



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES O/W
CON NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON
FLAVONOIDE ADSORBIDO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

VANESA ANTONIETA FLORES VALDENEGRO

Patrocinante y Director
Prof. Olosmira Correa Briones
Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéuticas

Director de Memoria
Prof. Javier Morales Valenzuela
Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéuticas

Santiago de Chile
2018

“Todos los cambios vienen acompañados
de una fuerte sacudida.
No es el fin del mundo,
es el inicio de uno nuevo”

Todos recordamos nuestras vacaciones de dos meses cuando estábamos en el colegio o en la universidad, cuando volvíamos a clases, cuando había que volver a estudiar costaba retomar el ritmo, parecía como si no hubiésemos estudiado en años, pero habían sido unas ricas y merecidas vacaciones. ¿Qué pasaría si esos meses hubiesen sido realmente años, y en lugar de unas entretenidas vacaciones hubiese sido un *black out*?

Un *black out* sólo en tu casa. Tus vecinos siguen con luz, pero en la tuya no hay y nadie sabe por qué. Te preguntas; ¿si tu casa es tan sólida como las demás e hiciste todo lo que se supone que debías hacer para mantenerlas? ¿Porque se fue la luz?

Al parecer las bases no eran tan sólidas y el circuito eléctrico necesitaba mantención, pero estabas tan ocupado con otros asuntos que lo postergaste hasta que no se pudo más. Se quemaron los fusibles dejándote a oscuras; fue tanto tiempo que pasó en ese estado que hasta los sistemas de emergencia ya habían colapsado. Intentaste que los demás no se enteraran, fingiendo que nada pasaba, pero fue aún más agotador.

Cuando la oscuridad de tu casa ya fue evidente, todos buscaron un culpable, alguien a quien responsabilizar por el desastre. Pero el culpable no era nadie más que tú mismo.

En medio de esa oscuridad desconocías tu casa, se hizo aún más grande hasta sentirte perdido. Ya no encontrabas tus cajas con buenos recuerdos, tus archivos con todo lo que habías aprendido, por todo lo que habías trabajado... se perdieron.

Era la misma casa, pero en la oscuridad todo parecía más caótico, más grande, todo se hacía más difícil, aun cuando intentabas caminar a ciegas según lo que recordabas, te tropezabas como si todo hubiese cambiado de lugar.

Emergen de las sombras, los fantasmas y los miedos, se convierten en monstruos gigantes que no dejan en paz. Intentas, sigues tratando con los viejos esquemas, pero ya no consigues resultados, ya nada genera lo mismo, lo que conocías y te angustias. Tus vecinos, tu familia, tus amigos intentan ayudarte, tratan de darte de su propia luz, pero no es suficiente. Algunos te dicen que sólo tú puedes ayudarte, que es cuestión de fuerza de voluntad, pero tú sientes que lo has intentado todo, tampoco quisieras estar así pero ya nada tiene sentido. La mayoría no lo

entiende y saldrá de tu vida, pero otros, se quedarán y te acompañarán en silencio mientras dure la oscuridad.

Cuando te has dado cuenta de que lo conocido ya no lo es, cuando lo que existe ya no sirve, y que la única forma de arreglar todo, es demoler todo para volver a comenzar, es ahí cuando empieza a aclarar.

Poco a poco vas a construir nuevamente tu casa, esta vez con cimientos más sólidos, organizarás todo de nuevo, con un nuevo orden, e iras encontrando tus cajas de buenos recuerdos y emociones, incluso nuevos.

Sales del *black out*, los monstruos ya no son tan gigantes, ahora ya los conoces, aún asustan un poco pero no les temes ni te paralizan, ahora convives con ellos. Empiezas a recuperar la tranquilidad y el orden de tu casa, asumes los costos que provocó este *black out* en tu vida y los vas saldando poco a poco.

Finalmente, sólo queda una caja, la cual no habías podido abrir y permanecía bloqueada, por más que lo intentabas, incluso ya causaba rechazo intentarlo, todo lo que alguna vez estudiaste permanecía en esa caja, lo que en algún momento fue todo tu mundo estaba ahí, uno de tus sueños. Sí, porque también fue tu sueño, pero gracias a que estuvo bloqueada pudiste descubrir otras cajas con otros talentos y que hoy son parte de ti.

Egresé en diciembre del año 2013, pero el 19 de octubre del 2015 comenzó mi *black out*... y hoy al fin encontré la llave de esa caja, después de años sin estudiar, hoy me reencuentro con mi carrera, hoy se cumple uno de mis sueños, y en éstas páginas se escribe el final de un capítulo en mi vida, para empezar uno nuevo, y poder decir que soy Químico Farmacéutico de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a todos quienes integraron el Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, a Marianita, Peter, Sra. Miriam, Sra. Rafaela, Profesora Karina, Profesora Nella, Profesora Edda, Profesora Olosmira, Profesor Javier y mis compañeros de laboratorio, por hacer de mi lugar de trabajo un segundo hogar para mí.

No puedo dejar de mencionar especialmente a mis profesores guías, la profesora Olosmira Correa y el profesor Javier Morales, de quienes estaré eternamente agradecida, por creer en mí desde un principio, por orientarme y guiarme durante todo el proceso, por cada uno de sus consejos, por los conocimientos y las experiencias compartidas, pero por sobre todo por el apoyo en todo momento que me han brindado para retomar la carrera y finalizar mi memoria para obtener mi título.

A mis compañeros de laboratorio, Memito y Pancho Arriagada, por los gratos momentos compartidos día a día, tanto en el laboratorio como fuera de este. También por ayudarme siempre que lo necesité, ya sea en lo académico o en lo personal, escuchando y aconsejándome, pero especialmente agradezco la preocupación y la ayuda ofrecida cuando salí del laboratorio.

Sin duda, este proceso no hubiese sido posible sin la compañía de quienes fueron mis amigos durante mi última etapa de pregrado, a Macarena Filún, Max Rojas, Francisco Cuevas, Fernanda León, Viviana Mena, Aníbal Pacheco. Agradeceré por siempre cada experiencia y anécdotas compartidas, por brindarme su amistad, a pesar de que con algunos hayamos tomado caminos diferentes, agradezco haber coincidido, por todo lo enseñado y aprendido. Pero por sobre todo agradezco a quienes aún permanecen, y a mis amigos que se han ido sumando en esta ruta, a María José Villagra, Verónica Cruz y Cristopher Caro, por su apoyo incondicional en esta etapa, por creer en mí siempre y alentarme constantemente.

También quiero agradecer a Javier Campanini, por aparecer en el momento preciso, porque con su amor y pasión por nuestra profesión, me motivó y me recordó lo que significaba para mí ser farmacéutico, además de ayudarme constantemente cada vez que lo necesité.

A Francisco Román, por apoyarme y potenciar otras áreas de mi vida, por influenciar en parte, quizás a veces no de la mejor manera, la persona que soy ahora. Pero principalmente, por enseñarme que la pasión es la clave de todo, una vez tomadas las decisiones, cuando hay ganas todo es posible.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, a mis primos, tíos y abuelos por todo el cariño, el apoyo y por alentarme cuando más lo necesité. Pero por sobre todo, a mis padres, hermano y cuñada, por ser los pilares fundamentales de mi vida, porque sin ellos, nada de esto hoy sería posible, por sostenerme cuando más lo necesitaba y ayudarme a ponerme nuevamente de pie.

A mi cuñada, Valeria Pérez, por ser la hermana que nunca tuve, por esos abrazos incondicionales incluso cuando ni yo sabía que los necesitaba, por enseñarnos a todos a demostrar más cariño y afecto, pero agradezco especialmente, la preocupación, el cariño constante y por estar a mi lado cada vez que lo necesité.

A mi hermano, Esteban Flores, por ser el mejor hermano que pude tener, por ser tan tú, tan inteligente, tan capaz, pero por sobre todo un gran ser humano, a quien amo y admiro. Gracias por estar para mí siempre, por ayudarme incluso a estudiar en las noches cuando estaba más estresada, por escucharme y sostenerme cuando mis piernas flaqueaban, pero especialmente por tu amor incondicional, aunque sea a tu modo.

A mis padres, Eduvino Flores y Matilde Valdenegro, por sus infinitos esfuerzos para entregarme todo lo que he necesitado y he requerido para formar la mujer que soy, por su amor, por creer en mí, por su apoyo y por buscar siempre lo que creyeron mejor para mí. Agradezco a mi madre, por su infinita paciencia y dedicación, por cuidar de mí siempre, aunque pasen los años, por enseñarme a estudiar, a ser constante, metódica, y esforzada para conseguir mis objetivos, sin duda sin ella nada de esto sería posible, pero por sobre todo, enseñarme a ir tras eso por lo que mis ojos brillan. Y a mi padre, por regalarme siempre, por ser la niña de sus ojos, aunque ya sea un adulto, por enseñarme con su esfuerzo y determinación a enfrentar la vida con fuerza, a ser responsable y que lo importante en la vida no es caer, sino que saber levantarse, con la frente en alto y aprender de ello.

Gracias totales.

TABLA DE CONTENIDO

I.	ÍNDICE DE FIGURAS	viii
II.	ÍNDICE DE TABLAS	x
III.	RESUMEN.....	xi
IV.	SUMMARY	xii
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	ESTABILIDAD DE EMULSIONES.....	2
1.2.	AGENTES EMULSIFICANTES.....	3
1.3.	EMULSIONES PICKERING	4
1.4.	USO DE ANTIOXIDANTES	6
2.	DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA	8
3.	HIPÓTESIS.....	9
4.	OBJETIVO GENERAL	9
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
6.1.	REACTIVOS	10
6.2.	SOLVENTES.....	10
6.3.	EQUIPOS E INSTRUMENTOS.....	10
6.3.1.	AGITADOR MECÁNICO.....	10

6.3.2.	SOFTWARE PARA DISEÑO EXPERIMENTAL ESTADÍSTICO	11
6.3.3.	MICROSCOPIA OPTICA	11
6.3.4.	ANÁLISIS DE IMAGEN	11
6.3.5.	TENSIÓN INTERFACIAL.....	11
6.3.6.	CENTRÍFUGA.....	11
6.3.7.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	11
6.4.	METODOLOGÍA	12
6.4.1.	PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES	12
6.4.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ELABORACIÓN DE EMULSIONES	12
6.4.3.	PROCEDIMIENTO DEFINITIVO DE ELABORACIÓN DE EMULSIONES	15
6.4.4.	PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO	17
6.4.5.	ADSORCIÓN DE MORINA EN NANOPARTÍCULAS.....	17
6.4.6.	DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN INTERFACIAL.....	18
6.4.7.	CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	19
6.4.8.	CONTROL DE LA ESTABILIDAD	19
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
7.1.	PREPARACIÓN DE EMULSIONES	22
7.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL DE ELABORACIÓN DE EMULSIONES	23
7.3.	PROCEDIMIENTO DEFINITIVO DE ELABORACIÓN DE EMULSIONES	28

7.4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO Y CON MORINA ADSORBIDA.	29
7.5. EVALUACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL.....	31
7.6. EMULSIONES O/W ESTABILIZADAS CON NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MODIFICADAS CON GRUPO AMINO.....	32
7.7. EMULSIONES O/W ESTABILIZADAS CON 10% DE TENSOACTIVOS Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NPs	36
7.8. EMULSIONES O/W ESTABILIZADAS CON 4% DE NPs Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TENSOACTIVO.....	39
7.9. ESTABILIZACIÓN DE VITAMINA E, EN LA FASE INTERNA DE UNA EMULSIÓN O/W O.....	42
10.9.1. ESTABILIZACIÓN QUÍMICA DE LAS EMULSIONES: ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO PROTECTOR DE LAS NANOPARTÍCULAS CON MORINA ADSORBIDA SOBRE LA DEGRADACIÓN DE VITAMINA E.	45
8. CONCLUSIONES	47
9. REFERENCIAS	48

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de un flavonoide	6
Figura 2. Efecto de la velocidad de agitación rápida sobre el tamaño de glóbulo del primer diseño experimental, con agitador Global Lab.....	26
Figura 3. Análisis de la distribución de tamaño de partículas mediante amplitud relativa del primer diseño experimental.	26
Figura 4. Efecto de la velocidad de agitación rápida sobre el tamaño de glóbulo del segundo diseño experimental, con agitador Ultra-turrax y GlobalLab.....	27
Figura 5. Análisis de la distribución de tamaño de partículas mediante amplitud relativa del segundo diseño experimental, con agitador Ultra-turrax y GlobalLab.	27
Figura 6. Imagen SEM de nanopartículas con morina adsorbida.....	30
Figura 7. Fotografías de emulsiones preparadas con diferentes concentraciones de AMNPs. A. Emulsiones recién preparadas. B. Emulsiones a los 60 minutos.....	32
Figura 8. Fotografías de las muestras luego de ser sometidas a centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos.	33
Figura 9. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones aceite mineral/agua con diferentes concentraciones de AMNPs recién preparadas.	35
Figura 10. Fotografías de emulsiones preparadas con 10% de tensoactivos y con diferentes concentraciones de AMNPs. A. Emulsiones recién preparadas. B. Emulsiones a los 60 minutos.	36
Figura 11. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones aceite mineral/agua con 10% de tensoactivos y diferentes concentraciones de AMNPs recién preparadas.....	37

Figura 12. Fotografías de emulsiones preparadas con 4% AMNPs y con diferentes concentraciones de tensoactivos. A. Emulsiones recién preparadas. B. Emulsiones a los 60 minutos.	39
Figura 13. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones aceite mineral/agua con 4% de AMNPs y diferentes concentraciones de tensoactivo recién preparadas.	41
Figura 14. Fotografías de emulsiones preparadas con 100 % de tensoactivo (1), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs (2), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs-MOR. A) Emulsiones recién preparadas. B) Emulsiones almacenadas a temperatura ambiente, luego de dos meses. C) Emulsiones almacenadas a 40 C luego de dos meses.	42
Figura 15. Fotografías de las muestras luego de ser sometidas a centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos. A) Recién preparadas. B) Luego de dos meses almacenadas a temperatura ambiente.	43
Figura 16. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones preparadas con 100 % de tensoactivo (1), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs (2), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs-MOR. A) Emulsiones recién preparadas. B) Emulsiones almacenadas a temperatura ambiente, luego de dos meses. C) Emulsiones almacenadas a 40 C luego de dos meses.....	44
Figura 17. Cromatograma típico de Vitamina E extraída de las emulsiones preparadas.	45

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Composición emulsión.....	12
Tabla II. Diseño experimental 1, usando agitador Global Lab.	13
Tabla III. Diseño experimental 2, usando agitador Ultra turrax y agitador Global Lab.	14
Tabla IV. Fórmulas de las emulsiones desarrolladas incorporando sólo nanopartículas modificadas con grupo amino (AMNPs).....	15
Tabla V. Fórmulas de las emulsiones desarrolladas utilizando sólo el 10% de tensoactivos y diferentes concentraciones de nanopartículas con grupo amino.	15
Tabla VI. Fórmulas de las emulsiones desarrolladas utilizando 4% de nanopartículas y diferentes concentraciones de tensoactivos.	16
Tabla VII. Fórmula de las emulsiones desarrolladas con vitamina E (tocoferol).	16
Tabla VIII. Resultados diseño experimental con agitador Global Lab.....	24
Tabla IX. Resultados diseño experimental con agitador Ultra-turrax y Global Lab.....	25
Tabla X. Valores de potencial Z de nanopartículas dispersadas en soluciones acuosas a diferentes pH.....	29
Tabla XI. Tabla resumen de análisis a diferentes concentraciones de AMNPs.	33
Tabla XII. Tabla resumen de análisis a emulsiones con 10% de tensoactivos y con diferentes concentraciones de AMNPs	38
Tabla XIII. Tabla resumen de análisis a diferentes concentraciones de tensoactivos.	40

III. RESUMEN

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, debido al exceso de energía libre asociada al aumento de superficie durante la formación de los glóbulos de la fase interna, estos tienden a la coalescencia lo que ocasionará finalmente la separación del sistema. Para prolongar la estabilidad física de las emulsiones se utilizan diferentes sistemas, entre estos se ha estudiado el uso de nanopartículas (NPs). Por otra parte, las NPs pueden actuar como vehículo de flavonoides y otorgar un mejor rendimiento en términos de actividad antioxidante.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de las nanopartículas mesoporosas de sílice con la superficie modificada con grupo amino, para estabilizar físicamente una emulsión. Además de evaluar de manera preliminar su capacidad de otorgar estabilidad química a la emulsión cuando se adsorbe un flavonoide en su superficie.

