



Formulación de quercetina en liposomas para su administración tópica

David Vélez Gómez

Disertación presentada al Instituto Politécnico de Bragança y a la Universidad de Salamanca para la obtención del grado de Magister en Farmacia y Química de Productos Naturales.

Orientado por

Dra. Clara Isabel Colino Gandarillas

Dra. María del Carmen Gutiérrez Millán

Esta disertación incluye las críticas y las sugerencias hechas por el jurado

Braganza

2018

ÍNDICE GENERAL

Graphical abstract.....	1
Resumen.....	2
Abstract	3
Resumo.....	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 La piel y el envejecimiento	5
1.2 Los flavonoides como antioxidantes	7
1.3 La Quercetina	9
1.4 Retos en la administración tópica de quercetina	10
1.5 Emulsiones O/W	14
1.6 Liposomas y otras vesículas lipídicas	15
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Reactivos	22
3.2 Instrumentación.....	22
3.3 Otros materiales.....	22
3.4 PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES	22
3.4.1 Preparación de liposomas elásticos	22
3.4.2 Preparación de los chitosomas	23
3.4.3 Preparación de la emulsión.....	24
3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS/CHITOSOMAS.....	24
3.5.1 Determinación del tamaño y potencial zeta por dispersión de luz dinámica (DLS).....	25
3.5.2 Determinación del porcentaje encapsulado y del contenido de principio activo.....	25
3.5.3 Método de cuantificación de quercetina.....	26
3.5.4 Ensayo de la actividad antioxidante	26
3.5.5 Elasticidad	27
3.5.6 Estudio de estabilidad.....	27
3.5.7 Ensayo de solubilidad.....	28
3.5.8 Estudios de liberación	28
3.5.9 Análisis estadístico	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1 Diseño y caracterización de las formulaciones desarrolladas	30
4.2 Ensayo de la actividad antioxidante	35

4.3	Elasticidad	36
4.4	Estabilidad.....	37
4.5	Estudios de liberación	38
4.5.1	Estudio de solubilidad de la quercetina.....	38
4.5.2	Perfiles de liberación.....	39
5.	CONCLUSIONES	41
6.	BIBLIOGRAFÍA:	43

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Diferentes clases de flavonoides.....	8
<i>Figura 2:</i> Estructura del Flavano.....	8
<i>Figura 3:</i> Los diferentes glicósidos de la quercetina según los sustituyentes	10
<i>Figura 4:</i> Quercetina y sus principales propiedades.....	12
<i>Figura 5:</i> Grados de penetración de la quercetina en la piel según su acción terapéutica	14
<i>Figura 6:</i> Liposomas multilaminares y unilaminares.....	16
<i>Figura 7.</i> Ilustración de la preparación de los liposomas y chitosomas.....	23
<i>Figura 8.</i> Cromatogramas obtenidos con el método de HPLC utilizado.....	26
<i>Figura 9.</i> Ensayos previos para determinar la relación de fosfatidilcolina/quercetina en las formulaciones.....	31.
<i>Figura 10.</i> Capacidad de inhibición del radical DPPH*.....	35
<i>Figura 11.</i> Resultados de la cantidad de quercetina remanente tras la exposición continuada de las formulaciones a la luz durante ocho días.....	37
<i>Figura 12.</i> Solubilidad de la quercetina en diferentes medios.....	38
<i>Figura 13.</i> Perfiles de liberación de las formulaciones y una solución de quercetina (200µg/ml); tiempo (horas) vs Porcentaje liberado (%).....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Coefficientes de partición de algunos flavonoides y el resveratrol</i>	13.
Tabla 2. <i>Composición de las formulaciones preparadas</i>	24
Tabla 3 : <i>Diferentes valores de solubilidad en agua para la quercetina</i>	28
Tabla 4. <i>Diámetro promedio y potencial Zeta para las formulaciones ensayadas</i>	31.

DEDICATORIA

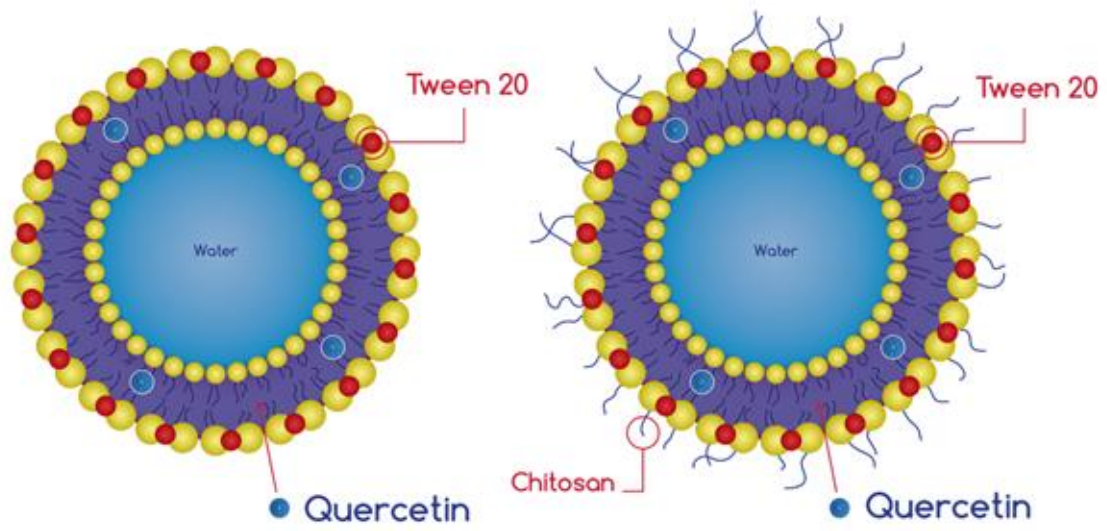
A mi madre dedico todo lo que soy y sé. Su apoyo incondicional, sin ataduras y con el mayor desprendimiento me permitieron emprender este camino y este monumental proceso de mi vida. Solo existe la posibilidad de seguir caminando cuando hay amor. Gracias por tanto.

A Clavel, mi tutora y asesora en este trabajo. Su paciencia, comprensión, conocimiento y disposición permitieron empaparme de un tema sustancioso, enriquecedor e interesante. Todo su tiempo dedicado a mi es lo que más voy a recordar, porque el tiempo es vida. gracias por eso, muchas gracias.

Este trabajo y el tiempo trascendido en este lejano continente son el resultado de la mayor experiencia de mi vida, la mayor resistencia y el mayor aprendizaje sobre mí mismo.

Graphical abstract

COMPARACIÓN Y VIABILIDAD



Resumen

La quercetina es un flavonoide con interesantes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, útil para la prevención y tratamiento de diversas afecciones cutáneas. Sin embargo, su baja solubilidad e inestabilidad dificultan su formulación. Por ello, el objetivo de este trabajo fue desarrollar, caracterizar y comparar nanoformulaciones y una formulación convencional de quercetina para su administración en la piel. Se elaboraron liposomas (F1, F2) y chitosomas (F3, F4) con fosfatidilcolina y diferentes concentraciones de tensioactivo (Tween 20). Para la preparación de las nanoformulaciones se utilizó el método de hidratación, se homogenizaron mediante sonicación y extrusión (100 nm) y se purificaron mediante diálisis. La quercetina encapsulada se cuantificó mediante HPLC y se caracterizaron tamaño de partícula y potencial zeta por dispersión de luz dinámica. Se realizaron estudios in vitro de liberación en medio fisiológico, estabilidad frente a la luz, elasticidad y acción antioxidante. El tamaño de las vesículas obtenidas con menor y mayor proporción de Tween 20 fue respectivamente de 184 nm, 120 nm para los liposomas y 342,7 nm y 213,5 nm para los chitosomas. El potencial Zeta fue negativo para los liposomas y positivo para los chitosomas. El porcentaje de encapsulación fue significativamente mayor para los chitosomas y no se vio afectado por la proporción de Tween. La quercetina encapsulada en las vesículas mantuvo su actividad antioxidante que fue superior para los chitosomas debido a la acción sinérgica del chitosán. Los perfiles de liberación mostraron la liberación controlada de la quercetina en relación con la solución.

Se han desarrollado formulaciones con las características adecuadas para la administración de quercetina por vía dérmica, si bien la realización de estudios in vitro con piel permitirá confirmar su capacidad de incrementar la penetración de quercetina a través del estrato corneo.

Abstract

Quercetin is a flavonoid with interesting antioxidant and anti-inflammatory properties, useful for the prevention and treatment of various skin conditions. However, its low solubility and instability difficult its formulation. Therefore, the objective of this work was to develop, characterize and compare nanoformulations and a conventional formulation of quercetin for dermal administration. Liposomes (F1, F2) and chitosomes (F3, F4) were studied with different concentrations of surfactant (Tween 20), using the hydration method for its preparation, sonication and extrusion (100 nm) for its homogenization and dialysis for its purification. The encapsulated quercetin was quantified by HPLC and particle size and zeta potential were characterized by dynamic light scattering. In vitro release studies, light stability, elasticity and antioxidant action were made. Vesicle sizes for lower and higher proportions of Tween were 184 nm and 120 nm for liposomes and 342.7 nm and 213.5 nm for chitosomes respectively. The zeta potential was negative for liposomes and turned positive for chitosomes. The percentage of encapsulation was significantly higher for the chitosomes and was not affected by the proportion of Tween. Quercetin encapsulated in the vesicles maintained its antioxidant activity, which was superior for chitosomes due to the synergistic action of chitosan. The release profiles showed the controlled release of quercetin in comparison with a quercetin solution. Formulations with adequate characteristics for the administration of quercetin by dermal route have been developed, although in vitro studies with skin will confirm its ability to increase the penetration of quercetin through the stratum corneum.

Resumo

A quercetina é um flavonóide com interessantes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, útil para a prevenção e tratamento de várias condições da pele. Entretanto, sua baixa solubilidade e instabilidade dificultam a sua formulação. É por isto que, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e comparar nano-formulações e uma formulação convencional de quercetina para sua administração à pele. Os Lipossomas (F1, F2) e quitossomas (F3, F4) foram preparados com fosfatidilcolina e diferentes concentrações de surfactante (Tween 20). Para a preparação das nanoformulações foi utilizado o método de hidratação, homogeneizado por um processo de sonicação e extrusão (100 nm) e purificado por diálise. A quercetina encapsulada foi quantificada por HPLC e o tamanho das partículas e o potencial zeta foram caracterizados por espalhamento dinâmico de luz. Foram realizados estudos *in vitro* de liberação em meio fisiológico, estabilidade contra luz, elasticidade e atividade antioxidante. O tamanho das vesículas obtidas com a menor e maior proporção de Tween 20 foi respectivamente 184 nm, 120 nm para lipossomas e 342,7 nm e 213,5 nm para quitossomas. A medição do potencial Zeta deu valores negativos para os lipossomas e positivos para os quitossomas. A porcentagem de encapsulação foi significativamente maior nos quitossomas e não foi afetada pela proporção de Tween no caso dos lipossomas. A quercetina encapsulada nas vesículas manteve sua atividade antioxidante, com valores superiores para os quitossomas devido à ação sinérgica da quitosana. Os perfis da liberação mostraram que existe uma liberação controlada de quercetina em relação à solução.

Todas as formulações foram desenvolvidas com as características ótimas para a administração de quercetina por via dérmica, embora a realização de estudos *in vitro* com pele confirme sua capacidade de aumentar a penetração de quercetina através do estrato córneo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La piel y el envejecimiento

La piel está formada por dos partes: la epidermis y la dermis. La dermis es la responsable de mantener la resistencia estructural de los tejidos y lo hace a partir de la producción de colágeno, su principal compuesto, aunque también intervienen en menor proporción la elastina y fibras reticulares. La epidermis, por el contrario, es el estrato superior, no es tan espesa como la dermis y no tiene vasos sanguíneos, siendo alimentada por difusión a partir de los vasos provenientes de la dermis (Seeley et al., 2003). En la parte más superficial se encuentra el estrato córneo, constituido por células epidérmicas muertas aplanadas, también llamadas corneocitos, incrustadas en una matriz rica en lípidos. La humedad de este estrato dependerá de varios factores como: su estructura y composición, la humedad externa, las funciones de barrera que ejercen los compuestos lipofílicos y la biosíntesis de sustancias endógenas de la piel (Hara y Verkman, 2003). La piel está en constante renovación por medio de un proceso que lleva el nombre de queratinización, el cual consiste en la renovación y reposición de la matriz extracelular a partir de nuevas células formadas en la capa basal. De esta manera se mantienen estables las funciones de barrera, impermeabilización y resistencia del estrato córneo (Seeley et al., 2003).

Este órgano, el más extenso del cuerpo humano, cumple una serie de funciones de vital importancia para asegurar la homeostasis del organismo. Es la barrera que aísla a los tejidos internos del medio exterior, protegiéndolos de agentes exógenos contaminantes u oxidantes (Hatahet et al., 2016a). Previene la pérdida de fluidos percutáneos, electrolitos y proteínas, mantiene el control de la temperatura promoviendo el flujo sanguíneo y por la actividad de las glándulas sudoríparas, tiene funciones de percepción sensorial y de alerta al sistema inmune y, ante todo, protege contra la abrasión y la luz ultravioleta (UV) (Diembeck et al., 1999). Sin embargo, en caso de un stress oxidativo extremo, superior a los mecanismos de defensa, puede ocurrir un daño de la piel y comprometerse órganos internos y el metabolismo.

