



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos

LICENCIATURA
Química Farmacéutica Biológica

REPORTE DE INVESTIGACIÓN

Estudio de la formación de complejos entre β -ciclodextrina y flavonoides con actividad ansiolítica formados con el uso de fluidos supercríticos o mecanoquímica.

PROYECTO GENERICO CORRESPONDIENTE

Biotransformaciones. Desarrollo de métodos biocatalíticos de síntesis y preparación de compuestos orgánicos biológicamente activos.

Liz Yarith López Ramírez

2172036290

Asesores:

Dra. Julia Cassani Hernández

No. Eco.29509

Dr. Luis José López Méndez

No. Eco. 12772022 CONACYT

Lugar de realización: Laboratorio de Biotransformaciones N-201, UAM Xochimilco.

Fecha de inicio y termino: 11 de julio del 2022 al 11 de enero del 2023.

Contenido

1.INTRODUCCIÓN	1
2.MARCO TEÓRICO.....	1
2.1 CICLODEXTRINAS.....	2
• 2.1.1 Historia y concepto	2
• 2.1.2 Obtención.....	3
• 2.1.3 Estructura química	3
• 2.1.4 Aplicaciones.....	4
2.2 FLAVONOIDES.....	5
2.3 HESPERIDINA.....	6
2.4 NEOPONCIRINA	7
2.5 COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	8
• 2.5.1 Requerimientos para la formación de compuestos de inclusión.....	9
2.6 MECANOQUIMÍA.....	10
• 2.6.1 Antecedentes	11
• 2.6.2 División	12
• 2.6.3 Molino de bolas planetario	13
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	13
4.OBJETIVO GENERAL.....	14
5.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
6.MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Equipo e instrumentos.....	15
6.2 Materias primas.....	15
7.METODOLOGÍA.....	16
7.1 Mecanoquímica.....	16
7.2 Curva de calibración hesperidina.....	18
7.3 Curva de calibración neoponcirina.....	19
7.4 Cuantificación de hesperidina y neoponcirina en los complejos de inclusión.....	20
7.5 Calculo del porcentaje de flavonoide.....	20
7.6 Prueba de disolución de hesperidina y neoponcirina en los complejos de inclusión.....	20
7.7Calculo de disolución acuosa	21
8.RESULTADOS	21
8.1 Curvas de calibración.....	21

8.2 Cuantificación total de flavonoide	23
8.3 Disolución acuosa.....	25
9. CONCLUSIÓN	27
10. BIBLIOGRAFÍA	29

1.INTRODUCCIÓN

Se ha informado que la prevalencia nacional de los trastornos de ansiedad (TA) ha aumentado entre un 20.8 y un 40 % desde la pandemia de Covid-19, en una revisión de artículos sobre aspectos de la salud mental en relación con el Covid, Torales, O'Higgins, Castaldelli-Maia y Ventriglio (2020) encontraron reportes sobre la presencia de sintomatología de estrés, ansiedad, depresión, insomnio, negación, ira y miedo, entre otros, presentes en diversas regiones del mundo. Además, se encontró que ésta se puede incrementar a través de factores como el pertenecer a un estatus socioeconómico bajo, ser del género femenino, tener conflictos interpersonales, baja resiliencia y soporte social, por lo que abordar esta afección debe ser una prioridad sanitaria, económica y social. Los flavonoides de origen natural, como la hesperidina, la rutina y la neoponcirina, se proponen como una buena alternativa para el tratamiento de los TA. Sin embargo, tienen baja solubilidad en agua. En este sentido, el uso de transportadores moleculares para mejorar la solubilidad en agua de fármacos es de gran interés.

Las ciclodextrinas son ejemplos de transportadores moleculares, tienen una cavidad hidrofóbica y extremos hidrofílicos. La solubilidad de los fármacos al complejarse con las CD cambia debido a que los grupos hidrofóbicos de éste, ya no se encuentran en contacto con el solvente sino con los átomos de la cavidad de la CD y por su parte, la superficie externa de las CD es la que interactúa con el solvente. Como resultado, la superficie externa de las CD contribuye a la solubilidad del complejo y no el fármaco en sí. La β -ciclodextrina es el más utilizado de estos sistemas porque el tamaño de su cavidad es adecuado para muchos fármacos y también es el más económico.

Este proyecto propone utilizar dos técnicas inusuales para formar complejos de inclusión con ciclodextrinas con ayuda de mecanoquímica. Se ha informado que la formación de CI con estas dos técnicas se ahorra tanto el uso de disolventes como el tiempo de formación de complejos inclusión, lo que convierte a estas dos técnicas en una excelente oportunidad de investigación para el desarrollo de

complejos de inclusión que aumentan la solubilidad de los flavonoides con actividad ansiolítica como la hesperidina y la neoponcirina.

2.MARCO TEÓRICO

2.1 CICLODEXTRINAS

- **2.1.1 Historia y concepto**

El primer trabajo sobre el aislamiento de un producto reconocible como ciclodextrina fue realizado en 1891 por Villiers quien aisló una pequeña cantidad de sustancia cristalina de un medio de cultivo de *Bacillus Amylobacter*. El siguiente avance en la química de las ciclodextrinas fue realizado por Schardinger entre 1903 y 1911 el cual caracterizó la mencionada sustancia cristalina como una mezcla de dos oligosacáridos cíclicos, a los cuales denominó dextrina cristalina α y dextrina cristalina β . (Schardinger, 1911). De igual manera Schardinger, publicó la primera descripción detallada para la preparación y aislamiento de estos oligosacáridos cíclicos. Por ello, las ciclodextrinas también son conocidas como dextrinas de Schardinger, cicloamilosas o cicloglucanos (Loftsson y Duchêne, 2007).

Actualmente, los trabajos se encuentran en una etapa conocida como segunda generación de ciclodextrinas, con especial atención en su producción y en la utilización de ciclodextrinas químicamente modificadas, donde la gran variedad de derivados existentes abre numerosas posibilidades para su uso en la industria farmacéutica, como también el número de compuestos activos susceptibles de beneficiarse de propiedades farmacocinéticas mejores o de una presentación más apropiada tras su inclusión en una ciclodextrina (Duchêne, 2011).

Las ciclodextrinas han acaparado un considerable interés dentro del campo farmacéutico, debido a su capacidad para formar compuestos de inclusión con fármacos de muy diferentes estructuras. Tales complejos de inclusión o "encapsulaciones moleculares" pueden ser aprovechadas en la formulación

farmacéutica para mejorar, por ejemplo, la solubilidad acuosa, la estabilidad química o la biodisponibilidad de un principio activo (Wade y Weller, 1994).

- **2.1.2 Obtención**

Las ciclodextrinas son producidas por la acción del enzima ciclodextrina glicosiltransferasa en un medio rico en almidón. Debido a la estructura helicoidal de las moléculas de almidón, el producto primario de la rotura del mismo por la acción de la enzima experimenta una reacción intramolecular, que da lugar a productos cíclicos por medio de enlaces α -(1,4) (Dodziuk, 2006).

Las ciclodextrinas se nombran por medio de letras griegas para denotar el número de unidades de D-glucosa que contienen: α , β y γ para las de 6, 7 y 8 unidades respectivamente y así sucesivamente para ciclodextrinas superiores. Pueden existir homólogos de 9 o más unidades, pero presentan dificultades para ser purificados y, además, su capacidad de complejación es pobre. Por otra parte, no pueden formarse ciclodextrinas de menos de 6 unidades debido a impedimentos estéricos (Larsen, 2002).

