

Formulación farmacéutica con actividad antiinflamatoria potenciada de moléculas comerciales y naturales

Pharmaceutical formulation with enhanced anti-inflammatory activity of commercial and natural molecules

Johanna Seidel Britania Chávez Hernández¹, Sofia Delgado Alcantar¹, Nadia Yolanda Quezada Santoyo¹, Ana Iris Reyes Gómez¹, Mariela Rodríguez Baltazar¹, Edgar Mauricio Torres Núñez¹, Clara Alba Betancourt¹, Marco Antonio Ramírez Morales¹

¹Departamento de Farmacia de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato
 ma.ramirez@ugto.mx¹

Resumen

En la naturaleza existen diversas moléculas de origen vegetal, las cuales presentan actividad biológica diversa como los flavonoides. Dentro de las múltiples actividades biológicas que presentan, se destaca la actividad antiinflamatoria y analgésica, por lo cual estas moléculas representan un gran potencial para la industria farmacéutica. Dentro de la industria farmacéutica existen varias moléculas con las actividades entre ellas los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, pero recientes investigaciones han mostrado que cuando estas moléculas sintéticas, se combinan con las de origen natural, se presenta el fenómeno de potenciación (aumento de la actividad biológica), con lo cual se utiliza menos cantidad de producto, pero con mejores resultados en la actividad antiinflamatoria y analgésica. Por lo cual es de nuestro interés, combinar dichas moléculas y producir una forma farmacéutica que permita su distribución en el organismo, aprovechando su potencial efecto terapéutico.

Palabras clave: rutina; quercetina, flavonoides, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, antiinflamatorio, microemulsiones.

Introducción

Los flavonoides son moléculas orgánicas polifenólicas que están presentes en las plantas, se han encontrado más de 4000 tipos diferentes de flavonoides en la naturaleza que se dividen en subclases: flavonoles, flavononas, flavonas, catequinas, isoflavonas, antocianidinas y dihidroflavonoles. Entre los flavonoides se distingue la rutina y la quercetina (Fig.1), donde la quercetina puede obtenerse de la degradación de la rutina, pero conservando sus propiedades farmacológicas principalmente la antiinflamatoria¹.

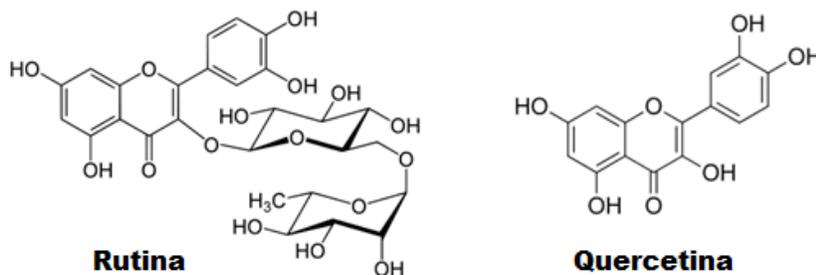


Figura 1. Flavonoides rutina y quercetina

Esta molécula tiene beneficios para la salud ya que presenta propiedades: antiinflamatoria de larga duración, efecto inmunosupresor, antiproliferativa y antioxidante^{2,3}, aunque también muestra un potencial terapéutico como prevención y tratamiento de enfermedades crónicas cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer⁴, como bloqueador solar⁵, tratamiento natural prometedor para enfermedades inflamatorias de la piel⁶, propiedades antioxidantes⁷ y antihiper glucémicas⁸ además de exhibir propiedades neuroprotectoras⁹.

El efecto antiinflamatorio que se encuentra en la rutina es explicado por la inhibición de algunas enzimas en el proceso de inflamación. En un estudio se observa que la mieloperoxidasa disminuye en presencia de rutina¹⁰. La mieloperoxidasa es una enzima lisosomal que se libera en vacuolas fagocitadas durante la actividad celular y su grado de actividad está directamente relacionado con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado¹¹. Se ha observado a su vez que distintas citocinas que promueven la inflamación se han visto reducidas en sus niveles. En conjunto, se ha encontrado que la rutina alivia la oxidación inducida por especies reactivas de oxígeno inducidas por estrés oxidativo e inflamación a través de la orientación p38-MAPK, NFκB, COX-2, i-NOS, TNF-α y IL-6¹⁰.