La teoría de los radicales libres del envejecimiento, formulada en 1956 por Denham Harman, ha sido fundamental para entender y estudiar el proceso de envejecimiento. Esta sugiere que el daño acumulado por los radicales libres sobrepasa la capacidad de

autoreparación de la célula, causando su muerte y finalmente la del organismo (Velarde et al., 2016).

El envejecimiento puede evidenciarse en el deterioro de la piel. Una piel envejecida es susceptible de sequedad, picor, escozor, infecciones y desórdenes autoinmunes (Diembeck et al., 1999) ya que su función de barrera está alterada, ha perdido elasticidad, se ha reducido la vasculatura de la dermis y el colágeno que se produce es atrófico (Hatahet et al., 2016a). Los responsables del proceso de envejecimiento son diversos factores, tanto extrínsecos como intrínsecos, desde cambios fisiológicos que devienen con la edad, la exposición a la radiación solar (fotoenvejecimiento) y la polución hasta el estilo de vida del individuo. Incluso, el tabaquismo es uno de aquellos factores que más condicionan la salud de la piel, disminuyendo la cantidad de nutrientes y oxígeno a los tejidos cutáneos, volviendo la piel más dura y menos elástica (Leow, Maibach, 1998).

Mientras los factores intrínsecos son inevitables, los factores extrínsecos, en diferentes grados, pueden ser controlados (Hara et al., 2003). Retardar el envejecimiento y la aparición de arrugas es uno de los objetivos de la investigación y desarrollo de cosmecéuticos. Para esto se busca la implementación a nivel tópico de agentes antioxidantes y antiinflamatorios que cuiden la piel de esos desencadenantes exógenos (Hatahet et al., 2016a).

Para poder hacer frente al estrés oxidativo, tanto del metabolismo endógeno como de factores extrínsecos, la piel cuenta con mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos para protegerse (Diembeck et al., 1999). Algunas de las enzimas endógenas que previenen los radicales libres son; la superóxido dismutasa (SOD), catalasas y glutatión peroxidasa y, entre los antioxidantes endógenos no enzimáticos la coenzima Q10.

El fotoenvejecimiento, causado por la exposición frecuente a la radiación ultravioleta, es quizás el aspecto más relevante, ya que consiste en un factor exógeno sobre el que, en menor o mayor medida, se puede influir para retardar o mitigar el proceso de envejecimiento, al igual que prevenir patologías asociadas. La exposición repetitiva a la radiación ultravioleta favorece la formación de colágeno severamente dañado y en última instancia la aparición de arrugas en una piel con reducida elasticidad (Casagrande et al., 2007).

Son tres los tipos de radiación ultravioleta: UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) y UVA (320-400 nm). Las radiaciones UVB logran penetrar la epidermis y están asociadas

con problemas de quemaduras o eritemas de piel. Las radiaciones UVC tienen poco impacto debido a que son bloqueadas por la capa de ozono, pero los rayos UVA, son muy problemáticas, porque logran penetrar hasta la dermis y son responsables de los daños crónicos asociados al fotoenvejecimiento (Diembeck et al., 1999), principalmente porque favorecen la disminución de la producción de colágeno en la dermis y la formación de colágeno imperfecto (Shindo et al., 1994).

1.2 Los flavonoides como antioxidantes

Para prevenir o tratar el envejecimiento cutáneo se utilizan agentes antioxidantes. Para que una molécula pueda actuar como antioxidante debe pasar a las capas vivas, es decir atravesar el estrato córneo. Entre los antioxidantes más prometedores están la coenzima Q10, la vitamina C, los polifenoles y la vitamina E (Hatahet et al., 2016a). En la piel, la coenzima Q10 actúa como antioxidante, presentándose diez veces en mayor cantidad en la epidermis que en la dermis. Se ha demostrado que esta molécula actúa protegiendo a los queratinocitos y fibroblastos (Diembeck et al., 1999). El ácido ascórbico es un potente antioxidante, actúa como coenzima de las enzimas hidroxilasa y oxigenasa, implicadas en la biosíntesis de procolágeno, carnitina y los neurotransmisores (Chen et al., 2015). La carencia de esta vitamina origina alteraciones en la cicatrización de heridas, hemorragias cutáneas e incluso lleva asociada una enfermedad a su déficit: el escorbuto. La vitamina E también es un buen antioxidante que protege a los lípidos y otros componentes de las células del daño oxidativo, interviniendo en el mantenimiento de la estructura de las membranas celulares (Carbajal, 2018).

Entre los compuestos naturales, los polifenoles presentan gran actividad antioxidante, principalmente el grupo de los flavonoides. Estos compuestos forman parte de los metabolitos secundarios de las plantas, de los cuales existen seis clases: flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas, antocianidinas e isoflavonas, cuya estructura se ilustra en la Figura 1 (Hollman, 2004).

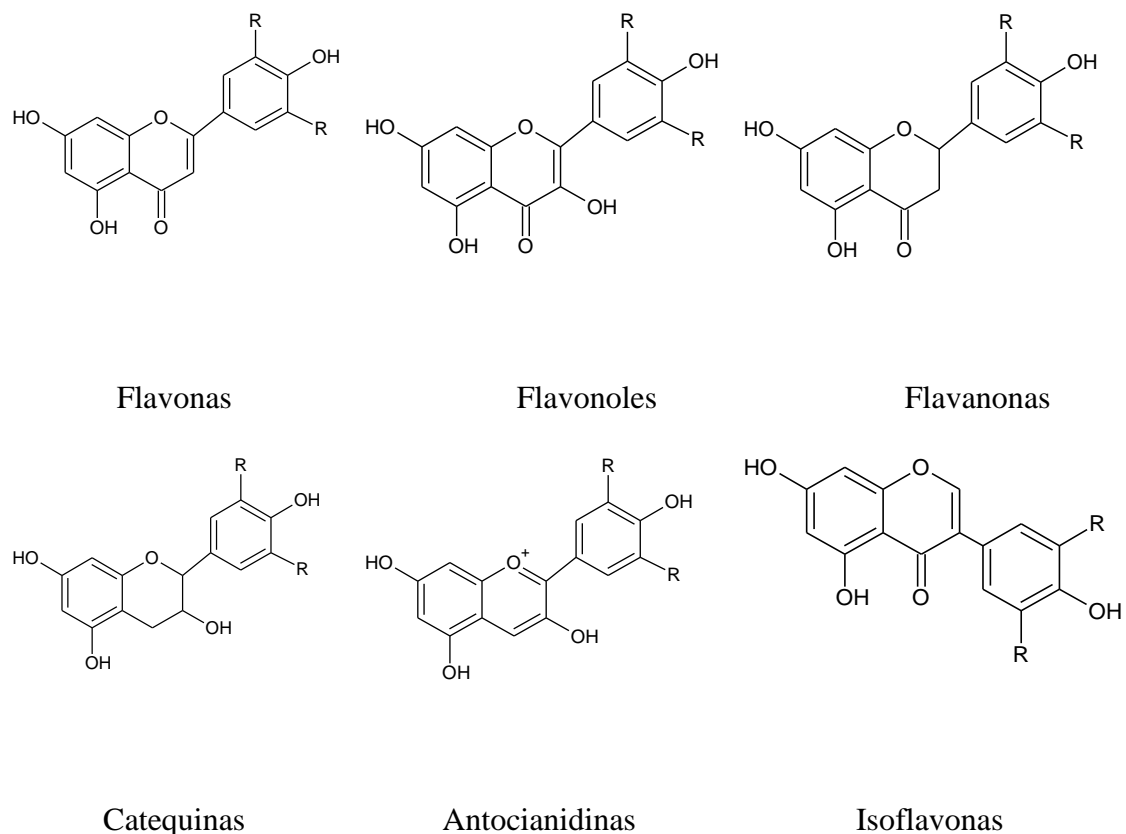


Figura 1: Diferentes clases de flavonoides (Hollman, 2004)

Los flavonoides constituyen una clase muy abundante de metabolitos secundarios presentes en prácticamente la totalidad de las plantas superiores y de los helechos. Son responsables de la mayoría de la pigmentación azul, amarilla y roja que se observa en las flores. Su sistema estructural se basa en un heterociclo denominado flavano, como se recoge en la Figura 2 (2-fenilbenzopirano o también 2-fenilcromano) en diferentes niveles de oxidación, lo que permite obtener estructuras diversas (Marco, 2006). Estos sistemas heterocíclicos están siempre sustituidos por una cantidad variable de grupos hidroxilo, algunos de los cuales pueden estar metilados, prenilados y glicosados. Lo más común es encontrar hidroxilos en las posiciones 5, 7 y 4' (Marco, 2006).

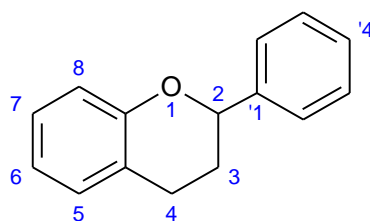


Figura 2: Estructura del Flavano (Marco, 2006)

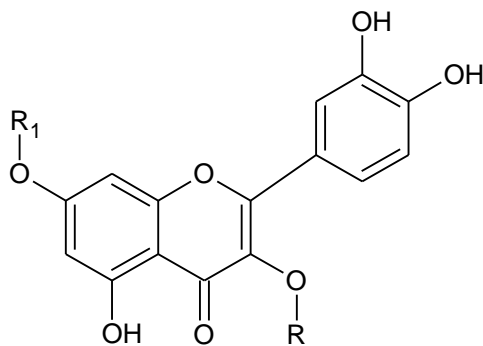
A excepción de las catequinas, los flavonoides suelen encontrarse en la naturaleza formando glicósidos con la rhamnosa, glucosa y arabinosa. Las estructuras agliconas de flavonoides son demasiado hidrófilas, por lo que su absorción es muy limitada. Mientras que los glucósidos y las agliconas pueden ser absorbidos en el intestino delgado por el íleon y rápidamente metilados, glucuronizados o sulfatados por el hígado, el resto de los flavonoides deben llegar hasta el colon, para que las bacterias probióticas se encarguen de su metabolismo y de su absorción. La capacidad de metabolizar y absorber ciertos flavonoides dependerá de la flora microbiótica de cada persona, aunque se han descubierto otros mecanismos de transporte especiales que llevan a los flavonoides desde el intestino a la sangre (Yuan et al., 2007).

Los efectos biológicos de los flavonoides en el hombre son particularmente beneficiosos, actuando tanto como antioxidantes como protectores contra las enfermedades cardiovasculares, ciertas formas de cáncer y contra la degeneración de los componentes celulares asociados con la edad (Dewick, 2009). Logran absorber la radiación ultravioleta evitando que se inicie la formación de especies reactivas de oxígeno dentro de las células (Diembeck et al., 1999) y tienen la capacidad de reducir el daño oxidativo causado por longitudes de onda solares cortas y el riesgo de generación de radicales de oxígeno debido a la radiación UVB (Roberto et al., 2014).

1.3 La Quercetina

La quercetina es el flavonol más común. Se encuentra en diversos alimentos: manzanas, bayas, diversas variedades de col, semillas, frutos secos, flores, cortezas y hojas, uvas negras, frambuesas, té verde, ajo y principalmente en las cebollas. Muchas propiedades de las plantas medicinales se han atribuido a una alta concentración de quercetina presente (Hollman, 2004). Esta molécula pertenece al grupo de los flavonoles (Figura 3) y se ha convertido en un compuesto de gran interés científico en la actualidad debido a sus múltiples propiedades terapéuticas (Rothwell et al., 2005). Destaca su capacidad preventiva contra factores de envejecimiento contra la radiación ultravioleta y contra la deshidratación de la piel al inhibir la peroxidación lipídica. Su valor radica principalmente es ser un gran antioxidante y antiinflamatorio, demostrándose *in vitro* e *in vivo*, que es una molécula protectora, tanto de los queratinocitos como de los fibroblastos (Hatahet et al., 2016a).

En un estudio realizado mediante inflamación inducida con radiación UV en ratones sin pelo, se encontró que la quercetina disminuía significativamente el aumento de la enzima mieloperoxidasa, que es un marcador de la presencia de neutrófilos y, por ende, de inflamación. La quercetina logra inhibir la actividad de las enzimas proteolíticas en los queratinocitos y fibroblastos epidérmicos, las cuales están estrechamente relacionadas con el envejecimiento (Casagrande et al., 2006). Todos estos estudios avalan a este flavonoide como una molécula prometedora como factor exógeno de protección para la piel.



- ✓ R=glucosa-rhamnosa, R₁=H: quercetina-3-rhamnoglucosido.
- 2.
- ✓ R=glucosa, R₁=H: Quercetina-3-glucosido.
- ✓ R=SO₄⁻, R₁=H: Quercetina-3-sulfato.
- ✓ R₁=H, R=H: Quercetina.
- ✓ R=H, R₁=SO₄⁻: Quercetina 7-sulfato.

