

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANO CÁPSULAS
DE QUERCETINA, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE AUTO-ENSAMBLAJE
CAPA A CAPA CON POLIELECTROLITOS.

AZTRID JERITZA ACHIPZ LÓPEZ.

MASTERIA EN FORMULACION Y DESARROLLO DE PRODUCTOS QUIMICOS
Y DERIVADOS.

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS.

UNIVERSIDAD ICESI.

SANTIAGO DE CALI, 2016.

FORMACION DE NANO CÁPSULAS DE QUERCETINA, POR MEDIO DE LA
TÉCNICA DE AUTO-ENSAMBLAJE CAPA A CAPA CON POLIELECTROLITOS.

AZTRID JERITZA ACHIPZ LÓPEZ.

TRABAJO DE GRADO PARA OBTENER EL TITULO DE
MASTER EN FORMULACION Y DESARROLLO DE PRODUCTOS QUIMICOS Y
DERIVADOS.

CONSTAÍN HUGO SALAMANCA MEJÍA, Ph. D.
ASESOR

ALVARO BARRERA OCAMPO, Ph. D.
CO ASESOR

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS.

UNIVERSIDAD ICESI.

SANTIAGO DE CALI, 2016

Firma Aval del Asesor:

Constain Salamanca

Firma del Aval del Asesor 2, Co-asesor o Co-asesor académico :

Álvaro Barrera

Firma del estudiante:

Aztrid Jeritza Achipiz L.

AGRADECIMIENTOS

Dedico de manera especial este logro a mi madre y mi padre, quien con su amor, ejemplo, dedicación, esfuerzo y apoyo me permitieron lograr esta nueva meta personal y profesional, que Dios me ha concedido terminar.

Un agradecimiento especial al profesor Constain Salamanca, por tan excelente trabajo en la dirección de la maestría, por entrega, su motivación, su dedicación y apoyo durante todo este tiempo con el fin de lograr ofrecernos una formación científico técnica aplicable a la industria

Gracias a mi mis amigos y compañeros que siempre me han apoyado durante este tiempo.

TABLA DE CONTENIDO

1.	RESUMEN DEL PROYECTO	8
2.	INTRODUCCION.....	10
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
3.1	PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA O DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	12
3.2	OBJETIVOS	13
3.3	HIPOTESIS DE INVETIGACION	13
3.4	MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	14
3.5	METODOLOGIA	23
3.6	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	24
4.	RESULTADOS DE LA INVESTIGACION	25
5.	DISCUSION Y ANALISIS	35
6.	CONCLUSIONES.....	41
7.	Bibliografía.....	42

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Estructura química de la quercetina (13).....	16
Ilustración 2. Estructura molecular de quitosano, donde "x" e "y" representan respectivamente las fracciones molares de glucosamina y N-acetilglucosamina.(39).....	27
Ilustración 3. Estructura de carboximetilcelulosa de sodio CMC-Na. (46).....	31
Ilustración 4. Carboximetilcelulosa de sodio en agua .(47)	31
Ilustración 5. Estructura de la lecitina.(49).....	34
Ilustración 6. Secuencia de obtención de nano emulsión gruesa.....	38

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Algunos estudios con quercetina que sustentan su efecto neuroprotector	20
Tabla 2. Datos de liberación de quercetina en sistemas de encapsulación.....	21
Tabla 3. Cronograma.....	25
Tabla 4. Fase oleosa para Quercetina	32
Tabla 5. Concentraciones de fase oleosa.....	36
Tabla 6. Combinatorios para fase dispersa.....	37
Tabla 7. Concentraciones sistema fase continua.....	38
Tabla 8. Variables de estudio para sistemas de nano emulsiones.....	38
Tabla 9. Concentración poli electrolitos Sistema quitosano/CMC-Na.....	40

1. RESUMEN DEL PROYECTO

La quercetina se encuentra dentro del grupo de los poli fenoles con una actividad antioxidante mayor que las moléculas antioxidantes tradicionales como el ascorbilo, además de ser un potente eliminador tanto del oxígeno como del nitrógeno reactivo, al mismo tiempo que sirve como un compuesto que puede unirse y secuestrar iones metálicos de transición. Diversos estudios se han demostrado su efecto neuroprotector para el estrés oxidativo en células PC12 un modelo para la síntesis de dopamina y la neurodegeneración (1), gracias a esto la quercetina ha demostrado ser un promisorio compuesto natural en la prevención y tratamiento de enfermedades inducida por estrés oxidativo como el Alzheimer, problemas cardiovasculares, prevención del cáncer, entre otros.

La quercetina al ser un poli fenol se caracteriza por una rápida degradación, baja solubilidad y su metabolismo se produce en un período de tiempo corto aun sin entrar en el torrente sanguíneo en medios acuoso, lo cual dificulta su administración por vía oral (2), (3) bajo este panorama el uso de sistemas de **nano encapsulación** es una alternativa para el desarrollo a futuro de medicamentos con una mayor biodisponibilidad.

En los últimos años se han desarrollado estudios que han buscado encapsular la quercetina dado su hidrofobicidad y características fisicoquímicas mencionadas en sistemas de liposomas especialmente utilizando diversas técnicas, dichos sistemas a escala industrial presentan altos costos en sus procesos de fabricación lo cual limita su uso en nuevos medicamentos o suplementos dietarios, por ello se busca poder emplear otras técnicas igualmente funcionales pero con mayor facilidad de fabricación y menor costo.

Es así como en las últimas décadas, el ensamblaje dinámico capa a capa (LbL) de multicapa delgada y especialmente la técnica de auto ensamblaje capa a capa con polielectrolitos ha sido ampliamente reconocida como una alternativa exitosa y accesible de nano encapsulación de flavonoides como la cúrcuma, y se espera poder extrapolar este caso a otros flavonoides como la quercetina para su uso a escala industrial.

Palabras Claves: Estrés oxidativo, Quercetina , nanoencapsulación, Auto ensamblaje capa a capa con polielectrolitos

SUMMARY

Quercetin is in the group of polyphenols with a higher antioxidant activity than traditional antioxidant molecules such as ascorbyl, in addition to being a potent eliminator of both oxygen and reactive nitrogen, while serving as a compound that can be bound and sequestering transition metal ions. Various studies have shown its neuroprotective effect for oxidative stress in PC12 cells a model for the synthesis of dopamine and neurodegeneration (1), thanks to this quercetin has been shown to be a promising natural compound in the prevention and treatment of diseases induced by Oxidative stress such as Alzheimer's, cardiovascular problems, cancer prevention, among others.

Quercetin being a polyphenol characterized by rapid degradation, low solubility and its metabolism occurs in a short period of time even without entering the blood stream in aqueous media, which makes it difficult to be administered orally (2), (3) under this scenario the use of nano-encapsulation systems is an alternative for the future development of drugs with a higher bioavailability.

In recent years studies have been developed that have sought to encapsulate quercetin given their hydrophobicity and physicochemical characteristics mentioned in liposome systems especially using various techniques, these systems on an industrial scale have high costs in their manufacturing processes which limits their use in new Medications or dietary supplements, so it is possible to use other techniques equally functional but with greater ease of manufacture and lower cost.

Thus, in the last decades, the dynamic layer-to-layer (LbL) assembly of thin multilayer and especially the layer-by-layer auto assembly technique with polyelectrolytes has been widely recognized as a successful and accessible nano-encapsulation of flavonoids such as curcumin, and it is hoped to extrapolate this case to other flavonoids such as quercetina for use on an industrial scale.

Keywords: Alzheimer's, oxidative stress, Quercetin, nanoencapsulation, Auto-assembly layer by layer with polyelectrolytes.

2. INTRODUCCION

En los últimos años se ha venido desarrollando estudios de los polifenoles en la prevención de enfermedades neurodegenerativas, donde se encuentra la quercetina por su potente efecto antioxidante(4), convirtiéndose en una buena opción como compuesto natural logrando mejorar su biodisponibilidad mediante el uso de nano portadores biocompatibles.(5)

Sin embargo la quercetina presenta inestabilidad química a altas temperatura y presencia de oxígeno, pobre solubilidad, lo cual genera baja biodisponibilidad por vía oral (3) y por ello se hace necesario desarrollar un sistema que pueda mantenerla solubilizada, protegida de ambiente oxidantes y en nano portadores para una liberación específica en el organismo.(6). Se ha evidenciado que requiere ser nano emulsionada en un sistema O/W, con ayuda de un tenso activo o hidrocoloide con carga, que permita la posterior deposición de los polielectrolitos. Los parámetros de control dentro del proceso debe analizarse es la concentración, pH de soluciones, tiempos y velocidades de agitación, en condiciones de alta energía se obtienen sistemas más estables y translúcidos.

