

Estudio biofarmacéutico de flavanonas isoprenílicas antiinflamatorias libres y vehiculizadas en sistemas nanoestructurados para aplicación tópica

Valeri Domínguez Villegas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FISICOQUÍMICA

**ESTUDIO BIOFARMACÉUTICO DE FLAVANONAS ISOPRENÍLICAS
ANTIINFLAMATORIAS LIBRES Y VEHICULIZADAS EN SISTEMAS
NANOESTRUCTURADOS PARA APLICACIÓN TÓPICA**

VALERI DOMÍNGUEZ VILLEGAS. 2014



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FÍSICOQUÍMICA

**PROGRAMA DE DOCTORAT: “RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL
DE MEDICAMENTS”**

**ESTUDIO BIOFARMACÉUTICO DE FLAVANONAS ISOPRENÍLICAS
ANTIINFLAMATORIAS LIBRES Y VEHICULIZADAS EN SISTEMAS
NANOESTRUCTURADOS PARA APLICACIÓN TÓPICA**

Memòria presentada per Valeri Domínguez Villegas per optar al Títol de Doctor per la
Universitat de Barcelona

Dra. María Luisa García López

Dra. Ana C. Calpena Campmany

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

Doctoranda

VALERI DOMÍNGUEZ VILLEGAS. 2014

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Departamento de Fisicoquímica, en la Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona así como también en el Laboratorio 9b: Química de Productos Naturales y Evaluaciones Farmacológicas del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de: *Dra. María Luisa García López, Dra. Ana C. Calpena Campmany y Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez.*

Este trabajo de investigación se llevó a cabo con base al Acuerdo de colaboración específica entre la Universidad de Barcelona y el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma de Estado de Morelos firmado en el año 2011.



AGRADECIMIENTOS

A todos los que de alguna manera colaboraron y me apoyaron para la realización de este trabajo que hoy culmino. Gracias a Dios y la vida que me han permitido concluir una etapa muy importante de mi vida.

La presente tesis ha sido un arduo camino desde las circunstancias en que la vida me ha llevado a desarrollarlo y que sin el trabajo invaluable de mis asesoras de tesis Dra. María Luisa García, Dra. Ana Calpena y Dra. María Luisa Garduño esto hubiera sido más complicado. Cada una de mis asesoras con cualidades maravillosas hicieron posible casi lo imposible. Gracias Marisa por creer en mí, por tanta bondad y por tanta confianza en mi trabajo; gracias Ana por buscar todos los mecanismos para que todo marchara bien, por tantas horas dedicadas de trabajo intenso con los estudios de permeación, por enseñarme tantos saberes y María Luisa tal vez no existan palabras para agradecerte todo el apoyo que me has dado desde hace bastante tiempo; te agradezco tanta bondad, tantas horas de trabajo, tu paciencia hacia mí cada vez que me frustraba con algún experimento y tu apoyo incondicional.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Estefanía Vega, Elisabet González, Joana Araújo, Paola Bustos, Mireia Mallandrich, Martha Vázquez, Hellen Alvarado, Berenice Andrade y Francisco Fernández con quienes compartí largas jornadas de trabajo, recibiendo su apoyo y enseñanzas en especial de Fany, Eli y Fran que ahora ya son doctores.

A la Dra. Maria Antonia Egea que desde el Máster ha sido una persona incondicional en la realización de mi trabajo.

A la Dra. Beatriz Clares por su colaboración en la parte final de esta tesis.

A Núria Bosch por hacer de mi estancia en Barcelona la mejor travesía en estas tierras. Una amiga inigualable y grandiosa que se robó mis risas en muchos momentos.

A mi querida amiga Viky, por llenarme de fortaleza, compartir conmigo su alegría y ser parte de las buenas y gratas noticias recientes.

Gracias a mi familia, a mis padres, a mis hermanas Vianata y Vanessa por darme ánimos, por su apoyo en los artículos y su admiración. Siempre juntas.

A mis tíos y primos que me llenan de alegría en cada momento de mi vida.

A mi abue por sus bendiciones y oraciones que hacía por mí cada día.

Mami, no lo pudimos haber hecho de una mejor manera. Tanto tiempo de extrañarte, tantas lágrimas en el teléfono y aún recuerdo el primer día en que llegué a Barcelona que quería regresar pero cuanto esfuerzo por estar comunicadas, que fueras cibernauta y nos pudiéramos ver a través de una cámara aunque sin comer. Gracias Magda por ser mi madre y por luchar porque llegara hasta aquí. Espero que estés orgullosa de mí.

¡ Gracias a todos por formar parte de cada una de las páginas de esta tesis !

ÍNDICE

ÍNDICE

Índice general	i
Abreviaturas	iii

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Inflamación	2
1.1.1 Cascada del ácido araquidónico	3
1.1.2 Células y moléculas que intervienen en el proceso inflamatorio	5
1.2 Fármacos antiinflamatorios comerciales	13
1.2.1 Antiinflamatorios esteroideos	14
1.2.2 Antinflamatorios no esteroideos	15
1.3 Compuestos antiinflamatorios de origen natural	17
1.3.1 Flavanoides	17
1.3.1.1 Flavanonas	21
1.3.2 Fuentes naturales de flavanonas	21
1.3.2.1 <i>Eysehardtia platycarpa</i>	25
1.4 La piel como una vía de administración	28
1.4.1 Características de la piel	29
1.5 Sistemas de liberación modificada	35
1.5.1 Nanoemulsiones	38
1.5.2 Nanopartículas	41
1.6 Permeación transdérmica	46
1.6.1 Métodos de estudio de permeación transdérmica	47
1.6.2 Estudios de liberación	50
2. OBJETIVOS	53
2.1 Objetivos	54
2.1.1 Objetivo general	55
2.1.2 Objetivos particulares	55
2.2 Plan de trabajo	57
3. RESULTADOS	58
3.1 Artículo 1. Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of <i>Eysehardtia platycarpa</i> . (2013). Natural Product Communications,8(2)147-282.	61
3.2 Artículo 2. Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from <i>Eysenhardtia platycarpa</i> . (2014). <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> . 116 (2014) 183– 192.	69

4. DICUSIÓN	81
5. CONCLUSIONES	92
6. BIBLIOGRAFÍA	96
7. ANEXOS	
Anexo 1. Tablas y figuras	111
Anexo 2. Publicaciones derivadas	121
Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., Domínguez-Villegas, V., Peraire, C., Ruiz, M.A., García, M.L., Calpena, AC., (2012). Skin permeation of cacalol, cacalone and 6- <i>epi</i> -cacalone sesquiterpenes from a nanoemulsion. Nat. Prod. Commun. 7, 821–822.	

ABREVIATURAS

AA	Ácido acarquidónico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AUC	Área bajo la curva
COX	Ciclooxigenasa
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazilo
<i>E. platycarpa</i>	<i>Eysenhardtia platycarpa</i>
EA	Eficacia de asociación del fármaco al polímero
HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía
IL	Interleucinas
LT	Leucotrieos
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energía
NE	Nanoemulsión
NPs	Nanopartículas
p.a.	Principio activo
P188	Poloxamer 188
PCS	Espectroscopía de correlación fotónica
PEG	Polietilenglicol
PG	Prostaglandinas
PLGA	Poli (D,L-láctico-co-glicólico)
PM	Peso molecular
P188	Poloxamer 188
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
TPA	Acetato de tetradecanoil forbol
ZP	Potencial zeta

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inflamación

El término inflamación cubre una compleja serie de respuestas de reparación y protección a lesiones de tejidos, ya sean causadas por infección o lesiones mecánicas. Se puede decir que es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Por lo tanto, la inflamación se determina como un conjunto de daños exógenas o endógenas al actuar sobre el tejido vascularizado produciendo una reacción compleja derivada del ácido araquidónico en las membranas lipídicas de las células. Los aspectos básicos que destacan en el proceso inflamatorio son, en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, que la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, que el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos (Delgado *et al*, 2004).

De forma esquemática, en la inflamación se pueden diferenciar en cinco etapas:

- 1.- Liberación de mediadores. Son moléculas la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por los mastocitos bajo la acción de determinados estímulos, por ejemplo, la histamina y el óxido nítrico.
- 2.- Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- 3.- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.

4.- Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.

5.- Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

Cuando un tejido es dañado, sus células liberan histamina que produce la dilatación de los vasos sanguíneos y, por consiguiente, el aporte de grandes cantidades de sangre hacia el área afectada. Además, los tejidos inflamados liberan líquido intracelular conocido como exudado inflamatorio, que puede acumularse infiltrando los tejidos y dificultando o imposibilitando el funcionamiento del órgano o de la región afectada (Delgado *et al*, 2004).

Esta inflamación puede ser aguda cuando presenta un período de hinchazón, dolor e incapacidad crecientes, que luego disminuyen en poco tiempo o crónica cuando se prolongan durante meses o años, presentando períodos de mayor o menor intensidad, de acuerdo con factores como la humedad, la dieta o el estado del propio sistema inmunitario. La gravedad, la duración y las características peculiares de cada respuesta inflamatoria dependen del área afectada, de su estado previo y de la causa que la provoca. La inflamación aguda está asociada a muchos padecimientos como la osteoartritis, infecciones del ojo, colitis, infecciones del oído y procesos quirúrgicos entre otros (Gómez *et al*, 2011).

1.1.1 Cascada del ácido araquidónico

Como ya se ha mencionado la inflamación es un proceso que se inicia en las membranas lipídicas debido a un estímulo. Los lípidos tienen derivados como los autacoides. Se han identificado 2 familias de autocoides, derivados de los fosfolípidos de la membrana: los eicosanoides, formados a partir de algunos ácidos grasos poliinsaturados, en particular el ácido araquidónico, (que incluyen prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos) y los fosfolípidos modificados representados

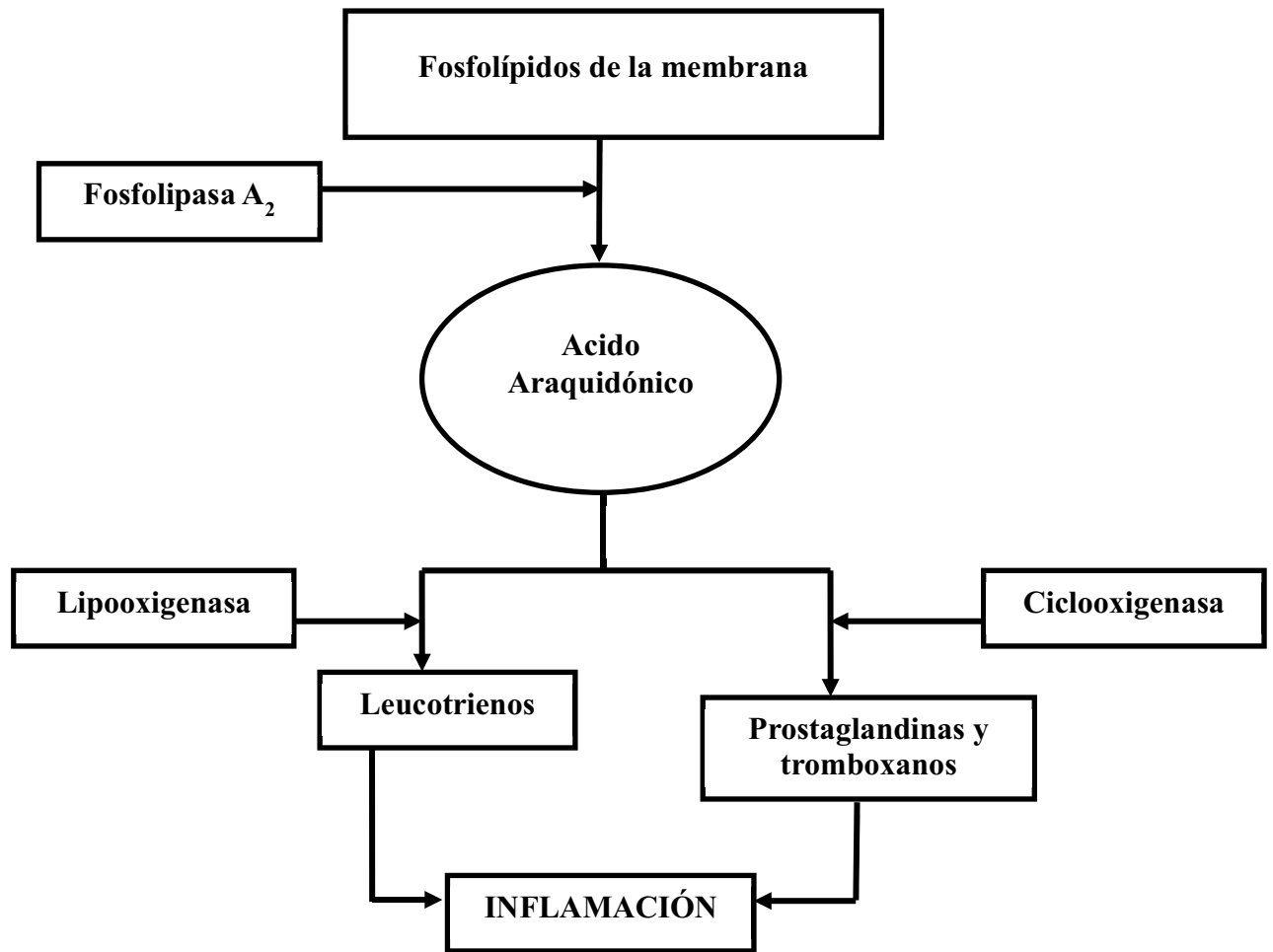
por el factor activador de plaquetas (PAF) (Delgado *et al* 2004). A esta derivación de sustancias se le conoce como cascada de ácido araquidónico.

El ácido araquidónico (AA) llamado ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetranoico es un derivado del ácido linoleico, ácido graso esencial, con muchos enlaces dobles, que se encuentra normalmente esterificado en forma de fosfolípido en las membranas celulares. El AA se libera por acción de las fosfolipasas celulares, a partir de cualquier célula activada (plaquetas), estresada o a punto de morir por necrosis. Una vez liberado, el AA puede metabolizarse por dos vías: (Figura 1)

- Las ciclooxygenasas (la forma constitutiva COX-1 y la inducible COX-2) generan intermediarios que, después de ser procesados por enzimas específicas, producen las prostaglandinas (PGD₂ producido por mastocitos, PGE₂ por macrófagos y células endoteliales, entre otros) y los tromboxanos (TXA₂, el principal metabolito del AA generado por las plaquetas); el endotelio vascular carece de tromboxano sintetasa, pero posee una prostaciclina sintetasa, y por tanto genera prostaciclina (PGI₂);
- Las lipooxygenasas generan intermediarios de los leucotrienos y las lipoxinas.

Los derivados del ácido araquidónico (también denominados eicosanoides) sirven como señales intra o extracelulares en una gran variedad de procesos biológicos, entre ellos la inflamación y la homeostasis. Sus efectos principales son:

- Prostaglandinas: PGE₂, PGI₂, PGD₂ producen vasodilatación, fiebre y dolor.
- Tromboxanos (TXA₂): producen agregación plaquetaria y vasoconstricción.
- Leucotrienos LTC₄, LTD₂ y LTE₄: producen vasoconstricción, aumento de la permeabilidad y broncoespasmos.
- Leucotrieno B₄: promueve adherencia leucocitaria y quimiotaxis.



1.1.2 Células y moléculas que participan en el proceso inflamatorio.

Para entender mejor el proceso inflamatorio y su complejidad es primordial conocer aquellas células y moléculas que se involucran en el proceso inflamatorio. Se han mencionado brevemente y a continuación se explican con mayor detalle.

Existen dos tipos de células, las que se encuentran de manera permanente en los tejidos, como son los mastocitos y las células endoteliales, y otras que pueden migrar y acceder al sitio afectado desde la sangre, como lo son los neutrófilos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y linfocitos. Estas células producen una gran cantidad de moléculas activas, que de manera directa o indirecta, son mediadores del proceso inflamatorio (Gómez *et al*, 2011).

Junto a las células de la inflamación se ha ido conociendo, cada vez más, un amplio número de moléculas, moléculas de la inflamación, producidas en gran medida por las propias células inflamatorias, pudiendo alguna de ellas activar la producción de otras. Estas son responsables del atrapamiento y activación celular, así como de las manifestaciones locales y generales de la inflamación, tal como malestar, fiebre, e hipotensión; estas moléculas son conocidas como eicosanoides (Espinós *et al*, 2012).

Prostaglandinas (PGs). Son las moléculas más abundantes, encontrándose en todos los tejidos y fluidos del organismo. Su producción está desencadenada por una gran variedad de estímulos. Se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción de diferentes enzimas como las ciclooxigenasas (COXs). La vía por la cual el ácido araquidónico se metaboliza a eicosanoides depende del tejido, del estímulo y de la presencia de inductores o inhibidores endógenos y farmacológicos (Espinós *et al*, 2012).

La molécula base de las prostaglandinas es un ácido graso de 20 átomos de carbono unido a un anillo de ciclopentano. El ácido graso, que se encuentra formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina puede tener 2, 3 o 5 dobles enlaces, de los que derivan respectivamente los compuestos eicosatrienoico PG₁, eicosatetraenoico PG₂ y icosapentaenoico PG₃. El sufijo 1, 2, 3 indica el número de dobles enlaces. Saber que las PGs constituyen solo una parte de los productos fisiológicamente activos del metabolismo del ácido araquidónico, permitió el descubrimiento del tromboxano A₂ (TXA₂), de la prostaciclina (PGI₂) y de los leucotrienos (Gómez *et al*, 2011; figura 2).

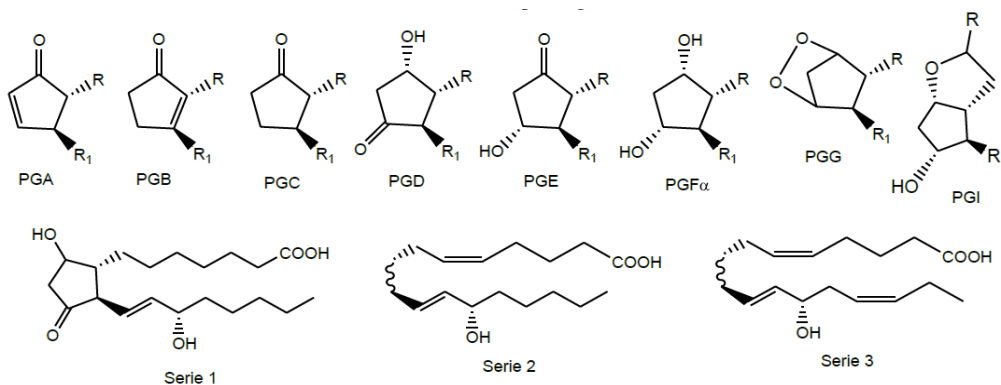


Figura 2: Estructuras de las Prostaglandinas

Son muchos los estímulos de activación de la fosfolipasa A₂; físicos, químicos, hormonales y neurohormonales. Al interactuar con los receptores en la membrana plasmática, estos se acoplan con las proteínas reguladoras de unión, como la proteína G. El resultado es la activación de fosfolipasas o incremento de las concentraciones de ión calcio (Ca⁺²) intracelular que culmina con la activación de las fosfolipasas. Se piensa que estímulos físicos facilitan la penetración de Ca⁺² en la célula que activa a la fosfolipasa A₂ (PLA₂), la cual hidroliza el enlace éster de los fosfolípidos de membrana con la liberación de ácido araquidónico, que es metabolizado rápidamente hasta obtener productos oxigenados, por acción de las COX, algunas lipooxigenasas (LOX) o citocromo P450 (*cyp* 450) y producción de PGs, TXs y/o LTs (Figura 3). Del Ácido Araquidónico (AA), por acción de la ciclooxigenasa derivan las prostaglandinas, [por acción primero de la ciclooxigenasa (COX) y después de la tromboxanosintetasa A₂ (TxA₂)], por acción de la 5-lipooxigenasa (5-LPO) los leucotrienos y por acción de la enzima acetiltransferasa el factor activador de las plaquetas (PAF). El diferente perfil metabólico derivado del AA depende de la maquinaria bioquímica de cada grupo celular (Espinós *et al*, 2012).

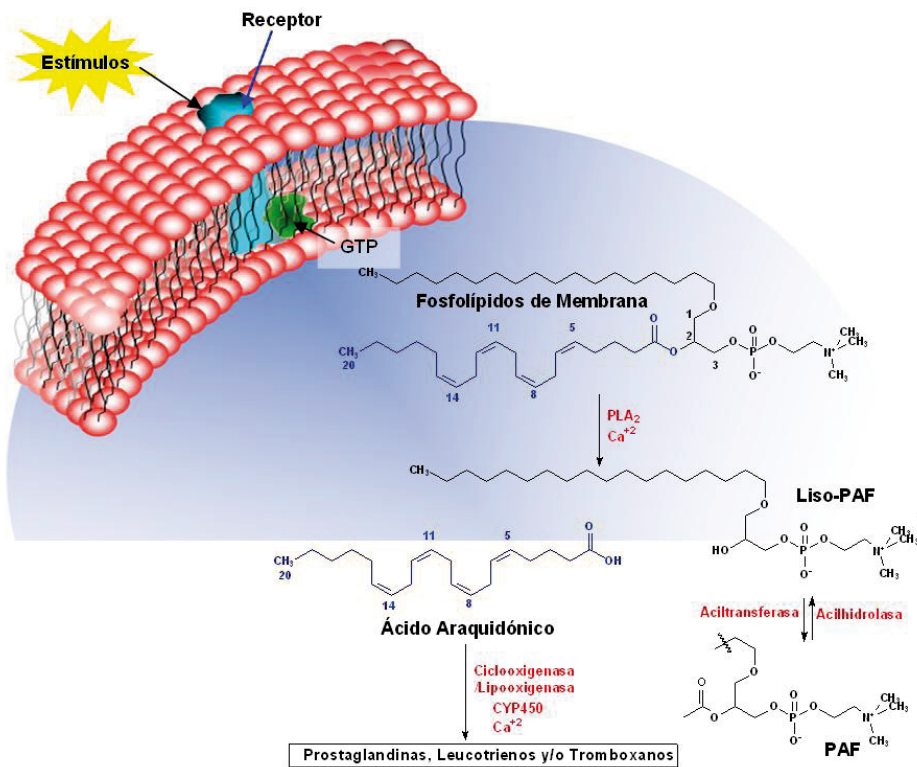


Figura 3. Mecanismos de señalización en la biosíntesis de las PGs

La COX es una proteína integrante de las membranas microsomales y de la membrana nuclear. La síntesis de las prostaglandinas, dependiendo del tipo de célula, puede ser explosiva pero de corta duración, o menos intensa pero de mayor duración. Esta diferencia de comportamiento depende del tiempo de acción de la actividad de la enzima y muy especialmente de la capacidad de resíntesis de la misma.

La COX favorece la oxidación del AA con la formación de un endoperóxido cíclico, el PGG₂, del que deriva el otro endoperóxido, el PGH₂. Éste, por acción de la protaciclinsintetasa, pasa a prostaciclina PGI₂, que es un poderoso antiagregante y vasodilatador. Por acción de la tromboxanosintetasa pasa a TxA₂, que es un poderoso agregante plaquetario y vasoconstrictor. Finalmente, la PGH₂ por la acción de la PGDSintetasa, PGEsintetasa y PGFSintetasa da origen a las prostaglandinas PGE₂, PGD₂ y PGF₂ (Espinós *et al*, 2012).

En el 2002 el grupo del Dr. Simmons de la Brigham Young University (Provo-Utah-E.U.) realizando un estudio en búsqueda de un analgésico menos tóxico en caninos, descubrió accidentalmente tres nuevas isoformas de la enzima COX que derivan de la COX-1, denominadas Ciclooxygenasas parciales 1a (PCOX-1a), 1b (PCOX-1b) y la Ciclooxygenasa-3 (COX-3). La COX-3 posee capacidad de realizar glicosilación similar a la realizada por la COX-1 y COX-2, es decir, tiene la capacidad de sintetizar PGs a partir del AA; las PCOX no poseen esta capacidad y hasta el momento no se ha postulado función alguna para estas. Las PGs sintetizadas por cada una de las isoformas difieren estructuralmente entre sí y de persona a persona. La COX-3 cuenta dentro de sus propiedades la de ser constitutiva como la COX-1 y no inducida como la COX-2, igualmente su concentración es inversa a la concentración de peróxidos en los tejidos (Pradilla, O. 2004).

El papel de las COX-3 se desarrolla a nivel central involucrando mecanismos tanto encefálicos como medulares; las teorías divergen en este punto: Chandrasekharan postula a las PGs COX-3 como las responsables directas de la producción central del dolor. Por otra parte Warner, entre otros autores, postulan la presencia de unas variantes de la COX-2 que llaman COX-2 (inducida) y COX-2b (constitutiva), esta última expresándose en mayor concentración a nivel encefálico, y que sería en conjunto con la

COX-3 las causantes del dolor a nivel central. No está claro cómo las PGs COX-3 participan en la instauración del dolor a nivel central, pero sí que la inhibición de la COX-3 produce analgesia a nivel central.

Leucotrienos. Son productos derivados de la vía 5-lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico. La síntesis de los leucotrienos, a partir del ácido araquidónico, se inicia por la vía 5-lipoxigenasa en conjunto con su proteína activadora. Aunque la proteína activadora de la 5-lipoxigenasa (FLAP) no tiene actividad enzimática, incrementa la función de la 5-lipoxigenasa para interactuar con su sustrato. La capacidad de generar grandes cantidades de leucotrienos a partir de araquidonatos se debe, principalmente, a la función de los leucocitos. (Espinós *et al*, 2012).

Se han caracterizado dos grupos mayores de leucotrienos, los sulfidopépticos o cisteinil-leucotrienos representados por LTC₄, LTD₄, LTE₄ y el grupo LTB₄, con actividad quimiotáctica, especialmente para los neutrófilos que tienen más de 25.000 receptores específicos La 5-LPO, que no se encuentra en todas las células del organismo, es para los leucotrienos lo mismo que la ciclooxigenasa para las prostaglandinas. Introduce un oxígeno en la posición C5 del AA formándose el 5-hidroxi-peroxi-eicosatetraenoico (5-HPETE). Éste, por peroxidación enzimática o no, pasa a 5-hidroxi-eicosa-tetraenoico (5-HETE) o leucotrieno A₄ (LTA₄), del que derivan el LTB₄ y los cisteinil-leucotrienos LTC₄, LTD₄, LTE₄. Los cisteinil-leucotrienos tienen acción vasoconstrictora, favorecen la permeabilidad vascular y la formación de edema, pero principalmente desencadenan broncoconstricción. El LTB₄ atrae a los neutrófilos y favorece su degranulación (Espinós *et al*, 2012).

Factor Activador de Plaquetas (PAF). Es una molécula de elevada potencia inflamatoria. Se genera por la acción de la enzima acetilhidrolasa al actuar sobre el AA. Los complejos antígeno anticuerpo, actuando sobre neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células endoteliales estimulan la formación de PAF. Las células endoteliales expresan PAF por acción de la histamina y la trombina. El PAF es un poderoso agregante de las plaquetas a las que activa; aumenta la contractilidad de la musculatura lisa con broncoconstricción y produce edema y aumento de la permeabilidad. El PAF es degradado rápidamente por la enzima acetilhidrolasa. Si esto no fuese así, por su gran

poder proinflamatorio, las consecuencias serían funestas para el organismo (Espinós *et al*, 2012).

Citocinas. Son péptidos o glicoproteínas de bajo peso molecular, que se producen de *novo* en los primeros segundos de la activación celular. Tienen una vida media muy limitada, actúan localmente y sólo estimulan a células con receptores específicos. Son producidas por una gran diversidad de tipos celulares y ejercen su función principalmente en forma autocrina (sobre la célula que las sintetizó, o paracrina, estimulando células adyacentes). Muy pocas actúan a distancia como el TGF y el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), pero otras pueden hacerlo cuando su producción se eleva. Además de modular la respuesta inmune, participan en la embriogénesis, la hematopoyesis, la angiogénesis, la cicatrización, el crecimiento y en la interrelación del eje neuroinmuno- endócrino, entre otras actividades. Generalmente las citocinas pueden ser clasificadas como pro-inflamatorias (Th1) o anti-inflamatorias (Th2) dependiendo de la vía en la que participen en la inflamación (Barros *et al*, 2011).

Entre las consideradas pro-inflamatorias, tenemos a las interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 y FNT (factor de necrosis tumoral). Las anti-inflamatorias son IL-4, IL-10, IL-13 y FTC β (factor transformador de crecimiento β). Las citocinas son mediadores necesarios para conducir la respuesta inflamatoria hacia las regiones de infección y lesión, favoreciendo la cicatrización apropiada de la herida o lesión. Pero la producción exagerada de citocinas pro-inflamatorias a partir de la lesión puede manifestarse sistémicamente con una inestabilidad hemodinámica o con disturbios metabólicos. Después de las lesiones o de las infecciones graves, la respuesta exacerbada y persistente de citocinas Th1 puede contribuir con las lesiones en el órgano objetivo, conllevando al fracaso multiorgánico y por ende, a la muerte. Las citocinas Th2 pueden minimizar algunos de esos efectos indeseados (Barros *et al*, 2011).

Las citocinas se unen a receptores específicos y su expresión requiere la activación celular. Están constituidas por cadenas polipeptídicas formando heterodímeros (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12), homodímeros y otros heterotrímeros (IL-2, IL-3, IL-13). Es de gran interés que existan en el torrente circulatorio, receptores solubles con capacidad de unión a la citocina correspondiente, impidiendo, de este modo, que ésta actúe sobre su

receptor. Estos receptores libres son la parte extracelular del receptor de membrana y se liberan por proteólisis (Espinós *et al*, 2012).

Por otra parte, es importante resaltar que el estrés oxidativo está íntimamente relacionado con muchos padecimientos debido a un desequilibrio redox, en el cual la producción de especies reactivas supera los mecanismos de defensa antioxidante y todos los elementos pro oxidativos que no se neutralizan, ya sean derivados del nitrógeno o del oxígeno, pueden atacar directamente las biomoléculas esenciales, y si éstas no se reparan con la misma velocidad, se produce daño celular, además de que su expresión puede llevar a la formación de una gran cantidad de elementos bioactivos como citocinas, proteasas y lípidos. Entre las especies reactivas que se producen en el hígado están los radicales libres, los peróxidos, como el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de distintas biomoléculas; los aniones, como el peróxido de nitrito y el hipoclorito, producido por células fagocíticas. (Videla L *et al*, 2003).

Especies reactivas de oxígeno (EROS/ROS). Son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Las ROS son moléculas muy reactivas entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de oxidoreducción. De menor a mayor grado de reducción son especies reactivas de oxígeno: el anión superóxido O^{2-} (potente agente oxidante muy reactivo con el agua), el peróxido de hidrógeno H_2O_2 y el radical hidroxilo $\cdot OH$, que es el más reactivo (Aceptando un electrón más, el radical hidroxilo da lugar a una molécula de agua). También pertenecen a las ROS el óxido nítrico (NO) y el HON^{2-} . Al ser especies reactivas, las ROS pueden producir efectos dañinos sobre las células como: daños en el ADN, daños producidos por oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y de aminoácidos o daños producidos por reacciones con metales como el hierro y el cobre.

Existen evidencias que apuntan hacia la participación de estos compuestos en la etiopatogenia de la inflamación. Durante la activación de los leucocitos, se liberan grandes cantidades de estas especies, cuya función es la eliminación de los agentes. Por ejemplo, pacientes con periodontitis producen elevados niveles de O^{2-} (García Triana *et al*, 1998).

Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS): EL OXIDO NITRICO (NO). El NO es un gas radical libre de fácil difusión, con vida media de 10 a 20 segundos, producido de forma endógena por una gran variedad de células. Es sintetizado en cantidades equimoleculares por una familia de óxido-reductasas conocidas como NOS, a partir del aminoácido L-arginina, NADPH y oxígeno. Se conocen tres isoenzimas de la NOS, una de ellas es inducible (iNOS), también denominada de tipo II (NOS II); es una enzima no dependiente de calcio, la cual puede ser inducida en macrófagos, hepatocitos, neutrófilos y en células de la musculatura lisa y del endotelio vascular como respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como el interferón gamma, el TNF- y el LPS bacteriano y ser inhibida por GCs (Gómez *et al*, 2011).

El NO regula numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la neurotransmisión, la contractilidad del músculo liso, la reactividad plaquetaria y la actividad citotóxica de las células inmunes. Por otro lado, se han descrito elevados niveles de NO en patologías como: artritis reumatoidea, inflamación crónica intestinal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, isquemia cerebral e infarto del miocardio (Pradilla, O. 2004).

La isoforma iNOS cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares. El NO puede funcionar como una molécula pro-inflamatoria, mediante la activación de las enzimas COX y con ello aumentar la producción de las PGs.

Existen otras isoformas de la enzima NOS, la de tipo constitutiva endotelial (eNOS, también conocida como NOS III) y la constitutiva/variable neuronal (nNOS o NOS I). Estas enzimas producen NO en pequeñas cantidades y son las responsables de los niveles normales de este gas en el organismo, entre cuyas funciones resaltamos su participación en diversos procesos de neurotransmisión, la transducción de señales y la relajación del músculo liso vascular y su participación como una sustancia anti-inflamatoria a través de varios mecanismos, por ejemplo, el NO puede inhibir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular, lo que impide su entrada al tejido lesionado (Gómez *et al*, 2011).

1.2 Fármacos antiinflamatorios comerciales

El dolor y la inflamación manifestados en forma crónica constituyen dos importantes problemas de salud pública mundial. Particularmente, el dolor es una de las principales causas de consulta médica que tiene un fuerte impacto en la calidad de vida y a nivel socioeconómico, mientras que la inflamación constituye el mecanismo fisiopatológico subyacente de numerosas enfermedades crónicas, tales como, aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes, cáncer y por ello numerosas empresas farmacéuticas encaminan sus esfuerzos hacia la búsqueda de fármacos antiinflamatorios.

