

Evaluación de la liberación de polifenoles desde vehículos cosméticos

An evaluation of polyphenol release from cosmetic formulations

SÁNCHEZ V*¹, SANDOVAL C², FRANCO C¹

¹Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Av. Gran Bretaña 111, Playa Ancha, Valparaíso, Chile. Casilla 5001, virginia.sanchez@uv.cl

²Escuela de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile csandoval@unab.cl

RESUMEN

La uvaterapia es una de las propuestas para atenuar las evidencias estéticas provocadas por el envejecimiento extrínseco en la piel, la que se fundamenta en el tratamiento con productos formulados con extracto vegetal y aceite de pepitas de uva, *Vitis Vinífera L.*, ambos con propiedades antioxidantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la liberación de polifenoles presentes en el extracto y en el aceite de pepitas de uva incorporados en formulaciones cosméticas. La liberación de los ingredientes activos desde las formulaciones se evaluó utilizando celdas de difusión de Franz. Los polifenoles totales se cuantificaron mediante espectrofotometría visible por el método de Folin Denis. La liberación de polifenoles desde los vehículos formulados, gel y emulsión, se ajustó al modelo cinético de la raíz cuadrada del tiempo, siendo mayor la velocidad de liberación desde el gel.

PALABRAS CLAVES: Liberación. Polifenoles. Uvaterapia.

ABSTRACT

One of the proposed treatments for extrinsic skin aging processes is Grape therapy, whose active ingredients, known to possess antioxidant properties, are the vegetable and seed oil extracts from the Vitis Vinífera L. grape species. The objective of the present work was to evaluate the release of polyphenol compounds from these extracts, retained in gel and emulsion based cosmetic formulations, using Franz diffusion cells. A quantification of total active ingredient release was also carried out using the Folin Denis visible spectrophotometry method. Polyphenol release from both types of formulation was found to follow a square root of time kinetic model, but a higher rate of release was obtained from the gel formulation.

KEY WORDS: Release. Polyphenols. Grape therapy.

Fecha de recepción: 14-10-2008

Fecha aceptación: 30-01-2009

INTRODUCCIÓN

La piel, como otros órganos del cuerpo, sufre modificaciones con el paso del tiempo. El envejecimiento cutáneo está ligado a una transformación del tejido conjuntivo y una disminución de la capacidad de regeneración de la célula. Durante el envejecimiento el material genético es modificado y la proliferación celular disminuye. Consecuentemente, el tejido pierde su elasticidad y la capacidad de regular el in-

INTRODUCTION

Skin, like any other organ of the body, undergoes a process of change over time. Aging is associated with alterations of connective tissue and a gradual decrease in the regenerative capacity of cells. During the aging process, genetic material undergoes modification, while at the same time, the proliferation of new cells gradually decreases. As a consequence, skin tissue loses its elasticity and its capacity to regulate cellular

tercambio de agua y la replicación del tejido comienza a perder su eficiencia^{1,2}. Las oxidaciones químicas y enzimáticas involucran la formación de radicales libres que aceleran el fenómeno de envejecimiento. De hecho, se considera que los radicales libres son los compuestos más activos en el envejecimiento, dañan el ADN y ayudan a la deshidrogenación, hidroxilación y glicosilación de proteínas, causando una pérdida de funcionalidad de algunas proteínas de la piel, tales como colágeno y proteoglicanos. Esto da como resultado alteraciones de la estructura de la membrana y un incremento de la rigidez de la piel. El origen de los radicales libres, puede ser endógeno, asociado con reacciones metabólicas y exógeno, debido principalmente a la acción de la radiación solar sobre la piel^{1, 3,4}.

En la actualidad existen diversas alternativas para la protección y cuidado de la piel. La uvaterapia es un tratamiento cosmético basado en formulaciones que contienen como sustancia activa extracto vegetal de uva y aceite de pepitas de uva (*Vitis Vinífera L.*), ambos con propiedad de proteger la piel del estrés oxidativo y estimular el metabolismo celular^{5,6}.

Los extractos y aceites de *V. Vinífera L.*, son ricos en polifenoles, cuya estructura química les otorga propiedades antioxidantes. Los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, benceno con uno o más grupos hidroxilos y derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. La forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los flavonoides, son los polifenoles más distribuidos en las plantas, son sustancias de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilperanos: dos anillos benceno (anillo A y B) unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico (anillo C)⁷.

La figura 1 muestra la estructura química de los flavonoides.

water interchange. Tissue replication then becomes increasingly less efficient^{1,2} and chemical and enzyme oxidations bring about the formation of free radicals, which accelerate the aging phenomenon. In fact, free radicals are considered to be the most active compounds in the aging process, leading to DNA damage, which contributes to the dehydrogenation, hydroxylation and glycosylation of proteins. In turn, these processes lead to a loss in functionality of some skin proteins, such as collagen and proteoglycans. The result of this chain of events is the alteration of the membrane structure, and an increase in skin rigidity.