- **2.1.3 Estructura química**

Las ciclodextrinas se pueden definir como oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,4). La característica estructural más importante de estos compuestos es su conformación toroidal o de "donut", que delimita una cavidad interior relativamente apolar, siendo su exterior de naturaleza hidrofílica. Gracias a dicha conformación, estas moléculas son capaces de formar complejos de inclusión los cuales son sistemas que presentan la estructura de un clatrato, es decir una molécula que contiene un segundo tipo de molécula (Davis y Brewster, 2004).

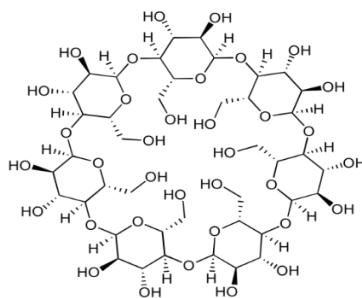


Figura 1. Estructura de la ciclodextrina.

Como se ha comentado, las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,4). Como consecuencia de la conformación del C1 de las unidades de α -D-glucopiranososa y la ausencia de libre rotación de los enlaces glucosídicos, estas moléculas no son totalmente cilíndricas, sino que presentan una conformación troncocónica (Davis y Brewster, 2004).

Por otra parte, los grupos hidroxilos secundarios (que se encuentran en los átomos C2 y C3 de las unidades de glucosa) están situados en un polo del anillo y todos los hidroxilos primarios en el otro. Esta particular ordenación determina que el exterior sea altamente hidrofílico (Loftsson et al., 2002).

El lado donde se encuentran situados los hidroxilos secundarios es más ancho que el de los hidroxilos primarios. La libre rotación de estos últimos, no rodeados por átomos de hidrógeno, puede reducir el diámetro efectivo de la cavidad en el lado donde éstos se encuentran, mientras que los hidroxilos secundarios, situados en cadenas más rígidas, no tienen posibilidad de rotación (Loftsson y Brewster, 1996).

- **2.1.4 Aplicaciones**

La formación de un complejo de inclusión con un compuesto produce cambios físicos y químicos para el huésped, por ejemplo: estabilidad contra oxidación, luz, calor; una modificación de su reactividad química, una fijación de moléculas muy volátiles, un aumento de la solubilidad, y una protección contra la degradación por microorganismos, entre otras cualidades (Rezende et al. 2009; Del Valle 2004).

En la formulación de alimentos se utiliza como protector de sabor debido a que algunas moléculas características del sabor son generalmente oleosas o líquidas y forman complejos con las ciclodextrinas fácilmente; también se utiliza para la eliminación de compuestos, además se ha demostrado que ayuda a mejorar la textura de productos cárnicos y reduce acidez de algunos compuestos (Hedges 1998).

La formación de los complejos de inclusión también se ha aplicado a flavonoides con baja solubilidad (Dias, Nikolaou y De Giovani 2008), para evitar su posible degradación en el intestino delgado y que la biodisponibilidad del flavonoide se mantenga en el intestino grueso que es donde ejerce su mayor efecto biológico (Rezende *et al.* 2009).

2.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides comprenden una clase de metabolitos secundarios importantes en plantas vasculares, vegetales, semillas, hierbas, especias, flores, así como en té, vino tinto y frutas cítricas. Los flavonoides son fenilbenzopironas (fenilcromonas) de bajo peso molecular con una variedad de estructuras basadas en un núcleo común de tres anillos. Las propiedades farmacológicas de los flavonoides cubren un amplio espectro de acciones como la inhibición de muchas enzimas, por ejemplo, la proteína quinasa C, la fosfolipasa A₂, las Na⁺ y K⁺-ATP-asas, las lipooxigenasas y las ciclooxigenasas, inhibir la proteinasa del VIH-1, entre otras. Cuentan con propiedades antiinflamatorias, antitóxicas, antialérgicas, anticancerígenas, antivirales y antitumorales citotóxicas. Quizás sus propiedades más estudiadas han sido sus efectos antioxidantes, que reflejan su capacidad para proteger a las células de la muerte producida por el estrés oxidativo, implicado en la neuro excitotoxicidad inducida por Ca²⁺ y en diversas patologías como el Alzheimer y el Parkinson (Cassani *et al.* 2013).

2.3 HESPERIDINA

La hesperidina es un glucósido flavanona que está comprendido de una aglicona, hesperetina y un disacárido unido, rutinosa. Es una sustancia sólida fácilmente soluble en piridina, generando una solución de color amarillo claro; es ligeramente soluble en metanol, ácido acético glacial caliente y casi insoluble en acetona, benceno y cloroformo, tiene baja solubilidad en agua. En estado puro se produce como agujas y tiene un color entre blanco y amarillo pálido, es insípida e inodora; su fórmula molecular es $C_{18}H_{34}O_{15}$, con un peso molecular de 610.57 Daltons y un punto de fusión entre 258 y 260 °C. Posee una propiedad para formar cristales complejos con otros glucósidos similares, esto puede afectar algunas propiedades físicas como la solubilidad y su obtención en estado puro. Tiene un espectro de absorción característico de flavanona, con máximos UV a 289 nm, con una inflexión de baja intensidad a 330 nm (Garg *et al.* 2001).

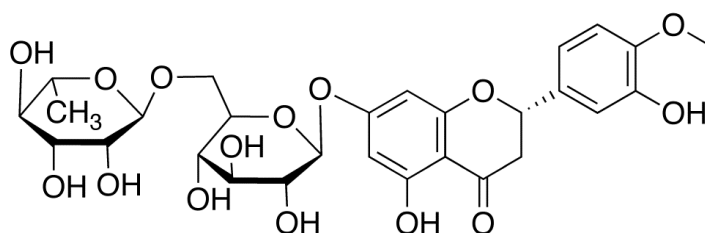


Figura2. Estructura de la Hesperidina

La hesperidina posee actividad similar a la de las vitaminas, puede disminuir la permeabilidad y la fragilidad capilar, también posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antialérgicas. Con el paso del tiempo, la hesperidina ha adquirido gran importancia, ya que se han publicado un gran número de estudios que describen nuevas actividades farmacológicas, con objetivos moleculares y mecanismos de acción. Durante la última década, se han investigado los efectos de la hesperidina sobre el sistema nervioso central. (Roohbakhsh *et al* 2014)

El efecto antidepresivo de la hesperidina comprende una vía óxido nítrico (NO) – guanosina monofosfato cíclico (cGMP) dependiente; los resultados mostraron que el tratamiento crónico de la hesperidina tiene comportamiento antidepresivo en el

Ensayo de Suspensión de Cola de Ratón (Mouse Tail Suspension Test (TST), por su nombre en inglés). El estudio evaluó el efecto de la hesperidina en el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), por su nombre en inglés) como un agente importante en la fisiopatología de la depresión. La hesperidina incremento el nivel de BDNF en el hipocampo. (Anthony *et al.* 2014).

De igual manera presenta efectos antihipertensivos; en el estudio realizado por Yamamoto y colaboradores (2013), suministraron dosis continuas de hesperidina (HE) y glucosal hesperidina (GHE) en ratas con hipertensión espontánea. Los resultados indicaron que la ingestión continua de HE y GHE, previene la hipertensión arterial por medio de la regulación de la expresión de genes que se relacionan con la modulación del tono vascular (Yamamoto *et al.* 2013).

2.4 NEOPONCIRINA

También llamada Didymin pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como flavonoides-7-o-glucósidos, se encuentra en varios cítricos. Estos son compuestos fenólicos que contienen un resto flavonoide que está enlazado O-glucosídicamente al fragmento carbohidrato en la posición C7 (Ali *et al.*, 2019).