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 y potencial zeta. Para evaluar la capacidad de las nanopartículas para estabilizar emulsiones, se prepararon emulsiones con y sin tensoactivos a diferentes concentraciones, comparando la distribución y el tamaño de glóbulo obtenido respectivamente, y la estabilidad de las fracciones emulsificadas. Para evaluar la capacidad de otorgar mayor estabilidad química a una emulsión con vitamina E, estas se sometieron a una degradación forzada con peróxido de hidrógeno, para posteriormente ser cuantificada mediante HPLC.

Los resultados mostraron que no se logra una estabilidad razonable al utilizar únicamente nanopartículas mesoporosas superficialmente modificadas con grupo amino como emulgente. Se logra un efecto sinérgico en la estabilización de un sistema bifásico, al utilizar tensoactivos y nanopartículas, a una concentración apropiada que permite la formación de una monocapa alrededor de la superficie de las nanopartículas. El estudio preliminar para evaluar la capacidad de otorgar estabilidad química a una emulsión reveló resultados promisorios dado que muestran un efecto protector frente a la degradación de la vitamina E contenida en el glóbulo.

IV. SUMMARY

EMULSIONS O/W STABILIZED BY SILICA NANOPARTICLES WITH FLAVONOID ADSORBED

Emulsions are thermodynamically unstable systems, due to the excess of free energy associated with the increase of surface during the formation of the globules of the internal phase, these tend to coalesce which will eventually cause the separation of the system. Diverse systems are used to prolong the physical stability of the emulsions among these the use of nanoparticles (NPs) has been studied. Furthermore, NPs can act as a vehicle for flavonoids and provide better performance in terms of antioxidant activity.

The objective of this work was to study the capacity of mesoporous silica nanoparticles with modified surface by amino group, to physically stabilize an emulsion. In addition to evaluating in a preliminary way its capacity to grant chemical stability to the emulsion when a flavonoid is adsorbed on its surface.

In order to carry out the procedure, mesoporous silica nanoparticles superficially modified with amino group were synthesized. By means of Batch experiments, nanoparticles with adsorbed morin were obtained, which were characterized by measuring the size, distribution and zeta potential. Emulsions with and without surfactants were prepared at different concentrations, comparing the distribution and globule size obtained respectively, and the stability of the emulsified fractions to evaluate the ability of nanoparticles to stabilize emulsions. So as to evaluate the ability to give greater chemical stability to an emulsion with vitamin E, these were subjected to a forced degradation with hydrogen peroxide, to be later quantified by HPLC.

The results showed that reasonable stability is not achieved by using only mesoporous nanoparticles superficially modified with amino group as emulsifier. A synergistic effect is achieved in the stabilization of a biphasic system, by using surfactants and nanoparticles, at an appropriate concentration that allows the formation of a monolayer around the surface of the nanoparticles. The preliminary study to assess the ability to give chemical stability to an emulsion revealed promising results since they show a protective effect against the degradation of vitamin E contained in the globule.

1. INTRODUCCIÓN

Una emulsión se define como un sistema disperso, constituido por una mezcla de dos o más líquidos inmiscibles entre sí, donde una de estas fases se encuentra distribuida en forma de glóbulos en el seno de la otra, denominándose fase interna (dispersa o discontinua) y fase externa (dispersante o continua), respectivamente.^{1,2} Desde el punto de vista termodinámico, las emulsiones son sistemas inestables, ya que la reducción del área interfacial por coalescencia es un proceso favorable que ocurre rápidamente. Sin embargo, desde el punto de vista farmacéutico y cosmético, se considera estable, cuando los glóbulos mantienen su tamaño y forma esférica permaneciendo uniformemente distribuidos en la fase continua durante un período de tiempo razonable, suficiente para su almacenamiento y uso.³ Para aumentar la estabilidad termodinámica de esta dispersión de glóbulos, se agrega un tercer agente, denominado emulsionante, el cual actúa mediante la formación de una película alrededor de los glóbulos de la fase dispersa.

La mayoría de las emulsiones farmacéuticas y cosméticas incluyen agua o una disolución acuosa, y aceite o una disolución orgánica.^{1,2} Que se disperse la fase acuosa o la oleosa depende principalmente del agente emulsionante que se emplee y de las cantidades relativas de las dos fases. Una emulsión en la cual el aceite está disperso como glóbulos en toda la fase acuosa se denomina emulsión aceite en agua (o/w). Cuando el agua es la fase dispersa y el aceite es la fase continua, la emulsión es del tipo agua en aceite (w/o). Además de estos dos tipos, existen emulsiones relativamente complejas, llamadas emulsiones múltiples, que son del tipo w/o/w u o/w/o. Estas se emplean según el efecto y la finalidad deseada.⁴ El tamaño de las partículas de la fase dispersa determina la apariencia de una emulsión, entre otras propiedades, el cual oscila habitualmente de 0,1 a 100 μm , otorgando para las macroemulsiones un aspecto opaco, usualmente blanco debido a su mayor tamaño.⁵ Estos sistemas son denominados genéricamente emulsiones, los cuales se subdividen en macroemulsiones, microemulsiones y nanoemulsiones, en función del tamaño de las partículas de la fase dispersa.²

Las emulsiones son ampliamente usadas en preparaciones farmacéuticas y cosméticas, otorgando múltiples ventajas, aumentando la capacidad de dispersión de los componentes, es posible enmascarar sabores y olores desagradables y así aumentar la tolerancia del paciente,

pueden proveer un medio para entregar fármacos poco solubles por vía enteral y parenteral, aumentando la absorción o la biodisponibilidad de éstos. Así también, las emulsiones tienen una importante ventaja sobre las preparaciones de solo una fase en cuanto al costo, ya que muchos lípidos y solventes usados para aplicación en el cuerpo humano son relativamente costosos y al “diluir” con una fase segura, de bajo costo como es el agua, resulta altamente conveniente desde el punto de vista económico.^{1,6}

Para garantizar que este tipo de forma de presentación sea adecuada como vehículo para administración de distintas sustancias activas, las emulsiones deben poseer ciertos atributos y causar un mínimo de problemas asociados, según el efecto y la finalidad deseada. La mayoría de las propiedades de las emulsiones, tales como estabilidad, viscosidad, etc., dependen del tamaño del glóbulo y la distribución de tamaño.² Por lo tanto, la preparación de la emulsión requiere un proceso de emulsificación, donde los parámetros físicos y químicos sean seleccionados y controlados por el formulador, para obtener las características requeridas y de manera reproducible. Como parámetros importantes en la elaboración de emulsiones, son destacables algunos factores importantes a tener en consideración, tales como la temperatura, el tiempo y la velocidad de mezclado, la composición y la cantidad de las fases, y el tipo de equipamiento. Por otra parte, es necesario caracterizar la emulsión, utilizando metodologías para determinar el tamaño de glóbulo y su distribución, el tipo de emulsión, sus propiedades reológicas como también realizar ensayos destinados a evaluar su estabilidad y durabilidad en el tiempo. Para esto último, se somete la emulsión a condiciones de estrés, las cuales incluyen almacenamiento por periodos determinados a condiciones extremas de temperatura, ciclos de temperatura y centrifugación.

1.1. ESTABILIDAD DE EMULSIONES

Existen varios procesos físicos y químicos que contribuyen a la desestabilización de una emulsión. Los principales fenómenos asociados con la estabilidad física de la emulsión son: La formación de cremado cuando se dejan en reposo, como consecuencia de la acción de la gravedad sobre la fase dispersa y de la diferencia de densidad entre las dos fases que constituyen la emulsión. Si la densidad de las gotas es mayor que la de la fase externa, se hundirán en la emulsión (sedimentación), mientras que si su densidad es menor tenderán a concentrarse en la

superficie (cremado o *creaming*). La formación de cremado no implica necesariamente la coalescencia ni la agregación de las gotas, y es un proceso reversible, pero se debe evitar ya que puede originar errores de dosificación, mala apariencia y facilitar la coalescencia y agregación. Para reducir la velocidad de cremado se debe obtener un menor tamaño de glóbulos en la emulsión, mejorar el método de elaboración, seleccionar un buen agente emulsificante, intentar disminuir la diferencia de densidad entre ambas fases y, por último, aumentar la viscosidad del medio externo.⁴ Otro fenómeno de inestabilidad es la floculación que consiste en la asociación de pequeños glóbulos para formar grandes agregados, que son redispersables ya que los glóbulos mantienen su identidad. La formación de estos agregados favorece la formación de cremado y además es un paso previo a la coalescencia, por ello interesa evitar este proceso mediante estabilización electrostática y estérica. Por otra parte, el crecimiento de Ostwald o difusión molecular es el proceso por el cual las gotas más pequeñas se solubilizan en las mayores, provocando un aumento del tamaño. Para evitar este proceso se debe obtener una distribución de tamaño homogénea. Y finalmente, la coalescencia es el proceso por el cual hay una fusión completa de los glóbulos, originando un descenso del número de éstos y, por consiguiente, la separación completa de las dos fases, produciéndose la ruptura de la emulsión. Esto se debe a que a pesar de la adición de un emulsionante persiste cierta tensión interfacial, por lo que el sistema busca la forma de minimizar el área interfacial, de forma espontánea.

Las emulsiones además pueden sufrir procesos de inestabilidad química, como incompatibilidades entre los distintos componentes, así también existe la posibilidad de una descomposición oxidativa de ciertos compuestos de la fase oleosa y de algunos fármacos o activos cosméticos, no sólo debido a la cantidad normal de aire disuelto en el líquido y la posible incorporación de aire durante la preparación del producto, sino también a la extensa superficie de interfase entre la fase oleosa y la acuosa.³

1.2. AGENTES EMULSIFICANTES

Como se mencionó anteriormente, para estabilizar una emulsión, se agrega un agente emulsificante, el cual actúa por uno o varios de los siguientes mecanismos: estabilización termodinámica al reducir la tensión interfacial, mediante la formación de una película interfacial que actúa como una barrera mecánica a la coalescencia, creando una barrera al acercamiento de

las gotas mediante estabilización electrostática y/o estérica, y mediante la modificación de las propiedades reológicas.

Se puede clasificar tres grandes grupos de agentes emulsificantes: coloides hidrofílicos, tensoactivos y sólidos finamente divididos. Los agentes emulsificantes coloides hidrofílicos si bien tienen una escasa actividad de superficie, el poder emulsificante se logra aumentando la viscosidad. Los agentes tensoactivos, son muy efectivos para reducir la tensión interfacial entre las fases oleosa y acuosa, debido a que la molécula posee propiedades hidrófilas como hidrófobas, lo cual se refleja en el balance hidrofílico-lipofílico (BHL). Los sólidos finamente divididos, son buenos emulsificantes ya que se adsorben en la interface y otorgan una estabilidad física al glóbulo, cuyo poder se cuantifica en términos de su capacidad de humectación a través del ángulo de contacto.⁶

1.3. EMULSIONES PICKERING

Debido a la importancia de obtener una emulsión estable, se han desarrollado diversos estudios buscando nuevas tecnologías. Percival S. Pickering en 1907,⁷ entregó el primer estudio que evidenció la estabilización de emulsiones o/w mediante el uso de partículas sólidas, las cuales se adsorben en la superficie del glóbulo de aceite, mostrando así la estabilidad mejorada de tales emulsiones con respecto a las emulsiones a base de tensoactivo. Cualquier tipo de emulsión estabilizada con partículas sólidas, son también llamadas Emulsiones de Pickering (*Pickering emulsions*)^{8, 9} por ser Pickering el primero en informar sobre éstas.

Las *Pickering emulsions* retienen las propiedades básicas de una clásica emulsión estabilizada por tensoactivo, pero la estabilización por partículas sólidas confiere propiedades específicas, tales como la alta resistencia a la coalescencia, siendo este el principal beneficio, así también la característica libre de surfactante (*surfactant-free*) las hace atractivas en varios campos de aplicación, en particular aplicaciones cosméticas y farmacéuticas, donde algunos surfactantes pueden causar efectos adversos¹⁰.

Las partículas sólidas necesariamente deben ser más pequeñas que los glóbulos de la emulsión, y es el mojamiento parcial de la superficie de las partículas sólidas por el agua y el aceite lo que origina el fuerte anclaje a la interface aceite-agua. Algunas partículas inorgánicas son más hidrofílicas en su superficie por lo cual requieren una modificación parcial de esta, para

asegurar la humectación tanto por el agua como el aceite, como es el caso de la sílica que es frecuentemente utilizada como partícula para estabilizar emulsiones. Existen varias estrategias para lograr su modificación, las cuales pueden estar basadas en el injerto químico de moléculas orgánicas o en la adsorción de diferentes tipos de moléculas. Aunque se prefiere el injerto químico por sobre la adsorción, ya que los injertos orgánicos se unen fuertemente a la superficie del sólido mediante enlaces químicos, mientras que las moléculas adsorbidas en equilibrio con las moléculas libres en solución pueden sufrir desorción cuando las condiciones de equilibrio son afectadas.¹⁰

En el año 2008, Ma y col.,¹¹ compararon la estabilización de una interfase aire-agua con respecto a una interface líquido-líquido mediante la interacción de tensoactivos y nanopartículas. Utilizaron un surfactante aniónico, dodecil sulfato de sodio (SDS) y surfactantes no iónicos, Triton X-100 y alquil éter de tetraetilenglicol. Ellos demostraron que la inclusión de nanopartículas de sílice hidrofílica cargada negativamente incrementa la estabilidad del SDS, pero no altera el desempeño de los surfactantes no iónicos, ya sea en la interface aire-agua o líquido-líquido.

Binks y Rodríguez en 2007,¹² analizaron el comportamiento de emulsiones o/w estabilizadas por una mezcla de nanopartículas de sílice con el surfactante catiónico CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio). Destacaron el sinergismo que se produce entre ellos, lo cual conduce a una mejora en la estabilidad de la emulsión. Para caracterizar la interacción entre los emulsificantes, utilizaron isoterma de adsorción, cryo-SEM, y análisis de ángulo de contacto.

Santini y col., en 2014,¹³ estudiaron la estabilización de emulsiones w/o mediante la interacción de nanopartículas de sílice y ácido palmítico, evaluando diferentes concentraciones del tensoactivo, realizando mediciones de la tensión interfacial en equilibrio y dinámica, y la estabilidad de la fracción emulsificada fue cuantificada en base a la evolución en el tiempo de la altura de la columna emulsionada, concluyendo que las condiciones mejoradas de estabilidad sólo son logradas cuando la cantidad de tensoactivo lleva a la formación de una monocapa sobre la superficie de las partículas, mientras que un exceso de tensoactivo, interactuando con las nanopartículas, podría llevar a la formación de multicapas y la asociación nanopartícula-tensoactivo podría ser redispersada en la fase acuosa.

Binks y Desforges en 2007,¹⁴ investigaron la estabilidad y reología de emulsiones o/w que contenían una mezcla de nanopartículas de sílice hidrofílica y surfactante no iónico, las cuales

se compararon con emulsiones estabilizadas con cada emulsificante por separado. Los autores resaltaron que la magnitud del efecto sinérgico observado depende del método de preparación.

