



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas
Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica

**ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE MORINA EN
NANOPARTÍCULAS, EVALUACIÓN DEL MEDIO DE
DISPERSIÓN Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

FRANCISCO JAVIER ARRIAGADA SOTO

Patrocinante y Director

Dr. Javier E. Morales Valenzuela
Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéuticas

Director

Dr. Germán R. Günther Sapunar
Departamento de Química
Orgánica y Físicoquímica

Santiago de Chile

2015

Tabla de contenido

I. ÍNDICE DE FIGURAS	iv
II. ÍNDICE DE TABLAS	vi
III. RESUMEN	vii
IV. SUMMARY	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. RADICALES LIBRES, ROS Y ANTIOXIDANTES	2
1.2. MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	3
1.3. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE COMO PLATAFORMA PARA EL TRANSPORTE DE ACTIVOS	4
1.4. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE EN SISTEMAS DE ENTREGA DE ACTIVOS	5
2. DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA	6
3. HIPÓTESIS	7
4. OBJETIVO GENERAL	8
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
6. PLAN DE TRABAJO	9
7. MATERIALES	10
7.1. REACTIVOS	10
1.1. SOLVENTES	10
8. INSTRUMENTACIÓN	11
8.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA	11
8.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	11
8.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA	11
8.4. VISCOSÍMETRO	11
8.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	11
8.6. RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA	12
9. METODOLOGÍA	13
9.1. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO	13
9.2. ADSORCIÓN Y EVALUACIÓN DE MORINA EN NANOPARTÍCULAS	13
9.3. AJUSTE A UN MODELO DE ISOTERMA DE ADSORCIÓN	14
9.4. CINÉTICA DE ADSORCIÓN	14

9.5.	EXPERIMENTOS TERMODINÁMICOS.....	14
9.6.	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON Y SIN MORINA ADSORBIDA.....	14
9.7.	EVALUACIÓN DEL MEDIO DE DISPERSIÓN	15
9.7.1.	ESTABILIDAD DEL SISTEMA NANOPARTÍCULA – GEL	15
9.7.2.	ESTABILIDAD DEL SISTEMA MORINA-NANOPARTÍCULA-GEL.....	16
9.7.3.	EVALUACIÓN DE LA CESIÓN DE MORINA ADSORBIDA DESDE LAS NANOPARTÍCULAS	16
9.8.	EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	16
9.8.1.	ENSAYO DE REACTIVIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON MORINA ADSORBIDA, FRENTE AL RADICAL HIDROXILO, MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE <i>SPIN-TRAPPING</i>	16
10.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
10.1.	OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS DE SÍLICE MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE.....	18
10.2.	ADSORCIÓN DE MORINA EN NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE.....	19
10.3.	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	23
10.3.1.	TAMAÑO, DISTRIBUCIÓN, POTENCIAL SUPERFICIAL Y MORFOLOGÍA.	23
10.3.2.	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	24
10.4.	CINÉTICA DE ADSORCIÓN.....	27
10.5.	ISOTERMA DE ADSORCIÓN	30
10.6.	EXPERIMENTOS TERMODINÁMICOS.....	34
10.7.	EVALUACIÓN DEL MEDIO DE DISPERSIÓN	37
10.7.1.	ESTABILIDAD DEL SISTEMA NANOPARTÍCULA – GEL	37
10.7.2.	CESIÓN DE MORINA ADSORBIDA DESDE LAS NANOPARTÍCULAS	38
10.8.	EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	40
10.8.1.	ENSAYO DE REACTIVIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON MORINA ADSORBIDA, FRENTE AL RADICAL HIDROXILO MEDIANTE LA METODOLOGÍA <i>SPIN-TRAPPING</i>	40
11.	CONCLUSIONES.....	44
12.	BIBLIOGRAFÍA	45

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de un flavonoide	1
Figura 2. Estructura química de la morina.	7
Figura 3. Esquema de la formación de nanopartículas mesoporosas de sílice modificadas superficialmente con grupos amino.....	18
Figura 4. Estructura de otros polifenoles estudiados en la adsorción sobre nanopartículas de sílice.....	19
Figura 5. Morina adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas.	20
Figura 6. Eficiencia de adsorción sobre la superficie de las nanopartículas a diferente cantidad inicial de morina.....	21
Figura 7. A) (I) Estructura del flavonoide morina, (II) Probable estructura de la formación de un dímero de morina. B) Estructura más probable de la formación de dímero de genisteína. (I) Vista perpendicular al plano de anillo de la flavona (II) Vista plana a lo largo del eje (III) vista desde una dirección intermedia.....	22
Figura 8. Imagen SEM de nanopartículas con morina adsorbida.....	24
Figura 9. Espectro FTIR. (a) nanopartículas modificadas con APTES (NP-NH ₂); (b) nanopartículas modificadas con APTES con morina adsorbida (NP-MOR); (c) morina (MOR).	26
Figura 10. Posible interacción superficial y potencial modo de enlace químico entre la superficie de las nanopartículas de SiO ₂ y APTES.	27
Figura 11. Efecto del tiempo de contacto en la adsorción de morina sobre las nanopartículas de sílice.	28

Figura 12. Ajuste lineal para las ecuaciones de pseudo-primer orden (A) y pseudo-segundo orden (B).....	29
Figura 13. Ajuste lineal de los datos experimentales usando el modelo de isoterma de Langmuir (A), Freundlich (B) y Temkin (C) a 25 °C.	31
Figura 14. Gráfico de van` t Hoff.	36
Figura 15. Viscosidad relativa del gel HEC al 1% con nanopartículas de sílice incorporadas.. ..	38
Figura 16. Efecto del cloruro de benzalconio sobre la remoción de morina adsorbida.	39
Figura 17. Espectro EPR de (A) Control; (B) morina; (C) Nanopartículas; (D) morina adsorbida sobre nanopartículas.....	42
Figura 18. Gráfico de barras con las intensidades absolutas del control, nanopartículas (NP), solución de morina en glicerina al 10%, morina adsorbida en NP a dos concentraciones ..	43

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la velocidad de adsorción de la morina sobre las nanopartículas de sílice.....	30
Tabla 2. Parámetros de las formas lineales de los modelos de isoterma estudiados.	34
Tabla 3. Parámetros de la isoterma de adsorción de Langmuir a 288 K, 298 K, 308 K y 318 K.	35
Tabla 4. Parámetros termodinámicos ΔH° , ΔS° y ΔG° para la adsorción de morina sobre las nanopartículas de sílice a 288, 298, 308 y 318 K.	37
Tabla 5. Efecto de diversos constituyentes, típicos en emulsiones de uso farmacéutico y cosmético, sobre la adsorción de FLAV.....	40
Tabla 6. Porcentaje de disminución de la intensidad de la señal con respecto al control. ..	43

III. RESUMEN

Los flavonoides son compuestos polifenólicos, que han destacado por sus propiedades antioxidantes. El uso de estos compuestos en formulaciones tópicas, se ha visto limitado por su inestabilidad y escasa solubilidad en agua. Las nanopartículas han sido ampliamente utilizadas para incorporar, estabilizar y controlar la entrega de diferentes activos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la adsorción de morina en nanopartículas de sílice modificadas superficialmente con grupo amino y el efecto del medio de dispersión sobre la estabilidad del sistema nanopartícula-morina (NP-MOR), además de evaluar la capacidad antioxidante de este sistema frente al radical hidroxilo.

Para realizar lo anterior, se sintetizaron nanopartículas mesoporosas de sílice superficialmente modificadas con grupo amino. Mediante experimentos tipo *Batch*, se obtuvieron nanopartículas con morina adsorbida, las cuales fueron caracterizadas midiendo el tamaño, distribución, potencial zeta y utilizando espectroscopía infrarroja y microscopía electrónica de barrido. La adsorción se estudió mediante modelos de isoterma, modelos cinéticos y parámetros termodinámicos. El efecto del medio de dispersión sobre la estabilidad de la morina adsorbida en las nanopartículas, se evaluó dejando las NP-MOR en contacto con diversos componentes comúnmente utilizados en formulaciones farmacéuticas y/o cosméticas. Para evaluar la capacidad antioxidante de las NP-MOR, se utilizó la metodología de *spin-trapping*, asociada a Resonancia Paramagnética Electrónica.

Los resultados mostraron que la adsorción de morina sobre las nanopartículas fue de 11 mg g⁻¹. Los datos experimentales se ajustaron de buena forma tanto a los modelos de isoterma de Langmuir y de Freundlich, como al modelo cinético de pseudo-segundo orden; además los parámetros termodinámicos sugieren que la adsorción fue espontánea y controlada principalmente por un proceso de quimisorción. El sistema NP-MOR fue estable en los medios de dispersión estudiados, con excepción de aquellos que contenían carbomer. El estudio preliminar de la capacidad antioxidante frente al radical hidroxilo reveló que la capacidad de *scavenging* de la morina en solución, fue aumentada en un 57% cuando se encuentra adsorbida sobre las nanopartículas.

IV. SUMMARY

STUDY OF THE ADSORPTION OF MORIN ONTO NANOPARTICLES, EVALUATION OF DISPERSION MEDIA AND ANTIOXIDANT CAPACITY

Flavonoids are polyphenolic compounds, which have remarkable antioxidant properties. The usefulness of these compounds in topical formulations has been limited because of its instability and poor water solubility. Nanoparticles have been widely used to incorporate, stabilize and control the delivery of different drugs.

The aim of this work was to study the adsorption of morin onto the surface of silica nanoparticles modified with amino group and the effect of the dispersion media on the stability of nanoparticle-morin system (NP-MOR), besides of evaluating the antioxidant capacity of this system against the hydroxyl radical.

For this purpose, modified-mesoporous silica nanoparticles with amino group were synthesized. By batch experiments mode, morin adsorbed onto nanoparticles was obtained, which were characterized by measuring size, distribution, zeta potential and using infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. Adsorption was studied by isotherm models, kinetic models and thermodynamic parameters. The effect of the dispersion medium on the stability of the morin adsorbed onto nanoparticles was evaluated keeping in contact the morin with various components commonly used in pharmaceutical and/or cosmetic formulations. To evaluate the antioxidant capacity of NP-MOR, spin-trapping methodology was used, associated with Electron Paramagnetic Resonance.

The obtained results displayed that the adsorption of morin onto the surface of the nanoparticles was 11 mg g^{-1} . The experimental data were well fit to both the Langmuir and Freundlich isotherm models and pseudo-second order kinetic models; moreover, the thermodynamic parameters suggest that the adsorption was spontaneous and controlled primarily for a chemisorption process. NP-MOR system was stable in all dispersion media studied, except those ones that contain carbomer. The preliminary study of the antioxidant capacity against the hydroxyl radical, showed that the scavenging capacity of morin in solution was increased by 57% when is adsorbed onto nanoparticles.

1. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de origen natural, ampliamente distribuidos en el reino vegetal,^[1-3] encontrándose predominantemente en frutas cítricas, hierbas, hojas de té, legumbres, frutas y vegetales.^[1, 3, 4] Se han identificado más de 4.000 de estos compuestos, los cuales son clasificados de acuerdo a su estructura química en flavonoles, flavonas, antocianinas, flavanonas, flavanos e isoflavonas, entre otros.

El organismo humano no es capaz de sintetizarlos, por lo que deben ser consumidos en la dieta (frutas y vegetales).^[4-7] La estructura básica de estos compuestos deriva del anillo benzo- γ -pirano, más específicamente, corresponde a un esqueleto hidrocarbonado del tipo C₆-C₃-C₆ (difencilpirano), compuesto de dos anillos bencénicos (A y B) ligados a través de un anillo pirano (C)^[3, 6, 8] (Figura 1).

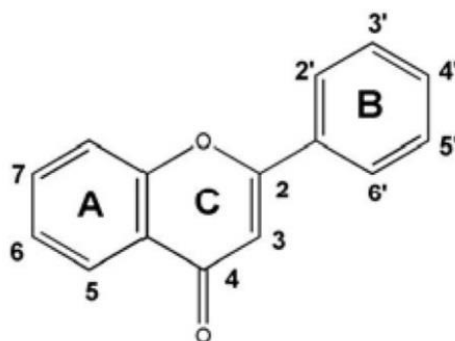


Figura 1. Estructura básica de un flavonoide

En la naturaleza, estos compuestos se pueden encontrar en forma de agliconas (estructura libre), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros, pero principalmente como glicósidos.

En las plantas, compuestos polifenólicos como morina, quercetina, y otros, actúan como enzimas inhibidoras, proporcionan color, textura y también son agentes con actividad reductora, actividad antifúngica y bactericida.^[3, 9]

En humanos, han demostrado tener efectos benéficos para la salud, siendo potenciales agentes antidiabéticos,^[2, 10] con actividad sobre el sistema cardiovascular, protectores de la

actividad vascular y hepática,^[3] también se presentan como importantes agentes anticancerosos^[2, 3, 11] y además participan en mecanismos antiinflamatorios y analgésicos.^[12] Adicionalmente las isoflavonas, dada su estructura, pueden ser importantes agentes en el tratamiento de la osteoporosis y la terapia de reemplazo hormonal.^[13]

A nivel farmacológico estos compuestos destacan por sus propiedades antioxidantes, pudiendo inhibir procesos de peroxidación lipídica, presentando efectos antimutagénicos y capacidad de inhibir diversas enzimas. Por esta razón, desempeñan un papel esencial en la protección contra el daño oxidativo producido por radicales libres y especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente).

1.1. RADICALES LIBRES, ROS Y ANTIOXIDANTES

Se define como radical libre a cualquier especie química que presenta uno o más electrones desapareados.^[14] En los sistemas vivos, los radicales libres son habitualmente considerados especies reactivas de oxígeno; los más comunes son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$). También se clasifican como ROS, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno molecular singlete (1O_2) que corresponde al primer estado excitado del oxígeno molecular.

Principalmente, a nivel cutáneo, los radicales libres y/o las ROS se pueden formar por vía endógena bajo condiciones fisiológicas,^[15] así como también por vía exógena, a través de la exposición directa a contaminantes medioambientales y a la radiación solar (UVR), entre otros.