Debido a su alto contenido en cítricos y su fácil extracción, la didimina ha sido destacado por su potencial como fármaco resaltándose por ser económico, seguro, eficaz y nula toxicidad en los tejidos normales. Tradicionalmente, la didimina se ha utilizado durante mucho tiempo en los países asiáticos como antioxidante dietético. En los últimos años, los estudios han confirmado que la didimina como flavonoide mostró actividades biológicas prometedoras que incluyen anticancerígeno, antioxidante y neuroprotector, antinociceptivo, hepatoprotector, antiinflamatorio, y cardiovasculares. A pesar de su papel emergente como agente antioxidante y de complicaciones cardiovasculares en la prevención de varios tipos de cáncer, su uso potencial como antidiabético no es bien conocido (Ali *et al.*, 2019).

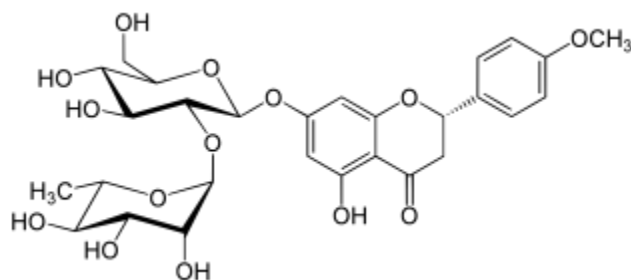


Figura 3. Estructura química de la Neoponcirina.

La neoponcirina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Algunos estudios con animales han demostrado que tiene efectos potencialmente beneficiosos sobre la reducción del aprendizaje con la edad, la pérdida de memoria y el aumento de ansiedad. Las intervenciones en el hombre asocian también el consumo de este flavonoide a largo plazo con una mejora del aprendizaje, el pensamiento lógico y la habilidad planificadora (Erdman *et al.* 2007)

2.5 COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Los complejos de inclusión son compuestos moleculares en el cual la molécula hospedadora envuelve espacialmente a otra. El compuesto encerrado (la molécula huésped), se encuentra situado en la cavidad del hospedador, sin que su estructura se afecte de forma significativa. Aparte de una leve deformación, un hecho característico es que el tamaño y la forma de la cavidad disponible permanecen prácticamente inalterados (Liu *et al.*, 2013).

Pringsheim descubre el poder complejante de estas sustancias, es decir, su aptitud para formar compuestos de inclusión con diversas moléculas, a las cuales modificaba sus características de solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad, etc. (Duchêne *et al.*, 1987).

Las ciclodextrinas presentan la posibilidad de interactuar con una amplia variedad de especies iónicas y moleculares. Los compuestos de inclusión resultantes

pertenecen a los complejos del tipo "hospedador-invitado".

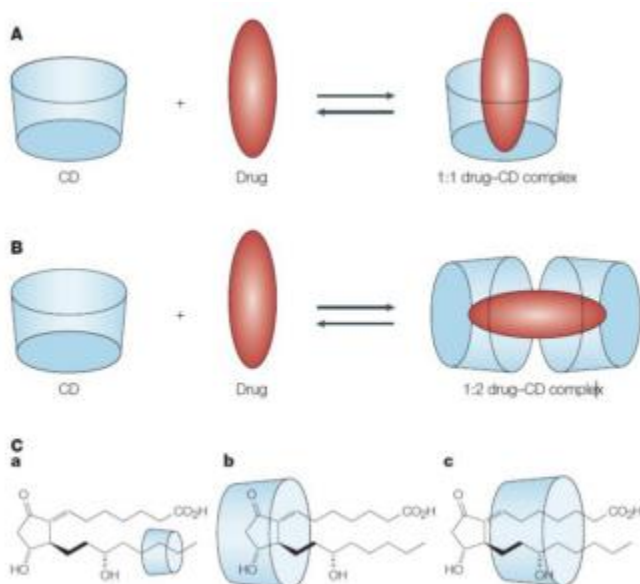


Diagrama 1. Formación de complejos de inclusión.

- **2.5.1 Requerimientos para la formación de compuestos de inclusión**

- 2.5.1.1 Compatibilidad geométrica**

El primer requerimiento para la formación de un compuesto de inclusión es que la molécula huésped pueda introducirse total o, al menos, parcialmente, en la cavidad de la ciclodextrina (Singh, 2010).

Las ciclodextrinas naturales presentan cavidades de diferentes dimensiones ($\gamma > \beta > \alpha$), por lo que una buena adaptación de la molécula huésped al tamaño de cavidad de un tipo concreto de ciclodextrina se traducirá en un mayor número de interacciones entre ambas moléculas: esto se refleja en un valor más alto de constante de estabilidad (Singh, 2010).

La estequiometría de los complejos depende de la naturaleza de la sustancia a complejar y de las dimensiones de la cavidad de la ciclodextrina o sus sustituyentes. Así, dependiendo de propiedades tales como el tamaño y forma del huésped, no sólo podemos encontrar en solución complejos de estequiometría 1:1, sino también 1:2, 2:1, ó 2:2 (Chmurski, 2015).

2.5.1.2 Polaridad y carga

Moléculas fuertemente hidrófilas (muy solubles en agua) y grupos fuertemente hidratados y ionizados son débilmente complejables, frecuentemente, los complejos de especies iónicas son mucho menos estables que los de especies no ionizadas, hallándose favorecida la entrada de estas últimas moléculas en la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas. En general, moléculas hidrofóbicas presentan alta afinidad por la cavidad de la ciclodextrina en solución acuosa (Zhang y Ma, 2013).

2.5.1.3 Medio

En principio, aunque no es necesario ningún tipo de disolvente para que se pueda formar un compuesto de inclusión, el proceso de complejación se ve mejorado en presencia de agua. La formación de complejos en solución es un proceso muy rápido, pero por regla general, las sustancias que posean buena solubilidad en agua se compleja sólo débilmente. En cambio, las moléculas que presenten una buena complejación suelen presentar baja solubilidad acuosa. La formación de los compuestos de inclusión en medio líquido se puede dividir en 6 etapas (Liu *et al.* 2013):

- (I) Aproximación de la molécula huésped hacia la ciclodextrina.
- (II) Ruptura del agua de estructura del interior de la cavidad de la ciclodextrina.
- (III) Desordenación de la estructura del agua alrededor de la molécula.
- (IV) Interacción de la molécula del sustrato o de algún sustituyente con grupos del borde o del interior de la cavidad de la ciclodextrina.
- (V) Formación de posibles puentes de hidrógeno entre el sustrato y la ciclodextrina.
- (VI) Restablecimiento de la estructura del agua alrededor de la parte exterior de la molécula después de la inclusión.

2.6 MECANOQUIMÍA

La mecanoquímica es un campo de investigación interdisciplinario dinámico en la ciencia de los materiales y la química del estado sólido que aporta ventajas en

términos de tiempo, simplicidad, costo y reducción de desechos. La molienda sin disolventes es una técnica que es capaz de proporcionar productos o formas de materiales que no se pueden obtener, o que son difíciles de obtener, utilizando métodos clásicos basados en soluciones. Entre sus muchas ventajas se encuentran el fácil escalado, así como el control cuantitativo e *in situ* de la reacción (Takacs, 2000).

La activación mecanoquímica se ha utilizado para la complejación de fármacos con CD desde 1986. Se han preparado complejos de esteroides, como metil hidroxiprogesterona. Los tratamientos de molienda pueden mejorar drásticamente la solubilidad y la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua debido a la reducción del tamaño de las partículas, mayor área superficial y porosidad. La molienda ultrafina es una técnica sencilla basada en fuerzas de impacto y efectos de fricción que dan como resultado grandes cantidades de energía mecánica que generalmente provocan cambios estructurales e incluso reacciones químicas, incluida la mejora de la interacción molecular y la formación de complejos (Smolyakov, 2008).