1.4. USO DE ANTIOXIDANTES

Para contribuir a la estabilidad química de las emulsiones, específicamente las reacciones de oxidación, se utilizan agentes antioxidantes, los cuales se pueden clasificar en los dos grupos siguientes, antioxidantes fenólicos de síntesis, tales como hidroxianisolbutilado (BHA), hidroxitoluenobutilado (BHT) y alquil galatos; y antioxidantes naturales como tocoferoles, ácido ascórbico y palmitato de ascorbilo.¹

En la actualidad los flavonoides son los antioxidantes más promisorios de origen natural con aplicación en el área farmacéutica y cosmética.¹⁵ Estos son compuestos polifenólicos, distribuidos principalmente en frutas y vegetales.¹⁶ La estructura básica está formada por un esqueleto hidrocarbonado del tipo C₆-C₃-C₆ (difenílpirano), compuesto por dos anillos bencénicos (A y B) ligados a través de un anillo pirano (C) (Figura 1). Los diversos tipos de flavonoides derivan de la presencia de diferentes sustituyentes sobre los anillos.¹⁷ Sus efectos beneficiosos para la salud son atribuidos principalmente a su capacidad antioxidante y quelante, pudiendo inhibir procesos de peroxidación lipídica, presentando efectos antimutagénicos y capacidad de inhibir diversas enzimas, desempeñando un papel esencial en la protección de daño oxidativo producido por radicales libres y especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (ROS y RNS respectivamente).¹⁸

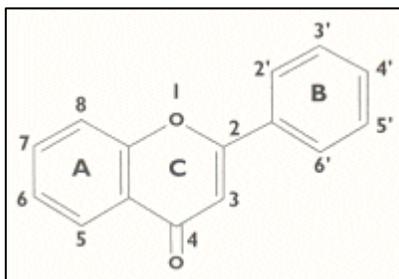


Figura 1. Estructura básica de un flavonoide¹⁹

Dadas las propiedades antioxidantes de los polifenoles y posibles efectos farmacológicos que derivan de ellas, surge la necesidad de desarrollar metodologías para su apropiada administración; no obstante, el principal problema para ello es su baja solubilidad en agua, lo cual condiciona su biodisponibilidad, y su inestabilidad química. Estrategias propuestas para inhibir la fotodegradación y aumentar la solubilidad de flavonoides en formulaciones farmacéuticas, han consistido 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 ciclodextrinas,¹⁹ estructuras laminares de hidrotalcita,²⁰ matrices porosas de sílice y nanopartículas.²¹

En el año 2013, Berlier y col.²² sintetizaron y caracterizaron nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con un grupo aminopropil con la finalidad de estudiar la estabilización de rutina en este sistema. La síntesis de nanopartículas mesoporosas incluye la adición de tensoactivos que generan, una vez removidos a través de por ejemplo métodos de calcinación, poros en la sílice, otorgándole a la nanopartícula una mayor área superficial por efecto de los poros. Así también, sintetizaron y caracterizaron nanopartículas mesoporosas de sílice, pero funcionalizadas con un grupo octil para evaluar la estabilización de quercetina.²³ En ambos estudios se obtuvo un aumento en la estabilidad y un mejor rendimiento en términos de actividad y fotoestabilidad, destacando por sobre todo, la importancia de la funcionalización en la estabilización de moléculas orgánicas dentro de los poros. Sapino y col. (2015),²⁴ estudian las nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con un grupo aminopropil con el fin de evaluar este sistema como potencial vehículo tópico para la entrega de quercetina, mostrando que se obtiene un mayor efecto al estar incluida en este sistema.

2. DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA

De acuerdo a la literatura, las *emulsiones Pickering* tienen un gran potencial de aplicación debido a sus características específicas que no comparten con las emulsiones en base a surfactante. El carácter *libre de tensoactivos* permite prevenir los efectos adversos ligados a los surfactantes, como irritación, citotoxicidad y comportamiento hemolítico¹⁰. Además, la densa capa de partículas sólidas sobre el glóbulo de la emulsión puede constituir una barrera, por lo cual los glóbulos de una *emulsión Pickering* se puede comportar como un sistema de encapsulación.²⁵ La aplicación tópica de estos sistemas son un buen ejemplo del potencial de estas emulsiones, ya que permiten una mayor absorción del activo en la piel en comparación con emulsiones a base de surfactante.^{26, 27} La posible penetración de las nanopartículas en capas profundas de la piel ha sido descartada, si bien depende del tamaño de la nanopartícula, estudios han demostrado que penetran solo hasta capas superficiales del estrato córneo en piel sana.²⁸

Varios estudios muestran la factibilidad de utilizar nanopartículas como sistemas de estudio para moléculas antioxidantes, además del uso seguro del dióxido de silicio aprobado por la FDA, por lo cual este trabajo tiene por objetivo estudiar la estabilización de emulsiones o/w con nanopartículas mesoporosas de sílice modificadas superficialmente y con flavonoides adsorbidos, que además de otorgar una estabilidad física, como sólido finamente dividido, otorgaría una estabilidad química al glóbulo, debido a la capacidad antioxidante de los flavonoides. Estudios anteriores sobre la reactividad de flavonoides y su eficiencia como desactivadores de especies excitadas (oxígeno molecular singulete) en medio homogéneo,²⁹ además de estudios sobre la actividad atrapadora de radicales dado las características estructurales,³⁰ muestran que el flavonoide morina (MOR) posee una importante actividad desactivadora y de atrapamiento entre los polifenoles analizados. Lo anterior junto con otros aspectos experimentales previamente ensayados, permitió seleccionarla como molécula de estudio.

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.

3. HIPÓTESIS

La presencia de nanopartículas mesoporosas de sílice con morina localizada en la interfase otorgarán estabilidad física y química a una emulsión o/w.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la presencia de nanopartículas mesoporosas de sílice con morina adsorbida en la estabilidad física de una emulsión o/w, para luego evaluar preliminarmente la estabilidad química de la vitamina E en dicha emulsión.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con un grupo aminopropil.
- Realizar un diseño experimental para la fabricación de las formulaciones y optimización de éste a condiciones reales.
- Preparar emulsiones o/w con adición de NPs funcionalizadas con un grupo aminopropil y evaluar su estabilidad.
- Formular una emulsión cosmética con vitamina E como activo.
- Adsorber el flavonoide morina a nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con un grupo aminopropil e incorporación de éstas a emulsiones o/w.
- Estudiar preliminarmente el efecto protector de la estabilidad de vitamina E en emulsiones o/w por incorporación de nanopartículas con morina adsorbida.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. 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-aminopropiltriétoxissilano (APTES) (Aldrich), fueron utilizados tal como se recibieron.

Polisorbato 80 (LIPO), Monooleato de sorbitán (LIPO), Aceite mineral (Sudelab), Monoestearato de glicerilo neutro (LIPO), Alcohol cetílico (LIPO), Metilparabeno (LIPO), Glicerina (Sudelab), Vitamina E 400UI (obtenida de una formulación comercial) y Peróxido de hidrógeno (Merck) también fueron utilizados tal como fueron recibidos.

6.2. SOLVENTES

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

6.3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

6.3.1. AGITADOR MECÁNICO

- Agitador Global Lab con un rango de velocidad de 250 a 2000 rpm, y una herramienta de dispersión tipo hélice.
- Equipo de dispersión Ultra-turrax T18digital de IKA[®]-WERKE, con un rango de velocidad de 6.500 a 15.500 rpm, y una herramienta de dispersión S18N-10G.

6.3.2. SOFTWARE PARA DISEÑO EXPERIMENTAL ESTADÍSTICO

Para realizar el diseño experimental estadístico se utilizó el Software StatGraphicsCenturion.

6.3.3. MICROSCOPIA OPTICA

Para el análisis de las muestras por microscopía se utilizó el microscopio óptico Zeiss modelo Standard 20.

6.3.4. ANÁLISIS DE IMAGEN

Para fotografiar las muestras se utilizó una cámara digital Cybershot DSC-W170 Sony 10.1 Megapíxeles y para procesar las imágenes digitales se utilizó el software Image J 1.4.3.

6.3.5. TENSION INTERFACIAL

Tensiómetro Du Noüy Krüss modelo K8.

6.3.6. CENTRIFUGA

Se utilizó la centrífuga IEC HN-SII.

6.3.7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Para medir la cantidad remanente de vitamina E, 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.

6.4. METODOLOGÍA

6.4.1. PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES

Mediante el método de fusión, usando placa calefactora, se preparan emulsiones o/w, en la proporción de 1:4 para un total de 100 gramos, en vasos precipitados de 100 mL agregando la fase acuosa sobre la oleosa. La mezcla de tensoactivos fue disuelta en la fase grasa, y el preservante metilparabeno en la fase acuosa.

Tabla I. Composición emulsión

	%
Aceite mineral	25
Polisorbato 80	3
Monooleato de sorbitán 80	2
Metilparabeno	0,1
Agua destilada c.s.p	100

6.4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ELABORACIÓN DE EMULSIONES

Para minimizar el número de experimentos sin menoscabar la calidad de los resultados obtenidos, se utiliza una metodología de diseño estadístico de experimentos para establecer una matriz a realizar con la finalidad de evaluar la influencia de la velocidad y el tiempo de agitación, en el tamaño y homogeneidad de los glóbulos, y a su vez, en la estabilidad de la emulsión.

Un diseño de superficie de respuesta de componente central con cuatro factores estudiados a dos niveles (Factorial 2⁴), en replicado y orden aleatorio fue desarrollado. Las dos matrices de experimentos constan de 28 ejecuciones aleatorias respectivamente y se muestran en las tablas I y II, que han sido obtenidas mediante el programa StatGraphicsCenturion. Los factores a evaluar son velocidad de agitación rápida y lenta, y el tiempo de cada agitación. La respuesta evaluada fue el diámetro de glóbulo y su distribución en las emulsiones preparadas, obtenido mediante microscopía óptica y análisis de imagen.

Tabla II. Diseño experimental 1, usando agitador Global Lab.

Muestra	Velocidad Rápida (rpm)	Tiempo Rápido minutos	Velocidad Lenta (rpm)	Tiempo Lento minutos
1	1500	3	750	15
2	2000	2	1000	10
3	1500	3	750	15
4	2000	4	1000	20
5	1500	3	750	15
6	2000	2	500	10
7	1000	2	1000	20
8	1500	3	750	5
9	1000	2	1000	10
10	500	3	750	15
11	2000	2	500	20
12	1500	3	250	15
13	2000	2	1000	20
14	2500	3	750	15
15	1000	4	1000	10
16	1000	4	500	10
17	1500	3	1250	15
18	1000	4	500	20
19	1500	1	750	15
20	1000	2	500	10
21	1000	4	1000	20
22	2000	4	500	10
23	1500	5	750	15
24	2000	4	1000	10
25	1500	3	750	25
26	1000	2	500	20
27	2000	4	500	20
28	1500	3	750	15

Tabla III. Diseño experimental 2, usando agitador Ultra turrax y agitador Global Lab.

Muestra	Velocidad Rápida (rpm)	Tiempo Rápido minutos	Velocidad Lenta (rpm)	Tiempo Lento minutos
1	12500	2	1000	20
2	9500	5	750	15
3	3500	3	750	15
4	12500	4	1000	10
5	6500	2	500	10
6	6500	2	500	20
7	6500	4	1000	10
8	6500	2	1000	10
9	9500	3	750	15
10	12500	4	1000	20
11	9500	3	250	15
12	6500	4	500	20
13	9500	3	750	15
14	6500	2	1000	20
15	6500	4	500	10
16	12500	4	500	20
17	12500	2	500	10
18	15500	3	750	15
19	9500	3	750	5
20	12500	2	1000	10
21	9500	3	750	15
22	9500	3	750	25
23	12500	2	500	20
24	12500	4	500	10
25	9500	3	750	15
26	9500	3	1250	15
27	9500	1	750	15
28	6500	4	1000	20

6.4.3. PROCEDIMIENTO DEFINITIVO DE ELABORACIÓN DE EMULSIONES

Se elaboraron emulsiones o/w (10 gramos), manteniendo la misma proporción de las fases (1:4). Las emulsiones fueron preparadas usando un homogenizador Ultra-turrax T18 a 6500 rpm durante 5 minutos, en viales de 20 mL. Las NPs son preparadas en una dispersión de Glicerina 10% con una agitación previa de 24 horas, y se incorporan en la fase acuosa de la emulsión. Es importante mencionar que tras cada preparación el equipo de agitación fue limpiado mediante dos enjuagues con alcohol y finalmente con agua destilada.

En las siguientes tablas se detalla la composición de todas las fórmulas desarrolladas:

Tabla IV. Fórmulas de las emulsiones desarrolladas incorporando sólo nanopartículas modificadas con grupo amino (AMNPs).

Formulación	1	2	3	4	5	6	7	8
Aceite mineral	25	25	25	25	25	25	50	25
Nanopartículas	0,5	1	2	3	4	5	10	5
Metilparabeno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Agua destilada c.s.p	100	100	100	100	100	100	100	100

Se debe destacar que en el caso de la formulación 7, se utilizó 50% de aceite mineral. En formulación 8, se utilizó agitación de 12.600 rpm por 10 minutos.

Tabla V. Fórmulas de las emulsiones desarrolladas utilizando sólo el 10% de tensoactivos y diferentes concentraciones de nanopartículas con grupo amino.

Formulación	0	1	2	3	4	5	6	7
Aceite mineral	25	25	25	25	25	25	25	25
Polisorbato 80	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Monooleato de sorbitán 80	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Nanopartículas	0	0,5	1	2	3	4	5	5
Metilparabeno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Agua destilada c.s.p	100	100	100	100	100	100	100	100

Se debe destacar que en la formulación 7, se realizó una agitación a 12.600 rpm durante 10 minutos.

Tabla VI. Fórmulas de las emulsiones desarrolladas utilizando 4% de nanopartículas y diferentes concentraciones de tensoactivos.

Formulación	0	1	2	3	4	5	6
Aceite mineral	25	25	25	25	25	25	25
Polisorbato 80	0	0,3	0,9	1,5	2,1	2,7	3
Monooleato de sorbitán 80	0	0,2	0,6	1	1,4	1,8	2
Nanopartículas	4	4	4	4	4	4	4
Metilparabeno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Agua destilada c.s.p	100	100	100	100	100	100	100

Se debe destacar que en todas las formulaciones se realizó agitación a 12.600 rpm durante 10 minutos, a diferencia de las desarrolladas en las tablas anteriores.

Tabla VII. Fórmula de las emulsiones desarrolladas con vitamina E (tocoferol).

Formulaciones	1	2	3
Aceite mineral	18	18	18
Alcohol cetílico	5	5	5
Monoestearato de glicerilo neutro	3	3	3
Polisorbato 80	3,7	1,8	1,8
Monooleato de sorbitán 80	1,3	0,3	0,3
Nps-amino	0	4	0
Nps-morina	0	0	4
Tocoferol	0,5	0,5	0,5
Metilparabeno	0,1	0,1	0,1
Agua destilada c.s.p	100	100	100

Se debe destacar que la vitamina E se agrega a la fase grasa una vez que ésta última ya está completamente fundida y ha alcanzado la temperatura. Además, todas las formulaciones fueron agitadas a 12.600 rpm durante 10 minutos.

6.4.4. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO

Las nanopartículas mesoporosas de sílice modificadas superficialmente con grupo amino (AMNPs) se sintetizaron a partir del método de Stöber.³¹ 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 h 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 h 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, seguidas de centrifugación. Finalmente, las nanopartículas se resuspendieron en 10 mL de Glicerina al 10%.