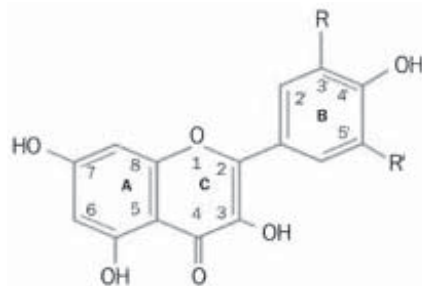
The origin of free radicals may be endogenous in association with exogenous and metabolic reactions, which are mainly attributed to exposure to solar radiation^{1, 3,4}.

There are numerous alternatives in modern day skin care and protection. However, the active ingredients obtained from the vegetable extract and seed oil from *Vitis Vinífera L. grapes* have been demonstrated to protect the skin from oxidative stress and to stimulate cellular metabolism^{5,6}.

These compounds are rich in polyphenols, whose chemical structure confer potent antioxidant properties. At a chemical level, phenolic compounds are substances which possess an aromatic ring, benzene with one or more hydroxyl groups and functional derivatives, such as esters, methyl esters, glycosides, etc.. The nature of the polyphenols varies from simple molecules, such as phenolic acids, to highly polymerised compounds, such as tannins. The most commonly encountered forms in nature are the glycosides, which are soluble in water and in organic solvents. The flavonoids, the most commonly found polyphenols in plants, are low molecular weight substances, sharing a common skeletal structure with the diphenyl pyrans: two benzene rings (rings A and B) bonded by a heterocyclic pyrone or pyran (ring C)⁷.

Figure 1 provides a graphic description of the flavonoids.

FIGURA 1. Estructura química de los flavonoides.
FIGURE 1. The chemical structure of flavonoids.



Esta estructura básica permite una diversidad de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flaonas, flavononas, isoflavonoides, catequinas, chalconas, dihidrochalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas o flavandioli y proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables).

Los taninos son compuestos fenólicos con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 D. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales, siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras macromoléculas. Los taninos pueden clasificarse en dos grupos: taninos hidrolizables y no hidrolizables o taninos condensados^{8, 9}.

Dentro de los polifenoles presentes en *V. Vinífera L.*, los taninos condensados son antioxidantes, atrapadores de radicales libres e inhibidores de la peroxidación lipídica^{1, 10, 11}.

La procianidina, perteneciente a la clasificación del tanino condensado, también puede ser utilizada como principio activo en productos cosméticos que protegen del daño inducido por radicales libres. La procianidina de pepita de uva, es un captador de especies de oxígeno reactivo (EOR) generadas por la radiación ultravioleta (UV), causante del daño celular y responsable del fotoenvejecimiento. Las EOR contribuyen al fotoenvejecimiento (en la dermis) y fotocarcinogénesis (generalmente en la epidermis), a través de dos procesos: modificación de la expresión genética y oxidación de los constituyentes genéticos⁶.

Los polifenoles tienen también numerosos beneficios sobre la salud humana y se han estudiado en otras plantas, como el té verde, que contiene una proporción relativamente alta de éstos, especialmente, catequinas y sus derivados. Estos compuestos tendrían efecto sobre las enfermedades cardiovasculares, incluyendo, reducción de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad¹².

This basic structure allows numerous substitutions and variations on the pyrone ring to take place, giving rise to flavonols, flavones, flavonones, isoflavonoids, catechins, chalcones, dihydrochalcones, anthocyanidins, leucoanthocyanidins or flavandioli and proanthocyanidins or condensed tannins (non-hydrolysable tannins).

Tannins are phenolic compounds with a molecular weight of between 500 and 3000 D. Among other functional groups, these compounds contain a high number of hydroxyl groups that are capable of binding to proteins and other macromolecules. Tannins can be classified into two groups: Hydrolysable tannins and non-hydrolysable or condensed tannins^{8, 9}.

Among the polyphenols present in *V. Vinífera L.*, the condensed tannins are antioxidants which have the capacity to trap free radicals and inhibit lipid peroxidation^{1, 10, 11}.

Procyanidin, classified within condensed tannin group, can be used as an active principle in cosmetic products designed to protect against free radical damage. Grape seed procyanidin captures the reactive oxygen species (ROS) generated by ultraviolet radiation (UV) that causes cellular damage and photo aging. The ROS contribute to photo aging (within the dermis) and photo carcinogenesis (generally within the epidermis) through two processes: firstly, by causing a modification in genetic expression and secondly, through the oxidation of genetic components⁶.

Polyphenols have been demonstrated to provide numerous benefits to human health. Studies have revealed their presence in other plants, such as green tea, which has a relatively high polyphenol content, especially in the case of catechin and its derivatives. These compounds are thought to have a beneficial effect on cardiovascular diseases, by reducing the oxidation of low density lipoproteins¹². In addition, (+)-catechin has been

Además, se ha descrito que la (+)-catequina inhibe *in vitro* la muerte de queratinocitos inducida por radiación UVB y H_2O_2 ¹³(Wu, 2006). También se estudia su acción inhibitoria de la iniciación, promoción y progresión de cáncer¹⁴⁻¹⁸.