- **2.6.1 Antecedentes**

El término mecanoquímica se establece por primera vez en 1891, cuando Fridrich Wilhelm Ostwald la define como: la rama de la química que se refiere a los cambios químicos o fisicoquímicos de sustancias en cualquier estado, debido a la influencia de energía mecánica. Este nombre surge inspirado tal vez, en la clasificación dada por W. Nernst, quien clasificó a los diferentes campos de la química de acuerdo con el tipo de energía suministrada al sistema: termoquímica, electroquímica, fotoquímica, entre otras (Fernandez, 1999).

Posteriormente, Gerhard Heinicke en 1984 presentó una definición ampliamente aceptada de mecanoquímica: es la rama de la química relacionada con los cambios químicos y físicos de los sólidos, inducidos por la acción de la influencia mecánica.

El término "mecanoquímica" se formalizó por la IUPAC en el año 1997 "una reacción química que es inducida por la absorción directa de energía mecánica" (Kajdas,2015)

La Mecanoquímica surgió como un método sencillo para producir compuestos inorgánicos, sin embargo, en la actualidad se ha convertido en uno de los métodos sintéticos más interesantes para producir nuevos materiales en un menor tiempo, libre de disolventes y más amigable con el medio ambiente (Kumar-Achar *et al* , 2015)

- **2.6.2 División**

La mecanoquímica se puede dividir en dos procesos principales: la mecanosíntesis que se refiere a aquellos procesos en los que se induce una reacción química en los materiales de partida, debido únicamente a la acción de molienda continua y la activación mecánica que se define como el incremento en la capacidad de reacción, debido a cambios estables en la estructura sólida. Esto se refiere a los procesos en los que no se produce un cambio químico en los reactivos de partida, pero se favorece la cinética de la reacción, permitiendo obtener un determinado producto empleando una temperatura de tratamiento térmico menor que en un proceso de síntesis convencional, en estado sólido (Tan, 2018)

Entre los procesos mecanoquímicos se encuentran los siguientes:

- Transformaciones de fases en sólidos polimórficos.
- Formación de disoluciones sólidas.
- Intercambios iónicos.
- Formación de complejos.
- Reacciones de oxidación-reducción.
- Reacciones ácido-base.
- Amorfización de polímeros.

En estos procesos de molienda, pueden tener lugar todos o algunos de los siguientes procesos:

- Reducción de las partículas a un tamaño muy pequeño.
- Generación de un gran número de nuevas superficies.
- Formación de dislocaciones y defectos puntuales en las estructuras cristalinas.

- **2.6.3 Molino de bolas planetario**

Instala vasos en un disco, y tanto los vasos como el disco giran simultáneamente y por separado a alta velocidad. La alta velocidad de rotación de las jarras y la revolución del disco hacen que las bolas se muevan fuerte y violentamente, lo que conduce a una molienda fina de un producto debido a la generación de energía de impacto de bola grande. La jarra del molino de bolas se llena parcialmente con el material que se va a moler junto con los medios de molienda, normalmente bolas de acero inoxidable. La alta energía de las bolas durante la molienda se atribuye a una fuerza centrífuga extremadamente alta que actúa sobre las bolas por las dos rotaciones a alta velocidad. Varias investigaciones han proporcionado información sobre el efecto de las condiciones operativas en el producto de molienda mecánica mediante análisis experimentales y matemáticos. Los procesos dentro de PBM son complejos y dependen en gran medida del material procesado, la síntesis o el tipo de complejación, por lo que se deben evaluar las condiciones óptimas de molienda para cada sistema individual. Esta tecnología verde permite que las reacciones y complejaciones se lleven a cabo en estado sólido y también puede reducir el uso de solventes (cuando sea necesario), lo que la convierte en una opción atractiva para varios campos de aplicación (Paneque-Quevedo *et al.* 2019)

Con los antecedentes revisados anteriormente es que el presente trabajo se propuso el siguiente planteamiento del problema.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Se estima que en México al menos 1 de cada 5 personas podría desarrollar alguna vez en su vida algún trastorno de ansiedad, considerando que estos padecimientos

discapacitan tanto a nivel físico como mental, el desarrollo de alternativas farmacológicas que ayuden a su tratamiento integral es un tema relevante para la investigación básica a nivel nacional.

Aprovechando la riqueza de medicina herbolaria en nuestro país para la búsqueda de nuevas entidades farmacológicas, es que en el presente proyecto de investigación se plantea incrementar la solubilidad acuosa de la neoponcirina, un flavonoide extraído de *Clinopodium mexicanum* y de la hesperidina flavonoide extraído de *Citrus aurantium*. Por lo anterior mencionado es que se propone el siguiente objetivo general.

4.OBJETIVO GENERAL

Estudiar mediante el análisis de perfiles de disolución como incrementa la solubilidad acuosa del flavonoide neoponcirina contenido en complejos de inclusión con β -ciclodextrina, formados utilizando CO₂ supercrítico y mecanoquímica.

5.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Formación de complejos de inclusión utilizando CO₂ supercrítico y mecanoquímica.
2. Realizar un ensayo de disolución de los complejos obtenidos.
3. Determinar mediante el análisis de los perfiles de solubilidad que método de entre el uso de CO₂ supercrítico y mecanoquímica es el óptimo para la formación de complejos de inclusión entre β -ciclodextrina con hesperidina y neoponcirina.

6.MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Equipo e instrumentos.

En la Tabla 1 se presentan los equipos e instrumentos empleados durante el desarrollo experimental.

Tabla 1 Equipo e instrumento utilizado durante el desarrollo experimental.

<i>Equipo e instrumento</i>		
Equipo/Instrumento	Marca	Modelo
Balanza analítica	AG245	METLER
Sonicador	COLE-PARMER	08895
espectrofotómetro UV/Vis	VELAB	VE-5100UV
CPU	NA	S/D
ThermoMixer	Eppendorf	0101726
Molino	NA	NA
Liofilizador	Labconco	Freeze Dry System 7670520

NA: no aplica. S/D: Sin dato

6.2 Materias primas.

Las materias primas empleadas fueron proporcionadas por laboratorios y proveedores certificados.

Tabla 2 Materias primas empleadas durante el desarrollo experimental.

<i>Principio activo</i>	
Nombre	Lote
Hesperidina	S/D
Neoponcirina	S/D
Excipiente	
Ciclodextrina	S/D

S/D: Sin dato

Extracto de Neoponcirina se obtuvo de *clinopodium mexicanum* de acuerdo a la metodología reportada por Cassni y colaboradores en 2013.

7.METODOLOGÍA

7.1 Mecanoquímica

Se realizaron 3 experimentos con distintas condiciones, para el caso de los experimentos con Neoponcirina se pesaron las cantidades que se muestran en la tabla 5.

Tabla 3. Pesos para experimentos con Neoponcirina

	Reactivos	Contenedor 1	Contenedor 2
Experimento	Ciclodextrina	30.2 mg	30mg
1	Neoponcirina	16.1 mg	16 mg
Experimento	Ciclodextrina	30.1 mg	30.1 mg
2	Neoponcirina	16.1 mg	16 mg
Experimento	Ciclodextrina	30.2 mg	30.2 mg
3	Neoponcirina	16.1 mg	16.2 mg

En caso de los experimentos con Hesperidina se pesaron las cantidades que se muestran en la tabla 6.

