



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**ESTUDIO DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE  
SÍLICE CONJUGADAS CON ÁCIDO CARMÍNICO  
COMO ESTABILIZANTES DE VITAMINA E Y  
VITAMINA A EN EMULSIONES “PICKERING O/W”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
FARMACÉUTICAS

**CATALINA DE LOS ÁNGELES UGARTE NÚÑEZ**

Director

Dr. Javier E. Morales Valenzuela

Co-Director

Dr. Germán R. Günther Sapunar

**SANTIAGO, CHILE**

**2019**



# ÍNDICE

I. Índice de Figuras.....	iv
II. Índice de Tablas.....	vi
III. Glosario.....	vii
IV. Resumen.....	viii
V. Summary.....	ix
1. Introducción.....	1
1.1 Emulsificantes.....	2
1.2 Estabilidad de emulsiones.....	3
1.3 Caracterización de las emulsiones .....	5
1.4 Industria cosmética.....	6
1.5 Emulsiones Pickering.....	7
1.6 Nanopartículas de sílice y su uso.....	8
1.7 Ácido Carmínico.....	9
1.8 Vitamina E.....	10
1.9 Vitamina A.....	10
2. Descripción de la propuesta.....	12
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivo general.....	14
5. Objetivos específicos.....	14
6. Materiales.....	15
6.1 Reactivos.....	15
6.2 Solventes.....	15
7. Instrumentación.....	16
8. Metodologías.....	18
9. Resultados y discusión.....	29
9.1 Síntesis de nanopartículas de sílice con capa mesoporosa modificada superficialmente con grupo amino. ....	30

9.2 Síntesis de nanopartículas superficialmente modificadas con grupo amino (ACMSNPs) y posteriormente conjugadas covalentemente con ácido carmínico (ACMSNPs-CA).....	30
9.3 Caracterización de nanopartículas conjugadas con y sin unión covalente con ácido carmínico .....	31
9.3.1 Espectroscopía IR .....	31
9.3.2 Microscopía electrónica de barrido .....	32
9.3.3 Potencial Zeta, tamaño y distribución de tamaño.....	34
9.4 Eficiencia de conjugación de ácido carmínico unido covalentemente a las nanopartículas (ACMSNPs). .....	36
9.5 Determinación de espectros de absorción UV-visible de nanopartículas conjugadas con ácido carmínico dispersas en diferentes solventes.....	36
9.6 Capacidad antioxidante del nanomaterial. Desactivación de oxígeno singlete. ....	38
9.7 Evaluación de emulsiones comerciales.....	40
9.8 Emulsión o/w: preparación y evaluación. ....	40
9.9 Porcentaje de incorporación de vitamina E y vitamina A en las emulsiones fabricadas.....	43
9.10 Incorporación de nanopartículas en emulsiones o/w.....	43
9.11 Estabilidad y caracterización de las emulsiones .....	44
9.11.1. Estabilidad física .....	44
9.11.2 Evaluación del color de las emulsiones en función de la concentración de ACMSNPS-CA incorporadas. ....	45
9.11.3 Color de las emulsiones frente a condiciones de estrés.....	46
9.11.4 Variación del color de las emulsiones en función del pH.....	47
9.11.5 Color de las emulsiones con ácido carmínico en solución .....	49
9.11.6 Viscosidad.....	50
9.11.7 Forma y tamaño de glóbulo.....	52
9.11.8 Evaluación química.....	52

9.11.8.1 Caracterización del pH. ....	52
9.11.8.2 Estudio de estabilidad química a partir del consumo de vitamina E.....	52
9.11.8.3 Estudio de estabilidad a partir del consumo de vitamina A.....	57
10. Conclusiones. ....	58
11. Bibliografía.....	60

