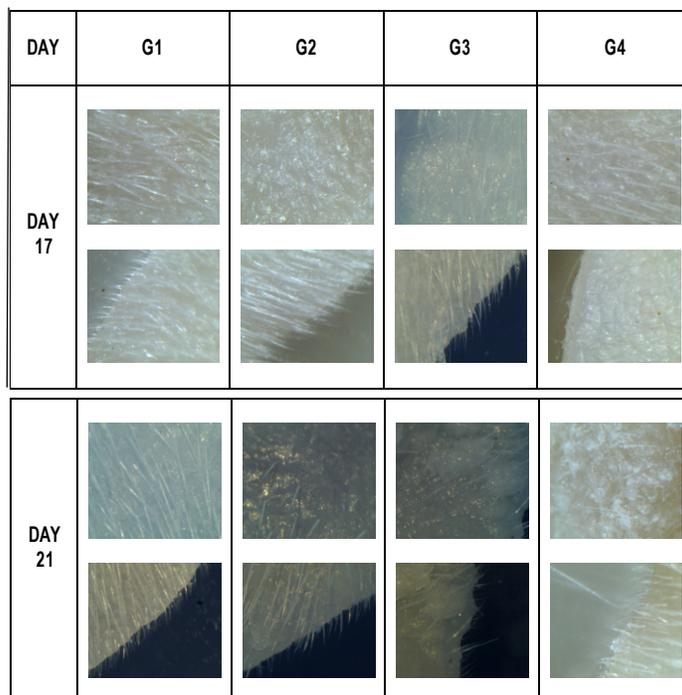


Figura 28. Análisis de los signos macroscópicos de la piel en un modelo *in vivo*. (Continuación)

Con el análisis cuantitativo, los resultados del tratamiento con flavanona con características tisulares se aproximan más al grupo **G1** que al grupo **G3**. La flavanona tiene parámetros fisicoquímicos adecuados, verificados en pruebas *in vivo*, siendo una molécula potencial para el tratamiento de la psoriasis.

Del análisis realizado mediante el estudio con el microscopio estereoscópico, es posible identificar que la escamación por la aplicación crónica del TPA en el área auricular de los ratones tratados con la flavanona (**1**) se reduce; al igual que se observa con metotrexato, por lo cual, la evidencia visual permite considerar que la flavanona (**1**) puede aportar beneficios para el tratamiento de la psoriasis en placa, probablemente a la interacción con las citocinas IL-17, IL-22, IL-23 y TNF- α , ampliamente reconocidas como blanco terapéutico para el control de la psoriasis.⁸⁷

Un tratamiento experimental *in vivo* para psoriasis empleando un péptido nombrado P155, muestra un análisis macroscópico,⁹⁰ en donde de igual forma como se analizó la flavanona 1, la descamación provocada por la aplicación de un inductor de inflamación en su caso IMQ, se ve claramente que el empleo del péptido P155 desaparece los daños tisulares ocasionados en el área auricular en el modelo murino empleado. (Figura 29), Con lo cual es posible establecer que la empleada a un análisis morfológico a nivel macroscópico también favorece para evidenciar la eficacia antipsoriásica de una nueva molécula en investigación.

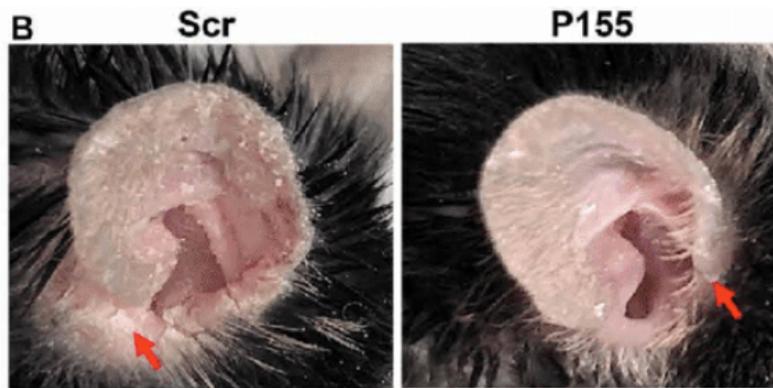


Figura 29. Fragmento de Imagen del análisis morfológico por microscopía estereoscópica del Péptido P155 (Niu, L. *et al* 2020)⁹⁰

La presente investigación ha permitido demostrar desde diferentes análisis que la flavanona natural (2S)-5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (1) cuenta con potencial antipsoriasis y además se presenta una nueva formulación nanoestructurada estable, monofásica, translúcida y monomodal que puede emplearse posteriormente en el desarrollo de un sistema terapéutico transdérmico para el tratamiento de psoriasis.