Tabla 4. Pesos para experimentos con Hesperidina

	Reactivos	Contenedor 1	Contenedor 2
Experimento	Ciclodextrina	30. mg	30.3 mg
1	Hesperidina	16.1 mg	16.3 mg
Experimento	Ciclodextrina	30.1 mg	30 mg
2	Hesperidina	16 mg	16 mg
Experimento	Ciclodextrina	30.2 mg	30.2 mg
3	Hesperidina	16.1 mg	16.2 mg

La síntesis se llevó a cabo en un molino planetario de bolas de alta energía con dos posiciones de molienda.

En cada posición de molienda se colocó un reactor con interior de zirconia provisto con 5 bolas del mismo material de 10 mm. En cada reactor se colocaron cantidades equimolares de reactivos (descritas en las tablas 5 y 6) . Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

Tabla 5. Condiciones utilizadas en mecanoquímica.

Condiciones		
		Frecuencia(rpm)
Neoponcirina	Experimento 1	200
	Experimento 2	400
	Experimento 3	600
Hesperidina	Experimento 1	200
	Experimento 2	400
	Experimento 3	600

Cada experimento consistió en 3 ciclos de 15 min con pausas de 5 minutos

Una vez los reactores contrapesados fueron colocados en sus posiciones en el molino, una vez que se llevó a cabo el proceso de síntesis, se recuperó todo el producto resultante.

7.2 Curva de calibración hesperidina.

La curva de calibración para la cuantificación de hesperidina se construyó partiendo de una disolución Stock 2 mg/mL en metanol, se sonicó por 10 minutos. Se tomaron las siguientes alícuotas para obtener soluciones de concentración con un intervalo de 0.008 a 0.04 mg/mL.

Tabla 6. Alícuotas para curva de calibración

de hesperidina

NO. ALICUOTA	mL
1	100
2	150
3	200
4	250
5	300
6	350
7	400
8	450
9	500

Estas soluciones se leyeron en un espectro UV-Vis con una longitud de onda de 284 nm en un intervalo de 0.1 a 1 u.a.

7.3 Curva de calibración neoponcirina.

La curva de calibración para la cuantificación de Neoponcirina se construyó partiendo de una disolución Stock 0.4 mg/mL en metanol, se sónico por 10 minutos. Se tomaron las siguientes alícuotas para obtener soluciones de concentración con un intervalo de 0.008 a 0.04 mg/mL.

Tabla8. Alícuotas para curva de calibración de neoponcirina

NO. ALICUOTA	ML
1	100
2	150
3	200
4	250
5	300
6	350
7	400
8	450
9	500

7.4 Cuantificación de hesperidina y neoponcirina en los complejos de inclusión.

4 mg de las muestras obtenidas por mecanoquímica, se colocaron en un matraz aforado de 5 mL y se aforo con metanol; de esta disolución se tomó una alícuota de 740 µL y se colocó en un matraz aforado de 5 mL, se aforo con Metanol. La disolución resultante Se analizó en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 284 nm.

7.5 Calculo del porcentaje de flavonoide

En el cálculo de porcentaje de flavonoides en primera instancia para sacar la concentración 2 se interpola las absorbancias en la curva de calibración utilizando la ecuación de la recta correspondientes a neoponciria y hesperidina según sea el caso.

Para la C1 se utiliza la siguiente ecuación $C_1V_1=C_2V_2$ pero como ya se cuenta con el valor de C2, despejamos dicha ecuación que quedaría $C_1= C_2*(V_2/V_1)$ y de esta manera podemos saber el dato de C1 para proceder a sacar los mg de flavonoide en donde todos los datos obtenidos de C1 se multiplicaron por 5 ml.

Por ultimo para sacar el % de flavonoide se multiplica los mg de flavonoide por 100 y se divide entre 4 que son los mg del complejo que se pesó.

7.6 Prueba de disolución de hesperidina y neoponcirina en los complejos de inclusión.

Se pesó 5 mg de cada muestra obtenida a diferentes condiciones de reacción y se colocaron en tubos Eppendorf con 1 mL de agua destilada a cada tubo. se colocaron en el Thermomixer con las siguientes condiciones: 25 °C y 1000RPM durante 20 horas. Posteriormente se tomó una alícuota del sobrenadante de 600 mL para colocarla en un matraz aforado de 5 ml, el cual fue aforado con metanol. Para concluir las disoluciones obtenidas fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 284 nm.

7.7 Cálculo de disolución acuosa

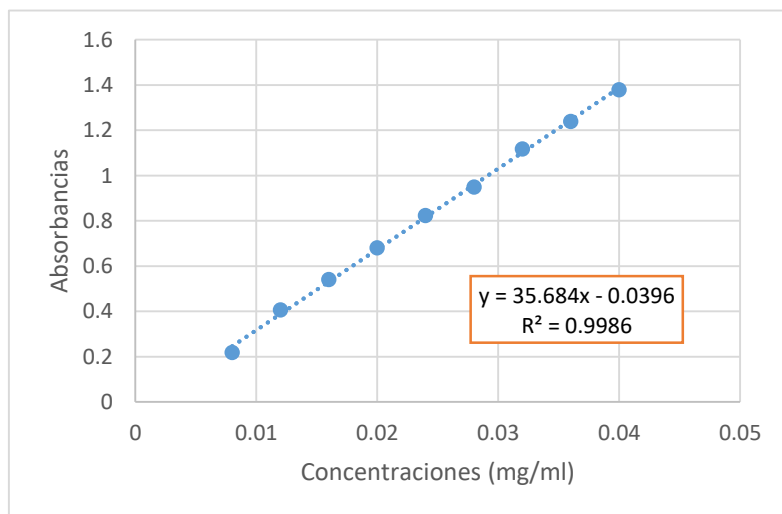
Lo primero es sacar C2 interpolando las absorbancias en la curva de calibración utilizando la ecuación de la recta correspondientes a neoponcirina y hesperidina según sea el caso.

Para C1 se utiliza la ecuación $C1V1=C2V2$, pero como ya se cuenta con el valor de C2, despejamos dicha ecuación quedando $C1= C2*(V2/V1)$ y de esta manera podemos saber el dato de C1.

Para finalizar el resultado que se obtuvo de C1 se multiplicara por lo siguiente (5 /0.6) donde 5 representa los ml del matraz aforado y 0.6 los microlitros que se tomaron del tubo eppendorf y este resultado lo convertimos a ug/mL para poder trabajar mejor con estas unidades.

8.RESULTADOS

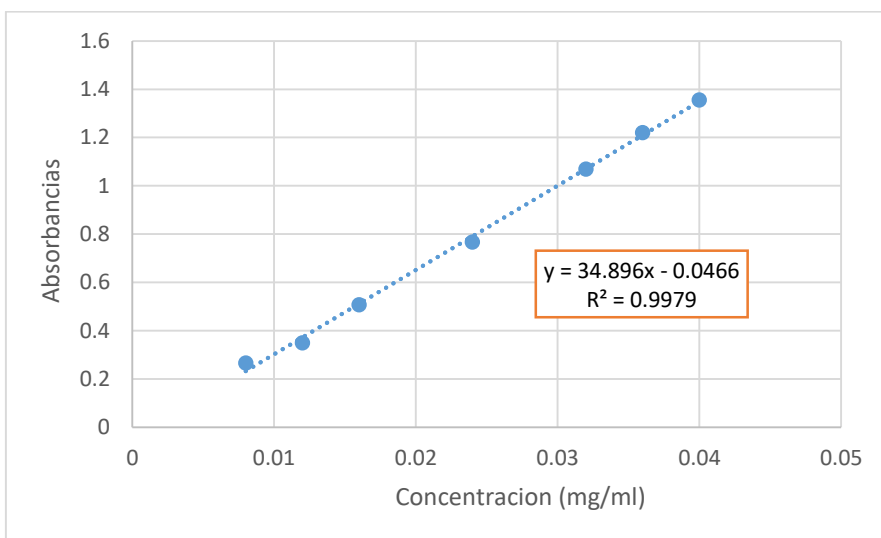
8.1 Curvas de calibración.