Las investigaciones confirman a su vez que el efecto antiinflamatorio de la quercetina se debe a la inhibición de las citocinas proinflamatorias, ATP y los sitios de unión del factor nuclear kappa B (IκBα), además de un efecto que parece estar asociado con su capacidad para bloquear algunos mediadores inflamatorios, expresión de moléculas de adhesión, enzimas inducibles y la activación del factor de transcripción nuclear.^{1,2,4,12,13} Se encontró que su mecanismo de acción es inhibir la producción de TNF-α inducida por lipopolisacáridos en macrófagos y la producción de IL-8 inducida por lipopolisacáridos bloqueando las vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa en concentraciones relativamente altas, mientras que, en concentraciones más bajas, la vía de la lipooxigenasa fue el objetivo principal de la actividad antiinflamatoria inhibidora^{2,14}. Asimismo, se hizo un estudio en voluntarios sanos en donde se determinó que inhibió de forma dependiente de la dosis la producción de TNF-α en personas con niveles elevados de inflamación.¹⁵

Los AINE (medicamentos antiinflamatorios no esteroideos) son algunos de los analgésicos más utilizados en adultos, como tratamiento común para los problemas de salud crónicos (a largo plazo), como la artritis (artritis reumatoide, osteoartritis y otros) y el lupus. Los AINE bloquean unas proteínas, llamadas enzimas principalmente la COX-2, en el cuerpo que ayudan a producir prostaglandinas. Las prostaglandinas son un grupo de ácidos grasos naturales que desempeñan un papel en el dolor y la inflamación. Los AINE también pueden disminuir la inflamación, así como la fiebre, la hinchazón y el enrojecimiento.¹⁶ Existen varios medicamentos dentro de esta clasificación, sin embargo, destacaremos 3 de ellos que son los usados en esta investigación, que serán el naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno.

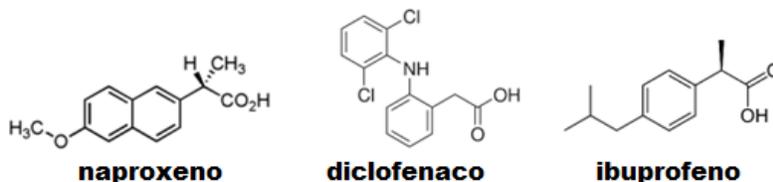


Figura 2. Aines usados en el trabajo.

Estas moléculas han sido utilizadas durante mucho tiempo y demostrando su beneficio en la farmacología, sin embargo, cuentan con algunos efectos adversos que deben ser considerados. Entre algunas reacciones adversas de los AINES se encuentran las gastropatías. Estos efectos indeseables son provocados por inhibición de la síntesis de prostaglandinas en las paredes del estómago y del intestino. Debido a lo anterior, se busca desarrollar AINES selectivos de COX-2, enzima que se expresa en células afectadas o dañadas, logrando así la disminución de los efectos adversos de estos fármacos, sobre todo los gastrointestinales.¹⁷

Por lo que se sugiere la combinación de fármacos y principios activos con propiedades antiinflamatorias con diferentes mecanismos de acción mostrando un sinergismo que los hace más efectivos, como se menciona en el trabajo del Dr. Zapata-Morales.¹⁸

La biodisponibilidad de los flavonoides es muy baja,⁴ aunque la vía tópica es poco eficaz debido a la baja permeabilidad cutánea y baja solubilidad de los flavonoides en medios acuosos, es importante mejorar los sistemas para permitir una incorporación eficiente y una buena biodisponibilidad de estos principios activos.¹²

Las microemulsiones son un tipo de formulación relativamente nuevo que ha tenido mucho auge por su eficaz administración dérmica de varios principios activos, ya que permite una rápida penetración de los principios activos debido a sus componentes que reducen la propiedad de barrera del estrato córneo, mejorando la absorción en comparación con otras formulaciones convencionales, haciendo que se conviertan en una forma farmacéutica prometedora para la administración transdérmica de fármacos.¹⁹