Las catequinas tienen metabolismo hepático de primer paso y son pobremente absorbidas en el tracto gastrointestinal, por lo que un sistema transdérmico puede ser una alternativa para la liberación de catequinas¹⁹.

Los polifenoles se pueden cuantificar utilizando el método de Folin Denis, el que se basa en la reducción del ácido fosfotungstomolibdico por los grupos hidroxilos fenólicos, produciendo compuestos de coloración azul en medio alcalino. Este método no es específico y puede detectar todos los fenoles, ácidos fenólicos, flavonoides y taninos^{20, 21}.

Los principios activos para la piel son incorporados preferentemente en emulsiones, siendo este tipo de vehículo el más usado en cosméticos^{22, 23}. La liberación de principios activos desde emulsiones o de otro vehículo semisólido, puede evaluarse mediante el uso de sistemas de diálisis o celdas de difusión. La celda de difusión de Franz (Figura 2) es utilizada para la evaluación de la liberación de principios activos desde diversas formulaciones. Este sistema consta de un compartimiento dador, donde se pone la muestra; y de uno receptor, que contiene una solución receptora; ambos compartimientos se separan por una membrana semipermeable. La solución receptora es termorregulada por una camisa de agua de circulación, forzada y homogenizada mediante un agitador magnético. El dispositivo consta, además, de una salida para la toma de muestra y una entrada para reposición de volumen, conectado con el medio receptor²⁴⁻²⁶.

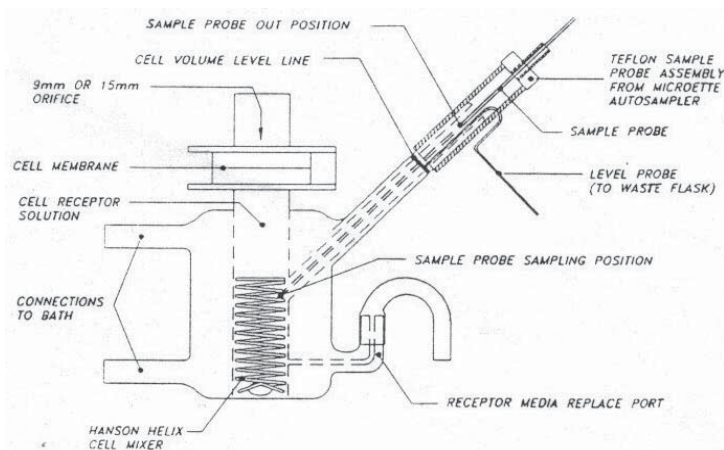
shown to inhibit keratinocyte death induced by UVB radiation and H_2O_2 ¹³(Wu, 2006). Similarly, other studies point to their inhibitory activity in the initiation, promotion and progression of cancer¹⁴⁻¹⁸.

Catechins have a first pass metabolism in the liver and are poorly absorbed in the gastrointestinal tract. A transdermic release system could therefore provide an interesting alternative administration method¹⁹.

The presence of polyphenols can be quantified using the Folin Denis method, based on the reduction of phosphotungstomolybdic acid by phenolic hydroxyl groups, which produce blue compounds in an alkaline medium. The method is not only polyphenol specific, but can also be used to detect phenoles, phenolic acids, flavonoids and tannins^{20, 21}.

In cosmetic preparations, the most commonly used method of active principles delivery is through emulsion type formulations^{22, 23}. The release of active principle from emulsions or other semisolid vehicles can be assessed through the use of dialysis systems or through diffusion cells. The Franz diffusion cell (Figure 2) is often used to evaluate active principle release from numerous formulations. The system is comprised of a donor chamber, into which a sample is placed, and a receiver chamber, which contains a receiver solution. Both chambers are separated by a semi-permeable membrane. The receiver solution is thermo regulated by a coil of circulating water, propelled and homogenized by a magnetic stirrer. The device also has an outlet for sample taking and an inlet for the replacement of volume, connected to the receiver medium²⁴⁻²⁶.

FIGURA 2. Celda de Difusión de Franz.
FIGURE 2. Franz diffusion cell.



El objetivo de este trabajo fue evaluar la liberación de los polifenoles desde vehículos dermatológicos. Si estos vehículos liberan los polifenoles de extracto de uva y aceite de pepita de uva incorporados como ingredientes activos de vehículos semisólidos, entonces se fundamenta su uso en productos cosméticos destinados a la prevención del envejecimiento extrínseco y cuidado de la piel.