Grafica 1. Curva de calibración de neoponcirina.

Esta curva de calibración presenta una buena linealidad en un amplio rango de concentraciones. Para la evaluación estadística de la linealidad se obtuvo la

ecuación de la recta donde $y = 35.684x - 0.0396$ y el valor de la R^2 de 0.9986 (mostrados en la gráfica 1).

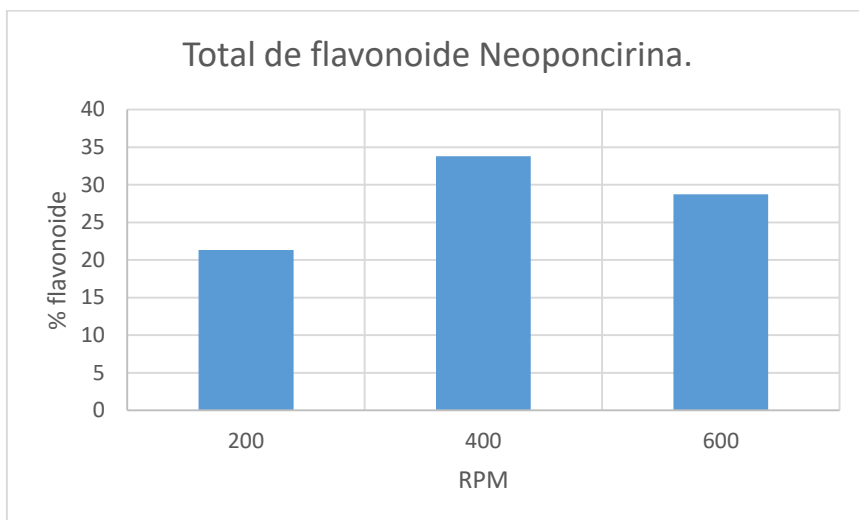


Gráfica 2. Curva de calibración de hesperidina.

Esta curva de calibración presenta una buena linealidad en un amplio rango de concentración. Para la evaluación estadística de la linealidad se obtuvo la ecuación de la recta donde $y = 34.896x - 0.0466$ y el valor de su R^2 de 0.9979 (mostrados en la gráfica 2).

Ambas curvas de calibración cumplen con el criterio de aceptación establecido por la guía de validación para métodos analíticos ($R^2 > 0.98$), por lo cual son confiables para la determinación de neoponcirina y hesperidina.

8.2 Cuantificación total de flavonoide.

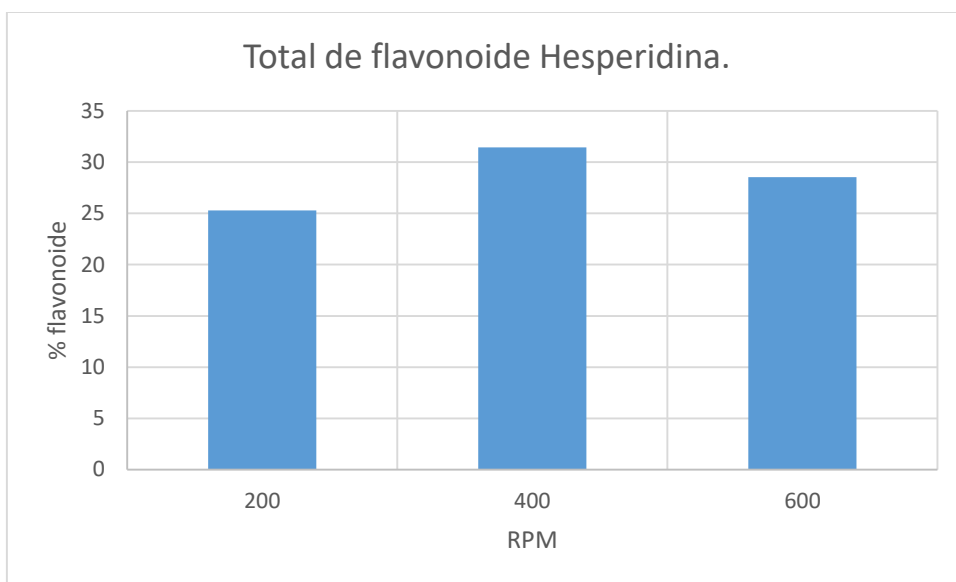


Grafica 3. Total de flavonoide neoponcirina.

Al utilizar mecanoquímica se proporciona un método fácil y eficiente para la formación de complejos de inclusión β -CD sin la adición de un disolvente. La mecanoquímica puede causar una reducción en el tamaño cristalino debido a una fuerte fuerza de impacto que surge del proceso de molienda (Smolyakov, 2008). Durante el proceso de molienda, los pasos iniciales están dominados por la rotura de los cristales y generalmente requieren menos energía, por ende, una variable que se fue modificando durante el proceso fueron las revoluciones por minuto para así saber cuál de las utilizadas tendría mejor resultado.

El mejor resultado del total de flavonoides se logró después de 45 min a 400 rpm. El total de flavonoides no fue satisfactorio a valores de rpm más altos o más bajos porque se suministró demasiada o muy poca energía, respectivamente, al sistema. En el primer caso, probablemente la energía no permitió la adecuada formación de complejos ya que el grado de complejación disminuye con el aumento de la temperatura. En este último caso, planteamos la hipótesis de que no se proporcionó suficiente energía para desplazar las moléculas de agua dentro de la cavidad. De hecho, se supone que la cavidad apolar del CD está ocupada por moléculas de agua, cuya presencia es desfavorable desde el punto de vista energético (interacción polar-apolar) y, por lo tanto, puede ser sustituida por

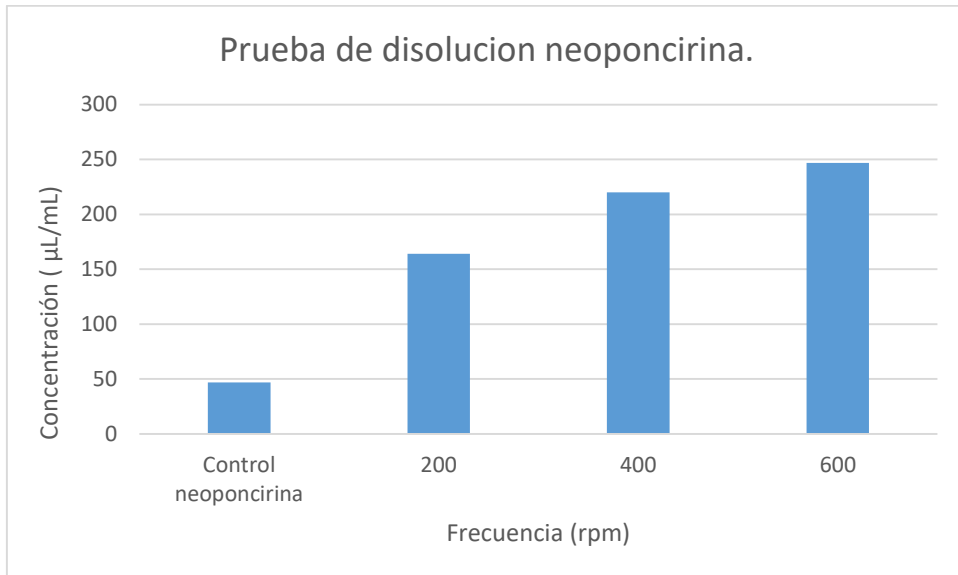
moléculas huésped menos polares y adecuadas. 400 rpm es un buen compromiso para la formación de complejos y una cantidad de flavonoides adecuado. Se logró un buen porcentaje de flavonoide total a esta velocidad de rotación en 45 min en condiciones sin disolvente.