Ya que las microemulsiones son mezclas líquidas isotrópicas de aceite, agua y surfactante, que se encuentran frecuentemente en combinación con un co-surfactante, presentan translucidez y estabilidad termodinámica. La fase dispersa, generalmente lipofílica, actúa como un reservorio potencial de fármacos lipofílicos, que, en contacto con membranas semipermeables, como la piel o las mucosas, pueden facilitar el transporte de fármacos a través de estas barreras, por lo cual representa una buena opción para trabajar con los flavonoides.²⁰

Con la información disponible a nuestro alcance, se planteó el objetivo de generar una forma farmacéutica tópica que combine los flavonoides elegidos con los AINE's, dado que sus mecanismos de inhibición de la inflamación son por diferente ruta, pero que se potencian mutuamente como lo demostró el Dr. Zapata-Morales.¹⁸

METODOLOGÍA

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Se deben llevar a cabo pruebas de solubilidad de los flavonoides y los AINE's, utilizando diferentes solventes (isopropanol, glicerina, polietilenglicol, etanol, propilenglicol y agua. Para ello, se debe colocar las muestras en tubos de ensayo y posteriormente, se agrega un solvente diferente en cada tubo y se observa la solubilidad de las muestras en frío. Si la muestra no es soluble en frío se procede a calentar los tubos, agitando ocasionalmente y observando la solubilidad de las muestras en caliente. Anotar los resultados y verificar cual es el mejor solvente para la solubilización de los principios activos.

FORMULACIÓN DE MICROEMULSIÓN DE GEL PLACEBO

Tabla 1. Material para formulación de microemulsión de gel.

Fase oleosa	Sistema lipídico, Polietilenglicol
Fase acuosa	Tween 80, Agua
Estabilizante	Carbopol, Agua

El proceso inicia con el tamizado del carbopol con una malla, posteriormente se adiciona al agua en un vaso de precipitado. En la fase acuosa se mezcla el tween 80 y el agua, cuidando que se mantenga la temperatura constante de 50°C. Para la fase oleosa directamente se mezclan el sistema lipídico y el PEG manteniendo agitación y temperatura de 50 °C constante. Ya que se tienen todas las fases, se añade la fase oleosa a la acuosa manteniendo la temperatura a 50 °C y agitando a 900 rpm durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de agitación esta mezcla se agrega a la base de carbopol manteniendo la agitación hasta incorporar completamente las fases sin que haya grumos. Finalmente, se dejó reposar la mezcla hasta temperatura ambiente.

FORMULACIÓN DE MICROEMULSIÓN DE GEL CON PRINCIPIO ACTIVO

Tabla 2. Material para formulación de microemulsión de gel.

Fase oleosa	Sistema lipídico, Polietilenglicol
Fase acuosa	Tween 80, Agua
Estabilizante	Carbopol, Agua
Principio activo	Flavonoide, AINE

El proceso se inicia con el tamizado del carbopol, posteriormente se adiciona al agua en un vaso de precipitado para su hidratación. Por otro lado, se prepara la fase acuosa mezclando el tween 80 con el agua, cuidando que se mantenga la temperatura constante de 50°C. En la fase oleosa se solubilizan los principios activos en PEG y se adiciona el aceite, manteniendo la agitación y temperatura constante. Ya que se tienen todas las fases, se procede a la incorporación de la fase oleosa a la acuosa manteniendo la temperatura y la agitación constante durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de agitación esta mezcla se agrega el carbopol manteniendo la agitación hasta incorporar completamente las fases, finalmente, se deja en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente.

PRUEBAS ORGANOLÉPTICAS

Se realizan pruebas organolépticas del placebo y de la formulación con principio activo para considerar las características del producto y como se alteran o no con la incorporación del principio activo.

Color: colocar muestra en un vidrio de reloj y hacer una observación simple en donde incida luz natural.

Olor: colocar muestra en un vidrio de reloj y percibir el olor acercando a la nariz.

Brillo: colocar muestra en un vidrio de reloj y hacer una observación simple en donde incida luz sobre la muestra y observar si hay reflejo de la luz.

Sensación al tacto: colocar muestra sobre la piel de 3 personas e indicar la sensación respecto a la muestra.