A pesar de la generación de las especies anteriormente descritas, en los seres vivos la concentración estas se mantiene relativamente bajo, debido a la presencia de moléculas conocidas como antioxidantes, que conforman un sistema de defensa capaz de retrasar o prevenir la oxidación de sustratos biológicos.^[16] Sin embargo, cuando ocurre un desbalance entre las especies oxidantes y los antioxidantes, se produce un estado conocido como estrés oxidativo,^[17] potencialmente capaz de alterar el normal funcionamiento celular^[18] e incluso dañar el DNA.^[19, 20]

1.2. MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Dada la relevante actividad antioxidante de los polifenoles (por ejemplo como atrapadores de radicales libres^[16, 21-24] y modificadores de estados REDOX) además de su lipofilicidad y coeficiente de partición,^[25] entre otros aspectos, es que muchos autores han desarrollado métodos para cuantificar su actividad tanto *in vitro* como *in vivo*. Las metodologías *in vitro* son muy empleadas debido a su rápida realización, bajo costo y baja complejidad en comparación con los métodos *in vivo*.^[16, 21]

Uno de los radicales libres de mayor importancia biológica, consecuencia de su alta reactividad, es el radical hidroxilo (OH•). Con el propósito de determinar la reactividad de compuestos antioxidantes de distinta naturaleza frente al OH•, y debido a que éste presenta un tiempo de vida muy corto (10^{-9} s),^[17] se utilizan atrapadores capaces de formar un aducto con este radical prolongando su tiempo de vida, lo cual permite su detección y cuantificación. Una de las metodologías utilizadas, corresponde a la de *spin-trapping*, asociada a Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), pudiendo usar como atrapador de espín el 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO).^[21] A pesar de que es muy poco probable que un antioxidante logre ejercer su actividad de *scavenging* al radical hidroxilo eficientemente *in vivo* (ya que este radical reacciona predominantemente con lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA, los cuales son menos reactivos pero en el organismo están en mayor concentración que los antioxidantes), en ensayos *in vitro* sigue siendo muy utilizado como estudio preliminar de la capacidad de *scavenging*, sumado a que el bloqueo en la formación de sus precursores (O_2^- , H_2O_2 , HOCl) puede resultar de gran interés.^[16, 21]

Debido a las características antioxidantes ya mencionadas de los polifenoles, surge el gran interés sobre su estudio, aplicación y el desarrollo de vehículos apropiados para administrarlos; sin embargo, su escasa solubilidad en agua -factor que condiciona su biodisponibilidad- y su inestabilidad química son una gran limitante.^[26, 27] Variadas estrategias se han propuesto para inhibir la fotodegradación y aumentar la solubilidad de flavonoides en formulaciones farmacéuticas; una de ellas consiste en la inclusión de estos compuestos en estructuras supramoleculares, caracterizadas por la presencia de cavidades desde donde la molécula puede difundir; como ejemplo de estos vehículos se pueden

mencionar las vesículas de fosfolípidos,^[28, 29] ciclodextrinas,^[30] estructuras laminares de hidrotalcita,^[31] matrices porosas de sílice y nanopartículas (NP), entre otras.^[32-34]

1.3. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE COMO PLATAFORMA PARA EL TRANSPORTE DE ACTIVOS

Varios reportes muestran la factibilidad de utilizar nanopartículas como sistemas de estudio para incluir moléculas antioxidantes. Parida y col. 1996, 1998,^[35, 36] investigaron el comportamiento de adsorción de algunos pigmentos catiónicos sobre el gel de sílice con y sin modificación superficial. Los resultados muestran que las características de la superficie, promueven una diferente orientación de los pigmentos y además reducen el área superficial debido a la modificación química. Por otra parte, Bardina y col. 2001,^[37] estudiaron las propiedades de adsorción sobre el gel de sílice antes y después de la modificación de su superficie con polietilenglicol (PEG).

Etienne y Walcarius en 2003,^[38] investigaron la reactividad química y estabilidad de las superficies de sílice funcionalizadas con grupos aminopropil en medio acuoso, determinando la importancia del pH para mantener la estabilidad del sistema. Parida y col. 2006,^[39] estudiaron la adsorción de moléculas orgánicas sobre superficies de sílice, la cual ya ha demostrado poder actuar como base para la síntesis de polímeros de alto peso molecular y biomoléculas de importancia médica. También Hassanien y Abou-El-Sherbini en 2006,^[40] sintetizaron y caracterizaron sílice porosa funcionalizada con morina, determinando la utilidad de este sistema, por ejemplo, en metodologías de preconcentración para la extracción de metales en aguas residuales.

En el año 2008, Zhang y col^[41] informaron respecto a la utilización de partículas magnéticas de hierro modificadas con sílice superficial para la adsorción indiscriminada de flavonoides desde extractos. Ambati y col., 2012^[42] propusieron la utilización de nanopartículas de sílice como vehículo de la enzima catalasa, evaluando la incorporación, actividad antioxidante y cesión de estas enzimas en la nanopartícula. Özyürek y col., 2012^[43] inmovilizaron polifenoles en nanopartículas de plata, evaluando la capacidad antioxidante por medio de reacciones colorimétricas. Luego, Cao y col. 2012^[44] compararon la biodisponibilidad oral de silimarina formulada en nanopartículas porosas de sílice sin

modificación superficial. También se han realizado estudios para la utilización de nanopartículas mesoporosas de sílice en medicina, para la entrega de fármacos y genes, debido a la unión que se da entre la sílice y el extremo de SiRNA.^[45-47] Una de las últimas investigaciones, es la de Berlier y col. 2013a^[48] quienes sintetizaron y caracterizaron nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con un grupo octil con la finalidad de estudiar la estabilización de quercetina en este sistema.

1.4. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE EN SISTEMAS DE ENTREGA DE ACTIVOS

Las nanopartículas han sido ampliamente utilizadas para encapsular y controlar la entrega de diferentes activos. Además, se han empleado nanopartículas sólidas de óxidos de silicio y cinc para la estabilización de sistemas bifásicos como las emulsiones, que pueden ser empleadas en formulaciones farmacéuticas.^[49-54]

Para que una formulación tenga la mayor eficiencia deseable, es necesario considerar factores tales como: el tamaño de partícula, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos y la biodistribución sobre la piel, entre otros.

Por lo anterior, resulta indispensable conocer el comportamiento de las nanopartículas y las nanopartículas-flavonoide (NP-FLAV) en sistemas dispersos como las emulsiones y geles, además de sus componentes típicos, los cuales podrían generar una excesiva y descontrolada desorción de los activos adsorbidos. Además, en estos sistemas es posible estudiar diversos fenómenos dinámicos e interacciones con la superficie de las nanopartículas (que involucran procesos de adsorción y deposición, entre otros).

Berlier y col. 2013b^[55] utilizaron sílice mesoporosa MCM -41 como vector para el uso del glucósido rutina en formulaciones tópicas, logrando sintetizar, caracterizar y funcionalizar la superficie con éxito, mediante grupos aminopropil; sin embargo, la actividad antioxidante de la rutina no se vio mejorada al ser incluida en este vehículo; es más, se vio disminuida cuando se incorpora en MCM-41 funcionalizada. En un trabajo reciente, Sapino y col. 2015^[56] utilizaron nanopartículas mesoporosas de sílice como nanotransportadores tópicos para la entrega de quercetina; los resultados podrían ser prometedores para un futuro sistema de entrega de activos en formulaciones tópicas.

Los estudios informados respecto a la inmovilización de polifenoles en nanopartículas de sílice con fines farmacéuticos y/o cosméticos siguen siendo limitados. La importancia de incorporar polifenoles a nanopartículas radica principalmente en la baja hidrofiliidad de éstos, combinado con su vasto metabolismo por microorganismos en el intestino, resultando una mínima absorción en el tracto gastrointestinal luego de su administración oral ^[46], además de la exposición a factores externos, que generan inestabilidad química, cuando se aplican vía tópica.

2. DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA

De acuerdo a la literatura, los polifenoles en formulaciones tópicas ejercen una importante actividad antioxidante,^[57-60] existiendo en el mercado diversas cremas regenerativas y antiarrugas (rutina y quercetina).^[61, 62]

La inestabilidad en diversas formulaciones sigue siendo una limitante; aun estando en vehículos farmacéuticos, el tamaño de ellos puede limitar la utilidad, ya que es un factor importante en la absorción y biodistribución cutánea; por ello, su inmovilización en nanopartículas mesoporosas de sílice puede tener un enfoque muy atractivo, debido a la capacidad de modificar el tamaño del vehículo y obtener nanopartículas con un diámetro superior a 100 nm, ya que se han evidenciado posibles efectos tóxicos a tamaños menores.^[63, 64] Lo anterior, sumado a los escasos estudios descritos en la literatura, respecto a la eficiencia de la incorporación y/o adsorción, el estudio de la estabilidad en el medio de dispersión y la eficiencia antioxidante de flavonoides en nanopartículas mesoporosas de sílice, además de los limitados estudios sobre la utilización particular de estos componentes en formulaciones tópicas, que pueden entregar bases relevantes para futuros estudios de preformulación, sustentan el desarrollo del presente proyecto.

Estudios anteriores sobre la reactividad de flavonoides y su eficiencia como desactivadores de especies excitadas (oxígeno molecular singlete) en medio homogéneo,^[65] además de estudios sobre la actividad atrapadora de radicales dado las características estructurales,^[66, 67] muestran que el flavonoide **morina** (MOR) posee una importante actividad desactivadora y de *scavenging* entre los polifenoles analizados. Lo anterior junto

con otros aspectos experimentales previamente ensayados, permitió seleccionarla como molécula de estudio.

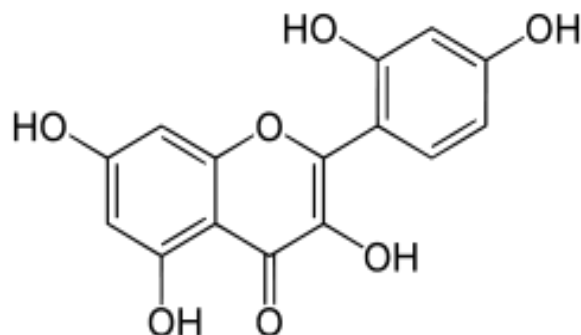


Figura 2. Estructura química de la morina.

3. HIPÓTESIS

El medio de dispersión constituido por compuestos utilizados con frecuencia en formulaciones farmacéuticas y cosméticas de uso tópico (agentes humectantes (glicerina), tensoactivos (polisorbato, lauril sulfato de sodio, cloruro de benzalconio), cosolventes (etanol) y agentes viscosantes (carbomer, hidroxietilcelulosa, quitosano y polivinilpirrolidona)) afectará la estabilidad del flavonoide morina adsorbido en nanopartículas de sílice (NP-MOR) y la capacidad antioxidante total de este sistema. Así, medios de dispersión que favorezcan la eficiencia de adsorción del flavonoide en la nanopartícula (por ejemplo, de acuerdo a su carga y capacidad solubilizante) aumentarán la estabilidad NP-MOR manteniendo el efecto antioxidante de sistemas que incluyan esta asociación.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la adsorción de morina en nanopartículas de sílice modificadas superficialmente con grupo amino y el efecto del medio de dispersión sobre la estabilidad del sistema nanopartícula-polifenol. Adicionalmente se evaluará en forma preliminar la capacidad antioxidante de este compuesto adsorbido frente al radical hidroxilo.

Los medios de dispersión a estudiar fueron escogidos debido a que son componentes frecuentes de formulaciones farmacéuticas de vía tópica y por lo tanto, su evaluación sobre la estabilidad de los polifenoles adsorbidos correspondería a un estudio de preformulación.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la adsorción del flavonoide morina en nanopartículas mesoporosas de sílice modificadas superficialmente, mediante un ajuste de isoterma de adsorción, además de evaluar la cinética de adsorción y los parámetros termodinámicos asociados.
- Caracterizar las nanopartículas sintetizadas en función del tamaño y su distribución, potencial zeta e imagen, utilizando metodologías apropiadas (difracción de luz, FT-IR y microscopía electrónica).
- Evaluar el efecto de distintos componentes de formulaciones farmacéuticas y cosméticas de uso tópico en la estabilidad de nanopartículas con el polifenol adsorbido.
- Evaluar en forma preliminar la capacidad antioxidante del flavonoide adsorbido en las nanopartículas, como atrapador de radical hidroxilo, mediante la metodología de *spin-trapping*.

6. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo se estructurará de acuerdo al siguiente orden:

1.- Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas modificadas superficialmente con grupos amino.

2.- Adsorción de morina en las nanopartículas

- Determinación de la eficiencia de adsorción en las nanopartículas (HPLC, FT-IR)
- Evaluación y ajuste a un modelo de isoterma de adsorción.
- Evaluación y ajuste a un modelo de cinética de adsorción
- Evaluación de parámetros termodinámicos (ΔH° , ΔS° y ΔG°)

3.- Caracterización de nanopartículas sintetizadas

- Determinación del tamaño y su distribución por medidas de difracción de luz (Nanosizer)
- Determinación del potencial zeta.
- Medidas de infrarrojo con transformada de Fourier
- Imagen de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

4.- Evaluación del medio de dispersión en la cesión y estabilidad de morina adsorbida en nanopartículas

- Etanol
- Solución de glicerina (5 y 10%),
- Solución con tensoactivos (polisorbato, lauril sulfato de sodio, cloruro de benzalconio)
- Solución con agentes viscosantes (carbomer, hidroxietilcelulosa, quitosano y polivinilpirrolidona)

5.- Evaluación preliminar de la capacidad antioxidante de morina adsorbida. Reactividad con radical hidroxilo.

7. MATERIALES

7.1. REACTIVOS

La morina dihidratada fue comprada a Merck, y no se sometió a purificaciones previas a su uso. Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Aldrich), hidróxido de amonio (NH₄OH) (J.T. Baker), ácido clorhídrico (HCl) fumante 37% (Merck), tetraetilortosilicato (TEOS) (Aldrich) y 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) (Aldrich), fueron utilizados tal como se recibieron.

Los agentes viscosantes hidroxietilcelulosa (Natrosol®) (Lipo), quitosano (Aldrich), carbomer neutro (Carbopol® 940NF) (Mathiesen), polivinilpirrolidona (PVP-K30) (para análisis), el agente humectante glicerina (Merck) y los tensoactivos polisorbato 80 (Aldrich), lauril sulfato de sodio (Winkler) y cloruro de benzalconio (para análisis), se utilizaron tal como fueron recibidos.

El 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) fue comprado a Sigma-Aldrich y el peróxido de hidrógeno 30 volúmenes fue adquirido de Merck.