# I. ÍNDICE DE FIGURAS

• <b>Figura 1.</b> Esquema emulsiones Pickering .....	4
• <b>Figura 2.</b> Estructura del ácido carmínico.....	7
• <b>Figura 3.</b> Estructura de la Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) .....	10
• <b>Figura 4.</b> Estructura de la Vitamina A (retinol).....	12
• <b>Figura 5.</b> Palmitato de retinol.....	13
• <b>Figura 6.</b> <i>Graphical Abstract</i> .....	15
• <b>Figura 7.</b> Esquema de reacción para formación de enlace amida entre COOH- y -NH <sub>2</sub> de ácido carmínico y ACMSNP respectivamente.....	20
• <b>Figura 8.</b> Imagen de nanopartícula como polvo seco. ....	21
• <b>Figura 9.</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido.....	22
• <b>Figura 10.</b> Ampliación de imágenes de nanopartículas con SEM.....	30
• <b>Figura 11.</b> Espectro de absorción UV-vis de (A) ácido carmínico (CA) en etanol, (B) ACMSNPs-CA dispersas en aceite mineral, y (C) ACMSNPs-CA dispersas en solución acuosa de glicerina al 5%.....	30
• <b>Figura 12.</b> Emulsiones terminadas E5, E7 y E14.....	30
• <b>Figura 13.</b> Emulsiones terminadas E11 y E12.....	30
• <b>Figura 14.</b> Color de emulsiones con diferentes concentraciones de ACMSNP-CA.....	34
• <b>Figura 15.</b> Color de emulsiones E-VE-CA a tiempo 0, y después de 48 horas de exposición a las condiciones trabajo.....	40
• <b>Figura 16.</b> Imágenes de emulsión E-VE-CA en medios con distintos pH.....	42
• <b>Figura 17.</b> Emulsiones E-VE-CA frente a diferentes medios (pH, temperatura y concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	45
• <b>Figura 18.</b> Emulsiones con ácido carmínico en solución.....	46
• <b>Figura 19.</b> Gráfico de viscosidad en función de la velocidad de cizalla.....	47
• <b>Figura 20.</b> Imagen de microscopía óptica de emulsiones con vitamina E.....	48
• <b>Figura 21.</b> Gráfico de Consumo de vitamina E en emulsión E-VE, con diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50

- **Figura 22.** Gráfico de Consumo de vitamina E en emulsión E-VE, con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a 40 °C.....55
- **Figura 23.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsión E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a temperatura ambiente.....56
- **Figura 24.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsiones E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al 1,5 %, a temperatura ambiente.....57
- **Figura 25.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsiones E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al 1,5%, a 40 °C.....59
- **Figura 26.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsiones E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al 3%, a 40 °C.....60
- **Figura 27.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsiones E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 40 °C.....60

## II. ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Formulaciones de Emulsiones.....10
- **Tabla 2.** Tamaños de nanopartículas para batch 17 y 18.....20
- **Tabla 3.** Valores de potencial Z y tamaño para nanopartículas compactas (SNPs), con capa mesoporosa (CMSNPs) y modificadas con amino ACMSNPs.....30
- **Tabla 4.** Valores de tamaño y potencial Z para nanopartículas conjugadas con ácido carmínico (ACMSNPs-CA).....30
- **Tabla 5.** Porcentaje de VE y VA incorporadas en las emulsiones.....30
- **Tabla 6.** Viscosidad de emulsiones E-VE, E-VE-CA 0,1 %, E-VE-CA 0,5 %, E-VE-CA 1 %.....50