6.4.5. ADSORCIÓN DE MORINA EN NANOPARTÍCULAS

Previamente en el laboratorio, se establecieron las condiciones óptimas para este tipo de experimentos. Para esto, una solución stock de 2 mg mL⁻¹ de morina fue preparada, luego se tomó un volumen deseado, el cual se añadió a una suspensión de nanopartículas en EtOH, en un frasco de vidrio. Después de la adición de la alícuota de polifenol, la suspensión se mantuvo bajo agitación hasta alcanzar el equilibrio durante 10 horas. Posteriormente se realizaron lavados con EtOH y finalmente las nanopartículas con morina se resuspendieron en 10 mL de Glicerina al 10%.

6.4.6. DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN INTERFACIAL

Se determinó el efecto de la adición de nanopartículas con modificación superficial con grupos aminopropil sobre la tensión interfacial aceite mineral/agua, constituyentes de las emulsiones preparadas. También se evaluó el efecto de la adición de glicerina, agente hidrofílico en el cual estas nanopartículas fueron resuspendidas y de la adición de los tensoactivos no iónicos, seleccionados en este estudio. La medición de la tensión interfacial se realizó utilizando el método del anillo de Du Noüy, que permite determinar la tensión superficial/interfacial de líquidos a través de la fuerza requerida para retirar un anillo de platino – iridio de la superficie del líquido. Para esto, el anillo se sumerge en el líquido o en la interface de dos líquidos inmiscibles y luego se lo hace ascender lentamente. A medida que el mismo sube, se forma un menisco de líquido y la fuerza ejercida pasa por un máximo y luego disminuye, desprendiéndose el líquido del anillo y volviendo a su posición original. El tensiómetro de Du Noüy consta de un fino alambre de torsión.³²

Para efectuar la determinación de tensión superficial con el tensiómetro de Du Noüy, los líquidos a determinar se colocan en un recipiente limpio. El plato que sostiene al recipiente con el líquido es elevado hasta que el anillo se sumerja en el líquido y luego se baja para que el anillo quede en la interface y el índice esté en posición cero. Este es el punto de partida de la determinación. Así, se aumenta la torsión sobre el alambre rotando la perilla para llevar el vernier a un punto cercano, pero por debajo del valor de la tensión superficial del líquido. Mientras se gira lentamente la perilla, el plato conteniendo al líquido se baja, manteniendo siempre la posición neutra del brazo de la balanza.³²

Con el fin de evaluar y comparar el efecto de la adición de nanopartículas sobre la tensión interfacial de un sistema aceite mineral/agua (25% AM), se prepararon 3 set de igual volumen de aceite mineral/agua con diferentes concentraciones de tensoactivo (10, 30, 50, 70 y 100%), nanopartículas modificadas superficialmente con grupo amino (0,5; 1; 2; 3; 4 y 5%) y glicerina (2, 3, 5, 8 y 10%). Los experimentos en cada concentración fueron repetidos 4 veces a temperatura ambiente.

6.4.7. CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

6.4.7.1.DETERMINACIÓN DEL TIPO DE EMULSIÓN

Usando el método de dilución se establece de manera sencilla el tipo de emulsión. Si un volumen pequeño de la emulsión se mezcla fácilmente con el agua, indica que la fase externa es acuosa, por lo tanto, corresponde a una emulsión o/w.

6.4.7.2.DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS GLÓBULOS

La determinación del tamaño del glóbulo de aceite se realizó mediante microscopía óptica. Para ello las muestras se depositaron en un portaobjeto y se presionaron suavemente con un cubre objeto, utilizando una amplificación visual de 10x. Además, se utilizó una cámara digital, para fotografiar las muestras recién preparadas y luego de 60 minutos, sin utilizar zoom fotográfico. Luego las imágenes digitales fueron ingresadas al software Image J. Con el fin de relacionar el tamaño de partícula con la amplificación visual se utilizó una plantilla de calibración a 10x de una regla micrométrica. Finalmente, con los diámetros registrados se calcula la amplitud de distribución de tamaño de 40 mediciones realizadas a cada muestra de acuerdo a la fórmula $(D_{90}-D_{10}) / D_{50}$.

6.4.8. CONTROL DE LA ESTABILIDAD

6.4.8.1. RELACIÓN H_u / H_0

El procedimiento de emulsificación utilizado, en algunos casos no provee una completa emulsificación, pero crea diferentes proporciones de emulsión, dependiendo de la concentración de emulgente utilizado. Por lo cual los resultados están enfocados en la estabilidad de la fracción emulsionada, H_u / H_0 , donde H_u es la altura de la columna emulsionada y H_0 es la altura del volumen total, cuantificada en base a su evolución en el tiempo.

6.4.8.2. DESESTABILIZACIÓN POR ENVEJECIMIENTO

En los estudios de estabilidad de las emulsiones en función del tiempo transcurrido desde la preparación, las muestras simplemente se cerraban y se almacenaban en estantería, sin exposición de luz directa y a temperatura ambiente, tomándose muestras cada cierto tiempo para estudiar la distribución del tamaño de glóbulo.

6.4.8.3. DESESTABILIZACIÓN CON TEMPERATURA

Las muestras una vez preparadas, se introdujeron en un vial de 20 mL y estos a su vez en una estufa a 40 C durante el tiempo planificado, tomándose muestras cada cierto tiempo para estudiar la distribución del tamaño de glóbulo.

6.4.8.4. DESESTABILIZACIÓN MEDIANTE CENTRÍFUGA

Una vez preparadas las emulsiones se introdujeron 2 g de muestra en tubos de ensayo con propiedades y dimensiones específicas para la centrífuga empleada. Cada muestra se sometió a centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos.

6.4.8.5. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD QUÍMICA DE LA VITAMINA E EN UNA EMULSIÓN CON Y SIN NANOPARTÍCULAS CON MORINA ADSORBIDA.

Para determinar el efecto protector antioxidante de las nanopartículas con morina adsorbida se prepararon tres emulsiones con vitamina E al 0,5 % disuelta en la fase grasa. Cada una de estas emulsiones se prepararon con mezcla de 100% de tensoactivo, 50% de tensoactivo más 4% de nanopartículas modificada con grupo amino, y 50% de tensoactivo más 4% de nanopartículas con morina adsorbida. Se tomaron dos muestras de 5 gramos de cada emulsión para agregar el peróxido de hidrógeno en la fase externa. Estas emulsiones fueron almacenadas durante 24 horas a temperatura ambiente y a 40 C cada una. Posteriormente para cuantificar la vitamina E mediante metodología por HPLC, se prepararon las muestras, pesando con exactitud alrededor de 25 mg de emulsión y se llevaron a un matraz aforado de 25 mL, se agregaron 5 mL de isopropanol y 10 mL de metanol, luego se agitó por 5 minutos. Se afora el matraz a 25 mL

con metanol para luego extraer la muestra mediante sonicación y centrifugación. Las soluciones fueron filtradas por filtro de membrana de 0,45 micras e inyectadas en el equipo.

El método HPLC utilizado se basó en el de Nada et al. que utiliza una columna RP-C18 y como fase móvil metanol-agua (97:3 v/v) a un flujo de 1,5 mL min⁻¹. La monitorización del α -tocoferol se realizó a 290 nm.³³

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. PREPARACIÓN DE EMULSIONES

La estabilidad de una emulsión se ve afectada por numerosas variables, por lo tanto, se deben seleccionar y establecer parámetros físicos y químicos para obtener las características requeridas de manera reproducible, para posteriormente poder estudiar y comparar el efecto de las nanopartículas sobre la estabilidad de las emulsiones. Los factores a considerar en la elaboración de emulsiones, son la composición y la proporción relativa de las fases, la temperatura, el tiempo y la velocidad de mezclado, y el tipo de equipamiento.

La elaboración de emulsiones se basa en el método de fusión, donde los agentes emulsificantes liposolubles, los aceites y las ceras, se calientan hasta una temperatura de aproximadamente 5-10 C por encima del punto de fusión del componente con mayor punto de fusión o hasta una temperatura máxima de 70-80 C. Los componentes hidrosolubles disueltos en agua se calientan a una temperatura de 3 a 5 C mayor que la de la fase oleosa. Luego se mezclan las dos fases, por motivos prácticos, la solución acuosa se agrega a la fase oleosa, y se mezcla con una agitación adecuada hasta que la emulsión se enfríe.⁶

Como formulación preliminar se utilizó una mezcla sencilla de 25% de aceite mineral y agua, materias primas ampliamente utilizadas tanto en preparados cosméticos como farmacéuticos.³⁴ Se seleccionó una mezcla de tensoactivos no iónicos debido a su baja susceptibilidad a los cambios de pH y electrolitos. Se emplearon polisorbato 80 y monooleato de sorbitán en una concentración del 20% de la fase grasa, de acuerdo al HLB requerido para obtener una emulsión o/w. Además, se adicionó metilparabeno como sustancia antiséptica para el control microbiano.

7.2. DISEÑO EXPERIMENTAL DE ELABORACIÓN DE EMULSIONES

La preparación de la emulsión requiere cierta cantidad de energía para formar la interfase entre las dos fases y una cantidad de trabajo adicional para mezclar el sistema y contrarrestar la resistencia al flujo. Para esto existe una amplia gama de equipos destinados a la preparación de emulsiones, donde la velocidad de homogenización y la velocidad de enfriamiento, así como el tiempo durante el cual se realicen estos, pueden influenciar la distribución y el tamaño de los glóbulos, y en consecuencia la viscosidad del producto. Debido a esto, se realizó un diseño estadístico de experimentos que permitió investigar simultáneamente los efectos de todas las variables de interés a través de la realización de un número mínimo de experimentos, repercutiendo en una mayor eficacia y en el ahorro de tiempo y costos.

Se realizaron dos diseños experimentales, para determinar la velocidad de agitación rápida o de homogenización y la velocidad de agitación lenta o de enfriamiento, así también el tiempo que se realiza cada agitación, para establecerlos como parámetros fijos en los experimentos posteriores. El primer diseño fue realizado únicamente con el agitador mecánico Global Lab, el cual cuenta con una herramienta de dispersión de tipo hélice y un rango de velocidad de agitación relativamente bajo, el cual va desde 250 a 2000 rpm. Para el segundo diseño experimental se utilizaron dos agitadores, para la velocidad de homogenización se utilizó el agitador Ultra-turrax T18 con un rango de velocidad de 6.500 a 15.500 rpm, y con una herramienta de dispersión S18N-10G, la cual funciona mediante el principio de rotor-estator, y alcanza una máxima finura de 1-10 μm en emulsiones;³⁵ para la velocidad de enfriamiento se utilizó el agitador Global Lab. Cabe señalar que para este segundo diseño la muestra número 3 no se pudo realizar ya que ninguno de los dos agitadores alcanzaba la velocidad de 3.500 rpm.

Las formulaciones de ambos diseños se caracterizaron determinando el tipo de emulsión, mediante el método de dilución comprobando que todas las muestras resultaron ser emulsiones o/w. También se caracterizó la distribución del tamaño de partículas mediante microscopía óptica, así se determinó la moda estadística y la amplitud relativa que se ha expresado como el valor obtenido de la relación $(D_{90}-D_{10})/D_{50}$, la cual se considera que es amplia cuando su valor es superior a 1. Los resultados obtenidos en estos diseños se muestran en las Tablas VIII y IX respectivamente.

Tabla VIII. Resultados diseño experimental con agitador Global Lab.

Muestra	Velocidad Rápida (rpm)	Tiempo Rápido minutos	Velocidad Lenta (rpm)	Tiempo Lento minutos	Moda	Amplitud
1	1500	3	750	15	12	1,3
2	2000	2	1000	10	12	0,9
3	1500	3	750	15	16	1
4	2000	4	1000	20	11	0,7
5	1500	3	750	15	19	0,8
6	2000	2	500	10	13	0,9
7	1000	2	1000	20	9	0,6
8	1500	3	750	5	31	1,3
9	1000	2	1000	10	17	0,6
10	500	3	750	15	16	1
11	2000	2	500	20	8	0,6
12	1500	3	250	15	15	0,7
13	2000	2	1000	20	13	0,9
14	2500	3	750	15	14	0,8
15	1000	4	1000	10	10	1,3
16	1000	4	500	10	23	1
17	1500	3	1250	15	7	1,5
18	1000	4	500	20	17	1,3
19	1500	1	750	15	6	1,3
20	1000	2	500	10	7	0,8
21	1000	4	1000	20	6	0,9
22	2000	4	500	10	8	1
23	1500	5	750	15	6	0,8
24	2000	4	1000	10	8	1,4
25	1500	3	750	25	14	1
26	1000	2	500	20	26	1,1
27	2000	4	500	20	12	1,2
28	1500	3	750	15	14	1,1

Tabla IX. Resultados diseño experimental con agitador Ultra-turrax y Global Lab.

Muestra	Velocidad Rápida (rpm)	Tiempo Rápido minutos	Velocidad Lenta (rpm)	Tiempo Lento minutos	Moda	Amplitud
1	12500	2	1000	20	6	0,8
2	9500	5	750	15	9	0,8
3	3500	3	750	15		
4	12500	4	1000	10	7	0,6
5	6500	2	500	10	13	0,8
6	6500	2	500	20	11	1
7	6500	4	1000	10	9	0,8
8	6500	2	1000	10	14	0,9
9	9500	3	750	15	11	0,5
10	12500	4	1000	20	6	0,5
11	9500	3	250	15	8	0,7
12	6500	4	500	20	10	0,6
13	9500	3	750	15	8	0,8
14	6500	2	1000	20	9	0,9
15	6500	4	500	10	14	0,7
16	12500	4	500	20	5	0,7
17	12500	2	500	10	7	0,7
18	15500	3	750	15	8	0,6
19	9500	3	750	5	8	0,6
20	12500	2	1000	10	6	0,8
21	9500	3	750	15	9	0,6
22	9500	3	750	25	9	0,4
23	12500	2	500	20	8	0,7
24	12500	4	500	10	8	0,4
25	9500	3	750	15	6	0,9
26	9500	3	1250	15	8	0,7
27	9500	1	750	15	8	0,8
28	6500	4	1000	20	9	0,6

Se estudió la influencia de la velocidad de agitación rápida en el tamaño del glóbulo y la homogeneidad de estos. En la Figura 2 se analiza la moda estadística de las muestras del primer diseño experimental utilizando sólo el agitador mecánico Global Lab de baja velocidad de agitación, donde se evidencia que en las muestras donde se utilizó una mayor velocidad de agitación se obtiene menor tamaño de glóbulo y se observa una menor dispersión de los datos. Sin embargo, en la Figura 3, al analizar la amplitud relativa de cada muestra (ver metodología) n, revela una baja uniformidad en la distribución del tamaño de partículas, ya que la mayoría de los valores son superiores a 1.

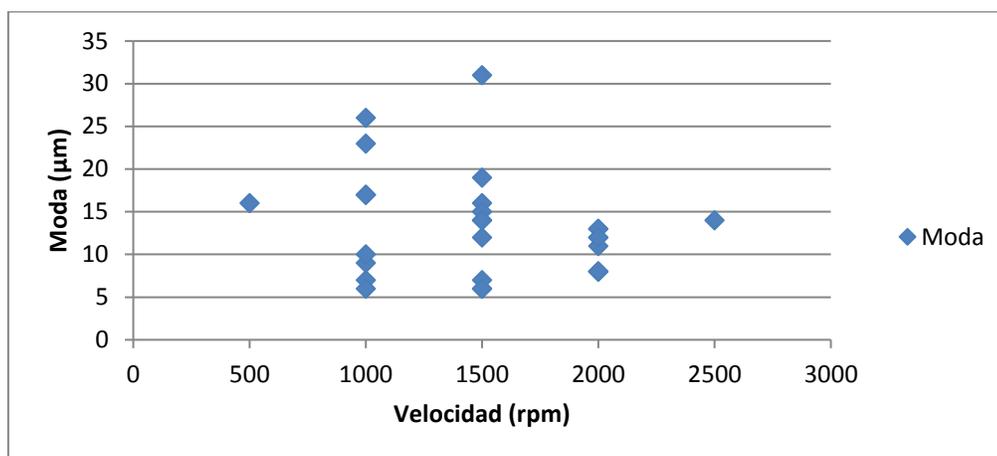


Figura 2. Efecto de la velocidad de agitación rápida sobre el tamaño de glóbulo del primer diseño experimental, con agitador Global Lab.