Evanescencia aparente: colocar muestra sobre la piel de 3 personas e indicar qué tan rápido se desvaneció la muestra.

Viscosidad aparente: colocar muestra sobre la piel de 3 personas e indicar con qué facilidad se pudo aplicar la muestra en una zona.

Consistencia aparente: colocar muestra sobre la piel de 3 personas e indicar su resistencia a romperse o deformarse.

CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO DE LA FORMULACIÓN

Se llevó a cabo la cuantificación de los principios activos con espectrofotómetro UV-VIS, en las diferentes formulaciones. Para lo cual es necesario preparar una solución madre de cada formulación y hacer las diluciones correspondientes para cuantificar las diferentes cantidades de principio activo contenidas en las microemulsión.

<i>Tabla 3.</i> Datos de los diferentes principios activos a cuantificar		
Principio activo	Cantidad	Ecuación de la recta
Rutina	30 µg	$Y=0.0258x+0.0065$
Quercetina	5 µg	$Y=0.0457x+0.0168$
Naproxeno	20 µg	$Y=0.0063x+0.002$
Diclofenaco	25 µg	$Y=0.0331x-0.0262$
Ibuprofeno	20 µg	$Y=0.0492x+0.0071$

RESULTADOS

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

<i>Tabla 4.</i> Resultados de solubilidad					
Disolvente	Rutina	Quercetina	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno
Agua	Poco soluble	Poco soluble	insoluble	Muy soluble	Soluble en caliente

Etanol	Poco soluble	soluble	soluble	Muy soluble	soluble
Isopropanol	Poco soluble	Soluble en caliente	soluble	Soluble en caliente	Muy soluble
Propilenglicol	Poco soluble	Soluble en caliente	soluble	Muy soluble	soluble
Polietilenglicol	Soluble en caliente	Soluble en caliente	soluble	Poco soluble	soluble
Glicerina	Soluble en caliente	Insoluble	Poco soluble	Poco soluble	Soluble en caliente

FORMULACIÓN DE MICROEMULSIÓN DE GEL PLACEBO

En las Figura 3 se muestran los geles placebo con diferentes porcentajes de carbopol. Dependiendo de la concentración de carbopol presentan diferente consistencia, para el 1% su consistencia más suave, para el 2% de carbopol tiene menor consistencia que el gel con 3% de carbopol el cual tiene una consistencia firme. El color en estos tres geles placebo también es diferente, pues mientras que los geles con 1% y 2% de carbopol son blancos y de aspecto lechoso, el gel con 3% de carbopol es traslúcido e incoloro.

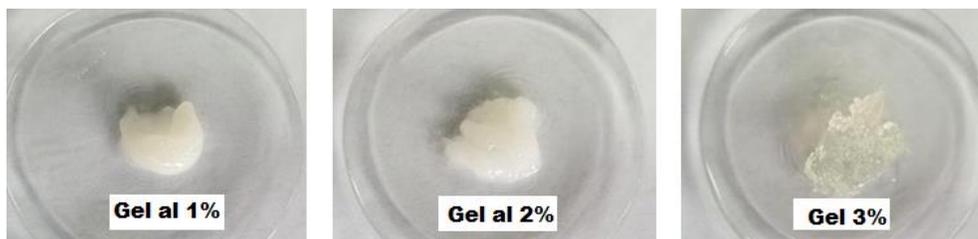


Figura 3. Aspecto de los diferentes placebos de las microemulsiones.

FORMULACIÓN DE MICROEMULSIÓN DE GEL CON PRINCIPIO ACTIVO



Figura 4. Aspecto de las diferentes combinaciones de formulaciones.