The objective of this work was to evaluate the release of polyphenols from dermatological delivery vehicles. The effective release of active principle polyphenols, obtained from grape extract and grape seed oils, incorporated into semisolid vehicles would therefore validate their use in cosmetic products designed for the prevention of extrinsic aging and skin care.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALS AND METHODS

Las materias primas, reactivos y los ingredientes activos, aceite pepa de uva y extracto glicólico de uva, fueron donados por Laboratorios *Coesam* S. A., Chile.

The raw materials, reagents and the active ingredients; grape seed oil and grape glycolic extract, were donated by Laboratorios *Coesam* S. A., Chile.

Vehículos semisólidos

Semi-solid delivery vehicles

La liberación de polifenoles se evaluó desde una emulsión aceite/agua (O/A) en proporción 20/80 lo que le da una textura muy liviana, de rápida absorción sin sensación oleosa y un gel acuoso. La emulsión se formuló utilizando diversos componentes grasos, acuosos y emulgentes no iónicos, entre otros. En la fase oleosa se incorporaron los ingredientes activos lipofílicos, tales como aceite de pepa de uva y en la fase acuosa, los ingredientes activos acuosos, como el extracto glicólico de uva. El emulgente se agregó a la fase oleosa. Ambas fases se calentaron a 80° C., una vez alcanzada esta temperatura, se agregó la fase acuosa sobre la oleosa. Se agitó hasta alcanzar la temperatura ambiente.

The release of polyphenols was evaluated from an oil/aqueous type emulsion at a proportion of 20/80, with a light aqueous gel texture that is rapidly absorbed without producing an oily sensation. The emulsion was formulated using numerous oily, aqueous and non-ionic components, among others. The lipophilic active ingredients, such as grape seed oil were added during the oil phase, while aqueous active ingredients, such as grape glycolic extract, were added during the aqueous phase. The emulsifier was added during the oil phase. Both phases were heated separately to 80°C, at which temperature, the aqueous phase was added to the oil phase, and stirred until the mixture had dropped to room temperature.

El gel se formuló dispersando el carbómero en agua conservante con el extracto de uva, bajo agitación continua hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se dejó hidratar por 24 horas y se neutralizó con NaOH al 30%.

Caracterización de las formulaciones

- a) pH: mediante pHmetro OAKTON (USA) a temperatura ambiente.
- b) Viscosidad: se determinó a 25°C con un viscosímetro rotacional Brookfield modelo RVT (USA), con adaptador de pequeñas muestras, utilizando husillo 21 o 29 a una velocidad de giro de 20 rpm.
- c) Tipo de emulsión: mediante pruebas de dilución y de lavado.

Evaluación de la liberación

La evaluación de la liberación de los principios activos incorporados en los vehículos semisólidos se realizó en celdas de difusión de Franz (Hanson Research Co.,USA), con un área de difusión de 1,77 cm² y un volumen del compartimiento receptor de 7,5 mL. El sistema se mantuvo a 37° C mediante un baño termorregulador de circulación forzada (Heildolph), como membrana semipermeable se utilizó una membrana de acetato de celulosa (Spectrum, tamaño N° 36, radio de poro 24 Å, cut-off 12000-14000 PM). En el compartimiento dador ubicó una cantidad previamente pesada de cada formulación en estudio, correspondiendo esta cantidad a 6,8 ± 0,06g de emulsión y 7,0 ± 0,2g de gel. El compartimiento receptor contenía agua desgasificada y se mantuvo bajo agitación constante. Se tomaron muestras de 1mL desde el compartimiento receptor a intervalos regulares con reposición de volumen. Las muestras fueron refrigeradas hasta su análisis.

Cuantificación de polifenoles totales

Los polifenoles totales se cuantifican utilizando el método de Folin Denis, por la reacción de los compuestos fenólicos con el ácido fosfotungstomolibdico (reactivo de Folin Denis), la que produce un complejo de color azul, en medio alcalino. 1 mL de muestra se mezcló con 1 mL

The gel was formulated by dispersing the carbomer in water with the grape extract, under continual stirring until a homogeneous mixture was obtained. The mixture was left to hydrate for 24 hours and was subsequently neutralised with 30% NaOH.

Formulation characterisation

- a) pH was determined using a OAKTON pH meter at room temperature
- b) Viscosity: was determined at 25°C with a Brookfield rotational viscometer (model RVT), USA, with a small sample adaptor, using a 21 or 29 spindle, at a rotational speed of 20 rpm.
- c) Emulsion type: was determined through dilution and washing.

Evaluation of active principle release

The evaluation of active principle release from the semi-solid vehicles was carried out in Franz diffusion cells (Hanson Research Co.,USA), with a diffusion area of 1.77cm² and a receiver chamber volume of 7.5mL. The temperature of the system was maintained at 37°C thermo regulated bath with propelled circulation (Heildolph). A cellulose acetate membrane was used as a semi-permeable membrane (Spectrum, size no.36, pore radius 24 Å, and cut-off 12000-14000 PM). A previously weighed quantity of test formulation was added to the donor chamber; comprising of 6.8 ± 0.06g of emulsion and 7.0 ± 0.2g of gel. The receptor chamber contained degassed water, maintained under constant stirring. Samples of 1mL were taken from the receiver chamber at regular intervals with a corresponding replacement of volume. The samples were then refrigerated until analysis.