Figura 3: Los diferentes derivados de la quercetina según los sustituyentes (Hatahet et al., 2016a)

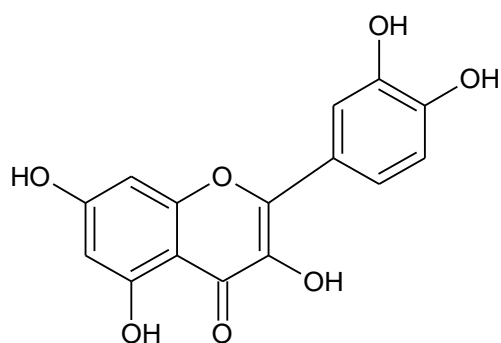
1.4 Retos en la administración tópica de quercetina

La piel es una barrera compleja y muy resistente a la penetración de principios activos siendo el estrato córneo el paso limitante en el transporte de sustancias a través de la piel y, por lo tanto, el principal reto en la administración tópica. El lugar de acceso de un principio activo depende fundamentalmente de la lipofilia y la hidrofilia que rigen las interacciones de membrana. La lipofilia puede expresarse como un coeficiente de partición: un parámetro que relaciona la forma en que un soluto se divide entre las fases polares y no polares (Rothwell et al., 2005).

Para una adecuada penetración a través de la piel tras la administración tópica, los fármacos o productos activos deben tener un peso molecular bajo (< 500 Da), con cierta solubilidad en aceite y en agua presentando un coeficiente de reparto intermedio entre 1 y 4 (Henriques, Rijo, Molpeceres y Pinto, 2017). Solo las moléculas con una adecuada lipofilia pueden difundirse a través de la membrana de fosfolípidos.

Como se ha mencionado anteriormente, la administración tópica de antioxidantes, naturales o sintéticos representa una estrategia exitosa para prevenir o reducir la gravedad de los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (Saija et al. 2003) y se ha presentado a los flavonoides, en particular la quercetina, como un gran candidato para retrasar la lesión oxidante y la muerte celular mediante la captación de radicales libres. Sus resultados probados para secuestrar radicales del tipo $O_2^{\cdot-}$, oxígeno singlete (O_2) y radicales OH, inhibir las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa y demás propiedades, la convierten en una potente molécula antioxidante y antiinflamatoria (Saija et al., 2003).

En el caso de la quercetina, su peso molecular es de $302,2$ g/mol y su coeficiente de reparto es de $1,82$ (Tabla 1). Este coeficiente indica que la quercetina tiene cierto carácter lipofílico, pero no es un valor suficiente para garantizar la penetración en los estratos cutáneos ya que también tiene cierto carácter hidrofílico dado por los grupos hidroxilo presentes (Hatahet et al., 2016a). La solubilidad es el factor principal que limita su incorporación en distintos vehículos y su liberación y penetración en la piel. Su solubilidad mejora si se emplean solventes orgánicos, por ejemplo, en etanol puede solubilizarse hasta 2 mg/ml (Hatahet et al., 2016a). En relación a la solubilidad de quercetina en agua y distintos medios, hay disparidad en los resultados que aparecen en la bibliografía, como se observa en la Tabla 3, en la que se recogen valores publicados por distintos autores para la solubilidad de la quercetina en agua.



Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Peso molecular	302.2 g/mol
Solubilidad en agua MiliQ	0.48±0,1 ug/ml
Solubilidad en Etanol	2 mg/ml
Coefficiente de partición Log P	1.82 ±0.3
Nombre IUPAC	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one

Figura 4: Quercetina y sus principales propiedades (Hatahet et al., 2016a).

En relación con el resveratrol, un estilbeno con propiedades similares, (Caddeo et al., 2016), la quercetina presenta una solubilidad en agua mayor pero un coeficiente de reparto menor. Otros flavonoides presentan coeficientes de reparto más altos (Tabla 1)

Las formulaciones tópicas no deben alcanzar la circulación sistémica. Sin embargo, en función de la actividad deseada se requerirá un nivel de penetración (Figura 5). Así, basta con que permanezca en la superficie de la epidermis para actuar como pantalla solar, pero deberá penetrar hasta el estrato espinoso y el estrato basal para poder actuar como protector sobre los queratinocitos, y si se pretende que ejerza una acción antiinflamatoria o sobre una quemadura o herida deberá alcanzar capas más profundas para actuar sobre los fibroblastos (Hatahet et al., 2016a).

Tabla 1: *Coefficientes de partición de algunos flavonoides y el resveratrol (Robinson et al., 2015)*

FLAVONOIDE	Log P
Kaempferol	3.11 ±0.54
Genisteina	3.04±0.02
Apigenina	2.92±0.06
Quercetina	1.82±0.32
Quercetina-3-glucosido	0.76±0.01
Quercetina-7-sulfato	0.74±0.02
Quercetina-3-rhamnoglucosido	-0.64±0.05
Quercetina-3-sulfato	-1.11±0.01
Naringenina	2.60±0.03
Resveratrol	3,1

El desarrollo de una formulación adecuada para la administración tópica requiere tener en cuenta el lugar de acción y las características de la molécula a emplear. Hay que considerar las condiciones del medio a ser liberado, la solubilidad del compuesto activo, los coeficientes de partición y el tiempo de liberación deseado (Hatahet 2016).

El desarrollo de formulaciones no convencionales se ha propuesto para poder resolver los problemas de solubilidad, incorporación y liberación de algunas moléculas. Para mejorar la eficacia de la quercetina se requiere utilizar diversos enfoques nanotecnológicos que mejoren su solubilidad, la velocidad de disolución y, por lo tanto, su biodisponibilidad. Entre estos recursos se incluyen dispersiones sólidas, nanosuspensiones, microemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas y profármacos. Existe una necesidad crítica de desarrollar estrategias alternativas para superar las deficiencias de la quercetina y mejorar su biodisponibilidad (Caddeo et al., 2015).

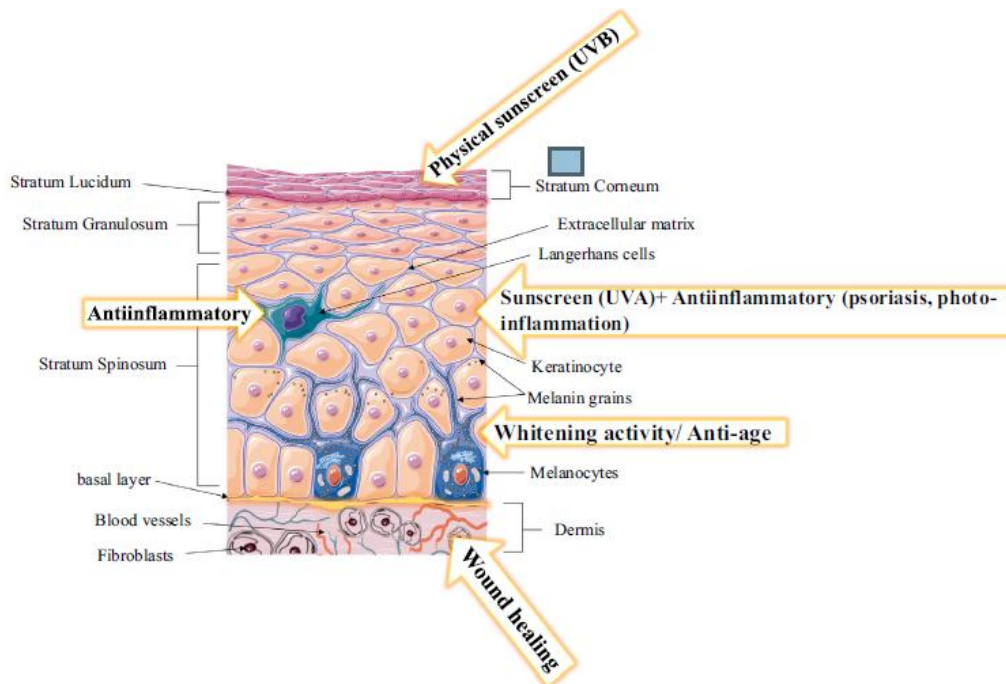


Figura 5: Grados de penetración de la queretina en la piel según su acción terapéutica (Hatahet et al., 2016a)

1.5 Emulsiones O/W

Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable entre dos líquidos inmiscibles, en la que uno de ellos forma pequeñas gotas dispersas en el otro. Debe existir un tercer elemento, un emulsionante, de naturaleza anfifílica que facilita la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial entre las fases, aportando estabilidad durante un tiempo (Muñoz et al., 2007). En el caso de las emulsiones O/W la fase dispersa está compuesta por sustancias apolares y la fase continua es el agua y sustancias de naturaleza polar.

Cuando las gotas formadas son extremadamente pequeñas, con un tamaño en el rango de 20-200 nm, se habla de nanoemulsiones. Estas pueden llegar a ser mucho más estables y a garantizar niveles más profundos de penetración de fármacos, aunque ambos sistemas, son superponibles en términos de toxicidad (Musazzi et al., 2018).

Musazzi et al., (2018) sostienen que las nanoemulsiones O/W pueden mejorar los perfiles de permeación de moléculas en función de sus propiedades fisicoquímicas, en particular de moléculas activas apolares si se compara con las emulsiones convencionales. Sin embargo, no existe evidencia para garantizar lo mismo con las moléculas polares. Como

la elaboración de emulsiones es sencilla y económica, es siempre una opción a considerar para la formulación de moléculas que son apolares. La quercetina, como se ha mostrado, tiene un coeficiente de partición intermedio y una solubilidad que la descarta como una sustancia polar. Por esta razón, la incorporación en una emulsión convencional es una alternativa, si bien es importante la selección de los componentes para conseguir una elevada capacidad de incorporación y adecuado perfil de liberación.

El uso de una emulsión rica en ácidos grasos de cadena media, como los que provienen de la leche de cabra y el aceite de coco pueden ser una alternativa para lograr esas características.

Los ácidos grasos son moléculas anfipáticas, que en solución acuosa forman micelas y pueden incorporarse fácilmente en las membranas lipídicas, aumentando la tensión en las bicapas (Aurori y Mouritsen, 2013; Høyryp et al., 2001). Los ácidos grasos desestabilizan la membrana lipídica y aumentan su permeabilidad (Jespersen et al., 2012) Esta alteración de la membrana depende de la concentración, la longitud de la cadena y el grado de insaturación (Aurori et al., 2016).

Aurori et al., (2016) demostraron que ácidos grasos como el cáprico (C10), caprílico (C8) y láurico (C12), logran perturbar un modelo de membrana, aunque estos resultados no fueran totalmente transferibles a las membranas biológicas dada la complejidad y la inestabilidad de estas en comparación con un modelo *in vitro*. Tomando este hecho, el uso de estos ácidos grasos en una emulsión convencional puede favorecer la penetración de la quercetina.

1.6 Liposomas y otras vesículas lipídicas

Las nanopartículas presentan un gran interés en la administración tópica de agentes terapéuticos. Dos ventajas importantes que presentan son: conseguir un control de su liberación y aumentar la penetración de los principios activos a través de la piel en comparación con otros vehículos. Varios estudios han demostrado que las partículas nanométricas tienden a residir en las capas externas del estrato córneo y en la epidermis, con una penetración insignificante en la dermis (Qi et al. 2011), lo que garantizaría que no llegan a la circulación sistémica y que su acción quedaría restringida a la piel.

Entre estos sistemas nanoparticulares destacan los liposomas, vesículas constituidas por una o varias bicapas de fosfolípidos que engloban uno o varios compartimentos acuosos (liposomas unilaminares o multilaminares, respectivamente). Se forman espontáneamente cuando se dispersan fosfolípidos en un medio acuoso y fueron sintetizados por primera vez por Bangham et al. en 1965 (Garg et al., 2017). Los liposomas unilaminares se denominan de acuerdo con su tamaño; vesículas pequeñas (SUV) para vesículas desde 40 hasta 100 nm, grandes (LUV) cuando alcanzan hasta 500 nm o gigantes (GUV) con un tamaño mayor a 1 μm . En el caso de los liposomas multilaminares suelen presentar tamaños mayores a 500 nm (MLV), aunque también pueden estar en el rango de 100 nm hasta 1 μm , denominándose en este caso vesículas oligomelares (OLV). Se puede ver en la Figura 6 diferentes tamaños de liposomas.

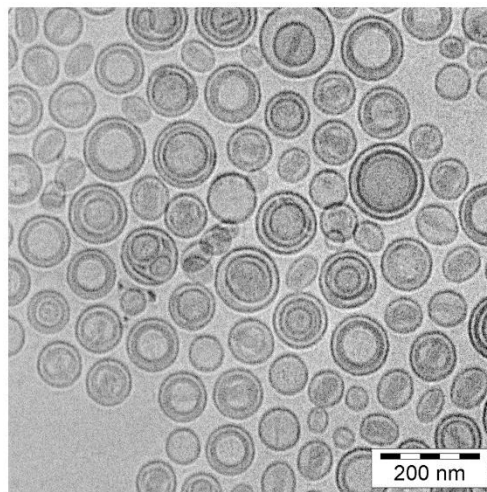


Figura 6: Liposomas multilaminares y unilaminares (Gubernator, 2014)

Presentan la ventaja de ser biocompatibles, versátiles y fáciles de preparar. Además, pueden incorporar moléculas de naturaleza lipofílica, hidrofílica o anfifílica. Entre sus desventajas destaca su inestabilidad en suspensión (Clares, 2003).

Sus propiedades dependen de su composición, carga superficial, tamaño y método de preparación. El componente fundamental de los liposomas es la fosfatidilcolina de huevo o de soja, acompañada en muchos casos por colesterol, que confiere una mayor estabilidad a las vesículas.