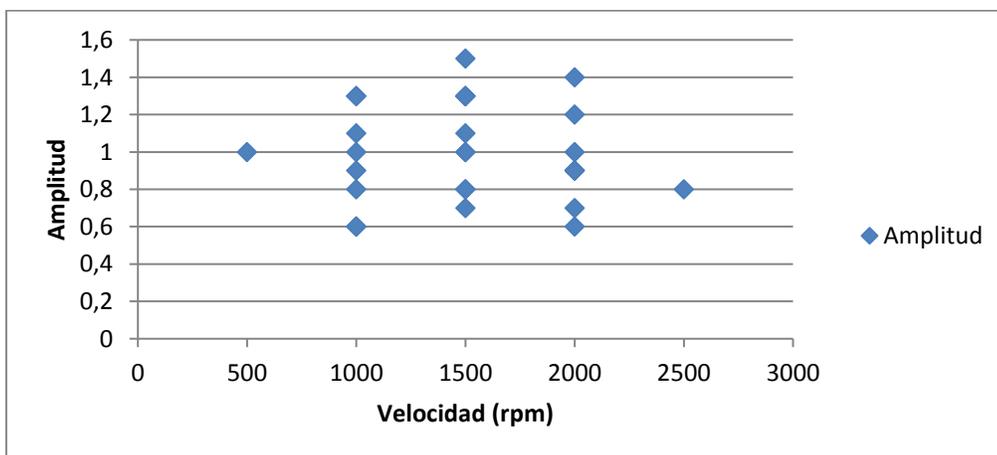


Figura 3. Análisis de la distribución de tamaño de partículas mediante amplitud relativa del primer diseño experimental.

Ahora en el siguiente diseño experimental, se utilizaron velocidades superiores a las probadas anteriormente, donde se observa que a la velocidad de 6.500 rpm (Figura 4) se obtiene un tamaño de glóbulo similar al obtenido en la velocidad de 2.000 rpm en el diseño experimental anterior (Figura 2), pero al analizar la amplitud de esas condiciones (Figura 3), se evidencia que a la velocidad de 2.000 rpm se obtiene una distribución de tamaño de glóbulos más heterogéneo, a diferencia de la velocidad de 6.500 rpm donde la amplitud indica mayor uniformidad en la distribución. Por consiguiente, mientras mayor sea la velocidad de agitación rápida o de homogenización se obtendrá un menor tamaño de glóbulo y una distribución del tamaño de partícula más homogénea.

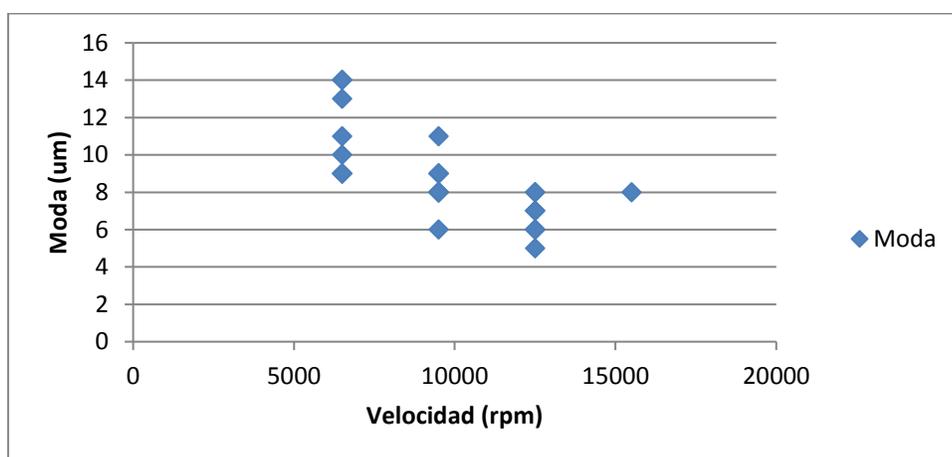


Figura 4. Efecto de la velocidad de agitación rápida sobre el tamaño de glóbulo del segundo diseño experimental, con agitador Ultra-turrax y GlobalLab.

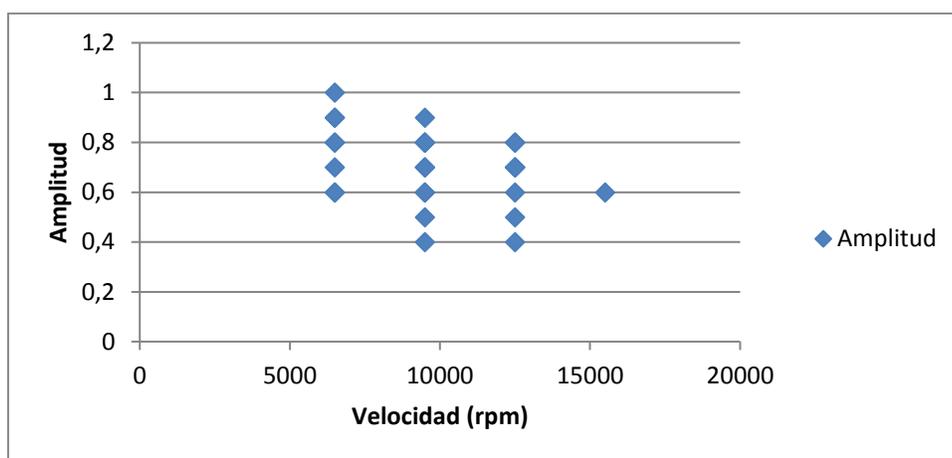


Figura 5. Análisis de la distribución de tamaño de partículas mediante amplitud relativa del segundo diseño experimental, con agitador Ultra-turrax y GlobalLab.

7.3. PROCEDIMIENTO DEFINITIVO DE ELABORACIÓN DE EMULSIONES

A pesar de los resultados obtenidos en el estudio anterior, se decide utilizar una velocidad de agitación de 6.500 rpm usando el homogenizador Ultraturrax T18. A una velocidad mayor se elimina una posible fuente de variabilidad en los resultados al asegurar, con un elevado margen de confianza, la independencia respecto de estos valores del tiempo y la velocidad de agitación en la preparación de la emulsión. Sin embargo, se obtienen glóbulos demasiado pequeños, resultando inapropiado para el tamaño de nanopartículas a utilizar en experimentos posteriores. Además, se agitó durante 5 minutos, debido a que en los primeros 3 minutos ya se define el tamaño de corte de los glóbulos por lo cual un tiempo mayor es innecesario e ineficiente. Por otra parte, la velocidad de enfriamiento, si bien es necesaria para bajar la temperatura y así la energía cinética de los glóbulos, es descartada por efectos prácticos ya que se deben preparar emulsiones de 10 g en un vial de 20 mL, y en este contenedor no cabe la hélice de la herramienta de dispersión.

La formación de una emulsión por agitación mecánica de un sistema bifásico es un proceso extremadamente complejo, ya que participan una gran variedad de variables cuyo efecto combinado es difícil de explicar. El diámetro promedio no es significativo para describir la emulsión, y es más apropiado el análisis de la distribución de tamaño de las gotas. El tamaño de las gotas disminuye con el tiempo de agitación hasta un valor constante, producto que es resultado de los procesos de ruptura y coalescencia. La distribución de tamaño depende del tiempo de agitación, así ésta tiende a reducirse en amplitud al mismo tiempo que su valor medio disminuye. Estudios indican que la distribución inicial de diámetro de gotas es de tipo normal con gran desviación típica, y que a medida que aumenta el tiempo de agitación tiende a ser más angosta (monodispersa). Respecto a la velocidad de agitación, su efecto es similar al obtenido por el tiempo de agitación, es decir, existe una disminución del diámetro de gota con el aumento de la velocidad de agitación. Esta disminución parece alcanzar un valor asintótico. Al aumentar la velocidad de rotación del agitador, la curva de distribución se desplaza hacia más bajo diámetro y se torna más angosta y más asimétrica.³⁶

7.4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO Y CON MORINA ADSORBIDA.

Utilizando el método de hidrólisis de Stöber,³¹ con la proporción de reactivos y las condiciones experimentales de reacción definidas en líneas de investigación anteriores, se sintetizaron nanopartículas de sílice esféricas y mesoporosas, las cuales se modificaron superficialmente con un grupo amino. Para los experimentos de adsorción tipo batch, la concentración utilizada del flavonoide fue de aprox. $5,9 \times 10^{-3}$ M, donde la máxima adsorción obtenida fue de 11 mg g^{-1} ($1.1 \text{ mg MOR}/100\text{mg NP}$).³⁷

El tamaño promedio de las nanopartículas mesoporosas superficialmente modificadas fue de 220 nm de diámetro y con una distribución normal. 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.²¹

De acuerdo a la literatura, como se muestra en la Tabla X, el potencial Z para las nanopartículas mesoporosas superficialmente modificadas con grupo amino y para las nanopartículas con morina adsorbida, dispersadas en soluciones a pH 1, 3, 7 y 9; muestra que a pH 1 y 3, la morina adsorbida en las nanopartículas no cambia su valor de potencial Z positivo. A pH 7 y pH 9, la morina está ionizada (forma fenolato), cambiando el signo del potencial de superficie de la nanopartícula (negativo).³⁸

Tabla X. Valores de potencial Z de nanopartículas dispersadas en soluciones acuosas a diferentes pH.

Nanopartículas	Potencial Z (mVolts)			
	pH 1	pH 3	pH 7	pH 9
AMNPs	+41.8	+27.6	-1.5	-5.2
AMNPs-MOR	+44.7	+26.2	-9.5	-17.7

La Figura 6 muestra las imágenes SEM de nanopartículas de sílice mesoporosas modificadas superficialmente con grupo amino y con morina adsorbida en la superficie. Las nanopartículas muestran una morfología esférica que no se ve alterada cuando se adsorbe morina en la superficie.

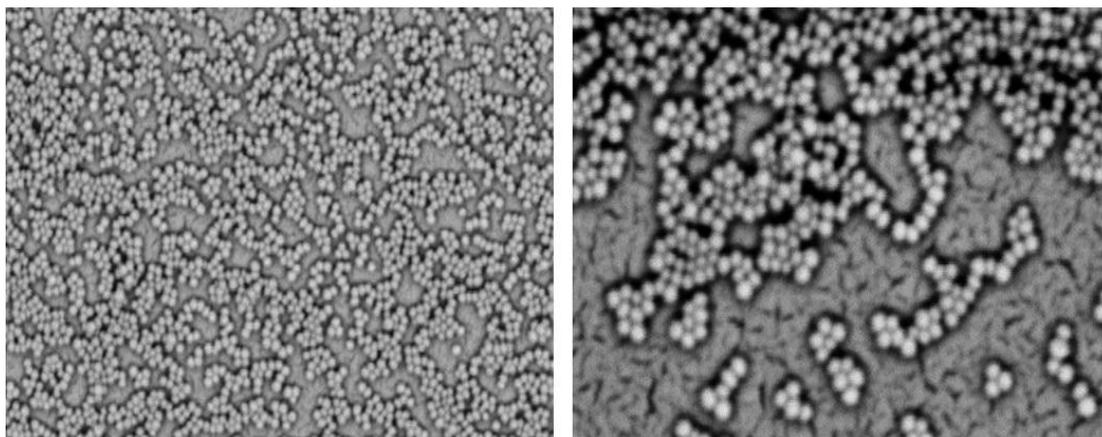


Figura 6. Imagen SEM de nanopartículas con morina adsorbida.³⁸

7.5. EVALUACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

Evaluated distintas proporciones de tensoactivos no iónicos, los resultados muestran que todas las proporciones estudiadas disminuyen la tensión interfacial a valores bajo las 10 dinas/cm, valores que son menores a medida que aumenta la concentración de Polisorbato 80 y Monooleato de sorbitán. Por otro lado, la adición de glicerina reduce mínimamente la tensión interfacial. Así, con la adición de 2% de este agente al sistema aceite mineral-agua, la tensión interfacial es de 19,5 dinas/cm, valor que disminuye en forma inversamente proporcional con la adición de 3%, 5%, 8% y 10% de glicerina. Para esta última cantidad, la tensión interfacial es de 15,4 dinas/cm. Este es de interés, dado que las nanopartículas desarrolladas son suspendidas en 10 mL de glicerina al 10%.

Las partículas sólidas finamente divididas actúan solamente como barrera fisicoquímica y no producen efecto sobre la tensión interfacial. Nuestros resultados muestran que la adición de cantidades crecientes de nanopartículas con modificación de grupos amino, no modifica la tensión interfacial de aceite mineral (6 mL) – agua (19 mL) correspondiente a 23 dinas/cm.

7.6. EMULSIONES O/W ESTABILIZADAS CON NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MODIFICADAS CON GRUPO AMINO

Se prepararon 8 emulsiones de aceite mineral/agua, estabilizadas con diferentes concentraciones de AMNPs. Como se muestra en la Figura 7, todas las muestras resultaron inestables, excepto la muestra 7 y 8, por lo cual los resultados informados aquí se enfocan en la estabilidad de la fracción emulsionada (H_u), cuantificada en base a la evolución en el tiempo de la altura de la columna emulsionada (H_u/H_0). En la Tabla XI se resumen todos los análisis realizados y en ella se evidencia que a mayor concentración de AMNPs se obtiene una mayor fracción de columna emulsionada, pero no se logra una estabilidad completa durante un tiempo razonable. La muestra 7 se mantuvo estable durante solo 5 minutos, en ella se utilizó 5% de AMNPs al igual que la muestra 6 pero se agitó a 12.500 rpm durante 5 minutos, lo cual también resultó en glóbulos más pequeños. La muestra 8, en la que se utilizó una proporción de las fases de 50/50, logró una mayor estabilidad, pero esta no superó los 60 minutos, en esta muestra se utilizó una concentración de nanopartículas del 10% y se mantuvo la velocidad de 6.500 rpm. Por otra parte, en la figura 7, la muestra 1 donde se utilizó un 0,5 % de AMNPs se observó una clara separación de la fracción emulsionada y la fase acuosa remanente, no así en las muestras 2, 3, 4, 5 y 6, donde es difícil distinguir la separación de estas, lo que sugeriría que queda una cantidad remanente de AMNPs en la fase acuosa y lo cual es comprobado al centrifugar las muestras, como se ve en la figura 8, donde en cada una de estas muestras queda un precipitado al fondo del tubo.

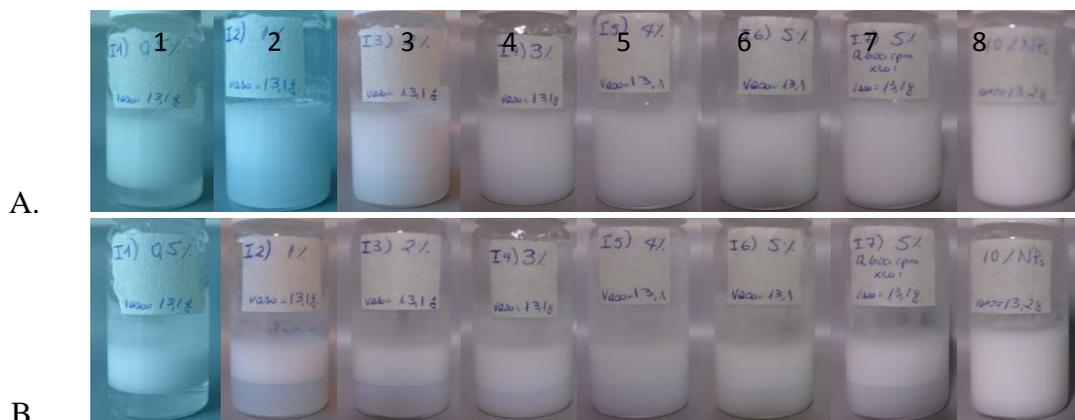


Figura 7. Fotografías de emulsiones preparadas con diferentes concentraciones de AMNPs. **A.** Emulsiones recién preparadas. **B.** Emulsiones a los 60 minutos.