8. CONCLUSIONES

Se prepararon y analizaron 9 diferentes Nanoemulsiones considerando a las formulaciones (3 formulaciones blancas (**F1B**, **F2B** y **F3B**)) y 3 con la flavanona (**1**) (**F1F**, **F2F** y **F3F**).

Del análisis realizado las formulaciones **F2B** y **F2F** fueron las que tuvieron un tamaño de gotícula considerable de 96.95 ± 32.27 nm y de 103.71 ± 38.12 , respectivamente.

Las propiedades fisicoquímicas del aceite de castor, el transcutool y el resto de los componentes favorecieron que la formulación nanoestructurada (**F2F**) sea de tamaño de gotícula adecuado y podría ser considerada para futuras aplicaciones terapéuticas.

De acuerdo con el análisis *in silico*, las flavanonas (**6-10**), presentan parámetros fisicoquímicos adecuados, una mejor actividad inhibitoria enzimática predictiva con valores cercanos a cero en inhibición de quinasa, por lo que se infiere que podrían intervenir en la producción de las interleucinas IL-23 e IL-12, clave en el progreso de psoriasis.

Con el análisis cuantitativo, los resultados del tratamiento con flavanona (**1**) con características tisulares se aproximan más al grupo G1 que al grupo G3. La flavanona (**1**) tiene parámetros fisicoquímicos adecuados, verificados en pruebas *in vivo*, siendo una molécula potencial para el tratamiento de la psoriasis.

9. PERSPECTIVAS

Realizar el estudio *in vivo* de inflamación crónica inducido con TPA en oreja de ratón con la nanoemulsión **F2B**, **F2F** y **F2M**.

Realizar el estudio histológico del tejido auricular.

Realizar la cuantificación de citocinas en los ratones tratados con la formulación **F2B**, **F2F** y **F2M** en el modelo de inflamación crónica.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Mapfre. Enfermedades dermatológicas de la piel *CanalSALUD* <https://www.salud.mapfre.es/enfermedades/dermatologicas/> Fecha de consulta: Septiembre, 2020.
2. Estrada-Aguilar, L., Amaya-Guerra, M., Gómez-Flores, M., Guevara-Sanginés, E., Jurado-Santacruz, F., & Lopez-tello-Santillán, A. *et al.* (2015) Metas mexicanas de tratamiento de psoriasis en placas. *Rev Med Inst Mex Seg Soc*; 55 (1): 90-97.
3. Graziola, E. Citoquinas: mediadores de la respuesta inmunitario, Rosario, Santa Fe, Argentina https://www.anestesia.org.ar/search/articulos_completos/1/1/282/c.php, Fecha de consulta: Octubre, 2020.
4. Health, S., Anatomía de la piel. Stanford Children's Health, <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=anatomadelapiel-85-P04436>, Fecha de consulta: Octubre, 2020.
5. Fuentes Carmona, J. C. , Anatomía y Fisiología de la piel, *Stetikmed*, <https://www.studocu.com/cl/document/universidad-de-la-serena/anatomia-general/otros/steikmed-anatomia-y-fisiologia-de-la-piel/8520099/view> Fecha de consulta: Octubre, 2020.
6. InfoMED, red de salud de Cuba, Sistema Tegumentario. http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/sistema_tegumentario_1.pdf , Fecha de consulta: Octubre, 2020.