Los liposomas se pueden preparar por distintos métodos como el de hidratación, inyección de etanol o el de evaporación de fase reversa (Henriques et al., 2017). En el método de hidratación, muy utilizado, se evapora primero el solvente orgánico utilizado

para solubilizar los lípidos a vacío en un rotavapor. En una segunda etapa se hidrata la película lipídica formada, con una solución tampón, siempre por encima de la temperatura de transición del lípido con agitación. Los liposomas obtenidos son multilaminares, no homogéneos y de gran tamaño. En el método de inyección de etanol, la fase lipídica disuelta en este solvente se inyecta en una solución acuosa a 50 °C con agitación. Después el solvente se evapora en condiciones de vacío (Charcosset et al., 2015). En el método de evaporación de fase reversa, se disuelve la fase lipídica en un solvente orgánico, se emulsiona con la fase acuosa y después se elimina el solvente en condiciones de vacío (Henriques et al., 2017).

Los liposomas de fosfatidilcolina presentan carga eléctrica negativa, si bien se pueden incluir en su composición lípidos que les confieran carga positiva como la estearilamina, que se sabe ayuda en la penetración de la piel, debido a la carga negativa de las membranas celulares (Zhanga, 2016). Cuando los lípidos empleados en la formación de los liposomas multilaminares tienen carga, la distancia entre las bicapas aumenta y es mayor la cantidad de sustancia hidrosoluble encapsulada, debido al incremento en el volumen acuoso. Desde el punto de vista termodinámico, los liposomas son sistemas inestables y tienden de forma natural a agregarse o fusionarse. La estabilidad depende de la existencia de un mecanismo de repulsión electrostático o impedimentos estéricos, por lo que es mayor para liposomas cargados (Ruano, 2013).

También pueden modificarse con otros compuestos que les confieran carga superficial positiva. Así se han desarrollado los chitosomas, por interacción del chitosán con la fosfatidilcolina. El chitosán es un polímero catiónico derivado de la quitina compuesto principalmente de unidades de glucosamina: es un derivado N-desacetilado de la quitina. Este polímero tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, así como muchas otras propiedades biofarmacéuticas atractivas, que incluyen biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioadhesión, potenciación de la penetración y actividad antimicrobiana. Debido a su fuerte carga positiva se une fuertemente a la piel de los mamíferos, la cual presenta una ligera carga negativa, favoreciendo la captación de fármacos a través de la piel. Una ventaja que presentan este tipo de vesículas es su estabilidad debido a la repulsión electrostática.

Los liposomas se han estudiado ampliamente y se ha demostrado que poseen un alto potencial en la administración tópica. Se adhieren a la piel, donde desestabilizan, se fusionan o mezclan con la matriz lipídica. Pueden actuar también modificando la

estructura del estrato córneo, promoviendo la penetración de los principios activos (Prasanthi and Lakshmi, 2012). Se ha visto que las características de los liposomas condicionan su disposición en la piel, pero esto también está condicionado con la integridad de la barrera cutánea. De hecho, no es igual la difusión a través del estrato córneo de una piel saludable a la difusión en un estrato córneo roto, característico de pieles con trastornos cutáneos (Caddeo et al., 2016). Aunque se ha descrito que los liposomas mejoran la penetración de los fármacos o principios activos en la piel (epidermis y dermis) (Nounou et al., 2008). Para lograr superar las limitaciones que tienen los liposomas convencionales para difundirse a través de la piel, se han desarrollado nuevos tipos de vesículas más flexibles que garanticen una mejor penetración del estrato córneo y una mayor estabilidad, como los transfersomas y etosomas (Ascencio et al., 2015).

La principal diferencia entre liposomas convencionales y deformables (elásticos) es la alta adaptabilidad de éstos últimos, dependiente de la presión, lo que les permite deslizarse entre las células aun cuando se trate de vesículas de gran tamaño.

Los transfersomas son liposomas elásticas o flexibles (vesículas ultradeformables, UDV) que se obtienen al modificar la estructura liposomal por medio de tensoactivos o sales biliares (Cevc, et al. 1994). Los componentes de los transfersomas son: etanol (hasta 10%), lípidos (5-10% fosfatidilcolina) y surfactantes (10-25%) (Choi and Maibach, 2005). Los tensoactivos son moléculas con alto radio de curvatura que desestabilizan la bicapa de las vesículas aumentando su deformabilidad facilitando la penetración del estrato córneo, ya que pueden comprimirse hasta diez veces su diámetro (Gupta et al., 2012). En su preparación se han utilizado colato sódico, deoxicolato sódico, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80, ácido oleico y glicirricinato potásico (Duangjit et al., 2011). Estos surfactantes generalmente se incorporan dentro de las membranas vesiculares (Ascenso et al., 2015; Choi et al., 2015; Choi and Maibach, 2005)

Los transfersomas fueron elaborados por primera vez por Cevc et al. en 1992 y son capaces de penetrar en la piel intacta (Henriques et al., 2017). Pueden prepararse por el método de hidratación y permiten obtener elevados porcentajes de encapsulación (Choi and Maibach, 2005)

Cuando son aplicados, los transfersomas pueden deshidratarse en la superficie de la piel por evaporación y aumentar la hidratación de esta (Cevc et al. 2002). Se origina una

presión osmótica entre las regiones altamente hidratadas de la piel y la superficie deshidratada de los transforsomas, permitiéndose la entrada de estos a través del estrato corneo hacia la piel más profunda (Cevc et al., 2002).

Otro tipo de vesículas deformables son los etosomas, que incluyen en su composición fosfolípidos (20-45%), agua y altas concentraciones de etanol (entre 20-45%) (Ainbinder et al., 2010). El etanol es un buen promotor de la absorción y en combinación con los fosfolípidos parece afectar a la región intercelular del estrato córneo. Además, sus propiedades de deformabilidad contribuyen también a su buena penetración en la piel (Henriques, 2017). Se ha sugerido que existe un efecto sinérgico entre el etanol, las vesículas formadas y los lípidos de la piel. Este tipo de sistema fue descubierto por Touitou in 1996 y tiene capacidad para la administración dérmica y transdérmica de principios activos. El tamaño de los etosomas es mayor cuando aumenta la proporción de lípidos utilizada y es inversamente proporcional a la cantidad de etanol (Ainbinder et al., 2010). Aunque el efecto irritante del etanol cuando está incluido en las vesículas es inferior al que produciría en solución, altas concentraciones de etanol pueden producir dermatitis por contacto (Akhtar y Pathak, 2012).

Los etosomas se pueden preparar mediante el método de hidratación o bien mediante la adición a velocidad controlada de fase acuosa sobre la solución alcohólica que contiene los fosfolípidos entre otros métodos (Henriques, 2017).

La caracterización de estas vesículas lipídicas tiene como fin determinar el tamaño, el tipo de estructura, su composición, homogeneidad, estabilidad, volumen y rendimiento final de encapsulación. Los métodos empleados para caracterizarlos son múltiples, entre ellos está la microscopía electrónica de transmisión, espectroscopía de dispersión laser para conocer la forma y el tamaño, técnicas de fluorescencia para determinar la localización de los componentes en la estructura del liposoma, microscopía de fuerzas para obtener datos sobre la morfología, entre otras (Clares, 2003). La elasticidad de los transforsomas y etosomas es otro parámetro importante que condiciona su comportamiento.

Se han preparado liposomas elásticos con resveratrol y quercetina con ácido oleico para mejorar la fluidez de las bicapas y conseguir la formación de vesículas pequeñas y dispersas. La relación de fosfolípidos/polifenoles es directamente proporcional a la capacidad de encapsulación de quercetina y resveratrol. Por lo tanto, el uso de menores

proporciones de fosfolípidos/polifenoles origina vesículas más grandes, con menor capacidad de carga y un precipitado de las moléculas no encapsuladas. Tanto para la quercetina como para el resveratrol, los liposomas obtenidos fueron pequeños (50-100 nm) con una capacidad de carga aproximada del 70% (Caddeo et al., 2015). En otro estudio se consiguieron porcentajes de encapsulación de más del 90% para estos dos flavonoides en liposomas con deoxicolato sódico de tamaño aproximado de 149 nm (Cadena et al. 2012).

Se ha evaluado también el efecto de los tensioactivos en las características de liposomas elásticos formulados con fosfatidilcolina y colesterol, encontrándose que el polisorbato 80 permite obtener el mejor valor de encapsulación entre los tensioactivos ensayados (Liu et al., 2013). Estos liposomas fueron preparados con el método de inyección de etanol. En este estudio se encontró que el uso de polisorbato 80 en la composición liposomal favorece en los tres sentidos evaluados: se obtiene el mayor valor de encapsulación de quercetina, el menor tamaño de liposomas y un valor de elasticidad, que sin ser el más alto, es diez veces mayor que en los liposomas con ausencia de tensioactivos.

Qi et al., (2011) demostraron que la incorporación de quercetina a nanopartículas de quitosano-lecitina para administración tópica daban como resultado una mayor eficacia de carga. Encontraron que la morfología del estrato córneo se modificaba en presencia de quitosano, por lo que las NPs podrían mejorar notablemente la penetración y la retención en la epidermis de la quercetina *in vitro* e *in vivo* (Qi et al. 2011).

Los liposomas, transfersomas y etosomas se utilizan habitualmente para la administración tópica de productos derivados de las plantas y por lo tanto, constituyen una alternativa de interés para la encapsulación de quercetina. El uso de liposomas como vehículos puede mejorar la penetración en la piel de las moléculas caracterizadas por una baja solubilidad en medios acuosos (Bonechi et al., 2017).

2. OBJETIVOS

La quercetina es un flavonoide con una excelente actividad antioxidante y antiinflamatoria. Su administración tópica tiene un gran interés para la prevención del envejecimiento de la piel y la protección de esta frente a la fotooxidación. Sin embargo, sus propiedades dificultan su penetración a través del estrato córneo: su solubilidad acuosa es muy baja, siendo más soluble en solventes como el etanol y el dimetilsulfóxido. Su coeficiente de reparto ($1,82 \pm 0,32$) y su estabilidad frente a iones metálicos, otros antioxidantes, la temperatura, la exposición al oxígeno y la luz son factores que determinan el interés en el desarrollo de formulaciones para su administración tópica.

Se han desarrollado formulaciones de liposomas elásticos para la quercetina destinados a su administración a través de la piel, pero hasta donde llega nuestro conocimiento, no se han preparado liposomas y chitosomas de quercetina con Tween 20 como surfactante, ni se han comparado directamente ambos tipos de formulaciones.

Por este motivo, el objetivo general de este trabajo es desarrollar, caracterizar y comparar dos tipos de formulaciones de quercetina para su administración tópica: una emulsión clásica y dos formulaciones de liposomas y chitosomas.

Para su consecución es necesario plantear otros objetivos secundarios

- . Estudio de la solubilidad de la quercetina en agua y diferentes medios
- . Optimizar un método *in vitro* que permita cuantificar la liberación o cesión de la quercetina
- . Optimización y caracterización de liposomas elásticos y chitosomas de quercetina
- . Preparación y caracterización de una emulsión conteniendo quercetina.
- . Estudio de la estabilidad de la quercetina en las formulaciones seleccionadas

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Quercetina (3,3',4',5,6-Pentahidroxi-flavone, Sigma-Aldrich, >95% HPLC), Tween 80 (Polisorbato 80, Acofarma), Tween 20 (Polisorbato 80, Acofarma), fosfato monopotásico, fosfato disódico, ácido acético, chitosán (bajo peso molecular, desacetilado de la quitina, poli-D-glucosamina, Sigma-Aldrich), fosfatidilcolina de huevo (PC, L- α -Phosphatidylcholine, Sigma-Aldrich CAS), agua MiliQ, etanol (96% v/v, USP, AppliChem), metanol (grado HPLC, Fischer Scientific).

3.2 Instrumentación

Rotavapor Heidolph Hei-VAP Advantage, bomba de vacío (vacuubrand rotary vane pumps RZ6), microscopio óptico (Motic B3 profesional series), Centrífuga (MPW-65R), baño de ultrasonido (Fisher Scientific FB15061), Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Waters 2998), baño de incubación con agitación (Unitronic-VaivenC), bomba inyección de microdialisis (CMA/100), extrusor (mini-extruder assembly, Avanti Polar Lipids), espectrofotómetro (Thermoscientific, UV1), Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern), viscosímetro rotacional analógico (Nahita 801), pH-metro (WTW 526).

3.3 Otros materiales

Membranas de diálisis (acetato de celulosa, 12000 Da, Sigma-Aldrich), filtros de policarbonato (Nucleopore Track-Etch membrane, Whatman).

3.4 PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES

3.4.1 Preparación de liposomas elásticos

Se prepararon liposomas elásticos con quercetina mediante el método de hidratación con distintas proporciones de tensoactivo, como se ilustra en la Figura 7. Para ello, se disolvió la fosfatidilcolina y el Tween 20 en 2 ml de etanol conteniendo la quercetina. Posteriormente se evaporó el solvente en el rotavapor (30 min, 60 rpm, 30 °C). La película formada se hidrató con 5 ml de tampón fosfato pH 7,4 (30 min, 100 rpm, 30 °C).

Se dejó reposar la muestra 2 horas para permitir la estabilización del sistema. Luego se sometió a sonicación a 40 °C durante un periodo de 15 min para reducir el tamaño de

partícula. La suspensión obtenida se extruyó 6 veces a través de un filtro de policarbonato, con un tamaño de poro de 100 nm, para homogenizar la muestra.

Los lotes se almacenaron a 4 °C.