El objetivo del presente trabajo se centra en evidenciar el uso de la quercetina como sustrato antioxidante con potencial aplicación en la industria farmacéutica especialmente como neuroprotector neuronal, ya que su estructura química le permite actuar como protector frente a las especies reactivas de oxígeno, mediante la neutralización de radicales libres como aniones superóxido, óxido nítrico y peroxinitritos entre otros, además que le permite inhibir enzimas como la xantina oxidasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, impidiendo la muerte celular e incluso puede incrementar la producción de antioxidantes endógenos (7)

Con el fin de lograr este objetivo, el presente trabajo de investigación desarrolla su marco teórico en 3 secciones donde se abordan: el potencial antioxidante de la quercetina y el uso de sistemas de nano encapsulación como el uso de polielectrolitos mediante la técnica de *Auto ensamblaje capa a capa* (LBL), como una alternativa, de bajo costo respecto al uso de liposomas ya reportado en la literatura y ofrece facilidad técnica (operaciones unitarias, equipos, procesos de fabricación y polielectrolitos como alginato, CMC-Na, goma guar, goma xantán entre otros) con miras a su uso a nivel industrial

Este trabajo busca aportar conocimiento al marco de investigación que ha iniciado la facultad de ciencia farmacéutica de la Universidad Icesi, sobre alternativas de nanoencapsulación en quercetina, con miras de contribuir al desarrollo científico de opciones para la obtención de este flavonoide encapsulado con miras a su uso industrial en el campo farmacéutico y/o alimentos .

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA O DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION.

En los últimos años los polifenoles como la quercetina tiene especial atención de los investigadores, debido a su potencial efecto neuroprotector-antioxidante y su efecto en los principales marcadores de la enfermedad. La nanomedicina se ha enfocado en buscar sistemas de nanoencapsulación que permitan encapsular la quercetina, permitiendo vehicularla, protegerla de la degradación en su tránsito por el organismo según sea la vía de administración y se permita el efecto terapéutico a la concentración adecuada en el cerebro.

Es así como se plantea una nueva alternativa a las investigaciones ya desarrolladas para nanoencapsulación de quercetina con el uso de matrices de polielectrolitos y se plantea la siguiente pregunta: ¿Es viable técnicamente la nanoencapsulación de la quercetina mediante el sistema de Auto ensamblaje capa a capa (LBL) con polielectrolitos?

La solución a esta pregunta se enmarca dentro de marco investigativo que viene desarrollando el país a través de su red de universidades como la Universidad Nacional de Colombia (8) y la universidad Icesi (9) en el estudio de sistemas formados a partir de complejos polielectrolito/fármaco en el desarrollo de fármacos para enfermedades neurodegenerativas donde sin dudas la quercetina tiene muchas ventajas sobre otros compuestos para el tratamiento de dichas enfermedades .

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GENERAL

- a. Establecer la viabilidad técnica de desarrollar un vehículo tipo nanocápsula multicapa en suspensión, mediante la técnica de ensamblaje capa a capa con polielectrolitos poliméricos aniónicos y catiónicos para encapsular quercetina.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a. Proponer un modelo experimental para futuros estudios empleado la técnica de nano encapsulación por Auto ensamblaje capa a capa (LBL).

3.3 HIPOTESIS DE INVESTIGACION

Hipótesis

La técnica de Auto ensamblaje capa a capa (LBL) con polielectrolitos es una alternativa para la obtención de las nano capsulas empleando el sistema quercetina, carboximetil celulosa de sodio y quitosano.

3.4 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

I. QUERCETINA : POTENCIAL NEURO PROTECTOR .

Más del 40% de las nuevas entidades químicas descubiertas son poco solubles en agua y sufren de baja biodisponibilidad oral como los compuesto potenciales para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o el cáncer y que mejoran su biodisponibilidad en nanoemulsiones O/W (10). Dentro de las ciencias farmacéuticas y la medicina, la nanotecnología en la última década ha tenido un especial interés , en el desarrollo de técnicas de nanoencapsulación, que buscan principalmente proteger y aislar el contenido del entorno y ciertas condiciones que aceleran su degradación tales como el oxígeno, luz, pH, además de mejorar los perfiles de liberación en el organismo(11).

El mecanismo exacto del desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas no está todavía claro a pesar del conocimiento actual creciente de su neurobiología y su crecimiento en los últimos años es alarmante. Sin embargo, hay consenso en reconocer que el estrés oxidativo y el desequilibrio causado por una sobreproducción de radicales libres [especie de oxígeno reactivo (ROS)], está estrechamente asociado con el desarrollo de la enfermedad y conduce a daño molecular severo en componentes celulares tales como oxidación de proteínas, oxidación de lípidos, oxidación de ADN, Y glicoxidación.(12). Por otra parte, el envejecimiento aumenta el daño neuronal mediado por el ROS debido a la disminución del estado antioxidante en el cerebro, lo que lleva a la neurodegeneración. Por lo tanto, la búsqueda de una herramienta eficaz para combatir el estrés oxidativo mediado daño neuronal ha conducido a la exploración de antioxidantes moléculas como ROS *scavenger* que son compuestos capaces de reaccionar con especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres reactivos. (13)

Es así como los investigadores han buscado alternativas para combatir este estrés oxidativo en los polifenoles de origen natural, suplementado por vía oral en combinación con las vitaminas C, E, como una terapia eficaz para mantener nuestra salud contra los ROS y estrategias antioxidantes para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas(14).

Dentro del grupo de los polifenoles se encuentran los flavonoides, los cuales se han identificado como compuestos con potencial neuro protección, esta habilidad parecen ser relacionados con su capacidad para interactuar con neuronas intracelulares y Glial, influyendo así en los procesos periféricos y vasculares, protegiendo las neuronas vulnerables, mejorando función neuronal existente o estimulación de la regeneración neuronal.(15)

Una gran cantidad de medicamentos potenciales se ha descubierto para tratar varios trastornos neuronales, incluidos los polifenoles. Pero, el éxito terapéutico de estos productos farmacéuticos sigue siendo limitado debido a que tiene que vencer la barrera hematoencefálica y la barrera de sangre-líquido cefalorraquídeo, ambas actúan como barreras dinámicas anatómicas y bioquímicas en el Cerebro. Hoy el enfoque de la nanotecnología es superar estos obstáculos para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, mediante nano partículas que puedan cruzar o liberar en la barrera hematoencefálica fármacos sin ayuda debido a su pequeño tamaño molecular (400-600 Dalton's), baja capacidad de enlace de hidrógeno y lipofilia condiciones necesarias para cruzarla(16).

Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran los polifenoles con potencial en la prevención de enfermedades neurodegenerativas como la quercetina (3,5,7,30,40-penta-hidroxi-flavona) que es un compuesto con importantes propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, abundante en la naturaleza y con una actividad antioxidante 5 veces mayor que otras moléculas antioxidantes como el ascorbilo, debido a la cantidad y posición de los grupos hidroxilo(4), particularmente en la

posición C3 (anillo C) y C5 (anillo A) que son responsables de su potente efecto antioxidante (13), ver ilustración No 1.

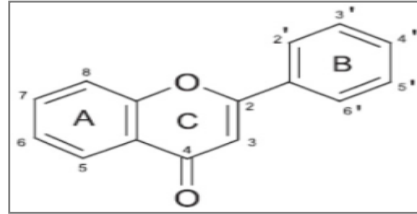


Ilustración 1. Estructura química de la quercetina (13)

Varios estudios in vitro usando líneas celulares neuronales, de la corteza cerebral y neuronas primarias mostraron que la quercetina aumenta la resistencia de las células al estrés oxidativo inducido por oxidantes como el H₂O₂, el hidropéroxidos y las moléculas neurotóxicas como el péptido beta amiloide, 6-hidroxiopamina, a través de su actividad antioxidante indirecta o directa (17)(18). Incluso se ha demostrado que a una concentración de 0,2-1 mM, la quercetina limita los aniones súper óxido, el oxígeno singlete y los radicales peroxilo lipídico y al mismo tiempo suprime la oxidación catalizada por Cu y la citotoxicidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) in vitro. Además se ha descubierto que los flavonoides suprimen la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (NOS) sin suprimir su actividad(19).

Adicionalmente la quercetina tiene un marcado efecto en algunos tipos de enfermedades diferentes a la neurodegenerativas, por ello se han realizado experimentos en animales con suplementación de quercetina (dosis de entre 100- 200 mg/kg/día) donde se pudo relacionar mejoras en la salud. Se ha descrito una menor incidencia de alergias, de cataratas, efecto analgésico, efecto antiviral, efecto nefroprotector. En cuanto a la administración de quercetina en pacientes (dosis entre 500-1500 mg/día), se han observado diferentes efectos, como reducción del dolor y mejoras en patologías como prostatitis o cistitis intersticial.

A pesar de todos sus beneficios a la salud la principal desventaja farmacocinética de la quercetina, es su baja biodisponibilidad. En los alimentos, la quercetina se puede

encontrar en forma de aglicona, de glicósido o incluso en ambas formas. La estructura mayoritaria en la que se presenta, es unida a un azúcar, en forma de glicósido. De éste modo presenta una absorción de 52% del total ingerido. El azúcar unido a la quercetina hace que la molécula sea más hidrofílica y que tenga mayor peso molecular. Por lo tanto, presenta menos capacidad de absorción por difusión pasiva y requiere transporte activo, a través, por ejemplo, del transportador de glucosa sodio dependiente (SGLT- 1) localizado en la pared del intestino delgado. En cuanto a la absorción en forma de aglicona (20%), ésta se puede transportar a través de las membranas por difusión pasiva en el intestino grueso (7).

Realmente se absorbe una baja cantidad de quercetina, ya que una vez en el tracto digestivo los microorganismos intestinales degradan la mayor parte, transformándola en ácido fenilacético y fenilpropiónico y otros productos inertes. Una vez en la circulación sanguínea, la quercetina se une a la albúmina y es transportada hacia diferentes órganos (intestino delgado, colon, hígado y riñón) donde sufre metabolismo en fase II (metilaciones, sulfataciones o conjugaciones con glucurónico). Algunos de estos metabolitos son transportados otra vez al tracto digestivo donde se reabsorben, entrando en un ciclo enterohepático que incrementa la vida media de quercetina en la circulación sanguínea. Otros metabolitos son transportados hacia los diferentes tejidos donde podrían acumularse(20), por ello muchos autores han indicado que dosis muy altas pueden llevar a efectos secundarios.