Entre los fármacos antiinflamatorios existen dos grandes grupos: antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINES). También existe el grupo de fármacos anti-reumatoides modificadores de la enfermedad (FARME) y algunos otros fármacos con propiedades antiinflamatorias mínimas como ciertos antihistamínicos y los utilizados para tratamiento de la gota aunque no son estrictamente antiinflamatorios (Rang, 2008) Las aplicaciones médicas de este último grupo de compuestos pueden ir desde disminuir la inflamación, especialmente en enfermedades crónicas tales como la artritis reumatoide y algunas alergias graves, hasta aliviar el dolor o mostrar propiedades antipiréticas. Algunos pueden presentar una acción inmunosupresora, que disminuye la eficacia de las defensas del organismo contra una agresión, una acción útil en caso de enfermedades sistémicas, como consecuencia de un trasplante de órganos para reducir el rechazo por el organismo, o se utilizan como tratamiento complementario en algunas quimioterapias.

Los antiinflamatorios esteroideos o corticoides que son derivados de cortisol y cortisona pueden ser de efecto corto: incluyendo prednisona, prednisolona, metilprednisolona, de efecto intermedio, o de efecto prolongado: betametasona o dexametasona, entre otros. Son medicamentos muy potentes pero que sin embargo, puede tener severos efectos adversos.

1.2.1 Antiinflamatorios esteroides o glucocorticoides

Los glucocorticoides constituyen otro grupo de fármacos que cuentan con propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras muy potentes. Actúan sobre la inflamación por diversos caminos; por ejemplo reducen el número y la activación de

eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos; reducen la proliferación de linfocitos T e inducen apoptosis, disminuyen la cantidad de monocitos, células dendríticas, mastocitos, inhiben la enzima PLA₂, a través de la síntesis de una proteína denominada lipocortina, que es la encargada de inhibir la PLA₂, además inhiben la producción y secreción de citocinas proinflamatorias, acumulación de macrófagos y neutrófilos en focos inflamatorios, como también la síntesis de enzimas lisosomales en las reacciones de fase aguda.

Los glucocorticoides suprimen la expresión de COX-2 y por consiguiente, la producción de prostaglandinas mediadas por dicha enzima, efecto que quizás contribuya parcialmente a las acciones antiinflamatorias de estos fármacos. Por ello, además de actuar como antiinflamatorios, tienen actividad antialérgica e inmunosupresora. Son derivados del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza adrenal esencial para la adaptación al estrés físico o emocional lo que los convierte en los antiinflamatorios más eficaces. Son las únicas moléculas activas en todas las etapas y en todo tipo de reacción alérgica, siendo efectivos inmunosupresores. Sin embargo, también favorecen la diseminación de infecciones, así como, efectos endocrinos y metabólicos, por ello deben reservarse para aquellos casos en que otros fármacos son probadamente ineficaces o están contraindicados. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, cortisona, hidrocortisona, entre otros (Gómez *et al*, 2011; Núñez *et al*, 2005; Serra *et al*, 2012; Valsecia-Malgor, 2012).

Los fármacos antiinflamatorios de este grupo son muy eficaces, pero producen efectos secundarios como los siguientes:

- Efectos sobre la piel (la piel se deteriora o aparece el acné)
- Aumento de peso y síndrome de Cushing
- Un mayor riesgo de infecciones, debido a la disminución de la inmunidad
- Trastornos de la visión (cataratas después de tratamientos prolongados)
- Aparición o empeoramiento de diabetes
- Problemas digestivos (incluyendo úlceras)
- Aparición o aumento de la hipertensión
- Debilitamiento de los huesos (osteoporosis)
- Descompensación psiquiátrica (hiperexcitación y depresión).

1.2.2 Antiinflamatorios no esteroideos

Los agentes anti-inflamatorios, más utilizados en la actualidad son los fármacos “anti-inflamatorios no esteroideos” (AINEs), al inhibir las ciclooxigenasas (COX’s) y por consiguiente la síntesis de prostaglandinas pero no suprimen las vías de la lipooxigenasa ni la formación de leucotrienos.

Estos fármacos también tienen actividad antipirética, a partir de que las prostaglandinas están implicadas en la fiebre. Los agentes atrapadores de radicales libres también juegan un papel en la inflamación, debido a que la liberación de radicales libres ocasiona daño en los tejidos durante el proceso inflamatorio (Williamson, E.M. 1996).

Este grupo de fármacos son ampliamente utilizados para el tratamiento del dolor, la inflamación y la fiebre. En este grupo se incluyen medicamentos tan conocidos y utilizados como el ácido acetil-salicílico (AAS) (Aspirina®), ibuprofeno, indometacina, diclofenaco, piroxicam, etc. Se trata de fármacos que se han utilizado para aliviar síntomas como el dolor, la inflamación aguda y crónica y así han contribuido de forma muy importante a mejorar la calidad de vida del ser humano, puesto que son de gran utilidad para controlar enfermedades incapacitantes como las enfermedades reumáticas.

Hay que destacar que además tienen una gran utilidad por su potencial como antiagregantes, es decir, poseen la propiedad de disminuir la capacidad de las plaquetas para unirse y formar trombos, como sucede con el AAS. Por esa capacidad se emplean en la prevención y tratamiento de enfermedades vasculares tan importantes y tan prevalentes en la actualidad como el infarto de miocardio o los accidentes vasculares cerebrales.

Estos medicamentos por su mecanismo de acción, pueden producir efectos no deseables en el organismo. Uno de los órganos diana donde pueden asentar estos efectos adversos es en el aparato digestivo que se relaciona con la irritación directa o indirecta del tracto gastrointestinal. La mayoría de las veces es moderada y no da síntomas, pero pueden ser muy graves. Se estima su incidencia hasta el 10 % de los usuarios, cifra que asciende aún más en los ancianos. Este efecto adverso depende de la

inhibición de las prostaglandinas, unas moléculas que juegan un papel importante en la protección de la mucosa gástrica, ya que limitan la secreción ácida gástrica y estimulan la formación de mucus. Los AINE's dificultan el funcionamiento de las defensas en la mucosa del tubo digestivo siendo los efectos secundarios gastrointestinales más frecuentes la esofagitis, úlceras (siendo sus complicaciones más frecuentes: hemorragia y perforación), gastroduodenitis, lesiones tóxicas y diarrea.

El daño celular asociado a la inflamación se inicia en las membranas celulares, en donde, por acción de fosfolipasas celulares A_2 sobre los fosfolípidos de membrana, se lleva a cabo la liberación del ácido araquidónico el cual es metabolizado en forma rápida hasta obtener productos oxigenados, denominados eicosanoides, por acción de diferentes sistemas enzimáticos, principalmente por la vía de las ciclooxigenasas (COX's) y por la vía de las lipooxigenasas. De ahí la importancia de la búsqueda de mejores agentes que puedan inhibir las rutas de las ciclooxigenasas y/o 5-lipooxigenasa del metabolismo de la cascada del ácido araquidónico.

Por otra parte, los AINE's como la indometacina, el diclofenaco y el flurbiprofeno, que se han utilizado como fármacos de referencia en el presente proyecto de tesis, presentan propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas pero son inhibidores no selectivos de COX. El deseo de que se conserven los efectos antiinflamatorios de fármacos similares al ácido acetilsalicílico y naproxeno, pero con muchos menos efectos gastrointestinales y menor capacidad ulcerógena, ha orientado los intentos para "diseñar" AINEs con mayor selectividad por COX-2, que por COX-1.

1.3 Compuestos antiinflamatorios de origen natural

Actualmente, se carece de terapias analgésicas y antiinflamatorias con perfiles ideales desde el punto de vista de seguridad y costos, lo cual estimula la búsqueda de nuevos agentes más potentes, con menos efectos adversos y accesibles para los pacientes.

La búsqueda de compuestos de origen vegetal con actividad analgésica y antiinflamatoria constituye una línea de investigación para la caracterización e

identificación de nuevas moléculas con potencial terapéutico a partir del uso racional de la biodiversidad con que cuenta nuestro planeta. Prueba de ello, es importante mencionar que, de los fármacos antiinflamatorios que se encuentran en el mercado hoy en día y que han sido aprobados por la FDA desde el año 1981 al 2010, el 26 % de ellos han sido derivados de productos naturales (Newman, 2012). De ahí la importancia de la búsqueda de principios activos obtenidos a partir de productos naturales.

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

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

1.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios comunes en el reino vegetal considerados sustancias bioactivas que presentan una gran variedad de efectos biológicos (prevención de enfermedades coronarias, cáncer, desórdenes gastrointestinales e inflamación). Existen evidencias del efecto de los flavonoides sobre la inhibición de varias enzimas involucradas en procesos inflamatorios (Wang *et al*, 1999, Kwon *et al*, 2005, Garcia-Mediavilla *et al*, 2007).

La palabra flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C₆-C₃-C₆, puede sufrir posteriormente modificaciones químicas y adiciones de grupos funcionales, por lo que, los

flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua en diferentes proporciones. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados en 6 clases principales: las chalconas, las flavanonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados (Figura 4).

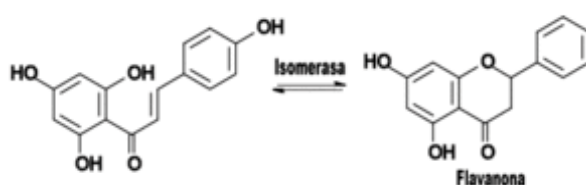


Figura 4 Isomerización de un flavonoide a una flavanona

Los flavonoides se clasifican de acuerdo con el grado de oxidación del anillo de pirano (de esta forma se agrupan a las flavanonas). En donde el núcleo A está generalmente sustituido en las posiciones 5 y 7, el tercer oxígeno está incluido en el puente éter del pirano, los sustituyentes pueden ser $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$ u $-\text{O}$ -ósido, ocasionalmente el núcleo A puede estar prenilado o alquilado por una osa (C-heterósido). El núcleo B puede estar sustituido por una o más funciones $-\text{OH}$, (Granado-Serrano *et al*, 2006).

Los flavonoides se encuentran en plantas superiores, frutas, granos y vegetales que son ingeridos en la dieta diaria en una cantidad significativa y tienen propiedades medicinales, entre las cuales cabe citar el efecto protector del daño de los oxidantes, como los rayos UV. Por otra parte, algunas sustancias químicas presentes en los alimentos (colorantes y conservantes) son flavonoides. Como el organismo humano no tiene la capacidad de sintetizar estas sustancias químicas, las obtiene enteramente de los alimentos que ingiere; sin embargo, no son considerados vitaminas ya que no son nutrientes esenciales que induzcan a síndromes de deficiencia y que se curen administrando la dosis de la sustancia en cuestión (Ochoa *et al*, 2004).

Por otra parte, también se le han atribuido otras propiedades: al limitar la acción de los radicales libres (que son oxidantes), los flavonoides reducen el riesgo de cáncer, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular y disminuyen la elevación de temperatura en la menopausia (Hertog *et al*, 1995).

Sus efectos en los humanos pueden clasificarse en:

- **Antiinflamatorios y analgésicos:** la hesperidina por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se ha utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los taninos tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides (Narvaez-Mastache *et al*, 2007).
- **Propiedades anticancerosas:** muchos flavonoides han demostrado ser altamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas y se ha probado contra el cáncer de hígado (Yochum *et al*, 1999).
- **Propiedades cardiotónicas:** tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación (Palazón *et al*, 1997 y Bylka *et al*, 2004).
- **Fragilidad capilar:** mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que éstos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Los flavonoides con mejores resultados en este campo son la hesperidina, la rutina y la quercetina.
- **Propiedades antitrombóticas:** la capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.
- **Disminución del colesterol:** poseen la capacidad de disminuir la concentración de colesterol y de triglicéridos.

- **Protección del hígado:** algunos flavonoides han demostrado su capacidad de disminuir la probabilidad de enfermedades en el hígado. Ensayos de laboratorio han puesto de relieve que la silimarina protege y regenera el hígado durante la hepatitis. Junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertos malestares digestivos relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.
- **Protección del estómago:** ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol tienen propiedades antiulcerosas, al proteger la mucosa gástrica (Narvaez-Mastache *et al*, 2007).
- **Antimicrobianos:** Isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.
- **Propiedades antioxidantes:** En las plantas los flavonoides actúan como antioxidantes, especialmente las catequinas del té verde.

1.3.1.1 Flavanonas

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

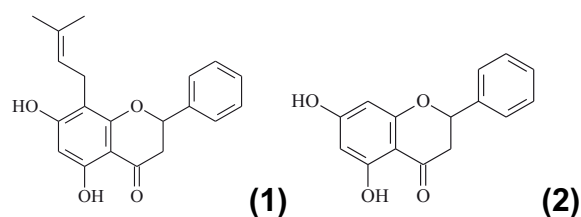
De acuerdo a todos los antecedentes medicinales que presentan los flavonoides, en el presente trabajo de investigación se aborda el estudio de un grupo específico de flavonoides que corresponde a las flavanonas preniladas naturales. Es por ello, que a continuación se presentan antecedentes químicos y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

1.3.2 Fuentes naturales de flavanonas

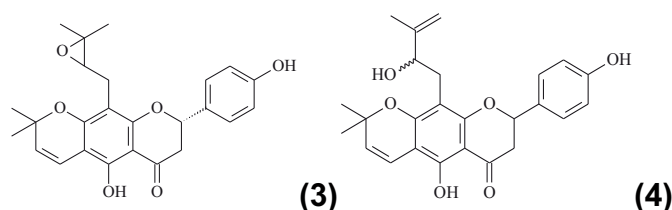
El descubrimiento de nuevas sustancias a partir de plantas con actividad terapéutica constituye una meta de la humanidad. El reino vegetal contiene un enorme potencial de moléculas por descubrir; se estima que más del 90 % de las especies no han sido estudiadas. La naturaleza ha demostrado ser una fuente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

En la literatura se encuentran descritas flavanonas preniladas naturales y derivadas con potenciales terapéuticos. En los últimos años se ha descrito información relevante sobre la investigación de las flavanonas isoprenílicas en las plantas así como la investigación desarrollada en búsqueda de agentes terapéuticos sobre esta variedad de estructuras:

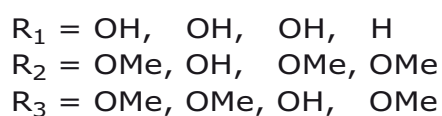
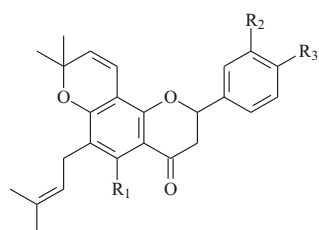
- A partir de las maderas de *Derris rariflora* se aislaron los compuestos: (2S)-5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona y (2S)-5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (Filho *et al*, 1975).
- Del fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de *Glycyrrhiza lepidota*, se identificaron las flavanonas: glabranina **(1)**, pinocembrina **(2)**, estas se probaron en busca de actividad antimicrobiana presentando MIC ($\mu\text{g/ml}$) de 12.5, 12.5 y 50 contra *S. aureus*, *M. smegmatis* y *C. albicans* para **(1)** respectivamente y de 100 para **(2)** en estos mismos microorganismos (Mitscher *et al*, 1983).



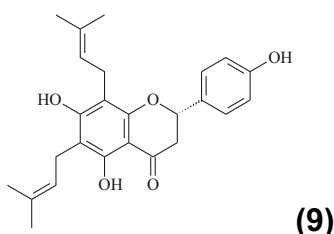
- El extracto diclorometánico de las partes aéreas de *Derris reticulata*, proporcionó las flavanonas lupinifolina, 2''',3'''-epoxilupinifolina (3) y deriticolatina (4), que fueron evaluados *in vitro* mostrando actividad citotóxica en la línea celular P-388 a una concentración de entre 0.4-0.5 µg/ml (Mahidol *et al*, 1997).



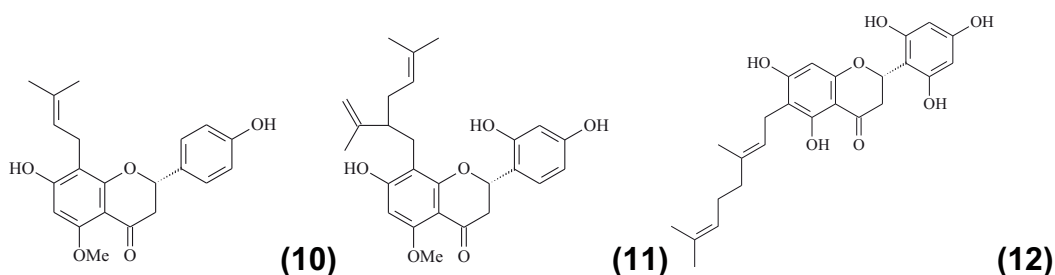
- Las flavanonas: derivadas del 2(S)-6-(γ,γ-dimetilalil)-6'',6''-dimetilpiran [2'',3'':7,8]flavanona con sustitución en: 5-hidroxi-3',4'-dimetoxi (5), 5,3'-dihidroxi-4'-metoxi (6), 5,4'-dihidroxi-3'-metoxi (7) y 3'4'-dimetoxi (8), aisladas de las plantas: *L. utilis* y *L. urucu*, fueron sometidos a estudios de relación estructura actividad en inhibición de NADH:ubiquinona oxidoreductasa, forbol éster inducido por ornitina descarboxilasa y citotoxicidad frente a las líneas celulares MCF-7 y Hepa 1clc7 presentando los siguientes valores de IC₅₀ en µM de 0.68-2.6, 1.1-2.3, 3.0-6.9 y 3.5-8.5, respectivamente para cada ensayo (Fang *et al*, 1999).



- De la planta *Monotes africanus* se aislaron varias flavonoides, entre los cuales la flavanona lonchocarpol A **(9)** fue la que presentó los mejores valores en un análisis anti-VIH con EC_{50} de 1.3 $\mu\text{g/ml}$ e IC_{50} de 2.7 $\mu\text{g/ml}$. (Meragelman *et al*, 2001).



- Se reporta un estudio de varios flavonoides aislados de varias especies, en búsqueda de los efectos que estos poseen sobre las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas, las cuales están involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico. Entre los flavonoides ensayados *in vitro*, se encuentra el 5-metilsoforaflavanona B **(10)**, soforaflavanona G **(11)** y D **(12)**, únicamente **(11)** presentó actividad inhibitoria con valores de IC_{50} (μM) de 0.1-0.6 para COX-1, 0.09-0.25 para 5-LOX y 20 para 12-LOX. (Chi, Y.S. *et al*, 2001).



- Mediante un estudio de actividad anti-VIH, empleando el método semi-empírico AM1 en un análisis comparativo de los valores de las energías de HOMO, LUMO y área calculadas de una serie de biflavonoides, los compuestos activos presentaron valores de E_{HOMO} más pequeños que los obtenidos por los compuestos inactivos, lo cual indica un pronunciado carácter electro-donador de estos. El valor más bajo de E_{LUMO} para los

compuestos activos los caracteriza como mejores electro-aceptores. El área superficial mayor para los compuestos inactivos puede dificultar la interacción con los receptores biológicos para este modelo (Molfetta *et al*, 2004).

Cabe mencionar que estos hallazgos se han realizado a partir de plantas medicinales gracias a la tradición oral y escrita sobre la medicina tradicional que el hombre ha conocido desde los principios de la historia, aprovechando la actividad curativa de un sinnúmero de plantas que ha llevado al descubrimiento de metabolitos secundarios farmacológicamente activos.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que más del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente, la medicina tradicional (Miranda, *et al*, 2005) debido a la abundancia y distribución de las plantas medicinales en el mundo. Y no hay duda que la medicina de nuestros antepasados practicada a través de las plantas es clave en la historia de la salud.

1.3.2.1 .*Eysenhardtia platycarpa*

En México existe gran diversidad de plantas y especies que son conocidas tradicionalmente para aliviar malestares o incluso patologías. La diversidad que se presume en el país se debe a los diferentes climas y tipos de ecosistemas que en él se encuentran. Por ejemplo la costa de pacífico, que se extiende en forma de una franja angosta e ininterrumpida desde el este de Sonora y el suroeste de Chihuahua hasta Chiapas, prolongándose hasta Centroamérica tiene un clima caliente y semihúmedo con tendencia a semiseco. La vegetación predominante es El Bosque Tropical Caducifolio y Subcaducifolio. Predominan las leguminosas y las especies que pueden desarrollarse con limitaciones de humedad. (Delgado, *et al* 2004). En esta parte del territorio de México se encuentra el estado de Guerrero que cuenta con una flora variada ya que en dicho estado hay climas diferentes que pueden dar lugar a diversidad de fauna. Guerrero cuenta con climas cálido subhúmedo, templado, y por supuesto cálido seco, siendo el primero con mayor abundancia en el estado. (Delgado *et al*, 2004) Debido a su clima variado en el estado de Guerrero, en la parte norte crece de forma endémica la especie

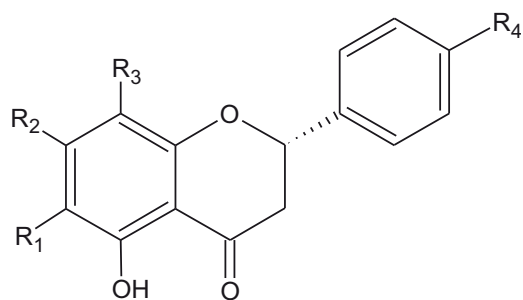
vegetal *Eysenhardtia platycarpa*, un árbol de 10 m de altura, con tronco de más de 25 cm de diámetro, (Ver figura 5), frecuentemente con corteza delgada esponjosa; plantas moderadamente pubescentes; hojas de 10 a 20 cm de largo; folíolos 15 a 25 pares, principalmente de 10 a 18 mm de largo, pubescentes o casi glabros, con muchas glándulas pequeñas, pedicelos de 1 mm de largo; cáliz de 3 a 3.2 mm de largo, siempre pubescente; corola 6 a 8 mm de largo, los lóbulos al secarse se tornan con manchas o rayas rojizas; fruto 12 a 13 mm de largo o más por 3.5 a 4 mm de ancho, glabro, glandular-punteado, ascendente en los racimos, se propaga mediante semillas (SAGARPA; Secretaria de Agricultura, Ganaderia y Desarrollo Rural 2011). Es una especie característica y abundante de la selva baja caducifolia, se distribuye en México en los estados de Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Puebla y Oaxaca. (Enciclopedia of Life. Citado: 2011; Mapa de distribución de *E. platycarpa* en la República Mexicana).



Figura 5. Especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa*

Algunos de sus usos en la medicina tradicional han sido como diurético y para el tratamiento de diabetes; también se ha descrito actividad antiséptica y se ha administrado para el tratamiento de infecciones de riñón y la vejiga en donde se encuentran implicados cuadros microbianos e inflamatorios por lo cual se considera que *E. platycarpa* potencialmente cuenta con actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

Se conoce por los pobladores de la región sur de México como "Ocoicui" "taray", "palo dulce", y "palo azul" (Narváez-Mastache *et al* 2006). La especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa* ha sido objeto de estudio anteriormente, de esos ensayos se logró el aislamiento y caracterización de 5 flavanonas isopreniladas mayoritarias a partir del extracto metanólico de las hojas y las ramas de esta especie: 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**13**) 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**14**) 5,7-dihidroxi-6-prenil-flavanona (**15**), 5,7-dihidroxi-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**16**), 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil-flavanona (**17**), entre otros compuestos como el β -sitosterol y 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol. Se han realizado estudios hipoglucemiantes y antidiabéticos sobre los extractos metanólicos de la planta *E. platycarpa* encontrándose potencial antidiabético, (Narváez-Mastache *et al*, 2006) también se han reportado estudios sobre la actividad antioxidante con diferentes métodos de extractos metanólicos y compuestos de especies del género *Eysenhardtia* que incluyen a *E. platycarpa* y de *E. subcoriacea* resultado con mejores valores el extracto metanólico de las hojas. (Narváez-Mastache *et al*, 2007; Narváez-Mastache *et al*, 2008;).



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(13)	CH ₃	OH	prenil	H
(14)	CH ₃	OH	prenil	OCH ₃
(15)	prenil	OH	H	H
(16)	H	OH	prenil	OCH ₃
(17)	prenil	OCH ₃	H	H

A partir de estos compuestos se ha realizado el presente trabajo de tesis. Las flavanonas isoprenílicas ensayadas en la tesis son las siguientes:

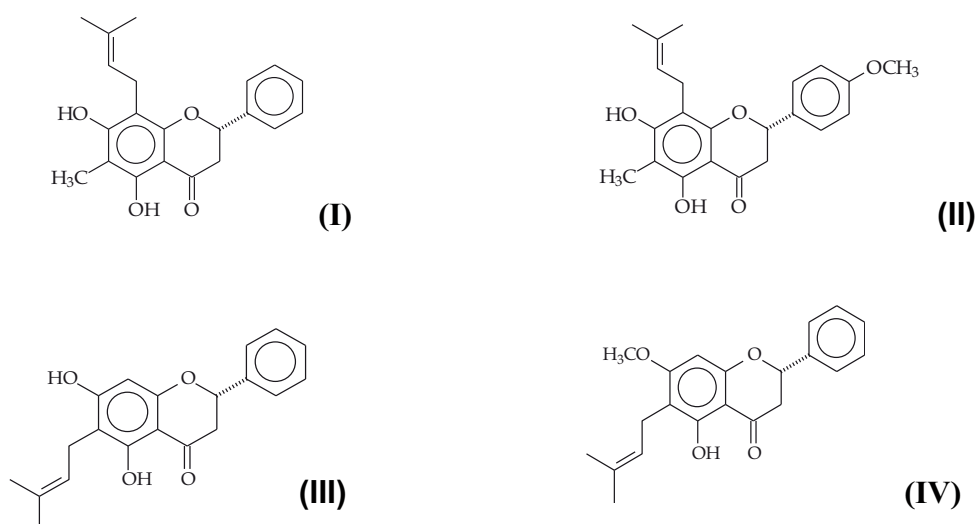


Figura 5. Flavanonas ensayadas en el presente trabajo de tesis

(I) 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona, (II) 5, 7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona, (III) 5, 7-dihidroxi-6-prenilflavanona y (IV) 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona.

Los AINEs de aplicación tópica son utilizados en el tratamiento de la inflamación y el dolor musculoesquelético que necesitan una terapia directa en el sitio de acción con el fin de eliminar la inflamación y el dolor asociados a los diferentes padecimientos. Estos antiinflamatorios tópicos son absorbidos por vía transdérmica pero que sus concentraciones son mayores en el área de aplicación y a nivel sérico y renal son muy bajas lo cual se relaciona con su perfil de seguridad sin ocasionar severos efectos adversos como lo son a nivel gastrointestinal cuando se administran por vía oral. Heyneman, et al. 2000).

Para que un fármaco a nivel tópico pueda alcanzar los tejidos blandos, hueso y articulaciones del tejido diana debe absorberse en la piel atravesando las diferentes barreras y capas de la piel que depende de las propiedades físico químicas de la sustancia activa, tipo de base, método de aplicación y forma de administración ya sea en gel, spray, parche.etc.

1.4 La piel como una vía de administración.

Desde hace algunos años se pretende obtener formulaciones de fármacos y fitofármacos para su aplicación sobre la piel que permitan conseguir un flujo lento para el tratamiento antiinflamatorio y considerar a la vía transdérmica como alternativa de la vía oral. La elección de la piel como vía de administración de fármacos se basa en las ventajas que proporciona. Evita el entorno químico agresivo del medio gástrico (pH), la formulación no presenta las contraindicaciones fisiológicas de la vía oral (vaciado gástrico, motilidad intestinal, evitan el efecto de primer paso). Permiten el uso de fármacos con margen terapéutico estrecho y permiten mantener las pautas de dosificación que suministran niveles plasmáticos terapéuticos, minimizan los efectos secundarios relacionados con los niveles plasmáticos máximos y puede interrumpirse su administración de inmediato (Villarino y Landoni, 2006).

El uso de esta vía de administración también presenta algunos inconvenientes como por ejemplo: no pueden utilizarse fármacos que requieren dosis elevadas, los fármacos pueden sufrir metabolismo cutáneo, el fármaco y/o la formulación pueden ocasionar irritación o sensibilización de la piel.

1.4.1 Características de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y comprende un área de superficie de aproximadamente 1.5 a 2 m² que protege a los órganos internos del cuerpo al actuar como una barrera efectiva contra los efectos perjudiciales del ambiente y agentes xenobióticos. Es un revestimiento de protección que además desempeña un papel importante en la regulación térmica, en la detección de estímulos exteriores y en la excreción de materiales de desecho y toxinas.

Actualmente se sabe que la piel participa activamente en la síntesis, utilización y metabolismo de proteínas, lípidos y moléculas de señalización celular, además de ser parte integral de los sistemas: inmune, nervioso y endócrino. Está constituida por tres capas histológicas (Figura 6) que del exterior al interior son: epidermis (zona externa de

células protectoras), dermis (vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas) e hipodermis (tejido subcutáneo graso).

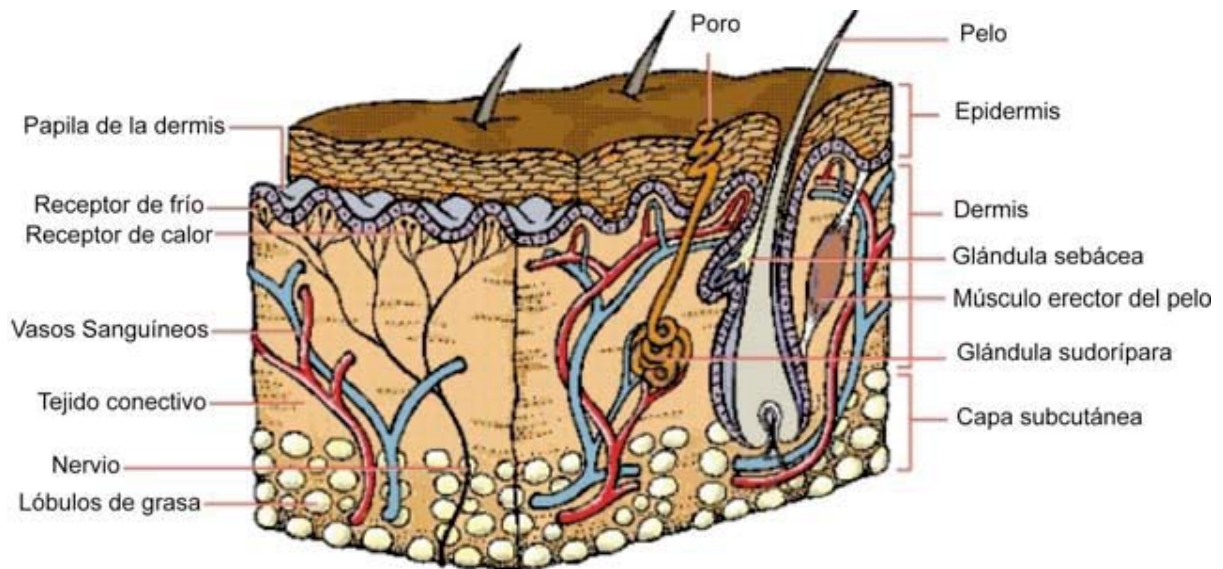


Figura 6. Estructura de la piel. (Figura extraída de Villarino y Landoni, 2006).

1.- **Epidermis:** es un epitelio plano, estratificado, queratinizado de un grueso aproximado a 0,1 mm. En esta capa se diferencia en cinco estratos de arriba abajo son: *córneo, lúcido, granuloso, espinoso, basal o germinativo*. (Figura 7). El estrato corneo está considerado la barrera que separa el organismo del medio externo, se comporta como una barrera semipermeable en la penetración de sustancias, por eso, constituye la principal barrera en la absorción percutánea de fármacos. (Elias *et al*, 1981).

La epidermis posee células de Langerhans tienen una distribución constante en toda la piel; son elementales en la presentación de antígenos y están involucradas en una gran variedad de respuestas inmunes por medio de la activación de las células T (Kanitakis, J. 2002). La piel también está constituida por melanocitos que son células productoras de pigmentos que no sólo se encuentran en la piel sino también en el pelo y los ojos, su función en la determinación del color depende esencialmente de su actividad más que del número de células presentes.

Los queratinocitos son las células más abundantes en la epidermis (representan el 80 %) y están dispuestos en 4 capas. El espesor (0.1-1 mm aproximadamente) y la estructura de la epidermis son diferentes para cada zona del cuerpo, siendo más gruesa y compleja en la piel lampiña de la palma de la mano y en la planta del pie, mientras que en otros sectores como los párpados es muy fina y sensible.

La descamación normal de los corneocitos más superficiales requiere una renovación celular constante y controlada que tiene su origen en el estrato basal de la epidermis.

El estrato córneo es la parte más externa de la epidermis y está compuesto aproximadamente un 15 % de agua, 70 % de proteínas y 15 % de lípidos. Esta capa no es homogénea en todo el organismo, existen diferencias significativas en su estructura y en su composición química en las diferentes zonas del cuerpo. Se presenta más grueso en las zonas palmar y plantar (aquí existe un estrato adicional denominado estrato lúcido); más delgado en párpados, prepucio, mejillas, abdomen y cara de flexión de las articulaciones.