1.1. SOLVENTES

Los solventes etanol (EtOH), tolueno, acetona y acetonitrilo fueron de grado para análisis o grado HPLC (Merck). El agua bidestilada fue purificada usando un sistema Mili – Q Plus Millipore.

8. INSTRUMENTACIÓN

8.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA

Las medidas de tamaño y potencial zeta de las nanopartículas, fueron obtenidas mediante el analizador Zetasizer Nano Z controlado por el programa Zetasizer software, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

8.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Microscopio Electrónico de Barrido TM 3000 Hitachi Table Top Microscope (Japón) perteneciente a la Unidad de Microscopía Avanzada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

8.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

Para medir la cantidad remanente de polifenol, se utilizó un equipo HPLC Agilent serie 1100, con detector de arreglo de diodos (DAD), usando una columna C-18 ODS Hypersil, 4,6 x 250 mm diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μm .

8.4. VISCOSÍMETRO

Para medir la viscosidad relativa de los agentes viscosantes, se utilizó un viscosímetro Brookfield LV.

8.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, se realizó utilizando un equipo FTIR Bruker IFS 28.

8.6. RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Con el fin de evaluar de forma preliminar la actividad antioxidante del sistema nanopartícula-morina, se utilizó un equipo de resonancia paramagnética electrónica (EPR). El espectro EPR fue registrado en la banda X (9.7 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 con una cavidad rectangular y un campo de modulación de 50 kHz, equipado con un resonador de alta sensibilidad a temperatura ambiente. Para generar el radical hidroxilo mediante la fotólisis de H_2O_2 , se utilizó una lámpara UV con una fuente de luz UV-vis-NIR, modelo DH-2000-BAL, *Ocean Optics*.

9. METODOLOGÍA

9.1. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO

Las nanopartículas mesoporosas de sílice modificadas superficialmente con grupo amino (MSNPs) se sintetizaron a partir del método de Stöber.^[68] Para ello, se agregó 120 mL de EtOH y 44 mL de H₂O en un matraz esmerilado de fondo redondo, el cual se llevó a un baño termostático con agitación (60 °C). A esta temperatura, se adicionaron 7,2 mL de solución de NH₄OH y 80 mg de CTAB. Tras la solubilización del agente tensoactivo, se agregaron lentamente 7,2 mL de TEOS, luego se retiró la agitación, dejando que la reacción proceda por 2 hrs. a 60 °C. La suspensión obtenida se centrifugó y lavó varias veces con EtOH y agua. Las nanopartículas obtenidas se resuspendieron en EtOH, luego se agregaron 5 – 10 mL de HCl fumante al 37% y se dejaron con agitación por 12 hrs. bajo una temperatura controlada (60 °C). Después se realizaron lavados con agua bidestilada, EtOH y acetona por centrifugación. Luego se añadieron a la suspensión 100 – 150 mL de tolueno; mientras la suspensión se mantuvo en agitación, se añadió 800 µL de APTES y se sometió a reflujo por 3 horas. Posteriormente, se realizaron lavados con tolueno:etanol (1:1) y EtOH por centrifugación. Finalmente las nanopartículas se resuspendieron en 250 mL de EtOH.

9.2. ADSORCIÓN Y EVALUACIÓN DE MORINA EN NANOPARTÍCULAS

Los experimentos de adsorción se llevaron a cabo mediante el modo batch, para obtener los datos cinéticos y de equilibrio. Previamente en el laboratorio, se establecieron las condiciones óptimas para este tipo de experimentos. Una solución stock de 2 mg mL⁻¹ de morina fue preparada, luego se tomó un volumen deseado y se añadieron a 30 mL de una suspensión de nanopartículas en un frasco de vidrio (50 mL). Después de la adición de la alícuota de polifenol, la suspensión se mantuvo bajo agitación hasta alcanzar el equilibrio y subsecuentemente se centrifugaron a 8000 rpm por 20 minutos, luego se extrajo una alícuota

adecuada de sobrenadante para su análisis por HPLC con el fin de determinar la cantidad de polifenol no adsorbido.

9.3. AJUSTE A UN MODELO DE ISOTERMA DE ADSORCIÓN

El ajuste a una isoterma de adsorción se llevó a cabo mediante la adición de una cantidad fija de solución de morina (0,514 mg MOR/ EtOH mL) a una cantidad variable de nanopartículas (16,5 mg – 99 mg) en matraces volumétricos de 25 mL cada uno, para obtener una concentración final de polifenol de 1×10^{-4} M; el contenido se trasvasó a frascos de vidrio de 50 mL y se mantuvieron bajo agitación hasta alcanzar el equilibrio de adsorción. Luego se cuantificó el sobrenadante según el método mencionado anteriormente.

9.4. CINÉTICA DE ADSORCIÓN

La cinética de adsorción sobre la superficie de las nanopartículas se realizó mediante la adición de una alícuota de solución de morina (2 mg/mL) a una suspensión de nanopartículas (1,178 g NP). La suspensión fue agitada a 25 °C. A varios intervalos de tiempo, se extrajeron muestras y se centrifugaron; la concentración de morina remanente en el sobrenadante fue determinada por HPLC.

9.5. EXPERIMENTOS TERMODINÁMICOS

Los experimentos termodinámicos se realizaron mediante la misma metodología que la isoterma de adsorción. Los experimentos se realizaron a las temperaturas de 288 K, 298 K, 308 K y 318 K.

9.6. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON Y SIN MORINA ADSORBIDA

La caracterización de las nanopartículas modificadas superficialmente con grupo amino con y sin morina adsorbida, se realizó midiendo el tamaño, distribución, potencial zeta y utilizando espectroscopía infrarroja y microscopía electrónica de barrido.

Para realizar las mediciones del tamaño, distribución y potencial zeta en el equipo Nanosizer, las muestras se diluyeron veinte veces. Los espectros fueron obtenidos a través de un equipo FTIR Bruker IFS 28. Cada muestra fue homogeneizada en un mortero junto con una cantidad suficiente de bromuro de potasio; luego, la mezcla fue sometida (en un molde) a una compresión utilizando 10 toneladas de peso para formar una pastilla compacta, la cual fue introducida en el equipo para su medición. También, se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la morfología, tamaño y distribución de las nanopartículas de sílice en suspensión. Cada muestra fue diluida en etanol y luego se añadieron 40 μ L de cada una sobre diferentes portaobjetos, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente para su posterior recubrimiento con una película de oro, con el fin de ser observados por el microscopio electrónico de barrido.

9.7. EVALUACIÓN DEL MEDIO DE DISPERSIÓN

9.7.1. ESTABILIDAD DEL SISTEMA NANOPARTÍCULA – GEL

Con el fin de evaluar el comportamiento y compatibilidad del sistema nanopartícula-gel, se prepararon 4 tipos diferentes de geles a bajas concentraciones (gel de hidroxietilcelulosa al 1% (Natrosol®), gel de carbomer al 5% (Carbopol®940), el cual se ajustó a pH 6 con una solución de hidróxido de sodio al 10%, gel de polivinilpirrolidona k-30 al 10% y gel de quitosano al 1%, el cual se ajustó a pH 3 con ácido láctico concentrado) y se pusieron en contacto con las nanopartículas, suspendidas en EtOH (Vial A) y glicerina al 10% (Vial B).

9.7.1.1. MEDICIÓN DE LA VISCOSIDAD RELATIVA

La viscosidad relativa de los geles y del sistema nanopartícula-gel, se llevó a cabo en un viscosímetro Brookfield LV con una aguja n° 63, a 12 rpm, 25 °C y considerando un factor de conversión de 100, para calcular la viscosidad relativa expresada en centipoise (cP). Todas las mediciones se realizaron luego de dejar en reposo el sistema durante 48 horas y por un tiempo de 5 minutos.

9.7.2. ESTABILIDAD DEL SISTEMA MORINA-NANOPARTÍCULA-GEL

Con el propósito de evaluar el comportamiento y compatibilidad del sistema morina-nanopartícula-gel, previamente se preparó una solución de morina ($1,8 \times 10^{-3}$ M) que se añadió a 40 mL de suspensión de nanopartículas y se mantuvo bajo agitación hasta alcanzar el equilibrio de adsorción; así se obtuvo una suspensión que contiene 1,2 mg MOR/100 mg NP, la cual posteriormente fue resuspendida en glicerina al 10%. Posteriormente, los mismos tipos de geles descritos anteriormente, se dejaron en contacto con las nanopartículas modificadas superficialmente que poseen morina adsorbida y que están suspendidas en glicerina al 10%, para evaluar la estabilidad y/o compatibilidad del sistema.

9.7.3. EVALUACIÓN DE LA CESIÓN DE MORINA ADSORBIDA DESDE LAS NANOPARTÍCULAS

Para determinar la cesión de morina adsorbida, desde las nanopartículas en contacto con diferentes constituyentes frecuentemente usados en diversas formulaciones de uso farmacéutico y cosmético, se prepararon soluciones de glicerina al 5% y 10%, polisorbato al 0,5%, 1%, 2% y 5%, lauril sulfato de sodio al 0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,5% y cloruro de benzalconio al 0.02%, 0.05% y 0.1%. Luego, las nanopartículas con morina adsorbida fueron suspendidas en 10 mL de cada una de las soluciones mencionadas anteriormente y se dejaron en contacto hasta alcanzar el equilibrio, posteriormente el sistema fue centrifugado y la morina remanente se cuantificó por HPLC.

9.8. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

9.8.1. ENSAYO DE REACTIVIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON MORINA ADSORBIDA, FRENTE AL RADICAL HIDROXILO, MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE *SPIN-TRAPPING*.

Con el fin de monitorear la capacidad antioxidante de la morina adsorbida en las nanopartículas frente al radical hidroxilo, generado mediante fotólisis del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en un medio acuoso de glicerina al 10%, se utilizó la metodología de *spin*

trapping. Uno de los atrapadores de espín para radicales libres centrados en oxígeno más comúnmente utilizados, es el DMPO. Para la generación de radical hidroxilo a través de la fotólisis de H₂O₂, mediante radiación UV, se observó un patrón de desdoblamiento de 4 líneas con una constante de acoplamiento hiperfina (hfcc) de $a_N = a_H = 14,92$ G, correspondiente al aducto DMPO/ HO•. Además se encontró la aparición de un aducto de radical glicerina/DMPO, producto de la reacción del radical hidroxilo y glicerina, observándose un patrón de desdoblamiento de 6 líneas con una hfcc de $a_N = 15,8$ G y $a_H = 22,5$ G. La intensidad de la señal del aducto radical glicerina/DMPO fue 1/3 de la intensidad de la señal del aducto DMPO/ HO• en el espectro control; por esta razón, la concentración de glicerina se mantuvo constante en todos los experimentos, por lo que la señal generada por la presencia de glicerina puede ser despreciable.

La morina fue preparada en una solución de glicerina al 10% con una pequeña cantidad de etanol como co-solvente, a una concentración de 0,11 mM. El DMPO fue preparado en agua nanopura a una concentración de 200 mM y el H₂O₂ fue preparado en agua nanopura al 10% v/v. La capacidad antioxidante se consideró proporcional a la disminución de la altura de la señal en comparación con el control, en ausencia de antioxidante.

10.2. ADSORCIÓN DE MORINA EN NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE

Para los experimentos de adsorción tipo batch, la concentración utilizada del flavonoide fue de aprox. $5,9 \times 10^{-3}$ M.

Además de morina, se estudiaron las isoflavonas genisteína y daidzina y el flavonoide rutina (Fig. 4), sin embargo, sólo con morina se obtuvieron resultados reproducibles y una cantidad adsorbida adecuada para realizar las pruebas y experimentos propuestos en esta memoria. Los polifenoles genisteína, rutina y daidzina no dieron buenos resultados y mostraron una baja eficiencia de adsorción (menor al 1%). Además, para el ajuste de isoterma realizado, ninguno de ellos mostró datos tan concluyentes como morina.

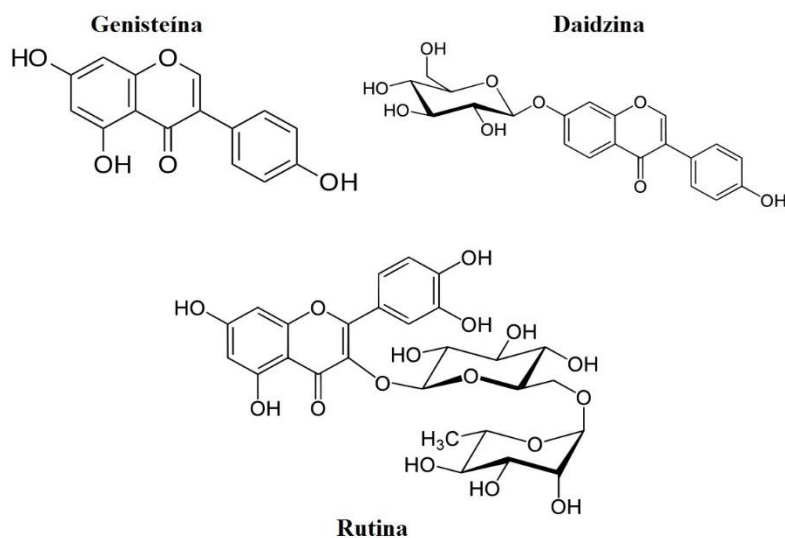


Figura 4. Estructura de otros polifenoles estudiados en la adsorción sobre nanopartículas de sílice.

La Figura 5, muestra los datos obtenidos (en triplicado) de la cantidad de morina adsorbida versus diferentes cantidades de morina disueltas en la solución que se puso en contacto con las nanopartículas. La cantidad de polifenol adsorbido en el equilibrio sobre la superficie de las nanopartículas fue calculado a partir de la siguiente ecuación:^[71, 72]

$$(1) q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m}$$

Donde q_e es la cantidad de morina adsorbida por cantidad de nanopartícula cuando se alcanza el equilibrio (mg g^{-1}), C_0 y C_e son la concentración de polifenol en solución antes y después de la adsorción, respectivamente (mg L^{-1}), V es el volumen bulk del medio (L) y m es la cantidad de nanopartículas (g).