7. Jiménez Gómez, N., Ballester Martínez, M., Pérez Gala, S., y Gárate Ayastuy, M. (2014). Psoriasis, *Medicine*, 11, (47), 2764-2773.
8. García A, F., Mejía Recuero, L., Menéndez Ramoz, F., & Barreda Hernández, D. (2011). Actualización en el tratamiento de la Psoriasis. *Infac*, 19, (3), 13-20.
9. López-Ferrer, A., & Laiz-Alonso, A. (2014). Psoriatic Arthritis: An Update, *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 105, (10), 913-922.
10. Fundación Española de Reumatología, Artritis psorásica: Qué es,síntomas, diagnóstico y tratamiento, <https://inforeuma.com/enfermedades-reumaticas/artritis-psoriasica/> Fecha de consulta: Octubre, 2020.
11. Bocheńska, K.; Smolińska, E.; Moskot, M.; Jakóbkiewicz-Banecka, J. and Gabig-Cimińska, M. (2017) Models in the Research Process of Psoriasis *Int. J. Mol. Sci.*; 18 (12): 2514.
12. Danilenko, D.M. (2008) Review Paper: Preclinical Models of Psoriasis *Vet. Pathol.* 45:563–575.
13. Madsen, M.; Hansen, P.R.; Nielsen, L. B.; Hartvigsen, K.; Pedersen, A. E.; Pravsgaard, J.; Aarup, C. A. and Pedersen, T. X. (2016) Effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced psoriasis-like skin lesions on systemic inflammation and atherosclerosis in hypercholesterolaemic apolipoprotein E deficient mice *BMC Dermatology* 16:9, 1-10.
14. Mayo Clinic, Psoriasis, Diagnóstico y tratamiento,<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/psoriasis/diagnosis/treatment/drc-20355845>, Fecha de consulta: Octubre, 2020.

15. Lozano, J (2002) Tratamiento de psoriasis. Nuevas perspectivas. *Farmacoterapia* 21, (10), 102-104.
16. Aguirrezabala, J., Aizpura, I., Abizuri, M., & Alfonso, I. (2011). Actualización en el tratamiento de la Psoriasis, Euskadi, Vol. 11, *Edición* 3, pp. 3-5.
17. García Gil A., Armendáriz Sánchez K., Cherit Domínguez J., (2020) Vitamin D in dermatology: A literatura review,, *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* , [https://dcmq.com.mx/edici%C3%B3n-octubre-diciembre-2013-volumen-11-%20n%C3%BAmero-4/199-la-vitamina-d-en-dermatolog%C3%ADa-una-revisi%C3%B3n-de%20la%20literatura#:~:text=Los%20an%C3%A1logos%20de%20vitamina%20D%20s uprimen%2](https://dcmq.com.mx/edici%C3%B3n-octubre-diciembre-2013-volumen-11-%20n%C3%BAmero-4/199-la-vitamina-d-en-dermatolog%C3%ADa-una-revisi%C3%B3n-de%20la%20literatura#:~:text=Los%20an%C3%A1logos%20de%20vitamina%20D%20s uprimen%2,), Fecha de consulta: Octubre, 2020.
18. Lopeztricas Jose-Manuel (2016), Isotretinoína. Informe técnico, *Info-farmacia* <http://www.info-farmacia.com/ultimas-publicaciones/isotretinoinainformetecnico>, Fecha de consulta: Octubre, 2020.
19. Pfizer, Metotrexato, (https://www.pfizerpro.com.co/sites/pfizerpro.com.co/files/g10034346/f/201601/lld_metotrexato.pdf) Fecha de consulta: Octubre, 2020.
20. López Tricas, D. (2020). Hitos de la farmacología: ciclosporina. - *info-farmacia* (<http://www.info-farmacia.com/medicofarmaceuticos/revisiones-farmaceuticas/hitos-de-la-farmacologia-ciclosporina>).

21. Chambers E. Erin, Lame E. Mary Haas Karen, (2016) Improving Quantification of Protein Therapeutics by Standardising the Sample Preparation Approach to LC-MS/MS Analysis: High-sensitivity Bioanalysis of Infliximab, and Total Antibody Quantification of the Antibody-drug Conjugate Trastuzumab Emtansine, *CHROMATOGRAPHY TODAY*, 27-31 https://www.researchgate.net/publication/303483394_Improving_Quantification_of_Protein_Therapeutics_by_Standardising_the_Sample_Preparation_Approach_to_LC-MSMS_Analysis_High-sensitivity_Bioanalysis_of_Infliximab_and_Total_Antibody_Quantification_of_th

22. PUBCHEM, Infliximab, <https://www.pharmacompass.com/jAssers/pdf/pubchem/Infliximab-pubchem-150530107>, fecha de consulta: Octubre, 2020.