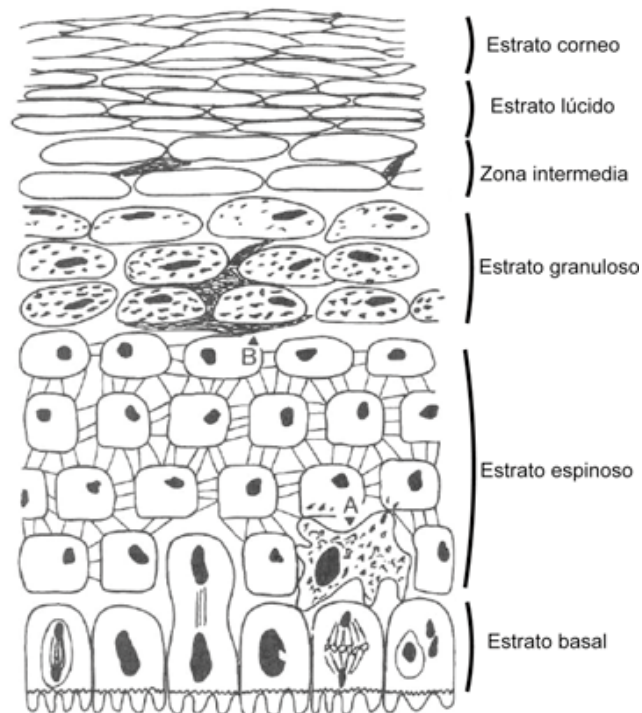


Figura 7. Estructura de la epidermis (figura extraída de Kielhorn y col., 2005).

Este estrato córneo constituye la principal barrera cutánea al paso de sustancias procedentes del medio ambiente. Esto se debe a su estructura que se describe con el modelo denominado “ladrillo y cemento” (del inglés, *brick and mortar*) (Elias *et al*, 1981). En donde los ladrillos representan la composición proteica, correspondiente a los corneocitos y el “cemento” corresponde a los lípidos intercelulares. El estrato córneo está entonces constituido por células muertas que poseen en su interior una proteína insoluble, amorfa y rica en sulfuro llamada *queratina*. Estas células están rodeadas de una capa lipídica continua constituida por ceramidas, ácidos grasos y colesterol, a la que se denomina *bicapa lipídica intercelular*. Sin embargo, la permeabilidad excepcionalmente baja del estrato córneo, no es debido sólo a la composición lipídica, sino también, a su morfología única que genera un camino difícil para la difusión.

Estrato Granuloso: El proceso de diferenciación de las células del estrato espinoso conduce a la formación del estrato granuloso, aquí las enzimas comienzan con la degradación del núcleo y los organelos. En ellas abundan unas estructuras ovoides bien delimitadas y de reducido tamaño que poseen un elevado contenido lipídico, denominadas cuerpos lamelares.

Estrato Espinoso: Esta capa debe su nombre a la morfología que le confiere la existencia de numerosas estructuras proteicas intra y extracelulares denominadas desmosomas, constituidas por diversas moléculas de adhesión que unen células adyacentes (Elias *et al*, 1981).

Estrato germinativo o basal: se encuentra en contacto con una membrana constitutiva de la unión dermoepidérmica en la zona de separación entre la epidermis y la dermis, presenta una intensa actividad mitótica.

2.-Dermis: Está constituida por un número reducido de células, principalmente fibroblastos y mastocitos. Consta de una matriz que contiene proteínas fibrosas entrelazadas (colágeno, elastina y reticulina) embebidas en una sustancia fundamental amorfa de mucopolisacáridos. Histológicamente dividida en dos capas: la capa papilar (*stratum papillare*) y la capa reticular (*stratum reticulare*). En esta

capa es donde podemos encontrar los corpúsculos sensoriales responsables de transmitir las sensaciones de calor, frío y dolor al cerebro. En la parte inferior de la dermis se originan los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y sudoríparas, que forman junto con las uñas, los anexos cutáneos

3.- **Hipodermis:** Capa de tejido conjuntivo especializado donde se encuentran los adipositos que sintetizan gran cantidad de lípidos que constituyen el tejido adiposo de espesor variable. Es un tejido graso que representa la parte más profunda de la piel que se extiende bajo la superficie de la dermis a lo largo de todo el cuerpo, con excepción del aparato genital masculino y los párpados. Desempeña un papel importante en la termorregulación, aislamiento, provisión de energía y protección contra daño mecánico. Los adipocitos son grandes células redondas con el citoplasma saturado de lípidos (triglicéridos, ácidos grasos) y son las principales células de este tejido (Kanitakis, J. 2002). Por lo que, la naturaleza, estructuración, características y comportamiento de la piel han propiciado su elección como una vía de administración de fármacos. De tal manera que la penetración percutánea de fármacos se puede producir por vía **transepidérmica** que se lleva a cabo por difusión a través de la capa córnea o **transpendicular** que puede ser transfolicular (por folículos pilosos y glándulas sebáceas) o transudorípara (por conductos y glándulas sudoríparas) (Figura 8).

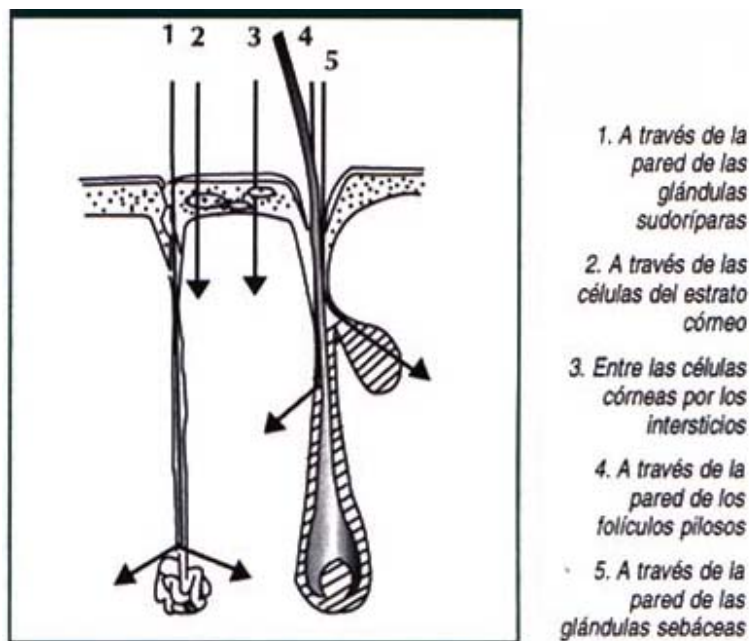


Figura 8. Vías de penetración a través de la piel. Extraída de Pareja, B. (1998).

A través de las glándulas sudoríparas y del sistema pilo sebáceo (vía transpendicular) se evita el paso del fármaco por el estrato córneo, pero estos anexos representan 1 % de la superficie de la piel por lo que la contribución al proceso de absorción resulta un tema muy discutible.

La penetración a través del estrato corneo (vía transepidérmica) constituye el camino más importante en la penetración cutánea (Figura 9). Esta se produce por difusión intercelular o intracelular

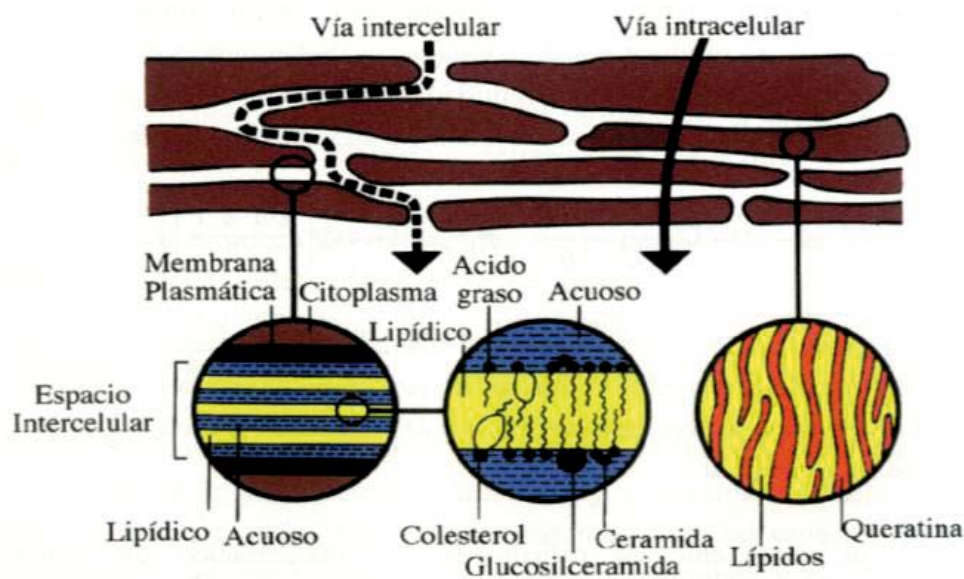


Figura 9. Vía transdérmica (Figura extraída de Barry, B.W. 2001).

En la vía intercelular, el fármaco atraviesa el estrato corneo siguiendo un camino a través de los lípidos de la matriz intercelular. Esta vía se considera menos importante ya que el fármaco tiene que salvar la impermeabilidad de los corneocitos, unido a repetidos repartimientos del propio principio activo entre las regiones hidrófilas y lipófilas de las bicapas lipídicas del estrato corneo (Aulton , ME, 2004).

La principal vía de penetración de fármacos en la piel es a través del estrato córneo que resulta ser un proceso lento, seguido de una rápida difusión a través de la epidermis viable y la dermis papilar.

La primera etapa del proceso de penetración es la disolución del fármaco y su liberación de la formulación, siendo este el paso limitante del proceso. Una vez liberado el principio activo se lleva a cabo el reparto del fármaco en el estrato córneo, sitio en el que

alcanza el equilibrio. La penetración desde la formulación hasta la circulación sistémica o tejidos locales involucra múltiples procesos (Figura 10).

1. Disolución del fármaco y su liberación de la formulación.
2. Reparto del fármaco en el estrato córneo.
3. Difusión a través del estrato córneo, principalmente por vía intercelular.
4. Reparto del fármaco entre el estrato córneo y la epidermis viva.
5. Difusión, a través de la epidermis, hasta la dermis.
6. Paso a la red capilar local, a través de la pared del vaso sanguíneo y, eventualmente, paso a la circulación sistémica.



Figura 10. Etapas de la absorción transepidermal. Extraída de Pareja, *et al* (1998).

Los fármacos antiinflamatorios que se encuentran en el de principios activos como piroxicam, diclofenaco, ketoprofeno tienen presentaciones de geles, cremas o lociones. Sin embargo, se buscan nuevas formas de administración en el que se utilicen menores dosis, se disminuya la frecuencia de dosificación y se alcance mayores concentraciones en el sitio de acción. Es por ello que, la aplicación de todo el contenido antes mencionado nos lleva al diseño de nuevas formulaciones a partir de principios activos de origen natural.

1.5 Sistemas de liberación controlada

De forma simultánea a la investigación de nuevas moléculas de fármacos o de su mejora, la investigación y desarrollo galénico lleva a cabo trabajos dirigidos a la búsqueda de novedosas formas de administración. Estas nuevas formas de administración son las llamadas formas farmacéuticas de liberación modificada que son aquellas diseñadas de tal manera que se modifica la velocidad o el lugar de liberación del principio activo respecto a las formas farmacéuticas de liberación inmediata del mismo principio activo. Los sistemas de liberación modificada incluyen todas aquellas formulaciones en su diseño intervienen, de una u otra forma, modificaciones en el proceso tecnológico que son determinantes del lugar de liberación; formas o sistemas de liberación.

En este sentido se encuentran los sistemas de liberación controlada son aquellos permiten la prolongación del tiempo de cesión del principio activo del medicamento a partir de la forma de dosificación, y, además, controlan su liberación para que ésta se realice de acuerdo con una cinética preestablecida y reproducible con lo que se consigue una mayor duración de los niveles plasmáticos eficaces y una liberación del principio activo definida y reproducible.

Las posibilidades de la formulación farmacéutica en el futuro parecen ilimitadas y están asociadas al desarrollo tecnológico que tiene tan alto impacto en nuestra sociedad en el comienzo del nuevo milenio. Los momentos actuales son considerados críticos para la industria farmacéutica innovadora, al haber descendido, de forma alarmante, el número de nuevas entidades químicas que hagan aportaciones interesantes en los diferentes campos de la terapéutica. Por ello, la Tecnología Farmacéutica se encuentra en una situación inmejorable para aplicar su potencial en el desarrollo de nuevas formulaciones que permitan mejorar el perfil terapéutico de los medicamentos (Domínguez-Gil *et al*, 2009). Las principales compañías especializadas en estas formas de liberación modificada se muestran en la tabla 1 y la previsión de ventas se ejemplifica en la tabla 2:

Tabla 1. Compañías especializadas en formulación de liberación modificada. Extraída de Domínguez-Gil A, & Martín Suárez A. (2009).

<i>Compañía</i>	<i>Tecnología</i>	<i>Descripción del producto</i>
NanoSpectra Biosciences (Houston, TX)	Nanopartículas	Nanopartículas en terapias oculares.
Sontra Medical Corporation (Franklin)	Tecnología ultrasonidos	Sono Prep ¹ ultrasonidos vía transdérmica.
MacroMed Inc. (Sandy, UT) EE.UU.	Microesferas PLGA	Mejoras en la biodisponibilidad
Neurotech SA (Evry) Francia	Células encapsuladas	Microencapsulación de células humanas
CellMed (Alzenau, Alemania)	Células encapsuladas	Terapéutica ocular y tumoral
MicroCHIPS Inc. (Bedford, MA) EE.UU.	Microchips	Dispositivos microfabricados. Vía parenteral
Nektar Therapeutics (S. Carlos, CA) EE.UU.	Pegilación	PEG-proteínas, oligonucleótido
Insert Therapeutics (Pasadena, CA) EE.UU.	Ciclodextrinas	Complejos con ciclodextrina
ALZA (Mountain view, CA) EE.UU.	Nanotecnología	Doxil ¹ nanopartículas-PEG
Advectus Life Sci (W Vancouver) EE.UU.	Nanotecnología	Citotóxicos para tumores cerebrales
Eurand (Nogent-Cedex). Francia	Glytech	Inhibición o bloqueo reversible de la P-glicoproteína

Tabla 2. Previsión de ventas de formulaciones de liberación controlada en EE.UU. Extraída de Domínguez-Gil *et al* (2009).

	<i>2001</i>	<i>2002</i>	<i>2003</i>	<i>2008</i>	<i>IMA (%)</i>
Formulaciones de liberación controlada (vías oral, inyectable y tópica)	17.710,2	19.482,8	21.475,6	34.102,6	9,7
Implantes y dispositivos intrauterinos	1.000	1.185	1.387,2	2.485,4	12,4
Fármacos de liberación transdérmica	2.010,3	2.311,9	2.648,1	4.485,4	11,1
Vectorización de fármacos	6.271,3	7.309,2	8.317,7	15.471,9	13,2
Fármacos de liberación transmucosa	7.358,8	8.409,9	9.714,8	17.713,6	12,8
Otros	107,8	119,5	131	211,1	10
Total	34.458,4	38.818,3	43.674,4	74.470	11,3

* Incremento Medio Anual.

Si bien observamos que existen varias compañías importantes trabajando en este tipo de formulación ya que las expectativas de obtener importantes resultados son altas. Los intereses de estas empresas se basan en los propósitos de los sistemas de liberación modificada que se muestran a continuación:

- Aprovechar totalmente la cantidad de fármaco administrada mediante la reducción al máximo de la dosis incluida en el medicamento.

- ✚ Disminuir o eliminar el riesgo de efectos no deseados (secundarios y tóxicos) de los medicamentos.
- ✚ Mejorar la pauta posológica buscando los siguientes objetivos: una vía de administración más cómoda y la reducción del número de tomas/día, en el intento de conseguir una dosis única cada veinticuatro horas, y tanto mejor cuanto los intervalos de tiempo sean cada vez más amplios.

En estos sistemas de liberación, el principio activo (p.a.) se encapsula o se incorpora en un sistema para obtener su liberación a una velocidad conocida que puede implicar prolongar su acción, conseguir la liberación del p.a. directamente en el lugar de acción de manera constante y a una concentración adecuada y finalmente, conseguir la protección del p.a. frente a la degradación enzimática.

El objetivo de la encapsulación es el control del principio activo liberado, obteniéndose así una mayor efectividad y eficiencia en la administración de la misma. Los soportes usados en estos procesos de encapsulación pueden ser polímeros, hidrogeles, emulsiones, liposomas y materiales inorgánicos.

Los liposomas son vesículas microscópicas esféricas, de 20 a 30 nanómetros de diámetro. Están rodeadas por una membrana compuesta de un fosfolípido y un colesterol bicapa, que envuelve a una sustancia acuosa de tal manera que sirven para transportar esta sustancia. Como su membrana es similar a las membranas celulares, los liposomas pueden incorporarse a células vivientes y depositar en ellas su contenido; al tener una capa externa de tipo graso, son absorbidos con facilidad por la piel, con lo que la distribución del p.a que contienen es mucho más eficaz y se necesita en menores cantidades que si se vertiera directamente sobre la piel.

Un hidrogel es una red tridimensional conformada de cadenas flexibles de polímeros que absorben cantidades considerables de agua. Estos polímeros tienden a ser hidrófilos, blandos, elásticos e insolubles en agua además de que se hinchan en

presencia de ella, aumentando apreciablemente su volumen mientras mantienen la forma hasta alcanzar el equilibrio físico-químico. Adicionalmente, pueden tener gran resistencia mecánica de acuerdo al método con el que se obtengan.

1.5.1 Nanoemulsiones

La nanoemulsiones son dispersiones coloidales translucidas de dos líquidos inmiscibles estabilizadas por un tensioactivo, con un tamaño de gota comprendido entre los 20 y los 200 nm en donde uno de los dos líquidos es disperso en forma de pequeñas gotas en el otro (Bechner P. 2001). Este pequeño tamaño de gota hace que la nanoemulsión posea una elevada estabilidad cinética, frente a la sedimentación, floculación y coalescencia. Sin embargo, a pesar de su elevada estabilidad cinética, son termodinámicamente inestables, siendo necesaria la aportación de energía para su formación (Solans *et al*, 2005).

Las emulsiones pueden ser convenientemente clasificadas de acuerdo a la distribución del espacio relativo del aceite y la fase acuosa. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa es llamado emulsión aceite-en-agua (o/w), mientras el sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa es llamado emulsión agua-en-aceite (w/o) y también existen las bi-continuas (Bhatt *et al*, 2011).

Ventajas de las nanoemulsiones:

1. Las nanoemulsiones tienen una mayor área de superficie y energía libre por lo cual se convierten en un sistema de transporte eficaz.
2. No muestran los problemas de formación de crema inherente, floculación, coalescencia y sedimentación.
3. Pueden ser formuladas en una variedad de formulaciones, tales como espumas, cremas, líquidos y aerosoles.
4. No son tóxicas ni irritantes por lo tanto pueden ser fácilmente aplicadas a la piel y a las membranas mucosas.

5. Se pueden administrar por vía oral si la formulación contiene agentes tensioactivos que son biocompatibles.
6. No dañan a las células sanas de humanos y animales, por lo tanto, son adecuadas para fines terapéuticos humanos y veterinarios.
7. Se pueden aplicar como sustitutos de liposomas y vesículas, y es posible construir fases laminares cristalinas líquidas alrededor de las gotitas de nanoemulsión.
8. Debido a su pequeño tamaño, las nanoemulsiones pueden penetrar a través de la superficie "rugosa" de la piel y esto mejora la penetración de los principios activos.

Los excipientes utilizados para la preparación de las nanoemulsiones deben ser seguros, no tóxicos y no irritantes, según los que aparecen en la lista de componentes generalmente reconocidos como seguros (Generally Regarded As Safe, GRAS y Gattefosse patented technology. "Microemulsions: Formulation Guide). Un punto crítico es la elección del tensioactivo ya que suelen ser irritantes y se encuentran en altas concentraciones en la formulación para poder estabilizar el sistema coloidal.

Para la elaboración de las nanoemulsiones, en primer lugar se selecciona la fase oleosa que es la responsable de la solubilización de fármacos hidrófobos. En este caso es conveniente seleccionar el aceite en el cual el fármaco presente una mayor solubilidad. Así pues para la selección de esta fase, se realiza un screening de aceites. Posteriormente se selecciona el tensioactivo apropiado.

Con el fin de racionalizar el comportamiento de los tensioactivos se determina su balance hidro-lipofílico (HLB). Este tiene en cuenta la contribución relativa del fragmento hidrófilo e hidrófobo en la molécula del tensioactivo. Los tensioactivos con HLB altos (8-18) se consideran solubles en agua, y favorecen la formación de emulsión de fase externa acuosa. Los tensioactivos de bajo HLB (3-6) se consideran lipófilos y favorecen la formación de emulsiones de fase externa oleosa. Los co-tensioactivos, son tensioactivos generalmente alcoholes o ésteres alcohólico de cadena corta, que se añaden con el fin de reducir aún más la tensión interfacial, facilitando la emulsificación del sistema (Devarajan y Ravichandran, 2011). La adición de un co-tensioactivo, generalmente aumenta la estabilidad del sistema y la solubilidad del compuesto en el mismo.

En general, se eligen tensioactivos no iónicos (ésteres de glicerol, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos), por su buena tolerabilidad biológica así como por su habilidad para formar nanoemulsiones independientemente del pH y a la concentración de electrolitos en la fórmula (Djordjevic y cols.2004). También se pueden encontrar tensioactivos aniónicos (ácidos carboxílicos, sulfonatos, etc.) y catiónicos (aminas y sales de amonio cuaternario, etc.) (Devarajan *et al*, 2011).

Normalmente las nanoemulsiones contienen grandes cantidades de tensioactivos. Esto hace que posean una muy baja tensión interfacial, facilitando la obtención de tamaños de gota nanométricos que aseguran una excelente superficie de contacto entre la piel y el vehículo (Kreilgaard, M. 2002). En la tabla 3 se muestran ejemplos de los componentes de las nanoemulsiones.

Tabla 3. Componentes de las nanoemulsiones. Gattefosé patented technology. “Microemulsions: Formulation Guide”. Saint-Priest Cédex FRANCE

Componentes de las nanoemulsiones	
Aceite	Ejemplos
Emulsionantes	Aceite de ricino, aceite de maíz, aceite de coco, aceite de onagra, aceite de linaza, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de cacahuete
Aditivos	Lecitinas naturales de origen vegetal o animal, fosfolípidos, derivados de aceite de ricino, polisorbatos, estearilamina.
Antioxidantes	Propilenglicol, 1, 3-glicol de butileno, glicol de butileno, azúcares tales como glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa.
Surfactante	Ácido ascórbico, α-tocoferol.
Co-surfactante	Polisorbato 20, Polisorbato 80, polioxi 60, aceite de ricino, monooleato de sorbitán, PEG300, glicérido caprílico.
Modificadores de la tonicidad	Etanol, glicerina, PEG300, PEG400, polieno glicol, poloxámero.
Agente de ajuste del pH	Glicerol, Sorbitol and xilitol.
Conservantes	Hidróxido de sodio o cloruro de hidrógeno.

1.5.2 Nanopartículas

Las nanopartículas son sistemas coloidales con tamaños que oscilan entre 10 y 1000 nm obtenidos a partir de polímeros que pueden incorporar el fármaco en su interior, o bien, quedar adsorbido. La estructura de las partículas puede ser de tipo matricial o de tipo vesicular dependiendo de que el fármaco esté incorporado en la red polimérica o rodeado o formando un núcleo; las primeras reciben el nombre de “*nanoesferas*” y las segundas de “*nanocápsulas*”.(Figura 11). Así pues, se pueden obtener nanoesferas de tipo matricial y nanocápsulas de tipo vesicular, formadas por un núcleo lipídico rodeado por una fina capa de material polimérico constitutivo (Zimmer A y Kreuter J. 1995).

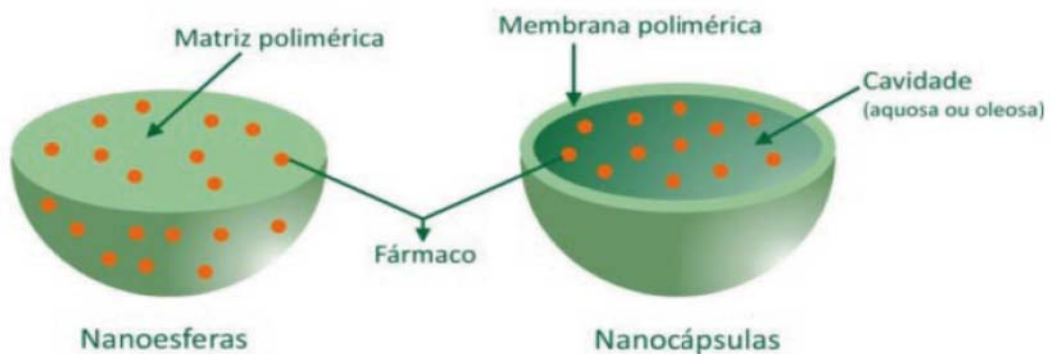


Figura 11. Sistemas nanoparticulares. (Extraída de Lima P. 2013)

Una gran variedad de fármacos pueden ser administrados utilizando vectores nanoparticulados. Así, las nanopartículas se pueden emplear para la liberación de sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Además pueden ser formuladas para que su liberación sea dirigida a determinados tejidos u órganos, como por ejemplo al cerebro, pulmones, hígado, bazo, sistema linfático, entre otros. Por lo tanto, las ventajas de este tipo de nanopartículas formuladas con poliésteres son las de ofrecer una protección al principio activo en las condiciones biológicas y permitir una liberación sostenida en el tiempo evitando así administraciones repetidas, lo que conlleva una mayor comodidad para el paciente.

Al considerar el uso de nanopartículas poliméricas para una determinada vía de administración de fármacos, el tamaño de las partículas y la eficiencia de encapsulación son dos de las características más importantes de la formulación.

La producción de nanopartículas tiene muchas variables independientes. Un parámetro clave es el tensioactivo. Una amplia gama de moléculas sintéticas y naturales con diferentes propiedades, se ha propuesto para la preparación de nanopartículas. Como ejemplo de emulsionantes naturales se pueden citar dipalmitoil- fosfatidilcolina, bromuro de didodecil dimetil amonio, y como tensioactivos el Pluronic F68 y Pluronic F108.

Con respecto al polímero de las nanopartículas, cabe mencionar que el polímero utilizado para formular las nanopartículas también afecta de manera importante a la estructura, propiedades y aplicaciones de las partículas. Es así que no existe un polímero único para todos los fármacos. En la tabla 4 se muestran algunos de los polímeros que se han utilizado para vehicular fármacos.

Tabla 4. Polímeros utilizados en la vehiculización de fármacos.
Extraída de LLabot *et al*, 2008

Ejemplos de polímeros utilizados en la vehiculización de fármacos		
Polímero	Fármaco	Tamaño (nm)
PLGA	Doxorubicina	200
PLGA/PLA/PCL	Isradipina	110-208
PLGA	U-86983	88-144
PLGA	Prociana	164-209
PLGA	Insulina	>1 μ
PLGA	Hemaglutinina	~250
PLGA-PEG	Cisplatino	133-163
PLGA	Haloperidol	800
PLGA	Estrógeno	~100
PEO-PLGA	Plaquitaxel	150
PECA	Amoxicilina	320
PLA	Toxoide tetánico	>200

* PEO: poli(etilen-oxido)
**PCL: poli(epsilon-caprolactona)

Entre los poliésteres utilizados en el desarrollo de nanopartículas destacan los poliésteres alifáticos, formados por una sucesión, bien de unidades monoméricas de ácido láctico o bien de dímeros láctico-co-glicólico. Estos biopolímeros han sido aprobados por la FDA para elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos como la fabricación de suturas biodegradables. El L-PLA y el PLGA son compuestos que corresponden respectivamente al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a copolímeros lineales del D,L ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables. La copolimerización del PLGA (Ácido poli-láctico-co-glicólico) puede ser llevada a cabo por dos rutas distintas de síntesis: 1) policondensación del ácido láctico y del ácido glicólico a temperatura superior a 120 °C, o por debajo de esta temperatura en presencia de catalizadores, obteniéndose así PLGA de bajo peso molecular ($PM < 10.000$ Da); 2) polimerización vía apertura de los dímeros cíclicos de los dos respectivos ácidos, resultando en copolímeros de alta masa y mejores propiedades mecánicas. Por otro lado, el peso molecular de PLA/PLGA es un parámetro que influye en la homogeneidad de la muestra. En general, polímeros de elevado peso molecular dan lugar a sistemas nanoparticulados con un bajo índice de polidispersión.

Las nanopartículas biodegradables de PLGA han sido utilizadas como vectores para la liberación controlada de proteínas, péptidos, vacunas, genes, factores de crecimiento, etc. El PLGA presenta ventajas y desventajas como biomaterial para la encapsulación de macromoléculas terapéuticas. La degradación del PLA/PLGA, que ocurre por hidrólisis no enzimática, puede dar lugar a una acumulación de sus monómeros ácidos, lo que resulta en la reducción del pH local y consecuente desnaturalización de proteínas encapsulada. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de toxicidad de sus productos de degradación y su modulable velocidad de degradación hacen del PLGA el poliéster más utilizado en formulaciones nanoparticuladas de aplicación terapéutica (Figura 12). Otra importante ventaja del PLGA sobre el L-PLA, es que al presentar una velocidad de degradación más rápida, la probabilidad de que ocurran reacciones adversas debido a fragmentos cristalinos liberados por estos últimos, es menor (Rocha, F. *et al*, 2009).

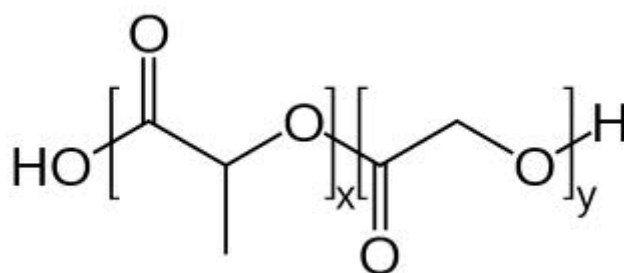


Figura 12. Estructura química del ácido poli (*D,L*-láctico-co.glicólico)(PLGA) donde **x** es el número de unidades de ácido láctico y **y** el número de unidades de ácido glicólico.

Otra característica de las nanopartículas de sumo interés es el potencial zeta, el cual es una medida de la carga de la partícula, como tal, y cuanto mayor es el valor absoluto del potencial zeta mayor es la cantidad de carga de la superficie (LLabot, JM. *et al*, 2008.)

Si bien se han realizado muchas investigaciones sobre nanopartículas y se han logrado vehiculizar fármacos que ya se encuentran comercializados. En 2005 se introdujo en el mercado Abraxane® y en el 2007 Nanoxel® ambos medicamentos contienen nanopartículas de paclitaxel (anticancerígeno derivado de producto natural). (Newman DJ 2012).

También se han llevado varias investigaciones sobre nanoformulaciones de productos naturales:

- ✚ En un estudio de *Phaleria macrocarpa* [Scheff]. Boerl que corresponde a una especie de Indonesia cuenta con aprecio etnomédico para el tratamiento de diabetes y cáncer, además de contar con propiedades diuréticas; los compuestos mayoritarios del extracto metanólico de las hojas de esta especie corresponde a flavonoides, uno de los principales es luteolina, el cual fue encapsulada en micelas de caseína logrando obtener nanocápsulas de tamaños de partícula promedio de 109 nm (Sahlan, M y Pramadewi, I. 2012).

- ✚ Por otra parte, para luteolina se ha desarrollado un método por HPLC para cuantificar la cantidad absoluta de recuperación y eficiencia de encapsulación, así como la cinética de liberación de diferentes formulaciones de suspensiones coloidales, logrando tamaños de partícula menores de 185.5 nm y superficies regulares esféricas con mayor homogeneidad y dispersiones bajas, así mismo, para las nanopartículas y nanoesferas formadas se reconoció que cuentan con un mecanismo de liberación de difusión pura según el modelo de Korsmeyer-Peppas's (Phul *et al*, 2011).
- ✚ En el área de la quimioprevención se contemplan agentes naturales como flavonoides, taninos, curcuminas entre otros polifenoles que supriman, inviertan o impidan el desarrollo del cáncer. Estos compuestos en pruebas de laboratorio han resultado eficaces; sin embargo, al trasladarlo a la clínica surgen fallos en lo referente a su ineficacia sistémica y robusta biodisponibilidad; por ello los esfuerzos científicos se han enfocado en las últimas dos décadas al desarrollo tecnológico a partir de formulaciones nanoestructuras como encapsulaciones de diferentes agentes anticancerígenos de origen natural (Muqbil *et al*, 2011).
- ✚ Se han preparado nanopartículas del triterpeno pentacíclico ácido boswélico por el método controlado de nanoprecipitación logrando tamaños de partícula de 200 nm de forma esférica mismas que fueron ensayadas sobre líneas celulares de cáncer, encontrando selectividad sobre cáncer de próstata; además se logró evidenciar *in vitro* que el ácido boswélico formulado en las nanopartículas preparadas causa la fragmentación del ADN que resulta un contraste de apoptosis para la célula cancerígena en cuestion (Uthaman *et al*, 2012).
- ✚ Finalmente, la epigallocatequina-3-galato ha sido encapsulada en PLA-PEG y evaluada su eficacia contra el cáncer de próstata humano tanto *in vitro* como *in vivo* observándose una mejora en la dosificación ya que se

disminuye en un rango de 10 veces obteniendo una eficacia significativa (Sanna 2011).