A pesar de los efectos beneficiosos de la quercetina, su uso ha sido limitada debido a su baja solubilidad acuosa, baja biodisponibilidad oral y vida media biológica corta, por lo cual recientemente, se han desarrollado diversos "nanocarriers" para mejorar la solubilidad, la biodisponibilidad y su liberación controlada(5).

Sin duda su pobre permeabilidad de la barrera hematoencefálica "Blood Brain Barrier" (BBB) debido a su insolubilidad en agua, la baja biodisponibilidad oral actúa como bloque insuperable en terapias en el sistema nervioso central. Varios informes han demostrado que la nanoencapsulación de quercetina con material biodegradable

mejoró su permeabilidad a la barrera hematoencefálica (BBB) y su eficacia terapéutica (13) .

Adicionalmente a todas estas consideraciones con el fin de poder evitar la degradación de la quercetina, es conveniente enmarcar un sistema de administración no invasivo alternativo, que pueda producir una biodisponibilidad mayor que la vía oral debido a la disminución del metabolismo hepático, distancia más corta al objetivo cerebral y fácil penetración a través del cerebro. La Universidad Khon Kaen de Thailand en el 2010, desarrollo liposomas de quercetina, se usaron ratas a las que se indujo estrés oxidativo, los animales fueron tratados con liposomas de quercetina, mediante vía intranasal , mediante dosis con una concentración de 0,5 mg de quercetina en 20 μ L , como resultado se atenuó la degeneración de las neuronas que se relaciono con la elevación de las actividades enzima superóxido dismutasa (SOD), Enzima catalaza (CAT) y enzima Glutación peroxidasa (GPX) y la reducción De MDA (producto de peroxidación lipídica) en el hipocampo. (21).

Los estudios sobre la quercetina en la última década se han enfocado principalmente en los posibles efectos neuroprotectores, se han desarrollado estudio sobre los mecanismos relacionados con su capacidad para contrarrestar la neurotoxicidad mediada por el estrés oxidativo , donde se ha demostrado este efecto a concentraciones de 0,5-50 mg / kg en roedores (22) . La tabla No 1 muestra algunos de estos estudios que sustentan su acción neuroprotectora contra los marcadores de patologías inducidas por stress oxidativo.

Año	Objeto de estudio	Efecto	Concentración	Referencia
-----	-------------------	--------	---------------	------------

2003	Estudio con células de ratones.	Inhibe la formación de fibrillas de proteína β amiloide ($A\beta$). El grupo 3', 4' dihidroxilo del anillo B o mejor descrito el grupo catecol en el anillo B y el grupo OH en la posición 3 de la quercetina, esta configuración óptima para la captura de radicales libres juega un papel clave en su efecto de anti agregación e inhibe la formación de fibrillas $\alpha\beta$ y desestabiliza las fibrillas maduras	CI: 50 de 0,72 y 0,73 mM	(13) (23)
2009	Estudio con células de ratones.	Efecto neuroprotector de la quercetina mediante la mitigación de las alteraciones morfológicas inducidas por βA beta amiloide 1-42	Dosis de 5 μM y 10 μM	(24).
2015	Estudio con ratones, 21-24 meses de edad.	Disminuye la β -amiloidosis extracelular, tauopatía, astrogliosis y microgliosis en el hipocampo y la amígdala. Reducción significativa en el filamento helicoidal emparejado Abeta 1-42	Dosis 25 mg / kg	(25).
2017	Estudio con ratones.	Administrada por vía intraperitoneal cada dos días por 3 meses, revirtió los signos histopatológicos del Alzheimer, disminuyendo el deterioro cognitivo y emocional.	Dosis 25 mg / kg	(15)

Tabla 1. Algunos estudios con quercetina que sustentan su efecto neuroprotector

II. NANO ENCAPSULACIÓN, CASOS APLICADOS A QUERCETINA.

En los últimos años han desarrollado investigaciones con el fin de lograr encapsular la quercetina adecuadamente, donde se han aplicados técnicas como liposomas , nanoemulsiones, nano-geles, nano suspensiones , ciclo dextrinas , den trómeros .

En el año 2012, el departamento de química fundamental de la universidad federal de Pernambuco en Brasil, lograron la nano encapsulación de quercetina y resveratrol en liposomas SDC (desoxicolato de sodio)-elástico con eficiencias de hasta 97% (26).

En el año 2013, la facultad de ciencias farmacéuticas de la universidad de Texas, desarrolló una nanoestructura de matriz oleosa con eficiencia de encapsulación del 95% utilizando un método basado en la inversión de fase (27).

En la india para el año 2014 el Centro de nanociencia y tecnología, logro obtener eficiencias de nanoencapsulación del 98% de quercetina depositada en quitosano-NPS sintetizados por el método de gelificación iónica y con tripolifosfato de sodio como agente reticulante. Los datos in vitro mostraron que las nano partículas podían ser efectivas para aplicaciones clínicas de daño oxidativo inducido por pesticida organofosfato(28).

En el año 2015 el departamento de ciencias y tecnología farmacéutica del instituto Birla de tecnología en la India, desarrollo nanopartículas poliméricas biodegradables por nanoprecipitación con poly(3caprolactone), un poliéster biodegradable utilizado ampliamente en administración de fármacos, ingeniería de tejidos e implantes (5).

Dentro de este marco de investigación la Universidad Icesi en el 2016, llevó a cabo el desarrollo de nanocápsulas de quercetina, con dos diferentes polímeros (PVA y

PCL), mediante el método de Nanoprecipitación, donde se obtuvieron nanopartículas entre 100 y 500 nm, con valores de potencial zeta -30 Mv durante más de 3 días, impidiendo así la agregación de las nanopartículas. Adicionalmente, se encontró que todos los sistemas son capaces de encapsular el fármaco quercetina, con eficiencias de aproximadamente 98%. (29)

A continuación en la tabla No 1, se presentan otros estudios que implican la formación de capsulas por deposición de polimeros y que cuentan con soporte de liberación in vitro en nano sistemas con quercetina. En todos los casos se presentó una liberación mayor al 40 % en los sistemas de simulación gástrica con los que fueron llevados a cabo.

Método	Materiales usados	Resultados	Liberación	Referencia
Nano precipitación	*Quercetin al 95%. PCL: Poly (3 caprolactona) (Mw, 14,000) Acetona Pluronic F127	Eficiencia= $66.32 \pm 0.4\%$ a $69.33 \pm 1.0\%$ IP= 0.094 a 0.199 $\phi_p = 215.9 \pm 2.9$ a 253.4 ± 3.3 PZeta= $-12. \pm 0.42$ a -12.9 ± 0.35	Liberación en 48h: $62.82 \pm 0.85\%$ a $66.05 \pm 1.41\%$	(5)
Evaporación por solvente	Poly-d,l-lactide (PLA) con MW = 75,000–120,000 Quercetina Diclorometano Alcohol polivinilico PVA	Eficiencia=96.7% $\phi_p = 170 \pm 25$ nm a 130 ± 30 nm	Liberación: 40-45% en 30 min 87,6% en 96 h	(4)

Tabla 2. Datos de liberación de quercetina en sistemas de encapsulación.

A la fecha no se referencian estudios de quercetina empleando ensamblaje con matrices poliméricas usando técnicas con absorción capa a capa de polielectrolitos.

III. AUTO ENSAMBLAJE CAPA A CAPA (LBL) CON POLIELECTROLITOS

Las nanopartículas se definen como partículas sólidas submicrónicas, que pueden utilizarse para la nano-encapsulación de compuestos bioactivos. Dependiendo del método de preparación, se pueden obtener nanopartículas, nanoesferas o nanocápsulas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que los compuestos bioactivos están confinados a una cavidad constituida por un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica.

Las nano partículas poliméricas biodegradables pueden producirse a partir de proteínas (tales como gelatina y proteínas de leche), polisacáridos (tales como quitosano, alginato de sodio y almidón), y polímeros sintéticos (tales como poli (d, l-lactida), poli (ácido láctico) PLA, poli (d, l-glicolida), PLG, poli (lactida-co-glicolida), PLGA y poli (Cianoacrilato) PCA) (30)

Recientemente una nueva clase de estructuras portadoras o vehículos, en múltiples capas denominadas microcápsulas de polielectrolitos (PMC) se han fabricado y diseñado para encapsular varias clases de moléculas de fármacos, mediante el uso de polímeros que son biodegradables o que puedan responder y liberar su carga útil en respuesta a estímulos bien definidos.(31)

La formación de nanocápsulas en auto-ensamblaje de polielectrolitos mediante la técnica capa por capa (LBL:layerbylayer) desarrollada por Sukhorukov en 1998, se basa en principalmente en fuerzas de atracción electrostáticas entre polímeros de cargas opuestas, consta de la absorción alternativa de polianiones (polímeros ionizables de carga positiva) y policationes (polímeros ionizables de carga negativa)(31)(32), sobre una superficie macroscópica con carga, generalmente sobre una plantilla coloidal donde se encuentra el activo, en donde cada paso de adsorción conduce a la inversión de la carga superficial, y una serie de deposiciones

consecutivas conducen a un complejo estructurado en capas. El espesor de un sistema multicapa de polielectrolitos y las propiedades fisicoquímicas de la película se ven influenciados por parámetros como el pH, fuerza iónica, temperatura, polaridad del disolvente, concentración de polielectrolitos, los cuales pueden controlarse ajustando las condiciones experimentales.