23. PUBCHEM,D0A2UV, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/349984255#section=Available-Date>, Fecha de consulta: Octubre, 2020.

24. PUBCHEM, APREMILAST, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11561674>. Fecha de consulta: Octubre, 2020.

25. PUBCHEM, Thioguanine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2723601> Fecha de consulta: Octubre, 2020.

26. PUBCHEM,Hydroxyurea <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3657#section=2D-Structure>, Fecha de consulta: Octubre, 2020.

27. Germana, F., Omega 3: beneficios para la salud, <https://www.farmaciegermana.com/blog/omega-3-beneficios-para-la-salud>, Fecha de consulta: Octubre, 2020.

28. Missouri Botanical Garden, Aloe vera, <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=b628> Fecha de consulta: Octubre, 2020.
29. Missouri Botanical Garden, Berberis aquifolium, [¿https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=c291](https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=c291), Fecha de consulta: Octubre, 2020.
30. Agarwal, D., Garg, S., & Sah, P. (2006), *Isolation of chalkones from the seeds of Psoralea corylifolia* Linn, *45*, 2574-2579.
31. Conforti, F., Marrenelli, M., Menichini, F., Bonesi, M., Statti, G., Provenzano, E., & Menichini, F. (2009). Natural and Synthetic Furanocoumarins as Treatment for Vitiligo and Psoriasis, *Current Drug Therapy*, *4*, (1) 38-58.
32. Hemalatha, S., Srikanth, P., & Bhaskar Reddy, K. (2017) *A review on herbs used to treat psoriasis*, *International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research*, *5*, (9) 77-89.
33. Acasuso Diaz, M., Collantes Estevez, E., & Jordi, C., Capsaicina dolor muscular de fibromialgia, *Fibromialgia Noticias*, <https://fibromialgianoticias.com/capsaicina-dolor-muscular-y-fibromialgia/>, Fecha de consulta: Octubre, 2020.
34. Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *10*, (4),1567-1574.
35. Joshi, R., Kulkarni, A., & Wairkar, S. (2018). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update, *Life Sciences*, *215*,43-56.

36. Álvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer, *Offarm: Farmacia y sociedad*, 22, (10), 130-140.
37. López Luengo, M. (2002). *Flavonoides*, *Offarm*, 21, (4) 108-113.
38. Herbert, R. B. (1989). *The biosynthesis of secondary metabolites*: Springer Science & Business Media.
39. Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*: John Wiley & Sons.
40. Narvaez-Mastache José Manuel, Garduño-Ramirez Maria Luisa, Alvarez Laura, Delgado Guillermo (2006) Antihyperglycemic Activity and Chemical Constituents of *Eysenhardtia platycarpa*. *J. Nat Prod.*, 69, 1687 - 1691.
41. Carrillo-Morales, Manuel (2004), Estudio químico y evaluaciones biológicas del extracto metanólico de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa* (Tesis de licenciatura Químico Industrial, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana.
42. Narvaez-Mastache José Manuel, (2007). Búsqueda de sustancias con actividad antioxidante y antihiperlipidémica en especies selectas de la familia *Fabaceae* empleadas e la medicina tradicional. (Tesis Doctoral, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México).

43. Narvaez-Mastache, J.M., Fernando, N. y Delgado, G. (2008), Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry* 69, (2) 451-456.
44. María del Rayo, C.-C. *et al.*, (2009) Evaluation of Some Plant-derived Secondary Metabolites Against Sensitive and Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J. Mex. Chem Soc*,53, (2).71-75.
45. Andrade Carrera Berenice, (2013), Estudio de la actividad Citotóxica de la 5,7-dihidroxi-6- metil-8-prenil flavanona y la 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil- 4'-metoxiflavanona y sus farmacomodulados: Acetilado, metilado, ciclizado y vinílogo ciclizado (Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).
46. Cárdenas Alaniz Daniel, (2013) Desarrollo de un dispositivo transdérmico evaluado en un modelo in vitro de la flavanona antiinflamatoria (EPIGB-I) formulada en una emulsión nanométrica, cuantificando la liberación del fármaco mediante un método analítico validado por HPLC (Tesis de Licenciatura de Químico Industrial, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).
47. Domínguez Villegas Valeri, (2014), *Estudio biofarmacéutico de flavanonas isoprenílicas antiinflamatorias libres y vehiculizadas en sistemas nanoestructurados para aplicación tópica*. (Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona).
48. Quintana Padilla Isaura, (2015), Implicación de flavanonas preniladas naturales en las vías de señalización molecular en el desarrollo de la inflamación. (Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).