1.6 Permeación transdérmica

En un sentido amplio la liberación transdérmica incluye todos los fármacos administrados de forma tópica cuyo objetivo es ingresar a la circulación sistémica. La colocación de pomadas, lociones o cremas sobre la piel intacta, obtiene grandes variaciones en la magnitud y duración del efecto farmacológico, así como niveles sanguíneos muy variables, debido a las diferencias en la permeabilidad intrínseca de la piel y sus condiciones, y la naturaleza del vehículo. (Kligman AM 1984). Los Sistemas Terapéuticos Transdérmicos (STT) propiamente dichos son sistemas de liberación sostenida; y por tanto, su objetivo es el de suministrar el medicamento a la velocidad necesaria para conseguir y mantener una concentración plasmática constante. El método transdérmico no sólo permite una administración del fármaco controlada y constante sino que además permite una entrada continua del fármaco con tiempos biológicos de vida media cortos y evita una entrada pulsada en la circulación sanguínea, lo que causa con frecuencia efectos secundarios no deseados (Verma *et al*, 2000). De esta manera, Una de las principales ventajas, es que permite obtener niveles constantes del fármaco en la sangre, evitando así las reacciones adversas asociadas a las fluctuaciones en las concentraciones sanguíneas.

Existen factores biológicos y fisicoquímicos que afectan la absorción y la velocidad de absorción. En los factores biológicos uno de los aspectos a tener en cuenta es el estado de la piel; las lesiones cutáneas, la hidratación de la piel, la región anatómica y la edad de la persona.

Con respecto a los factores fisicoquímicos generalmente en los sistemas de liberación controlada, la velocidad de liberación puede estar afectada por las propiedades del polímero del que está compuesto el vehículo/transportador.

Otro factor es el pH debe ser tenida, ya que la proporción en la que se encuentra ionizada la molécula depende tanto de su pKa como del pH del medio, sólo la forma no ionizada del p.a es capaz de atravesar la membrana lipídica en cantidades significativas, la forma ionizada también puede hacerlo aunque en menor grado.

La lipofilicidad/hidrofilicidad de un compuesto también influye en la afinidad relativa que presenta un soluto por el vehículo que lo contiene y la membrana a través de la cual difundirá, y puede evaluarse mediante el coeficiente de partición ($\log P$) (Schoenwald *et al* 1978).

1.6.1 Métodos de estudio de permeación transdérmica

Para determinar si la vía transdérmica puede ser una alternativa a la vía oral, para una serie de fármacos que cumplen los requisitos básicos para ser formulados en forma de sistema de administración transdérmica, se usan dos tipos de métodos de estudio: *in vivo* y método *in vitro*.

En los métodos *in vivo*, la capacidad de penetración de formulaciones o fármacos aplicados localmente es estimada evaluando las concentraciones alcanzadas en la circulación sistémica u orina. La biopsia cutánea representa otro método que permite evaluar la cantidad de fármaco que penetra a través de las diferentes estructuras de la piel en función del tiempo. Tanto estos como otros métodos *in vivo* presentan ventajas y desventajas a la hora de la cuantificación que pueden ser solventadas con la combinación de una o más técnicas para un estudio más completo.

Los métodos *in vitro* aplicados al estudio de la penetración de principios activos representan las técnicas más difundidas. En estos métodos se utilizan tanto piel animal o humana como membranas artificiales (piel artificial) (Villarino, N. y Landoni, M. F. 2006).

El fenómeno de penetración o permeación de un fármaco a través de la piel es un proceso complejo en el cual influyen gran cantidad de factores. Este fenómeno está limitado por la difusión del principio activo a través del estrato corneo, dado que este actúa como un medio de difusión pasiva según las leyes de difusión de Fick.

En los estudios de permeación transdérmica se relacionan normalmente la variación de la concentración del principio activo en función del tiempo. Al construir una curva (Figura 13) con estas variaciones es posible aplicar las leyes de Fick y obtener los parámetros de que reflejan la penetración como, flujo del principio activo (J) y constante de permeación o penetrabilidad (K_p).

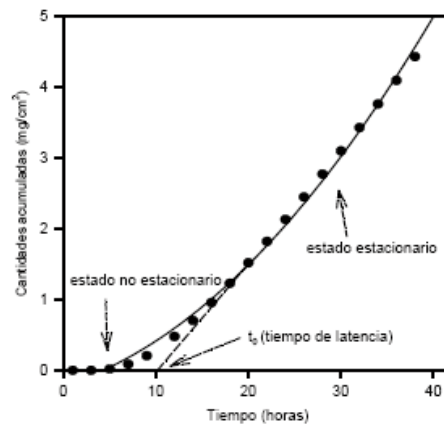


Figura 13. Representación de la función de permeación simulada correspondiente a la cantidad permeada acumulada en función del tiempo.

La pendiente de la recta que relaciona la cantidad del principio activo permeado en función del tiempo equivale al flujo J ($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^2$). Las características del principio activo que mayoritariamente influyen sobre la velocidad de permeación son su reparto (K) y su difusión (D) a través de la membrana. El producto de los dos coeficientes que cuantifican estas propiedades (K y D) por unidad de espacio recorrida (L) de la membrana se define como coeficiente o constante de permeabilidad (K_p). El cálculo directo de K_p en función de D , K y L resulta difícilmente viable así que con algunas sustituciones y conociendo el valor del flujo se puede estimar el valor de la constante de permeabilidad K_p sabiendo la concentración del principio activo en el compartimento donador (C_0) con la ecuación:

$$J = K_p C_0$$

Se puede observar que la curva es convexa en los primeros tiempos del proceso y después se transforma en una línea recta. Esto es debido a que en los primeros tiempos no se encuentra en estado de equilibrio estacionario. En función del tiempo, la velocidad de permeación es constante, la curva es prácticamente lineal y se llega a un estado de equilibrio (puntos que forman una recta).

Si se extrapola la recta representativa de la permeación en estado de equilibrio estacionario hasta el eje de las abscisas, el valor de la cantidad de activo acumulada es cero y el tiempo en el cual se cumple este es igual al tiempo de latencia (TI) (punto de intersección de la recta con el eje de las abscisas). En consecuencia, el tiempo de latencia indica el tiempo que tarda, desde el inicio de la experiencia, en llegar al estado de equilibrio estacionario.

La resolución de las ecuaciones que describen el modelo de permeación de fármacos mediante transformadas de Laplace conducen a ecuaciones que describen la acumulación de soluto en el compartimiento receptor; en estas ecuaciones aparecen nuevas variables, por tanto para que estas resulten operativas se re-expresan utilizando los siguientes parámetros:

$$P_1 = (K)(L)$$
$$P_2 = \frac{D}{L^2}$$

De aquí que:

$$K_p = (P_1)(P_2)$$
$$TI = \frac{1}{6}(P_2)$$

Estos cálculos se realizan con un programa informático que opera para la regresión no lineal de mínimos cuadrados por la aplicación de transformadas de Laplace. La finalidad es poder hacer una predicción de las concentraciones verdaderas de un principio activo en un individuo en un estado estacionario.

1.6.2 Estudios de liberación

El uso de membranas artificiales tiene un interés en los ensayos de cesión de principios activos desde sus formulaciones semisólidas o fluidas durante la fase inicial del desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas. Se debe trabajar con un tipo de membranas que minimice al máximo la resistencia de paso del principio activo con el objetivo de determinar con confianza la influencia de las emulsiones a la cesión del principio activo.

Para determinar la cinética que mejor explica el proceso de cesión en la piel en cada formulación, se ajustan los datos experimentales a modelos matemáticos que intentan describir el curso evolutivo del proceso de difusión. Las más adecuadas son las funciones de orden cero, orden uno, Higuchi con base fisicoquímica y Weibull sin base físico-química y Korsmeyer-Peppas (Costa, P. 2001) Las expresiones matemáticas de estas funciones son las siguientes:

$$\text{Función de orden cero: } Q_t = K_d(t - t_0)$$

Donde:

Q_t = cantidad del principio activo disuelto en el tiempo t .

K_d = constante de velocidad de la cesión

t_0 = periodo de latencia

$$\text{Función de orden uno: } Q_t = Q_\infty \left(1 - e^{-K_d(t-t_0)}\right)$$

Donde:

Q_∞ = es la cantidad máxima susceptible de cederse

$$\text{Función de Higuchi: } Q_t = A + K(t)^{\frac{1}{2}}$$

Donde

A = ordenada al origen

K = constante de velocidad de la cesión

$$\text{Función de Weibull: } Q_t = Q_\infty \left[1 - e^{-\left(\frac{t}{t_d}\right)^\beta} \right]$$

Donde:

t_d = tiempo que necesita para ceder el 63.2 % de la cantidad máxima del principio activo susceptible a cederse.

β = parámetro adimensional.

$$\text{Función de Korsmeyer-peppas: } Q = At^n$$

Donde:

A = es una constante cinética.

n = exponente de difusión o liberación y debe ser menor que 0.45.

t = tiempo en horas.

Los ajustes de las funciones llamadas se han de realizar por regresión no lineal mediante el programa WinNolin (Software, 2000) adaptado a un ordenador. Como el criterio discriminatorio del modelo se ha de utilizar el criterio de información de Akaike (AIC) basado en la ecuación:

$$AIC = n \ln SSQ + 2p$$

Donde:

n = nombre de las parejas de valores experimentales.

SSQ = suma de los mínimos cuadrados de los residuales.

p = nombre de los parámetros de la función ajustada.

Este criterio se basa en el hecho de que los valores residuales han de estar distribuidos aleatoriamente y la suma de sus cuadrados (SSQ) ha de ser mínima. Se debe tener en cuenta que cuanto mayor es el nombre de los parámetros de la función ajustada (p), mayor será la posibilidad de que siga menor el valor de SSQ.

La función que presente el menor valor de AIC es la que estadísticamente explica mejor el proceso de difusión estudiado.

Para poder realizar este análisis no lineal, se han de hacer aproximaciones del comportamiento de los datos en cada uno de los modelos. Para ello es necesario hacer un análisis por regresión lineal y así obtener los parámetros que describen cada modelo.

Las ecuaciones lineales para cada modelo cinético se resumen en la tabla siguiente (tabla 4):

MODELO	ECUACIÓN
ORDEN CERO	$Q = K_0 t$
ORDEN UNO	$Ln(Q_\infty - Q) = -K_d t + LnQ_\infty$
WEIBULL	$Ln\left(Ln\left(\frac{Q_\infty}{Q_\infty - Q}\right)\right) = \beta LnT - \beta Ln t_d$
HIGUCHI	$Q_t = A + K_H t^{0.5}$ $A = \frac{1}{t_d}$
KORSMEYER-PEPPAS	$LnQ = LnA + nLn t$

Tabla 4. Ecuaciones lineales para cada uno de los modelos cinéticos de liberación de fármacos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS

El estudio de las plantas medicinales tiene como objetivo contribuir al conocimiento químico y farmacológico de las especies vegetales y de sus componentes, propiciar su uso como alternativa terapéutica, además, de conducir al descubrimiento de nuevos fármacos, candidatos para evitar o disminuir los síntomas de una diversidad de enfermedades que amenazan la salud humana. Por ende, es muy importante realizar estudios pertinentes de aquellas especies vegetales que ya son utilizadas de forma tradicional para aliviar ciertos padecimientos y que han sido demostrados sus efectos farmacológicos en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

A partir del estudio de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa*, se observó que la especie vegetal metaboliza las flavanonas isopreniladas: 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona **(I)** 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona **(II)**, 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona **(III)**, 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona **(IV)**, además de reportarse a los esteroides: β -sitosterol y 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol como constituyentes de la especie. (Narváez-Mastache, J.M.; Garduño-Ramírez *et al* 2006) El extracto metanólico fue sometido a evaluaciones en modelos químico-biológicos en busca de actividades hipoglucemiante, antidiabética, antiinflamatoria y antioxidante, resultando interesantes los datos obtenidos de la investigación. (Carrillo Morales, M. 2004; Narváez-Mastache *et al*, 2007; Narváez-Mastache *et al*, 2008).

Se han reconocido también a las flavanonas isopreniladas naturales como compuestos químicos sujetos a diferentes estudios tanto farmacológicos, biofarmacéuticos y de nanoestructuración en este proyecto de investigación; buscando también mejorar la actividad antiinflamatoria. Se considera relevante la contribución científica basando la propuesta de investigación en la originalidad del proyecto, su alcance y hallazgos que aporte en el campo de la Investigación de los Productos Naturales, Biofarmacia y Tecnología Farmacéutica; para llevar a cabo el presente proyecto de investigación, se establecen los objetivos que se describen a continuación.

2.1.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer la capacidad de permeación transdérmica a través de estudios *ex vivo*, de las flavanonas isopreniladas de origen natural vehiculizados en sistemas nanoestructurados (nanoemulsiones y nanopartículas) para comparar la eficacia antiinflamatoria de las flavanonas libres y nanoformuladas y realizar estudios biofarmacéuticos. Con ello se pretende obtener información relevante de su liberación para poder diseñar y desarrollar nuevas formulaciones con el fin de conseguir un mejor balance riesgo/beneficio en futuras aplicaciones farmacéuticas. En el diagrama 1 se muestran de manera gráfica los objetivos del presente trabajo de investigación.

2.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener del extracto metanólico íntegro de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa* las flavanonas isopreniladas 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona **(I)**, 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona **(II)**, 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona **(III)**, 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona **(IV)**.
2. Diseñar y caracterizar sistemas nanoestructurados (nanoemulsiones y sistemas poliméricos) para las flavanonas isopreniladas naturales.
3. Estudiar la liberación *in vitro* de estos sistemas matriciales en membrana artificial.
4. Realizar ensayos de permeación de los sistemas coloidales desarrollados en un sistema *ex vivo* de piel humana.
5. Analizar los resultados obtenidos con los diferentes sistemas nanoestructurados de las flavanonas isopreniladas desarrollados en función de su actividad antiinflamatoria comparándolos con las flavanonas vehiculizadas en disolventes orgánicos.

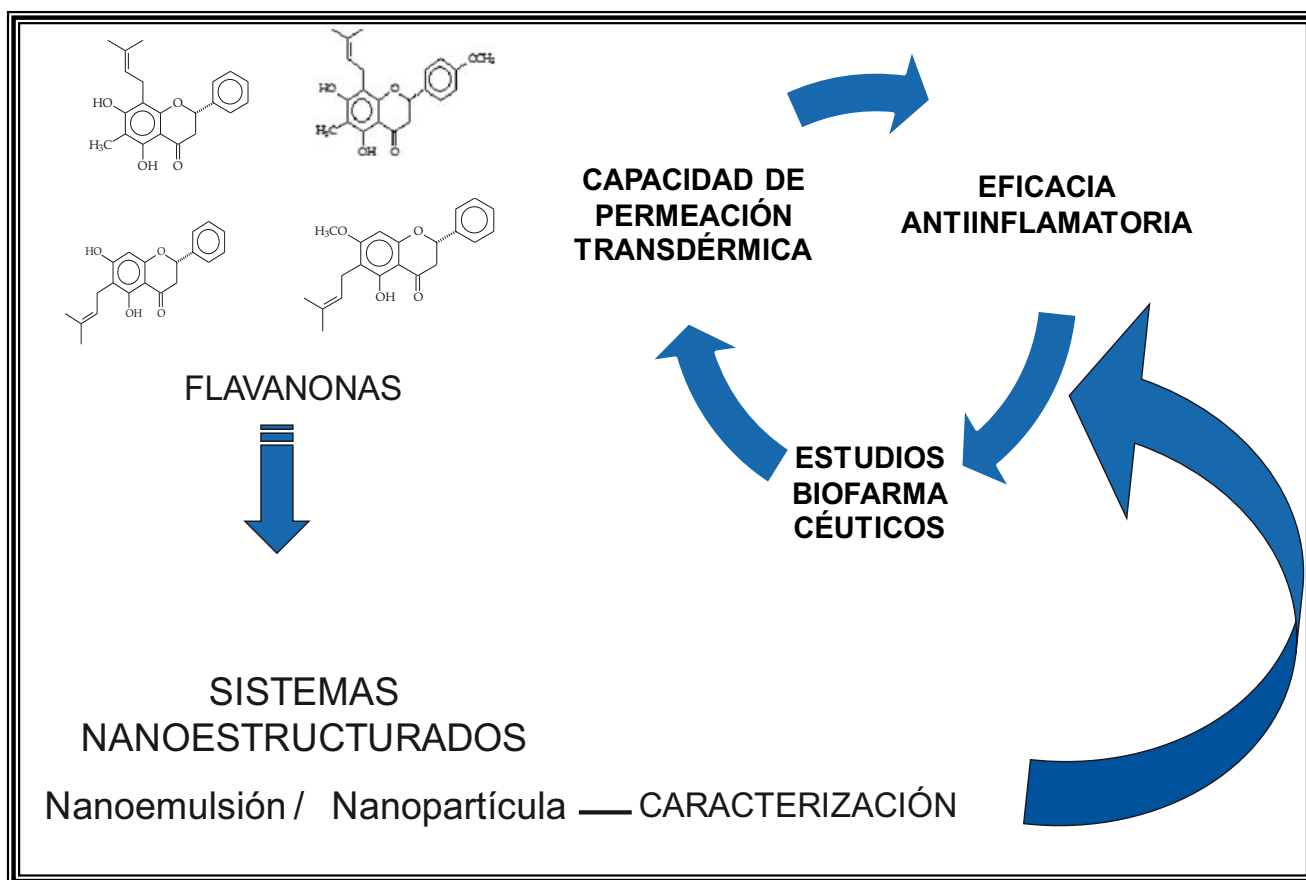


Diagrama 1. Objetivos del proyecto de tesis

2.2 PLAN DE TRABAJO

En base a los objetivos descritos, la metodología que se siguió para el presente trabajo de tesis es el siguiente:

- Aislamiento de las flavanonas y caracterización mediante espectroscopía de RMN ^1H y RMN ^{13}C .

- b) Desarrollo y validación de un método analítico lineal, preciso y exacto para el análisis de las flavanonas isopreniladas.
- c) Estudios de citotoxicidad en *Artemia salina* para cada uno de los compuestos.
- d) Selección de la composición de los excipientes para la síntesis de las nanoemulsiones y selección del tipo de nanopartículas en función de las propiedades fisicoquímicas de las flavanonas.
- e) Síntesis y estandarización de los sistemas nanoparticulados.
- f) Determinación de la morfología, morfometría (tamaño promedio e índice de polidispersión) y carga superficial de los sistemas nanoestructurados desarrollados mediante Microscopía de Transmisión Electrónica y Espectroscopia de Correlación Fotónica (*Dynamic Light Scattering*) respectivamente.
- g) Determinación de la eficiencia de asociación de las flavanonas en las nanopartículas.
- h) Evaluación de la cinética de liberación de cada una de las flavanonas incorporadas en nanoemulsiones y nanopartículas.
- i) Realizar estudios de permeación *ex vivo* de las flavanonas vehiculizadas en los sistemas nanoestructurados.
- j) Evaluación de la capacidad antiinflamatoria en modelo *in vivo* de las flavanonas libres y vehiculizadas en nanoemulsión y nanopartículas.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Los resultados derivados de la realización de este trabajo de investigación han dado lugar a dos artículos publicados en revistas científicas, los cuales se presentan a continuación acompañados de un breve resumen.

Artículo 1. Domínguez-Villegas Valeri, Domínguez-Villegas Vanessa, García María Luisa, Calpena Ana, Clares-Naveros Beatriz and Garduño-Ramírez María Luisa (2013). Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of *Eysehardtia platycarpa*. *Natural Products Communications*, 8 (2):177-180.

Artículo 2. Valeri Domínguez-Villegas, Beatriz Clares-Naveros , María Luisa García-López , Ana Cristina Calpena-Campmany, Paola Bustos-Zagal , Maria Luisa Garduño-Ramírez (2014) Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 116 (2014) 183– 192.

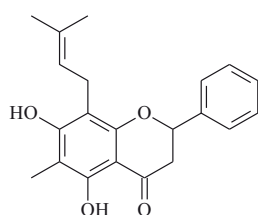
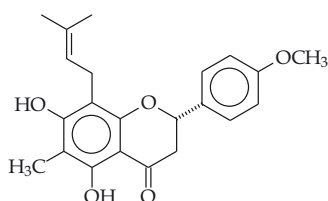
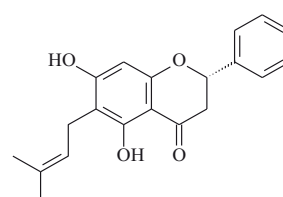
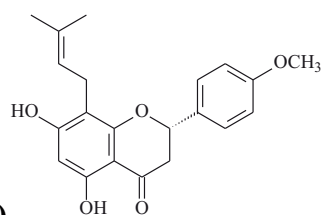
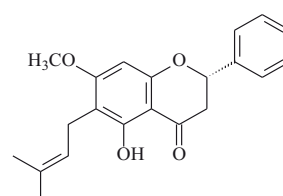
Artículo 1. Domínguez-Villegas Valeri, Domínguez-Villegas Vanessa, García María Luisa, Calpena Ana, Clares-Naveros Beatriz and Garduño-Ramírez María Luisa (2013). Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of *Eysehadtia platycarpa*. *Natural Products Communications*, 8 (2):177-180.

3.1 Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of *Eysehhardtia platycarpa*.

RESUMEN

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos del tipo fenólico que abarcan una gran variedad de sustancias dentro de los Productos Naturales. Este tipo de compuestos, que se encuentran en plantas superiores, frutas, granos y vegetales, son consumidos en cantidad significativa en la dieta diaria. Particularmente las flavanonas han demostrado diversas propiedades farmacológicas

A partir del estudio de las hojas de *Eysehhardtia platycarpa*, se puso de manifiesto que esta especie metaboliza las flavanonas isoprenílicas: 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona **(1)** 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona **(2)**, 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona **(3)**, 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona **(4)** y 5,7-dihidroxi-8-prenil-4'-metoxi-flavanona **(5)** entre otros compuestos .

**(1)****(2)****(3)****(4)****(5)**

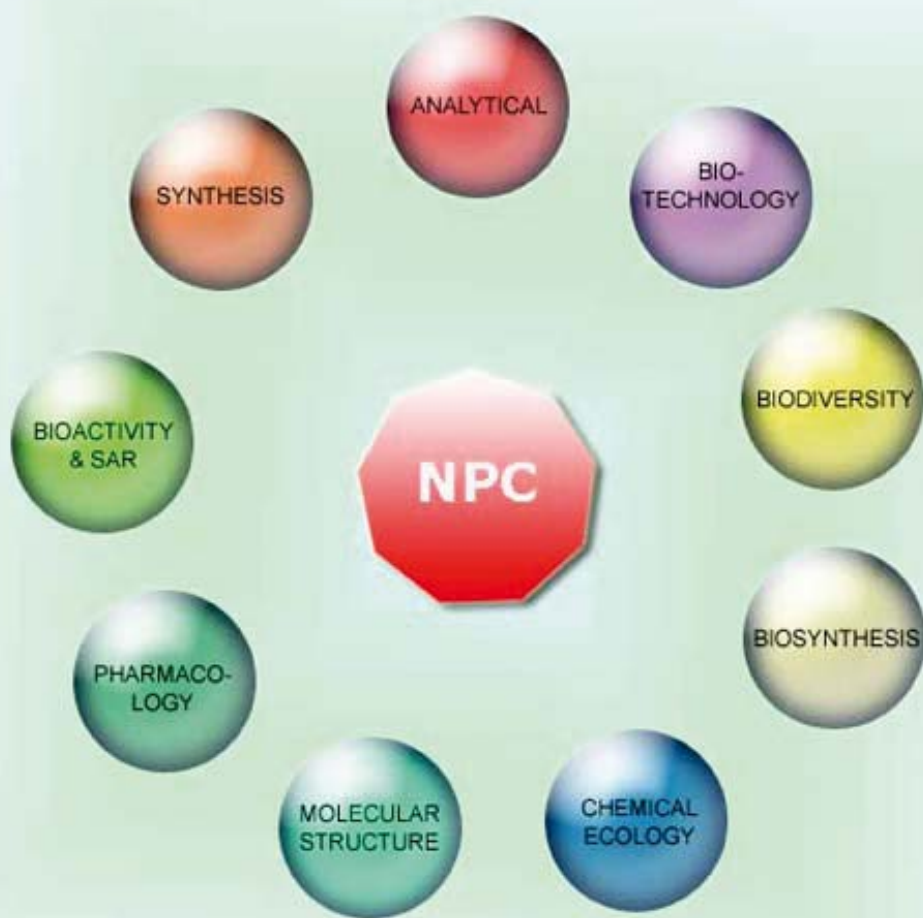
En el presente trabajo se investigó la actividad antioxidante en el modelo de DPPH, la actividad antiinflamatoria en el modelo *in vivo* de inducción de la inflamación con TPA en oreja de ratón y la toxicidad frente a *Artemia salina* de las flavanonas citadas de la especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa*. A parte del extracto metanólico, que presentó un 77.47 ± 0.95 % de inhibición de la inflamación, se aislaron las flavanonas (1-5); siendo la flavanona (5) la que presentó la mayor actividad antiinflamatoria con un 75.3 ± 1.5 % en el modelo *in vivo* ensayado.

Con respecto a la evaluación antioxidante, se utilizó la quercetina y el alfa-tocoferol como fármacos de referencia siendo también la flavanona (5) la que presentó mayor actividad con 43.1 ± 3.9 % de inhibición a una concentración de 1000 μ M observándose que la capacidad inhibitoria del radical libre es directamente proporcional a la concentración de las flavanonas isopreniladas.

Para conocer la toxicidad de los compuestos estudiados se realizó el estudio de toxicidad frente *Artemia salina* que puso de manifiesto que el extracto metanólico de la especie vegetal presenta una importante actividad tóxica a 100ppm con un IC_{50} de 98.2 %. Sin embargo, al hacer el estudio de las flavanonas aisladas únicamente la flavanona (4) presenta un importante efecto sobre la *Artemia salina* con un IC_{50} de 97.8 % a una concentración de 100 M. El resto de las flavanonas no presenta efectos citotóxicos. Al igual que en los estudios de actividad antioxidante, se observa que el índice de mortalidad frente a *Artemia salina* es directamente proporcional a la concentración de las flavanonas.

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all Aspects of Natural Products Research



Volume 5, Issue 2, Pages 147-262, 2013
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of *Eysenhardtia platycarpa*

Valeri Domínguez-Villegas^{a,b}, Vanessa Domínguez-Villegas^a, María Luisa García^b, Ana Calpena^c, Beatriz Clares-Naveros^d and María Luisa Garduño-Ramírez^{a*}

^aCentro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 Cuernavaca, Morelos, México

^bDepartamento de Fisicoquímica. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Av. Joan XXIII, 29-31 08028 Barcelona, España

^cDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Av. Joan XXIII, 29-31 08028 Barcelona, España

^dDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071, Granada, España

lgarduno@uaem.mx

Received: September 11th, 2012; Accepted: December 17th, 2012

From the methanolic extract of *Eysenhardtia platycarpa* (leaves), were isolated the prenylated flavanones: 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (1), 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxy-flavanone (2), 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (3), 5-dihydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (4), 5,7-dihydroxy-8-prenyl-4'-methoxy-flavanone (5). Methanolic extract of *E. platycarpa* (leaves) and flavanones (5), (2) and (3) showed anti-inflammatory activity according to tested quantities. In addition, flavanone (5) revealed the best percentage reduction of free radical DPPH. Finally, after cytotoxic activity study, the methanolic extract from *E. platycarpa* leaves and flavanone (4) exhibited promising cytotoxic activity on brine shrimp.

Keywords: Flavanones, *Eysenhardtia platycarpa*, Anti-inflammatory activity, Antioxidant activity, cytotoxic activity, *Artemia salina*.

Flavonoids are the most abundant polyphenols present in the human diet and represent a class of molecules characterized by a C6-C3-C6 backbone structure [1]. A growing number of biological/pharmacological activities including anticancer, antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antithrombotic activities are associated with these compounds [2]. Other different biological activities as antimicrobial fungitoxicity, cytotoxic and anti-VIH have been also reported for prenylated flavanones [3-6]. All these properties turn the prenylated flavanones into compounds of interest.

The study of the *Eysenhardtia platycarpa* leaves methanolic extract revealed the presence of prenylated flavanones: 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (1), 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxy-flavanone (2), 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (3), 5-dihydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (4), 5,7-dihydroxy-8-prenyl-4'-methoxy-flavanone (5). These compounds were isolated previously and evaluated by biochemical models in search of hypoglycemic and antidiabetic activities [7].

The aim of the present work is to investigate the in vivo anti-inflammatory activity and the in vitro antioxidant and cytotoxic activities of the methanolic extract of *E. platycarpa* (leaves) and its flavanones (1-5). The TPA-Induced Acute Inflammation model in mice ear was used. The antioxidant capacity was assayed by DPPH and the cytotoxic activity by the *Artemia salina* (brine shrimp) method.

TPA is an excellent acute inflammation animal model, closely related with the infiltration of neutrophil and macrophages, thereby

can be very useful short-term test to detect the agents with anti-inflammatory potential. The methanolic extract of the *E. platycarpa* leaves revealed a total edema inhibition in mouse ear of 77.47 ± 0.95 %; this percentage is due to the individual anti-inflammatory activity of its isolated compounds, considering that each isolated prenylated flavanone varies in anti-inflammatory activity. Among the flavanones tested with 1 mg/ear in the TPA-Induced Acute Inflammation (Table 1), flavanone (5) showed the highest anti-inflammatory activity (75.3 ± 1.5 %); followed by flavanones (2) and (3) with inhibition percent of 68.4 ± 1.5 % and 66.7 ± 1.1 %, respectively; however, flavanone (4) showed a moderate anti-inflammatory activity with inhibition percent of 46.4 ± 1.5 %. Finally, flavanone (1) showed the lowest anti-inflammatory activity (12.2 ± 1.1 %).

Flavanone (5) as the unique among five tested, as shown in Table 1, which has methoxyl group in C-7 demonstrated that the presence of this group may enhance the anti-inflammatory activity; equally, we observed that the presence of the prenyl group in C-6 and the methoxyl group in C-4' could also improve the anti-inflammatory activity. Similar anti-inflammatory activity shown in flavanones (3) and (5) could indicate that presence of methoxyl group in C-7 instead of hydroxyl group also promoted the anti-inflammatory activity. The inhibitions of pro-inflammatory enzymes and cytokine-induced chemokine expression have been suggested as molecular mechanism of the biological anti-inflammatory activity of flavonoids [8], thus chemical structure is closely related with this biological activity.

Table 1: Anti-inflammatory activity of the methanolic extract and prenylated flavanones (1-5).

Samples	Percentage of anti-inflammatory activity (1 mg/ear)
Methanolic Ext. Leaves	77.5 ± 1.0
1	12.2 ± 1.1
2	68.4 ± 1.5
3	66.7 ± 1.1
4	46.4 ± 1.5
5	75.3 ± 1.5
Indomethacin	91.35 ± 0.47

Antioxidant compounds may be defined as radical scavengers which protect the human body against free radicals that may cause pathological conditions as anemia, arthritis, inflammation, neurodegeneration, Parkinson's and cardiovascular diseases among others [9]. The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which can play an important role in adsorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides [10].

The effect of antioxidant compounds on DPPH radical scavenging method is thought to be due to their hydrogen donating ability. DPPH is a stable free radical and it accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule. The reduction capability of DPPH radicals was determined by the decrease in its absorbance at 515 nm induced by antioxidants and it is visually remarkable as a discoloration from purple to yellow. Hence, DPPH is usually used as a substrate to evaluate antioxidant activity of natural products.

The antioxidant activity of methanolic extracts plant from *E. platycarpa*, *E. punctata*, and *E. subcoriaceus* (Fabaceae) were previously reported, concluding that the methanolic extract of bark from *E. platycarpa* was the most active against DPPH radical with $EC_{50} = 21.2 \pm 0.1$ ppm [11].

In this research, the antioxidant activity of prenylated flavanones obtained from methanolic extract of leaves from *E. platycarpa* compared with quercetin and α -Tocopherol as antioxidant standard agents was determined using DPPH method and results are shown in Table 2. The flavanone (5) was the most active with 43.1 ± 3.9 percent of reduction of DPPH free radical (1000 μ M) of the assayed prenylated flavanones. Additionally, the obtained results revealed that the scavenging of DPPH radical was found to be directly proportional to the concentration of the prenylated flavanones.

Analyzing the chemical structure of the prenylated flavanones we observed that the presence of methyl group in C-6, hydroxyl group in C-7 and prenyl group in position 8 conferred a moderate antioxidant capacity. However, the presence of prenyl group in position 6 and methoxyl group in position 7 without the hydroxyl group in position 4', significantly improved the antioxidant activity.

Table 2: 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH) radical scavenging activity of the prenylated flavanones (1-5) and antioxidant standards.

Comps	Concentration		
	10 μ M	100 μ M	1000 μ M
1	-3.1 ± 1.7	-11.0 ± 1.0	17.4 ± 2.1
2	4.0 ± 0.8	4.6 ± 1.0	20.1 ± 2.0
3	0.8 ± 0.0	-2.1 ± 0.7	7.9 ± 1.7
4	0.2 ± 0.0	2.1 ± 0.9	7.7 ± 1.2
5	-6.6 ± 0.1	-1.9 ± 1.0	43.1 ± 3.9*
Quercetin	2.7 ± 0.9	74.6 ± 4.4*	92.9 ± 0.0*
	1 mM	10 mM	100 mM
α -Tocopherol	21.6 ± 4.3	60.0 ± 2.9*	63.5 ± 3.1*

Values are mean ± S.E.M (n=3) * $p < 0.05$ Compared to control.

For pharmacological screening, we have applied the brine shrimp lethality bioassay method which is recently developed as a rapid general bioassay technique for the natural products, this method

Table 3: Cytotoxic activity (*Artemia salina*).

Samples	Cytotoxic activity (<i>Artemia salina</i>) IC_{50}
Methanolic Ext. Leaves	< 17.78 ppm
1	> 100 μ M
2	> 100 μ M
3	> 1000 μ M
4	< 10 μ M
5	> 100 μ M
Vehicle	No cytotoxic

indicates cytotoxicity as well as a wide range of pharmacological activities e. g. anticancer, antiviral and pesticidal, and others [12,13].