En la técnica LBL se debe tener en cuenta que las disoluciones de poli electrolitos añadidas deben tener siempre la misma fuerza iónica y concentración del polielectrolito para que las capas formadas tengan un mismo patrón. De hecho es posible observar diferentes tipos de crecimientos de multicapas para un par de polielectrolitos al cambiar la fuerza iónica. Es importante garantizar el control en la adición y homogeneidad del compuesto a adsorber mediante agitación y posterior lavado para eliminar el polielectrolito no adsorbido y evitar formación de complejos inter-polielectrolitos(33).

3.5 METODOLOGIA

La presente investigación se desarrolla teniendo en cuenta los siguientes aspectos dentro del método científico:

Planteamiento del problema :

Se genera la Hipótesis (Ho): La técnica de Auto ensamblaje capa a capa (LBL) con polielectrolitos es una alternativa para la obtención de las nano capsulas empleando el sistema quercetina , carboximetil celulosa y quitosano.

Recopilación de información

La recopilación de información se desarrolla en 4 secciones en el marco teórico. El primer capítulo, con base al conocimiento existente de la enfermedad permite establecer la relación entre la oxidación y la aparición de los marcadores biológicos de la enfermedad. El segundo capítulo permite evidenciar el efecto neuroprotector de la quercetina en células con patologías degenerativas, su efecto sobre la proteína beta

amiloide A-beta y marcadores de la enfermedad. El tercer capítulo establece un marco teórico sobre estudios realizados para la nanoencapsulación de la quercetina , de donde se establecen los principales factores que contribuyen al proceso. El cuarto capítulo permite contextualizar la viabilidad de emplear la técnica (LBL) con polielectrolitos base para propone algunas alternativas y poder abordar el diseño experimental con un par no empleado para este activo.

Análisis documental

Se compararan los diversos resultados o posiciones de los autores, analizando sus resultados dentro de un esquema crítico que lleve a comprobar la hipótesis planteada.

Propuesta

Se establece una propuesta de diseño experimental para la hipótesis planteada, de acuerdo al análisis y síntesis de datos de la revisión bibliográfica.

Conclusiones

Contiene las principales soluciones para resolver el problema en cuestión, base para el desarrollo o continuación de estudios al respecto.

3.6 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

A continuación se presenta el cronograma de actividades para el año 2017

Actividades	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
Objetivos e Hipotesis	x				
Planteamiento del problema		x			
Recopilación de información		x	x	x	
Redacción de maraco teórico			x	x	
Análisis documental y Síntesis de datos			x	x	
Propuesta y concusiones				x	

Documento final						x
-----------------	--	--	--	--	--	---

Tabla 3. Cronograma.

4. RESULTADOS DE LA INVESTIGACION

Para la administración dirigida de nano partículas es necesaria su circulación sistémica en el cuerpo, pero las nanopartículas convencionales con superficie hidrófoba son rápidamente eliminadas por los macrófagos fijados de los órganos del sistema fagocítico mono nuclear. Es así como para aumentar el tiempo de circulación y la concentración en sangre, la superficie de las nanopartículas convencionales se modifican con diferentes moléculas, como polímeros tales como: PLGA, PLA, quitosano, gelatina, policaprolactona y poli-alquilcianoacrilatos(34).

Las nanopartículas poliméricas tienen muchas propiedades favorables tales como la permeación mejorada (quitosano y polímeros cargados positivamente), escape del metabolismo hepático en su primer paso por liberación terapéutica a través de células M (nanopartículas PLGA) y protección contra pH elevado y enzimas (base en polímeros con alginato y quitosano) en el intestino. Los polímeros naturales por ejemplo, el quitosano, y alginato tienen ventajas sobre los polímeros sintéticos con respecto a accesibilidad, inmunogenicidad, cumplimiento del paciente, biodegradabilidad y toxicidad (35).

Sin duda el mayor reto para las nanopartículas de fármacos son la encapsulación con tamaños polidispersos, liberación prematura, mala permeabilidad a través de las uniones epiteliales, la degradación por enzimas digestivas e inestabilidad al pH variable que se encuentra a lo largo de la zona gastrointestinal. Adicionalmente las nanopartículas deben de tener la

capacidad de vencer la barrera hematoencefálica, la cual es conocida como el mejor guardián del cuerpo hacia sustancias exógenas y generalmente los productos farmacéuticos, incluyendo la mayoría de las moléculas pequeñas, no logran atravesarla, debido a que deben tener ciertas características que permitan que ingresen directamente o a través de transportadores endógenos de la barrera hematoencefálica. (36)

Es así como el tamaño y distribución de tamaño de las nanopartículas son importantes para determinar su interacción con la membrana celular y su penetración a través de las barreras fisiológicas (la barrera hematoencefálica y la barrera de sangre-líquido cefalorraquídeo), donde el tamaño de las nanopartículas para cruzar diferentes barreras biológicas depende del tejido, el sitio de acción y la circulación, adicionalmente a este parámetro está ligada la necesidad de tener una buena homogeneidad de tamaño, que debe ser controlado mediante el índice de polidispersidad (PDI) el cual tiene un valor de 0 a 1. Valores cercanos a 0 indican una dispersión homogénea mientras que aquellas superiores a 0,3, indican alta homogeneidad (5).

Otro parámetro para tener en cuenta para la penetración celular de las nanopartículas, es la carga superficial, y poder determinar si las nanopartículas se agruparían en el flujo sanguíneo o se adheriría y/o interactuarán con células de carga opuesta en su membrana. La carga catiónica en la superficie es deseable, ya que promueve la interacción de las nanopartículas con las células y, por tanto, aumenta la tasa y el grado de penetración (34)

Dentro de los polímeros de origen natural con alto potencial de uso en nanoencapsulación de fármacos para aplicaciones en enfermedades neurodegenerativas encontramos al quitosano que es polímero catiónico obtenido de la quitina por desacetilación parcial, el cual se ha investigado a fondo para su uso potencial en la industria farmacéutica debido a que es mucoadhesivo, no inmunogénico, no tóxico y biodegradable.

Cuando el quitosano se solubiliza en un ácido diluido, se convierte en un polímero catiónico con una alta carga positiva. Contribuye a la absorción oral del fármaco encapsulado mediante la interacción con la carga de carga negativa de las mucosas (37). Los estudios con células en modelos con membrana se ha podido permitir inferir que las interacciones electrostáticas

puede ser la característica más importante en la acción de quitosano en la mucoadhesividad , pero no son los únicos relevantes.(38).

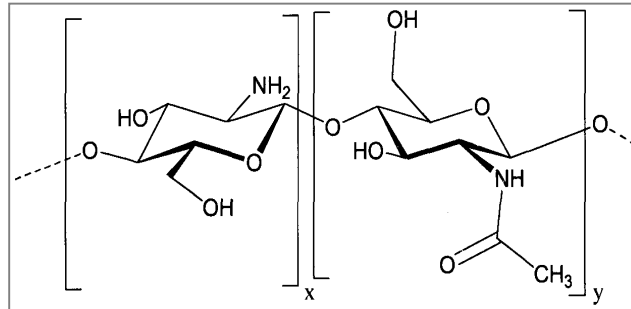


Ilustración 2. Estructura molecular de quitosano, donde "x" e "y" representan respectivamente las fracciones molares de glucosamina y N-acetilglucosamina.(39).

Otras características del quitosano es su carácter hidrófilo e hidrófobo, dado por los grupos amino y acetilamino, respectivamente, hacen que este polímero tenga diversas características según la proporción de unidades acetiladas (A) y desacetiladas (D) que conformen el copolímero. Posee un valor del pKa ~ 5.6, siendo soluble solo en soluciones ácidas con valores de pH < 6 debido a la protonación de los grupos amino, por debajo de pH 6.5 presenta una alta densidad de carga, se adhiere fácilmente a las superficies negativamente cargadas y puede formar quelatos con iones metálicos. El quitosano se caracteriza biológicamente por su biocompatibilidad (polímero natural no tóxico, biodegradable a los componentes normales del cuerpo) y por su bioactividad (aceleración del curado de las heridas, disminución del colesterol, estimulante del sistema inmune), forma complejos polielectrolitos con la carboximetilcelulosa, el alginato, la carragenina, las pectinas y el poli(ácido acrílico)(39).

Según el estudio desarrollado por Gülsah Erel y su equipo en el 2016 donde se uso la técnica de gelificación iónica, la cual se basa en la interacciones entre cargas negativas y positivas para formar nanoparticulas , se empleo el sistema Quitosano/Tripolifosfato de sodio como agente de reticulación aniónico /Insulina como activo. El estudio de liberación in vitro a pH 2,5 reveló que la liberación de insulina aumento al aumentar la concentración de quitosano

en el sistema. La formulación óptima [relación insulina : quitosano (5:5) v:v y Tripolifosfato de sodio: Quitosano (1:6) v:v] que mejoró la biodisponibilidad y absorción oral de insulina en el tracto gastrointestinal y el nivel de glucosa en plasma se redujo hasta 68.7% después de 3 h y termino en una reducción de 66.4% después de 8 h, con parámetros de eficiencia de la gelificación de 57,4 % y tamaño de partícula de 814 nm(37).