Tabla XI. Tabla resumen de análisis a diferentes concentraciones de AMNPs.

Muestra	% NPs	Formación de Emulsión	Hu/Ho inicial	Hu/Ho hora después	Microscopio	Moda (um)	Amplitud
1	0,5	no	0,7	0,5	heterogéneo	18	1
2	1	no	0,7	0,5	heterogéneo	33	0,5
3	2	no	0,7	0,5	heterogéneo	36	0,7
4	3	no	0,7	0,6	heterogéneo	35	0,9
5	4	no	0,8	0,6	heterogéneo	42	0,5
6	5	no	0,9	0,6	heterogéneo	23	0,7
7	5	si	1	0,7	homegéneo	7	0,8
8	10	si	1	0,8	homegéneo	14	0,9

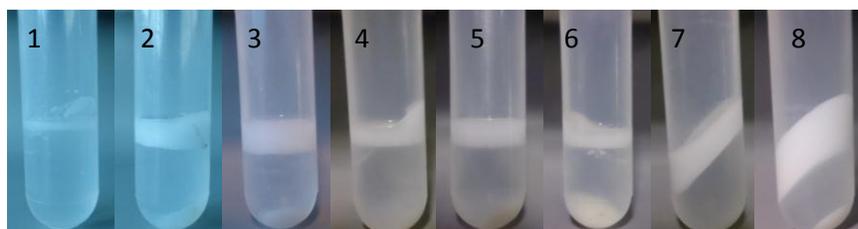


Figura 8. Fotografías de las muestras luego de ser sometidas a centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos.

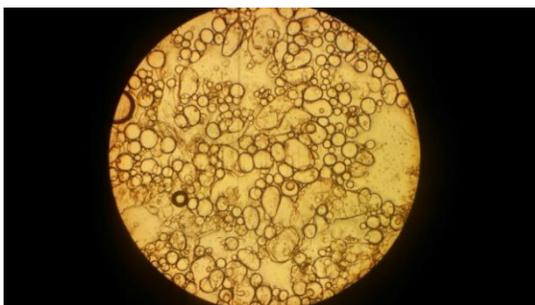
Considerando el volumen de aceite utilizado en la formulación y que el volumen de un glóbulo es $\frac{4}{3}\pi r^3$ y el área superficial de este es $4\pi r^2$, podemos calcular en forma teórica el área total superficial disponible para que las nanopartículas se adsorban en la superficie. Así, si nuestras partículas tienen un tamaño promedio de 220 nm, el número de nanopartículas necesarias para formar una monocapa en la interfase de un glóbulo de aceite disperso en agua, de tamaño 35 μm , sería de $1,3 \times 10^{14}$ (1-2% de NPs) y para un tamaño de 12 μm sería necesario un 4%. El peso de una nanopartícula de sílice se calcula considerando el rendimiento de la síntesis (masa total) y el tamaño promedio obtenido por microscopía. Así por ejemplo, si una emulsión está formada por 50g de aceite mineral, los cuales se dispersan en glóbulos de tamaño de 12 μm y para su estabilización se utilizaron NPs de tamaño promedio de 220 nm (1 partícula pesa a nivel teórico 1.1×10^{-14} g), la cantidad de NPs mínima necesaria para formar una monocapa en todos los glóbulos es de 9,02 gramos, es decir, si preparamos 100 gramos de emulsión que contiene un 50% de aceite mineral, el porcentaje de NPs correspondería a un 9%. Al contrastar con lo obtenido experimentalmente (Tabla XI), en las muestras con 1 a 3% de NPs se alcanza un tamaño promedio del glóbulo de 35 μm , lo cual se correlaciona con lo calculado teóricamente, pero en las muestras con 4 y 5% de NPs no se logra un tamaño tan pequeño como el calculado, esto se debe a que en la práctica, con la proporción de fase grasa y la agitación

utilizada se alcanza cierto límite de tamaño y luego las nanopartículas no se sitúan como una monocapa en la interfase, si no que estas se superponen formando multicapas y el exceso sobrante se redispersa en la fase acuosa,³⁹ la cual por la diferencia de densidad entre el agua y la sílice, finalmente lleva a un precipitado de las nanopartículas, fenómeno anteriormente descrito. Por esta razón, se realizó la muestra de 5% de NPs con una agitación de 12.500 rpm, de esta forma se aporta mayor energía al sistema, logrando un tamaño de glóbulo mucho menor (7µm), resultando estable durante 5 minutos. Según la teoría, para este tamaño de glóbulo, al tener una mayor área superficial se necesitaría una concentración de NPs mucho mayor. Así también se realizó una muestra con 10% de NPs, con una agitación de 6.500 rpm (utilizando una proporción de las fases de 50/50), sin obtener una estabilidad prolongada.

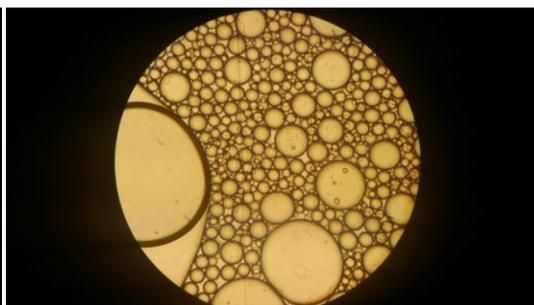
Las muestras de las fracciones emulsificadas fueron analizadas por microscopía óptica (Figura 9), en las cuales se observan glóbulos claramente esféricos, excepto en la figura 9 A y 9 C donde se aprecian formas irregulares. Si bien en general se observan glóbulos definidos, sólo se logra una homogeneidad de tamaño en las muestras 9 G y 9 H, en las cuales se utilizó mayor velocidad de agitación y mayor concentración de NPs, respectivamente.

Se esperaba que con la modificación superficial de la nanopartícula con el grupo amino se le otorgara un cierto grado de lipofilia y de este modo estabilizar una emulsión o/w. Sin embargo, con las condiciones experimentales empleadas no se consiguió una estabilidad razonable. Por lo tanto, para conseguir una emulsión estable utilizando sólo nanopartículas como emulgente, una *pickering emulsion*, se debería cambiar la fase oleosa, por una con mayor viscosidad para que otorgue un mayor soporte a las nanopartículas, como por ejemplo el petrolato blanco (vaselina sólida). También se podría realizar otra modificación superficial a la nanopartícula, para que otorgue mayor afinidad por la fase grasa y a su vez, sin perder un cierto grado de hidrofilia. Una forma de lograr esta característica anfifílica de las nanopartículas sería modificar su superficie mediante la técnica de obtención de partículas coloidales Janus, que son partículas con dos caras o lados de distinta naturaleza química o polaridad, es decir, por un lado, puede tener un carácter hidrofílico y por el otro lado ser lipofílico, y estas son preparadas mediante el método de *pickering emulsion*.⁴⁰

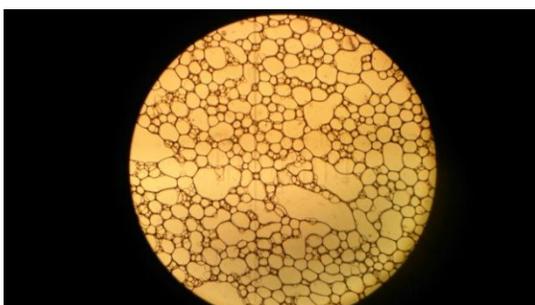
A. 0,5% NPs.



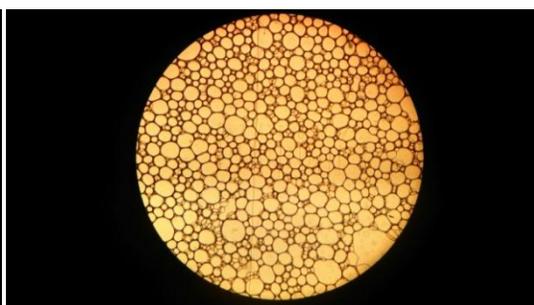
B. 1% NPs.



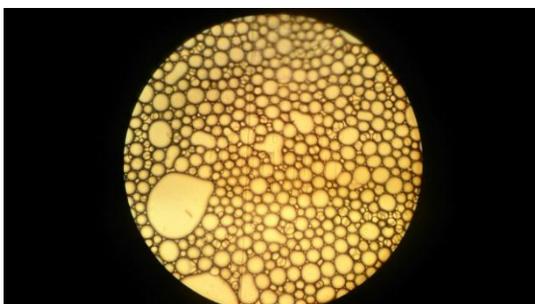
C. 2% NPs



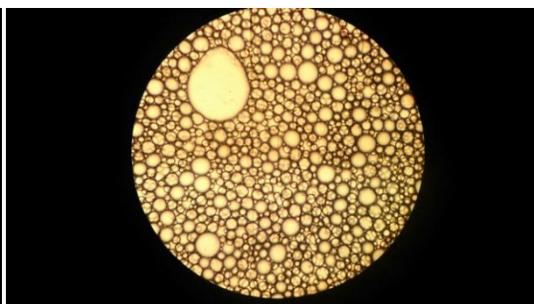
D. 3% NPs



E. 4% NPs



F. 5% NPs.



G. 5% NPs. A 12.500 rpm.



H. 10 % NPs y 50% Aceite mineral.



Figura 9. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones aceite mineral/agua con diferentes concentraciones de AMNPs recién preparadas.

7.7. EMULSIONES O/W ESTABILIZADAS CON 10% DE TENSOACTIVOS Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NPs

Se prepararon 8 emulsiones utilizando el 10% de la mezcla de tensoactivos correspondiente (Polisorbato 80 y Monooleato de sorbitán) como base, con diferentes concentraciones de AMNPs. Exceptuando la muestra 0 como un patrón estándar de comparación, donde sólo se utilizó la mezcla de 10% de tensoactivos, se observa que todas las muestras con distintas concentraciones de AMNPs, resultan estables (Figura 10), pero las que logran mantenerse estables por más tiempo son las muestras 6 y 7, ambas con un contenido de 5 % NPs, pero agitadas a 6.500 rpm y 12.500 rpm, respectivamente. Esto sugiere un efecto sinérgico en la estabilización de un sistema bifásico, dado que los tensoactivos reducen la tensión interfacial y la adición de NPs a una concentración apropiada (muestras 6 y 7) contribuyen en la estabilización mecánica del glóbulo.

En la Tabla XII se resumen todos los análisis realizados y se aprecia la evolución en el tiempo de la relación H_u/H_0 , donde la muestra 7 permanece estable hasta 3 horas después de ser preparada.

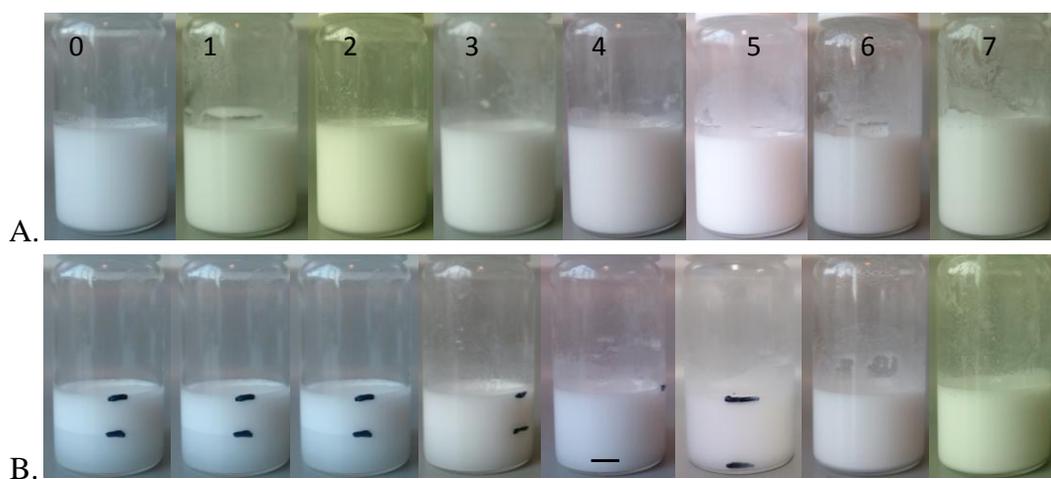
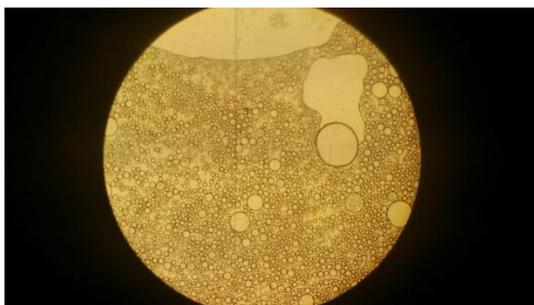


Figura 10. Fotografías de emulsiones preparadas con 10% de tensoactivos y con diferentes concentraciones de AMNPs. **A.** Emulsiones recién preparadas. **B.** Emulsiones a los 60 minutos.

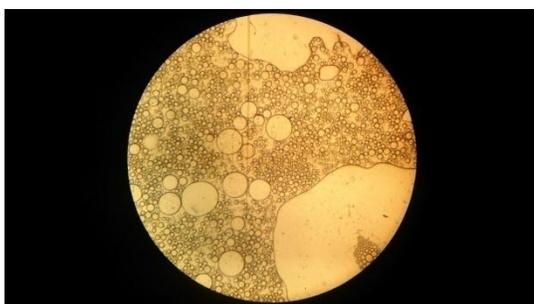
A. Sin NPs.



B. 0,5% NPs.



C. 1% NPs



D. 2% NPs



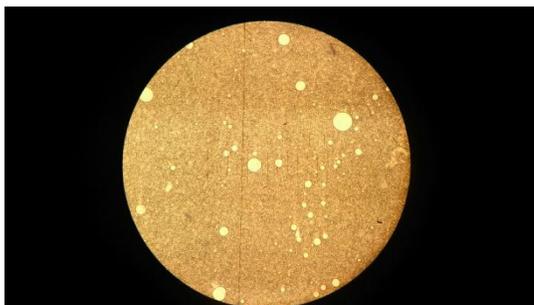
E. 3% NPs



F. 4% NPs.



G. 5% NPs.



H. 5% NPs. A 12.500 rpm.

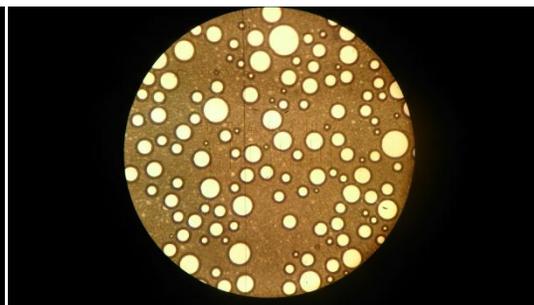


Figura 11. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones aceite mineral/agua con 10% de tensioactivos y diferentes concentraciones de AMNPs recién preparadas.