In the present study the brine shrimp lethality of methanolic extract of the leaves from *E. platycarpa*, showed an important toxic activity: at 100 ppm, 98.2% of nauplii mortality was observed and at the lowest assayed concentration, 17.8 ppm, above 50 % of mortality was observed. The results are given in Table 3. We conclude that the extract may have components presenting biological activity, cytotoxic activity mainly.

Among flavanones, flavanone (4) exerted an important effect on the *Artemia salina* test: at 100 μ M, 97.8% of nauplii mortality was observed and at the lowest assayed concentration, 17.8 μ M, 84% of mortality was observed, a significant percent. We could conclude that the IC_{50} is less than 10 μ M, concentration that still causes mortality slightly higher than 50%.

On the other hand, the prenylated flavanone (3) showed 43% of mortality at the highest assayed concentration, 1000 μ M, so it was considered as non significant toxic activity.

Besides, the rest of flavanones, (1), (2) and (5) did not show any remarkable cytotoxic activity against brine shrimp: $IC_{50} > 100$ μ M; for this reason assay at 1000 μ M was not performed. The rate of mortality of nauplii was found to be increased according to the concentration of each of the samples assayed.

Based on the obtained results, it may be concluded that the prenylated flavanones isolated from *E. platycarpa* did not showed strong antioxidant activity compared to the standard, being flavanone (5) which showed the best value of free radical DPPH reduction.

The methanolic extract of the *E. platycarpa* leaves showed anti-inflammatory activity and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (5) was the most active followed by flavanones (2) and (3) with moderate anti-inflammatory activity.

Cytotoxic activity study revealed different mortality rates of nauplii in all experimental samples, simultaneously, the control group of nauplii remained unchanged (non lethality/mortality). Thus we conclude that the methanolic extract from the *E. platycarpa* leaves and flavanone (4), have a promising cytotoxic activity on brine shrimp.

Experimental

Plant Material: Leaves of *E. platycarpa* Pennell & Safford (Fabaceae) were collected from the municipality of Tetipac, State of Guerrero, México. Voucher specimens were authenticated by Ramiro Cruz Durán 1325 and were stored at the Sciences Faculty Herbarium facilities (Autonomous University of the State of Morelos, Mexico).

Preparation of methanolic extract: The methanolic extract was obtained by the next maceration method, leaves were dried at room temperature in the shade; once the leaves were dried they were pulverized and extracted with methanol by maceration at room temperature three times (100 g of dried vegetable material per 1000 ml of methanol). Once the extractions were performed, the solvent was removed under reduced pressure to obtain the corresponding residues [7].

Isolation of compounds: From the methanolic extract of *E. platycarpa* leaves the prenylated flavanones 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-flavanone (1); 5,7-dihydroxy-6-methyl-4'-methoxy-8-prenyl-flavanone (2); 5,7-dihydroxy-6-prenyl-flavanone (3); 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-8-prenyl-flavanone (4) and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenyl-flavanone (5) were isolated by column chromatography at reduced pressure, then flavanones were purified and characterized by direct comparison using TLC original samples available at the laboratory. They were also analyzed by ¹H NMR and ¹³C NMR and mass spectrometry checking their identities by comparison with the spectroscopic data previously published [7].

Anti-inflammatory activity

TPA-Induced Mouse Ear Edema: Mouse ear edema was evaluated following the protocol previously described [14], using groups of three male CD-1 mice. Edema was induced by topical application of 2.5 µg per ear of TPA solved in ethanol. Solutions of the methanolic extract from leaves, flavanones (1-5) (1 mg/ear) and indomethacin as standard drug reference were prepared at a concentration of 1 mg/ear, solving each of those substances in different solvents according to their solubility, respectively. Those were applied to both sides of the right ear (10 µL each side) such as TPA. The ear swelling was measured just before TPA application and 4 h later. The edema was expressed as the increase of thickness. Results are shown in Table 1.

Mice: Adult male CD-1 mice with a body weight ranging from 20 to 25 g were used. All animals had free access to food and water and were kept on a 12/12 h light-dark cycle. Animals were maintained in standard laboratory conditions approved by the Animal Care and Use Committee (NOM-062-ZOO-1999 and PROY-NOM-087-ECOL-SSA1-2000). All experiments were carried out using 6 animals per group.

Antioxidant activity

DPPH radical scavenging assay: Radical scavenging activity of methanolic extract from *E. platycarpa* leaves and compounds was measured by a slightly modified method of Brand-Williams [15]. Radical scavenging activity of methanolic extract and flavanones against stable DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) was determined

spectrophotometrically. When DPPH reacts with an antioxidant compound, which can donate hydrogen, it is reduced. The changes in color (from deep—violet to light—yellow) were measured at 515 nm on a UV/visible light spectrophotometer (Spectronic Genesys 8, Rochester, USA).

Methanolic extract and compound solutions were prepared by solving an appropriate amount of each sample in ethanol. The solution of DPPH in ethanol was prepared just before UV measurements. 1.5 ml of this DPPH solution was mixed with 0.5 ml of compound solutions in 1 cm path length disposable microcuvettes (final mass ratio of compound and DPPH 3:1 approximately).

Samples (at 1000, 100 and 10 µM for compounds) were kept in the dark for 90 min at room temperature, then the decrease in absorption was measured. For control sample, absorption was measured of a blank sample containing the same amount of ethanol and DPPH. The experiment was carried out in triplicate. Radical scavenging activity was calculated by the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = [AB - AA/AB] \times 100$$

Where: AB—absorption of blank sample ($t = 0$ min); AA—absorption of tested extract or compound solution ($t = 90$ min).

Brine shrimp *Artemia salina* Lethality bioassay

Brine shrimp lethality test: The shrimp lethality assay was proposed by Mayer [16]. It is based on the ability to kill laboratory-cultured *Artemia nauplii* brine shrimp. The assay is considered a useful tool for preliminary assessment of toxicity, and it has been used for detection of fungal toxins, plant extract toxicity, heavy metals, cyanobacteria toxins, pesticides, and cytotoxicity testing of dental materials.

Dried cysts were performed as indicated above, and incubated (1 g cyst per liter) in a hatcher at 28–30 °C with strong aeration, under a continuous light regime. Approximately 12 h after hatching, the phototropic nauplii were collected with a pipette and concentrated in a small vial. Ten brine shrimp were transferred to each well using adequate pipette. The toxicity was determined after 24 h of exposure. The numbers of survivors were counted and percentages of dead ones were calculated. Larvae were considered dead if they did not exhibit any internal or external movement during several seconds of observation. LC₅₀ values with 95% confidence intervals values were determined using the log dose-probit analysis method [17]. The experiment was realized by triplicated. The methanolic extract was tested at concentration level of 1000, 100 and 10 ppm and compounds solutions of 1000, 100 and 10 µM. All sample stock solutions were prepared in saline solution with dimethylsulfoxide 0.1 %.

References

- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- Havsteen B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32, 1141–1148.
- Mitscher LA, Raghav Rao GS, Khanna I, Veysoğlu T, Drake S. (1983) Antimicrobial agents from higher plants: prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*. *Phytochemistry*, 22, 573–576.
- Tahara S, Katagiri Y, Ingham JL, Mizutani J. (1994) Prenylated flavonoids in the roots of *Yellow lupin*. *Phytochemistry*, 36, 1261–1271.
- Mahidol C, Prawat H, Ruchirawat S, Lihkitwitayawuid K, Lin L, Cordell GA. (1997) Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. *Phytochemistry*, 45, 825–829.
- Meragelman KM, McKee TC, Boyd MR. (2001) Anti-HIV prenylated flavonoids from *Monotes africanus*. *Journal of Natural Products*, 64, 546–548.
- Narváez-Mastache JM, Garduño-Ramírez ML, Alvarez L, Delgado G. (2006) Antihyperglycemic activity and chemical constituents of *Eysenhardtia platycarpa* (Fabaceae). *Journal of Natural Products*, 69, 1687–1691.
- Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. (2010) Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 273–278
- Huang D, Ou B, Prior RL. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.

- [10] Yanishlieva-Maslarova N. (2001) Inhibiting oxidation. In: *Antioxidants in Food. Practical Applications* Eds. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, CRC Press, Boca Raton, FL (USA), Woodhead Publishing, Cambridge (UK) 22–70.
- [11] Narváez-Mastache JM, Soto C, Delgado G. (2007) Antioxidant evaluation of *Eysenhardtia* species (Fabaceae): relay synthesis of 3-O-acetyl-11a,12a-epoxy-oleanan-28,13b-olide isolated from *E. platycarpa* and its protective effect in experimental diabetes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 1503-1510.
- [12] Mayer BN, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen HB, Nichols BD, McLanghlin JL. (1991) *Brine Shrimp*: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- [13] McLanghlin JL. (1990) Bench-top bioassay for the discovery of bioactive compounds in higher plants. *Brenesia*, 34, 1-14.
- [14] Qadeer G, Rama NH, Hill RA, Garduño-Ramírez ML. (2007) Synthesis and anti-inflammatory activity of fluorinated isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins. *Journal of Fluorine Chemistry*, 128, 641-646.
- [15] Bondent V, Brand-Williams W, Bereset C. (1997) Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical methods. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 30, 609–615.
- [16] Mayer BN, Ferrigni NR, Potnam JE, Jacobson LB, Nicholas DE, McLaughlin JL. (1982) *Brine Shrimp*: a convenient bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- [17] Finney DJ. (Ed) (1952) *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge.

Artículo 2. Valeri Domínguez-Villegas, Beatriz Clares-Naveros , María Luisa García-López , Ana Cristina Calpena-Campmany, Paola Bustos-Zagal , Maria Luisa Garduño-Ramírez (2014) Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 116 (2014) 183– 192.

3.2 Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*.

RESUMEN

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Por lo tanto, la inflamación se determina como un conjunto de daños exógenos o endógenos al actuar sobre el tejido vascularizado produciendo una reacción compleja. Existen varios fármacos comerciales para combatir la inflamación; sin embargo, presentan muchos efectos secundarios. Una alternativa a estos fármacos es el uso de productos naturales.

En el presente trabajo, cuatro flavanonas aisladas de las hojas de la especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa* (Figura 14 de anexos) con actividad antiinflamatoria experimentada *in vivo* y conocida, fueron formuladas en sistemas de liberación modificada; nanoemulsiones anhidras y nanopartículas poliméricas de PLGA para su aplicación tópica.

La morfología de la gota de las nanoemulsiones y el tamaño de partícula de las nanopartículas de PLGA de cada una de las flavanonas fueron determinadas por TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) y DLS (Dispersión Dinámica de la Luz). Para los estudios de liberación *in vitro* y la permeación en piel humana *ex vivo* se utilizaron celdas de difusión vertical de Franz. También se realizaron estudios *in vivo* para determinar la actividad antiinflamatoria de las formulaciones utilizando el modelo de TPA en oreja de ratón.

Las nanoemulsiones mostraron una forma de gota esférica, y un tamaño entre los 48 y 68 nm; mientras que las nanopartículas poliméricas de PLGA que presentan aún más una forma esférica, con tamaño de partícula (156-173 nm.)

En los estudios de liberación se observa que las flavanonas **(1)** y **(3)** son las que liberan mayor cantidad de fármaco, tanto en las nanoemulsiones como en las nanopartículas; sin embargo, en las nanoemulsiones se libera mayor cantidad de flavanona. En los estudios de permeación estas dos flavanonas también son las que presentan mayor cantidad permeada.

En las evaluaciones *in vivo* para conocer la actividad antiinflamatoria de las flavanonas en las formulaciones, la flavanona **(1)** vehiculizada en nanoemulsión aumentó la actividad antiinflamatoria comparada con la actividad intrínseca de la misma y la flavanona **(3)** mejoró la actividad antiinflamatoria cuando está vehiculizada en nanoemulsión y nanopartículas.

Gracias a los estudios realizados y a las formulaciones obtenidas se abre una opción para mejorar los tratamientos antiinflamatorios que se encuentran actualmente en el mercado. De esta forma, se alcanza el efecto antiinflamatorio deseado utilizando menos dosis de principio activo, con la disminución de efectos adversos. Además, se mantiene una liberación constante durante un tiempo determinado del principio activo, obteniéndolo a partir de una fuente de origen natural.



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*



Valeri Domínguez-Villegas^{a,b}, Beatriz Clares-Naveros^{c,*}, María Luisa García-López^{a,d}, Ana Cristina Calpena-Campmany^{d,e}, Paola Bustos-Zagal^e, María Luisa Garduño-Ramírez^b

^a Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Avenue, Barcelona 08028, Spain

^b Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida de la Universidad 1001, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico

^c Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja s/n, Granada 18071, Spain

^d Nanoscience and Nanotechnology Institute (IN2UB), University of Barcelona, Joan XXIII Avenue, Barcelona 08028, Spain

^e Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Avenue, Barcelona 08028, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2013

Received in revised form

14 November 2013

Accepted 5 December 2013

Available online 6 January 2014

Keywords:

Flavonones

Eysenhardtia platycarpa

Polymeric nanoparticles

Nanoemulsion

Skin permeation

Anti-inflammatory activity

ABSTRACT

Many of the inflammatory diseases are becoming common in ageing society throughout the world. The clinically used anti-inflammatory drugs suffer from the disadvantage of side effects. Alternative to these drugs are natural products, since ancient times traditional medicines are being used for the treatment of inflammation. In the present study, four flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa* leaves with a potent pharmacological activity were formulated in effective drug delivery systems: nanoemulsion and polymeric nanoparticles for topical use as novel anti-inflammatory topical formulations. Nanoemulsion system exhibited droplet sizes less than 70 nm and polymeric nanoparticles with a size of 156–202 nm possessed zeta potential values less than -25 mV that provided good stability and obtained high entrapment efficiency (78–90%). *In vitro* release and *ex vivo* permeation studies were performed on Franz-type diffusion cells and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC), all formulations showed steady state release profiles over time and steady increase of flavanones in the skin permeation test. The anti-inflammatory activity, tested by TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), induced oedema in mice ear suggesting that prenylated flavanones improve significantly their anti-inflammatory activity when are vehiculated in nanosized systems. Our results suggested that 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenyl flavanone loaded nanoemulsion and polymeric nanoparticle could be proposed as potential topical anti-inflammatory formulations with the best properties for the treatment of inflammatory disorders.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Many of the chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus are becoming common in ageing society throughout the world. Among drugs used to treat different rheumatic diseases anti-inflammatory agents play an important role in improving quality of life of these patients. However, the clinical use of anti-inflammatory drugs for prolonged periods is usually associated with an increased risk of side effects. An alternative to these drugs are natural products, since ancient times, traditional medicines have increasingly been used for the treatment of inflammation.

Eysenhardtia platycarpa, a member of the Leguminosae family known as “taray”, “palo dulce” (sweet wood) and “palo azul” (blue wood) is a small tree that is widely distributed in southern Mexico. It has been used in traditional herbal medicine because of its potential health beneficial properties related to phenolic compounds, among them, flavonoids have been known to be the nature's tender drugs to show a wide range of pharmacological activities [1]. They are a group of chemical entities of benzo- γ -pyrone derivatives that have been studied as potential anti-inflammatory reagents [2]. Flavonoids can affect the functions of cells linked to inflammatory processes, acting on enzymes and pathways involved in anti-inflammatory processes [3]. Previous chemical analyses of *E. platycarpa* have allowed the isolation of flavonoids as 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone; 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxyflavanone; 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone [4]. Thus, it may be valuable to study

* Corresponding author. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.
E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B. Clares-Naveros).

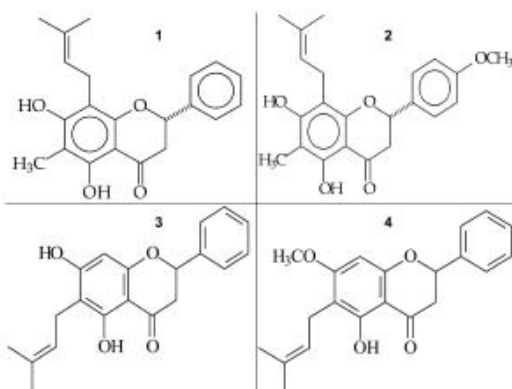


Fig. 1. Chemical structure of flavanones. 5,7-Dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (1); 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxyflavanone (2); 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (3); and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (4).

the anti-inflammatory activity of these flavonoids, not only in order to establish anti-inflammatory mechanisms, but also for developing a new class of safe anti-inflammatory agents, which may be useful in the treatment of these kinds of diseases [5].

However, the chemical structure of flavonoids (Fig. 1) makes them water insoluble compounds. To overcome the poor water solubility of drugs, an important area of pharmaceutical research is in finding safe and effective strategies to deliver conventional drugs as nano-scale drug delivery systems which can be devised to tune release kinetics, to regulate biodistribution and to minimize side effects, thereby enhancing the therapeutic index of a given drug [6]. Nanoemulsions and nanoparticles are being widely utilized in pharmaceutical and biomedical sciences [7–10]. In fact, many promising new or existing drugs never reach the market because of difficulties in delivery. Such drugs need to be formulated with smart drug delivery systems and/or delivery technology to make them acceptable for the treatment of patients [11]. Simultaneously, drug delivery systems can be synthesized with controlled composition, shape, size and morphology.

Nanoemulsions are transparent or translucent dispersions of oil and water stabilized by an interfacial film of surfactant usually in combination with co-surfactant having droplet sizes less than 100 nm. From the pharmaceutical point of view, nanoemulsions improve transdermal and dermal drug delivery *in vitro* and *in vivo* over classical dosage forms, as well as, increase the aqueous solubility of poorly water soluble drugs as in the case of the referred flavanones [12].

Nanoparticle systems have also been proposed for topical administration to enhance percutaneous transport into and across the skin barrier with important features, among them their surface to mass ratio that is much larger than other particles, their quantum properties and their ability to bind and adsorb drugs improving their bioavailability, providing better encapsulation, controlled release, less toxicity and increasing drug stability [8]. In this line, upon skin application, the stability of polymeric carriers differs considerably from conventional vesicles (liposomes and niosomes). [13]

In view of an extensive literature searching, no information about *E. platycarpa* was found as anti-inflammatory agent loaded nanostructured drug delivery systems for dermal application and on account of alleged usefulness to this plant in traditional medicine, the major aims of the present study were: (i) to develop nanoemulsion (NE) and nanoparticles (NP) of flavanones: 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (1); 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxyflavanone (2);

5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (3) and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (4) isolated from the methanolic extract of *E. platycarpa* leaves, (ii) to characterize the formulations in terms of physicochemical properties; (iii) to evaluate their *in vitro* release behaviour and kinetic parameters, (iv) to investigate the *ex vivo* permeation across human skin and retained amounts, and finally (v) to assess the *in vivo* anti-inflammatory activity in mice.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) 50:50 (Resomer® RG503) was obtained from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany), poloxamer 188 (P188, Lutrol® F68) was kindly provided by BASF Corp. (Barcelona, Spain), polyglyceryl-3 dioleate (Plurol® Oleique CC497), caprylocaproyl polyoxyl-8-glycerides (Labrasol®), triglycerides medium-chain EP/NF/JPE (Labrafac® lipophile) and propylene glycol were provided by Gattefossé (Saint-Priest Cedex, France). Double distilled water was used after filtration in a Millipore® system (Millipore, Billerica, MA, USA). All other chemicals and reagents used in the study were of analytical grade and obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Experimental animals

Male Swiss CD-1 mice (20–25 g) were purchased from Circulo ADN S.A. de C.V. (Coyoacan D.F., Mexico) and were subjected to a quarantine period of 7 days on arrival. The animals were housed in plastic cages with soft bedding with access to controlled diet and tap water *ad libitum*. The temperature was kept at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and the relative humidity was kept at 50–60%. Artificial lighting was used to provide 12 h light and 12 h dark every 24 h. The studies were conducted under a protocol in accordance with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999).

2.3. Extraction and isolation

E. platycarpa leaves were collected from the municipality of Tetipac, State of Guerrero (México) and identified by Prof. Ramiro Cruz. A voucher specimen was stored at the Sciences Faculty herbarium facilities of the Autonomous University of the State of Morelos, Mexico (voucher specimen Ramiro Cruz 1325).

Once the leaves were dried at room temperature they were pulverized and extracted with methanol by maceration at room temperature three times (100 g of dried vegetable material per 1000 mL of methanol). The extract was concentrated to dryness by rotatory vaporization at 60°C under reduced pressure. The prenylated flavanones 1, 2, 3 and 4, were isolated by column chromatography at reduced pressure, and then flavanones were purified and characterized by direct comparison using TLC original samples available at the laboratory. They were also analyzed by ^1H NMR and ^{13}C NMR and mass spectrometry checking their identities by comparison with the spectroscopic available data in literature [4].

Finally, the logarithm of the molecular octanol/water partition coefficient ($\log P$) of the isolated flavanones was estimated, because is a measure of hydrophobicity, an important property to predict or explain the drug behaviour. The measure was performed by the semiempirical quantum AM1 method using the HyperChem Professional 8.0 software (Hypercube, Inc., Gainesville, FL, USA).

2.4. Preparation of nanoparticulate systems

The elaboration of flavanones loaded NEs (NE1, NE2, NE3, NE4) was performed according to the method described previously [9] by mixing the established amounts of oil, solvent

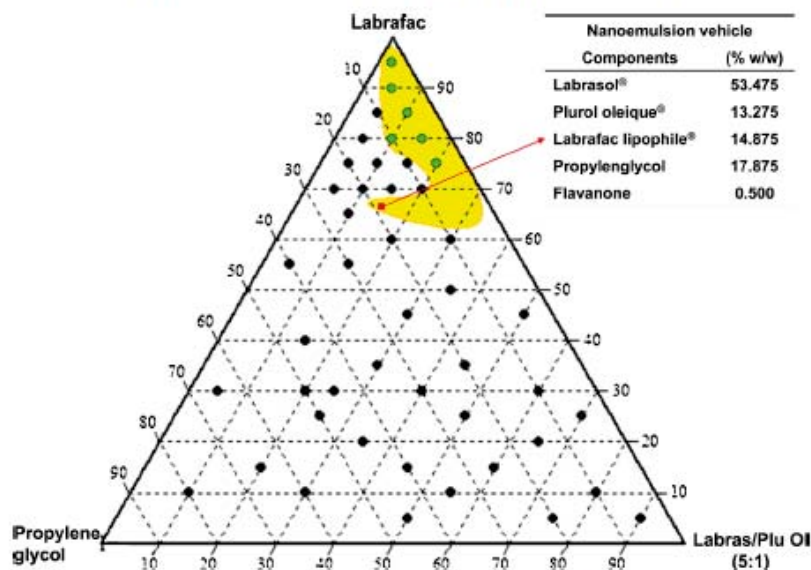


Fig. 2. Pseudo-ternary phase diagram showing nanoemulsion region of Labrafac®, Labrasol®-Plurol® oleique (5:1) and propylene glycol.

and surfactant-cosurfactant mixture, before adding the required amount of propylene glycol under magnetic stirring at room temperature. Subsequently, flavanones (1–4) were dissolved into the pre-weighted vehicle at a concentration of 0.5% (w/w) by sonication of the components in an ultrasonic bath, and equilibrated for 12 h to detect possible precipitation risk of actives. Compositions of the developed NEs are reported in Fig. 2.

Polymeric NPs containing different flavanones (NP1, NP2, NP3 and NP4) were prepared by the solvent displacement technique described by Fessi et al. [14] under optimized conditions determined in previous papers [15–16]. Briefly, an organic solution of 90 mg of PLGA (50:50) in 25 mL of acetone containing the flavanone (1.5 mg/mL) was poured, while stirring moderately, into 50 mL of an aqueous pH = 3.5 solution containing 10 mg/mL of P188. Acetone was then evaporated and the NPs dispersion was concentrated to 10 mL under reduced pressure in a rotavapor model B-480 (Büchi, Labortechnik AG, Flawil, Switzerland).

2.5. Physicochemical characterization

2.5.1. Particle size analysis

The size of NEs and NPs was determined by photon correlation spectroscopy (PCS) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK), a non-invasive, well established technique for measuring the size of particles in the submicron region, providing in parallel the width of the size distribution expressed as polydispersity index (PI). Samples were directly placed into the module and the data were collected at room temperature. Experiments were carried out in triplicate for each sample, and results were reported as the mean \pm SD.

2.5.2. Zeta potential measurements

Zeta potential (ZP) of NPs was also measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). This instrument also allows determining the electrophoretic mobility to assess the surface electrical charge of particles. Samples were diluted in purified water adjusting conductivity (50 μ S/cm) with sodium chloride solution (0.9%, w/v), adjusting the conductivity to this fixed value avoids fluctuations of the ZP caused by differences in the

conductivity of the distilled water [17]. The ZP was calculated from the electrophoretic mobility using the Helmholtz–Smoluchowski equation [18]. Values are reported as the mean \pm SD of at least three different batches of each formulation.

2.5.3. Morphological studies

Morphological and structural examination of NEs and polymeric NPs was performed using transmission electron microscopy (TEM) with a Zeiss 902 CEM 902 (Zeiss, Barcelona, Spain). Briefly, one drop of each sample was deposited on copper grids covered with a layer of Formvar® standing for 4 min. The grids were later stained with one drop of 2% uranyl acetate solution and allowed to dry for 5 min before examination under the electron microscope.

2.5.4. Drug loading efficiency and entrapment efficiency

Accurate amount of flavanone loaded NEs containing 0.5% (w/w) of drug were dispersed into ethanol/water (70:30) solution and sonicated for 10 min to completely extract flavanones from the NEs. After extraction, the solution containing the loaded NE was stored for two days at room temperature and then re-analyzed to ensure the complete extraction of drug. The amount of flavanone extracted was quantified by HPLC analysis described in Section 2.7 and drug loading efficiency (DLE) calculated.

The entrapped efficiency (EE) of each flavanone loaded polymeric NPs was determined by measuring the concentration of free drug in the dispersion medium. The amount of non-entrapped flavanone (1–4) was separated by filtration/centrifugation technique using Amicon centrifugal filter devices with 100 KDa Ultracel membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) at 3000 rpm for 12 min in a Sigma 301K centrifuge (Sigma, Barcelona, Spain). Prior to filtration/centrifugation each sample was diluted (1:20) with ethanol/water (70:30) solution to avoid deposition of free flavanones (possibly crystallized in the aqueous phase) onto NPs surface avoiding erroneous overestimation of the EE. NPs were then retained on the membrane filter while the hydro-ethanolic solution containing the free drug crossed the membrane. The amount of drug in this solution was established using HPLC analysis.

The flavanone entrapment efficiency was calculated as indicated below:

$$EE(\%) = \frac{\text{Total amount of flavanone} - \text{Free amount of flavanone}}{\text{Total amount of flavanone}} \times 100 \quad (1)$$

Similarly, the drug loading capacity (LC) of the loaded polymeric NPs was calculated using the following equation:

$$LC(\%) = \frac{\text{Total amount of flavanone in nanoparticles}}{\text{Total amount of nanoparticles}} \times 100 \quad (2)$$

2.6. Stability studies

The NEs and polymeric NPs were filled in glass vials and incubated according to ICH guideline [19] at $5 \pm 1^\circ\text{C}$ (refrigeration condition) and $40 \pm 2^\circ\text{C}/65\% \text{RH}$ (accelerated condition) for 3 months. Stability was assessed by comparing the initial appearance and clarity (by visual inspection), as well as EE, ZP, and particle size with those obtained after storage period.

2.7. Determination of the drug content in formulations

The flavanones content in NEs and polymeric NPs was determined by a reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Aliquots of the extracted sample were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ filters and drug content was estimated. The system consisted of a Waters 1500 pump (Waters, Milford, MA) with a UV-vis 2487 detector (Waters, Milford, MA), wavelength of 290 nm. A reverse-phase column Nucleosil® 100, $5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany) was used with a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (80:20).

Standard stocks of flavanones (100, 50, 25, 12.5, 6.25, and $3.125 \mu\text{g/L}$) were prepared from a main solution in ethanol/water (70:30) containing 0.1 mg/mL in order to measure the concentration of the samples and to validate the analytical technique according to international guidelines [20] including linearity, sensitivity, accuracy, precision and selectivity.

2.8. In vitro release studies and kinetic evaluation

In vitro release studies were performed using vertical diffusion Franz cells (Hanson research corporation, CA, USA) with effective diffusional area of 0.6 cm^2 . Three types of membranes were tested: methylcellulose (MC) (Teknokroma, Barcelona, Spain), nylon (NYL) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and polysulfone (PS) (Pall Corporation, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA). The best membrane was selected for this assay.

The receptor compartment was filled with ethanol/water (70:30) as receptor phase. This receptor medium allowed keeping perfect sink conditions in the whole experiment. It was constantly stirred with a small magnetic bar and thermostated at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ throughout the experiments. 100 mg of each formulation was placed on the donor phase; samples of the receiver compartment were extracted after prefixed intervals times for 70 h and replaced with an equal volume of fresh solution. Concentrations of released drug values are reported as the mean \pm SD of six replicates. Flavanones amounts of each sample were calculated by HPLC method as described in Section 2.7.

Data obtained from *in vitro* release studies were fitted to various kinetic equations to find out the mechanism of flavanones release from NEs and polymeric NPs. Four different kinetic models were used: zero order, first order, Weibull and Korsmeyer–Peppas functions.

A nonlinear least-squares regression was performed using the WinNonLin® Professional edition software, version 3.3 (Pharsight

Corporation, Sunnyvale, CA, USA), and the model parameters calculated. Equally, the Akaike's Information Criterion (AIC) was determined for each model as it is an indicator of the model suitability for a given dataset. The smaller the value of Akaike's Information Criterion, the better the model adjusts the data.

2.9. Human skin permeation studies

Human skin from abdominal plastic surgery of healthy patients was used as a permeation membrane. Skin was cleaned and stored at -25°C until further use. For the experiment skin was cut using an Aesculap GA 630 dermatome (Aesculap, Tuttlingen, Germany) into $400 \mu\text{m}$ thick pieces at room temperature [21]. The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona SCIAS Hospital (Spain), and written informed consent forms were provided by volunteers.

Each skin sample was measured in triplicate using a trans epidermal water loss (TEWL) measurement DermaLab® module (Cortex Technology, Hadsund, Denmark) to check the skin integrity [22], skin with TEWL value higher than $10 \text{ g/m}^2/\text{h}$ was ruled out from the experiment.

The permeation studies were performed in amber glass Franz-type diffusion cells with a diffusion area of 2.54 cm^2 . The excised skin was set in place with the stratum corneum facing the donor compartment (1.5 mL) and the dermis facing the receptor compartment (6 mL). 0.4 mL of the test formulation was applied to the skin surface in the donor compartment and the receptor compartment was filled with ethanol/water (70:30) solution. Solution in receptor side was kept at $32 \pm 1^\circ\text{C}$. After application of the test formulation on the donor side, 300 μL aliquots were collected from the receptor side at designated intervals for 40 h and replaced with an equal volume of fresh solution immediately. Sink conditions were met in all cases. Amounts of flavanones were determined in triplicate by HPLC as described in Section 2.7.

The cumulative amount of each flavanone permeated (Q_t) through excised human skin was plotted as a function of time. Additionally, flavanones fluxes (J , $\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$) through the skin, from the NEs and polymeric NPs were calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the human skin per unit surface area versus time plot, and the intercept with the X-axis (time) is equal to lag time (T_l , h). The permeability coefficients (K_p , cm/h) were obtained by dividing the flux (J) by the initial drug concentration (C_0) in the donor compartment, and it assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment. Partition parameter P_1 and the diffusion parameter P_2 were also calculated.

Amount of drug remaining in the skin (the extraction recovery) was determined by computing the amount of each flavanone extracted from the skin to the amount of flavanone added. For the extraction, the skin was removed from the Franz cell, cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of sodium dodecyl sulphate and washed in distilled water accurately. The permeation area of the skin was then excised and weighed, and the flavanone contained was extracted with ethanol/water (70:30) mixture during 20 min under sonication in an ultrasound bath. The resulting solutions were centrifuged (1500 rpm) and their flavanones (1–4) levels (expressed as $\mu\text{g/gcm}^2$ of skin) were measured by HPLC, yielding the amount of each flavanone retained in the skin.

2.10. Anti-inflammatory testing

For the evaluation of the anti-inflammatory activity, each flavanone loaded NE and polymeric NPs were assayed by TPA-induced mouse ear oedema following the protocol previously described

[23]. Mouse ear oedema was induced using groups of male CD-1 mice ($n=3$ mice per group) through topical application of $2.5 \mu\text{L}$ of TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) dissolved in $5 \mu\text{L}$ ethanol. 1 mg of each free flavanone (1–4) was dissolved in acetone and applied on both sides of the right ear simultaneously with TPA. Standard anti-inflammatory drugs, diclofenac acid and indomethacin as references, were dissolved in acetone or incorporated in the vehicle concerned and applied to both sides of the right ear (same dose that flavanones) simultaneously with TPA. Also, ethanol and acetone were applied to both sides of the left ear.

Appropriate volumes of flavanone loaded NEs or NPs were chosen to apply 1 mg of drug to the right ear and the same quantity of vehicle (unloaded NEs or unloaded NPs) to the left ear. Four hours after the anti-inflammatory agents were administered; the animals were sacrificed by cervical dislocation. Circular sections (7 mm diameter) were cut from right and left ears. The sections were weighted and then anti-inflammatory activity expressed by means of the following equation:

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{\text{difference in weight of ear, control} - \text{difference in weight of ear, treated}}{\text{difference in weight of ear, control}} \times 100 \quad (3)$$

2.11. Statistic analysis

The mean values of the ratio between chromatographic areas and their expected concentration (AUC/C) were compared by ANOVA to test the linearity of the analytical method ($P > 0.05$).