49. Garduño-Ramírez, M. L.; Dominguez-Villegas, V.; Andrade-Carrera, B y Quintana Padilla I. (2015) Implementación del modelo *in vivo* para el desarrollo de psoriasis considerando la inducción de la inflamación crónica *in vivo* con la aplicación de TPA en oreja de ratón por 21 días.
50. Andrade-Carrera, B.; Clares, B.; Noé, V.; Mallandrich, M.; Calpena, A.; García, M.; Garduño-Ramírez, M. (2017) Cytotoxic Evaluation of (2S)-5,7-Dihydroxy-6-Prenylflavanone Derivatives Loaded PLGA Nanoparticles against MiaPaCa-2 Cells, *Molecules* 22, (1553), 1-21.
51. Andrade Carrera Berenice, (2017) Farmacomodulación de un flavonoide de origen natural y su estudio *in vitro* citotóxico de forma intrínseca y vehiculizado en sistemas nanoestructurados (Tesis Doctoral, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).
52. Terreros Isaias Senteotl, (2018) 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. (Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).
53. Bustos-Salgado, P., Andrade-Carrera, B., Garduño-Ramírez, M. L., Alvarado, H., & Calpena-Campmany, A. (2020) Quantification of one Prenylated Flavanone from *Eysenhardtia platycarpa* and four derivatives in *Ex Vivo* Human Skin Permeation Samples Applying a Validated HPLC Method. *Biomolecules*, 10, (6), 889.
54. Watkins, R., Wu, L., Zhang, C., Davis, R., & Xu, B. (2015) Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues, *International Journal of Nanomedicine*, 10, (1), 6055-6074.

55. Bonet, R., & Garrote, A. (2015). Parches medicamentosos, *Farmacia Profesional.*, 29, (5), 32- 35.
56. Beléndez Eulalia, Esteban Rosa, Santos Emilia, Suñé Negre José Ma., Fernández Laura, Pineda Laura, Pineda Enric, Mayayo Teo, Isamat Marcos, (2001), Edición 1, Cap. 3: Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración, Formación continuada para farmacéuticos de hospital, Fundación PROMEDIC, sani red, edición 1, ISBN*, 49-53.
57. Parra, A., Clares, B., Roselló, A., Garduño-Ramírez, M., Abrego, G., García, M., & Calpena, A. (2016). *Ex vivo* permeation of carprofen from nanoparticles: A comprehensive study through human, porcine and bovine skin as anti-inflammatory, *Pharmaceutical, Nanotechnology*, 501, (1-2),10-17.
58. Villareal Carvajal, A. (2004). Formulación de una nanoemulsión dermocosmética, nutritiva y regeneradora de la piel, (Post grado en Química, Laboratorio de espectroscopia molecular, analítica, Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias).
59. Alvarado, H., Abrego, G., Souto, E., Garduño-Ramirez, M., Clares, B., García, M., & Calpena, A. (2015). Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,130, (1), 40-47.
60. Silva, A.M.; Alvarado, H.L.; Abrego, G.; Martins-Gomes, C.; Garduño-Ramirez, M.L.; García, M.L.; Calpena, A.C.; Souto, E.B. (2019) *In Vitro* Cytotoxicity of Oleanolic/Ursolic AcidsLoaded in PLGA Nanoparticles in Different Cell Lines. *Pharmaceutics* ,11, (1), 1-11.
61. Alvarado, H. L.; Abrego, G.; Garduño-Ramirez, M. L.; Clares, B.*; Calpena, A. C.; García, M. L. (2015) Design and Optimization of Oleanolic/ursolic Acid-Loaded Nanoplatforms for