PRUEBAS ORGANOLÉPTICAS

Las muestras presentan de manera general color amarillo en diferentes tonalidades y una variación de transparencia en las formas farmacéuticas. La consistencia de todas ellas es firme y homogénea, pero que

sede al tacto. El olor que predomina en ella es el del aceite. El brillo también se mantiene constante. En cuanto a la sensación al tacto, se siente firme, pesado y menos húmedo. Otra propiedad evaluada, fue la evanescencia aparente; el gel con 2% de carbopol fue el que mejor evanescencia presentó, pues se absorbió muy bien y bastante rápido, dejando una sensación bastante agradable, mientras que el gel con 1% de carbopol no se absorbió del todo, y el gel con 3% de carbopol dejó una sensación pegajosa en la piel. Por último, se evaluó la viscosidad, es decir, la facilidad con la que se aplica la muestra. Nuevamente, el gel con 2% de carbopol presentó una mejor característica, pues es fácil de esparcir en las zonas deseadas, mientras que el gel con 1% de carbopol, al ser más líquido, se escurría un poco más, y por el otro lado, el gel con 3% de carbopol requería ligeramente más uso de fuerza para poder esparcirse.

CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 4. Resultados de cuantificación promedio					
	Rutina	Quercetina	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno
Longitud de onda (λ)	372	372	272	276	264
Absorbancia promedio	0.9420	0.2462	1.5712	2.5506	0.8944
Cantidad teórica	30 μg	5 μg	20 μg	25 μg	20 μg
Cantidad observada	36 μg	4.87 μg	227 μg	79 μg	18.04

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las microemulsiones formuladas resultantes cuentan con características organolépticas aceptables, tanto en la incorporación de principio activo como de sus características organolépticas, esto es debido al porcentaje de carbopol utilizado en las formulaciones.

Las pruebas de solubilidad nos permiten elegir los mejores disolventes, que sean compatibles con la microemulsión, los cuales variaron dependiendo de las diferentes combinaciones ensayadas. Ya que en los casos donde existe solubilidad en agua, los principios activos se agregan ahí, en el caso de los flavonoides la mejor opción es el Polietilenglicol.

La apariencia de las diferentes formulaciones va de la transparente a la opacidad en diferentes grados, esto debido a principalmente a falta de agitación durante el proceso de la microemulsión. Sin embargo, se considera que las microemulsiones resultantes cuentan con características aceptables, tanto de incorporación de principio activo como de sus características organolépticas. Ya que solo afecta el tamaño de las gotas de la emulsión que sería más grandes y generan dicha opacidad.

Las microemulsiones utilizan trietanolamina para activar la propiedad gelificante del carbopol, sin embargo, tiene una incompatibilidad con los flavonoides, por lo que para evitar que interactúen con ellos, se utiliza diferentes concentraciones de carbopol de 1-3%, lo que nos permite alcanzar una consistencia adecuada para la formulación, sin provocar interacciones con los flavonoides.

Los datos obtenidos de la cuantificación muestran que la metodología utilizada permite la correcta cuantificación para la rutina, quercetina e ibuprofeno, los cuales pueden ser cuantificados en una sola medición. Sin embargo, cuando se intenta con las combinaciones respectivas con naproxeno y diclofenaco, no responden, por lo que se intentó cuantificarlos por separado, pero tampoco, se logró una buena respuesta. Esto se explica por una posible interacción con los componentes de la formulación que pueden dar señal en la misma longitud de onda donde se intenta cuantificar estos productos, por lo que sería necesario modificar la metodología de cuantificación para eliminar dicha interferencia.

CONCLUSIÓN

Las formulaciones farmacéuticas, realizada con la combinación de rutina o quercetina, con los diferentes AINE's (naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno), muestra buena estabilidad y características organolépticas, así como una prometedora forma de cuantificación de los flavonoides e ibuprofeno, que debe ser ajustada y mejorada para el naproxeno y diclofenaco para que en un solo proceso se pueda determinar ambos productos, eliminando así la interferencia que se detectó en esta primera aproximación a la formulación.

PERSPECTIVA

El trabajo puede ser mejorado de una manera significativa al modificar el método de cuantificación de los principios activos de naproxeno y diclofenaco, debido a todas las interferencias que se detectaron, y con esto, poder pasar a las pruebas de estabilidad térmica y pruebas de liberación *in vitro* e *in vivo* para determinar su capacidad de pasar a través de la piel. Además, mejorar la técnica para la preparación de las formulaciones y con ello poder obtener un producto con mejores características organolépticas.