Quantification of total polyphenols

Total polyphenol content was quantified using the Folin Denis method, in which the reaction of phenolic compounds with phosphotungstate molybdic acid (Folin Denis reagent) produces a blue compound in an alkaline medium. 1 mL of sample was mixed with Folin Denis reagent,

de reactivo de Folin Denis, se aforó a 5 mL con carbonato de sodio al 10%. Se dejó reaccionar por 20 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm. En el sobrenadante se cuantificaron los polifenoles totales mediante espectrofotometría a 750 nm, utilizando como patrón ácido tánico^{20, 27}. El reactivo Folin Denis se preparó adicionando 50 g de tungstato de sodio, 12 g de ácido fosfomolibdico y 25 mL de ácido fosfórico a 350 mL de agua destilada. Se puso la mezcla bajo condensador de reflujo por 2 horas, una vez frío, se diluyó con agua a 500 mL y se mezcló. Se refrigeró en envase ámbar²⁸.

Análisis estadístico

Los resultados de las cinéticas de liberación se presentan como promedio de la cantidad liberada \pm error estándar de la media. Los datos se sometieron a la prueba de t de Student, con un nivel de significancia de 0,05²⁹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formulación de los vehículos

La liberación de polifenoles se evaluó desde dos tipos de vehículo: un gel acuoso y una emulsión O/A. Los vehículos contenían extracto de uva (2-10%*m/m*) y aceite de pepa de uva (0,5%*m/m*). El gel se elaboró con un 0,3% de carbómero (Carbopol 940) que fue dispersado en agua conservante, extracto de uva y propilenglicol. La emulsión se formuló utilizando emulgentes no iónicos: alcohol cetearílico/Ceteareth-20 y estearato de glicerilo/estearato PEG 100. La fase oleosa de la emulsión contenía materias grasas de uso cosmético, que dan emoliencia y actúan como factor de consistencia, tales como ácido esteárico, alcohol cetílico, aceite mineral, alcohol lanolina acetilada o miristato de isopropilo y el aceite de pepa de uva. La fase acuosa contenía los preservantes antimicrobianos (parabens), glicerina como humectante, extracto de uva y agua. El contenido de ingredientes activos en las formulaciones seleccionadas para el estudio de liberación de muestra en la tabla 1.

assessed with 5 mL of sodium carbonate at 10%. The mixture was left to react for 20 minutes and then centrifuged for 10 minutes at 1000 rpm. Spectrophotometry at 750 nm was used to quantify total polyphenol content in the supernatant, with tannic acid as standard^{20, 27}. The Folin Denis reagent was prepared by adding 50 gr. of sodium tungstate, 12 gr. of phosphomolybdic acid and 25 mL of phosphoric acid to 350 mL of distilled water. The mixture was placed under a reflux condenser for 2 hours, which after cooling, was diluted in 500 mL of water and mixed. This mixture was then refrigerated in an amber glass bottle²⁸.

Statistical analysis

The kinetic release results are presented as an average of released quantity \pm standard error of the average. The Student T test was applied to the collected data, with a level of significance of 0.05²⁹.

RESULTS AND DISCUSSION

The formulation of delivery vehicles

Polyphenol release was assessed from two types of vehicles: an aqueous gel and aqueous/oil emulsion. Both vehicles contained grape extract (2-10%*m/m*) and grape seed oil (0.5%*m/m*). The gel was prepared with 0.3% of carbomer (Carbopol 940), dispersed in water, grape extract and propylene glycol. The emulsion was formulated using non-ionic emulsifiers: Cetyl-stearyl/ceteareth-20 alcohol and glyceryl stearate/PEG 100 stearate. The oil phase of the emulsion contained fatty material, added to provide emollience and consistency for cosmetic use, such as stearic acid, cetylic alcohol, mineral oil, acetylated lanolin alcohol or isopropyl myristate and grape seed oil. The aqueous phase contained antimicrobial preservatives (parabens), glycerine as moisturizer, grape extract and water. Table 1 shows the active ingredient components used in the release study.

TABLA 1. Contenido de ingredientes activos (%m/m) en los vehículos.
TABLE 1. Active ingredient content (% m/m) of delivery vehicle.

Ingrediente activo <i>Active ingredient</i>	Composición (% m/m) <i>Composition (% m/m)</i>	
	Emulsión O/A <i>Emulsion O/A</i>	Gel <i>Gel</i>
Extracto glicólico de uva <i>Glycolic grape extract</i>	2,0	10,0
Aceite de pepa de uva <i>Grape seed oil</i>	0,5	-

Caracterización de las formulaciones

La tabla 2 muestra las características de las formulaciones estudiadas. La emulsión es de tipo O/A, pues no permite dilución a mezclarla con agua ni se puede lavar completamente de la mano al aplicar un chorro de agua.