Por lo anterior en la fabricación de nano sistemas mediante matrices poliméricas con poli electrólitos es conveniente que la ultima capa de la matriz sea de característica catiónico para facilitar muco adherencia , en miras al desarrollo de formas farmacéuticas por vía oral o nasal y es allí donde el Quitosano es una buena alternativa.

En los últimos años se han desarrollado diferentes métodos para la fabricación de nano sistemas, entre los cuales la técnica de Capa por Capa (LBL o Layer by Layer) es una de las más notable debido a su extraordinaria sencillez y versatilidad. Ha sido ampliamente utilizado en una cantidad extremadamente grande de aspectos desde la energía o campos físicos hasta aspectos de la liberación de fármacos como se ha estudiado para el caso de nano encapsulación de curcumina (11). Esta técnica permite realizar recubrimientos funcionales sobre sustratos o matrices coloidales con ciertas características, donde se agregan con deposición espontanea unos grupos de poli electrólito de carga opuesta. (40)

Mediante la LBL se puede formar un recubrimiento de poli electrólitos que son añadidos en las cantidades necesarias para invertir el potencial a un valor opuesto de hasta 20 mV, permitiendo así la formación de una matriz de cargas opuestas sobre un sistema coloidal(41). Algunos autores hablan de una condición ideal de potencial zeta de +/- 30 mV y a un pH entre menor de 4 y mayor 7.5 donde el sistema este alejado de su punto isoeléctrico donde la emulsión es más inestable y puede romperse .

Dentro de las principales ventajas de esta técnica, se encuentran su capacidad de carga del fármaco de hasta un 70%, la facilidad para modificar su capa externa para mejorar las propiedades de las nanopartículas, la utilización de copolímeros y/o polisacáridos de bajo peso molecular para preservar la estabilidad coloidal, especialmente por para administración vía intravenosa donde debe ser estable a condiciones de tampón fisiológico con un tamaño

<200 nm y por último la posibilidad para formar varios pares de capas inicialmente a un pH y cambiar el pH a otro valor para terminar el revestimiento (42). Además, la estructura y las propiedades de estas nano estructuras pueden modularse mediante un simple ajuste de los parámetros, incluyendo el pH del ensamblaje, la concentración de sal y el tipo de peso molecular del material, las calidades del disolvente y la temperatura o la humedad también.(40)

Aunque la técnica es relativamente sencilla, se hace necesaria una buena selección del o los pares de electrolitos y el disolvente utilizado, debido a que estos algunos polímeros pueden adoptar distintas conformaciones desde un ovillo aleatorio hasta cadena estirada, dependiendo de la naturaleza química del sistema polímero-solvente, de la temperatura y de la fuerza iónica de la solución. Debido a que solubilidad de los polielectrolitos viene dada por las interacciones con el disolvente, y por una ganancia muy grande de entropía cuando se liberan los contra iones y se forman complejos cuando un polielectrolito se adsorbe sobre otro de carga opuesta, esta formación de complejos inter-polielectrolito es la base de la técnica de adsorción alternada capa a capa (LBL: layerbylayer) donde el complejo formado es la situación termodinámicamente más estable (33).

El agua es una excelente disolvente o dispersante para la gran mayoría de polímeros naturales del enfoque de esta monografía y que son usados en nanoencapsulación tales como alginato, carboximetilcelulosa de sodio, goma guar, goma xantana donde son dispensables en agua a baja concentraciones, la cual mejora con solo agitación mecánica. En el caso del quitosano se requiere para su disolución en agua un medio ácido que permita su protonación, para lo cual generalmente se usa una solución buffer de acetato con un pH de 4.5 a 5 al 0.1M. (43)

Antes de revisar los pasos para la fabricación de nanocápsulas mediante LBL, es conveniente revisar las características y ventajas que deben de tener los polielectrolitos aniónicos donde se deposita el poli electrólito catiónico, así como las características del medio solvente del activo.

Los polielectrolitos aniónicos como la carragenina, carboximetilcelulosa de sodio y alginato sódico se caracterizan por la existencia de grupos que permiten la adsorción, y grupos ionizados negativamente, cuyo papel consiste en aumentar la extensión de las cadenas del polímero. De este grupo la carboximetilcelulosa de sodio CMC-Na un polielectrolito natural derivado de la celulosa introduciendo un grupo carboxilmetilo ($-\text{CH}_2\text{COOH}$), ha atraído mucha atención en aplicaciones médicas y farmacéuticas debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad, buenas propiedades filmógenas y sensibilidad al pH .(44)

Un primer acercamiento al mecanismo de películas auto ensamblada de carboximetilcelulosa y quitosano lo realizó S. Zhang y su equipo de colaboradores en el 2013 mediante microbalanza de cristal de cuarzo , dicho estudio reveló que el crecimiento de las películas autoensamblada presenta una fuerte dependencia del pH de las soluciones de los polielectrolitos utilizados para el montaje de las diferentes capas. Esto se puede entender considerando los cambios en la densidad de carga de las cadenas poliméricas con el pH, que modifica así las interacciones entre polielectrolitos en el proceso de ensamblaje. Se supone que el ensamblaje LBL se construyó a través de interacciones entre la carga negativa sobre grupo carbonilo de la carboximetilcelulosa y el carga positiva sobre el amino del quitosano (45).

De acuerdo con lo anterior la carboximetilcelulosa sódica por su naturaleza aniónica más fuerte que la CMC (pK_a es aproximadamente 4.30) (46) , podrá ofrecer una densidad de carga mayor y menos dependiente del pH, a través de interacciones entre la carga negativa sobre grupo carbonilo al liberar el Na de la carboximetilcelulosa y el carga positiva sobre el amino del quitosano y formando soluciones más estables.

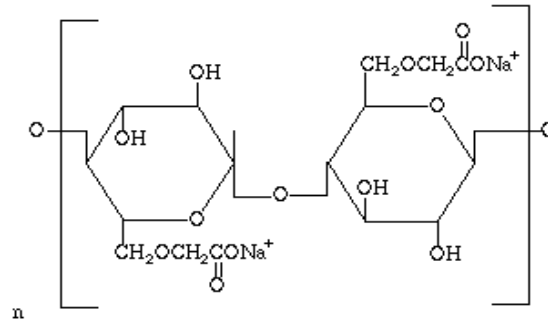


Ilustración 3. Estructura de carboximetilcelulosa de sodio CMC-Na. (46)

La conformación estructural que adquiere la carboximetilcelulosa de sodio en agua en la ilustración No 4.

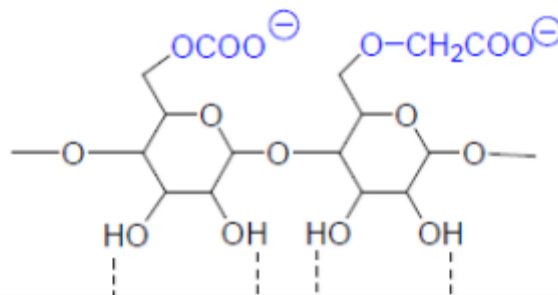


Ilustración 4. Carboximetilcelulosa de sodio en agua .(47)

En el estudio realizado por Shabbar Abba en el 2015 donde la nanoemulsión de curcumina se cubrió con quitosano y carboximetilcelulosa de sodio, las nanopartículas obtenidas exhibieron tamaño de 159 nm, PDI de 0.140 y potencial zeta negativo (17.2 mV) sin agregación después de ser almacenadas a 4 °C durante 4 semanas (11), lo cual muestra una buena sinergia entre estos dos polímeros y la estabilidad de la nanocápsula .

Por otra parte revisemos el medio solvente de los activos pobremente solubles como la quercetina, la cual requiere de una emulsión tipo O/W con ayuda de un agente tensoactivo o

surfactante iónico que le permita reducir la tensión superficial e interactuar con polielectrolitos en medio acuoso.

La quercetina debido a su baja solubilidad debe de emulsionarse en una fase oleosa con un HLB entre 10 y 12. En la tabla No 3 se hace referencia de algunos compuestos usados por en para solubilizarla.

Fase oleosa	HLB	Referencia
Miglyol 812	11	(29)
Aceite de castor	10.8	(28)
Soya o lecitina de soya hidrolizada puede actuar también como emulsificante	10.8	(43)(26)

Tabla 4. Fase oleosa para Quercetina

En algunos sistemas dependiendo de la nano estructura se requiere el uso de un tenso activo, para el caso de la técnica LBL, se requiere que la fase oleosa contenga un tenso activo iónico que permita ser la plantilla sobre a cual se depositaran los polielectrolitos.

A la fecha no existen estudios de nano encapsulación de quercetina mediante el uso estricto de la técnica LBL, sin embargo existen algunos estudio realizado en la curcumina que nos pueden ayudar a revisar la implementación de la técnica LBL para flavonoides como la quercetina.