Bibliografía

1. Azeem, M., Hanif, M., Mahmood, K. et al. (2023). An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: a review. *Polym. Bull.* 80, 241–262. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04091-8>
2. Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>
3. Kleemann, R., Verschuren, L., Morrison, M., Zadelaar, S., van Erk, M. J., Wielinga, P. Y., & Kooistra, T. (2011). Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human *in vitro* and *in vivo* models. *Atherosclerosis*, 218(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.023>
4. Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintač, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, 40, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.047>
5. Kajbafvala, A., Salabat, A., & Salimi, A. (2016). Formulation, characterization, and *in vitro/ex vivo* evaluation of quercetin-loaded microemulsion for topical application. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1–10. <https://doi.org/10.1080/10837450.2016.1263995>
6. Karuppagounder, V., Arumugam, S., Thandavarayan, R. A., Sreedhar, R., Giridharan, V. V., & Watanabe, K. (2016). Molecular targets of quercetin with anti-inflammatory properties in atopic dermatitis. *Drug Discovery Today*, 21(4), 632–639. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.011>
7. Escamilla JCI, Cuevas MEY, Guevara FJ. (2009) Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 52(2):73-75.
8. González-Sánchez, Avel, Cabañas-Wuan, Ángel, Arana-Argáez, Víctor, Hernández-Núñez, Emanuel & Ortiz-Andrade, Rolffy. (2011). Citroflavonoides como posible alternativa en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(3),17-26. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S187001952011000300003&lng=es&tlng=es.
9. Estrada-Reyes R, Ubaldo-Suárez D, Araujo-Escalona AG. (2012) Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*.35(5):375-384.
10. Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Feijoo, G., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 220-235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.008>
11. Cardenas, P., Aragón, D., Ospina, L., Isaza, G., Pérez, J. (2012). Efecto de algunas especies vegetales antiinflamatorias sobre la actividad enzimática de elastasa y mieloperoxidasa. *Rev. Colom. Cienc. Quim. Farm.* Vol.41 no.2 Bogotá
12. Shuji Kitagawa and others. (2009) Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61(7): 855–860, <https://doi.org/10.1211/jpp.61.07.0003>
13. De Paula Rogerio, A., Sonvico, F., Andrade, E. L., Chaves, J. N., Silva, L. F., Lemos-Senna, E., & Calixto, J. B. (2010). Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacological Research*, 61(4), 288-297. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.10.005>
14. Guardia, T., Rotelli, A. E., Juárez, A. O., & Pelzer, L. E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *II Farmaco*, 56(9), 683–687. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01111-9](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01111-9)
15. Boots, A. W., Wilms, L. C., Swennen, E. L. R., Kleinjans, J. C. S., Bast, A., & Haenen, G. R. M. M. (2008). *In vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. *Nutrition*, 24(7-8), 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.03.023>
16. Pérez Ruiz, Andrés A., López Mantecón, Ana Marta, & Grau León, Ileana. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), 119-138. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200004&lng=es&tlng=es.
17. Jiménez Martínez, E., Gasco-García, C., Arrieta Blanco, J. J., Gómez del Torno, J., Bartolome Villar, B. (2003). Estudio de la eficacia analgésica del Dexketoprofeno Trometamol 25 mg vs. Ibuprofeno 600 mg. tras su administración oral en pacientes sometidos a una intervención quirúrgica oral. *Med oral*. (9):1-10.
18. Zapata-Morales, J. R., Alonso-Castro, A. J., Muñoz-Martínez, G. S., Martínez-Rodríguez, M. M., Nambos-Arcos, M. E., Brennan-Bourdon, L. M., Aragón-Martínez, O. H., Martínez-Morales, J. F. (2012). *In vitro* and *in vivo* synergistic interactions between the flavonoid rutin with paracetamol and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arch Med Res*. 2021, 52(6):611-619. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2021.03.007>
19. Zaffar, F. M., Singh, U., & Han, L. C. (2013). Review on microemulsion as futuristic drug delivery. *international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5(3), 39-52. https://www.ijppsjournal.com/Vol5Iss_ue3/69_37.pdf
20. De Paula Rogerio, A., Sonvico, F., Andrade, E. L., Chaves, J. N., Silva, L. F., Lemos-Senna, E., & Calixto, J. B. (2010). Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacological Research*, 61(4), 288-297. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.10.005>