Formulation characterisation

Table 2 shows the formulation characteristics studied. The emulsion was a oil/aqueous type emulsion that could not be mixed with water and could not be removed from the hand under a running tap.

TABLA 2. Parámetros fisicoquímicos de los vehículos semisólidos.
TABLE 2. Physico-chemical parameter of the semisolid delivery vehicles.

Parámetros <i>Parameters</i>	Formulación <i>Formulation</i>	
	Emulsión O/A <i>Emulsion O/A</i>	Gel <i>Gel</i>
PH <i>pH</i>	5,24	5,43
Viscosidad (mPa s) <i>Viscosity</i>	10.750 ^a	750 ^b
Tipo de emulsión <i>Emulsion type</i>	O/A	-

^a husillo 29, 20 rpm

^b husillo 21, 20 rpm

^a Spindle 29. 20 rpm

^a Spindle 21. 20 rpm

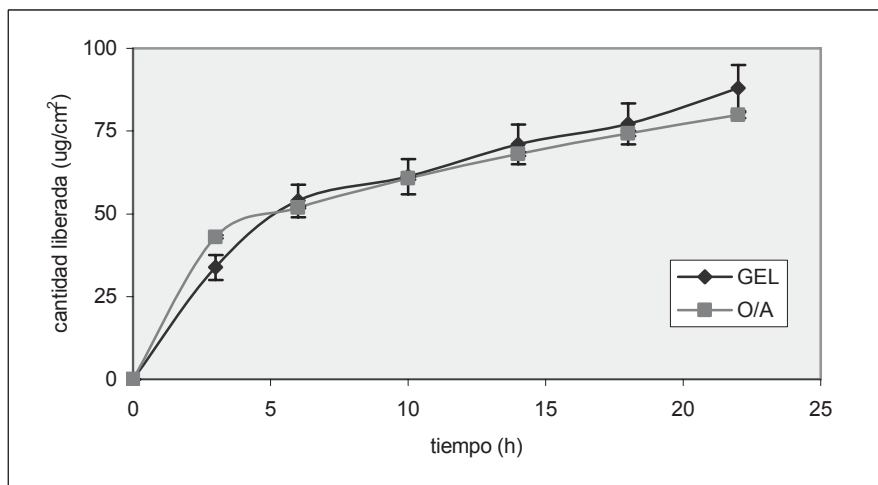
Evaluación de la liberación de polifenoles desde las formulaciones

Los dos tipos de vehículos formulados liberaron los compuestos polifenólicos contenidos en el extracto de uva y en el aceite de pepa de uva. El perfil de liberación de polifenoles desde las formulaciones estudiadas se muestra en la figura 3. Cada punto representa el promedio \pm error estándar (n=4).

Evaluation of polyphenol release from the formulations

Both vehicle types were capable of releasing the polyphenolic compounds contained in the grape extract and grape seed oil. Figure 3 provides a polyphenol release profile for each sample, with each point representing its average \pm standard error (n=4).

FIGURA 3. Perfil de liberación de polifenoles desde dos vehículos.
FIGURE 3. The polyphenol release profiles from two delivery vehicles.



La liberación de principios activos desde formulaciones semisólidas generalmente se ajusta a los modelos cinéticos de orden cero o de raíz del tiempo³⁰⁻³³. Para determinar el orden cinético de la liberación de polifenoles desde los vehículos estudiados, se calcularon los coeficientes de correlación (r) ajustando los perfiles de liberación a los modelos de orden cero (Q vs t) y orden raíz del tiempo (Q vs t^{1/2}), los que se presentan en la tabla 3.

Active principle release from semi-solid formulations generally fit a zero order or square root of time kinetic model³⁰⁻³³. The kinetic order of polyphenol release was determined by calculating the correlation coefficients (r), adjusting the release profiles to zero (Q vs. t) and square root of time (Q vs. t^{1/2}) models, the values of which are shown in Table 3.

TABLA 3. Coeficientes de correlación según modelo cinético (n=4).
TABLE 3. Correlation coefficients in accordance with kinetic model (n=4).