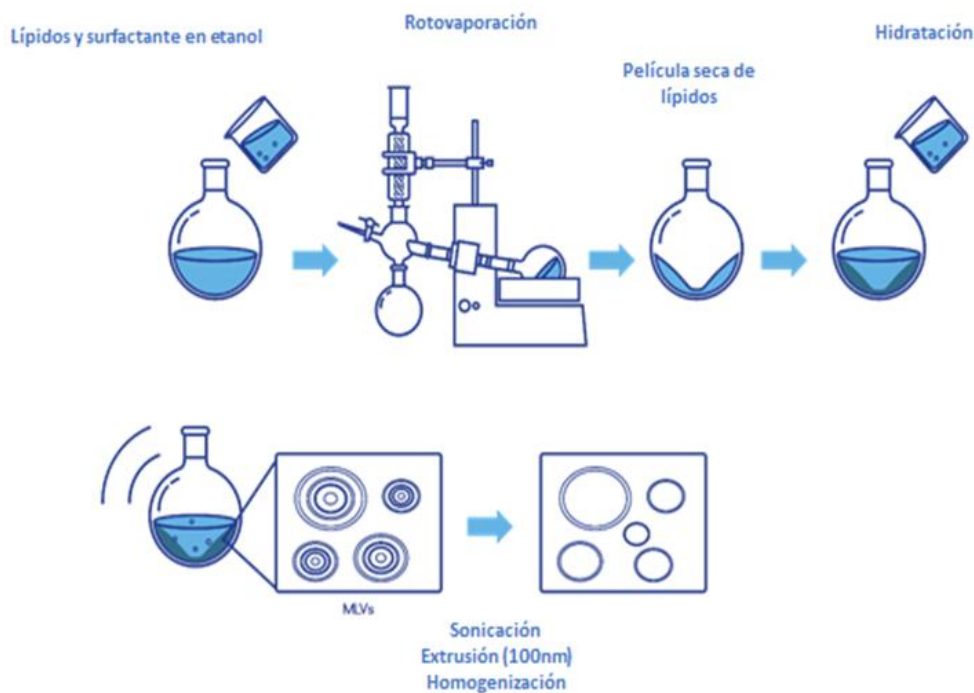


Figura 7. Ilustración de la preparación de los liposomas y chitosomas

3.4.2 Preparación de los chitosomas

Los chitosomas se prepararon siguiendo el mismo procedimiento, pero la hidratación se llevó a cabo con 5 ml de tampón fosfato pH 5,5 (30 min, 100 rpm, 30 °C).

Se dejó reposar la muestra durante 2 horas y se sonicó en las mismas condiciones que los liposomas. Para formar los chitosomas se adicionaron 2,5 ml de disolución de chitosán al 0,5% en ácido acético 0,5 %, a las vesículas extruidas y se agitó 2 minutos en un vortex.

Los lotes se almacenaron igualmente a 4 °C.

En la tabla 2 se muestra la composición de las formulaciones de liposomas elásticos y chitosomas-estudiadas.

Tabla 2. *Composición de las formulaciones preparadas*

Tipo de vesícula	PC de huevo (mg)	Tween 20 (mg)	Quercetina (mg)	Chitosano (mg)
Liposomas elásticos (F1)	40	0,3	1	----
Liposomas elásticos (F2)	40	2	1	-----
Chitosomas (F3)	40	0,3	1	1,25
Chitosomas (F4)	40	2	1	1,25

3.4.3 Preparación de la emulsión

Se trabajó con una emulsión existente en el mercado cosmético colombiano cuyo nombre comercial es “*Caprri*”. Su composición en código INCI es Aqua, Cetearyl Alcohol, Cetareth 20, Cetyl Alcohol, Stearyl Alcohol, Coco-Caprylate Oil, Stearate Lanolin, Cocos Nucifera (Coconut) Oil, Acrylates C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Glycerin, Triethanolamine, Cyclopentasiloxane, Caprae lac, Phenoxyethanol/Ethylhexylglycerin y Calendula Officinalis Flower. A esta emulsión se le incorporó 200 µg de quercetina por gramo de emulsión con la ayuda de Tween 80 para solubilizarla.

Para su elaboración se sigue el siguiente protocolo: Los componentes lipófilos, a excepción del extracto de leche de cabra, se mezclan y se calientan hasta 70°C (Mezcla A): alcohol cetearílico, cetareth 20, alcohol cetílico, alcohol estearílico, estearatos de lanolina, aceite de coco, acrilatos C10-30, alquíl acrilatos. Por otro lado, se calienta el agua hasta 40°C y se adicionan crosspolímero, glicerina, ciclopentasiloxano, fenoxietanol, etilhexilglicerina y extracto de flor de calendula Officinalis (Mezcla B).

Cuando la Mezcla A está a una temperatura de 40°C, se adiciona lentamente la Mezcla B con agitación constante. En este mismo paso se agrega el extracto de leche de cabra y trietanolamina hasta conseguir un pH de 6,4.

3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS/CHITOSOMAS

3.5.1 Determinación del tamaño y potencial zeta por dispersión de luz dinámica (DLS)

Se midió el diámetro medio, el índice de dispersión y el potencial Zeta de las partículas de cada formulación mediante un equipo Zetasizer Nano-ZS90 de Malvern.

Los valores de potencial zeta se obtienen a partir de medidas de la movilidad electroforética. Esta magnitud se define como la velocidad con la que migran las partículas al aplicar una diferencia de potencial a los electrodos de la célula que contiene la suspensión de las mismas.

Por otro lado, el fundamento teórico de la técnica “dispersión dinámica de luz” se basa en las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada por las partículas con respecto al tiempo al ser iluminadas con un láser. Dichas fluctuaciones resultan del movimiento browniano de las propias partículas en el seno del líquido y pueden correlacionarse con el coeficiente de difusión translacional y con el tamaño de las partículas.

3.5.2 Determinación del porcentaje encapsulado y del contenido de principio activo

La quercetina no encapsulada se separó de la suspensión de liposomas o chitosomas mediante diálisis. Para ello 0,5 ml de la suspensión se colocaron en una membrana de acetato de celulosa (1.0 in, 12000 Da, Sigma-Aldrich) y se sometieron a un proceso de diálisis con 1 litro de agua durante 1 hora.

Una vez terminado este proceso, se trató una alícuota de cada lote con metanol en proporción 1:4, se agitó y se centrifugó durante 10 minutos (14000 rpm, -1°C). Las concentraciones de quercetina se determinaron mediante una técnica de HPLC.

El porcentaje encapsulado se determinó con la fórmula:

$$(\%E) = \left(\frac{Q_o}{Q_f} \right) * 100$$

El contenido en principio activo se estableció a partir de la siguiente ecuación:

$$(Q) = \frac{Q_o}{m_t} * 100$$

Donde

$\%E$ Porcentaje de quercetina encapsulada (%)

Q_0 Cantidad encapsulada de quercetina (μg)

Q_f Cantidad de quercetina incorporada en la preparación (μg)

m_t Cantidad total de fosfolípidos empleados (μg)

3.5.3 Método de cuantificación de quercetina

Las concentraciones de quercetina se determinaron mediante una técnica de HPLC con detección de UV a una longitud de onda de 371 nm. Se utilizó una columna Purospher 18 con tamaño de partícula de 3 μm , con una fase móvil formada por un 28% de acetonitrilo y 72% de ácido ortofosfórico al 0,2% en agua a un flujo de 1 ml/min. El tiempo de retención de la quercetina fue de 2,59 minutos.

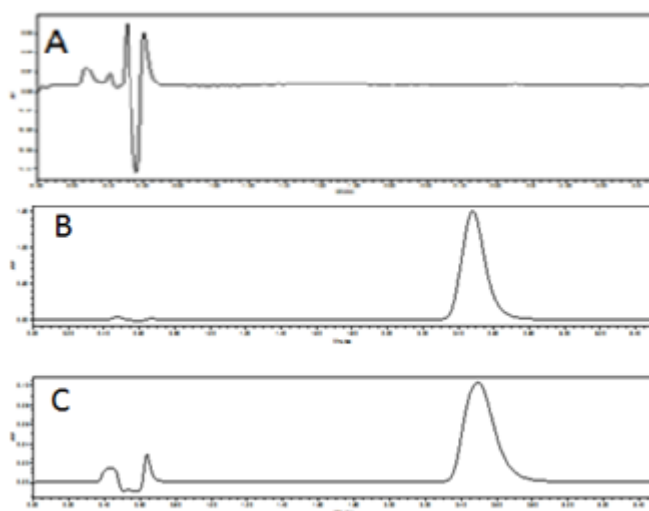


Figura 8. Cromatogramas obtenidos con el método de HPLC utilizado.
*Blanco (A), Patrón de 250 $\mu\text{g/ml}$ (B), Muestra encapsulación quercetina (C)

3.5.4 Ensayo de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las vesículas preparadas se evaluó mediante la reacción con el radical DPPH*. Para ello, a partir de una solución etanólica del compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) en concentración 1 mM, se prepararon mezclas en relación volumétrica 1:10 (formulación:reactivo). Las muestras se incubaron con agitación a 37 °C en oscuridad durante una hora. Inmediatamente trascurrido el tiempo se midieron las absorbancias (A_{muestra}) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. Se tomó

como blanco las preparaciones liposomales sin quercetina y la absorbancia del reactivo DPPH* (A_{DPPH}) se midió previamente al ensayo. Los ensayos se hicieron por triplicado.

La tasa de eliminación de radicales se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Captación de radicales libres } (C) = \left(\frac{A_{DPPH} - A_{MUESTRA}}{A_{DPPH}} \right) * 100$$

3.5.5 Elasticidad

El ensayo de elasticidad se llevó a cabo haciendo pasar un volumen predeterminado de muestra a un flujo conocido por un filtro de un tamaño de poro menor al diámetro promedio de. Para ello, se adaptó el extrusor (mini-extruder assembly, Avanti Polar Lipids) a una bomba de microdialisis (CMA/100) y se utilizó un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 50 nm a presión constante. Se calculó el flujo (F) con el que las vesículas pasan a través del filtro y el diámetro inicial (dv) mediante DLS (Zetasizer Nano-ZS90 de Malvern).

La elasticidad de las vesículas se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Elasticidad } (E) = F \left(\frac{rp}{rv} \right)^2$$

F flujo a través del filtro de membrana ($\mu\text{l/s}$)

rv tamaño de las vesículas (μm).

rp tamaño de poro del filtro de membrana (nm)

3.5.6 Estudio de estabilidad

Para llevar a cabo este estudio se mantuvo una alícuota de 200 μL de cada formulación expuesta a la luz durante una semana, tomando como referencia una solución de quercetina sometida a las mismas condiciones. Una vez transcurrido dicho tiempo, las muestras se trataron con metanol en proporción 1:4 y se cuantificó la cantidad de quercetina por HPLC. Los ensayos se hicieron por triplicado.

3.5.7 Ensayo de solubilidad

La quercetina tiene una solubilidad muy baja y en la bibliografía no existe un consenso sobre la solubilidad de la quercetina en agua (ver Tabla 3) y en otros medios, lo que puede deberse a la baja solubilidad de quercetina y las distintas condiciones empleadas en los estudios. (Hatahet et al., 2016a 1, Robinson et al., 2015, Saija et al., 2003). (Ver Tabla 3)

Tabla 3 : *Diferentes valores de solubilidad en agua para la quercetina*

Solubilidad	Referencia
0,48 µg/ml	Hatahet et al., 2016a 1
2 µg/ml	Robinson et al., 2015
0,514 µg/ml	Saija et al. 2003

Por ello, y con el fin de encontrar un medio para los estudios de liberación, se estudió la solubilidad de la quercetina a temperatura ambiente en los siguientes medios: agua MiliQ; tampón fosfato pH 5,5; tampón fosfato pH 7,4; tampón fosfato pH 5,5/etanol (90:10); tampón fosfato pH 7,4/etanol (90:10); tampón fosfato pH 5,5/etanol (80:20); tampón fosfato pH 7,4/etanol (80:20); tampón fosfato pH 5,5/Tween 20 (0,5%); tampón fosfato pH 7,4/Tween 20 (0,5%)

Para ello, se prepararon disoluciones sobresaturadas de quercetina en los mismos y posteriormente se centrifugaron 10 minutos (14000 rpm, -1°C). Se retiró una alícuota del sobrenadante y se cuantificó la cantidad disuelta mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 371 nm. Como blanco se utilizó cada uno de los medios. Se preparó una recta patrón en etanol/agua de concentraciones entre 2,5 y 500 µg/ml.

3.5.8 Estudios de liberación

Para el estudio de la liberación *in vitro* se colocó un volumen de 0,5 ml de preparación liposomal en una bolsa de diálisis (10 cm de longitud). El tubo de diálisis consistió en celulosa regenerada, un material química y físicamente tratado para aumentar su

resistencia (MWCO 12000-14000 Da, diámetro de poro de 25 Å). Se ataron los extremos y la bolsa de diálisis se suspendió en 10 ml de tampón fosfato pH 5,5/Tween 20 (0,5%). La dispersión se incubó con agitación constante a una temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Se tomaron muestras de 200 µL a los intervalos de tiempo predeterminados: 20 y 30 minutos, 1,5, 3, 6, 10 y 24 horas que se repusieron con el mismo volumen del medio de liberación. Las concentraciones de quercetina se cuantificaron usando el método de HPLC anteriormente descrito. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje total de quercetina liberado a cada tiempo se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$(\%L) = \left(\frac{Q_t}{Q_o} \right) * 100$$

$\%L$ porcentaje de quercetina liberado en el tiempo t

Q_t cantidad total de quercetina liberada en el tiempo t (µg)

Q_o cantidad de quercetina inicial (µg)

Para el estudio de la liberación *in vitro* desde la formulación convencional se colocó 1 gramo de emulsión en una bolsa de diálisis (10 cm de longitud). El tubo de diálisis fue del mismo tipo que el utilizado para las liberaciones de los liposomas, al igual que el procedimiento a seguir y las condiciones del ensayo.