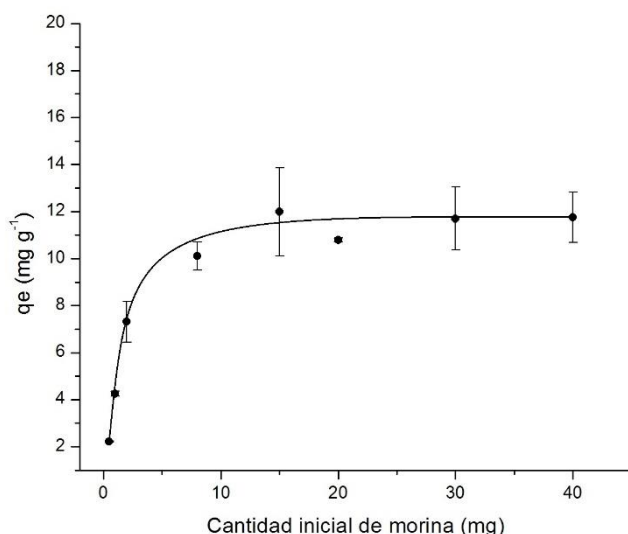


Figura 5. Morina adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas. Los valores son el promedio de $n = 3$ (promedio \pm SD).

La máxima adsorción obtenida fue de 11 mg g^{-1} ($1.1 \text{ mg MOR}/100\text{mg NP}$). En la Fig. 5 se muestra que la cantidad adsorbida aumenta cuando la cantidad inicial de morina aumenta, alcanzando la saturación de la curva a valores sobre 10 mg iniciales de morina. En la Figura 6 se muestra la eficiencia de adsorción, calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$(2) \text{ Eficiencia de adsorción (\%)} = \frac{\text{Cantidad de morina cargada sobre la nanopartícula (mg)}}{\text{Cantidad inicial de morina (mg)}} \times 100$$

En el gráfico se observa que al agregar cantidades de morina hasta el máximo experimental por cada 100 mg NP, la adsorción alcanza valores tan altos como 97% de eficiencia, incluso en cantidades de 2 mg MOR/ 200 mg, NP la eficiencia permanece alrededor de 90%; por otro lado, cuando la cantidad inicial de morina excede la máxima

adsorción experimental calculada, la eficiencia se ve disminuida a cerca del 50% y a cantidades superiores, la eficiencia disminuye y se acerca a valores promedio de 14,4%.

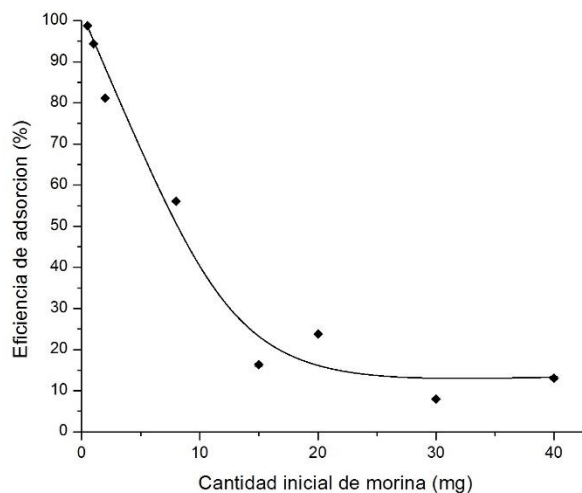
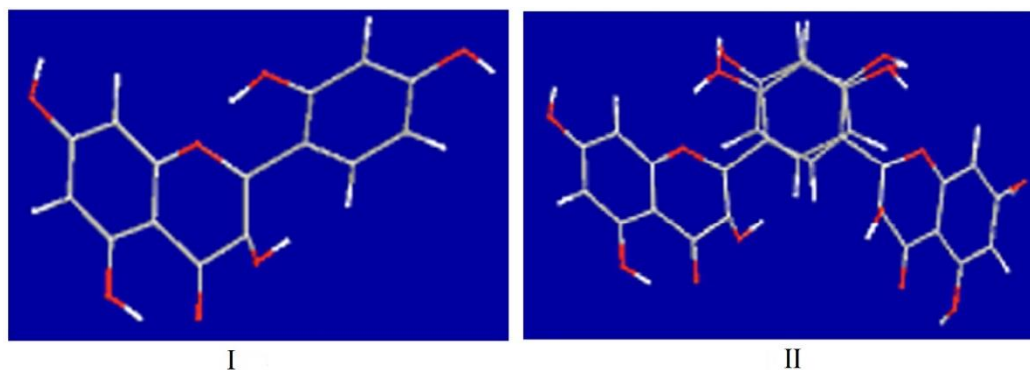


Figura 6. Eficiencia de adsorción sobre la superficie de las nanopartículas a diferente cantidad inicial de morina.

Es probable que la baja adsorción sea producto, entre otras razones, de la formación de dímeros de flavonoide y posibles aglomeraciones formando estructuras apiladas ^[73-76] como lo muestra la Fig. 7A. Además de lo anterior, pueden influenciar la adsorción, la relación entre volumen y/o tamaño de la molécula respecto al poro, la homogeneidad de la superficie, las formas estructurales de la modificación con APTES, la posición del dímero y el ángulo y la posición del anillo B de los flavonoides respecto al anillo C ^[77] (Fig. 7B).

A



B

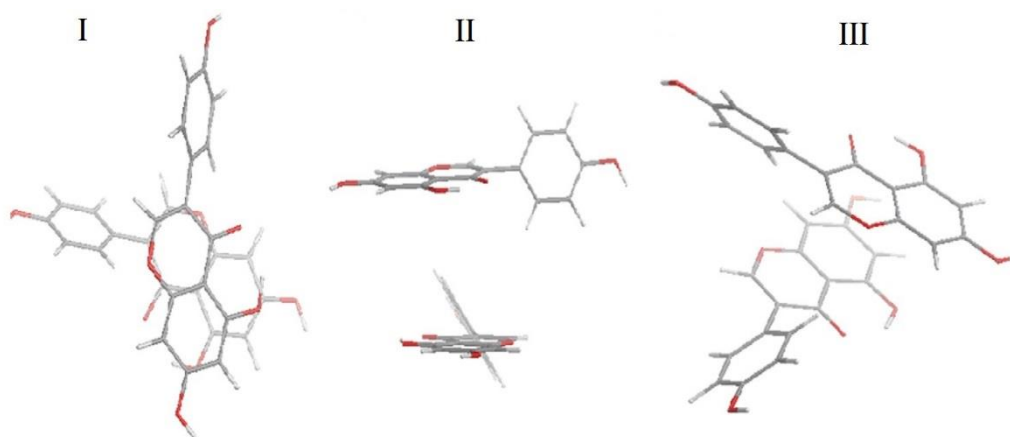


Figura 7. A) (I) Estructura del flavonoide morina, (II) Probable estructura de la formación de un dímero de morina. B) Estructura más probable de la formación de dímero de genisteína. (I) Vista perpendicular al plano de anillo de la flavona (II) Vista plana a lo largo del eje (III) vista desde una dirección intermedia.

10.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

10.3.1. TAMAÑO, DISTRIBUCIÓN, POTENCIAL SUPERFICIAL Y MORFOLOGÍA.

El tamaño de las nanopartículas mesoporosas superficialmente modificadas tuvo un promedio de 213,1 nm de diámetro y una distribución normal. Adicionalmente, se midió el tamaño para las nanopartículas sin modificación superficial, obteniendo un tamaño promedio de 174 nm. Finalmente, para las nanopartículas con morina adsorbida el tamaño promedio fue de 234,9 nm, lo que corrobora el aumento de tamaño esperado (de acuerdo a estudios previos en el laboratorio) para las nanopartículas con y sin modificación superficial y sin cambios importantes en el tamaño cuando se adsorbe morina.^[78]

El potencial Z de las muestras estuvo dentro del rango de valores esperados, observándose para las nanopartículas mesoporosas superficialmente modificadas un valor promedio de +34,5 mV y para las nanopartículas con morina adsorbida el valor promedio fue de -1,89 mV. Esto se explica debido a la carga negativa que presenta la morina en las condiciones acuosas de medición en donde el flavonoide se encuentra levemente ionizado, por lo que la carga superficial de las nanopartículas se hace menos positiva cuando se adsorbe morina, lo que es coincidente con datos reportados en la literatura.^[56]

La Figura 8 muestra las imágenes SEM de nanopartículas de sílice mesoporosas modificadas superficialmente con grupo amino y con morina adsorbida en la superficie. La muestra se dispersó en etanol, luego se evaporó el solvente y se trató con una película de oro para la observación por microscopía electrónica. Se observó que las nanopartículas muestran una morfología esférica que no se ve alterada cuando se adsorbe morina en la superficie.

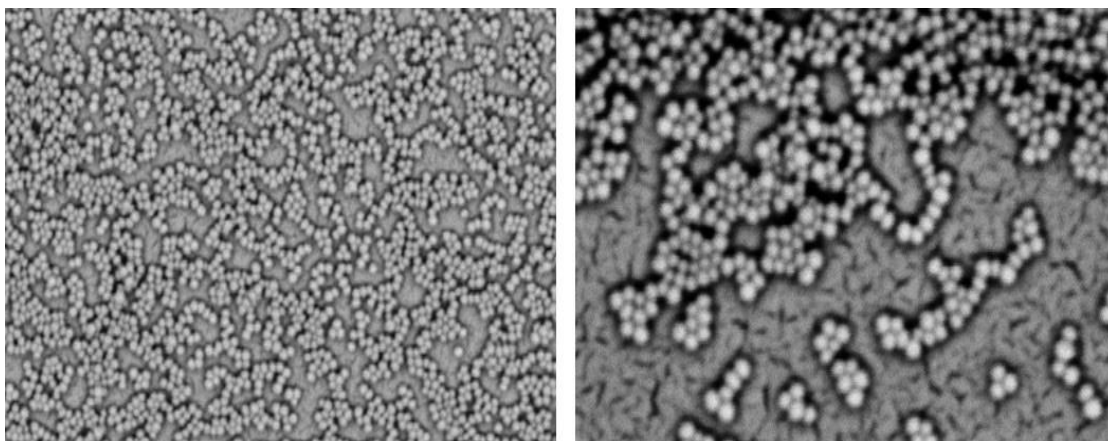


Figura 8. Imagen SEM de nanopartículas con morina adsorbida.

10.3.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER

El espectro FTIR de la morina, de las nanopartículas con grupo amino (NP-NH₂) y nanopartículas con grupos amino y con morina adsorbida en la superficie (NP-MOR) se registró en el rango de 4000-500 cm⁻¹ (Figura 9). El espectro de la Fig. 9c muestra la posición de las bandas IR de morina. El espectro revela una banda a 1653 cm⁻¹ debido a la vibración *stretching* (C=O), la vibración de deformación de (C-OH) se observó a los 1351 cm⁻¹ y 1307 cm⁻¹. Las bandas a los 1202 cm⁻¹ y 1172 cm⁻¹ corresponden al *stretching* de (C-OH) y la banda localizada a 1245 cm⁻¹ es atribuible a la vibración de (C-O-C).^[79, 80]

En la Fig. 9a se muestra el espectro IR de las nanopartículas con grupo amino en la superficie (NP-NH₂). En el espectro se observó la presencia de una banda ancha en el rango de 1200 – 1000 cm⁻¹, correspondiente al *stretching* asimétrico del enlace (Si-O-Si) formado mediante la reacción de condensación entre el grupo silanol de APTES y el grupo hidroxilo presente sobre la superficie de las nanopartículas, probablemente acoplado a la misma vibración del enlace (Si-OH) en la superficie; también se observó una banda a 948 cm⁻¹ debido a la vibración *bending* del grupo silanol (Si-OH). El espectro muestra una banda a 3400 cm⁻¹ atribuible a la vibración *stretching* del grupo NH₂ y una débil banda a 2980 cm⁻¹

del grupo (CH_2) de la cadena propil, correspondientes a la superposición de estas bandas con los grupos siloxano y silanol, sugiriendo la presencia del grupo amino de la molécula APTES en la posición terminal de la cadena propil,^[81-83] además de la presencia de agua en la superficie, atribuible a la superposición en el rango de $3400\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ y a la banda a 1637 cm^{-1} . Todo lo anterior sugiere que el APTES ha sido unido a la superficie de las nanopartículas por el grupo silanol, dejando libre, sin ligar al grupo amino.^[84-86]

Finalmente, la Fig. 9(b) muestra el espectro IR de las NP-NH₂ con morina adsorbida. El espectro muestra una amplia señal correspondiente al grupo (Si-O-Si) que además posee un aumento con respecto al espectro de NP-NH₂, sugiriendo una interacción de la superficie de las nanopartículas con la molécula en estudio y/o una superposición de las señales en ese rango de medición.

Adicionalmente se observó una banda a 3400 cm^{-1} y 2970 cm^{-1} indicando que debido a la pequeña cantidad de morina adsorbida, aún permanecen grupos amino en la posición terminal de la cadena propil sin interaccionar con morina. Además, la relación de la cantidad nanopartícula : morina es muy grande por lo que se hace difícil detectar a la morina utilizando sólo la técnica de FT-IR.