The median values of the permeation parameters coming from six different donors were performed by non parametric analysis (Kruskal–Wallis) by using the GraphPad Prism®, v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) differences where $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Selection of nanoparticulate system formulations

Nanoemulsions could improve the permeation across the skin due to the small droplet size and the presence of permeation promoters. Furthermore, NE itself accelerates the drug penetration into the tissue [9–10]. To design a new formulation, it is essential to identify the influencing factors that might affect the properties of the NEs, so we elaborated a pseudo-ternary phase diagram formed by the combination of substances such as a lipophilic phase, non-ionic surfactants, and co-surfactants attending to their characteristics of polarity, hydrophilicity and/or amphiphilicity according to the NE formulations by the manufacturer guidelines.

On the basis of the suitability for topical administration after literature research and preliminary studies, an anhydrous composition was selected because of the solubility of flavanones. The frequently combination Labrasol® and Plurol® oleique was used as surfactant and co-surfactant respectively because of the known skin compatibility. Pseudo-ternary phase diagram of the investigated quaternary system was constructed with the objective to study the relationship between the phase behaviour and composition of mixtures. In this way, the vertexes of the equilateral triangle represented the following components: Labrafac®, Labrasol®:Plurol® oleique (5:1) and propylene glycol (Fig. 2). Formation of NE systems (the yellow area) was observed at room temperature. The obtained results show the best values of appearance (isotropic transparent phase), droplet size and PI. From the best area of emulsion, the formulation expressed in Fig. 2 was selected. Each flavanone (1–4) was loaded in a fixed concentration of 0.5% (w/w).

The use of polymers as drug delivery systems is considered nowadays a strategy to enhance the bioavailability of topically administered drugs [16]. The entrapment of non-steroidal anti-inflammatory drugs in particulate delivery systems represents an innovative alternative to minimize side effects, while preserving their efficacy. This can be obtained by the capacity of these systems to provide controlled release or to improve the drug penetration through the skin. Among these polymers, poly(D,L-lactide-coglycolide) (PLGA), approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), has been extensively used for controlled drug delivery systems because of their biocompatibility and biodegradability. P188 was chosen as surfactant to stabilize particulate systems in aqueous suspension due to its non-ionic character and it is also accepted by the regulatory authorities for its administration [24]. Additionally, it is a valuable alternative to poly(vinyl alcohol) due to the pronounced negative zeta potential values obtained which contribute to the stabilization of the colloidal system [25]. Based on these considerations, PLGA 50:50 unloaded

NPs and flavanone loaded NPs were developed at concentration of 1.5 mg/mL.

3.2. Physicochemical characterization

Nanoemulsions and polymeric NPs were characterized in terms of appearance, droplet and particle size, PI and ZP. Values are reported in Table 1.

The obtained NEs were isotropic, transparent, and slightly viscous (Fig. 3). All flavanones loaded NEs presented droplet sizes less than 70 nm indicating a good system for topical release, with PI ranging from 0.222 ± 0.019 to 0.518 ± 0.02 [11]. The NE4 exhibited the highest size of 68.87 ± 3.46 nm and NE1 showed the least droplet size of 48.91 ± 0.30 nm. The droplet size of the unloaded NE was 50.76 ± 3.34 nm, the mean droplet size was not changed after flavanones 1 and 2 loading, contrary, after flavanone 3 loading, droplet size was slightly but not significantly decreased, and flavanone 4 loading increased significantly the droplet size ($P < 0.001$). It has been hypothesized that apart from the NE structure and composition, the incorporated drug molecules participate in the structure of the system and may influence it due to molecular interactions, especially if the drug possesses amphiphilic and/or mesogenic properties [11]. On the other hand, the whitish suspension of flavanone loaded polymeric NPs showed mean particle sizes of 156–202 nm. This increase of particles size against nanoemulsions could be attributed to the presence of a polymer matrix. The particle size distribution was very narrow for NP2, NP3 and NP4, being the PI lesser than 0.1, corresponding to monodisperse systems. Slightly higher value was observed for NP1.

Zeta potential of PLGA NPs depends on the end groups of the PLGA, the type of drug encapsulated and the type of stabilizing agent used during preparation. All NP formulations showed negative charges ranging from -25 to -30 mV. These values are probably due to the ionization of the carboxyl end-groups of the polymer chains in presence of water and represent particle stability, because the repulsive forces prevent aggregation with ageing due to the ionization of carboxylic end groups of the surface polymer [26]. Drug loading capacity is a very relevant parameter for judging the suitability of a particular drug-carrier system [27]. Table 1 also summarizes the main characteristic of flavanones loaded NEs and NPs as a function of the drug entrapped. Drug loading efficiency results show that all NEs entrapped between 98.66 and 99.33% of

Table 1

Partition coefficient ($\log P$) of flavanones and physicochemical properties of nanoparticulate systems, drug loading efficiency of nanoemulsion (DLE), entrapment efficiency (EE) and loading capacity (LC) of PLGA nanoparticles. 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (1); 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxy-flavanone (2); 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (3); and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (4). Values are reported as mean \pm SD ($n=3$).

Sample	$\log P$	Nanoemulsions			Nanoparticles				
		Droplet size (nm)	Polydispersity index	DLE (%)	Particle size (nm)	Polydispersity index	ξ -Potential (mV)	EE (%)	LC (%)
Empty		50.76 \pm 3.34	0.381 \pm 0.033	–	202.00 \pm 1.80	0.08 \pm 0.01	–25.70 \pm 1.3	–	–
1	0.85	48.91 \pm 2.30	0.414 \pm 0.091	99.26 \pm 0.2	173.26 \pm 3.43	0.03 \pm 0.03	–26.65 \pm 0.6	90 \pm 4.30	32.14 \pm 0.21
2	1.04	49.67 \pm 2.33	0.242 \pm 0.026	98.83 \pm 0.5	156.16 \pm 2.28	0.05 \pm 0.02	–31.60 \pm 0.2	78 \pm 3.02	27.86 \pm 0.20
3	0.70	59.84 \pm 0.55	0.518 \pm 0.020	98.66 \pm 0.7	156.20 \pm 1.41	0.09 \pm 0.01	–29.95 \pm 0.6	80 \pm 4.75	28.75 \pm 0.26
4	0.73	68.87 \pm 3.46 ^a	0.222 \pm 0.019	99.33 \pm 0.3	163.82 \pm 3.09	0.08 \pm 0.08	–30.90 \pm 0.6	85 \pm 5.80	30.40 \pm 0.19

^a Statistically significant differences ($P < 0.05$) comparing loaded and empty.

flavanones. The NEs showed up to 20% higher flavanones loading compared to NPs, probably due to an increase in the solubility of the drug. Among NPs, the EE was high enough and ranged from 78% for NP2 to 90% for NP1, these values of PLGA NPs were in agreement or even higher than other authors [28] and could be explained by the hydrophobic nature of flavanones, in line with $\log P$ values of flavanones (Table 1). In this sense, other authors [15] have reported the relationship between the drug hydrophobicity and PLGA. Similarly, as shown Table 1 LC values for NPs were appropriated from 27.86% for NP2 to 32.14% for NP1.

As demonstrated in Fig. 4, a clear image of the undiluted NE was obtained. TEM images allowed confirm the efficiency of the NE preparation method used. The diffusion of the dye used (uranyl acetate, 2%) reveals the existence of a transparent area on electron bombardment (areas which the colouring has not been able to reach) and electrodeposited areas which denote the presence of heavy metal. For this reason, the aqueous phase of the NEs behaves as though electrodeposited, which appear dark to us, whilst the non-polar droplets, around the previous one, correspond to the transparent areas. The increased contrast observed at the interface of the oil droplets could be due to the affinity of the staining agent to interfacial components. All confirmed that a W/O nanoemulsion was obtained and the efficiency of the elaboration method. The observation of the sample in higher magnifications (Fig. 4) showed particles with smooth surfaces and almost spherical shape. These results confirmed DLS measurements.

Fig. 5 gives information about NP structure showing that most particles had round, uniform shapes. Particle size measured by TEM was generally well correlated with that found using photon correlation spectroscopy, although a slightly smaller particle size was observed in TEM, probably due to desorption of the surrounding P188 on the NPs surface. This fact could be attributed to the dilution of samples [14].

For the stability studies, all NE formulations were examined after 3 months storage period at two temperatures (5 ± 1 °C and 40 ± 2 °C). There was no change in the visual appearance, as expected, because of the stability properties of NEs [29]. Samples maintained the initial properties with respect to droplet size when stored at 5 °C. Equally, PLGA NPs remained visually unchanged during storage under referred conditions. No sediment could be observed in any formulation. Samples maintained the initial properties with respect to particle size, ZP and EE after 3 months. However the NEs and NPs sizes as well as their PI values were increased at accelerated storage conditions (40 °C), but NPs retained high negative surface charges contributing to maintain the stabilization of these colloidal systems. EE was significantly decreased between 10 and 12% (data not shown).

3.3. In vitro drug release

Polysulfone membranes were selected as the most suitable type which offered the least resistance to the diffusion of the actives,

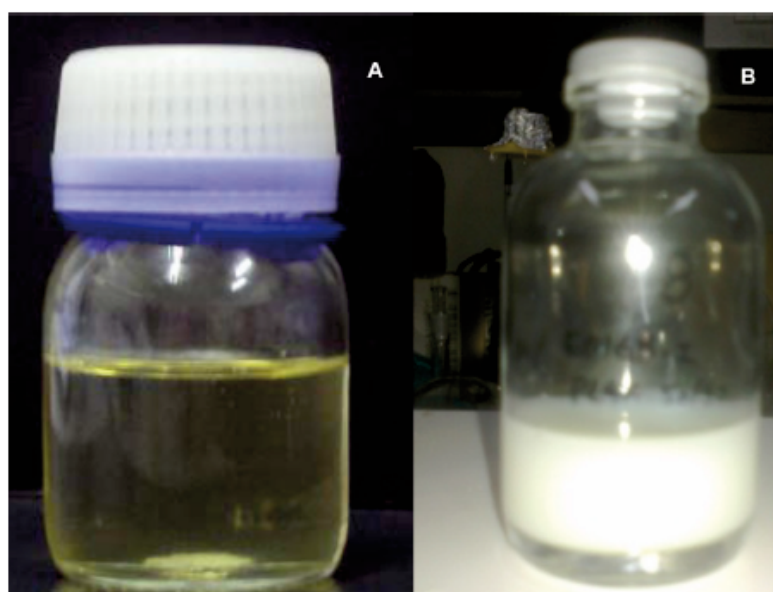


Fig. 3. Visually appearance of nanoemulsion (A) and nanoparticles (B).

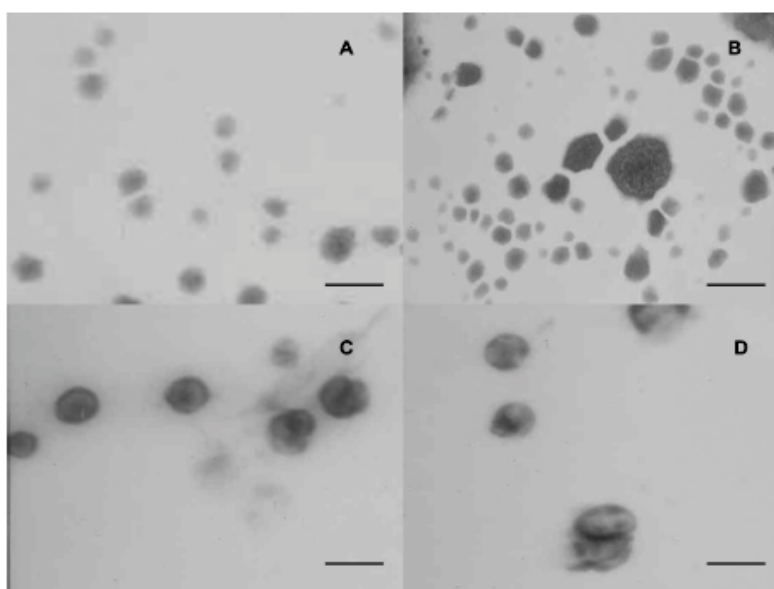


Fig. 4. TEM images of the flavanone loaded nanoemulsions. 5,7-Dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (A); 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxy-flavanone (B); 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (C); and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (D). Bar length 100 nm.

in order to minimize the influence of membrane type in the test. Fig. 6 shows the different release profiles of NEs and NPs, respectively. The release profiles indicate a two step process. The initial step shows a burst release which can be attributed to the surface associated drug, followed by a slower sustained release phase for all flavanone loaded NEs except for NE4 in which this effect is almost absent. Statistical differences ($P < 0.05$) among assayed emulsions were observed, 70–75% of **3** and **1** was released from NEs in 10 h approximately, **2** reached 50%, but the release of **4** barely achieved 30%. This greater liberation from NE1 and NE3 could be due to

the absence of the methoxy group in their molecule structures (**1** and **3**). The methoxy group can involve electron-donating resonance effect giving an overall electron-donating effect. This fact could modify the molecular hydrophobic interactions between flavanones **2** and **4** and rings of the polysulfone membrane which has a lipophilic nature, and thus could show greater affinity for molecules with methoxy groups. By contrast, flavanones **1** and **3** include several hydroxyl groups. These chemical groups in absence of methoxy groups are expected to form hydrogen bonds with the receptor medium [30].

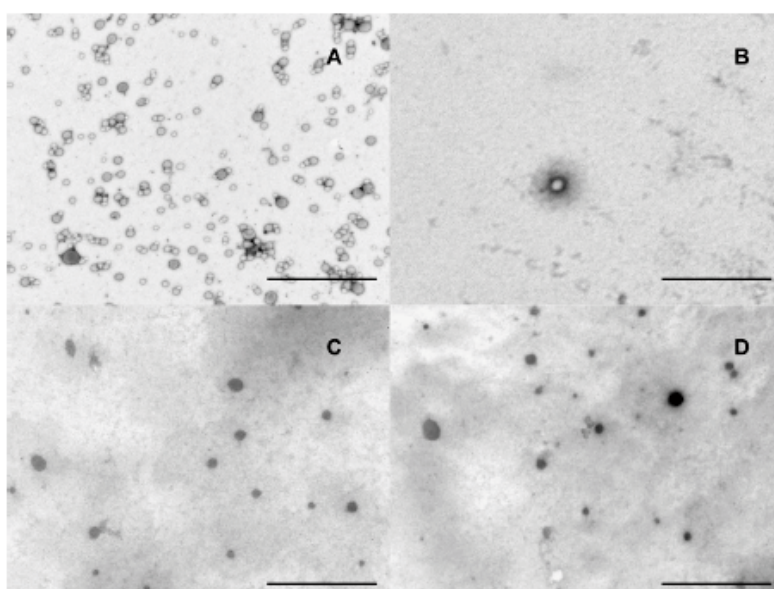


Fig. 5. TEM images of the flavanone loaded PLGA nanoparticles. 5,7-Dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (A); 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxy-flavanone (B); 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (C); and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (D). Bar length 1000 nm.

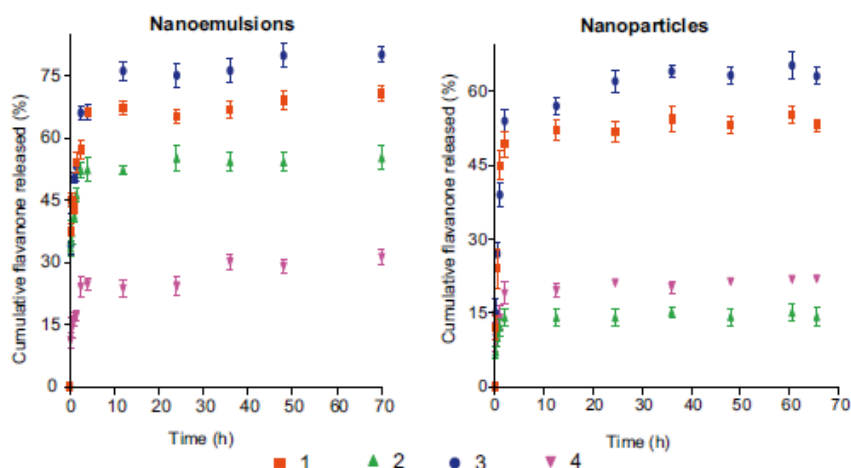


Fig. 6. *In vitro* drug release of flavanones from nanoemulsions and PLGA nanoparticles. 5,7-Dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (1); 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4'-methoxy-flavanone (2); 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (3); and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (4). The cumulative amount released was plotted against time. Data represent mean \pm SD ($n=6$).

On the other hand, polymeric NPs release showed even faster burst effect, maximum amount release was achieved in 2 h approximately, but smaller drug release rate was achieved, 65% from NP1 and 50% from NP3, as in the case of NEs, NP2 and NP4 exhibited 20% without statistically differences between both.

All these data obtained from the *in vitro* release study were fitted to four kinetic models. It has been reported the advantages of using empirical equations, they can be fitted very simply to experimental data [31]. However, the release data analysis applying the mathematical models is purely empirical and no definitive conclusion can be drawn concerning the dominating mass transport mechanisms. Model fitting, according to the least AIC values, showed that NE1 followed a Weibull release model; NE2 and NE3 followed a first-order release model and NE4 a Korsmeyer-Peppas's release model.

On the other hand, flavanones vehiculated in polymeric NPs exhibited the same kinetic models that their respective NE vehicles except NP4 which showed a zero order kinetic model.

On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms, estimates for $\beta \leq 0.75$ indicate Fickian diffusion in either fractal or euclidian spaces while a combined mechanism (Fickian diffusion and swelling controlled release) is associated with β values in the range $0.75 < \beta < 1$. For values of β higher than 1, the drug transport follows a complex release mechanism [32]. For our NE1 and polymeric NP β values were 0.833 ± 0.27 and 0.94 ± 0.09 indicating a combined mechanism and Fickian diffusion which is frequently encountered in release studies, as β value approaches 1 is compatible with first-order release, whereas the concentration gradient in the dissolution medium drives the rate of release [33], then both formulations would be in line with what showed by NE2, NP2, NE3 and NP3. First order means that the flavanone is delivered at a rate proportional to the concentration gradient driving the transfer of drug movement, based on the first Ficks law, where the released amounts are directly proportional to the amounts remaining into the dosage form. Finally, zero order and Korsmeyer-Peppas models are closely approximated when $n \geq 0.89$, then the release rate of the drug is independent of its concentration. NE4 showed anomalous (non-Fickian) release with $n=0.75$ (close to 0.89). Polymeric NP4 provided a reservoir effect which caused sustained release (zero order). It can be seen that the release from these two formulations are also similar. These results are closely aligned to the typical release profile for PLGA

particulate delivery systems, which are characterized by the initial burst effect followed by a near zero order phase [34]. Both nano-vehicles provided similar release behaviours for each flavanone, however, the mathematical description of the entire drug release process is rather difficult because of the number of physical characteristics that must be taken into consideration [35]. There are too much factors involved, physicochemical properties, structural characteristics of the material system, release environment, and the possible interactions between these factors, but the final purpose of mathematical modelling is to simplify the complex release process and to gain insight into the release mechanisms.

3.4. *Ex vivo* skin permeation

Permeation parameters of NE1-NE4 are provided in the supplementary data. A steady increase of flavanones in the receptor chambers was observed over time. After lag times from 6.25 to 8.91 h a nearly linear relationship between cumulative amounts of drugs permeated *versus* time could be observed, indicating that the skin integrity was maintained throughout the experiment and the permeation rates were constants. The median K_p values among NE formulations ranged between 1.6×10^{-4} cm/h and 6.26×10^{-5} cm/h for NE3 and NE2 respectively showing better results than diclofenac acid in similar vehicle with a K_p of 4.50×10^{-5} cm/h [28]. The maximum flux was achieved by NE3 with $0.81 \mu\text{g}/\text{h cm}^2$ and partition parameter 7.86×10^{-3} cm directly related to the membrane/donor phase partition coefficient, contrary, NE4 achieved a flux value of $0.15 \mu\text{g}/\text{h cm}^2$. Permeated amounts after 40 h ranged between 82.56 and 16.09 μg for NE3 and NE2 respectively and the highest retained amount was observed in NE4 $320.09 \mu\text{g}/\text{g cm}^2$. Nanoemulsions are reported to be able to reduce the interface tension between vehicle and skin because of their contact to the skin lipids, which resulted in faster permeation [36].

Colloidal particles, such as polymeric NPs have been developed as drug delivery carriers with advantages. The encapsulation of the drug in a modified-sustained release form can lead to a slower uptake of the drug in the systemic circulation, avoiding high plasma concentrations and increasing in time its pharmacodynamic effect for a prolonged period of time [37]. Among flavanones loaded polymeric NPs, NP1 exhibited the highest permeability coefficient and flux of 1.95×10^{-4} cm/h and $1.95 \mu\text{g}/\text{h cm}^2$

Table 2

Effect of *Eysenhardtia platycarpa* flavanones on TPA-induced mouse ear oedema. 5,7-Dihydroxy-6-methyl-8-prenylflavanone (1); 5,7-dihydroxy-6-methyl-8-prenyl-4-methoxy-flavanone (2); 5,7-dihydroxy-6-prenylflavanone (3); and 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenylflavanone (4). Results are shown as mean \pm SD ($n = 3$) of the inflammatory activity inhibition (%).

Solutions	1	2	3	4	Diclofenac acid	Indomethacin
% Inhibition	12.24 \pm 1.09	68.35 \pm 1.45	66.67 \pm 1.55	46.43 \pm 1.54	90.52 \pm 0.67	91.35 \pm 0.47
Nanoemulsions	NE1	NE2	NE3	NE4	Diclofenac acid nanoemulsion	Indomethacin nanoemulsion
% Inhibition	88.29 \pm 1.45	64.55 \pm 1.45	82.91 \pm 0.95	62.66 \pm 1.09	59.91 \pm 0.62	64.29 \pm 1.55
Nanoparticles	NP1	NP2	NP3	NP4	Diclofenac acid nanoparticle	Indomethacin nanoparticle
% Inhibition	21.61 \pm 2.9	20.00 \pm 1.48	80.97 \pm 1.48	54.84 \pm 2.23	54.13 \pm 1.59	87.16 \pm 1.59

respectively, partition and diffusion parameters were 0.22 cm and $0.86 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. Lag time is a permeation parameter depending mainly on the diffusivity of the drug through the skin with the lag time being reduced with increasing diffusivity, NP1 showed the smallest T_l value of 19.37 h and NP4 displayed the lowest flux, $0.12 \mu\text{g}/\text{h cm}^2$. There were not statistically significant differences among flavanones amounts permeated through the skin at 40 h but remaining amounts were greater for NP3 and NP4 (500.63 and $396.99 \text{ mg}/\text{g cm}^2$, respectively) in accordance with their low values of permeability coefficients.

Permeability coefficient was increased in 1 when it was loaded in NPs instead of NE vehicle; also P_1 , flux and permeated amount were increased. In addition, better permeability coefficients were observed in 2 when was included in polymeric NPs. For both vehicles, low values in K_p and flux, in general could be related to high quantities of retained drug, but often it is difficult to explain some differences as very little is known about the underlying principles of membrane flux variability [38].

Overall the retained amounts of flavanones in NPs were observed to be improved by the NP vehicle; this could be explained because PLGA is lipophilic, and so NPs may gradually accumulate in the skin layers.

3.5. Anti-inflammatory activity

The topical anti-inflammatory activities of flavanones (free drug and encapsulated) were determined by assessing the effect of the drugs on mouse ear oedema induced by TPA.

Inflammatory reactions can be triggered off by exogenous or endogenous aggressions which are characterized by vascular and cellular events. Several mechanisms explaining the anti-inflammatory activity of flavonoids have been described, including antioxidative and radical scavenging activities, regulation of cellular activities of inflammation-related cells, modulation of the activities of arachidonic acid metabolism enzymes and nitric oxide synthase, modulation of the production of other proinflammatory molecules and modulation of proinflammatory gene expression. Inhibition of cyclooxygenase and nitric oxide synthase expression reduces the inflammatory response caused by the application of TPA, which is known to induce the expression of both enzymes through the activation of protein kinase C in different tissues and pro-inflammatory cells [39]. As shown in Table 2, flavanones of *E. platycarpa* in solution (1 mg/ear) reduced the ear oedema induced by TPA, among them, 1 showed the least activity and 4 the highest. The chemical structure is closely related with this biological activity, in this way it seems that the presence of the methoxy group in the phenyl ring may be related with stronger anti-inflammatory activity of 2 and 4. The vehiculization of flavanones in NE involved significantly higher inhibition of ear oedema for NE1, NE3 and NE4, being similar for NE2. The NP loading showed higher inhibition of ear oedema only for NP3. When compared with reference anti-inflammatory drugs, NP3 and NP4 exhibited the same inhibition

activity than indomethacin and diclofenac acid, respectively. Thus is evident that NPs formulations applied on the mouse ear possess enough ability to provide sufficient bioavailability of flavanone to reach easily the site of action.

4. Conclusions

The potent anti-inflammatory activity of flavonoids suggests the use of these compounds as potential prophylactic and therapeutic agents. In this study, we report for the first time incorporation of four prenylated flavanones isolated from *E. platycarpa* leaves into NEs and PLGA NPs as anti-inflammatory agents for topical administration. The vehiculization of the compounds with anti-inflammatory activity in nanoparticulate systems represents a great advantage to improve therapeutic effect and decrease side effect as a consequence of better permeation and more accumulation at the site of action while delivering relative less amount of drugs. After constructing a pseudo-ternary phase diagram NEs with droplet size less than 70 nm were elaborated. PLGA NPs were prepared using a solvent displacement technique and displayed small, homogeneous size, high entrapment efficiency, and satisfactory drug loading. Negative zeta potential values ensured good stability. Vehiculization sustained flavanones release and promoted the permeation through the skin for ensuring the achievement of the site of action. Finally, formulations showed to possess adequate anti-inflammatory properties. When considering that 5-hydroxy-7-methoxy-6-prenyl flavanone (3) loaded NE and NP showed the best results in the release and skin permeation studies, as well as their remarkable anti-inflammatory activity, it could be proposed as the formulations which have the best properties as potential topical anti-inflammatory agents.

Acknowledgments

The authors would like to thank to Gattefossé for kindly supplying the samples of nanoemulsion components used in this study and Hospital Barcelona-SCIAS (Barcelona, Spain) for providing skin samples. The research leading to these results has received funding from project MAT2011-26994 of the Ministry of Science and Innovation of Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.009>.

References

- [1] B. Havsteen, *Pharmacol. Ther.* 96 (2002) 67–202.
- [2] A. García-Lafuente, E. Guillamón, A. Villares, M.A. Rostagno, J.A. Martínez, *Inflamm. Res.* 58 (2009) 537–552.
- [3] T.A. de Sousa Araújo, N.L. Alencar, E.L. de Amorim, U.P. de Albuquerque, J. *Ethnopharmacol.* 120 (2008) 72–80.

- [4] J.M. Narváez-Mastache, M.L. Garduño-Ramírez, L. Alvarez, G. Delgado, J. Nat. Prod. 69 (2006) 1687–1691.
- [5] H.P. Kim, H.S. Kun, H.W. Chang, S.S. Kang, J. Pharmacol. Sci. 96 (2004) 229–245.
- [6] O. Kayser, A. Lemke, N. Hernández-Trejo, Curr. Pharm. Biotechnol. 6 (2005) 3–5.
- [7] V. Domínguez-Villegas, V. Domínguez-Villegas, M.L. García, A.C. Calpena, B. Clares-Naveros, M.L. Garduño-Ramírez, Nat. Prod. Commun. 8 (2013) 177–180.
- [8] B. Clares, M.A. Ruiz, V. Gallardo, J.L. Arias, Curr. Med. Chem. 19 (2012) 3203–3211.
- [9] F. Fernández-Campos, A.C. Calpena-Campmany, G. Rodríguez-Delgado, O. López-Serrano, B. Clares-Naveros, J. Pharm. Sci. 101 (2012) 3739–3752.
- [10] M.L. Garduño-Ramírez, B. Clares, V. Domínguez-Villegas, C. Peraire, M.A. Ruiz, M.L. García, A.C. Calpena, Nat. Prod. Commun. 7 (2012) 821–822.
- [11] A. Gimeno-Sandig, A.C. Calpena-Campmany, F. Fernández-Campos, M.J. Martín-Villena, B. Clares-Naveros, Colloid Surf. B Biointerfaces 103 (2013) 558–565.
- [12] S. Baboota, F. Shakeel, A. Ahuja, J. Ali, S. Shafiq, Acta Pharm. 57 (2007) 315–332.
- [13] S. Arayachukeat, S.P. Wanichwecharungruang, T. Tree-Udom, Int. J. Pharm. 404 (2011) 281–288.
- [14] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Int. J. Pharm. 55 (1989) 1–4.
- [15] E. Vega, M.A. Egea, A.C. Calpena, M. Espina, M.L. García, Int. J. Nanomedicine 7 (2012) 1357–1371.
- [16] E. Vega, F. Gamisans, M.L. García, A. Chauvet, F. Lacoulonche, M.A. Egea, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 5306–5317.
- [17] M.G. Carneiro-da-Cunha, M.A. Cerqueira, B.W.S. Souza, J.A. Teixeira, A.A. Vicente, Carbohydr. Polym. 85 (2011) 522–528.
- [18] S.R. Deshiiikan, K.D. Colloid Polym. Sci. 276 (1998) 117–124.
- [19] ICH, Guidance for industry Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products, 2003, <http://www.fda.gov/downloads/regulatoryinformation/guidances/ucm128204.pdf> (accessed 05.07.13).
- [20] European Medicine Agency (EMA), Guideline on Validation of Bioanalytical Methods, Document Reference EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, EMA, London, 2011.
- [21] Council Regulation (EC) No 440/2008, Test Guideline for Skin Absorption: in vitro Method (B.45), J. Eur. Union (2008) 438–443.
- [22] F. Netzlaff, K.H. Kostka, C.M. Lehr, U.F. Schaefer, Eur. J. Pharm. Biopharm. 63 (2006) 44–50.
- [23] N. Acevedo-Quiroz, V. Domínguez-Villegas, M.L. Garduño-Ramírez, Nat. Prod. Commun. 3 (2008) 313–317.
- [24] S.D. Singh-Joy, V.C. McLain, Int. J. Toxicol. 27 (2008) 93–128.
- [25] J. Vandervoort, A. Ludwig, Int. J. Pharm. 238 (2002) 77–92.
- [26] T. Govender, S. Stolnik, M.C. Garnett, L. Illum, S. Davis, J. Control. Release 57 (1999) 171–185.
- [27] K. Ruckmani, M. Sivakumar, P.A. Ganeshkumar, J. Nanosci. Nanotechnol. 6 (2006) 1–5.
- [28] E. Escribano, A.C. Calpena, J. Queralt, R. Obach, J. Doménech, Eur. J. Pharm. Sci. 19 (2003) 203–210.
- [29] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, M.J. Garcia-Celma, Curr. Opin. Colloid. Interface Sci. 10 (2005) 102–110.
- [30] M.B. Spowage, C.L. Bruce, J.D. Hirst, J. Cheminform. 1 (2009) 1–13.
- [31] J. Siepmann, N.A. Peppas, Adv. Drug Deliv. Rev. 48 (2001) 139–157.
- [32] V. Papadopoulos, K. Kosmidis, M. Vlachou, P. Macheras, Int. J. Pharm. 309 (2006) 44–50.
- [33] E. Rinaldi, A. Dokoumetzidis, P. Macheras, Pharm. Res. 20 (2003) 406–408.
- [34] Y. Li, Y. Pei, X. Zhang, Z. Gu, Z. Zhou, W. Yuan, J. Zhou, J. Zhu, X. Gao, J. Control. Release 71 (2001) 203–211.
- [35] A.F. Sierra, M.L. Ramírez, A.C. Campmany, A.R. Martínez, B.C. Naveros, J. Dermatol. Sci. 69 (2013) 202–214.
- [36] A. Teichmann, S. Heuschkel, U. Jacobi, G. Presse, R.H. Neubert, W. Sterry, J. Lademann, Eur. J. Pharm. Biopharm. 67 (2007) 699–706.
- [37] V. Hoffart, A. Lamprecht, P. Maincent, T. Lecompte, C. Vigneron, N. Ubrich, J. Control. Release 113 (2006) 38–42.
- [38] E. Limpert, W.A. Stahel, M. Abbt, Bioscience 51 (2001) 341–352.
- [39] J.K. Lin, Adv. Exp. Med. Biol. 595 (2007) 227–243.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha realizado la asociación de cuatro flavanonas naturales isoprenílicas a sistemas coloidales de liberación modificada con el fin de mejorar la biodisponibilidad tópica de cada una de las flavanonas en el tratamiento de la inflamación en enfermedades reumáticas y desórdenes musculoesqueléticos. Por ello, se diseñaron nanopartículas y nanoemulsiones con el propósito de ofrecer una alternativa a los antiinflamatorios tópicos que se encuentran ya comercializados.

Para el **diseño de una nueva formulación**, es esencial identificar los factores que pueden afectar a las **NEs**, por lo que en estudios preliminares se elaboró un diagrama pseudo-ternario a partir de una fase lipofílica, tensioactivos no iónicos y co-tensioactivos a distintas proporciones atendiendo las características de polaridad, hidrofílicas y anfifílicas. En primer lugar, se seleccionó una fase oleosa en la cual fueran solubles las flavanonas, tras ello, se seleccionó el tensioactivo y co-tensioactivo apropiados para la formulación (Labrasol® y el Plurol oleique®). Adicionalmente, para facilitar la emulsificación del Labrasol® se utilizó propilenglicol y ésteres ácidos (Kreilgaard, 2001, Fernández-Campos *et al*, 2013, Garduño-Ramírez *et al*, 2012).