Formulación <i>Formulation</i>	Orden cero <i>Zero order</i>	Orden raíz del tiempo <i>Root of time order</i>
Gel <i>Gel</i>	0,9736	0,9893
Emulsión O/A <i>Emulsion O/A</i>	0,9506	0,9962

En la tabla 3 se observa que la liberación de polifenoles desde los vehículos se ajusta al modelo cinético de la raíz del tiempo (Q vs t^{1/2}) (modelo cinético de Higuchi), ya que los coeficientes de correlación son mayores al de cinética de orden cero. La cinética de liberación también puede determinarse aplicando la ecuación de Peppas:

$$M_t/M_{\infty} = K_p t^n$$

Donde M_t es la cantidad de principio activo liberado a tiempo t, M_∞ es la cantidad de principio activo liberada a tiempo infinito, k_p es la cons-

Table 3 shows that polyphenol release from both delivery vehicles fit a square root of time kinetic model (Q vs. t^{1/2}) (Higuchi kinetic model, given that the correlation coefficients are greater than the zero order kinetic. Release kinetics can also be determined by applying the Peppas equation:

$$M_t/M_{\infty} = K_p t^n$$

where M_t is the quantity of released active principle at time t, M_∞ is the quantity of released active principle at infinite time, k_p is the propor-

tante de proporcionalidad y n es el exponente de liberación. En esta ecuación la fracción liberada está relacionada exponencialmente con el tiempo y el exponente n es indicativo del orden cinético de liberación. Cuando n es igual o se aproxima a 0,5 la liberación depende de la raíz cuadrada del tiempo. Si el exponente n tiene un valor igual o cercano a uno, la cinética de liberación es de orden cero³⁴⁻³⁶. El exponente de liberación se obtiene de la pendiente de la recta de $\log (M_t/M_{\infty})$ en función del $\log t$. La tabla 4 muestra los valores de n y los coeficientes de correlación obtenidos con las formulaciones en estudio.

tionality constant and n is the release exponent. The fraction of active principle released is exponentially related to time and the exponent n is indicative of the kinetic order of release. When n is equal or close to 0.5, active principle release will be dependant on the square of root time. If the exponent n has a value equal or close to one, the release kinetic is a zero order³⁴⁻³⁶. The release exponent is obtained from the slope of the log straight line (M_t/M_{∞}) on the basis of $\log t$. Table 4 shows the values of n and the correlation coefficients obtained from the formulations under study.

TABLA 4. Exponente de liberación (n) y coeficiente de correlación (r).
TABLE 4. Release exponent (n) and correlation coefficient (r).

Formulación <i>Formulation</i>	N <i>N</i>	r <i>r</i>
Gel <i>Gel</i>	0,47±0,03	0,974
Emulsión O/A <i>Emulsion O/A</i>	0,37±0,08	0,970

(n=4)

Los valores de n son cercanos a 0,5; por lo que se corrobora que la liberación de polifenoles desde los tres vehículos se ajusta al modelo cinético de Higuchi.

La tabla 5 muestra las constantes de velocidad de liberación de polifenoles desde las formulaciones en estudio.

The n values were found to be close to 0.5, demonstrating the fact that the polyphenol release from the three vehicles fit a Higuchi kinetic model.

Table 5 shows the velocity constants of polyphenol release from the three formulations.

TABLA 5. Constantes de velocidad de liberación de polifenoles ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}^{1/2}$) desde dos vehículos.
TABLE 5. Polyphenol release velocity constants ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}^{1/2}$) from the delivery vehicles.

Formulación <i>Formulation</i>	k ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}^{1/2}$) <i>k</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}^{1/2}$)
Gel <i>Gel</i>	16,94 ± 0,09 *
Emulsión O/A <i>Emulsion O/A</i>	12,44 ± 0,39 *
Cada valor representa el promedio ± DS (n=4) * Diferencia significativa (p<0,05) <i>Each value represents the means ± SD (n=4)</i> * <i>Significant difference (p<0.05)</i>	

Las constantes de velocidad de liberación obtenidas fueron sometidas a la prueba t de Student, con un nivel de significancia del 5%. Existen diferencias significativas entre la velocidad de liberación de polifenoles desde las dos formulaciones. El gel acuoso libera los polifenoles a una velocidad mayor que la emulsión. A medida que se aumenta el contenido lipofílico en las formulaciones el coeficiente de difusión disminuye. Esto puede ser debido a que los compuestos polifenólicos tendrían una mayor afinidad por los componentes lipídicos del vehículo, quedando retenidos en la formulación más oleosa. Para mejorar la solubilidad de las sustancias activas en la fase receptora y aumentar su coeficiente de difusión, podría incorporarse al medio receptor surfactantes o alcoholes³⁷.

CONCLUSIÓN

Los vehículos formulados con extracto de uva y/o aceite de pepa de uva liberan polifenoles, componentes con actividad antioxidante, por lo que se fundamenta su uso en productos cosméticos destinados a la prevención del envejecimiento extrínseco y cuidado de la piel.

Los estudios de liberación de principios activos cosméticos pueden ser una herramienta de utilidad para la evaluación de la efectividad cosmética de los productos destinados al cuidado y protección de la piel.

The student t test, with a significance level of 5%, was applied to the release velocity constants obtained. Significant differences were found in the release velocity from the formulations tested. The aqueous gel released polyphenols at a greater rate than the emulsion. Formulations with higher lipophilic content were found to have a lower diffusion coefficient. This could perhaps be attributable to the fact that the polyphenolic compounds have a greater affinity to the lipidic components of the delivery vehicle and are consequently more readily retained in more oily formulations. Surfactants or alcohols could be added to the medium to improve the solubility of the active substances on introduction into the delivery medium, thus increasing their diffusion coefficient³⁷.