3.5.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el programa SPSS utilizando un test t y un nivel de significación de 0,05 y los ajustes de los perfiles de liberación con R-Commander.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño y caracterización de las formulaciones desarrolladas

La quercetina es un flavonoide con potente actividad antioxidante y antiinflamatoria. A pesar de su peso molecular inferior a 500 kDa y su coeficiente de reparto de 1,84, su baja solubilidad acuosa inestabilidad, dificultan su penetración a través de la piel. Por ello, en el presente estudio nos propusimos desarrollar y caracterizar formulaciones de liposomas flexibles y chitosomas, adecuados para la administración de la quercetina por vía tópica a través de la piel.

Para encontrar una formulación adecuada para la quercetina, se realizaron estudios de preformulación con distintas proporciones de fosfatidilcolina y quercetina, con el fin de encontrar aquella que evitara su precipitación. Para esto, se prepararon vesículas por el método de hidratación. En este caso, las preparaciones no fueron ni sonicadas ni extruidas, obteniéndose vesículas de gran tamaño, de modo que se podía observar en el microscopio óptico la densidad de vesículas formadas y la presencia de cristales. En la Figura (9) se muestra una imagen de una preparación de liposomas con una relación de fosfatidilcolina y quercetina 1:20, en la cual hay presencia de cristales de quercetina no solubilizada, los cuales no se distinguen fácilmente de las aglomeraciones presentes.

Se estableció una relación de fosfatidilcolina/quercetina (40:1) para las formulaciones para evitar la formación de cristales, es decir, que la quercetina se encuentre incorporada en su totalidad o parcialmente solubilizada, pero no precipitada en el medio (ver Figura 9).

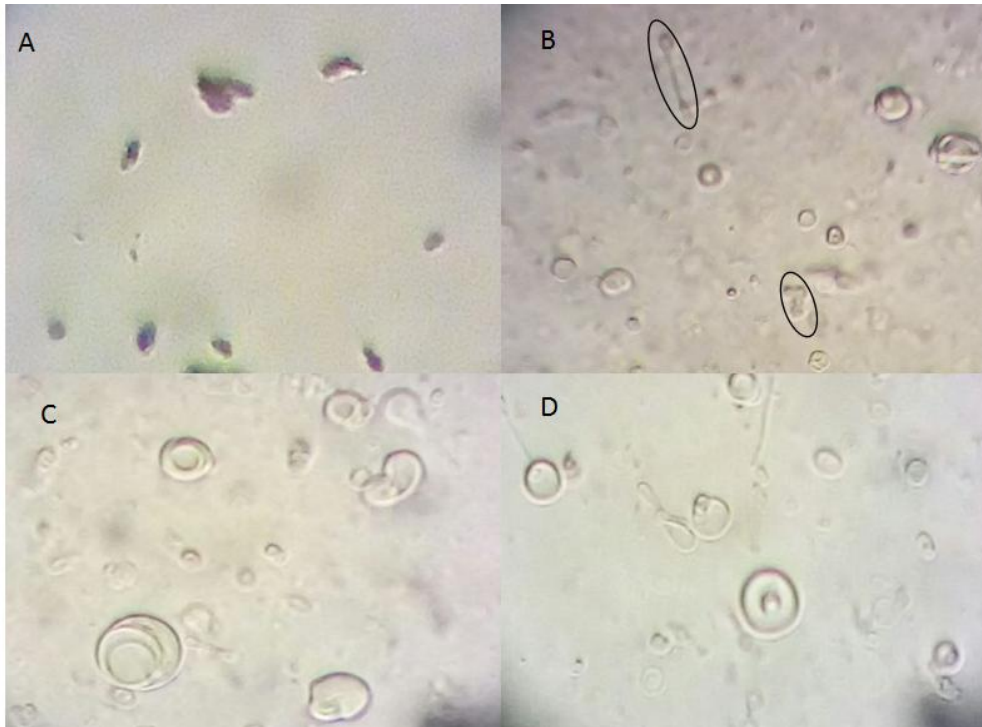


Figura 9. Ensayos previos para determinar la relación de fosfatidilcolina/quercetina en las formulaciones *.

*Cristales quercetina solución sobresaturada (A), Chitosomas relación 1:20 (B), Liposomas y chitosomas relación 1:40 (C, D)

Los liposomas y chitosomas preparados mediante el método de hidratación resultaron tener tamaños de 963 nm y 819 nm respectivamente, con un elevado índice de polidispersión de 1 en ambos casos. Para disminuir su tamaño y dispersión, se optimizó el proceso incluyendo las etapas de sonicación y extrusión descritas.

El diámetro y el potencial Zeta de las vesículas preparadas está recogido en la Tabla 4.

Tabla 4. *Diámetro promedio y potencial Zeta para las formulaciones ensayadas*

Formulación	Diámetro medio/nm(PdI)	Potencial zeta/mV
F1	184 (0,3)	-23,8±6,2
F2	120,3 (0,27)	-23,6±6,1
F3	342,7 (0,27)	39,1±7,3
F4	213,5 (0,32)	33,6±7,6

El tamaño y la naturaleza de las vesículas son un indicador de la posibilidad de penetrar la barrera cutánea. La entrada de cualquier compuesto desde el exterior a las capas

internas de la piel está limitada principalmente por la capa córnea, el estrato más superficial de la piel. La absorción puede producirse a través de los corneocitos o de la matriz lipídica de los espacios intercelulares. Otras alternativas para penetrar la barrera córnea, son los folículos capilares y las glándulas sudoríparas, que representan el 0,1% de la superficie total de la piel (Henriques, 2017).

Se han descrito varios posibles mecanismos por los cuales las vesículas deformables pueden incrementar la penetración de fármacos a través de la piel (El Maghraby et al., 2005). En primer lugar, el fármaco puede atravesar la piel de forma independiente una vez que se libera desde las vesículas. En segundo lugar, las vesículas podrían adherirse o fusionarse con el estrato córneo incrementando el reparto del fármaco en la piel (Bouwstra y Honeywell-Nguyen 2002). También se ha propuesto que los fosfolípidos y otros componentes de las vesículas pueden actuar como promotores, modificando la estructura del estrato córneo e incrementando el paso del fármaco a través de la piel (Mohammed et al., 2017). Otra opción sería la penetración de las vesículas intactas, especialmente en el caso de liposomas ultradeformables, transfersomas o etosomas (Cevc et al., 1998). El paso a través de los apéndices, aunque tradicionalmente ha sido menospreciado en la última década ha recibido atención como una vía importante de penetración en la piel (Lauer, 2001; El Maghraby et al., 2005). Parece que la carga, especialmente si es positiva, favorece el transporte transfolicular (Shah et al, 2015)

En el caso de los transfersomas, su flexibilidad les permite adaptarse a espacios con tamaño menor a su diámetro. Además, la función promotora de los tensioactivos, capaces de incrementar el tamaño de estos poros, facilita su penetración en la piel. Habitualmente se buscan tamaños de 100 nm, lo que supondría que tendrían que reducir su tamaño hasta 5 veces para poder atravesar intactos el estrato córneo a través de poros de unos 40 nm (Cevc et al., 2004; Yuan et al., 2017).

Entre las formulaciones preparadas, se asocia una disminución del diámetro de la vesícula con el incremento en la proporción de tensioactivo. Por otro lado, el tamaño de partícula de las vesículas aumenta cuando se cubren con quitosán. Este incremento se puede explicar por la adhesión del quitosán a la superficie del liposoma cargado negativamente mediante interacciones electrostáticas formando una capa superficial).

Los liposomas con un 5% de Tween 20 (F2) son los que más se acercan al diámetro de 100 nm, por lo tanto, podrían atravesar el estrato córneo. Sin embargo, las vesículas

pueden promover la penetración de quercetina en la piel por los otros mecanismos mencionados. De hecho, no solo el tamaño, sino también la carga de las vesículas e incluso el tipo de fármaco pueden condicionar la penetración en la piel (Shah et al., 2015).

En cuanto al potencial zeta, es indicador de la estabilidad de las dispersiones, indicando el grado de repulsión entre partículas adyacentes y, por tanto, de la resistencia a la agregación (Batalla et al., 2014). Para la estabilización electrostática se requiere un valor de potencial Zeta absoluto mínimo de 30 mV (Starkloff et al., 2014).

Los liposomas preparados presentan carga negativa debido a los grupos carboxilo de los fosfolípidos (Mura et al., 2007) Los valores del potencial Zeta para las dos formulaciones de liposomas son similares, por lo que parece que, en las proporciones y condiciones utilizadas, el Tween 20 no ejerce ninguna influencia en este parámetro, debido a su naturaleza eléctricamente neutra. Los chitosomas presentan carga positiva y un potencial Zeta superior a 30mV, que se debe al chitosán, lo que a priori los hace más estables en suspensión.

La carga superficial de las nanopartículas también afecta a su interacción con las membranas celulares (Uchechi et al., 2014). La superficie de las células presenta carga negativa debido a las moléculas de proteoglicanos, de modo que las nanopartículas con carga positiva tienen gran afinidad por las membranas celulares debido a interacciones electrostáticas. Por ello, la interacción entre NPs cargadas positivamente y las células es más probable, promoviéndose la penetración a través de la piel. No obstante, no se debe descartar totalmente la penetración de las formulaciones cargadas negativamente, ya que hay estudios en los que también se ha observado la interacción de las membranas celulares con vesículas con carga negativa debido a procesos de adsorción no específicos (Uchechi et al., 2014).

Los resultados obtenidos para la encapsulación de quercetina en las diferentes formulaciones y la cantidad de principio activo en relación al total de lípidos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. *Porcentaje encapsulado y contenido de principio activo*

Formulación	%E	SD	Q (%)	SD
F1	79,862	1,125	1,997	0,028
F2	78,007	0,662	1,950	0,017
F3	91,939	2,067	2,293	0,056
F4	81,673	1,934	2,049	0,030

E (porcentaje de quercetina encapsulada) Q (porcentaje de principio activo)

El análisis estadístico de los resultados de encapsulación reveló que la concentración de Tween 20 no modifica significativamente el porcentaje de encapsulación en las formulaciones de liposomas F1 y F2 ($p > 0,05$) pero sí en las de chitosomas F3 y F4 ($p < 0,001$), con aproximadamente un 10 % más de quercetina encapsulada en las vesículas con menor proporción de tensoactivo, las cuales presentan un porcentaje de encapsulación del 92%.

En general se acepta que las moléculas altamente hidrofóbicas se incluyen en el interior de la bicapa de fosfolípidos mediante interacciones hidrofóbicas (Tan et al., 2016). Los surfactantes se insertan en la membrana de las vesículas produciendo defectos en el empaquetado que proporcionarían espacio donde puede integrarse la molécula del flavonoide. Para los polifenoles, también se ha descrito su absorción en la superficie de las vesículas (Kedong et al., 2017). En el caso de la quercetina su escasa solubilidad deberá favorecer a la incorporación en las bicapas. El uso de un medio de hidratación con concentraciones más altas de tensoactivo, por encima de la CMC, en el que la quercetina es más soluble, no se traduce en diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de encapsulación.

Es posible que la presencia de tensoactivo, por su carácter neutro, disminuya la interacción con el chitosán. De hecho, el incremento de tamaño de las vesículas cuando se les adiciona chitosán es superior para aquellas que tienen el porcentaje más bajo de tensoactivo, lo que podría indicar un mayor depósito del polímero sobre los liposomas.

4.2 Ensayo de la actividad antioxidante

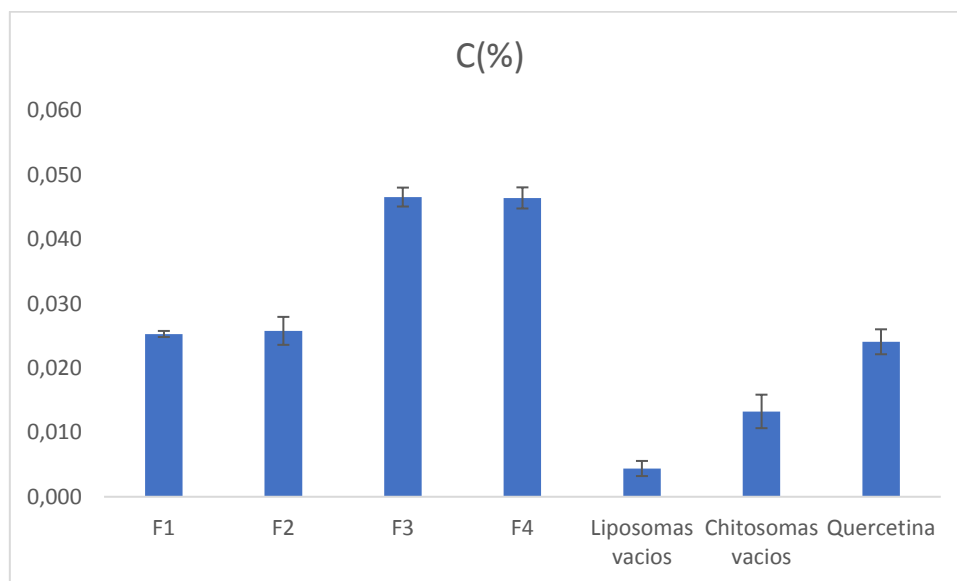


Figura 10. Capacidad de inhibición del radical DPPH*

La molécula DPPH* es un radical orgánico libre y estable en ausencia de luz que se utiliza en estudios de evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos. El método es rápido, fácil, preciso, sensible, económico y sencillo y solo involucra en su reacción al radical y a los antioxidantes presentes. Consiste en evaluar la neutralización del radical al captar átomos de hidrógeno de los compuestos antioxidantes que se encuentren presentes, en este caso de la quercetina principalmente. Esta reacción puede seguirse midiendo los cambios en la absorbancia del DPPH* a 516 nm.