En el estudio realizado, T.P. Saria y su grupo de investigadores llevaron a cabo la nano emulsión de curcumina usando en la fase oleosa MCT (mezcla de triglicéridos de cadena media) con HLB de 11, y como agente emulsificante una mezcla de Tween-80 (2 -10% w/w) y concentrado de proteína de suero WPC-70 (0- 1% w/w), donde el WPC actúa a la vez como hidrocoloide que con un efecto estérico le da estabilidad a la emulsión, donde se obtuvieron valores de potencial zeta de 6.9 ± 0.2 , tamaño de partícula 141.6 ± 15.4 e índice de polideispersidad de 0.273 , donde solo se uso agitación con mecánica de baja frecuencia con ultraturas (48).

En el mismo año en el 2015 Shabbar Abbas y su grupo de investigadores se realizó la formación de nano cápsulas de curcumina por la técnica LBL, usando en la fase oleosa el

MCT (mezcla de triglicéridos de cadena media) con HLB de 11, y como agente estabilizador/emulsiónate se uso el almidón modificado con OSA, dicho almidón se obtiene por adición de una cadena de Octenil succínico con una carga anionica en medio acuoso que le confiere estabilidad al pH y una fuerza iónica , que le permite actuar como un surfactante iónico; la nano emulsión O/W obtenida obtuvo valores de potencial de 39.4 ± 1.84 mV y un tamaño de partícula 142.7 ± 0.85 nm con un índice de polidispersidad de 0.141 ± 0.01 después de pasar por ultraturas y sonificación de alta frecuencia(11) .

Como se puede observar la diferencia en la obtención de la nano emulsión entre los dos estudios es el potencial zeta, asociado al surfactante usado y el método de agitación.

La selección de un adecuado tenso activo se hace complejo en el sentido que no se deben de seleccionar aquellos que no tengan restricciones de uso en medicamentos por via oral, nasal o intramuscular, tales como el dodecil sulfato de sodio SDS, moestearato de PEG 400, tween 80, de origen natural como la lecitina hidrolizada y el almidón modificado, algunas proteínas o fosfolipidos, los cuales pueden ayudan a la estabilización de la emulsión de la fase O/W, al actuar como hidrocoloide con efecto estérico por su cadena alifática y su posibilidad de generar un ion . Sin duda se puede realizar una combinación de ellos o estudiar su efecto individual. La lecitina por ejemplo es uno de los emulsificantes mas versátiles y usados en la industria de alimentos , especialmente la lecitina hidrolizada que es obtenida por la hidrólisis de los fosfolípidos por medio de enzimas (fosfolipasa A2) transformándolos en lisofosfolípidos.

La lecitina hidrolizada posee una mayor solubilidad en agua que la lecitina standard y produce emulsiones tipo aceite/agua más estables. La característica química más importante de la lecitina es su poder emulsionante. Las moléculas de fosfolípidos poseen una parte polar hidrofílica y otra apolar lipofílica, responsable por el poder de reducción de la tensión interfacial entre una mezcla aceite/agua por ejemplo. Ese poder emulsionante es utilizado en aplicaciones como bebidas, margarinas, aderezos, etc.; permitiendo la obtención de emulsiones tipo aceite/agua o agua/aceite.

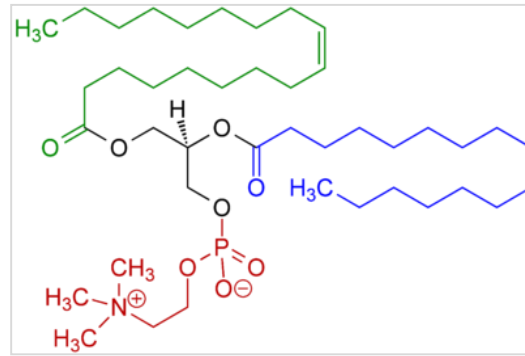


Ilustración 5. Estructura de la lecitina.(49)

Desde el punto de vista de su uso en sistemas de formación de nanocápsula por ensamblaje de capa de poli electrolitos LBL, tendría la ventaja que el nitrógeno de la colina posee carga positiva y el fosfato, negativa, de modo que en solución, a casi todos los valores de pH, la lecitina existe como sal interna o ion interno (zwitterion). En su estructura podemos ver la parte hidrofóbica de la molécula, constituida por los dos radicales acilo sustituyendo al glicerol, y la parte polar de la misma, compuesta por el grupo fosfocolina. La polaridad de este último está determinada por la carga electronegativa del fosfato y la carga electropositiva del grupo trimetilamonio de la colina. Así se convierte en una opción para ser planilla coloidal de polielectrolitos .

Veamos ahora la importancia de una buena homogenización mecánica como un parámetro importante al realizar las nano emulsiones y el uso de otras técnicas de homogenización diferente al ultraturas entre la de las fases oleosa y acuosa.

Sin duda el camino más simple para la obtención de una emulsión es proporcionar energía mecánica al sistema. Este propósito puede ser fácilmente alcanzado usando agitadores mecánicos, homogeneizadores o por efectos de cavitación por ultrasonido. El proceso de emulsificación por ultrasonido, el cual usa la producción súbita y el consecuente colapso de las gotas de aire en el líquido. Este colapso, que produce un gran incremento de la presión local, es capaz de destruir la gota. La emulsión por sonicación presenta el problema en términos de reproducibilidad debido a la dificultad de controlar los núcleos de cavitación (dominios donde la presión del líquido es mayor que la presión de vapor). La ley de LaPlace regula la forma de las gotas, permite calcular la presión necesaria para dividir una gota en

dos más pequeñas a presiones más altas que las iniciales y también permite demostrar que el radio medio de la gota depende de la energía introducida por unidad de volumen. (50)

A pesar de sus limitaciones la sonicación hoy cobra más fuerza, debido a que el uso de sistemas de ultrasonido con frecuencias (>20 kHz) permiten obtener tamaños de partícula de hasta 100 nm lo cual ofrece una mejor homogenización, además es una alternativa y ventaja al ser más pequeñas su transporte por la barrera macro encefálica y será cuestión de identificar los rangos y tiempos de frecuencia a utilizar que eviten que se rompa la emulsión.

El estudio realizado por Zhiguo Zheng donde realizó la síntesis de nano partículas de curcumina revestidas con poli electrolitos asistida por sonicación, se pudo evidenciar que el uso de ultrasonido favorece la formación de diámetros de partícula de hasta 60 nm a 90 nm , que se combina con la alta carga superficial para aumentar la estabilidad coloidal (51)

5. DISCUSION Y ANALISIS

De acuerdo a la recopilación de la información a continuación se propone una serie de etapas para la fabricación de nano cápsulas de quercetina mediante auto ensamblaje (LBL):

I. MATERIALES A UTILIZAR:

- Quercetina.
- Fase oleosa: Miglyol 812 el cual es una mezcla de triglicéridos de cadena media, basado en los resultados obtenidos por Etcheverry Juan Diego en el 2016 donde obtuvo buena solubilidad de quercetina en una relación de 1:30 (v:w) en ml: mg.(29)
- Sistema de surfactantes: Lecitina hidrolizada y Tween 80. Donde la lecitina con un HLB=10.8, actúa adicionalmente como un estabilizante tipo hidrocoloide de la emulsión gruesa O/W y el Tween 80 con HLB = 15 actuará como un surfactante entre el sistema Miglyol - Lecitina que realizará un efecto de hidrocoloide generando una plantilla coloidal con disponibilidad de liberar carga positiva que realizará la interacción carboxílicos de la carboximetil celulosa de sodio.

- Poli electrolitos: Se usara la carboximetil celulosa de sodio y el quitosano con el fin de obtener una nano capsula con carga negativa, que como ya fue revisado tiene mayor mucoadherencia, lo cual genera la ventaja de su uso por vía intranasal donde no tendría paso atreves del sistema digestivo.

II. FORMACION DE NANOEMULSION

A continuación se presentan un resumen de los pasos que deben de seguirse para la obtención de nanocápsulas mediante LBL:

- **Formación de fase dispersa o fase oleosa.**

La tabla No 4 muestra las concentraciones preliminares a evaluar con base al trabajo realizado con flavonoides de curcumina, ver las referencias bibliográficas(48) y (11) de este documento.

Materias primas (Xi)	-1	0	1
X1 Activo: Quercetina	3 mg/ml	6 mg/ml	10 mg/ml
	MCT	MCT	MCT
X2 Fase oleosa:			
Miglyol (triglicéridos de cadena media) con un HLB de 11.	0.05 % V/V emulsión	0.1% V/V emulsión	0.2% V/V emulsión

Tabla 5. Concentraciones de fase oleosa.

La mezcla X1 más X2 se realizara con agitación mecánica con ultraturas únicamente debido a la afinidad de las materias primas. Las variables de control se tendrá en cuenta es la concentración de flavonoides en fase oleosa a landa de 371 por espectrofotómetro UV/Vis.

La matriz de combinación para determinar el mejor nivel se presenta a continuación en la tabla 5.

formulación (Fi)	Variables	
	X1	X2

F1	-1	-1
F2	-1	0
F3	-1	1
F4	0	-1
F5	0	0
F6	0	1
F7	1	-1
F8	1	0
F9	1	1

Tabla 6. Combinatorios para fase dispersa

- **Formación de emulsión gruesa.**

Una vez determinada la concentración óptima de la fase dispersa se procede a la inclusión de la fase continua para obtener una emulsión tipo O/W, donde se evaluarán en tres niveles (-1, 0 y 1) para la concentración del emulsificante que debe conservar una naturaleza aniónica y el agua desionizada, determinando así la concentración óptima para la emulsión gruesa.

La tabla No 6, describe las concentraciones propuestas de trabajo. Los valores fueron tomados de los reportados en la aplicación de la técnica en curcumina(48) y (11).