- Ocular Anti-Inflammatory Applications, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11 ,(3), 521-530.
62. Domínguez-Villegas, V., Clares-Naveros, B., García-López, M., Calpena-Campmany, A., Bustos-Zagal, P., & Garduño-Ramírez, M. (2014). Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116, 183-192.
63. Limón, D., Amirthalingam, E., Rodrigues, M., Halbaut, L., Andrade, B., Garduño-Ramírez, M. L., Amabilino, D. L., Pérez-García, L.I., Calpena, A. C. (2019) Novel nanostructured supramolecular hydrogels for the topical delivery of anionic drugs, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 181, 657–670.
64. Alalaiwe, A., Lin, C., Hsiao, C., Chen, E., Lin, C., Lien, W., & Fang, J. (2020). Development of flavanone and its derivatives as topical agents against psoriasis: The prediction of therapeutic efficiency through skin permeation evaluation and cell-based assay, *International Journal of Pharmaceutics*, 581, 119256.
65. a) Montenegro CA, Gonçalves GF, Oliveira Filho AA, Lira AB, Cassiano TTM, Lima NTR, Barbosa-Filho JM, Diniz MFFM, Pessôa HLF. In Silico Study and Bioprospection of the Antibacterial and Antioxidant Effects of Flavone and Its Hydroxylated Derivatives. *Molecules*. 2017 May 24;22(6):869. doi: 10.3390/molecules22060869. PMID: 28538688; PMCID: PMC6152620. b) Montagud Rubio Nahum <https://psicologiyamente.com/cultura/ramas-quimica>, Fecha de consulta Diciembre 2021.
66. Peniche Trujillo, A. (2011, mayo). La quimioinformática, una herramienta eficiente para desarrollar los medicamentos del futuro. Retrieved from Quimioinformática: file:///D:/Dialnet- LaQuimioinformaticaUnaHerramientaEficienteParaDesa- 3726081.pdf

67. (Alvarez-Ginarte, Y.M; Crespo-Oterob,R.; Padrón-García,A.; Montero-Cabrera,L-A;Ruiz-García,J.A, Nuevo procedimiento computacional "in silico" para el estudio QSAR en esteroides derivados de la serie 4,5.dihidrotestosterona. Revista Cubana de Química, vol. XVII, núm. 2, 2005, pp. 233-243
68. Monge Vega, A., Hueso, J., Baeyens, W., García Campaña, A., & Vallet Regi, M. (2004, enero 29). Nuevas Oportunidades y Tecnologías en el Descubrimiento de Fármacos y Medicamentos. Retrieved from Quimioinformática en el descubrimiento de fármacos : file:///D:/896-3591-1-PB.pdf
69. Aguilar López, E. G., Castilla Burguete, D., Escotto Puga, E. González Rubio, E., Lira Pulido, M., Zayas Contreras, D. A. y Loza Mejia, M. A. (2016).Evaluación in silico de análogos del Pazopanib para el tratamiento de Glioblastoma en receptores VEGF-2. Memorias del Concurso Lasallista de Investigación, Desarrollo e innovación, 3(1), 21-26.
70. Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F.D.; Medina-Franco J. L. (2016) Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional, Educacion Quimica Volume 28, Issue 1, January 2017, Pages 51-58.
71. Thomas Scior, Martinez Molares Evelyn, Salinas Stefanón Eduardo, (2007), Los modelos *in silico*, una herramienta para el conocimiento farmacológico. Elementos: ciencia y cultura,14,(068), pp.45-48. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29406806.pdf>
72. Choque, Rigoberto, & Nogales, Jorge. (2019). Estudio de propiedades moleculares del glifosato usando métodos químico-cuánticos computacionales. *Revista CON-CIENCIA*, 7(1), 41-56. Recuperado en 25 de junio de 2021, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000100005&lng=es&tlng=es