No obstante, este método posee bastantes limitaciones. Entre ellas, destaca que no existe un protocolo estandarizado y por lo tanto hay modificaciones según los diferentes autores (Oliveira, 2015) que impiden la comparación de resultados. Por lo tanto, los resultados de la actividad antioxidante de un componente estudiado, solo podrán compararse con datos obtenidos siguiendo el mismo procedimiento, las mismas condiciones de medida y el mismo solvente empleado para solubilizar el reactivo y las misma concentración de DPPH* utilizada (Pérez-Jiménez, 2006). Por lo tanto los porcentajes que se presentarán como capacidad de captación de radicales libres deben entenderse como indicativos de si la quercetina encapsulada conserva su capacidad antioxidante y se encuentra disponible para reaccionar, o por el contrario no se difunde fácilmente desde las vesículas y se mantiene encapsulada.

Al comparar los resultados (Figura 10) entre el mismo tipo de formulación y diferente concentración de tensoactivo se encuentra que no existe diferencias significativas ($p > 0,05$). Por otro lado, los porcentajes obtenidos en los chitosomas son mayores que en los liposomas ($p < 0,0001$), esto se debe tanto a una mejor encapsulación de la quercetina como a la actividad antioxidante que ejerce el chitosán, valor que puede verificarse al compararse los resultados de los chitosomas y liposomas vacíos.

La fosfatidilcolina presente en las formulaciones también presenta un ligero efecto antioxidante, pero su actividad es comparativamente menor frente a la quercetina y se encuentra en la misma proporción en todas las formulaciones estudiadas, por lo que no actúa como factor de confusión en el análisis de los resultados. Según éstos, podemos afirmar que la quercetina encapsulada en las diferentes vesículas liposomales está disponible para actuar frente a agentes oxidantes, si bien en el caso de los chitosomas debe considerarse también la contribución del propio chitosán a la acción antioxidante observada para dichas formulaciones.

4.3 Elasticidad

La elasticidad de las vesículas es un parámetro fundamental que condiciona el paso a través de la piel. Se ha postulado que los surfactantes como el Tween 20 se incorporan en los lugares de mayor estrés y es en ellos donde se produce una mayor deformación de las vesículas y en consecuencia, los transfersomas experimentan cambios de forma cuando se imponen resistencias o existe estrés circundante, como el confinamiento del espacio. De esta manera pueden penetrar con mayor facilidad a través de espacios más pequeños que su propio diámetro, y se convierten en una manera eficaz de transporte para moléculas que no tienen fácil el acceso a la piel (Garg et al., 2017).

En este estudio evaluamos la elasticidad relativa de las formulaciones preparadas, obteniéndose los resultados reflejados en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados del ensayo de elasticidad

Formulación	Elasticidad ($\mu\text{L}/\text{min}$)	SD
F1	1,36	0,07
F2	3,35	0,12
F3	0,38	0,01
F4	0,99	0,03

La cantidad de tensoactivo modifica la capacidad de deformación de las vesículas, volviéndolas más flexibles. Por esta razón las formulaciones F2 y F4, aquellas con mayor proporción de Tween 20, poseen mayor elasticidad comparativamente con el mismo tipo de vesícula con menos tensoactivo. Por otro lado, el chitosán al ser un polímero rígido, hace a los chitosomas menos elásticos que los liposomas. Esto dificulta su penetración a través de la piel.

4.4 Estabilidad

En la Figura 11 se recogen los porcentajes remanente de quercetina transcurrida una semana de exposición a la luz.

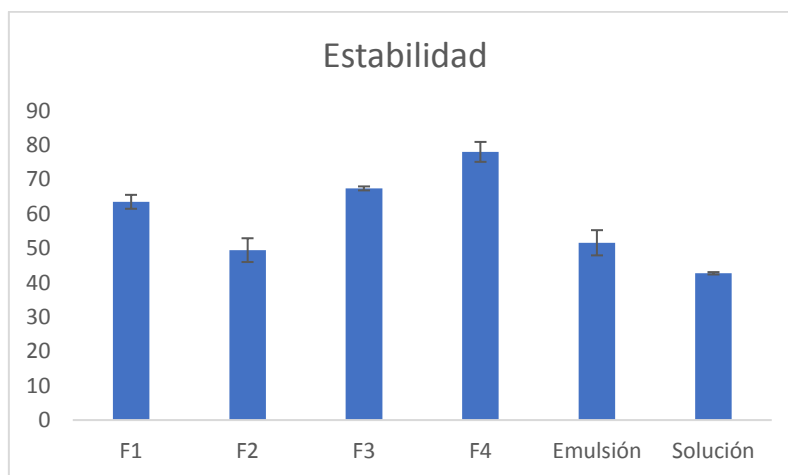


Figura 11. Resultados de la cantidad de quercetina remanente tras la exposición continuada de las formulaciones a la luz durante ocho días

La formulación que presentó menor estabilidad fue F2 (liposomas con mayor proporción de Tween) lo que podría atribuirse a una menor retención de la quercetina en estas vesículas. La emulsión presentó también una capacidad moderada de protección de quercetina frente a la luz. Por otra parte, con los chitosomas se obtienen las mayores

proporciones de cantidad remanente, lo que indicaría una mayor protección de la quercetina cuando es incluida en este tipo de formulación. Por lo tanto, el chitosán ejerce una acción estabilizadora de las vesículas, siendo la formulación F4 la más estable con un porcentaje remanente de quercetina del $78 \pm 2,9\%$.

4.5 Estudios de liberación

4.5.1 Estudio de solubilidad de la quercetina

En la figura 12 se recogen los resultados obtenidos en el estudio de solubilidad para la quercetina en distintos medios.

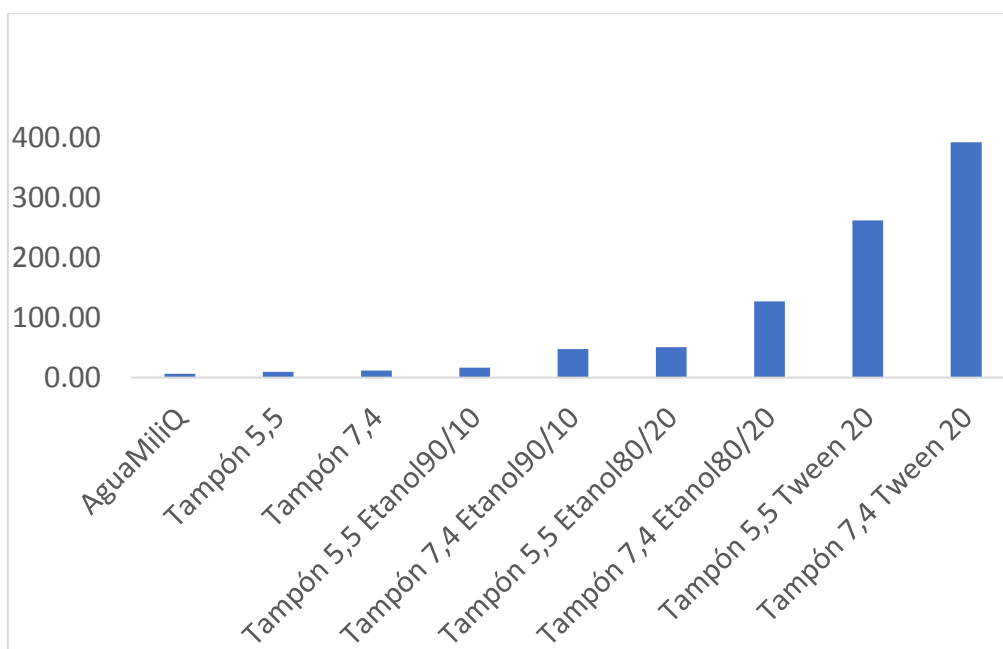


Figura 12. Solubilidad de la quercetina en diferentes medios

Se puede observar que el valor más alto de solubilidad de la quercetina se obtiene en el medio con Tween al 5%, y el más bajo en agua. La solubilidad se incrementa a medida que se aumenta la relación de etanol/agua y es mayor a pH 7,4.

A partir de estos resultados se estableció el medio para los ensayos de liberación: pH 5,5/Tween 20 (0,5%), ya que la solubilidad de la quercetina en este medio nos permitiría conseguir concentraciones cuantificables y mantener las condiciones sink en el ensayo que realizamos a pH 5,5 (pH de la piel en condiciones fisiológicas).

Por otro lado, las suspensiones liposomales desarrolladas tienen respectivamente 200 µg/ml y 133 µg/ml de quercetina, incrementándose la solubilidad en agua hasta 16 veces más para los liposomas y 13 veces más en el caso de los chitosomas.

4.5.2 Perfiles de liberación

Los resultados obtenidos para los ensayos de liberación de las diferentes formulaciones liposomales y la emulsión se recogen en las siguientes figuras. Como control, se realizó un ensayo de liberación de quercetina desde una solución de quercetina de 200 µg/ml.

Desde las formulaciones de liposomas se produce una liberación lenta de la quercetina con un incremento de la velocidad de liberación para las vesículas con mayor proporción de tensioactivo, siendo la cantidad liberada aproximadamente el doble a los 30 minutos. Este mismo efecto del tensioactivo se produce también para los chitosomas.

Una de las principales funciones de este tipo de vehículos de administración es evitar una liberación inmediata. Se puede observar que todas las formulaciones propuestas, incluida la emulsión, se comportan como vehículos de liberación controlada, en comparación con lo que sucede en la solución de quercetina, donde el 70 % es liberado en menos de una hora y media y un 90 % a las tres horas. Los perfiles de liberación se presentan en la Figura 13.

Se han desarrollado liposomas y chitosomas de quercetina con fosfatidilcolina con dos concentraciones de Tween 20 diferentes, mediante el método de hidratación, seguida de sonicación y extrusión con tamaños entre 120 y 342 nm. La función principal del Tween 20 es proporcionar a los liposomas una mayor capacidad de deformación y flexibilidad que les permita atravesar la barrera cutánea y penetrar hasta estratos profundos de la piel. La formulación F2 con un tamaño próximo a 100 nm sería el tipo de vesícula óptima para lograr una mayor penetración de las capas epidérmicas, sin destruirse y adaptándose a la deformación que se requiere para atravesar los intersticios intercelulares, y alcanzar estratos profundos de la piel como los fibroblastos. Sin embargo, también se han descrito otros mecanismos de penetración de los fármacos a través de la piel desde nanosistemas. En este sentido, es importante resaltar que, en el caso de los chitosomas, no solamente el Tween sino también el chitosán, tiene propiedades como promotor de la absorción y que, además la carga positiva de las vesículas favorecería su interacción con las membranas

celulares. Hay que tener en cuenta asimismo, que la quercetina presenta distintas acciones sobre la piel y no en todas es necesario que acceda a las capas más profundas.

Finalmente fue posible la incorporación de la quercetina en una emulsión que contiene ácidos grasos de cadena media, también con actividad promotora de la absorción. La emulsión logró encapsular una cantidad similar a la que poseen los liposomas y liberarla a un medio de condiciones fisiológicas, pero quizás su acción esté restringida para penetrar estratos de la piel y limite su acción a la capa superficial.

Las formulaciones desarrolladas presentan características adecuadas para la administración de quercetina por vía dérmica. La realización de estudios *in vitro* con piel permitirá confirmar su capacidad de incrementar la penetración de quercetina a través del estrato corneo y verificar hasta qué profundidad en los diferentes estratos puede garantizarse su acción.