Tabla XII. Tabla resumen de análisis a emulsiones con 10% de tensoactivos y con diferentes concentraciones de AMNPs

Muestra	% NPs	Formación de Emulsión	Hu/Ho inicial	Hu/Ho 1 h después	Hu/Ho 2 h después	Hu/Ho 3 h después	Microscopio	Moda (um)	Amplitud
0	0	no	0,9	0,4			Heterogéneo	4	1,4
1	0,5	si	1	0,5			Heterogéneo	6	1
2	1	si	1	0,5			Heterogéneo	5	1,6
3	2	si	1	0,5			Heterogéneo	4	1,4
4	3	si	1	0,8	0,5		Heterogéneo	5	1,2
5	4	si	1	0,9	0,8		Homogéneo	4	0,8
6	5	si	1	1	1	0,9	Homogéneo	4	0,5
7	5	si	1	1	1	1	Homogéneo		

Las muestras fueron analizadas por microscopía óptica (Figura 11), donde se observa que se obtiene un tamaño promedio de glóbulo de 4 μm (Tabla XI), bastante más pequeño que lo que se obtuvo al utilizar sólo AMNPS como emulgente. Asimismo, se evidencia que a pesar de resultar todas las muestras estables inicialmente (excepto muestra 0), hay una clara coalescencia en las muestras con 0,5 a 3% de NPs, sólo en las muestras 5, 6 y 7 se logra un tamaño de glóbulo pequeño y a su vez homogéneo. Cabe mencionar que, a mayor velocidad de agitación durante la emulsificación, se producen más burbujas de aire, las cuales se evidencian en la muestra 7, figura 11 H.

7.8. EMULSIONES O/W ESTABILIZADAS CON 4% DE NPs Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TENSOACTIVO

Se prepararon 7 emulsiones utilizando una concentración fija de 4% de AMNPs y variando la concentración de tensoactivos. Para todas se utilizó una agitación de 12.500 rpm (Figura 12).

Como se mencionó previamente en el ítem 10.5, para un glóbulo de tamaño 12 μm se necesitaría en forma teórica un 4% de AMNPs, sin embargo, en forma práctica al preparar esta emulsión bajo una agitación de 6.500 rpm, esta no resulta estable, obteniéndose un tamaño de glóbulo mayor. Al utilizar una mayor agitación se logra un tamaño menor de glóbulo, resultando estable inicialmente, pero que no perdura en el tiempo. Como se puede ver en la Tabla XIII, con la evolución en el tiempo de la relación H_u/H_0 , a los 60 minutos esta relación se redujo rápidamente a la mitad. De este modo, se fija la concentración de 4% de NPs como patrón (muestra 0), para comparar las muestras preparadas con diferentes concentraciones de tensoactivos.

Como se muestra en la Tabla XIII, se obtuvo una emulsión estable y que perdura en el tiempo únicamente con la muestra 3, en la cual se utilizó 4% de AMNPs con un 50% de tensoactivos determinado teóricamente. Bajo esta concentración no se obtuvieron emulsiones estables, asimismo, sobre un 50% de tensoactivos se logró solo una estabilidad inicial.

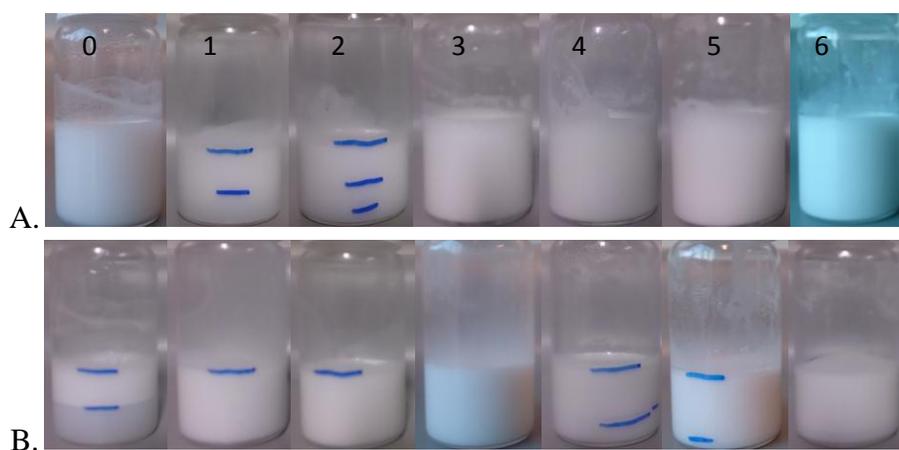


Figura 12. Fotografías de emulsiones preparadas con 4% AMNPs y con diferentes concentraciones de tensoactivos. **A.** Emulsiones recién preparadas. **B.** Emulsiones a los 60 minutos.

Tabla XIII. Tabla resumen de análisis a diferentes concentraciones de tensoactivos.

Muestra	% T	Formación de Emulsión	H _u /H _o inicial	H _u /H _o 1 h después	H _u /H _o 2 h después
0	0	si	1	0,5	
1	10	no	0,5	0,5	
2	30	no	0,8	0,5	
3	50	si	1	1	1
4	70	si	1	0,7	0,6
5	90	si	1	1	0,9
6	100	si	1	1	0,9

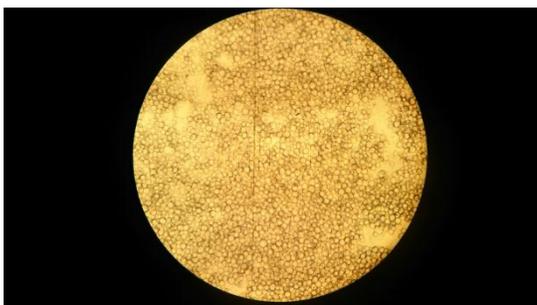
El análisis por microscopía óptica (Figura 13) da cuenta que en las muestras bajo el 50% de tensoactivos se observa un tamaño de glóbulo heterogéneo, y en concentraciones superiores al 50 %, se evidencian agregados.

Este comportamiento es atribuible al complejo NPs-Tensoactivo que se forma en la interfase del glóbulo, y a los diferentes grados de hidrofobicidad de las nanopartículas en base a la concentración del tensoactivo. Es decir, con la concentración de tensoactivo de la muestra 3, se logra la formación de un complejo con una humectación parcial por ambas fases, pero al superar esta concentración, el exceso de moléculas de tensoactivo puede formar multicapas alrededor de las nanopartículas y el complejo puede ser dispersado en la fase acuosa.⁴¹

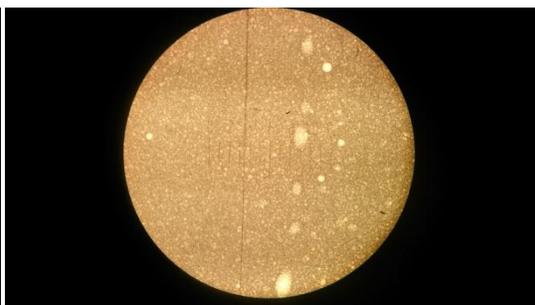
De este modo, las condiciones de estabilidad solo pueden ser mejoradas cuando la cantidad de tensoactivo permite la formación de una monocapa alrededor de la superficie de nanopartículas, lo cual es posible controlando la concentración de tensoactivo y la relación de volumen entre las fases.

Además, en este estudio preliminar se utilizó una mezcla de tensoactivos no iónicos (Polisorbato 80 y Monooleato de sorbitán), cuando sólo se debió utilizar el tensoactivo lipofílico para lograr un cierto grado de hidrofobicidad del complejo NP-tensoactivo, mediante la adsorción del tensoactivo lipofílico a la NP. El no haber realizado esta acción, pudo dificultar la estabilidad de la emulsión.

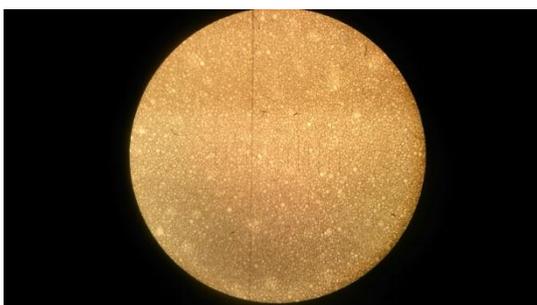
A. 4% NPs Sin tensoactivos.



B. con 10% de tensoactivos.



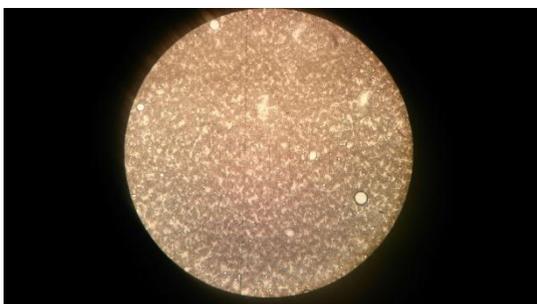
C. con 20% de tensoactivos.



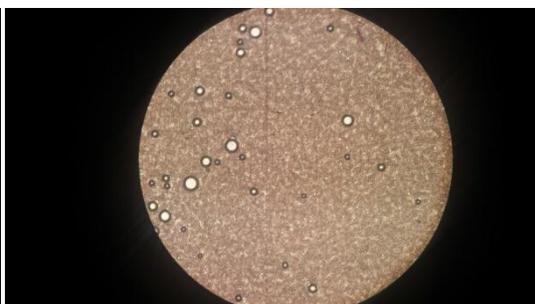
D. con 50% de tensoactivos.



E. con 70% de tensoactivos.



F. con 90 % de tensoactivos.



G. con 100 % de tensoactivos.

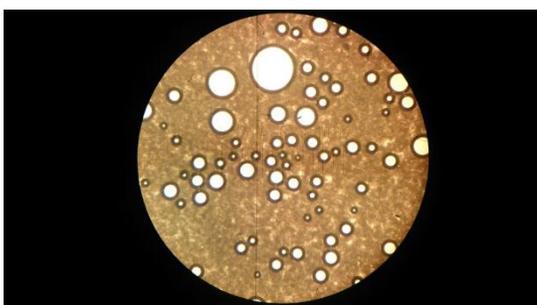


Figura 13. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones aceite mineral/agua con 4% de AMNPs y diferentes concentraciones de tensoactivo recién preparadas.

7.9. ESTABILIZACIÓN DE VITAMINA E, EN LA FASE INTERNA DE UNA EMULSIÓN O/W

Para estabilizar vitamina E en la fase interna de una emulsión o/w, se prepararon 3 emulsiones utilizando aceite mineral, alcohol cetílico y monoestearato de glicerilo neutro como fase grasa, las cuales fueron elaboradas utilizando una agitación de 12.500 rpm. En la muestra 1 sólo se utilizó una mezcla de tensoactivos no iónicos al 100 % de lo requerido para su estabilidad. En la muestra 2 se utilizó una mezcla de 50 % de tensoactivos requeridos y 4 % de nanopartículas de sílice modificadas con grupo amino. Finalmente, en la muestra 3 se utilizó una mezcla de 50 % de tensoactivos requeridos y 4 % de nanopartículas de sílice con morina adsorbida.

Las 3 emulsiones preparadas resultaron físicamente estables (Figura 14 A), incluso después de ser sometidas a centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos (Figura 15 A). Para evaluar la estabilidad de forma preliminar, se sometieron a desestabilización por envejecimiento, almacenándolas a temperatura ambiente durante dos meses, así también, luego de este período de tiempo se sometieron a centrifugación, permaneciendo estables en ambos ensayos (Figura 14 B y 15 B, respectivamente). Cabe destacar, que solo se logró una desestabilización por temperatura, luego de ser almacenadas a 40 C durante dos meses (Figura 14 C).



Figura 14. Fotografías de emulsiones preparadas con 100 % de tensoactivo (1), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs (2), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs-MOR. **A)** Emulsiones recién preparadas. **B)** Emulsiones almacenadas a temperatura ambiente, luego de dos meses. **C)** Emulsiones almacenadas a 40 C luego de dos meses.

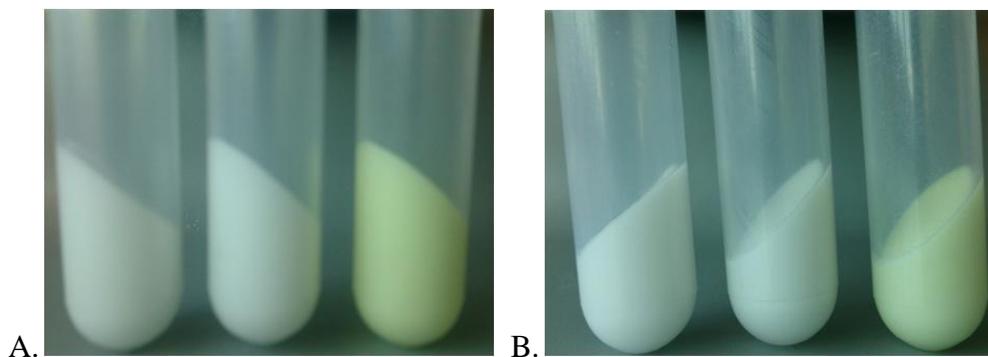


Figura 15. Fotografías de las muestras luego de ser sometidas a centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos. **A)** Recién preparadas. **B)** Luego de dos meses almacenadas a temperatura ambiente.

La estabilidad observada en el estudio anterior, también quedó comprobada con el análisis por microscopía óptica de estas emulsiones. La Figura 16 muestra la microscopía de emulsiones preparadas con el 100 % del tensoactivo (1), con el 50 % del tensoactivo y 4 % de AMNPs (2), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs-MOR, evaluadas a distintos tiempos (recién preparadas, emulsiones almacenadas a temperatura ambiente y luego de dos meses) y también en condiciones aceleradas a 40 C luego de dos meses, comprobándose que existe una alta estabilidad de los glóbulos en las pruebas a temperatura ambiente y solo presentando una alteración leve de estos en las pruebas realizadas a 40° C luego de dos meses.

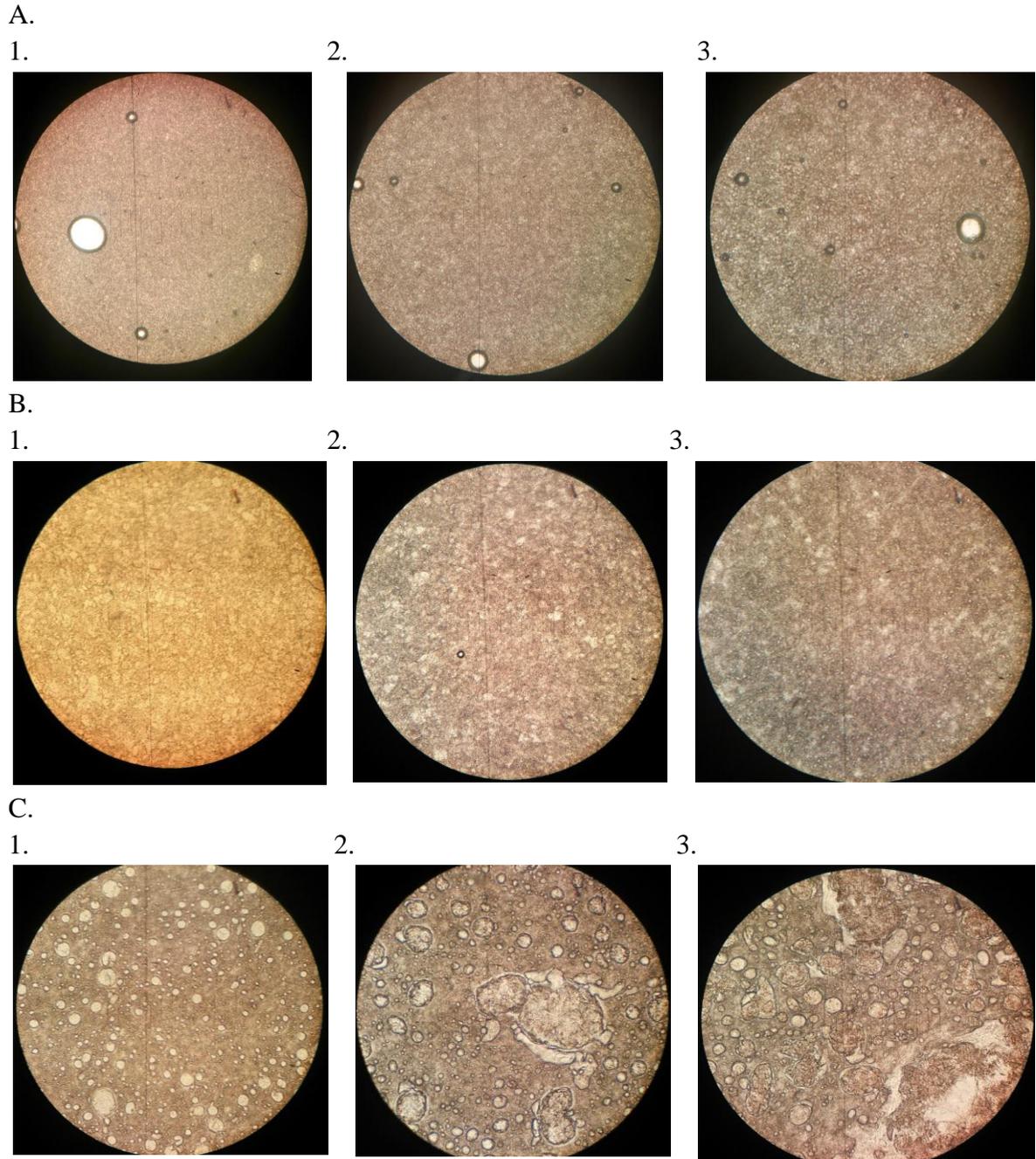


Figura 16. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones preparadas con 100 % de tensoactivo (1), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs (2), con 50 % de tensoactivo y 4 % de AMNPs-MOR. **A)** Emulsiones recién preparadas. **B)** Emulsiones almacenadas a temperatura ambiente, luego de dos meses. **C)** Emulsiones almacenadas a 40 C luego de dos meses.