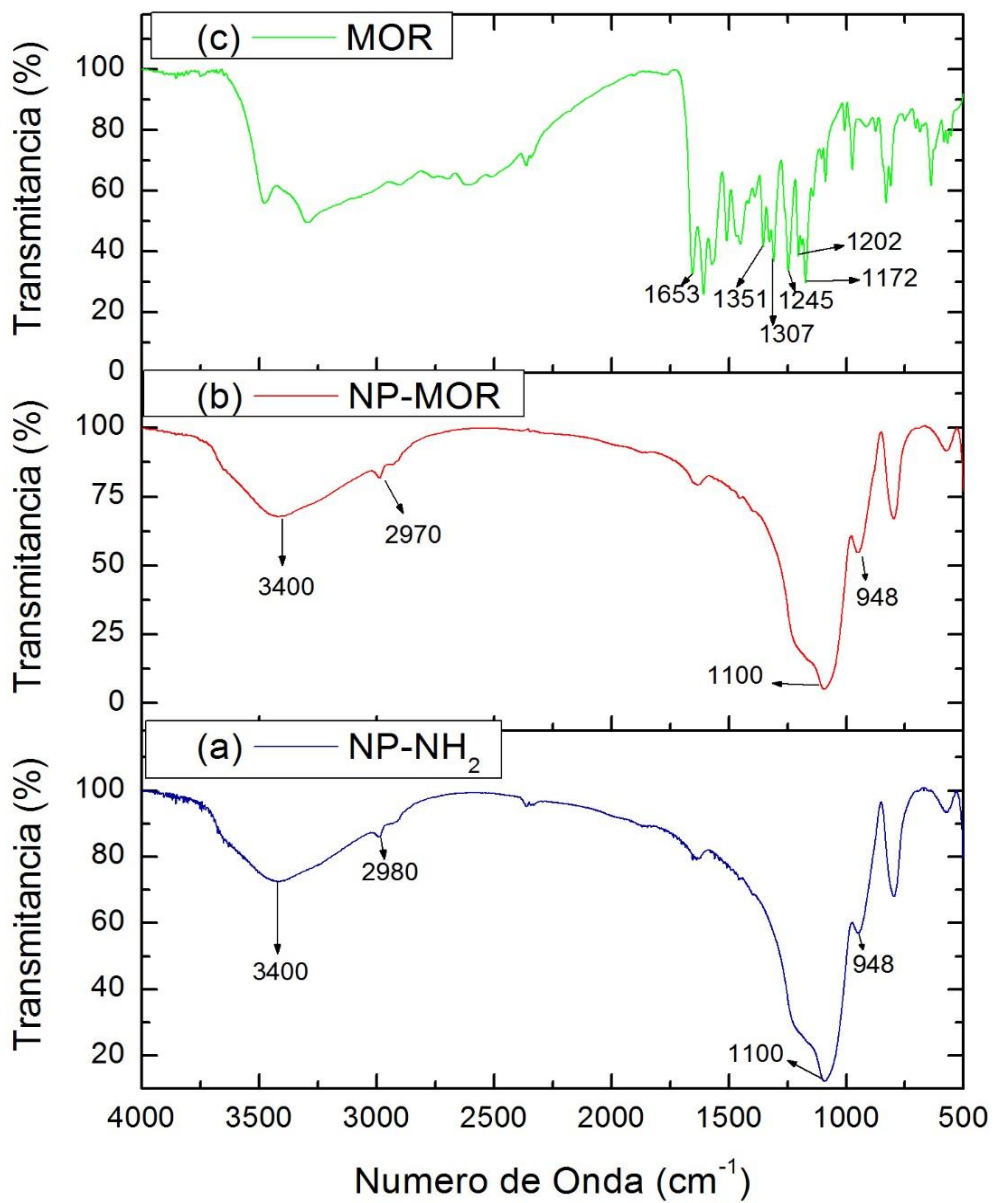


Figura 9. Espectro FTIR. (a) nanopartículas modificadas con APTES (NP-NH₂); (b) nanopartículas modificadas con APTES con morina adsorbida (NP-MOR); (c) morina (MOR).

Autores como Cheng y col.^[87] y Andersson y col.^[88] reportan que la modificación superficial de nanopartículas de TiO₂ y silicio, respectivamente, con APTES, puede generar más de una posible interacción en la superficie (Fig. 10), por lo que es posible que en el presente trabajo, la modificación con APTES también se hizo en más de una interacción. Como se describió anteriormente, los espectros FT-IR mostraron una correcta unión a la superficie, dejando el grupo amino libre para su interacción. Sin embargo, se requieren mayores estudios para definir la forma de la interacción en la superficie.

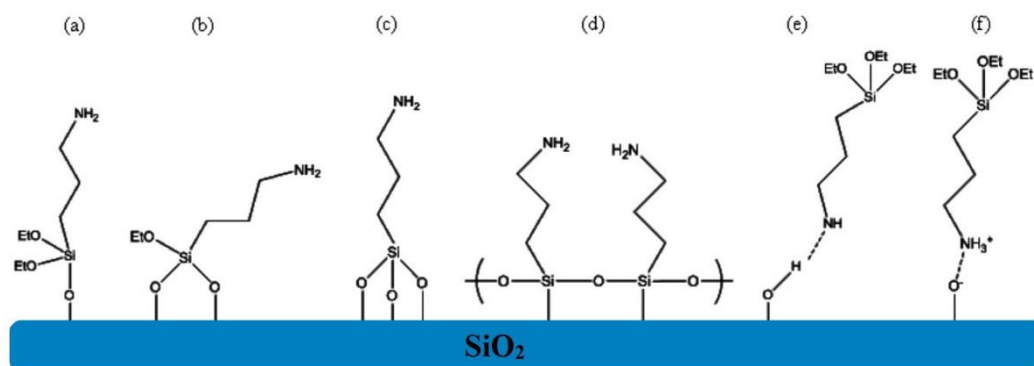


Figura 10. Posible interacción superficial y potencial modo de enlace químico entre la superficie de las nanopartículas de SiO₂ y APTES.

10.4. CINÉTICA DE ADSORCIÓN

El estudio de la cinética de adsorción es importante ya que puede ayudar a predecir tanto el mecanismo de adsorción como el de desorción.^[89-91] En la Figura 11 se muestra el efecto del tiempo de contacto, alcanzando un máximo de adsorción a las 24 horas (indicando que el proceso no es eficiente).

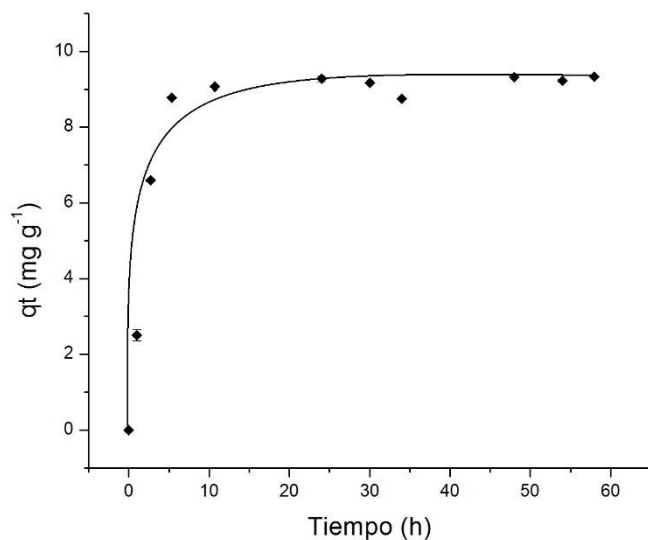


Figura 11. Efecto del tiempo de contacto en la adsorción de morina sobre las nanopartículas de sílice.

La cinética de adsorción de la morina sobre la superficie de las nanopartículas fue analizada utilizando 2 modelos cinéticos, el modelo de pseudo-primer-orden^[89, 90] y el modelo de pseudo-segundo-orden.^[91, 92] Estos dos modelos pueden expresarse en forma lineal, mediante las siguientes ecuaciones:

$$(3) \ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t$$

$$(4) \frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}$$

Donde q_e y q_t son la cantidad de morina adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas (mg g^{-1}) en el equilibrio y a un tiempo t , respectivamente; k_1 es la constante aparente de velocidad de pseudo-primer-orden, que depende del balance entre la constante de velocidad de adsorción (k_a) y desorción (k_d)^[90] y k_2 es la constante aparente de velocidad de pseudo-segundo-orden.

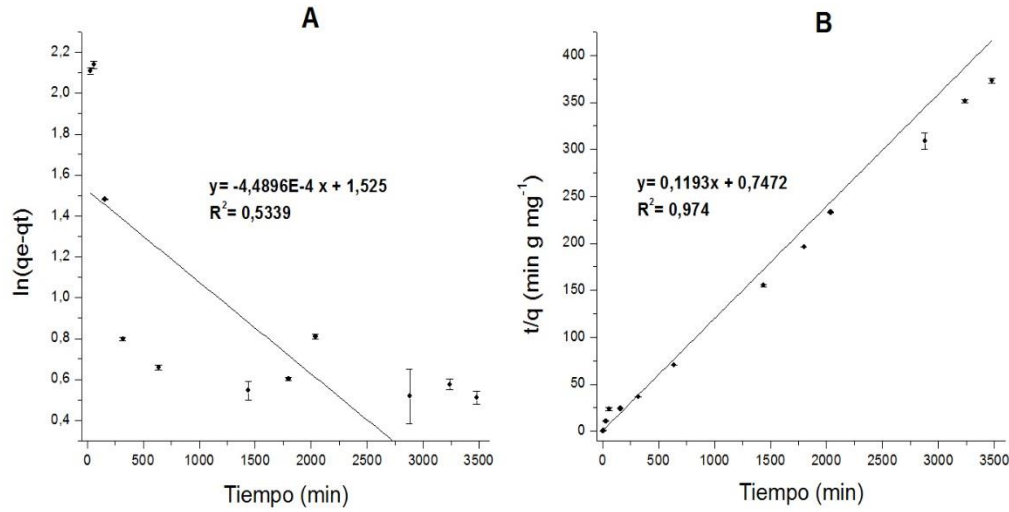


Figura 12. Ajuste lineal para las ecuaciones de pseudo-primero orden (A) y pseudo-segundo orden (B).

La fig. 12a y 12b muestra el ajuste lineal para la ecuación de pseudo-primero-orden y pseudo-segundo-orden respectivamente. El valor de q_e fue calculado a partir de la pendiente, k_1 se obtuvo a partir de la pendiente del ajuste lineal de pseudo-primero-orden y k_2 se obtuvo a partir del intercepto del ajuste de pseudo-segundo-orden. El valor de q_e obtenido con el modelo de pseudo-primero-orden se aleja de lo encontrado experimentalmente, dando cuenta que el modelo no es un buen ajuste. Por otro lado, el valor de q_e para el modelo de pseudo-segundo-orden fue mucho más cercano a los valores encontrados experimentalmente. El mecanismo cinético para la adsorción de morina sobre nanopartículas de sílice se ajusta bien a un modelo de pseudo-segundo orden. Los parámetros obtenidos a partir de la ecuación se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la velocidad de adsorción de la morina sobre las nanopartículas de sílice.

	Cinética de pseudo-primer orden			Cinética de pseudo-segundo orden		
	k_1 (min ⁻¹)	q_e (mg g ⁻¹)	R^2	k_2 (g mg min ⁻¹)	q_e (mg g ⁻¹)	R^2
Morina	3×10^{-4}	4,38	0,5339	2×10^{-3}	8,38	0,974

10.5. ISOTERMA DE ADSORCIÓN

Con el fin de determinar la máxima capacidad de adsorción de las nanopartículas y describir de mejor forma la relación entre adsorbente y adsorbato en el equilibrio, se utilizaron ecuaciones lineales de isothermas de Langmuir (5), Freundlich (6) y Temkin (7)

$$(5) \frac{C}{q_e} = \frac{1}{Q_m b} + \frac{1}{Q_m} C$$

$$(6) \log(q_e) = \log K_f + \frac{1}{n} \log C$$

$$(7) q_e = B \ln A + B \ln C_e$$

Donde, q_e es la cantidad de morina adsorbida por cantidad de nanopartícula cuando se alcanza el equilibrio de adsorción (mg g⁻¹), C es la concentración de morina en la solución (mg L⁻¹), Q_m es la capacidad de adsorción de la monocapa de Langmuir (mg g⁻¹), b es la constante de Langmuir para el equilibrio adsorbato-adsorbente (L mg⁻¹).

K_f es el coeficiente de isoterma de Freundlich ((mg/g)(L/mg)^{1/n}), n es la constante de Freundlich (también llamado índice de intensidad de adsorción o heterogeneidad superficial) la cual expresa lo favorable de la adsorción si los valores fluctúan entre 1 a 10, desprendiéndose que la pendiente toma valores aprox. entre 0 y 1 en donde se favorece el proceso de quimisorción y la superficie es más heterogénea mientras más se acerca a cero.^{[93-}

^{95]} A es la constante de unión de la isoterma de equilibrio de Temkin (L mg⁻¹), B es una constante definida como $B = \frac{RT}{b_T}$, siendo R la constante universal de los gases (8,3143 J

$\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), T es la temperatura absoluta en Kelvin y b_T es una constante relacionada al calor de adsorción.

Los datos experimentales ajustados a las isothermas antes mencionadas (Fig. 13), muestran un alto coeficiente de determinación para los tres casos ($R^2_{\text{Langmuir}} = 0,9964$; $R^2_{\text{Temkin}} = 0,9943$; $R^2_{\text{Freundlich}} = 0,9904$).

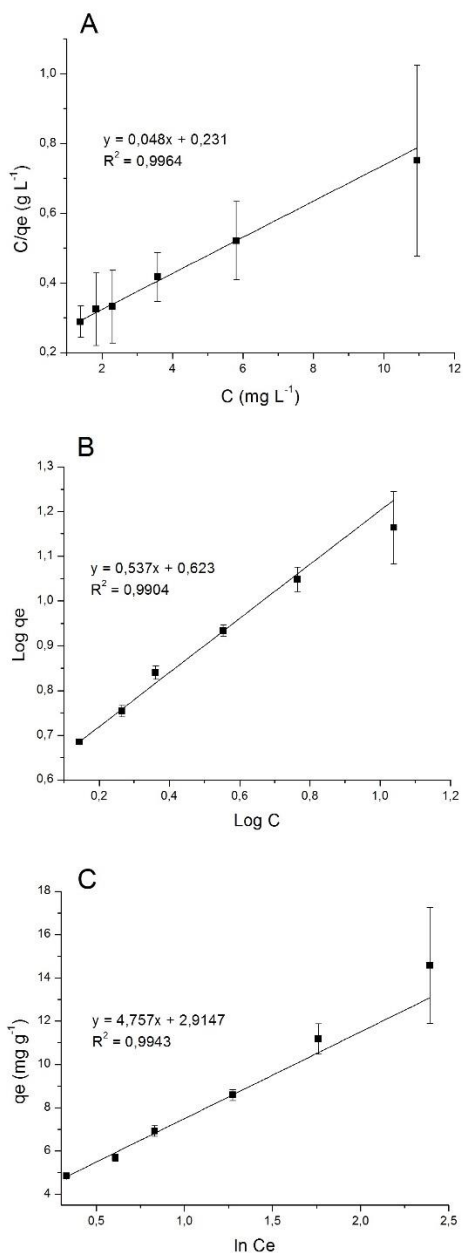


Figura 13. Ajuste lineal de los datos experimentales usando el modelo de isoterma de Langmuir (A), Freundlich (B) y Temkin (C) a 25 °C. Los valores son el promedio de $n = 3$ (promedio \pm SD).