En la ilustración No 4, se muestra una propuesta secuencial para la obtención de la emulsión gruesa.

Materias primas	Mezcla 1	Mezcla 2
Tween 80	0% de la emulsión	2% de la emulsión

Lecitina de soya	0.5 % de la emulsión	0.9 % de la emulsión
X3 Agua des ionizada a cps 50 ml de emulsión		

Tabla 7. Concentraciones sistema fase continua.

En la formación de la emulsión gruesa se tomaran las condiciones entre 1000 -1400 rpm en ultra turras con un tiempo de 3 a 6 min a temperatura ambiente de acuerdo al las condiciones reportadas por Shabbar en su estudio con curcumina (11) . Una vez obtenida la emulsión gruesa deberá realizar la caracterización, mediante las variables de control (Y1, Y2, Y3) que se describen a continuación en la tabla No 7.

Variable de respuesta (Yi)
Tamaño de partícula (Y1)
Índice de polidispersidad (Y2)
Potencial Zeta (Y3)
Eficiencia de encapsulación (Y4)

Tabla 8. Variables de estudio para sistemas de nano emulsiones.

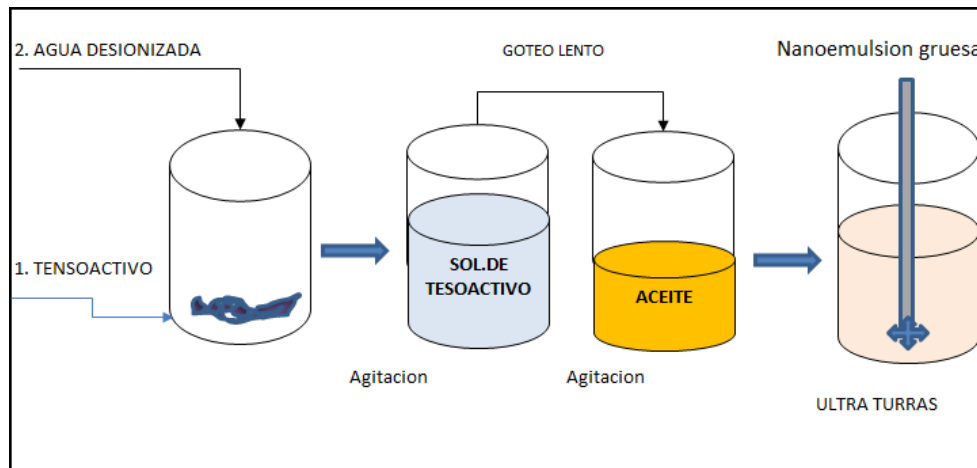


Ilustración 6. Secuencia de obtención de nano emulsión gruesa.

- **Formación de nano emulsión en matriz polimérica.**

Una vez determinada la concentración óptima de la emulsión gruesa se procede a la etapa de formación de la matriz polimérica con el ensamblaje de los poli electrolitos, se estudiarán combinaciones de polímeros así: Carboximetil celulosa sódica (aniónico) y Quitosano (catiónico)

Durante la formación de la nano emulsión en matriz polimérica, las variables de control serán Y1, Y2, Y3, Y4 que ya se describieron en la Tabla No 5 de variables de estudio para sistemas de nanoemulsiones.

- **Sistema Carboximetil celulosa sódica CMC-NA (aniónico): Quitosano (catiónico) :**

Las concentraciones de evaluación y los niveles se describen en la tabla No 8.

A continuación se describe la preparación de los polímeros y la nano emulsión

a. Dispersión de los polímeros iónicos:

La dispersión de la CMC-NA se puede realizar entre 0.1 a 0.7 mg/mL de agua en agua des ionizada con agitación manual (11). Las concentraciones de CMC-Na a evaluar se describen en la tabla No 8.

El quitosano a utilizar debe ser parcialmente desacetilado, con un grado de des acetilación: 93.4 %, con un peso molecular promedio de 100 kDa o con grado de des acetilación: 85 %, con un peso molecular promedio de 200 kDa. Se preparara una solución buffer acetato (pH 4.5 y 0.1M) disolviendo 3.15 gramos de acetato de sodio anhidro en un matraz de 500 ml con agua, a continuación se adiciona 4.5 ml de ácido acético glacial y se completa con agua hasta la marca del matraz, el pH de la solución buffer debe estar en 4.5, si necesita ajuste se adiciona una solución de NaOH. La solución de quitosano puede prepararse variando la concentración de dispersión de 0.25 a 2.25 mg de polvo de quitosano/mL de solución buffer(11) . Las concentraciones de quitosano a evaluar se describen en la tabla No 8.

b. Deposición de poli electrolitos

A continuación una propuesta para la adición de la solución de CMC-Na (13.3 mL) gota a gota en el 40 mL de la nano emulsión con quitosano , mientras se realiza la homogeneización durante 5 min y 10 min a 8000 rpm usando ultra turras (11). Después de la adición de cada polímero se le mide la viscosidad y pH.

Después se agregaría la solución de quitosano (20 mL) gota a gota en 40 mL de la nana emulsión gruesa mientras se realiza la homogeneización durante 5 min y 10 min a 8000 rpm usando ultra turras.

Materias primas de encapsulación		-1	0	1
X4	Carboximetil celulosa de sodio CMC-NA	0.1mg/ml de agua	0.25 mg/ml de agua	0.7mg/ml de agua
X5	Quitosano Parcialmente desacetilado	0.25 mg/ml de solución buffer	0.75 mg/ml solución buffer	1.3 mg/ml de solución buffer

Tabla 9. Concentración poli electrolitos Sistema quitosano/CMC-Na.

c. Medición en zeta sizer

Las muestras se diluirán 200 veces con agua purificada agitando bien antes de la medición. El potencial zeta se determinara mediante la medición de la movilidad electroforética en 25 °C.

6. CONCLUSIONES

- a) La quercetina es un compuesto natural con un alto poder antioxidante al contener 5 donantes de enlaces de hidrógeno y 7 aceptores de enlaces de hidrógeno además de tener el grupo catecol en el anillo B y el grupo OH en la posición 3 , donde el grupo OH libre de la posición 3 aparentemente incrementa la capacidad antioxidante porque la forma libre es más lipofílica que la glicosídica y un grupo OH en posición 5 puede aumentar la actividad antioxidante por incremento de la deslocalización electrónica que le permiten captura de radicales libres . Asi la quercetina actua como un ROS scavenger capaz de reaccionar con especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres reactivos y se ha demostrado ser capaz ejercer un efecto de anti agregación e inhibición en la formación de fibrillas $\alpha\beta$, desestabilizar incluso las fibrillas maduras y aumentar la producción de enzima superóxido dismutasa (SOD), Enzima catalaza (CAT) y enzima Glutati6n peroxidasa (GPX) .
- b) La nano encapsulaci6n de quercetina en sistemas polim6ricos naturales en combinaci6n con la ultrasonicaci6n u homogenizaci6n de alta frecuencia pueden permitir di6metros menores de 100 nm , donde se mejora su penetraci6n a trav6s de las barreras fisiol6gicas (la barrera hematoencef6lica y la barrera de sangre-líquido cefalorraquídeo), el cual es uno de los inconvenientes para muchos medicamentos.
- c) Nanocápsula con carga superficial negativa en base a quitosano indica que contribuye a la absorci6n oral del fármaco encapsulado mediante la interacci6n con la carga de carga negativa de las mucosas. Los estudios con células en modelos con membrana se

ha podido permitido inferir que las interacciones electrostáticas puede ser la característica más importante en la acción de quitosano en la mucoadhesividad , pero no son los únicos relevantes.

- d) La técnica LBL es una combinación de nano emulsiones con los principios de las fuerzas hidrofobicas y fuerzas electrostáticas, sumado al tratamiento ultrasónico para su homogenización conduce al ensamblaje de envolturas de poli electrolito ultra finas que pueden modularse para su liberación atreves de estímulos como el pH, fuerzas iónicas entre otras .

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhang JL. Quercetin, a natural product supplement, impairs mitochondrial bioenergetics and locomotor behavior in larval zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017 March; 327: p. 30-38.
2. Muhammet Ay ACHJVA. Seccion 3. Capitulo 32 – Quercetina. In Gupta R. *Nutraceuticals, Efficacy, Safety and Toxicity*. 9780128021477000322th ed. Londres: Academic Press; 2016.
3. Mirpoor SF, Hosseini SMH. Efficient delivery of quercetin after binding to beta-lactoglobulin followed by formation soft-condensed core-shell nanostructures. *Food Chemistry*. 2107 Abril; 233: p. 282–289.
4. Avnesh Kumaria SKYYBPBSSCY. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;(80): p. 184–192.
5. Kumar VD. Development and evaluation of biodegradable polymeric nanoparticles for the effective delivery of quercetin using a quality by design approach. *LWT - Food Science and Technology*. 2015; 61: p. 330-338.
6. Zhongxiang Fang BB. Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;; p. 510-523.
7. Vicente-Vicente L, Prieto M, Morales AI. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Revista de Toxicología*. 2013 Julio; 30(2): p. 171-181.