CONCLUSIONS

The delivery vehicles formulated with grape extract and/or grape seed oil release polyphenols with active antioxidant components, validating their use in cosmetic products designed for the prevention of extrinsic skin aging and skin care in general.

The active principle release studies are a useful tool for the evaluation of the effectiveness of cosmetic products.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Jay, V., Berthon, J., Hagege, D., Pouget, M-P Lejeune, B., Pourrat, H *Cosm. & Toil.* 1998; 113: 71-77
2. Bazar, K., Doux, J., Yun, A. *Med. Hypotheses* 2006 ; 67:1274-1276
3. Chauduri, R., Hwang, C., Puccetti, G. *Cosm. & Toil.* 2004; 119:59-70.
4. Tomaino, A., Cristani, M., Cimino, F., Speciale, A., Trombetta, D., Bonina, F., Saija, A. *Toxicol. in Vitro* 2006;20:1395-1402
5. Metcalfe, L. *Cosm. & Toil.* 2000; 115: 8-9
6. Sandoval, C. *GCI Latinoamericana* 2004; 3: 32-34
7. Havsteen, B. *Pharmacol. & Ther.* 2002; 96: 67-202
8. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. *Free Radic. Biol. & Med.* 1996; 20:933-956
9. Martínez, I., Periago, M., Ros, G. *Arch. Latinoam. Nut.* 2000; 50: 5-18
10. Bombardelli, E., Morazzoni, P. *Biofactors* 1997; 6: 429-431.
11. Rodrigo, R., Castillo, R., Carrasco, R., Huerta, P. Moreno, M. *Life Sci.* 2005;76: 889-900
12. Miller, A. *Altern. Med. Rev.* 1996; 1:103-111
13. Wu, W-B., Chiang, H., Fang, J., Chen, S-K, Huang, C. *Life Sci.* 2006; 79:801-807
14. Eckert, R., Crish, J., Efimova, T., Balasubramanian, S. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68:1125-1131
15. Stoclet, J., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M., El Bedoui, J., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 500: 299-313
16. Hafeez B., Ahmed S., Wang N., Gupta, S., Zhang, A., Haqqi, T. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006; 216:11-19
17. Li, T., Fan, G., Wang, Li T., Yuan, Y. *Int. Immunopharmacol.* 2007; 7: 1221-1231
18. Ranaldi, G., Mancini, E., Ferruzza, S., Sambuy, Y., Perozzi, G. *Toxicol. in Vitro* 2007; 21: 204-210

19. Batchelder, R., Calder, R., Thomas, C., Heard, C., Int. J. Pharm. 2004; 283: 45-51.
20. Muñoz, M., Mariné, A. Anal. Bromatol. 1978; XXX-2: 107-122
21. Ferreira, E., Nogueira, A., Souza, G., Batista, L. Food Chem. 2004; 86: 17-23.
22. Schueller, R., Romanowski, P. Cosm. & Toil. 1998; 113: 39-44.
23. Erős, I., Kónya, M., Csóka, I. Int. J. Pharm. 2003; 256:75-84.
24. Delgado, M.I., Cucala, J., Obach, R. Drug Dev. Ind. Pharm. 1994; 20: 2267-2283
25. Sánchez, V., Carreño, P., Castelletto, M. Acta Farm. Bonaerense 2001; 20:101-4.
26. Leveque, N., Makki, S., Hadgraft, J., Humbert, Ph. Int. J. Pharm. 2004; 269: 323-328.
27. Helrich, K. Ed. Official Methods of Analysis, A.O.C. 15 th ed., Association of Official Analytical Chemist, INC, 1990
28. USP 26. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. United States Pharmacopeial Convention, INC. 2003.
29. Montgomery, D.; Runger, G. Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. Ed. McGraw-Hill, México. 1996
30. Parks, J., Cleek, R., Bunge, A. J. Pharm. Sci. 1997; 86: 187-192.
31. Gallagher, S. Trotter, L. Heard, C. Int. J. Pharm. 2003; 268: 37-45.
32. Özsoy, Y., Güngör, S., Cevher, E. Il Farmaco 2004; 59: 563-566.
33. Gebre-Mariam, T., Asres, K., Getie, M., Endale, A., Neubert, R., Schmidt, P. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2005; 60:31-38.
34. Peppas, N., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2000; 50: 27-46.
35. Siepmann, J., Peppas, N. A. Adv. Drug Deliv. Rev. 2001; 48:139-157.
36. Dokometzidis, A., Macheras, P. (226) Int. J. Pharm. 321(1-2): 1-11.
37. Siewert, M., Dressman, J., Brown, C., Shah, V. FIP/AAPS Guidelines to dissolution/ in vitro release testing of novel/ special dosage forms. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2003.