La alta correlación de los datos con el modelo de Langmuir sugiere que el proceso de adsorción se lleva a cabo preferencialmente mediante la formación de una monocapa de morina sobre la superficie de las nanopartículas. Por otro lado, el coeficiente de determinación para la isoterma de Freundlich y la isoterma de Temkin es estadísticamente aceptable, indicando que el proceso de adsorción involucra la formación de más de una capa de morina y posiblemente interactuando con otras moléculas del flavonoide. Esto puede explicarse ya que el equilibrio adsorción-desorción es complejo y gobernado por más de un mecanismo, donde la formación de dímeros y otras asociaciones de morina, pueden generar más de una capa en la superficie, permaneciendo unidas posiblemente mediante fuerzas electrostáticas. El parámetro n mayor que la unidad, indicó que el proceso de adsorción está favorecido.

El máximo valor adsorbido en la monocapa fue calculado a partir de los parámetros de la ecuación linealizada de la isoterma de Langmuir y fue de $20,8 \text{ mg g}^{-1}$. Este valor concuerda con los valores experimentales de máxima adsorción (determinados a partir del *plateau* en la Fig. 4).

Además, la factibilidad de la adsorción se puede dilucidar a partir de la constante adimensional, conocida comúnmente como factor de separación (R_L),^[96] que corresponde a:

$$(8) R_L = \frac{1}{1+bC_0}$$

Donde b es la constante de Langmuir (L/mg) y C_0 es la concentración inicial de morina (mg/L). El valor de R_L indica la naturaleza de la adsorción, para una reacción desfavorable ($R_L > 1$), un caso lineal ($R_L = 1$), un proceso favorable ($0 < R_L < 1$) y un caso irreversible ($R_L = 0$). El valor de R_L encontrado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ fue $0,22$ a $0,007$, lo que sugiere que el proceso de adsorción es favorable.

Para establecer qué modelo de isoterma presenta el mejor ajuste, se utilizó el parámetro estadístico R^2 , sin embargo, su uso se limita a calcular la diferencia entre los valores experimentales y los teóricos, sólo en datos que han sido linealizados, pero no el error en formas no lineales de las curvas de isotermas.^[94] Diferentes funciones han sido desarrolladas para evaluar el error de regresiones no lineales y encontrar el mejor ajuste a los modelos de isoterma para los datos experimentales de equilibrio.^[97, 98] Por lo anterior, se utilizó una

función de error denominada test estadístico no lineal Chi-cuadrado,^[99] basado en la siguiente ecuación:

$$(9) \chi^2 = \sum \frac{(q_{e \text{ exp}} - q_{e \text{ calc}})^2}{q_{e \text{ calc}}}$$

Donde $q_{e \text{ exp}}$ y $q_{e \text{ calc}}$ son los valores de la capacidad de adsorción experimental y calculado, respectivamente. El modelo que tenga el menor valor en el test Chi-cuadrado será el que ajuste mejor los datos experimentales. El análisis de los datos mediante el test Chi-cuadrado mostró que la isoterma de Langmuir es el modelo más adecuado. Además, se obtuvo un valor negativo en los valores de q_e en la isoterma de Temkin, lo que muestra un valor matemático que no refleja un q_e coherente con la realidad evidenciando que la isoterma de Temkin, a pesar de tener un buen ajuste lineal, no modela apropiadamente los datos, además muestra un q_e teórico de $\sim 30 \text{ mg g}^{-1}$, sobreestimando el resultado experimental.

El comportamiento observado, puede explicarse señalando que la asociación de dímeros de morina en la superficie parece ser fundamental, afectando la adsorción, haciéndola parecer de multicapas, con interacción entre adsorbatos o bloqueando sitios adyacentes; sin embargo, es posible que la adsorción sea de una capa con estructuras apiladas. No obstante, lo anterior sólo son ajustes a modelos matemáticos en los que claramente no se expresa la realidad del proceso de adsorción pero nos otorga un enfoque para dilucidar el posible mecanismo. Los valores de los diferentes parámetros obtenidos en el ajuste se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de las formas lineales de los modelos de isoterma estudiados.

Isoterma	Ecuación linealizada	Parámetros	
Langmuir	$\frac{C}{q_e} = \frac{1}{Q_m b} + \frac{1}{Q_m} C$	Q _m (mg g ⁻¹)	20,8
		b (L mg ⁻¹)	0,208
		R ²	0,9964
		R _L	0,22 - 0,007
		χ ²	24,7
Freundlich	$\log(q_e) = \log K_f + \frac{1}{n} \log C$	K _f ((mg/g)(L/mg) ^{1/n})	4,2
		n	1,86
		R ²	0,9904
		χ ²	425,5
		Temkin	$q_e = B \ln A + B \ln C_e$
A (L mg ⁻¹)	1,8454		
R ²	0,9943		
χ ²	56,62		

10.6. EXPERIMENTOS TERMODINÁMICOS

Con el fin de analizar el proceso de adsorción desde el punto de vista termodinámico, se midieron las isotermas de adsorción a 15 °C, 25°C, 35 °C y 45°C. En la Tabla 3 se resumen los parámetros para cada ecuación encontrada.

Tabla 3. Parámetros de la isoterma de adsorción de Langmuir a 288 K, 298 K, 308 K y 318 K.

Isoterma de Langmuir	Parámetros	Temperatura (K)			
		288	298	308	318
$\frac{C}{q_e} = \frac{1}{Q_m b} + \frac{1}{Q_m} C$	Q_m (mg g ⁻¹)	11,48	20,8	13,35	17
	b (L mg ⁻¹)	0,3887	0,208	0,1949	0,06395
	R_L	0,134-	0,22-	0,235-	0,484-
		0,004	0,007	0,008	0,023
	χ^2	0,54	24,7	4,33	23,04
	R^2	0,9832	0,9964	0,9824	0,9615

El estudio termodinámico de adsorción permite establecer los aportes entálpicos y entrópicos al proceso, permitiendo establecer la espontaneidad del proceso de adsorción bajo ciertas condiciones y temperatura. Como ya se señaló, los parámetros termodinámicos a considerar son el cambio en la entalpía estándar (ΔH°), entropía estándar (ΔS°) y la energía libre estándar (ΔG°) debido a la transferencia de unidad de mol de soluto a partir de la solución sobre la interface.^[93, 100] Los parámetros termodinámicos ΔH° , ΔS° y ΔG° pueden determinarse mediante el uso de las siguientes ecuaciones:^[93]

$$(10) \quad \Delta G^\circ = -RT \ln b$$

$$(11) \quad \ln b = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT}$$

Donde b es la constante de Langmuir (L mg⁻¹), R es la constante universal de los gases (8.3143 J/mol K), y T es la temperatura absoluta de la solución (K). La ecuación (11) es conocida como la ecuación de van't Hoff.^[101, 102]

En la figura 14, se muestra el gráfico de van't Hoff en donde se observó que al aumentar el valor recíproco de la temperatura también aumenta el valor de b . Los resultados presentaron un coeficiente de determinación adecuado ($R^2 = 0,9113$). A partir de la pendiente e intercepto se obtuvieron los valores de ΔH° y ΔS° , respectivamente. El valor negativo de

ΔG° observado para todas las temperaturas, indica que el proceso de adsorción es espontáneo en esas condiciones.

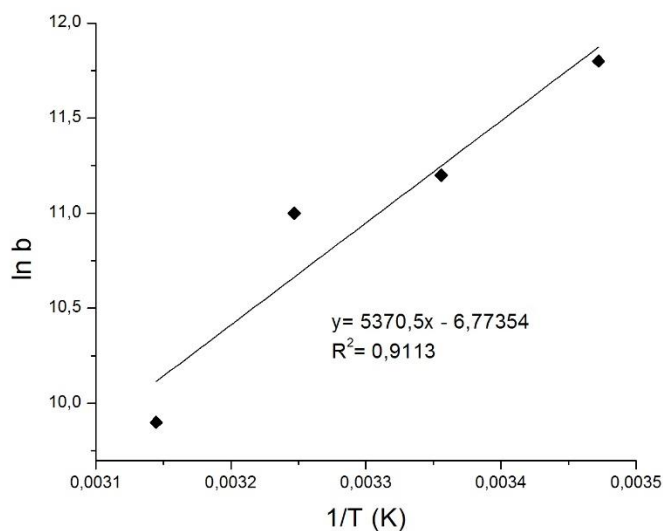


Figura 14. Gráfico de van't Hoff.

El valor negativo para la entalpía muestra un proceso exotérmico. En la literatura se ha reportado que para valores de ΔH° menores a 20 kJ/mol y superiores a 80 o 200 kJ/mol ^[103] se estima una fisisorción y quimisorción, respectivamente. ^[103, 104] El valor observado para ΔH° (-44,65 kJ mol⁻¹) sugiere que el proceso que predomina corresponde más a una quimisorción que una fisisorción, esto podría explicarse ya que ambos procesos se encuentran presentes debido a las asociaciones antes mencionadas sobre la superficie, sin embargo, es posible que en la primera capa adsorbida predomine la quimisorción. El valor negativo de ΔS° revela que las moléculas pierden el grado de libertad traslacional y rotacional, sufriendo una restricción en el movimiento. En la Tabla 4, se resumen los valores de los parámetros termodinámicos encontrados.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos ΔH° , ΔS° y ΔG° para la adsorción de morina sobre las nanopartículas de sílice a 288, 298, 308 y 318 K.

ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)			
		288 K	298 K	308 K	318 K
-44,65	-56,3	-28,25	-27,75	-28,17	-26,17

Como se mencionó, postulamos que la adsorción involucra la formación de más que una monocapa, mas no multicapas, ya que en experimentos previos, se demostró que la desorción no se correlaciona con una adsorción en multicapas si no que más bien es una asociación que se va liberando y al parecer sólo deja una capa de dímeros en la superficie.

10.7. EVALUACIÓN DEL MEDIO DE DISPERSIÓN

10.7.1. ESTABILIDAD DEL SISTEMA NANOPARTÍCULA – GEL

Con el fin de determinar el comportamiento y estabilidad del sistema Gel-NP, se pusieron en contacto, en una batería de viales A y B, cada uno de los geles con las nanopartículas suspendidas en EtOH (batería A) y una solución de glicerina al 10% (batería B). En la batería A, el sistema carbomer-nanopartícula (Carbomer-NP) fue inestable, observándose una evidente separación entre las NP y el gel, presentando un floculado de NP; el sistema hidroxietilcelulosa-nanopartícula (HEC-NP) también presentó una separación y evidente inestabilidad, observándose una aglomeración de NP en diferentes zonas del gel. Por otra parte, los sistemas polivinilpirrolidona-nanopartícula (PVP-NP) y quitosano-nanopartículas (QUIT-NP) no mostraron problemas de inestabilidad aparente, sin observarse los fenómenos antes descritos. En la batería B, el único sistema que presentó inestabilidad fue el sistema carbomer-NP, en donde se observó separación y presencia de flóculos. En el resto de los sistemas no se observaron indicios de inestabilidad.

Por otro lado, en los experimentos realizados al sistema Gel-NP-MOR, las muestras con el gel de carbomer fueron las únicas inestables, mostrando nuevamente el fenómeno descrito anteriormente.

En los sistemas con carbomer, se evidenció una gran inestabilidad, esto se debe principalmente a diferencias en las cargas superficiales, ya que las nanopartículas poseen una naturaleza positiva y el gel de carbomer una carga negativa, presentando inestabilidad, incluso en sistemas con morina adsorbida, sugiriendo que el flavonoide en estudio no generó grandes cambios en la carga superficial de las nanopartículas que mejoren la estabilidad del sistema frente al carbomer. Los sistemas de HEC, QUIT y PVP con nanopartículas con morina adsorbida, fueron estables. Es importante señalar que al agregar nanopartículas a los geles estudiados, se observó un aumento en la viscosidad relativa (Fig. 15), sin embargo, esto no significa una desventaja.

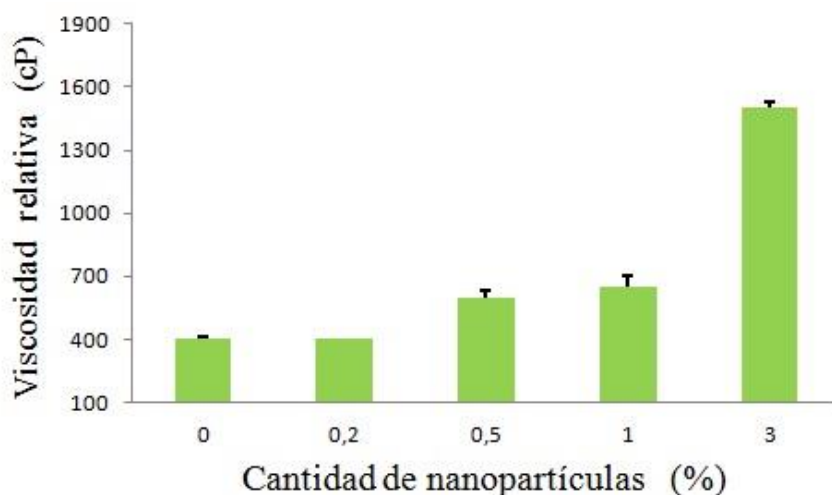


Figura 15. Viscosidad relativa del gel HEC al 1% con nanopartículas de sílice incorporadas. Los valores son el promedio de $n = 3$ (promedio \pm SD).

10.7.2. CESIÓN DE MORINA ADSORBIDA DESDE LAS NANOPARTÍCULAS

Las soluciones de glicerina, tanto al 5% como al 10%, no generaron un efecto sobre la cesión de morina y las soluciones de polisorbato al 0,5%, 1%, 2% y 5%, tuvieron un efecto despreciable sobre la ésta. La cesión generada por las soluciones de laurilsulfato de sodio no superó el 3% en cada concentración. Por otra parte, la remoción de morina con cloruro de

benzalconio fue más significativa, alcanzando valores promedio de 24% de desorción de morina en las diversas concentraciones evaluadas, observándose una tendencia a aumentar la desorción a medida que la concentración aumenta (Fig. 16).