8. Aristizábal YB. ESTUDIO FISICOQUÍMICO DE LA LIBERACIÓN DEL DICLOFENAC A PARTIR DE COMPLEJOS POLIELECTROLITO-FÁRMACO. In Bogota UNd. Tesis. Bogota; 2011.
9. Pineda D. Estudio del efecto de los sistemas poliméricos PAM-18 k2 y PAM-18 Na2 sobre los perfiles de disolución de comprimidos de ampicilina Cali: Trabajo de tesis; 2013.
10. Sabna Kotta AWKKP. Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion. Drug Delivery*. 2012; 9(5): p. 585-598.
11. Shabbar Abbas EKBH. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015; 23 : p. 81–92.
12. Kenjiro O, Yuji Y. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 2003 June; 87: p. 172–181.
13. Natarajan S, Pandima DK, Seyed N. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016 Octobe; 84: p. 892–908.
14. Sonia L, Carlos BD. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017 March; 133: p. 379-402.
15. Clara GL, Ibiapina M. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017; 517: p. 50–57.
16. Son S, Ruhel R, Medhi B. Nanomedicine in Central Nervous System (CNS) Disorders: A Present and Future Prospective. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2016 September; 6(3): p. 319-335.
17. Shokoohinia Y, Rashidi M. Quercetin-3-Ob-d-glucopyranoside, a dietary flavonoid, protects PC12 cells from H2O2- induced cytotoxicity through inhibition of reactive oxygen species. *Food chemical*. 2015; 167: p. 162-167.
18. Magalingam K, A R. Protective effects of quercetin glycosides rutin, and isoquercetrin against 6-hydroxydopamine (6- OHDA)-induced neurotoxicity in rat

- pheochromocytoma (PC-12) cells. *International Journal Immunopathol. Pharmacol.* 2016; 29: p. 30-39.
19. Salem Alrawaiq N, Abdullah A. A Review of Flavonoid Quercetin: Metabolism, Bioactivity and Antioxidant Properties. *International Journal of PharmTech Research.* 2014 July; 6(3): p. 933-941.
 20. Aherne S. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 2002 January; 18(1): p. 75-81.
 21. Phachonpai W, Wattanathorn J, Muchimapura S. Neuroprotective Effect of Quercetin Encapsulated Liposomes: A Novel Therapeutic Strategy against Alzheimer's Disease. *American Journal of Applied Sciences.* 2010; 7(4): p. 480-485.
 22. Costa L, Garrick J. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016 January; 2016.
 23. Jiménez K, Bermejo P, Benedí J. Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP^{swe} cells. *Life Science.* 2011; 89: p. 939-945.
 24. Ansari MA, Abdul HM. Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1-42): relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2009; 20: p. 269-275.
 25. Angelica Maria Sabogal JIMJRR. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology.* 2015; 93.
 26. Pabyton G. Cadena MPRBSC. Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013; 1828: p. 309-316.
 27. Ming Suna SNXPRZZFSW. Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2014; 113: p. 15-24.
 28. S.Nathiya MDTD. PREPARATION, PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOCOMPATIBILITY EVALUATION OF QUERCETIN LOADED CHITOSAN. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* 2014; 9(4): p. 1603 - 1614.

29. Echeverry JD. NANOENCAPSULACIÓN DE QUERCETINA PARA OPTIMIZAR SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. Anteproyecto de grado. Cali: Universidad Icesi, Valle del Cauca ; 2016.
30. Efsanjani AF, Jafari SM. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016 June; 146: p. 532-543.
31. Viviana Vergaro FS. Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011; 63: p. 847–864.
32. Mora-Huertas CE. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 385: p. 113–142.
33. Aldea MR. Tesis doctoral. 2013..
34. Kumari A. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 75: p. 1-18.
35. Nisha T, Ranjit D, Jakob B, Amirali P. Cancer therapeutics with epigallocatechin-3-gallate encapsulated in biopolymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017 Feb; 518(1-2): p. 220-227.
36. De Jong W, Borm P. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal Nanomedicine*. 2008; 3(2): p. 133-149.
37. Gülsah E, Mustafa K, Hasan A. Nanoencapsulated chitosan nanoparticles in emulsion-based oral delivery system: In vitro and in vivo evaluation of insulin loaded formulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017; 36: p. 161-167.
38. Cristine S, Nobre T. Interaction of chitosan and mucin in a biomembrane model environment. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012 Marzo; 376: p. 289–295.
39. Carmiña Gartner BL. Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 210;(53): p. 20-29.
40. Xu L. Layer-by-layer directly-assembly of polyelectrolyte multilayers with foaming structures. Tesis. University of Akron ; 2015.

41. Eduardo G, Mateos A. Layer-by-Layer polyelectrolyte assemblies for encapsulation and release of active compounds. *Advances in Colloid and Interface Science*. Available online 20 April 2017.
42. Gaurav Parekha PPCJaTSMD. Layer-by-layer nanoencapsulation of camptothecin. *International Journal of Pharmaceutics* 465. (2014); 465: p. 218–227.
43. Souza M, Vaz A, Correia M. Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Functional Food Applications. *Food Bioprocess Technology*. 2014; 7: p. 1149-1159.
44. Hu D. Quaternized chitosan/polyvinyl alcohol/sodium carboxymethylcellulose blend film for potential wound dressing application. *Wound Medicine*. 2017; 16: p. 15-21.
45. Zhang S, Liu W, Liang J. Buildup mechanism of carboxymethyl cellulose and chitosan self-assembled films. *Cellulose*. 2013; 20: p. 1135–1143.
46. Wikipedia. Wikipedia.org. [Online].; 2016 [cited 2016 Marzo 2016]. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Carboximetilcelulosa>.
47. <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-10.php>. [Online]. [cited 2017 Mayo 10]. Available from: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-10.php>.
48. T.P. Sari BMK. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*. 2015; 43: p. 540 -546.
49. [Online]. [cited 2017 Mayo 02]. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Lecitina>.
50. Fernandez A. Preparacion , caracterizacion y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/w. Universidad de Granada , Depto de ingenieria quimica; 2006.
51. Zheng Z, Zhang X. Sonication assisted synthesis of polyelectrolyte coated curcumin nanoparticles. *Langmuir*. 2010 June; 26(11): p. 7679–7681.
52. Instituto nacional del cancer EEUU. Instituto nacional del cancer. [Online].; 2016 [cited 2016 Abril 8]. Available from: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
53. Santo Scalia MM. Incorporation of quercetin in lipid microparticles effect on photo- and chemical-stability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009; 49: p. 90–94.
54. Parra RA. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.* 2010; 63(2): p. 5669-5684.

55. Iuliia S. Elizarova PFL. Fabrication of polyelectrolyte multilayered nano-capsules using a continuous layer-by-layer approach. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016; 470: p. 92–99.
56. Henry W. Querfurth MD,PD,aFMLPD. Alzheimer’s Disease. *The new england journal of medicine*. 2010; 362: p. 329-44.
57. Borja Sánchez MFGAM. Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis subs lactis* strain. *International Dairy Journal*. 2010; 20: p. 800-805.
58. Plataforma de medios de comunicación de la Universidad Icesi. Unicesi. [Online].; 2016 [cited 2016 Abril 4. Available from: <http://www.icesi.edu.co/unicesi/2013/09/19/alzheimer-un-problema-de-salud-publica-en-colombia-dia-mundial-del-alzheimer/>.
59. Minsalud. Ministerio de salud de Colombia. [Online].; 2016 [cited 2016 Marzo 20. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/MinSalud-establece-reporte-para-registrar-informaci%C3%B3n-de-pacientes-con-c%C3%A1ncer.aspx>.
60. Instituto nacional del cancer EEUU. Instituto nacional del cancer. [Online].; 2015 [cited 2015 Abril 4. Available from: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/estadisticas>.
61. Banker SK&G. Culturing hippocampal neurons. *NATURE PROTOCOLS* : Center for Research on Occupational and Environmental Toxicology, Oregon Health & Science University. 2006 Junio; 1 (5).
62. Angel E, Gonzalez H. Evolución del medio de cultivo en el estudio de las células madre neuronales. *Revista Médica Universidad Veracruzana*. 2009 Junio; 9(1).
63. Morten Bagge Hansen SENKB. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*. 1989 Mayo; 119(2): p. 203-210.
64. Sánchez MÁ. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 2008 Junio; 9(3): p. 196-201.
65. Association_Alzheimer's. alz.org. [Online]. [cited 2016 junio 5. Available from: <http://www.alz.org/>.

66. Mirpoor SF, Hashem SM. Efficient delivery of quercetin after binding to beta-lactoglobulin followed by formation soft-condensed core-shell nanostructures. *Food Chemistry*. 2017 Abril; 233: p. 282–289.
67. Alzheimer Gdsfdlpc. Laura Tuneu;Miguel Rojas; Montse Sadans. Granada : Universidad de Granada.
- 68.
69. Dennis S. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Journal of Alzheimer's disease*. 2001 June; 3: p. 75-80.
70. A S, J M, J R. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*. 2015 June; 93: p. 134-145.
71. Muhammet Ay ACHJVAAKAGK. Seccion 3. Capitulo 32 – Quercetina. In Gupta RC. *Nutraceuticals, Efficacy, Safety and Toxicity*. 9780128021477000322th ed. Londres: Academic Press. Copyright © 2016 Elsevier Inc.; 2016. p. 447-452. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021477000322>.
72. Vecchione R, Quagliariello V, Calabria D. Curcumin bioavailability from oil in water nano-emulsions: In vitro and in vivo study on the dimensional, compositional and interactional dependence. *Journal of Controlled Release*. 2016; 233: p. 88-100.