Para la determinación del área de la nanoemulsión más óptima, se llevó a cabo primeramente una inspección visual que permitió seleccionar aquellas formulaciones de aspecto monofásico y transparente, las cuales fueron evaluadas posteriormente en términos de tamaño de gota y polidispersión a través de DLS. Las NEs obtenidas fueron isotrópicas, transparentes y ligeramente viscosas con un tamaño de gota inferior a 70 nm y un índice de polidispersión entre 0.222 y 0.518 ± 0.002 , lo cual indica un sistema de liberación adecuado para aplicación tópica (Gimeno-Sandig *et al*, 2013).

Las imágenes de TEM indican que se obtuvo una emulsión W/O, es decir, una nanoemulsión de fase interna hidrófila. Esto se deduce utilizando acetato de uranilo como agente de contraste, que permite observar un área trasparente al bombardeo electrónico, en la cual, el colorante no es capaz de difundir (fase oleosa) y un área electrodensa que indica la presencia del metal pesado (fase hidrófila). El tamaño promedio de gota de la NE blanca fue de 50.76 ± 3.34 nm. La NE **(IV)** presentó el mayor tamaño de gota (68.87 ± 3.46 nm) mientras que la NE **(I)** fue la de menor tamaño (48.91 ± 0.30 nm). Ello indica que

aparte de la composición y estructura de las NEs, la incorporación y asociación de las flavanonas genera interacciones en la estructura del sistema que modifica el tamaño de gota (Gimeno-Sandig *et al*, 2013).

En la **elaboración de las nanopartículas** se utilizó como polímero el PLGA que es un polímero biocompatible, atóxico, y con una cinética de degradación predecible. Como tensioactivo, a pesar de que el PVA es el más utilizado cuando se utiliza el PLGA, tiene la desventaja que queda absorbido en la superficie del polímero y se elimina con dificultad, por lo que, se empleó el Poloxamer 188 debido a que es un tensioactivo no iónico y no tóxico (Vega, E, *et al*, 2006). Para su elaboración se siguió el método de Fessi donde el polímero y el fármaco se disuelven en acetona que es añadida (bajo agitación magnética) a la fase acuosa que contiene el tensioactivo. Las **NPs** se forman instantáneamente por la difusión rápida del disolvente a través del mecanismo de turbulencia interfacial que se genera durante el desplazamiento del solvente.

A partir de las flavanonas naturales empleadas en este trabajo se prepararon así mismo, nanopartículas poliméricas de PLGA 50/50 a concentración de 1.5 mg/mL que presentaron un tamaño de partícula superior (156-173 nm) al de las correspondientes las nanoemulsiones, conteniendo un 5 mg/ml de activo (48-68 nm), como consecuencia del carácter hidrofílico/lipofílico de cada una de las formulaciones. Las nanoemulsiones preparada en el presente trabajo son formulaciones lipofílicas mientras que las nanopartículas presentan un carácter hidrofílico, de acuerdo con los componentes empleados para su preparación (Fernández-Campos *et al*, 2013, Garduño-Ramírez *et al*, 2012, Vega *et al*, 2006). Este incremento de tamaño de partícula comparado con la NE se puede atribuir a la presencia de la matriz polimérica.

Se observó que la flavanona **(I)**, la más lipofílica de las cuatro ensayadas, es la que presenta el menor tamaño de gota de las nanoemulsiones formuladas, mientras que en las nanopartículas presenta el tamaño de partícula más grande, lo cual se atribuye a las interacciones de dicha flavanona con la formulación que debido a sus características de lipofilidad presenta más afinidad con la NE que es la formulación más lipofílica. Esto concuerda con otros estudios de productos naturales y que como se ha descrito en el área de investigación de principios activos de origen natural, se busca obtener tamaños

de partícula pequeños en las formulaciones que permitan una mejor biodisponibilidad del principio activo (Bhadoriya *et al*, 2011).

Respecto a la carga superficial que presentan las NPs, evaluada en base al potencial zeta, depende de los grupos terminales del PLGA, el tipo de fármaco encapsulado y el tipo de tensioactivo utilizado. Valores de potencial zeta elevados tienden a mejorar la estabilidad de las suspensiones, ya que la repulsión entre las partículas con la misma carga superficial previene la agregación de las mismas. Todas las **NPs** formuladas, presentan una carga negativa en un rango de -25 a -30 mV que se atribuye a la ionización de los grupos carboxílicos de los copolímeros en la superficie de las nanopartículas (Govender *et al*, 1999).

La capacidad de carga del fármaco es un parámetro muy relevante para considerar un sistema determinado idóneo para el transporte del fármaco (Bukimani *et al*, 2006). Los resultados de la eficiencia de asociación muestran que todas las **NEs** encapsulan entre el 98.66 % y 99.33 % de flavanonas. Las **NEs** mostraron un 20 % más de flavanonas encapsuladas comparadas con las correspondientes **NPs**, probablemente debido al incremento de solubilidad de las mismas. Para las **NPs** de PLGA desarrolladas, la EE fue lo suficientemente alta y oscilando entre el 78 % para **NP2** al 90 % para **NP1**, éstos valores fueron iguales o incluso superiores en comparación con los descritos otros autores (Escribano, *et al*, 2003) para este tipo de polímeros, lo que podría atribuirse a la naturaleza hidrofóbica de las flavanonas (puesta de manifiesto por los valores de log P para dichos activos). En este sentido, otros autores (Vega, *et al*, 2012) han reportado la relación que existe entre la hidrofobicidad y el **PLGA**. Del mismo modo, los valores fueron apropiados con un 27.86 % para **NP2** a 32.14 % para **NP1**.

Para los **estudios de liberación**, se analizó, previamente, la solubilidad de cada una de las flavanonas en el medio receptor con el fin de comprobar que se cumplan las condiciones Sink durante todo el experimento. Esto permite asegurar que la concentración máxima que puede encontrarse en el medio receptor a lo largo del experimento sea inferior a un 20% de la concentración de saturación de las flavanonas en el medio. En este sentido, el medio receptor en el que se cumplían las condiciones Sink fue etanol-agua (7:3) en el que se garantiza que la liberación de las flavanonas no se verá limitada

por la solubilidad del medio. En los ensayos realizados, la membrana de diálisis de polisulfona se seleccionó por considerarse el tipo más conveniente que ofreció la resistencia mínima a la difusión de las flavanonas y los activos comerciales, para reducir al mínimo esta variable y determinar el mecanismo de liberación. Para ello, se analizaron cuatro ecuaciones cinéticas de acuerdo con Siepmann y Peppas (2001) y se seleccionó el modelo de liberación con base al menor valor de AIC (Criterio de información de Aikake). La determinación de los modelos cinéticos de liberación es un aspecto importante durante el desarrollo de una nueva formulación ya que proporciona datos sobre el mecanismo de liberación y el efecto de los excipientes en la misma (Fu y Kao, 2010).

Se demostró que la flavanona (I) siguió un modelo de liberación de Weibull, las flavanonas (II) y (III) un modelo de primer orden mientras que la flavanona (IV) se ajustó al modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas's. Las flavanonas vehiculizadas en nanopartículas poliméricas mostraron los mismos modelos cinéticos que sus correspondientes formulaciones en nanoemulsiones excepto para la flavanona (IV) que formulada en nanopartículas poliméricas sigue un modelo cinético de orden cero. Sobre el empleo de la función de Weibull para el discernimiento de los mecanismos de liberación de los fármacos, las estimaciones para $\beta \leq 0.75$ indican difusión Fickiana, mientras que un mecanismo combinado (difusión Fickiana y una liberación inmediata seguida de una liberación sostenida) se asocia con valores de $0.75 < \beta < 1$. Para los valores de β mayores que 1, el transporte de los fármacos sigue un mecanismo de liberación complejo (Papadopoulou *et al*, 2006).

Para el caso de la flavanona (I) en ambas formulaciones los valores de β fueron 0.83 ± 0.27 y 0.94 ± 0.09 indicación de un mecanismo combinado que se encuentra con frecuencia en estudios de liberación. Como el valor de β se acerca 1 indica que la liberación es prácticamente de primer orden, (Rinaki *et al*, 2003), siguiendo un patron similar al mostrado para las flavanones (II) y (III).

La cinética de liberación de primer orden, indica que la flavanona se dispone en una cantidad proporcional al gradiente de concentración que facilita la cesión del fármaco, basado en la primera ley Fick, donde las cantidades de activo liberadas son directamente proporcionales a las cantidades remanentes en la formulación. Finalmente, el orden cero

y modelos de Korsmeyer-Peppas implican un valor de $n = 0.85$, siendo, en este caso, la cantidad de fármaco liberada independiente de su concentración. La flavanona (IV) en nanoemulsión mostró una liberación no Fickiana en la liberación con un valor de $n = 0.75$. Por otra parte, el vehículo de nanopartícula polimérica facilita la liberación sostenida (orden cero), al retener en su interior parte del activo. Estos resultados se encuentran estrechamente alineados al perfil de liberación típico de los sistemas nanoparticulares de PLGA, caracterizado por una etapa inicial de liberación rápida (efecto de estallido) que corresponde a la liberación del fármaco de la superficie de la partícula, seguida de una fase de orden cero, en la cual se cede el fármaco encapsulado en el sistema (Li *et al*, 2001). Ambos nano-vehículos proporcionaron comportamientos de liberación similares para cada flavanona.

Los perfiles de liberación correspondientes a las flavanonas vehiculizadas en NPs y NEs indican que la liberación se llevó a cabo mediante una difusión controlada en la que se observó un primer paso de liberación inmediata seguida de una liberación sostenida, excepto para la flavanona (IV) en la cual este efecto no es apreciable. En el caso de las NPs, se ha reportado que la liberación del fármaco de estos sistemas ocurre por difusión, erosión del polímero o una combinación de ambas (Peppas, 1985; Zolnik *et al*, 2006).

La liberación de las flavanonas en NEs a las 10h fue del 70-75 % para las flavanonas (I) y (III), del 50% para la flavanona (II), mientras que la flavanona (IV) se liberó apenas el 30 % en el mismo periodo de tiempo. Es posible atribuir la mayor liberación de las flavanonas (I) y (III) a la ausencia del grupo metoxilo en la posición C-4' para el caso de la formulación en nanoemulsión (figura 1 trabajo 2).

La liberación de las flavanonas de nanopartículas poliméricas presentó un perfil más rápido, alcanzándose la liberación máxima a las 2 h aproximadamente [65 % de liberación para la flavanona (I), 50 % para la flavanona (III), y un 20% para las flavanonas (II) y (IV)]. En estudios anteriores, se ha descrito el tipo de liberación en NPs de PLGA que coincide con lo encontrado en este trabajo (Vega *et al*, 2006).

Los estudios de **permeación ex vivo**, realizados con piel humana, permiten evaluar la capacidad de penetración de la formulación y son indicativos de la disponibilidad tópica o sistémica de los fármacos, proporcionando información sobre la permanencia del principio activo en la piel. Antes de realizar los experimentos, se determinó la integridad de la barrera mediante la medición de pérdida de agua transepitelial (TEWL) (Nangia , *et al*, 1999) ya que esta medición es un reflejo de la funcionalidad de la piel como barrera de protección. Los valores obtenidos (inferiores a 12 g/m²h) confirman su integridad.

En estos estudios de permeación, entre 6.25 y 8.91 h después del tiempo de aplicación se observa una relación casi lineal entre las cantidades acumuladas de fármaco permeado con el tiempo, indicando que la integridad de la piel se mantiene durante el experimento y las dosis de permeación fueron constantes. El valor de la mediana, K_p, entre las formulaciones de nanoemulsión fue de 1.6×10^{-3} cm/h y 0.07×10^{-3} cm/h para las flavanonas (III) y (II), respectivamente (tabla 1). Se observan mejores resultados que en el diclofenaco ácido en un vehículo similar, que presentó un valor de K_p de 4.50×10^{-5} cm/h (Escribano *et al.*, 2003). El flujo máximo (8.103 µg/h·cm²) fue alcanzado para la flavanona (III) mientras que, la flavanona (IV) en nanoemulsión alcanzó un flujo de 0.147 µg/h·cm². Las cantidades permeadas después de 40h de experimentación fueron de 82.56 y 16.09 µg para las flavanonas (III) y (II) vehiculizadas en nanoemulsión, respectivamente.

Entre las flavanones vehiculizadas en las nanopartículas poliméricas, la flavanona (I) mostró el coeficiente de permeabilidad más alto (1.9×10^{-3} cm/h) y un flujo de 1.9 µg/h·cm² (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de permeación de la flavanonas 1) 5, 7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona, 2) 5, 7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona, 3) 5, 7-dihidroxi-6-prenilflavanona y 4) 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona en nanoemulsiones y nanopartículas. Los resultados se muestran como la mediana y el rango mínimo y máximo. Diferencias significativas ($p < 0.05$) a con la flavanona 1, b con 2, con 3 and d con 4.

Nanoemulsiones				
	1	2	3	4
Parámetros de permeación				
Kp (cm/h)	0.0001083 (0.0000565-0.00014)	0.0000709 (0.0000526-0.000124)	0.0016 ^d (0.00158-0.00161)	0.000029 (0.000027-0.000073)
P1 (cm)	0.004095 (0.0028-0.0079)	0.000930641 ^c (0.0002122-0.002122)	0.0786 (0.0757-0.0787)	0.0014 (0.0014-0.0039)
P2 (1/h)	0.02195 (0.018-0.03)	0.133547 ^d (0.024-0.2478)	0.0208 (0.0203-0.0209)	0.0186 (0.0184-0.019)
Flujo ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$)	0.543 (0.2825-0.72)	0.35 (0.26-0.61)	8.103 ^d (7.9371-8.2005)	0.147 (0.1359-0.3653)
Tiempo de latencia (h)	7.5175 (5.38-9.2)	6.25 ^d (6.6725-6.916)	7.95 (7.88-7.99)	8.91 (8.4-9.04)
Cantidad permeada a 40 h (μg)	40.95 (40.66-47.94)	16.09 (15.61-17.84)	82.56 (74.3-85.9)	16.28 (14.82-17.99)
Cantidad retenida a las 40 h ($\text{mg}/\text{g}/\text{cm}^2$)	48.53 (48.47-55.18)	253.49 (85.32-451)	21.54 (12.68-24.28)	320.09 (140.3-535.78)
Nanopartículas				
Parámetros de permeación				
Kp (cm/h)	0.00195554 (0.000395-0.003335)	0.000199 (0.0001438-0.000204)	0.00029 (0.000256-0.0002985)	0.000635 (0.000099-0.00117099)
P1 (cm)	0.216697 (0.045-0.65755)	0.047276 (0.045319-0.063561)	0.0067512 (0.00534-0.01475)	0.176818 (0.13587-0.217762)
P2 (1/h)	0.0086 (0.00333-0.0090)	0.00329 ^b (0.003209-0.003311)	0.00379 (0.0202-0.05402)	0.00579 (0.005377-0.00622)
Flux ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$)	1.9555 (0.3957-3.3357)	0.30602 (0.21575-0.39859)	0.4353 (0.38404-0.44775)	0.12451 (0.09951-0.14951)
Tiempo de latencia (h)	19.37 (18.46-32.85)	53.81 ^c (51.92-54.77)	4.39 (3.84-8.23)	28.874 (26.76-30.99)
Cantidad permeada a 40 h (μg)	45.69 (35.07-58.77)	39.25 (35.74-40.88)	44.93 (38.8-45.37)	38.82 (31.63-58.77)
Cantidad retenida a las 40 h ($\text{mg}/\text{g}/\text{cm}^2$)	134.18 (117.45-164.87)	157.37 (129.54-185.4)	500.63 (489-745.99)	396.99 (317.66-494.83)

El tiempo de latencia (T_1), es decir, el tiempo que tarda el principio activo en liberarse de forma constante, es un parámetro que depende principalmente la difusión del principio activo por la piel. Las nanopartículas (II) cargadas mostraron un T_1 altamente diferenciado del resto de las nanopartículas, de 52.81 h. Las nanopartículas cargadas (IV) mostraron el flujo más bajo ($0.124 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades de flavanonas permeadas en la piel a las 40 h, pero cantidades retenidas eran mayores para las NPs (III) y (IV). El coeficiente de permeabilidad se incrementó en la flavanona (I) cuando fue incorporada en

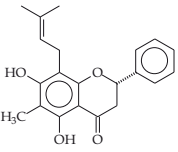
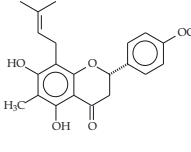
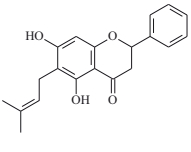
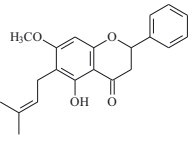
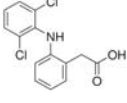
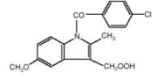
nanopartículas comparada con la nanoemulsión. También P1, el flujo y la cantidad permeada aumentó. Igualmente los mejores los coeficientes de permeabilidad se obtuvieron para las flavanonas (II) y (IV) cuando se encuentran cargadas en nanopartículas poliméricas. Para ambos vehículos, los valores de Kp y flujo fueron bajos, lo que podría estar relacionado con las altas cantidades de fármaco retenido. A menudo es difícil de explicar estas diferencias si no están asociadas a la variabilidad de flujo de la membrana (Limper *et al*, 2001).

En general las cantidades retenidas de las flavanonas vehiculizadas en nanopartículas poliméricas se incrementa debido a la naturaleza del vehículo de la nanopartícula, esto podría explicarse porque el PLGA es lipofílico; por lo tanto, las nanopartículas gradualmente pueden acumularse en las capas de la piel.

La **eficacia antiinflamatoria *in vivo*** tanto de los compuestos libres como formulados en NEs y NPs se llevó a cabo en un sistema tópico inducido por la administración de 13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón (Della Loggia *et al*, 1994). Tras la paliación del agente inflamatorio TPA, se produce un eritema y vasodilatación entre 1 y 2 h y a las 3-4h aumenta el grosor del pabellón auricular como consecuencia de la extravasación de líquido. Se evaluó la capacidad de inhibición de la inflamación para las flavanonas en solución y en los sistemas nanoestructurados desarrollados. La flavanona (IV) resultó con mayor porcentaje de inhibición de la inflamación al ser ensayada en solución en una concentración de 1 mg/oreja en el modelo de inducción de la inflamación con TPA como se muestra en la tabla 2 con un valor de 75.31 ± 1.08 %.

Se observó que en las flavanonas en donde se encuentra un grupo metoxilo unido a un anillo aromático, como son las flavanonas (II) y (IV), la eficacia antiinflamatoria no presenta una diferencia significativa entre el compuesto evaluado en solución y las flavanonas formuladas en la nanoemulsión. Para todos los casos de los fármacos de referencia comerciales, la respuesta antiinflamatoria fue menor vehiculizados en las nanoemulsión que en solución.

Tabla 2. Actividad antiinflamatoria en modelo de TPA en oreja de ratón de las flavanonas libres en nanoemulsiones y nanopartículas comparadas con la indometacina y diclofenaco ácido. 1) 5, 7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona, 2) 5, 7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona, 3) 5, 7-dihidroxi-6-prenilflavanona y 4) 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona. Media \pm SD, n =3

Compuesto	 (1)	 (2)	 (3)	 (4)	 Diclofenaco ácido	 Indometacina
Concentración	1 mg/oreja	1 mg/ oreja	1 mg/ oreja	1 mg/ oreja	1 mg/ oreja	1 mg / oreja
% inhibición intrínseco	12.24 \pm 1.09	68.35 \pm 1.45	66.67 \pm 1.55	75.31 \pm 1.08	90.52 \pm 0.67	91.35 \pm 0.47
Concentración	1 mg/ oreja	1 mg/ oreja	1 mg/ oreja	1 mg/ oreja	1 mg/ oreja	1 mg/ oreja
% Actividad antiinflamatoria en nanoemulsión	88.29 \pm 1.45	64.55 \pm 1.45	82.91 \pm 0.95	62.66 \pm 1.09	59.91 \pm 0.62	64.29 \pm 1.55
Concentración	0.15 mg/ oreja	0.15 mg/ oreja	0.15 mg/ oreja	0.15 mg/ oreja	0.15 mg/ oreja	0.15 mg/ oreja
% Actividad antiinflamatoria en nanopartículas de PLGA	21.61 \pm 2.9	20.00 \pm 1.48	80.97 \pm 1.48	54.84 \pm 2.23	54.13 \pm 1.59	87.16 \pm 1.59

Por otra parte, para las flavanonas (I) y (III) la eficacia antiinflamatoria mejora significativamente al ser vehiculizadas en la nanoemulsión; partiendo del 12.24 \pm 1.09 % de inhibición de la inflamación al 88.29 \pm 1.45 % para el caso de la flavanona (I) y del 66.67 \pm 1.55 % al 82.91 \pm 0.95 % para la flavanona (III) respectivamente.

Para el caso de la flavanona (I) la eficacia antiinflamatoria aumenta pero no significativamente, como se observó para la flavanona (III), en donde, la vehiculización en nanopartículas permitió mejorar significativamente la eficacia antiinflamatoria del principio activo al obtener un porcentaje de disminución de la inflamación de 80.97 \pm 1.48 %.

Los fármacos antiinflamatorios comerciales no esteroideos cuentan con un porcentaje de actividad antiinflamatoria considerable, si se tiene en cuenta la cantidad de fármaco vehiculizado en las nanopartículas (considerando que la concentración de compuesto activo aplicada en el pabellón auricular fue de 0.15 mg por oreja).

El análisis de la eficacia antiinflamatoria de las flavanonas vehiculizadas en sistemas nanoestructurados, tanto en la emulsión anhidra como en las nanopartículas poliméricas, puso de relieve que la flavanona (III) mejora su eficacia en ambas formulaciones con un porcentaje de $82.91 \pm 0.95 \%$, vehiculada en nanoemulsión y un $80.97 \pm 1.48 \%$ en nanopartículas, respectivamente. Esto permite considerar que la eficacia de liberación del fármaco favorece la biodisponibilidad del compuesto.

Ahora bien, considerando la concentración de compuesto depositado en el pabellón auricular del ratón vehiculizado en las nanopartículas, se evidencia que la biodisponibilidad del fármaco así como sus propiedades de permeación facilitaron que el compuesto alcance sin dificultad la biofase, que finalmente es el propósito de las formulaciones nanoestructuradas, orientadas hacia un sistema transportador que permita desarrollar medicamentos que atraviesen poros y membranas celulares y lleguen eficazmente al sitio de acción. Esto se ha reflejado en el incremento de la efectividad de manera más notable en la flavanona (III) mediante el control de la dosis requerida para obtener mejor respuesta antiinflamatoria, así como también en la disminución de la dosis del principio activo.

En el área de investigación de principios activos de origen natural se han encontrado trabajos en la literatura donde se desarrollan diferentes formulaciones nanoestructuradas. Por ejemplo, *Phaleria macrocarpa*, corresponde a una especie de Indonesia y cuenta con reconocimiento etnomédico para el tratamiento de la diabetes y el cáncer, además de contar con propiedades diuréticas. Los compuestos mayoritarios obtenidos del extracto metanólico de las hojas fueron flavonoides, uno de los principales fue luteolina, a partir de la cual se obtuvieron nanocápsulas de tamaños de partícula promedio de 109 nm (Muhamad e Indrianti 2012). Por otra parte, para luteolina se ha desarrollado un método por HPLC para cuantificar la cantidad absoluta de recuperación y eficiencia de encapsulación, así como la cinética de liberación de diferentes formulaciones

de suspensiones coloidales, logrando tamaños de partícula menores de 185.5 nm y superficies regulares esféricas con mayor homogeneidad y dispersiones bajas, siguiendo un mecanismo de liberación de difusión pura según el modelo de Korsmeyer-Peppas's. (Puhl *et al*, 2011).

En el caso de quimioprevención se han contemplado agentes naturales de tipo flavonoide, taninos y curcuminas entre otros polifenoles que supriman, inviertan o impidan el desarrollo del cáncer. Estos compuestos en pruebas de laboratorio han resultado eficaces; sin embargo, al trasladarlo a la clínica surgen fallos en lo referente a su ineficacia sistémica y robusta biodisponibilidad. Por ello los esfuerzos científicos se han enfocado en las últimas dos décadas al desarrollo tecnológico a partir de formulaciones nanoestructuras como encapsulaciones de diferentes agentes anticancerígenos de origen natural que permitan una liberación controlada del principio activo (Irfana *et al*, 2011).

Así como también se han preparado nanopartículas del triterpeno pentacíclico ácido boswélico por el método controlado de nanoprecipitación, logrando tamaños de partícula de 200 nm de forma esférica, que fueron ensayadas sobre líneas celulares de cáncer, encontrando selectividad sobre cáncer de próstata. Además, se logró evidenciar *in vitro* que el ácido boswélico formulado en las nanopartículas preparadas causa la fragmentación del ADN que resulta un contraste de apoptosis para la célula cancerígena en cuestión. (Saji Uthaman *et al*, 2012)

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se elaboraron nanoemulsiones (**NEs**) y nanopartículas (**NPs**) poliméricas a partir de cuatro productos naturales (flavanonas isopreniladas) con actividad antiinflamatoria para su uso como antiinflamatorios tópicos. Como resultados de la investigación realizada se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1.- Se obtuvieron 15 g del extracto metanólico íntegro de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa* vía maceración a partir de 100 gramos de material seco y triturado del cual se obtuvieron las flavanonas isopreniladas 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**I**), 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**II**), 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (**III**), 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (**IV**) mediante procesos cromatográficos.

2.- A partir de las flavanonas naturales se prepararon nanopartículas poliméricas de PLGA 50/50 a la concentración de 1.5 mg/mL del principio activo y nanoemulsiones al 0.5 % obteniéndose un menor tamaño de partícula en las nanoemulsiones (48-68 nm) frente a un tamaño de 156-173 nm de las nanopartículas poliméricas.

3.- Se desarrolló un método analítico de HPLC el cual fue validado mediante los siguientes criterios de validación analítica: linealidad con un coeficiente de correlación 0.9999, exactitud en un rango entre el 1 y el 3.8%, precisión expresada como la desviación estándar relativa (RSD) de 2.45 %, límite de detección de 1.60 µg/mL, límite de cuantificación de 2.86 µg/mL y selectividad.

4.- Las **NEs** obtenidas fueron isotrópicas, transparentes y ligeramente viscosas. Presentaron un tamaño de gotícula inferior a 70 nm y una homogeneidad de la muestra adecuada para este tipo de sustancias.

5.- Los estudios de TEM y DLS indican que se obtuvieron **NEs** del tipo W/O, de forma esférica y una estructura micelar de las gotas que oscilaban entre 60 y 70 nm. La nanoemulsión de la flavonona (**IV**) mostró el mayor tamaño, siendo de 68.87 ± 3.46 nm mientras que la nanoemulsión de la flavonona (**I**) obtuvo el menor tamaño de gotícula, siendo de 48.91 ± 0.30 nm.

6.- Las **NPs** poliméricas mostraron un tamaño de partícula medio de 156 - 202 nm. La distribución del tamaño de partícula fue muy reducido con las flavanonas **(I)**, **(III)** y **(V)**, con valores de polidispersión menores de 0.1, valores que corresponden a sistemas monodispersos; pero en el caso de la flavanona **(I)** se observó un valor ligeramente mayor. Todas las formulaciones de nanopartículas mostraron carga negativa entre -25 and -30 mV.

7.- Las imágenes obtenidas por TEM evidencian que las **NPs** tiene forma esférica obteniéndose de esta manera nanoesferas con un patrón denso uniformemente distribuido.

8.- Para las flavanonas **(I)** y **(III)** la eficacia antiinflamatoria evaluada in vivo en oreja de ratón, mejora significativamente al ser vehiculizadas en la nanoemulsión en particular para la flavanona **(I)** que aumenta de 12.24 ± 1.09 % al 88.29 ± 1.45 % en nanoemulsión. La flavanona **(III)** mejora su eficacia antiinflamatoria en ambas nanoestructuras con un porcentaje de 82.91 ± 0.95 % y 80.97 ± 1.48 % vehiculizadas en nanoemulsiones o nanopartículas, respectivamente.

9.- Respecto a la liberación se encontró que los compuestos vehiculizados en nanopartículas liberan más rápido que en nanoemulsiones; siendo en ambos casos, las flavanonas **(I)** y **(III)** las que liberan mayor cantidad de fármaco.

10.- Las flavanonas vehiculizadas en nanopartículas poliméricas mostraron los mismos modelos cinéticos de liberación que sus correspondientes nanoemulsiones excepto para la flavanona **(IV)**.

11.- De los ensayos de permeación en un sistema *ex vivo* de piel humana se observa que la constante de permeación y la cantidad retenida en piel se ven incrementados para las flavanonas **(I)**, **(II)** y **(IV)** cuando son vehiculizadas en **NPs**.

12.- Respecto a la estabilidad a corto plazo (ensayadas a 5 ± 1 °C y a 40 ± 2 °C por un periodo de tres meses), las **NEs** no mostraron cambio en la apariencia visual, ni se presentó separación de fases. Las **NPs** incrementaron la morfología, mantuvieron la carga superficial y la eficiencia de asociación disminuyó significativamente.

13.- En base a los resultados de la presente investigación consideramos que la flavanona 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil flavanona (III) vehiculizada en nanoemulsión y nanopartículas poliméricas presenta los mejores resultados de permeación y actividad antiinflamatoria por lo que puede ser un potencial agente antiinflamatorio de uso tópico.

14.- La vehiculización de las flavanonas con actividad antiinflamatoria en sistemas nanoparticulados representa una notable ventaja para mejorar su efecto farmacológico y disminuir los efectos secundarios como consecuencia de una menor dosis, mejor permeación y mayor acumulación en la biofase.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

A

Ahluwalia, VK; Sharma, ND; Mittal, B; Gupta, SR. (1988). Novel prenylates flavonoids from *M. philippensis* Muel. Arg., *Indian Journal of Chemistry*, 27B, 238-241.

Aulton ME. (2004) La ciencia y el diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier España. 2e. ; 33: 524-527

Aulton ME. (2004). La ciencia y el diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier España. 2a. Edición 33, 524-527.

Avedaño, C. (1993). *Introducción a la Química Farmacéutica*. España: Ed. Mc Graw Hill, 1ª. Edición.

B

Barros, C.M.; Sakata, R.K.; Machado A; Gerola, L.R.; Solmao, R. (2011) Citocinas y dolor. *Rev Bras Anestesiología*; 61: 2: 137-142.

Barry, B. W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 101-114.

Becher, P. (2001) *Emulsions: Theory and practice*; Reinhold Publishing: New York; 1957; 3 Rd ed.; Oxford University Press: New York.

Bhadoriya, S. S., Mangal, A., Madoriya, N and Dixit P. (2011) Bioavailability and bioactivity enhancement of herbal drugs by "Nanotechnology": A review. *Journal of Current Pharmaceutical Research* 8, 1-7.

Bhatt, P y Madhav S (2011) A detailed review on nanoemulsion drug delivery system *IJPSR*; 2(9): 2292-2298.

Bruneton J. (1991). *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*, 1ª. Edición Edit. Acriba.

Bylka, W; Matlawska, I; Pilewski, N. A (2004) "Natural flavonoids as Antimicrobial Agents"; JANA, Vol. 7, No. 2.

C

Carl Roth Company

<http://www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do?act=showBookmark&favOid=000000090002566a00020023&lang=en-com&market=COM> Fecha de Consulta Abril 2013.

Carrillo Morales, M. (2004) Tesis de Licenciatura de Químico Industrial: "*Estudio Químico y Biológico del extracto metanólico de las hojas de Eysenhardtia platycarpa Pennell & Safford*" Universidad Veracruzana. Directora de tesis: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez.

Chi, YS; Jong, HG; Son, KH; Chang, HW; Kang, SS; Kim, HP. (2001) Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: ciclooxigenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology*, 62, 1185-1191.

Costa, P. (2001). An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. *International journal of pharmaceutics*, 220(1), 77-83.

Crozier, A., Lean, M. E., McDonald, M. S., & Black, C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 590-595.

D

Delgado, A, Minguillón, C y Joglar J. (2004) *Introducción a la Química Terapéutica*, Díaz de Santos, Madrid, España.

Delgado, A; Minguillon, C; Joglar, J; "Introducción a la Química Terapéutica"; Editorial Diaz de Santos; 2ª. Edición; 2004.

Devarajan V, Ravichandran V. (2011) Nanoemulsions: as modified drug delivery tool Pharmacie Globale IJCP;4(01).

Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D (2004) Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. Int J Pharm 27:11-19.

Domínguez-Gil Hurlé, A., & Martín Suárez, A. (2009). Avances en Tecnología Farmacéutica. <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/532/550>
Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Domínguez-Gil Hurlé, A., y Martín Suárez, A. (2009). Avances en tecnología farmacéutica. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.*

Domínguez-Villegas, V; Domínguez-Villegas, V; García, ML; Calpena; AC; Clares-Naveros, B; Garduño-Ramírez, ML. (2013). Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of *Eysehadtia platycarpa*, *Natural Product Communications*, 8(2),177-180.

E

Elias PM, Cooper ER, Korc A, Brown BE. (1981) Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. J. Invest. Dermatol., 76: 297-301.

Enciclopedia of Life. Citado: 2011. Disponible en la World Wide Web:<<http://www.eol.org/pages/416264>> .Mapa de distribución de *E. platycarpa* en la República mexicana.

Enciso,E., Arroyo, J. (2011) Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas An Fac Med. 72(4):231-7.

Escalona Arranz, JC, Carrasco Velar, R y Padrón García, JA (2008) Diseño racional de

fármacos. Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria, ISBN 978-959-16-0647-1. 45.

Escribano, E; Calpena, A.C; Queralt, J; Obach, R; Doménech, J. (2003). *Eur. J. Pharm. Sci.* 19 (2003) 203–210.

Espinós, D; López, A; Calvo, E. Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. Citado el 21 de Noviembre del 2012. Disponible en la World Wide Web:<<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/536/554>>

F

Fang, N; Casida, JE. (1999), New bioactive flavonoids and resin insecticide. *Journal of Natural Products*, 62, 205-210.