Grafica 4. Total de flavonoide hesperidina

La coordinación de la molécula de Hesperidina y CD es un sistema de reacción complejo en el que influyen muchos factores. Se estudió el efecto de las revoluciones por minuto sobre la relación de inclusión. Y así saber cuál de estas variables tendrá mejor resultado. El mejor resultado en cuanto a la cantidad total de flavonoide como el experimento anterior se logró después de 45 min a 400 rpm.

8.3 Disolución acuosa



Grafica 5. Prueba de solubilidad neoponcirina

En general, se reconoce que el efecto obtenido por la molienda en molinos vibratorios depende principalmente de la frecuencia del movimiento vibratorio, el material del medio de molienda, la forma (generalmente bolas) y la densidad, así como la relación entre el medio de molienda y la carga. En cuanto a la frecuencia vibratoria, se aplicaron tres valores que fueron 200,400 y 600 rpm. El efecto de la frecuencia vibratoria en la formación del complejo de inclusión de CD en estado sólido no es sencillo, sino que también depende del tipo y las propiedades del CD utilizado en este caso se utilizó la β -CD. Al tener en cuenta estas características se determinó que la frecuencia más óptima para una mejor disolución de Neoponcirina fue la de 600 rpm.

En el caso de la mezcla de ciclodextrina con neoponcirina, se logró la amorfización completa del fármaco y la probable formación del complejo de inclusión después de 30 minutos de molienda a 400 rpm, mientras que se logró el mismo resultado después de solo 15 minutos de trituración a 600 rpm por lo tanto una mejor disolución. La complejación de Neoponcirina con β CD lograda mediante la molienda conjunta aumentó su velocidad de disolución intrínseca constante

aproximadamente 100 veces, en comparación con el aumento de aproximadamente 10 veces obtenido a partir de mezclas molidas con β CD.

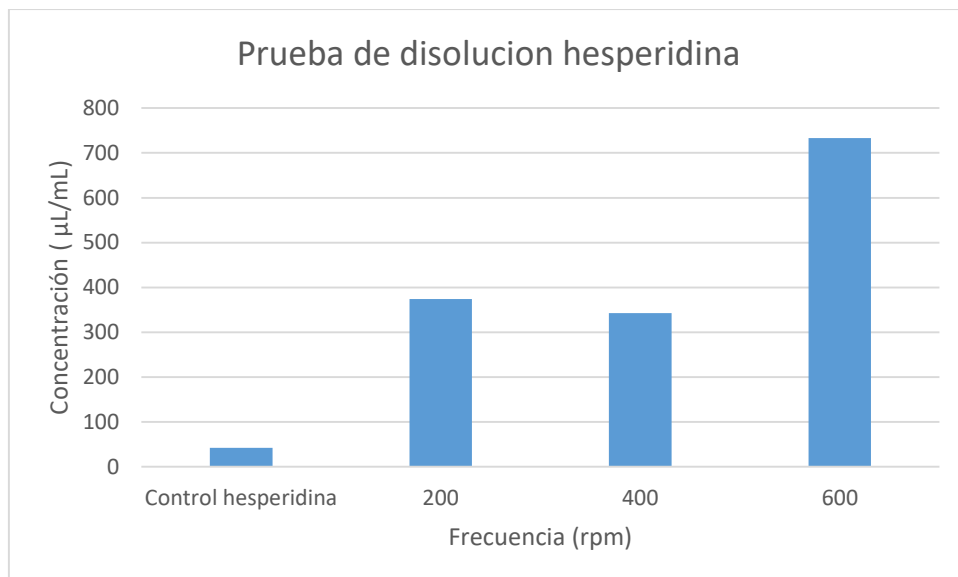


Grafico 6. Prueba de solubilidad hesperidina

Se encontró que la solubilidad acuosa de hesperidina aumento con el tratamiento de activación mecánica a mayores revoluciones por minuto, lo que significa que el tamaño reducido de las partículas pudo contribuir a aumentar la solubilidad de hesperidina. Se propuso que este fenómeno estaba relacionado con la auto agregación de partículas de hesperidina, que fue causada por una alta presión directa y una fuerza de corte con una aceleración de los medios de molienda durante el proceso.

Es obvio que el nivel de carga de los frascos de molienda es un parámetro importante que define el espacio libre disponible para las trayectorias de las bolas, definiendo así su energía cinética que podría transferirse a la muestra tratada. Generalmente se acepta que los frascos de molienda deben llenarse hasta el 25% de su volumen, teniendo en cuenta tanto el volumen de la muestra como el de las bolas de molienda. En general, el tiempo de molienda necesario para lograr

una completa amorfización del producto y probable complejación de inclusiones en estado sólido varía entre 30 y 60 min, dependiendo de las características fisicoquímicas tanto del fármaco como del CD sometidos a molienda, así como de la relación fármaco-CD. Sin embargo, en algunos casos, la amorfización exitosa se logró en tiempos de molienda relativamente más cortos. Pero en este caso se obtuvo un mejor resultado con la mayor frecuencia que es de 600 rpm y con un tiempo de 45 min obteniendo el mayor grado de disolución.

En general, la molienda conjunta con derivados de CD cristalinos conduce solo a una complejación parcial del fármaco (es decir, a la formación de productos parcialmente cristalinos) o requiere un tiempo de molienda más largo hasta la amortización completa del producto, lo que generalmente se acepta como una indicación de formación de complejos de inclusión en estado sólido. Por otro lado, los derivados de β CD hidrofílicos son más efectivos que los β CD naturales para establecer interacciones de estado sólido con el fármaco mediante molienda.

Wongmekiat y colaboradores estudiaron en detalle el mecanismo de formación de partículas finas de fármaco mediante la molienda conjunta con CD, quienes demostraron el papel fundamental del contenido de agua en el rendimiento y las dimensiones de las nanopartículas de fármaco formadas, junto con el tiempo de molienda y la relación fármaco/CD. Dato que se debería tomar en consideración para las futuras investigaciones y gracias a esto podemos deducir que si hubiéramos utilizado agua como disolvente se hubiera tenido un rendimiento aún más alto.

9. CONCLUSIÓN

En relación con este proyecto de investigación se alcanzó con éxito la formación de complejos de inclusión mediante el uso de mecanoquímica, así mismo se adquieren resultados que nos dicen la gran potencia para mejorar la disolución acuosa de neoponcirina y hesperidina usando la mecanoquímica.

Después de efectuar las pruebas con hesperidina los resultados más notables positivamente referente al contenido de flavonoides fueron con 400 rpm y en cuanto a la disolución se consiguieron con 600 rpm estas dos variables indican las condiciones de reacción para un buen resultado.

En cuanto a la neoponcirina los resultados son semejantes a los anteriores mencionados ya que para el contenido de flavonoides las condiciones más óptimas se llevaron a cabo con 400 rpm mientras que para la prueba de disolución las condiciones más perfectas sucedieron con 600 rpm.

Cabe recalcar que para mejorar los resultados es de vital importancia tomar en consideración el uso del agua como disolvente ya que los rendimientos de los experimentos aumentarían significativamente, así como moderar el tiempo de molienda y la relación fármaco/CD. Estos son datos que pueden servir de mucho para las futuras investigaciones.