10.9.1. ESTABILIZACIÓN QUÍMICA DE LAS EMULSIONES: ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO PROTECTOR DE LAS NANOPARTÍCULAS CON MORINA ADSORBIDA SOBRE LA DEGRADACIÓN DE VITAMINA E.

Se evaluó en forma preliminar la estabilidad de la vitamina E, monitoreando por HPLC su consumo, en tres emulsiones preparadas con 1.-mezcla de 100% de tensoactivos, 2.- 50% de tensoactivos más 4% de nanopartículas modificadas con grupo amino y 3.- 50% de tensoactivos más 4% de nanopartículas con morina adsorbida. El efecto de la adición de nanopartículas con morina se evaluó en función de la variación del contenido de Vitamina E en comparación con el determinado en las emulsiones preparadas con tensoactivos y con nanopartículas sin morina adsorbida.

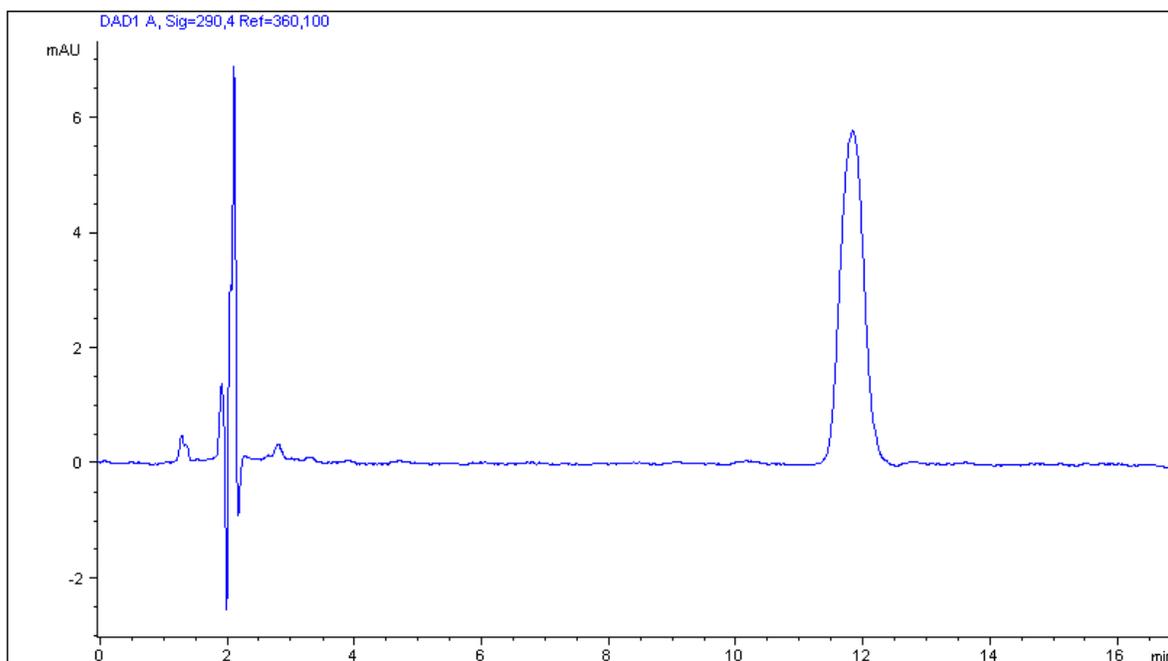


Figura 17. Cromatograma típico de Vitamina E extraída de las emulsiones preparadas.

Bajo las condiciones cromatográficas señaladas en la metodología, el cromatograma típico de las muestras extraídas (Figura 17) exhibe una señal bien definida que presenta un tiempo de retención de 11,85 minutos.

Del análisis de los resultados, podemos indicar lo siguiente:

- Las muestras analizadas correspondientes a las 3 emulsiones, en condiciones iniciales (tiempo de 24 horas luego de fabricada, a temperatura ambiente y sin adición de agua oxigenada) presentan un peak de área promedio de 120 UA.
- Para la muestra con tensoactivos, evaluada a temperatura ambiente 1 semana después, el contenido de vitamina E disminuye en un 12%.
- Al adicionar agua oxigenada a la muestra 1 (temperatura ambiente, 24 horas) el contenido de vitamina E disminuye un 16%.
- Sometida la muestra 1 con peróxido y en condiciones aceleradas (40 C) la disminución de la vitamina E es de 19%.
- Evaluada la muestra 2 que contiene NPs con grupo aminopropil en su superficie, se determina que luego de 24 horas con la adición de agua oxigenada, muestras evaluadas a temperatura ambiente y a 40 C, disminuyen su contenido de vitamina E en 5,4 y 23%, respectivamente. Sin embargo, estos valores presentan una mayor variación que otras determinaciones.
- Finalmente, los resultados para las emulsiones de mayor interés para este estudio, las cuales contienen NPs con morina adsorbida, muestran que luego de 24 horas con la adición de agua oxigenada, muestras evaluadas a temperatura ambiente y a 40 C, disminuyen su contenido de vitamina E en 9,6 y 7,1%, respectivamente.

Estos resultados, aunque preliminares, son promisorios dado que muestran que las nanopartículas de sílice con el flavonoide morina adsorbido en su superficie, tienen efecto sobre la estabilidad química de emulsiones o/w, protegiendo a la degradación de la Vitamina E contenida en el glóbulo oleoso.

8. CONCLUSIONES

Las nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con un grupo aminopropil permitieron en forma simple y eficiente, adsorber el flavonoide morina.

Se realizó un diseño experimental para la fabricación de las formulaciones que permitió identificar las condiciones óptimas para la obtención de emulsiones preparadas a base de aceite mineral y agua, sin embargo, dadas las condiciones de trabajo, se decidió modificar las condiciones sugeridas con la finalidad de obtener una formulación de 10 g en un vial de 20 mL.

Las nanopartículas mesoporosas de sílice modificadas superficialmente con grupo aminopropil, utilizadas como único emulgente en una emulsión o/w, no logran mantener la estabilidad física de ésta durante un tiempo razonable. Se postula que para conseguir una emulsión estable utilizando sólo nanopartículas como emulgente, éstas podrían ser modificadas cambiando el tipo de funcionalización por uno más lipofílico o también se podría cambiar la fase oleosa, por una con mayor viscosidad para que otorgue un mayor soporte a las nanopartículas.

Al utilizar tensoactivos no iónicos y nanopartículas de sílice superficialmente modificadas con grupo amino, a una concentración apropiada, se logra un efecto sinérgico en la estabilización de un sistema bifásico que permite la formación de una monocapa alrededor de la superficie de las nanopartículas.

El estudio preliminar para evaluar la capacidad de otorgar estabilidad química a una emulsión reveló resultados promisorios, dado que se genera un efecto protector frente a la degradación de la vitamina E contenida en el glóbulo, lo cual permite tener un precedente importante para utilizarlo como estabilizante.

9. REFERENCIAS

1. Rieger, M. 1986. Emulsions. En: LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. Y KANIG, J. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Tercera edición. EE.UU. Editorial Lea & Febiger. pp 502-532.
2. Fernandez, A. 2006. Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones o/w. Tesis Doctoral. Granada. Universidad de Granada. pp I.43-I.83.
3. Delgado, M., Otero, F. y Méndez, J. 1997. Emulsiones. En: VILA JATO, J. Tecnología Farmacéutica Volumen I: Aspectos Fundamentales de los Sistemas Farmacéuticos y Operaciones Básicos. España. Editorial Síntesis. pp 260-299.
4. Swarbrick, J., Rubino, J. y Rubino, O. Dispersiones de partículas gruesas. En: GENNARO, A. Remington Farmacia Tomo I. 20° Edición. Editorial medica Panamericana. pp:372-387.
5. Khan, B., Akhtar, N., Shoaib Khan, H., Waseem, K., Mahmood, T., Rasul, A., Iqbal, M. y Khan, H. 2011. Basics of pharmaceutical emulsions: A review. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5(25): 2715-2725.
6. Nairn, J. Soluciones, emulsiones, suspensiones y extractos. En: GENNARO, A. Remington Farmacia Tomo I. 20° Edición. Editorial medica Panamericana. pp: 857- 864.
7. Pickering, S. 1907. Emulsions. Journal of the Chemical Society, Transactions. Vol. 91: 2001-2021.
8. Aveyard, R., Binks*, B. y Clint, J. 2003. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. Advances in Colloid and Interface Science: 503–546.
9. Binks, B. 2002. Particles as surfactants_similarities and differences. Current Opinion in Colloid & Interface Science (7): 21-41.
10. Chevalier, Y., y Bolzinger, M. 2013. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and EngineeringAspects.
11. Ma, H., Luo, M. y Dai, L. 2008. Influences of surfactant and nanoparticle assembly on effective interfacial tensions. Physical Chemistry Chemical Physics (10): 2207–2213.
12. Binks, B. y Rodrigues, J. 2007. Synergistic Interaction in Emulsions Stabilized by a Mixture of Silica Nanoparticles and Cationic Surfactant. Langmuir (23): 3626-3636.

13. Santini, E., Guzmán, E., Ferrari, M. y Liggieri, L. 2014. Emulsions stabilized by the interaction of silica nanoparticles and palmitic acid at the water–hexane interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.
14. Binks, B. y Desforges, A. 2007. Synergistic Stabilization of Emulsions by a Mixture of Surface-Active Nanoparticles and Surfactant. *Langmuir* (23): 1098-1106.
15. Yang J., Guo J., Yuan J. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT- Food Science and Technology*. (41): 1060-1066.
16. Luo, Z., Murray, B., Yusoff, A., Morgan, M., Povey, M. y Day, A. 2011. Particle-Stabilizing Effects of Flavonoids at the Oil-Water Interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (59): 2636–2645.
17. Pietta, P. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* (63): 1035-1042.
18. Heim, K., Tagliaferro, A. y Bobilya, D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* (13): 572–584.
19. Carloti M, Sapino S, Ugazio E, Caron G. 2011. On the complexation of quercetin with methyl- β -cyclodextrin: photostability and antioxidant studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 70(1-2): 81-90.
20. Costantino U, Ambrogi V, Nocchetti M, Perioli L. 2008. Hydrotalcite-like compounds: versatile layered hosts of molecular anions with biological activity. *Microporous and Mesoporous Materials*; 107(1): 149-60.
21. Bustos, P. 2013. Adsorción de Flavonoides en Nanopartículas de Sílice: Caracterización y evaluación de la eficiencia antioxidante. Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico. Santiago. Universidad de Chile. Pp 1-9.
22. Berlier, G., Gastaldi, L., Sapino, S., Miletto, I., Bottinelli, E., Chirio, D. y Ugazio, E. 2013. MCM-41 as a useful vector for rutin topical formulations: Synthesis, characterization and testing. *International Journal of Pharmaceutics* (457): 177–186.
23. Berlier, G., Gastaldi, L., Ugazio, E., Miletto, I., Iliade, P. y Sapino, S. Stabilization of quercetin flavonoid in MCM-41 mesoporous silica: positive effect of surface functionalization. *Journal of Colloid and Interface Science* (93): 109–118.

24. Sapino, S., Ugazio, E., Gastaldi, L., Miletto, I., Berlier, G., Zonari, D. y Oliaro-Bosso, S. 2015. Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: characterization and in vitro studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (89): 116–125.
25. Simovic, S., Prestidge, C. 2006. Nanoparticle encapsulation of emulsion droplets. *International Journal of Pharmaceutics* (324) 92–100.
26. Frelichowska, J., Bolzinger, M., Valour, J., Mouaziz, H., Pelletier, J., Chevalier, Y. 2009. Pickering w/o emulsions: drug release and topical delivery, *International Journal of Pharmaceutics* (368) 7–15.
27. Frelichowska, J., Bolzinger, M., Pelletier, J., Valour, J., Chevalier, Y. 2009. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions, *International Journal of Pharmaceutics* 371 (2009) 56–63
28. Rancan, F., Gao, Q., Graf, C., Troppens, S., Hadam, S., Hackbarth, S., Kembuan, C. 2012. Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS Nano* vol. 6 (8): 6829-6842.
29. Morales J, Günther G, Zanocco AL, Lemp E. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical–experimental study. *PloSone* 2012; **7** (7): e40548.
30. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49 (6): 2774-9.
31. 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(1): 62-9.
32. Carrera, M.; Romero, A.; Villegas, M.; Parentis, M.; Gonzo, E. 2013. Obtención de la tensión superficial mediante el método de Du Nouy y el método de la gota pendiente. En: VII Congreso Asociación Argentina de Ingenieros Químicos. Argentina. Pp: 4-7
33. Nada, A., Krishnaiah, Y., Zaghoul, A., and Khattab, I. (2010). Analysis of vitamin E in commercial cosmetic preparations by HPLC. *Journal of Cosmetic Science.*, 61, 353–365.
34. Rowe, R. 2006. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th edition. London. Pharmaceutical press. 471p.
35. Datos Técnicos Dispersores Ultra-Turrax® T-series. IKA. USA

36. Salager, J. 1994. Emulsión: Influencia de las variables de agitación y composición. Versión 2. Venezuela. 5p.
37. Arriagada, F. 2015. Estudio de la adsorción de morina en nanopartículas, evaluación del medio de dispersión y capacidad antioxidante. Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 20p.
38. Arriagada, F.; Correa, O.; Günter, G.; Nonell, S.; Mura, F.; Olea-Azar, C.; Morales, J.; Morin flavonoid adsorbed on mesoporous silica, a novel antioxidant nanomaterial. PloSone. 2016: 6.
39. Chevalier, Y., y Bolzinger, M. 2013. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Pp: 5.
40. Kaewsaneha, C.; Tangboriboonrat, P.; Duangporn, P.; Mohamed, E.; Abdelhamid, E. Preparation of Janus colloidal particles via pickering emulsion: an overview. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 439 (2013) 35- 42.
41. Santini, E., Guzmán, E., Ferrari, M. y Liggieri, L. 2014. Emulsions stabilized by the interaction of silica nanoparticles and palmitic acid at the water–hexane interface. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.