73. Molinspiration: <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
74. PASS online 2021: <http://www.way2drug.com/passonline/definition.php>
75. Gfeller, *et al* 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4086140/>
76. Daina, A.; Michielin, O. y Zoete, V. (2019) SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue W1, Pages W357–W364, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>
77. Forgiarini, A., Marquez L., Salaer, J. (2006). Nanoemulsiones. Universidad de los Andes Facultad de Ingenieria Química. S237-A
78. Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M. J. (2005). Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, (3), 102-110pp.
79. Hetal N. Prajapati & Damon M. Dalrymple & Abu T. M. Serajuddin (2012) A Comparative Evaluation of Mono-, Di- and Triglyceride of Medium Chain Fatty Acids by Lipid/Surfactant/Water Phase Diagram, Solubility Determination and Dispersion Testing for Application in Pharmaceutical Dosage Form Development *Pharm Res*, 29,(1), 285–305.
80. GATTEFOSSÉ,(2020),Transcutol P, for efficient drug solubilization and skin penetration, <https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2021/01/Transcutol-P-Brochure.pdf>, Fecha de consulta: Abril, 2021.

81. MERCK, TWEEN 20 ,
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p1379?lang=es®ion=MX#:~:text=Tween%C2%AE20%20is%20a,as%20the%20primary%20fatty%20acid>, fecha de consulta: abril, 2021.
82. Modarres-Gheisaria, S. M. M.; Gavagsaz-Ghoachania, R.; Malakib, M.; Safarpoura, P. and Zandia, M. (2019) Ultrasonic nano-emulsification – A review Ultrasonics - Sonochemistry 52, 88–105.
83. https://www.microtrac.com/products/particle-size-shape-analysis/dynamic-light-scattering-zeta-potential/?gclid=EAlaIQobChMIkL2Dkdaa9AIV5WxvBB3DIgp2EAAYAyAAEgIko_D_BwE
 Fecha de consulta noviembre 2021
84. Ortega-Torres, I.; Alonso-Moreno, C.; Castro-Osma, J. A. (2020) ORO NANOMÉTRICO Y VECTORIZADO COMO POTENCIAL ESTRATEGIA HACIA EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE FarmaJournal, vol. 5, núm. 1, pp. 75-83.
85. Prabhu, P; Shetty, ; Koland, M; Vijayanarayana, K.; Vijayalakshmi, K. K.; Nairy, M. H.; Nisha, G. S. (2012) Investigation of nano lipid vesicles of methotrexate for anti-rheumatoid activity International Journal of Nanomedicine 7, 177–186.
86. Maleki, H.; Dorkoosh, F.; Adabi, M.; Khosravani, M.; Arzani, H. and Kamali, M. (2017) Methotrexate-Loaded PLGA Nanoparticles: Preparation, Characterization, and their Cytotoxicity Effect on Human Glioblastoma U87MG Cells. Int. J. Med. Nano Res. 2017, 4:020.
87. Mello, S. B.V.; Tavares, E. R.; Guido, M. C.; Bonfa', E.; Maranhão, R.C. (2016) Anti-inflammatory effects of intravenous methotrexate associated with lipid nanoemulsions on antigen-induced arthritis CLINICS, 71(1):54-58.

88. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04971239> Fecha de consulta: noviembre 2021.
89. Xie, J.; Huang, S.; Huang, H.; Deng, X.; Yue, P.; Lin, J.; Yang, M.; Han, L. and Zhang, D. (2021) Advances in the Application of Natural Products and the Novel Drug Delivery Systems for Psoriasis. *Frontiers in Pharmacology* Volume 12 | Article 644952
90. Herraiz Romero Marta, Rodriguez Pereyra José Juan, La genética de la psoriasis, <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2016/mc163b.pdf>, 12 de enero 2022
91. Sanchez-Saldaña Leonardo A, Los inhibidores de las Jak cinasas: una nueva puerta terapéutica en las enfermedades inflamatorias de la piel. *Dermatol Peru*,29(2):81-82
92. Niu, L.; Lou, F.; Sun, Y.; Sun, L.; Cai, X.; Liu, Z.; Zhou, H.; Wang, H.; Wang, Z.; Bai, J.; Yin, Q.; Zhang, J.; Chen, L.; Peng, D.; Xu, Z.; Gao, Y.; Tang, S.; Fan, L.; Wang, H. (2020) A micropeptide encoded by lncRNA MIR155HG suppresses autoimmune inflammation via modulating antigen presentation. *Sci. Adv.*; 6: eaaz2059.