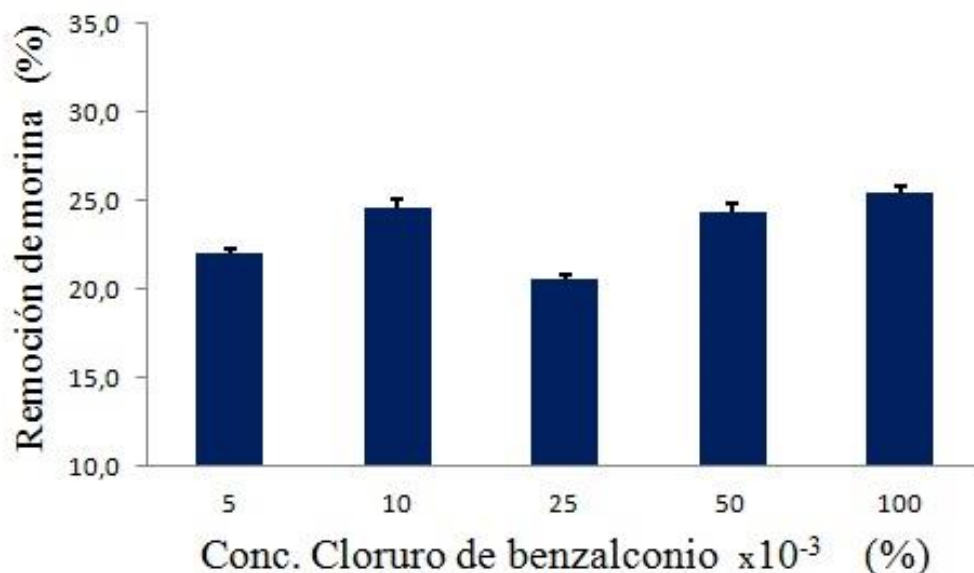


Figura 16. Efecto del cloruro de benzalconio sobre la remoción de morina adsorbida.

Este comportamiento puede explicarse debido a la leve carga negativa de la morina adsorbida, capaz de interactuar con el cloruro de benzalconio (de naturaleza positiva), provocando una mayor desorción respecto a los demás constituyentes. Resulta interesante mencionar que cuando el sistema NP-MOR se dejó en contacto con los diferentes medios de dispersión estudiados, la remoción de morina sólo ocurre una sola vez, es decir, la morina que no es removida es retenida irreversiblemente. Lo descrito, es consistente con los valores de los parámetros termodinámicos encontrados, sugiriendo que una primera capa de morina es adsorbida mediante una quimisorción y el resto que puede ser removido fácilmente, corresponde a fisorción.

Con el fin de corroborar lo anteriormente descrito, se evaluó la desorción de morina en el tiempo y alta temperatura (60 – 70°C), utilizando como medio de dispersión etanol y una

solución de cloruro de benzalconio al 0,1%. Como resultado, se liberó una pequeña cantidad de morina (los datos no se muestran), dejando la capa de morina adsorbida irreversiblemente, durante el tiempo restante que se monitoreo la cesión (5 semanas).

En la Tabla 5, se resumen el efecto de los distintos constituyentes de formulaciones estudiados.

Tabla 5. Efecto de diversos constituyentes, típicos en emulsiones de uso farmacéutico y cosmético, sobre la adsorción de FLAV. – (No genera efecto); + (Afecta levemente); ++ (Afecta moderadamente); +++ (Afecta mayormente).

Constituyentes típicos en una emulsión	Efecto sobre la adsorción de FLAV	mg MORad./100mg SNP (inicial)	mg MORad./100mg SNP (Final)
Glicerina 10%	-	2	2
Tween 2%	++	2	1,90
Laurilsulfato de sodio 0,5%	+	2	1,98
Cloruro de benzalconio 0,05%	+++	2	1,60

10.8. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

10.8.1. ENSAYO DE REACTIVIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON MORINA ADSORBIDA, FRENTE AL RADICAL HIDROXILO MEDIANTE LA METODOLOGÍA *SPIN-TRAPPING*

Se estudió la reactividad de nanopartículas con morina adsorbida frente al radical hidroxilo generado por fotólisis de agua oxigenada al 10%. Se realizó un control con DMPO 200 mM (50 μ L), agua oxigenada 10% (50 μ L) y glicerina al 10% (50 μ L). Posteriormente, se reemplazó el volumen de glicerina por una solución de morina 0,11 mM (solución 1), de nanopartículas 6800 mg/L (solución 2) y de nanopartículas con morina adsorbidas 0,11mM (solución 3). Con el propósito de evaluar la posible degradación fotolítica (en ausencia de

radical hidroxilo) de los componentes del sistema, se realizó un ensayo con morina (morina 0,11 mM (50 μ L) + DMPO 200 mM (50 μ L) + agua nanopura (50 μ L)), generándose el aducto de DMPO-OH• en una pequeña cantidad, 10% de la señal del control, la cual fue descontada de la intensidad de todas las demás señales medidas. La presencia de glicerina en el medio generó un patrón de señales de seis líneas, el cual fue constante en intensidad en todos los espectros de los ensayos, razón por la cual el análisis se volvió independiente de estas señales (Fig. 17A).

Con el propósito de evaluar el aporte a la actividad *scavenging*, de la adsorción de morina sobre las NP, se realizó la medición de la capacidad antioxidante de cada componente de manera independiente; los resultados mostraron que las NP presentan capacidad de *scavenging* del radical hidroxilo (Fig. 17C). Por otro lado, la capacidad de *scavenging* para las NP con morina adsorbida (Fig. 17D) aumenta en un 57% respecto a la de morina sola en solución (a igual concentración) (Fig. 17B), dando cuenta de la existencia de un efecto sinérgico entre la morina adsorbida y las nanopartículas.

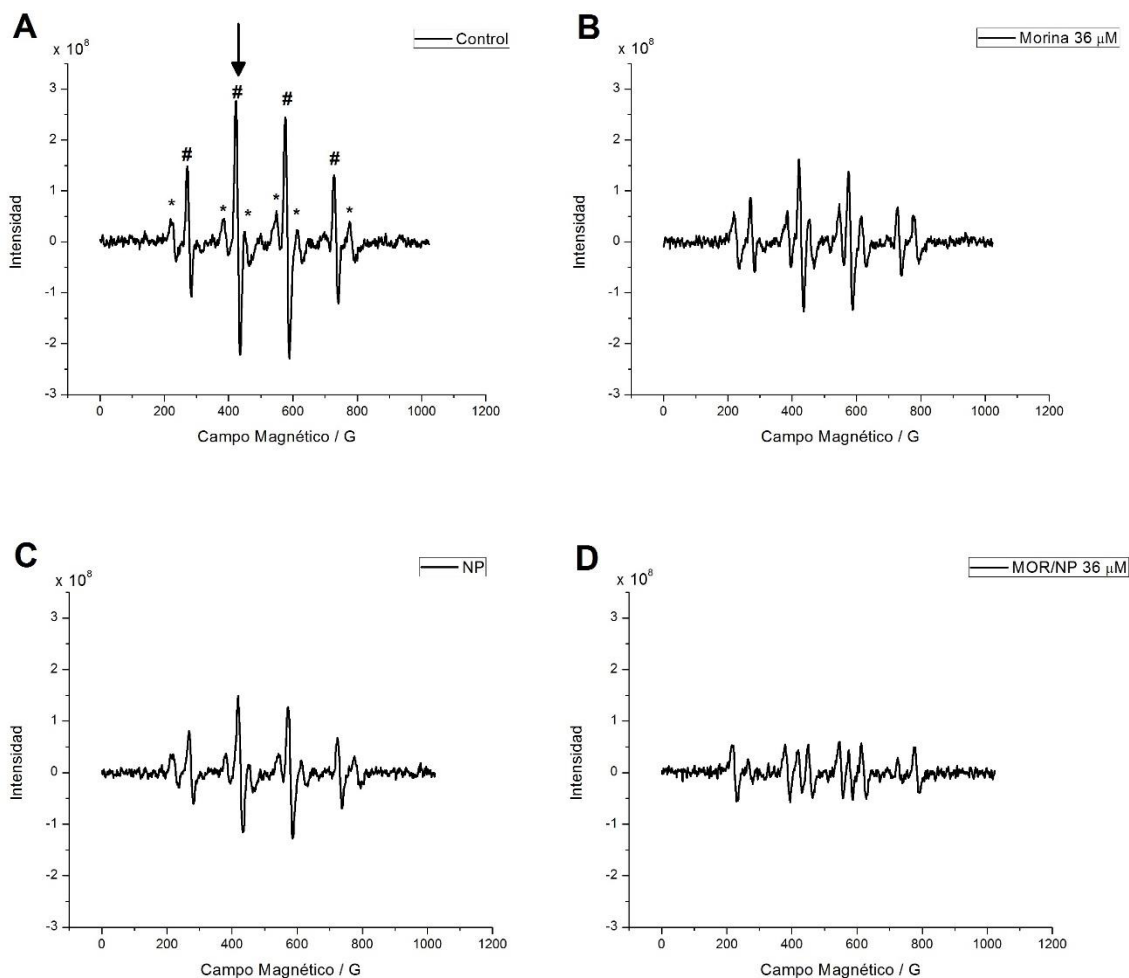


Figura 17. Espectro EPR de (A) Control (DMPO + H₂O₂ + glicerina 10%); (B) morina (DMPO + H₂O₂ + morina 0,11 mM / glicerina 10%); (C) Nanopartículas (DMPO + H₂O₂ + NP 6800 mg/L / glicerina 10%); (D) morina adsorbida sobre nanopartículas (DMPO + H₂O₂ + morina 0,11 mM/NP 6800 mg/L / glicerina 10%). En el espectro (A) se señala con (#) la señal correspondiente al aducto DMPO/HO•, (*) la señal correspondiente al aducto DMPO/glicerina; la flecha indica el pico que se empleó para el análisis de cada espectro.

La actividad de *scavenging* de cada derivado fue estimada mediante la comparación de la señal del aducto DMPO-HO• en la reacción antioxidante-radical en la suspensión y/o solución de estudio y la reacción del control al mismo tiempo de reacción, y se expresó como porcentaje de disminución del radical hidroxilo. En la Tabla 6 se resumen estos porcentajes.

Tabla 6. Porcentaje de disminución de la intensidad de la señal con respecto al control. Los valores son expresados como el promedio \pm SD, de tres ensayos independientes ($p < 0,05$).

	Conc. en celda	Porcentaje de disminución*
morina	36 μ M	40,9 \pm 0,8
Nanopartículas	2267 mg/L	27,7 \pm 2,2
morina /Nanopartículas	18 μ M	60,5 \pm 3,9
	36 μ M	72,1 \pm 2,3

* *Porcentaje de disminución* = $\left[\frac{(I_{control} - I_x)}{I_x} \right] \times 100\%$, donde I_x es la intensidad de la señal del sistema con morina y/o nanopartículas e $I_{control}$ es la intensidad de la señal del control.

También se realizó un ensayo con concentraciones crecientes de morina, manteniendo constante la concentración de NP (Fig. 18), donde se observa que el aumento en la concentración en celda, de morina adsorbida sobre las nanopartículas, se traduce en un incremento de la capacidad antioxidante, que no es lineal con respecto a la concentración.

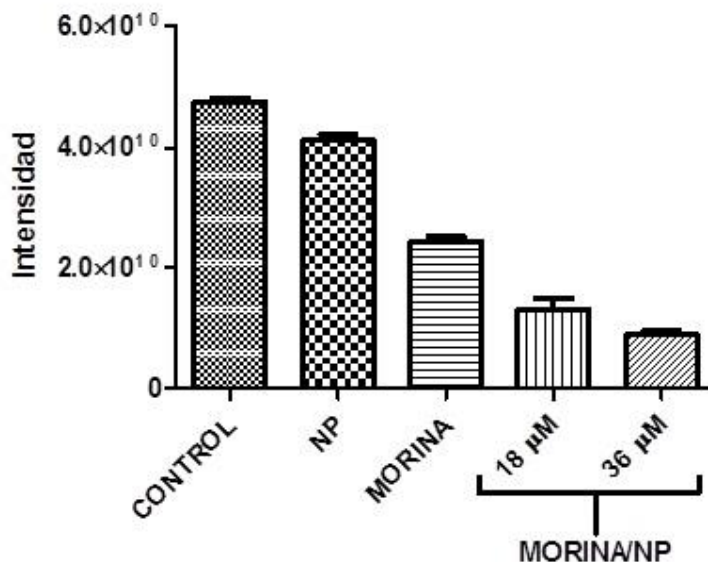


Figura 18. Gráfico de barras con las intensidades absolutas del control (0 μ M morina en celda), nanopartículas (NP) (0 μ M morina en celda), solución de morina en glicerina al 10% (36 μ M en celda), morina adsorbida en NP a dos concentraciones (18 μ M y 36 μ M en celda).

11. CONCLUSIONES

La cantidad máxima de morina adsorbida en NP de sílice funcionalizadas con NH_2 fue entre 10-20 mg g^{-1} , la cual podría ser aumentada, cambiando el tipo de funcionalización y/o controlando otras propiedades superficiales de las nanopartículas. Además, sería de importancia establecer con mayor certeza, de qué forma se une la morina a la cadena aminopropil.

El uso de isothermas de adsorción, de modelos cinéticos y termodinámicos, proporcionaron un acercamiento al mecanismo de adsorción. Aunque los modelos matemáticos ajustaron de buena forma los datos experimentales, sólo el modelo de isoterma de Langmuir y el de Freundlich mostraron consistencia entre lo experimental y lo teórico. Los resultados sugieren que la adsorción es de carácter espontáneo y es posible que el proceso siga una dinámica en donde se adsorbe mediante quimisorción, una primera capa de morina y luego sobre ésta, estructuras apiladas (dímeros o asociaciones) que forman una capa extra en ciertas zonas de las nanopartículas, pudiendo interactuar entre sí o no, adsorbiéndose mediante fisorción, lo que requiere mayores pruebas y experimentos para aseverarlo.

Los resultados muestran que una solución de glicerina al 10% puede constituir un medio de dispersión adecuado para el sistema NP-MOR, ya que no afecta su composición, al igual que agentes viscosantes de naturaleza catiónica y/o no iónica. Lo anterior genera bases fundamentales para un posible estudio de preformulación de un producto y/o una formulación de uso tópico.

Las MSNPs, poseen una actividad *scavenging* intrínseca frente al radical hidroxilo, lo que limita en cierta forma su uso como vehículo de entrega ya que se pierde la propiedad inerte de un vehículo farmacéutico. Sin embargo, permite tener un precedente importante para utilizarlo como protector de alguna molécula funcionalizada sobre las nanopartículas, potenciar su actividad antioxidante y entregar una molécula de forma inalterada; pudiendo ser incluidos en formulaciones tópicas con importante potencialidad protectora de diversos desórdenes cutáneos, entre ellos el cáncer.

12. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*. 1998;18:1995-2018.
- [2] Tanwar B, Modgil R. FLAVONOIDS: DIETARY OCCURRENCE AND HEALTH BENEFITS. *Spatula DD*. 2012;2:59-68.
- [3] Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 1999;65:337-53.
- [4] Haytowitz D, Bhagwat S, Holden J. Sources of variability in the flavonoid content of foods. *Procedia Food Science*. 2013;2:46-51.
- [5] Liu Z-h, Kanjo Y, Mizutani S. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. *Water Research*. 2010;44:567-77.
- [6] Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002;13:572-84.
- [7] Vermerris W, Nicholson RL. *Phenolic compound biochemistry*: Springer Science & Business Media; 2007.
- [8] Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*. 2002;96:67-202.
- [9] Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological research*. 2010;165:496-504.
- [10] Behloul N, Wu G. Genistein: a promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *European journal of pharmacology*. 2013;698:31-8.
- [11] Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45:2821-31.
- [12] Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il farmaco*. 2001;56:683-7.
- [13] Moreira AC, Silva AM, Santos MS, Sardão VA. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;143:61-71.
- [14] Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*. 1984;219:1.
- [15] Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;29:222-30.

- [16] Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;49:503-15.
- [17] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 1997;82:291-5.
- [18] Pattison DI, Davies MJ. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Cancer: cell structures, carcinogens and genomic instability*: Springer; 2006. p. 131-57.
- [19] Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2003;147:137-45.
- [20] de Grujil FR. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin pharmacology and applied skin physiology*. 2001;15:316-20.
- [21] López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*. 2013;763:1-10.
- [22] Takashima M, Horie M, Shichiri M, Hagihara Y, Yoshida Y, Niki E. Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;52:1242-52.
- [23] Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. 2005;92:235-54.
- [24] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53:1841-56.
- [25] Movileanu L, Neagoe I, Flonta ML. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. *International journal of pharmaceutics*. 2000;205:135-46.
- [26] Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50:47-60.
- [27] Mohanty C, Sahoo SK. The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials*. 2010;31:6597-611.
- [28] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin–phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *International journal of pharmaceutics*. 2007;330:155-63.
- [29] Gang W, Jie WJ, Ping ZL, Ming DS, Ying LJ, Lei W, et al. Liposomal quercetin: evaluating drug delivery in vitro and biodistribution in vivo. *Expert opinion on drug delivery*. 2012;9:599-613.
- [30] Carlotti M, Sapino S, Ugazio E, Caron G. On the complexation of quercetin with methyl- β -cyclodextrin: photostability and antioxidant studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2011;70:81-90.

- [31] Costantino U, Ambrogi V, Nocchetti M, Perioli L. Hydrotalcite-like compounds: versatile layered hosts of molecular anions with biological activity. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008;107:149-60.
- [32] Kazakova O, Gun'ko V, Lipkovskaya N, Voronin E, Pogorelyi V. Interaction of quercetin with highly dispersed silica in aqueous suspensions. *Colloid Journal*. 2002;64:412-8.
- [33] Fedyanina T, Barvinchenko V, Lipkovskaya N, Pogorelyi V. The effect of complexation with biopolymers on the adsorption of quercetin on silica. *Colloid journal*. 2008;70:215-20.
- [34] Ambrogi V, Perioli L, Marmottini F, Latterini L, Rossi C, Costantino U. Mesoporous silicate MCM-41 containing organic ultraviolet ray absorbents: Preparation, photostability and in vitro release. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2007;68:1173-7.
- [35] Parida SK, Mishra BK. Adsorption of styryl pyridinium dyes on silica gel. *Journal of colloid and interface science*. 1996;182:473-7.
- [36] Parida S, Mishra B. Adsorption of styryl pyridinium dyes on polyethylene-glycol-treated silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1998;134:249-55.
- [37] Bardina I, Kovaleva N, Nikitin YS. Surface properties of initial and polyethylene glycol modified silica gels. *RUSSIAN JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C/C OF ZHURNAL FIZICHESKOI KHIMII*. 2001;75:442-5.
- [38] Etienne M, Walcarius A. Analytical investigation of the chemical reactivity and stability of aminopropyl-grafted silica in aqueous medium. *Talanta*. 2003;59:1173-88.
- [39] Parida SK, Dash S, Patel S, Mishra B. Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2006;121:77-110.
- [40] Hassanien MM, Abou-El-Sherbini KS. Synthesis and characterisation of morin-functionalised silica gel for the enrichment of some precious metal ions. *Talanta*. 2006;68:1550-9.
- [41] Zhang B, Xing J, Lang Y, Liu H. Synthesis of amino-silane modified magnetic silica adsorbents and application for adsorption of flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Science in China Series B: Chemistry*. 2008;51:145-51.
- [42] Ambati J, Lopez A, Cochran D, Wattamwar P, Bean K, Dziubla T, et al. Engineered silica nanocarriers as a high-payload delivery vehicle for antioxidant enzymes. *Acta biomaterialia*. 2012;8:2096-103.
- [43] Özyürek M, Güngör N, Baki S, Güçlü K, Apak Ra. Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *Analytical chemistry*. 2012;84:8052-9.

- [44] Cao X, Fu M, Wang L, Liu H, Deng W, Qu R, et al. Oral bioavailability of silymarin formulated as a novel 3-day delivery system based on porous silica nanoparticles. *Acta biomaterialia*. 2012;8:2104-12.
- [45] Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, Lin VS-Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60:1278-88.
- [46] Xia T, Kovoichich M, Liong M, Meng H, Kabehie S, George S, et al. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS nano*. 2009;3:3273-86.
- [47] Hom C, Lu J, Liong M, Luo H, Li Z, Zink JJ, et al. Mesoporous silica nanoparticles facilitate delivery of siRNA to shutdown signaling pathways in mammalian cells. *Small*. 2010;6:1185-90.
- [48] Berlier G, Gastaldi L, Ugazio E, Miletto I, Iliade P, Sapino S. Stabilization of quercetin flavonoid in MCM-41 mesoporous silica: positive effect of surface functionalization. *Journal of colloid and interface science*. 2013;393:109-18.
- [49] Bose S, Michniak-Kohn B. Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;48:442-52.
- [50] Wang S, Su R, Nie S, Sun M, Zhang J, Wu D, et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014;25:363-76.
- [51] Pickering SU. CXCVI.-Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1907;91:2001-21.
- [52] Chevalier Y, Bolzinger M-A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013;439:23-34.
- [53] Luo Z, Murray BS, Ross A-L, Povey MJ, Morgan MR, Day AJ. Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012;92:84-90.
- [54] Dickinson E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*. 2012;24:4-12.
- [55] Berlier G, Gastaldi L, Sapino S, Miletto I, Bottinelli E, Chirio D, et al. MCM-41 as a useful vector for rutin topical formulations: Synthesis, characterization and testing. *International journal of pharmaceutics*. 2013;457:177-86.
- [56] Sapino S, Ugazio E, Gastaldi L, Miletto I, Berlier G, Zonari D, et al. Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: characterization and in vitro studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;89:116-25.

- [57] Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Dorta DJ, dos Santos AC, Fonseca MJ. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2006;84:21-7.
- [58] Paleco R, Vučen SR, Crean AM, Moore A, Scalia S. Enhancement of the in vitro penetration of quercetin through pig skin by combined microneedles and lipid microparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2014;472:206-13.
- [59] Vicentini FT, Simi TR, Del Ciampo JO, Wolga NO, Pitol DL, Iyomasa MM, et al. Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;69:948-57.
- [60] Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Borin MF, Lopez RF, Fonseca MJ. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International journal of pharmaceutics*. 2007;328:183-90.
- [61] Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*. 2008;41:1060-6.
- [62] Atarés L, Marshall LJ, Akhtar M, Murray BS. Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure. *Food chemistry*. 2012;134:1418-24.
- [63] Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Matsuo K, Arimori A, et al. Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials*. 2011;32:2713-24.
- [64] Larese Filon F, Mauro M, Adami G, Bovenzi M, Crosera M. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015;72:310-22.
- [65] Morales J, Günther G, Zanooco AL, Lemp E. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical–experimental study. *PloS one*. 2012;7:e40548.
- [66] Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49:2774-9.
- [67] Amić D, Davidović-Amić D, Bešlo D, Trinajstić N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta*. 2003;76:55-61.
- [68] Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of colloid and interface science*. 1968;26:62-9.
- [69] Green D, Lin J, Lam Y-F, Hu M-C, Schaefer DW, Harris M. Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*. 2003;266:346-58.

- [70] Park SK, Do Kim K, Kim HT. Preparation of silica nanoparticles: determination of the optimal synthesis conditions for small and uniform particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2002;197:7-17.
- [71] Limousin G, Gaudet J-P, Charlet L, Szenknect S, Barthes V, Krimissa M. Sorption isotherms: a review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*. 2007;22:249-75.
- [72] Chen Y, Zhang D. Adsorption kinetics, isotherm and thermodynamics studies of flavones from *Vaccinium Bracteatum* Thunb leaves on NKA-2 resin. *Chemical Engineering Journal*. 2014;254:579-85.
- [73] Liu R, Yang J, Wu X, Hua S, Sun C. Interaction of morin with CTMAB: aggregation and location in micellar. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2001;57:2561-6.
- [74] Liu W, Guo R. The interaction between morin and CTAB aggregates. *Journal of colloid and interface science*. 2005;290:564-73.
- [75] Jelley EE. Spectral absorption and fluorescence of dyes in the molecular state. *Nature*. 1936;138:1009-10.
- [76] Eisfeld A, Briggs J. The J-and H-bands of organic dye aggregates. *Chemical Physics*. 2006;324:376-84.
- [77] Benthami K, Lyazidi SA, Haddad M, Choukrad M, Bennetau B, Shinkaruk S. Photophysics of Genistein isoflavone: Solvent and concentration effects studied by UV-visible spectroscopy and theoretical simulation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;74:385-90.
- [78] Bustos PL, E; Morales, J. Incorporación de flavonoides en nanopartículas de sílice: Caracterización y evaluación de la eficiencia antioxidante. Universidad de Chile. 2013.
- [79] Rosu M-C, Suci R-C, Mihet M, Bratu I. Physical-chemical characterization of titanium dioxide layers sensitized with the natural dyes carmine and morin. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 2013;16:1551-7.
- [80] Panhwar QK, Memon S, Bhangar M. Synthesis, characterization, spectroscopic and antioxidation studies of Cu (II)-morin complex. *Journal of molecular structure*. 2010;967:47-53.
- [81] Kamiya H, Mitsui M, Takano H, Miyazawa S. Influence of Particle Diameter on Surface Silanol Structure, Hydration Forces, and Aggregation Behavior of Alkoxide-Derived Silica Particles. *Journal of the American Ceramic Society*. 2000;83:287-93.
- [82] Pena-Alonso R, Rubio F, Rubio J, Oteo J. Study of the hydrolysis and condensation of γ -Aminopropyltriethoxysilane by FT-IR spectroscopy. *Journal of materials science*. 2007;42:595-603.

- [83] Rahman I, Jafarzadeh M, Sipaut C. Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Ceramics International*. 2009;35:1883-8.
- [84] Pasternack RM, Rivillon Amy S, Chabal YJ. Attachment of 3-(aminopropyl) triethoxysilane on silicon oxide surfaces: dependence on solution temperature. *Langmuir*. 2008;24:12963-71.
- [85] Kim J, Seidler P, Wan LS, Fill C. Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates. *Journal of colloid and interface science*. 2009;329:114-9.
- [86] Kim J, Seidler P, Fill C, Wan LS. Investigations of the effect of curing conditions on the structure and stability of amino-functionalized organic films on silicon substrates by Fourier transform infrared spectroscopy, ellipsometry, and fluorescence microscopy. *Surface Science*. 2008;602:3323-30.
- [87] Cheng F, Sajedin SM, Kelly SM, Lee AF, Kornherr A. UV-stable paper coated with APTES-modified P25 TiO₂ nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. 2014;114:246-52.
- [88] Acres RG, Ellis AV, Alvino J, Lenahan CE, Khodakov DA, Metha GF, et al. Molecular structure of 3-aminopropyltriethoxysilane layers formed on silanol-terminated silicon surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2012;116:6289-97.
- [89] Tseng R-L, Wu F-C, Juang R-S. Characteristics and applications of the Lagergren's first-order equation for adsorption kinetics. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2010;41:661-9.
- [90] Azizian S. Kinetic models of sorption: a theoretical analysis. *Journal of colloid and Interface Science*. 2004;276:47-52.
- [91] Ho Y-S, McKay G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process biochemistry*. 1999;34:451-65.
- [92] Ho Y-S. Review of second-order models for adsorption systems. *Journal of hazardous materials*. 2006;136:681-9.
- [93] Liu Y, Liu Y-J. Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. *Separation and Purification Technology*. 2008;61:229-42.
- [94] Allen S, McKay G, Porter J. Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004;280:322-33.
- [95] Yildirim H. *Surface chemistry of solid and liquid interfaces*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2006.
- [96] Hall KR, Eagleton LC, Acrivos A, Vermeulen T. Pore-and solid-diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*. 1966;5:212-23.

- [97] Allen SJ, Gan Q, Matthews R, Johnson PA. Comparison of optimised isotherm models for basic dye adsorption by kudzu. *Bioresource Technology*. 2003;88:143-52.
- [98] Porter J, McKay G, Choy K. The prediction of sorption from a binary mixture of acidic dyes using single-and mixed-isotherm variants of the ideal adsorbed solute theory. *Chemical Engineering Science*. 1999;54:5863-85.
- [99] Ho Y-S, Ofomaja AE. Kinetics and thermodynamics of lead ion sorption on palm kernel fibre from aqueous solution. *Process biochemistry*. 2005;40:3455-61.
- [100] Deka H, Saikia MD. Structural and thermodynamic factors on adsorptive interaction of certain flavonoids onto polymeric resins and activated carbon. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015.
- [101] Pal S, Ghorai S, Das C, Samrat S, Ghosh A, Panda AB. Carboxymethyl tamarind-g-poly (acrylamide)/silica: a high performance hybrid nanocomposite for adsorption of methylene blue dye. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2012;51:15546-56.
- [102] Deiters UK. The isothermal van't Hoff equation for phase equilibria—A forgotten relation? *Fluid Phase Equilibria*. 2012;336:22-7.
- [103] Liu Y. Is the free energy change of adsorption correctly calculated? *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2009;54:1981-5.
- [104] Atkins P. *Physical Chemistry*. 6th. Oxford University Press; 1998.