Fernández-Campos F, Clares Naveros B, López Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. (2013) **Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections**. *Mycoses*, 56, 70-81.

Fernández-Campos, F; Calpena-Campmany, A.C; Rodríguez-Delgado, G;López-Serrano, O; Clares-Naveros,B. (2012). *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3739–3752.

Février F. (1990). Microemulsions for topical application, *Bulletin Technique Gattefossé*, 83,21-31.

Filho, RB; Gottlieb, OR; Mourão, AP. (1975). A stilbene and two flavanones from *Derris rariflora*. *Phytochemistry*, 14, 261-263.

Fryd, MM; and Mason, TG. (2010), Time-dependent nanoemulsion droplet size reduction by evaporative ripening. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1, 3349-3353.

Fu Y, Kao WJ. (2010). Drug release kinetics and transport mechanisms of nondegradable and degradable polymeric delivery systems. *expert opinion on* 2010; 7:429-444.

G

Ganta, S; and Amiji, M. (2009). Coadministration of paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. *Molecular Pharmaceutics*, 6(3), 928-939.

García Celma, MJ; Azamer Sazatornil, N; Solans Marsá, C. "Microemulsiones". En: "Tratado de Farmacia Galénica". Faulí Trillo C. De. Luzán, 5 S.A. Madrid. 1993; 445-447.

Garduño-Ramírez, ML; Clares, B; Domínguez-Villegas, V; Peraire, C; Ruiz, MA; García, ML; Calpena, AC. (2012). Skin Permeation of Cacalol, Cacalone and 6-*epi*-Cacalone Sesquiterpenes from a Nanoemulsion *Nat. Prod. Comm.* 7, (7) 821 – 823.

Gattefossé SA 1994. Microemulsions: formulation Guide, publication No PF9225 A, Saint-Priest Cedex, France.

Gimeno-Sandig, A.; Calpena-Campmany, A.C ; Fernández-Campos, F; Martín-Villena, M.J, Clares-Naveros, B. (2013). *Colloid Surf. B Biointerfaces* 103 558–565.

Gómez, HA; González, K.N, Medina J.D. (2011) Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10, (3): 182-217.

Govender, T; Stolnik, S; Garnett, M.C; Illum, L; Davis, S. (1999). *J. Control. Release* 57(1999) 171–185.

Graf, B. A; Milbury, P. E; Blumberg, J. B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence; *J Med Food*; 8: 281–290.

Granado-Serrano, A. B; Martín, M. A; Bravo, L; Goya, L; Ramos, S; (2006). Quercetin Induces Apoptosis via Caspase Activation, Regulation of Bcl-2, and Inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK Pathways in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2); *Journal of Nutrition*; 2715-2721.

H

Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., & Katan, M. B. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155(4), 381.

Heyneman, C.A., Lawless-Liday, C., Wall, G.C., 2000. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: A comparison. *Drugs*, 60, 555-574.

J

Jain, AC; Gupta, RC; Sarpal, PD. (1978). Synthesis of (±) lupinifolin, di-o-methyl xanthohumol and isoxanthohumol and related compounds. *Tetrahedron*, 34, 3563-3567.

Jain, AC; Gupta, RC; Sarpal, PD. (1978). Synthesis of (±) lupinifolin, di-o-methyl xanthohumol and isoxanthohumol and related compounds. *Tetrahedron*, 34, 3563-3567.

Jiménez Ramírez, J.; Martínez Gordillo, M.; Valencia Ávalos, S.; Cruz Durán, R. (2003). Estudio Florístico del Municipio Eduardo Neri, Guerrero. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, Serie botánica*, 74 (1): 79-142.

K

Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 12(4), 390-9.

Kielhorn, J.; Melching-Kollmub, S.; Mangelsdorf, I. (2005) International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria: Dermal Absorption. World Health Organization. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf>

Kingston DGI. (2009). Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents, *J. Nat. Prod.*, 72, 507–515

Kligman, AM. (1984) Skin permeability: dermatologic aspects of transdermal drug delivery. *Am Heart J*. 108(1): 200-6.

Kreilgaard M. (2002) Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *advanced*

drug delivery reviews;54 Suppl 1:S77-98.

Kubinyi, H. (1993) "QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches" en "Methods and Principles in Medicinal Chemistry" (R. Mannhold, P. Krosgaard-Larsen, H. Timmerman, eds.) Ed. VCH, New York, Vol. 1.

L

Lacoulonche, F, Gamisans, F; Chauvet, A. García, ML, Espina, M and Egea, MA (1999). Stability and In Vitro Drug Release of Flurbiprofen-Loaded Poly- ϵ - Caprolactone Nanospheres, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(9), 983–993.

Lam, KS. (2007). New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in microbiology*, 15(6), 279-289.

Li, YP; Pei, YY; Zhang, XY; Gu, ZH; Zhou ZH; Yuan, WF; Zhu, JH; Gao XJ. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats.; *Journal of Controlled Release*, 71 (2), 203 –211.

Lima Paula, Nanotecnología y sus aplicaciones.

<http://www.cienciasparalelas.com.br/nanotecnologia-e-suas-aplicacoes/>Fecha de consulta enero 2014.

Lin, YL; Chen, YL; Kuo, YH. (1991). Three new flavonoids, 3`-metoxilupinifolin, laxifolin, and isolaxifolin from the roots of *Derris laxiflora* Benth. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 3132-3135.

Llabot, JM; Santiago, DP; Allemandi DA. (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas. *Nuestra Farmacia*, 53,40-47.

M

Ma, WG; Fuzzati, N; Li, QS; Yang, CR; Stoeckli-Evans, H; Hostettmann, K. (1995). Polyphenols from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry*, 39, 1049-1061.

Mahidol, C., Prawat, H., Ruchirawat, S., Lihkitwitayawuid, K., Lin, LZ., Cordell, G. A. (1997). Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. *Phytochemistry*, 45(4), 825-829.

Mann, J; Davidson, RS; Hobbs, JB; Banthorpe, CV; Harborne, JP. (1994). *Natural Products: Their chemistry and biological significance*, Edit. Addison Wesley Longman.

Meragelman, KM; McKee, TC; Boyd, MR. (2001) Anti-HIV prenylated flavonoids from *Monotes africanus*. *Journal of Natural Products*, 64, 546-548.

Miranda, M. A. O., Velázquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 30(8), 453-459.

Mitscher, LA; Raghav Rao, GS; Khanna, I; Veysoglu, T; Drake, S. (1983). Antimicrobial agents from higher plants: prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*. *Phytochemistry*, 22, 573-576.

Mizuno, M; Tamura, K-I; Tanaka, T; Inuma, M. (1988). Three prenylflavanones from *Euchresta japonica*. *Phytochemistry*, 27, 1831-1834.

Molfetta, FA; Honório, KM; Alves, CN; da Silva, ABF. (2004). A study on the anti-HIV activity of biflavonoid compounds by using quantum chemical and chemometric methods. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 674, 191-197.

Muqbil, I, Masood, A, Sarkar FH, Mohammad RM y Azmi, AS (2011) Progress in Nanotechnology Based Approaches to Enhance the Potential of Chemopreventive Agents *Cancers* 2011, 3, 428-445; doi:10.3390/cancers3010428.

Murillo, M; Espuelas, S *et al*; (2001). Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas; *Rev. Med. Univ. Navarra*; 45,4,19-34.

N

Nangia A, Berner B, Maibach HI. (1999). Transepidermal water loss measurements for assessing skin barrier functions during in vitro percutaneous absorption studies. In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology. Drugs and the Pharmaceutical sciences*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 587-594.

Nagar, A; Gujral, VK; Gupta, SR. (1978). Synthesis of lupinifolin. *Tetrahedron Letters*, 23, 2031-2034.

Narváez-Mastache, J.M.; Garduño-Ramírez, M.L.; Alvarez, L. and Delgado, G. (2006) Antihyperglycemic activity and chemical constituents of *Eysenhardtia platycarpa* (Fabaceae) *J. Nat. Prod.* Dec 27;69(12):1687-1691.

Narváez-Mastache, J.M.; Soto, C. and Delgado, G. (2007) Antioxidant Evaluation of *Eysenhardtia* Species (Fabaceae): Relay Synthesis of 3-O-Acetyl-11a,12a-epoxy-oleanan-28,13b -olide Isolated from *E. platycarpa* and Its Protective Effect in Experimental Diabetes *Biol. Pharm. Bull.* 30(8) 1503-1510.

Narváez-Mastache, J.M. Novillo, F. and Delgado, G. (2008) Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry* 69, 451–456.

Newman, DJ; and Cragg, GM. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.

Newman, DJ; Cragg, GM and Snader, KM. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022-1037.

Newman, DJ; Cragg, GM. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311-335.

Nicolás Vazquez, M. I.; Marín Chiñas, E. Castro Martínez, F. M. y Miranda Ruvalcaba, R. (2006) Algunos aspectos básicos de la química computacional. UNAM 1ª. Edición ISBN 970-32-3307-4. Pag. 39-40.

O

Okawa, M; Kinjo, J; Nohara, T; Ono, M. (2001). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull*, 24, 1202-1205.

Organisation for economic co-operation and development (OECD). (2000). Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Guideline 428: Skin absorption: in vitro method. Paris.

P

Palazón J; Cusidó R. M; Morales C; (1997) “Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino”; Revista de Enología ACE; Editorial Rubes.

Papadopoulou V; Kosmidis K, Vlachou, M; Macheras, P (2006). *Int.J. Pharm.* 309 44–50.

Pareja, B. (1998). Absorción y mecanismos de transporte. *Folia Dermatológica Peruana*, 9(4).

Parsons, IC; Gray, AI; Waterman, PG. (1993). New triterpenes and flavonoids from the leaves of *Bosistoa brassii*. *Journal of Natural Products*, 56, 46-53.

Patani, GA; LaVoie, EJ; (1996). Bioisosterism: A rational approach in drug design., *Chemical Review*, **96**, 3147-3176.

Padilla, O. (2004) Ciclooxygenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia. MED UNAB Vol. 7 Número 21.

Peppas, N.A., (1985). Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.*, 60, 110.

Puhl, AC, Fagundes, M, Dos Santos, KC, Polikarpov, I, Fernandes da Silva, MFG, Batista Fernandes, J, Vieira, JC, Forim, MR (2011) Preparation and characterization of polymeric nanoparticles loaded with the flavonoid luteolin, by using factorial design International Journal of Drug Delivery 3 (4) 683-698.

R

Rang, H.P. Farmacología. Editorial Elsevier España, (2008). ISBN 84-8086-303-X, 9788480863032.

Schoenwald, R.D., Ward, R.L., (1978). Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol-water partition coefficient. J. Pharm. Sci., 67,786-788.

Rocha Formiga, F, Ansorena, E, Estella-Hermoso De Mendoza A, Imbuluzqueta, E, González, D, Blanco Prieto M. J. (2009). Nanosistemas a Base de Poliésteres <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/989/1023> *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.

Rosano, HL and Clause, M. (1987). Microemulsions systems in Surfactants science series. Marcel Dekker Inc., New York; vol 24.

Rzedowski, J; Vegetación de México (2006); 1ra. Edición digital; Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad; México; p. 504.

Rinaki, E; Dokoumetzidis, A; Macheras, P. (2003). Pharm. Res. 20, 406–408.

S

(SAGARPA) Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Flora%20nectarfera%20y%20polinifera%20de%20Chiapas/Attachments/5/chis5.pdf> Fecha de consulta abril 2011.

Sahlan, M y Pramadewi, I (2012) Nanoencapsulation of the flavonoids isolated from *Phaleria Macrocarpa* Leaf By Casein Micelle Int J Pharm Bio Sci. 3(3): (P) 472 – 478.

Saji Uthaman, Snima K.S, Annapoorna M, Ravindranath K.C., Shanti V. Nair, Vinoth-Kumar Lakshmanan. (2012). Novel Boswellic acids Nanoparticles induces cell death in Prostate cancer cells *Journal of Natural Products*, Vol. 5:100-108.

Sanna, V.; Pintus, G.; Roggio, A.M.; Punzoni, S.; Posadino, A.M.; Arca, A.; Marceddu, S.; Bandiera, P.; Uzzau, S.; Sechi, M. (2011) Targeted biocompatible nanoparticles for the delivery of (-)-epigallocatechin 3-gallate to prostate cancer cells. *J. Med. Chem.*, 54, 1321-1332.

Serra A, Roganovich J, Rizzo L. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional de lo molecular al uso clínico. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2012; 72: 158-170.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3), 102-110.

Stoclet JC, Schini-Kerth V. (2011) Dietary flavonoids and human health. *Ann Pharm Fr.* 2011 Mar;69(2):78-90.

T

Tahara, S; Katagiri, Y; Ingham, JL; Mizutani, J. (1994). Prenylated flavonoids in the roots of *Yellow lupin*. *Phytochemistry*, 36, 1261-1271.

Thangapazham, R.L.; Puri, A.; Tele, S.; Blumenthal, R.; Maheshwari, R.K. (2008) Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 32, 1119-1123.

U

Uthaman, S, Snima K.S, Annapoorna M, Ravindranath K.C., Shanti V. Nair, Vinoth-Kumar Lakshmanan (2012) Novel Boswellic acids Nanoparticles induces cell death in Prostate cancer cells *Journal of Natural Products*, Vol. 5:100-108.

V

Vega, E; Egea, MA; Valls, O; Espina, M; García, ML. (2006). Flurbiprofen loaded biodegradable nanoparticles for ophthalmic administration. *J. Pharm. Sci*, 95,2393–2405.

Verma PRP, Iyer SS. Transdermal delivery of propranolol using mixed grades of Eudragit: Design and *in vitro* and *in vivo* evaluation *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26(4): 471-476.

Videla Luis (2003) *Medwave* Ene;3(1):e3196 doi: 10.5867/medwave.2003.01.3196

Villarino, N. F., & Landoni, M. F. (2006). Administración transdérmica de fármacos: Una alternativa terapéutica. *Analecta Veterinaria*, 26.

W

Wang, X; Jiang, Y; Wang, YW; Huang, MT; Ho, CT; and Huang, Q. (2008). Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chemistry*, 108(2), 419-424.

Williamson, EM. (1996). *Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material, vol. I*, edit. John Wiley & Sons.

Y

Yechezkel Barenholz and Dan Peer (2012) Past, current and future applications of liposomes - Grand Challenges and Opportunities in Nanomedicine *Journal of Controlled Release* 160, 2, 117–134

Yochum, L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. (1999) "Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women." *American Journal of Epidemiology*; 149:10.

Z

Zimmer A and Kreuter J. (1995) Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 61-73.

Zolnik, B.S., Leary, P.E., Burgess, D.J., (2006). Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *J. Control Release*, 3, 293-300.

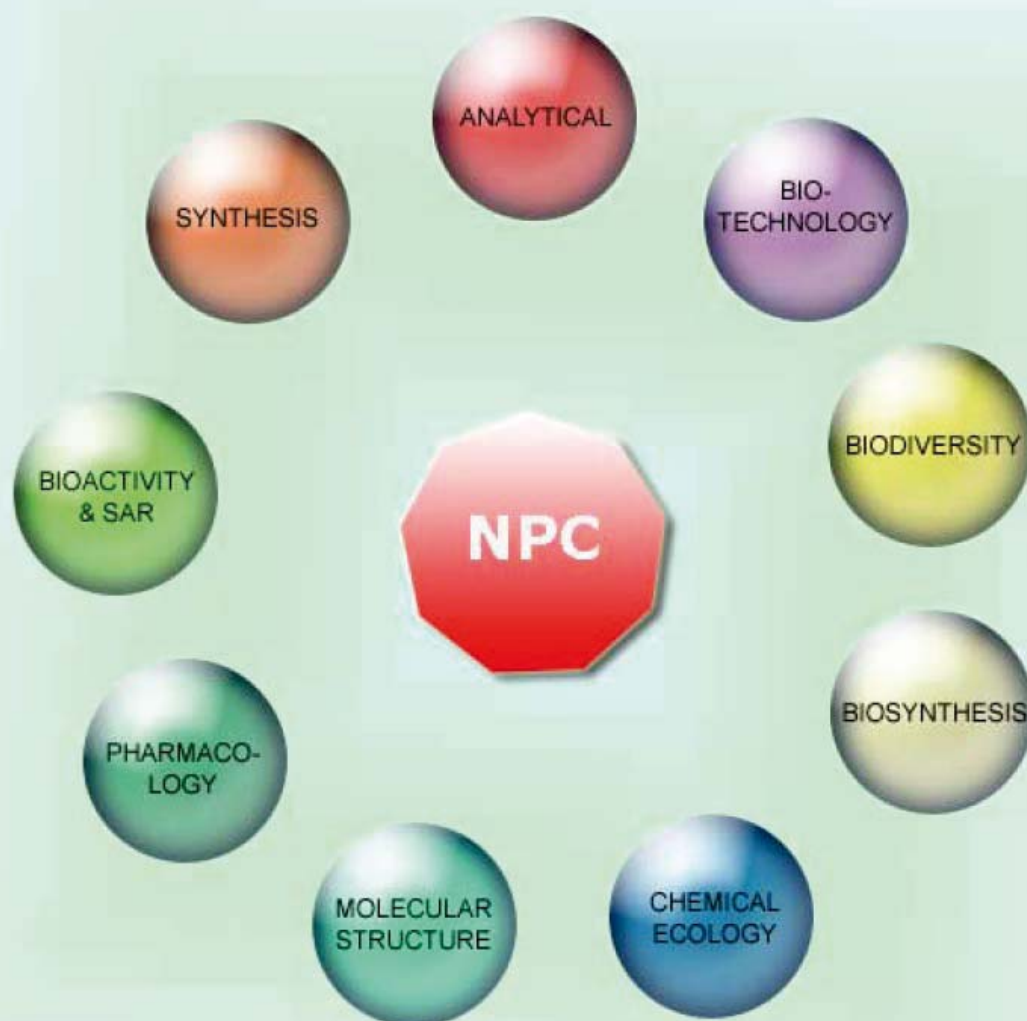
7. ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo . Publicación derivada

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 7. Issue 7. Pages 815-970. 2012
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

Skin Permeation of Cacalol, Cacalone and 6-*epi*-Cacalone Sesquiterpenes from a Nanoemulsion

María Luisa Garduño-Ramírez^{a*}, Beatriz Clares^b, Valeri Domínguez-Villegas^c, Concepción Peraire^d, María Adolfini Ruiz^b, María Luisa García^c and Ana C. Calpena^a

^aCentro de Investigaciones Químicas, Av. Universidad 1001, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, México

^bDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada 18071, Spain

^cDepartment of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona 18071, Spain

^dDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona 18071, Spain

lgarduno@uaem.mx

Received: July 20th, 2011; Accepted: April 13th, 2012

The objective of the present study was to investigate the transdermal permeation of cacalol (1) and a mixture of cacalone (2) and 6-*epi*-cacalone (3) in comparison with diclofenac acid (4) delivered from the same characterized nanoemulsion using Franz diffusion cells (formulae I, II and III). Results show that de K_p, J, Q₂₄, P₁ and P₂ were higher for the acid diclofenac nanoemulsion than for the natural products nanoemulsions. As for the differences between the formulations I and II, with the natural products, Q₂₄, the quantity extracted from skin and P₂ were higher in the mixture of 2 and 3 nanoemulsion compared with the corresponding nanoemulsion of 1. In conclusion, the low permeability of the natural products nanoemulsions in comparison with that of diclofenac acid has the potential for development for drugs with local and systemic applications, respectively.

Keywords: Cacalol, Cacalone, Diclofenac acid, Permeation, Nanoemulsion.

Investigations of the chemical constituents of *Psacalium radulifolium* resulted in the isolation and identification of furan eremophilanes [1,2]. Pharmacological studies suggest that these have bioactivity as anti-microbial, germination inhibitor, anti-fungal, allelopathic, antihyperglycemic, hypoglycemic, antioxidant and anti-inflammatory agents [2]. The structure-activity relationship (SAR) of the sesquiterpenes measured using anti-inflammatory activity in the TPA mouse edema ear test was previously studied [3]. When eremophilanes are topically administered, permeation through the skin and transdermal absorption occurs, resulting in the corresponding inhibition of the inflammatory process. The permeability properties of the comeum stratum remained unchanged indicating good tolerance to the compounds. As a consequence, a good correlation exists between measurements derived from both *in vivo* and *ex vivo* skin diffusion experiments with the same chemicals. Therefore, the transdermal route is relevant for the administration of anti-inflammatory agents. It avoids hepatic metabolism, the administration is easier, and is more convenient for the patient. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the most commonly used to reduce pain and inflammation [4] and they are widely utilized in the treatment of rheumatic diseases. Available formulations contain diclofenac sodium. This salt is soluble in aqueous solutions as an ionized salt and its penetration into the skin is dependent upon partitioning of the unionized form into the lipophilic phase of the formulation [5]. Thus, in this study diclofenac acid (2-[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid) (4) has been formulated in a less soluble form.

Also, cacalol (1), and a natural mixture of cacalone (2) and 6-*epi*-cacalone (3) are poorly water soluble drugs. The comeum stratum is

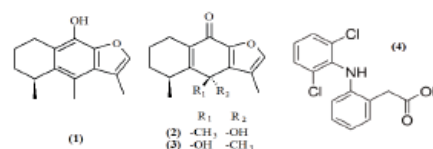


Figure 1: Cacalol (1), cacalone (2), 6-*epi*-cacalone (3) and diclofenac acid (4).

a formidable natural barrier. To overcome these difficulties various colloidal approaches have been proposed as nanoparticles, liposomes, vesicular lipidic systems and others [6,7]. In this way, nanoemulsions are attractive vehicles for drug delivery because of their easy formulation, thermodynamic stability, solubilization properties and their small droplet size [8,9]. In order to evaluate the potential of nanoemulsions as transdermal delivery systems for sesquiterpenes, the objective of the present study was to investigate the skin permeation of cacalol (1) (Formulation I) and of the mixture of cacalone (2) and 6-*epi*-cacalone (3) (Formulation II) to obtain transdermal parameters and hence obtain information about their possible and future clinical utilization by this administration route.

A comparative study of the transdermal penetration of the sesquiterpenes and a known anti-inflammatory substance, diclofenac acid (4) (Formulation III) was also studied. All drugs were topically applied on human epidermal membranes using the same experimental conditions.

Table 1 shows the percent composition of the nanoemulsion for transdermal preparations. An anhydrous composition was selected because of the solubility of sesquiterpenes and diclofenac acid.

Table 1: Composition of nanoemulsions

Components	(% w/w)
Labrasol®	53.5
Plurol oleique®	13.3
Labrafac lipophile®	14.9
Propylenglycol	17.9
Active principle (anti-inflammatory natural product or synthesized)	0.5

A nanoemulsion is comprised of a base, formed by the combination of substances such as a lipophilic phase, non-ionic surfactants, and co-surfactants.

A fixed concentration (0.5%) of the drugs was used in three formulations (I, II and III) to compare the effect of both anti-inflammatory compounds (natural product and synthesized). In all cases, a solubility study was performed and a ternary phase diagram constructed.

Nanoemulsions were characterized with regard to their appearance and particle size by transmission electron microscopy (TEM) and photon correlation spectroscopy (PCS).

Nanoemulsion systems were obtained on a laboratory scale with emulsification using an ultrasound method [10].

The obtained formulations were isotropic, transparent, and slightly viscous. To elaborate the ternary phase diagram, the components were gathered in crowds attending to their characteristics of polarity, hydrophilic and/or amphiphilic according to the microemulsion formulations by Gattefossé [11]. Initially, a base graph was chosen, without the presence of an active ingredient, in order to identify the suitable zone to form the nanoemulsion. In this way, in the vertexes of the equilateral triangle the following components or compositions were: Labrafac, Labrasol/plurol oleique (5:1) and polypropylenglycol.

Transmission electron microscopy (TEM) allowed the observation of the droplet structure in all formulations, and the efficiency of the preparation method used. Nanoemulsion droplets were spherical, with narrow size distribution in which the hydrophilic globules had a mean size from 50 to 200 nm: (A) Z-Average (dnm): 102/PDI: 0.1, (B) Z-Average (dnm): 141.1/PDI: 0.093 and mixture (C) Z-Average (dnm): 105.5/PDI: 0.664 (D) Z-Average (dnm): 50.76/PDI: 0.381.

The droplet size did not change after addition of the natural products. However, the median diameter of the diclofenac acid nanoemulsion decreased significantly in comparison with the initial droplet size. This can be explained by the affinity of diclofenac acid (4) with the non-ionic surfactants of the nanoemulsion. Some

electrostatic interactions could occur between the aromatic ring and functional groups of the chain of the surfactants during nanoemulsion preparation [12, 13]. Both the results of TEM and PCS indicated that the samples were stable without great increase in particle size for at least three months.

Tables 2 and 3 show the comparative permeation parameters of the different anti-inflammatory substances of the formulations. Skin of 6 healthy donors was used; the median amounts permeated at 24 h with Formulations I, II and III were 2.0 µg, 11.4 µg and 414.4 µg, respectively. These values were statistically different using the non parametric test of Kruskal-Wallis (Table 2).

Q_{24} values obtained in each case showed that diclofenac acid permeated 40 times more than the mixture of 2 and 3, and 200 times more than 1. Also P_2 ranged from 0.83 h^{-1} (4) to 0.04 h^{-1} for the mixture of 2 and 3 (Table 2). The higher permeation of 4 was favored by the small particle size in the disperse phase, since vehicle passed through the narrow intercellular passages (pores) in the outer skin layers [14]. In fact, the diclofenac acid nanoemulsion had flow values approximately 40 times higher and retained amounts 2 to 5 times smaller than 1 and the mixture of 2 and 3 nanoemulsions, respectively.

A difference between the two natural drugs is the permeated amount of mixture 2 and 3 nanoemulsion (formulation II) at 24 hours, which was 5 times higher than that of formulation I. Therefore, a greater quantity extracted of mixture 2 and 3 was found (4.15 ng/mg skin/cm²). These differences in topical permeation could be explained by the higher value of P_2 , directly related to the diffusion coefficient, but not by the P_1 parameter ($p < 0.05$). Thus, the mixture of 2 and 3 favor deposition in the skin, which could increase the initial retained amount and further permeation of drug.

Results of the present study show that it is possible to investigate the permeation through the skin of 1 and the mixture of 2 and 3 formulated in nanoemulsions by using *ex vivo* human skin experimental models. Moreover, the permeation rate found for the assayed compounds shows that further investigations for local and systemic anti-inflammatory activities could be envisaged. Thus the possibility exists for the use of both natural nanoemulsions for local effects and the diclofenac acid nanoemulsion for systemic effects. The choice of one or another formulation depends on the desired pharmacological action.

Experimental

Materials: Cacalol (1) and the mixture of cacalone (2) and 6-*epi*-cacalone (3) were obtained from roots of *P. radulifolium* [1]. Diclofenac acid (4) was prepared from diclofenac sodium by simple

Table 2: Permeation parameters.

Formulation	Compounds	TL (h)	J (µg.cm ² .h ⁻¹)	Quantity extracted from skin (ng/mg skin/cm ²)	Q ₂₄ (µg)
I	1	4.16 (2.54/13.02)	0.14 (0.10/0.26)	1.40 (0.52/4.29)	2.0 (1.67/5.61)
II	2 and 3	1.42 (0.22/4.62)	0.18 (0.08/0.26)	4.15 (3.03/9.51)	11.37 (4.39/15.57)
III	4	0.20 (0.10/4.11)	5.74 (4.22/21.55)	0.73 (0.59/0.87)	414.41 (266.23/6.25)

Results are median and range from six replicates. Significant differences between groups: ^{a,b,c} $p < 0.05$ (^a II is different from I; ^b III is different from II and ^c III is different from I).

Table 3: Permeation parameters.

Formulation	Compounds	P_1 (cm)	P_2 (h ⁻¹)	K_p (cm.h ⁻¹)
I	1	3.43×10^{-3} ($1.47 \times 10^{-3}/1.03 \times 10^{-2}$)	4.00×10^{-2} ($1.28 \times 10^{-2}/6.55 \times 10^{-2}$)	1.07×10^0 ($7.77 \times 10^{-1}/2.05 \times 10^0$)
II	2 and 3	8.08×10^{-3} ($1.83 \times 10^{-3}/5.55 \times 10^{-2}$)	12.00×10^{-2} ($3.60 \times 10^{-2}/77.41 \times 10^{-2}$)	1.42×10^0 ($6.64 \times 10^{-1}/2.02 \times 10^0$)
III	4	6.90×10^{-3} ($1.99 \times 10^{-3}/4.13 \times 10^{-2}$)	0.83 ($4.04 \times 10^{-2}/1.66$)	4.50×10^3 ($3.30 \times 10^3/1.67 \times 10^4$)

Results are median and range from six replicates. Significant differences between groups: ^{a,b,c} $p < 0.05$ (^a II is different from I; ^b III is different from II and ^c III is different from I).

acid hydrolysis with concentrated hydrochloric acid. ^1H NMR spectra of **4** were obtained using a Varian Unity Inova spectrometer at 400 MHz, using TMS as the internal standard and CDCl_3 as solvent. Labrasol® (caprylocaproyl macrogol-8-glycerides), Labrafac® (medium chain triglyceride, C_8 - C_{10} fatty acids), Plurol oleique® (polyglyceryl-6-dioleate) and polypropylenglycol were supplied by Gattefossé and Panreac Química. Absolute ethanol, acetonitrile and water were of either reagent or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade.

Droplet size and size distribution: The droplet size and polydispersity index (PI) of samples were assessed by photon correlation spectroscopy (PCS, dynamic light scattering, DLS) using a Z-SIZER MALVERN instrument (photon correlation spectrometer Malvern 4700, Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25°C.

Characterization of the nanoemulsions: The morphological observations of nanoemulsions were performed, by negative staining, using an Electronic Transmission Microscope, TEM Zeiss 902 with magnifications of 7000 to 140000. The samples were placed over a copper grid coated with carbon film and air dried. Then they were stained with 2% uranyl acetate. Finally, the samples were air dried prior to being placed in the TEM instrument for analysis.

Ex vivo permeation study: Permeation study was performed using amber glass occluded Franz-type diffusion cells with an effective

diffusion area of 2.54 cm^2 and a receptor compartment volume of 12.36 ± 0.6 mL. The receptor chambers of all diffusion cells were filled with absolute ethanol–water (3:7 v/v) to provide sink conditions for the permeation and they were magnetically stirred [4]. The diffusion cells were equilibrated at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h before conducting permeation studies over 46 h. 300 μL samples were withdrawn from receptor chamber at 2, 4, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 40, 42, 44 and 46 h after application, and replaced with the same volume of receptor medium.

HPLC analysis: Analysis of **1**, natural mixture of **2** and **3**, and diclofenac acid (**4**) were performed using a validated high-performance liquid chromatography method. The instrument (Waters LP Module 1) consisted of an UV/visible detector and an analytical column (250/4.6 mm i.d.) packed with 5 μm ODS (C_{18}). Samples were analyzed at 25°C with UV detection at 326 nm for natural drugs and 211 nm for diclofenac acid (**4**).

Statistical analysis: Comparison of the median values of the permeation parameters coming from 6 different donors were performed by non parametric analysis (Kruskal-Wallis) with a significance value of $p < 0.05$.

Acknowledgments - The authors would like to thank Dr Humet of the SCIAS Hospital of Barcelona for supplying skin samples and Gattefossé for the donation of the components of the nanoemulsion.

References

- [1] Garduño-Ramírez ML, Trejo A, Navarro V, Bye R, Linares E, Delgado G. (2001) New modified eremophilanes from the roots of *Psacalium radulifolium*. *Journal of Natural Products*, **64**, 432-435.
- [2] Garduño-Ramírez ML, Delgado G. (2003) New eremophilanoids from the roots of *Psacalium radulifolium*. Hypoglycemic, antihyperglycemic and anti-oxidant evaluations. *Revista de la Sociedad Química de México*, **47**, 155-159.
- [3] Acevedo-Quiroz N, Domínguez-Villegas V, Garduño-Ramírez ML. (2008) Structure-activity relationship of modified eremophilanes and anti-inflammatory activity using the TPA mouse edema ear test. *Natural Product Communications*, **3**, 313-317.
- [4] Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obach R, Domenech J. (2003) Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *European Journal of Pharmaceutical Science*, **19**, 203-210.
- [5] Sintov AC, Botner S. (2006) Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of the skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *International Journal of Pharmaceutics*, **311**, 55-62.
- [6] Clares B, Gallardo V, Medina MM, Ruiz MA. (2009) Multilamellar liposomes of triamcinolone acetamide: preparation, stability and characterization. *Journal of Liposome Research*, **19**, 197-206.
- [7] Ruiz MA, Clares B, Morales ME, Gallardo V. (2008) Vesicular lipidic systems, liposomes, PLO, and liposomes-PLO: characterization by electronic transmission microscopy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **34**, 1269-1276.
- [8] Shafiq S, Faiyaz S, Sushma T, Farhan JA, Khar RK, Ali M. (2007) Design and development of ramipril nanoemulsion formulation: *In vitro* and *in vivo* assessment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **3**, 28-44.
- [9] Shafiq S, Faiyaz S, Sushma T, Farhan JA, Khar RK, Ali M. (2007) Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **66**, 227-243.
- [10] Abisma B, Canselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. (1999) Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, **6**, 75-83.
- [11] Gattefossé SA. (1994) Microemulsion: Formulation Guide, Publication No. PF9225A, Saint-Priest Cedex, France.
- [12] Levitt M, Perutz MF. (1988) Aromatic rings act as hydrogen bond acceptors. *Journal of Molecular Biology*, **201**, 751-754.
- [13] Tadros, T, Izquierdo, P, Esquena J, Solans C. (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **108**, 303-318.
- [14] Cevc G. (2004) Lipid vesicles and others colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, 675-711.