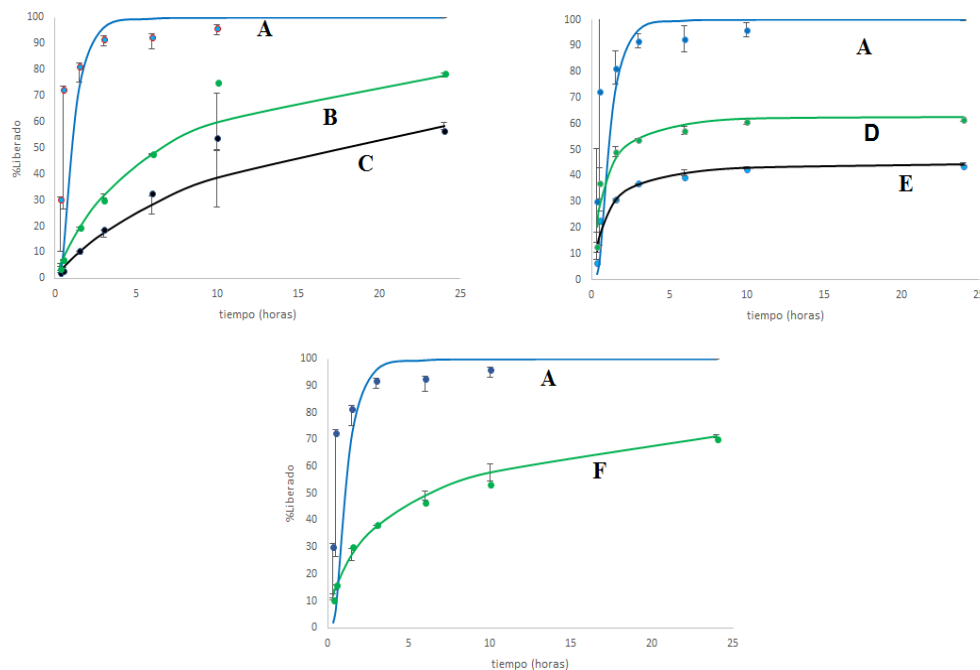


Figura 13. Perfiles de liberación de las formulaciones y una solución de quercetina (200µg/ml); tiempo (horas) vs Porcentaje liberado (%)*

*solución quercetina (A), F2 (B), F1 (C), F4 (D), F3 (E) F5 (F)

5. CONCLUSIONES

Elaboración de liposomas y chitosomas: Se logró estandarizar un método de elaboración de liposomas elásticos y chitosomas con Tween 20 y fosfatidilcolina, obteniendo vesículas de tamaño entre 120 y 340 nm de diámetro. El método empleado fue de hidratación seguido por procesos de sonicación y extrusión para homogenizar las muestras.

Caracterización del tamaño de partícula y estabilidad de las vesículas: mediante el método de dispersión de luz dinámica encontramos que el potencial Zeta de las formulaciones no se modificó con el porcentaje de tensoactivo. Estos valores fueron negativos para los liposomas, mientras que los chitosomas presentaron un potencial Zeta positivo, superior a 30mV, lo que favorece su estabilidad en suspensión.

Capacidad de encapsulación de la quercetina: en todas las formulaciones se logró encapsular más del 70% de quercetina, siendo superior en los chitosomas. No hubo diferencias como consecuencia de la proporción de tensoactivo para los liposomas.

Solubilidad de la quercetina en las vesículas: Se incrementó el valor de la solubilidad de la quercetina en agua al lograr incorporar 200 µg/ml y 133 µg/ml de en los liposomas y chitosomas respectivamente. Esto demuestra que se pudo incrementándose la solubilidad en agua hasta 16 veces más para los liposomas y 13 veces más en el caso de los chitosomas.

Elasticidad: Las vesículas más elásticas fueron los liposomas con mayor proporción de tensoactivo, esto les permite tener mayor capacidad para penetrar estratos pequeños de la piel. Los chitosomas por el contrario demostraron tener una escasa capacidad de flexionarse, son vesículas rígidas.

Actividad antioxidante: la quercetina mantiene su actividad antioxidante tras su incorporación en las vesículas, siendo mayor en los chitosomas debido a la acción sinérgica con el chitosán.

Remanente de quercetina luego de la exposición a la luz: Las formulaciones basadas en chitosomas revelaron una mayor protección de la quercetina frente a la luz, con cantidades remanentes a los ocho días de exposición de 67% y 78%,

Perfiles de liberación: todas las formulaciones son vehículos de liberación prolongada, en comparación con una solución de quercetina, cuyo perfil muestra una liberación casi completa de la quercetina en menos de 3 horas.

Optimización del método de cuantificación de quercetina: la medición de la quercetina se logró hacer bajo un método de HPLC con condiciones establecidas.

6. BIBLIOGRAFÍA:

- ROTHWELL, J., DAY, A., & MORGAN, M. (2005). Experimental Determination of Octanol-Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 4355-4360.
- Ainbinder, D., Paolino, D., Fresta, M., & Touitou, E. (2010). Drug delivery applications with ethosomes. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6, 558-568.
- Akhtar, N., & Pathak, K. (2012). Cavamax W7 composite ethosomal gel of clotrimazole for improved topical delivery: development and comparison with ethosomal gel. *AAPS PharmSciTech*, 13, 344-355.
- Arouri, A., Lauritsen, K. E., Nielsena, H. L., & Mouritsena, O. G. (2016). Effect of fatty acids on the permeability barrier of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 139-146.
- Arouri, A., & Mouritsen, O. G. (2012). Membrane-perturbing effect of fatty acids and and lysolipids. *Progress in Lipid Research*, 52, 130-140.
- Ascenso, A., Raposo, S., Batista, C., Cardoso, P., Mendes, T., Garci Praga, F., . . . Simoes, S. (2015). Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5837–5851.
- Bonechi, C., Donati, A., Tamasia, G., Leonea, G., Consumi, M., Rossia, C., . . . Magnania, A. (2017). Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophysical Chemistry*.
- Caddeo, C., Díez-Sales, O., Pons, R., Carbone, C., Ennas, G., Puglisi, G., . . . Manconi, M. (2015). Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. *Journal of Colloid and Interface Science*.
- Cadeo, C., Nacher, A., Vassallo, A., Armentano, M. F., Pons, R., Fernández-Busquets, X., Manconi, M. (2016). Effect of quercetin and resveratrol co-incorporated in liposomes against inflammatory/oxidative response associated with skin cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 513, 153–163.
- Cadena, P. G., Pereira, M. A., Cordeiro, R. B., Cavalcanti, I. M., Barros Neto, B., do Carmo C.B. Pimentel, M., . . . Santos-Magalhães, N. S. (2012). Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 309–316..
- Casagrande, R., Georgetti, S. R., Verri Jr., W. A., Dorta, D. J., dos Santos, A. C., & Fonseca, M. J. (2006). Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 84, 21–27.
- Carbajal Azcona, Á. (17 de 01 de 2018). *La nutrición en la red*. Obtenido de <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-11-vitaminas.pdf>

- Cevc, G., Blume, G., & Schatzlein, A. (1997). Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. *Journal of Controlled Release*, 45, 211–226.
- Cevc, G., Schatzlein, A., & Richardsen, H. (2002). Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica et Biophysica*, 21-30.
- Cevc, G., Schatzlein, A., & Blume, G. (1994). Transdermal drug carriers: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. *Journal of Controlled Release*, 36 (1995) 3-16.
- Charcosset, C., Juban, A., Jean-Pierre, V., Sébastien, U., & Hatem, F. (2015). Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chemical engineering research and design*, 94, 508-515.
- Chen, Y.-J., Yuan, R.-M., Liu, Y.-J., Yang, H.-J., Liang, G.-Y., & Tian, L.-X. (2015). Dietary vitamin C requirement and its effects on tissue antioxidant capacity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, 435, 431–436.
- Choi, J., Cho, S., Yun, J., & Cho, C. (2015). Ethosomes and transfersomes for topical delivery of ginsenoside R_{h1} from red ginseng. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8, 5660-2.
- Choi, M. J., & Maibach, H. I. (2005). Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems. *International Journal of Cosmetic Science*, 27, 211-221.
- Clares Naveros, B. (2003). *Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de Acetonido de triamcinolona*. Granada: Universidad de Granada, facultad de Farmacia.
- Dewick, P. (2009). *Medicinal natural products*. Nottingham, UK: A John Wiley and Sons, Ltd., Publication.
- Diembeck, W., Hoppe, U., Bergemann, J., Ennen, J., Gohla, S., Harris, I., . . . Steckel, F. (1999). Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer. *BioFactors*, 9, 371–378.
- Duangjit, S., Opanasopit, P., Rojanarata, T., & Ngawhirunpat, T. (2011). Characterization and in vitro skin permeation of meloxicam-loaded liposomes versus transfersomes. *Journal of Drug Delivery*.
- El Maghraby, G. M., Williams, A. C., & Barry, B. W. (2005). Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *Journal of pharmacy and pharmacology*.
- Garg, V., Singh, H., Bimbrawh, S., Singh, S., Gulati, M., Vaidya, Y., & Kaur, P. (2017). Ethosomes and Transfersomes: Principles, Perspectives and Practices. *Current drug delivery*, 5, 613-633.
- Gubernator, J., Lipka, D., Korycínska, M., Kempínska, K., Milczarek, M., Wietrzyk, J., . . . Kozubek, A. (2014). Efficient Human Breast Cancer Xenograft Regression after a Single Treatment with a Novel Liposomal Formulation of Epirubicin Prepared Using the EDTA Ion Gradient Method. *PLOS ONE*.

- Gupta, A., Aggarwal, G., Singla, S., & Arora, R. (2012). Transfersomes: A Novel Vesicular Carrier for Enhanced Transdermal Delivery of Sertraline: Development, Characterization, and Performance Evaluation. *Scientia Pharmaceutica*, 80, 1061–1080.
- Hatahet, T., Morille, M., Hommoss, A., J.M. Devoisselle, J. M., Müller, R. H., & Bégu, S. (2016a). Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 108,41-53.
- Hatahet, T., Morille, M., Hommoss, A., Dorandeu, C., Müller, R. H., & Bégu, S. (2016b). Dermal quercetin smartCrystals: Formulation development, antioxidant activity and cellular safety. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, 102, 51–63.
- Hara, M., & Verkman, A. (2003). Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice. *National Institutes of Health*.
- Hollman, P. (2004). Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 42, 74–83.
- Høyrup, P., Davidsen, J., & Jørgensen, K. (2001). Lipid Membrane Partitioning of Lysolipids and Fatty Acids: Effects of Membrane Phase Structure and Detergent Chain Lengths. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105, 2649-2657.
- Jespersen, H., Andersen, J. H., Ditzel, H. J., & Mouritsen, O. G. (2012). Lipids, curvature stress, and the action of lipid prodrugs: Free fatty acids and lysolipid enhancement of drug transport across liposomal membranes. *Biochimie*, 94, 2-10.
- Lauer, A. C. (2001). Percutaneous drug delivery to the hair follicle. *Journal of Toxicology - Cutaneous and Ocular Toxicology*, 20(4), 475-495.
- Leow, Y., & Maibach, H. (1998). Cigarette Smoking, Cutaneous Vasculature, and Tissue Oxygen. *Clin. Dermatol.*, 16, 579–584.
- Marco, J. (2006). *Química de los productos naturales*. Madrid, España: Editorial síntesis s.a.
- Mohammed, M. A., Syeda, J. T., Wasan, K. M., & Wasan, E. K. (2017). An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *College of Pharmacy and Nutrition*,.
- Muñoz, J., Alfaro, M., & Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y aceites*.
- Musazzi, U. M., Franzè, S., Minghetti, P., & Casiraghi, A. (2018). Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product? *Drug delivery and translational research*, 8, 414-421.
- Nounou, M., El-Khordagu, L. K., Khalafallah, N. A., & Khalil, S. A. (2008). Liposomal Formulation for Dermal and Transdermal Drug Delivery: Past, Present. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2, 19-18.
- Oliveira, G. L. (2015). Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 17, 36-44.
- Prasanthi, D., & Lakshmi, P. K. (2012). Effect of chemical enhancers in transdermal permeation of alfuzosin hydrochloride. *ISRN pharmaceuticals*, 2012, 965280.

- Qi , T., Weidong , L., Chenyu , G., & Guangxi , Z. (2011). Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. *International Journal of Nanomedicine*.
- Roberto, S., Bertelle, M., & Fabris, S. (2014). Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69, 71–77.
- Robinson, K., Mock, C., & Dong, L. (2015). Pre-formulation studies of resveratrol. *Drug Dev Ind Pharm*, 41(9): 1464–1469.
- Rothwell, J. A., Day, A. J., & Morgan, M. R. (2005). Experimental Determination of Octanol-Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *Journal agricultural food and chemistry*, 53, 4355-4360.
- Ruano Aldea, M. (2013). *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Saija, A., Tomainoa, A., Trombetta, D., Pellegrino, M., Tita, B., Messina, C., Castelli, F. (2003). ‘In vitro’ antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 167-174.
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., & Tate, P. (2003). *Anatomia & Fisiologia*. Lourdes, Portugal: McGraw-Hill companies.
- Sha, S. M., Ashtikar, M., Jain, A. S., Makhija, D. T., Nikam, Y., Gude, R. P., . . . Nagarsenker, M. S. (2015). LeciPlex, invasomes and liposomes: a skin penetration study. *Internstional Journal of Pharmaceutics*, 490, 391-403.
- Starkloff, W. J., Palma, S. D., & Lujan Gonzalez-Vidál, N. (2014). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 4, 7-16.
- Uchechi, O., Ogbonna, J. D., & Attama, A. A. (2014). Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, 193–235.
- Velarde Peña, T. L., Orozco Ríos, A. M., & Martínez Gallardo, L. (2016). Estrategias para un envejecimiento exitoso. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 51(5):284–289.
- Yuan JP, J., Wang JH, J., & Liu. , X. (2007). Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora--implications for health. *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol 51, 765-781.
- Zhanga, Y., Ng, W., Feng, X., Cao, F., & Xu, H. (2016). Lipid vesicular nanocarrier: Quick encapsulation efficiency determination and transcutaneous application. *International Journal of Pharmaceutics*, 516, 225–230.