No menos importante gracias a este trabajo me pude dar cuenta que los métodos convencionales suelen llevar mucho tiempo y requieren grandes cantidades de disolventes orgánicos, lo que provoca contaminación ambiental y conlleva problemas toxicológicos y de seguridad. Por estas razones, los métodos de extracción "verdes", eficientes y sostenibles, como la extracción en fase sólida y el enriquecimiento a través de la técnica de molienda de bolas y el uso de CD, pueden consolidar su lugar como una tendencia de investigación prometedora en el campo de la química.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, MY., Zaib, S., Rahman, MM., Jannat, S., Iqbal, J., Park, SK., Chang, MS. (2019) Didymín, un flavonoide cítrico de la dieta, presenta complicaciones anti-diabéticas y promueve la captación de glucosa a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt en células HepG2 resistentes a la insulina. *Chem Biol Interact.* 305;180-194. Doi: 10.1016/j.cbi.2019.03.018.
- Anthony, MS., Souza, LC., Boeira, S. P., Jesse, C. R. (2014) Ejercicios de hesperidina efectos similares a los antidepresivos en tratamientos agudos y crónicos en ratones: posible papel de la vía L-arginina-NO-cGMP y los niveles de BDNF. *Revista cerebral Toro.* 104 ;19–26.
- Cassani, J., Araujo, AG., Martínez-Vázquez, M., Manjarrez, N., Moreno, J., Estrada-Reyes, R. (2013) Anxiolytic-like and antinociceptive effects of 2(S)-neoponcirin in mice. *Molecules.* 28;18(7):7584-99. doi: 10.3390/molecules18077584.
- Chmurski, K., Stepniak, P., Jurczak, J. (2016) Dímeros de β -ciclodextrina ligados a cadena larga: Síntesis y relación entre reactividad y formación de complejos de inclusión. *Carbohydr Polym.* 15(138): 8-15.
- Davis, ME., Brewster, ME. (2004) Farmacéuticos a base de ciclodextrina: pasado, presente y futuro. *Nat Rev Drug Discov.* ;3(12): 1023-1035.
- Del Valle, E.M.M. (2004). Ciclodextrinas y sus usos: una revisión. *Bioquímica de procesos [en línea].* 39; (9), 1033-1046. DOI 10.1016/S0032-9592(03)00258-9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203002589>.
- Dodziuk, H. (2006) Ciclodextrinas y sus complejos. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim.*
- Donato, F., de Gomes, M. G., Va, A. T. R., Filho, C.B., Del Fabbro, L.,

- Duchêne, D. (2011) Ciclodextrinas y sus complejos de inclusión. En *Ciclodextrinas en Farmacia, Cosmética y Biomedicina: Aplicaciones Industriales Actuales y Futuras. Inc.: Hoboken, USA.* p. 15.
- Duchêne, D., Glomot, F., Vaution, C. (1987) Aplicaciones farmacéuticas de las ciclodextrinas. *Cyclodextrins and their industrial uses.* Editions de Santé, Paris. p. 213.
- Erdman JW, Jr., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, JT., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, CL., Mazza, G. (2005) Flavonoides y salud cardíaca : actas del taller de flavonoides de América del Norte de ILSI. *Washington, DC. J Nutr.* 137; (1-2) 718-737. Doi: 10.1093/jn/137.3.718S. PMID: 17311968.
- Fernández-Bertrán, J.F. (1999) Mecanoquímica: una visión general. *Química Pura y Aplicada.* 71(4), 581-586.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, LJ., Singla, K. (2001) Química y Farmacología
- Hedges, A.R. (1998). Aplicaciones industriales de ciclodextrinas. *Revisiones químicas [en línea].* 98; (5), 2035-2044. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848958>.
- Kajdas, C. (2015) Activación Mecánica de Procesos Químicos. *Ciencias de los Materiales y Aplicaciones.* 6; 60-67.
- Kumar-Achar, T., Bose, A., Mal, P. (2017) Síntesis mecanoquímica de pequeñas moléculas orgánicas”. *Revista Beilstein de química orgánica.* 13; 1907-1931.
- Larsen, KL. (2002) Fenómeno de inclusión. *Química macrocíclica.* 43: 1–13
- Liu, B., Li W., Zhao, J., Liu, Y., Zhu, X., Liang, G. (2013) Caracterización fisicoquímica de las estructuras supramoleculares de la luteolina complejo de inclusión de ciclodextrina. *Alimento químico.* 141; 900–906.
- Loftsson, T., Brewster, ME. (1996) Aplicaciones farmacéuticas de las ciclodextrinas. *Solubilización y estabilización de fármacos. J PharmSci.* 85(10): 1017-1025.
- Loftsson, T., Duchene, D. (2007) Ciclodextrinas y sus aplicaciones farmacéuticas. *Farmacia;* 329(1-2), 1-11.

- Loftsson, T., Masson, M., Brewster, ME. (2002) Autoasociación y solubilización de ciclodextrina de drogas. *J Pharm Sci.* 91(11): 2307-2316.
- Paneque-Quevedo, A. (2019). Mecanoquímica: Una visión general más allá de la Química Inorgánica. *Revista Cubana de Química*, 31(Supl. 1), 71-86. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212019000400071&lng=es&tlng=es.
- Rezende, B., Cortes, s.f., Sousa, F.B., Lula, S., Schmitt, M. (2009). La complejación con beta-ciclodextrina confiere actividad oral al flavonoide diocleína. *Internacional revista de productos farmacéuticos [en línea]*. 367;(1-2),133-9. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.046. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955122>.
- Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M. (2014) Propiedades neurofarmacológicas y farmacocinéticas de los cítricos flavonoides hesperidina y hesperetina: una mini revisión. *Ciencias de la vida*.
- Schardinger, F. (1911) Formación de polisacáridos cristalizados (dextrinas) a partir de pasta de almidón por microbios. *Departamento central de parásitos de bacteriol sanguíneo*, 2(29),188–197.
- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, UC. (2002) Aplicaciones biotecnológicas de ciclodextrinas. *Avanzado en biotecnología*. 20; 341–359.
- Smolyakov, V.K., Lapshin, O. V., Boldyrev, V.V. (2008) Síntesis mecanoquímica de productos de tamaño nanométrico en sistemas heterogéneos: cinética macroscópica. *Revista internacional de síntesis de alta temperatura de autopropagación*. 17(1), 20-29.
- Takacs, L. (2000) "Azogue a partir de cinabrio: ¿La primera reacción mecanoquímica documentada?". *Revista de la Sociedad de Minerales, Metales y Materiales*. 52(1), 12-13.
- Tan, D., Friščić, T. (2018) Mecanoquímica para químicos orgánicos: una actualización. *Revista Europea de Química Orgánica*. 1(10) 18-33.
- Torales, J., O'Higgins, M., Castaldelli-Maia, J. M., y Ventriglio, A. (2020). The outbreak of COVID-19 coronavirus and its impact on global mental health.

International Journal of Social Psychiatry, 66(4), 317-320. doi: 10.1177/0020764020915212

- Wade, A., Weller, P.J. (1994) Handbook of pharmaceutical excipients. *London: Pharm. Press & Am. Pharm. Assoc.* p. 145– 148.
- Yamamoto, M., Jokura, H., Suzuki, A. (2013) Efectos de la ingestión continua de hesperidina y glucosil hesperidina sobre la expresión de genes vasculares en ratas espontáneamente hipertensas. *J. Nutricional* 470–473.
- Zhang, J., Ma, P.X. (2013) Sistemas supramoleculares basados en ciclodextrina para la administración de fármacos: progreso reciente y perspectiva futura. *Adv. DrugDeliv.* 65: 1215–1233.