### III. GLOSARIO

- **CA:** Ácido Carmínico
- **VE:** Vitamina E
- **VA:** Vitamina A
- **SNP:** Nanopartícula sólida.
- **MSNP:** Nanopartícula mesoporosa.
- **AMSNP:** Nanopartícula mesoporosa modificada con grupo aminopropil en la superficie.
- **CMSNP:** Nanopartícula con centro sólido y corona mesoporosa (*core-shell*).
- **ACMSNP:** Nanopartícula con centro sólido y corona mesoporosa modificada con grupo aminopropil.
- **ACMSNP-CA:** Nanopartícula con centro sólido y corona mesoporosa modificada con grupo aminopropil y luego conjugada con ácido carmínico.
- **E-VE:** Emulsión con Vitamina E (sin nanopartículas).
- **E-VA:** Emulsión con Vitamina A (sin nanopartículas).
- **E-VE-NH<sub>2</sub>:** Emulsión con vitamina E y nanopartículas con centro sólido y corona mesoporosa (*core-shell*), con superficie modificada con grupo aminopropil (ACMSNP).
- **E-VA-NH<sub>2</sub>:** Emulsión con vitamina A y nanopartículas con centro sólido y corona mesoporosa (*core-shell*), con superficie modificada con grupo aminopropil (ACMSNP).
- **E-VE-CA:** Emulsión con vitamina E y nanopartículas con centro sólido y corona mesoporosa (*core-shell*), con superficie modificada con grupo aminopropil y posteriormente conjugada con ácido carmínico (ACMSNP-CA).
- **E-VA-CA:** Emulsión con vitamina A y nanopartículas con centro sólido y corona mesoporosa (*core-shell*), con superficie modificada con grupo aminopropil y posteriormente conjugada con ácido carmínico (ACMSNP-CA).
- **E14:** Emulsión preparada con la formulación N° 14.

## IV. RESUMEN

Los materiales híbridos constituidos por pigmentos naturales y sintéticos incorporados a matrices inorgánicas, son de gran interés para la industria química, cosmética y alimentaria, pues se ha demostrado que mejoran la resistencia y estabilidad química de los pigmentos. Uno de los pigmentos más utilizado en la industria cosmética, corresponde al ácido carmínico, compuesto polifenólico de origen natural que otorga a los productos que lo contienen, un característico color rojo y además, otorgaría protección frente a la oxidación. Diversos estudios muestran que es posible la adsorción y conjugación entre polifenoles naturales, con actividad antioxidante, y nanomateriales de sílice, sin perder la capacidad antioxidante del polifenol, ni estabilidad de este nanomaterial.

El objetivo de este trabajo es preparar y caracterizar un nanomaterial bifuncional, antioxidante y colorante, basado en una nanopartícula de sílice *core-shell*, con un centro de sílice sólido (*core*) y una capa externa (*shell*) mesoporosa. La capa mesoporosa se modificó con un grupo aminopropil, y posteriormente se conjugó con ácido carmínico (CA). Luego, ésta fue incorporada en una emulsión o/w para evaluar sus propiedades como colorante y capacidad antioxidante, determinando una mejora en la estabilidad química de un compuesto bioactivo incorporado en la fase oleosa del sistema, utilizando, en este caso, vitamina E como modelo lipofílico.

Uno de los ámbitos de estudio de las nanopartículas de sílice son las emulsiones de “Pickering”, emulsiones estabilizadas mediante partículas sólidas, en este caso nanopartículas de sílice, capaces de ubicarse en la interfase. Una de las ventajas de las nanopartículas *core-shell* de sílice, es que el centro sólido otorga una densidad suficiente, que permite a la nanopartícula mantener su ubicación en la interfase de la emulsión. Otra ventaja, es la capacidad que tiene la capa mesoporosa modificada, de inmovilizar, mediante la adsorción o la formación de un enlace covalente a compuestos bioactivos.

El enlace covalente, entre el CA y el grupo aminopropil, se obtuvo utilizando EDC/NHS como activantes, obteniendo nanopartículas esféricas de tamaño homogéneo igual a 182 nm. Al adicionar el nanomaterial en la emulsión, esta adquirió un atractivo color rosado. Al evaluar la capacidad antioxidante de este sistema, se observó una disminución en el consumo vitamina E, permitiendo considerar este nanomaterial, como nanoexcipiente bifuncional, capaz de conferir propiedades antioxidantes y color.

## V. SUMMARY

Hybrid materials constituted by natural and synthetic dyes incorporated into inorganic matrices, have been of great interest for the chemical, cosmetic and food industry. These materials have been shown to be able to improve the resistance and chemical stability of the dyes by several studies. An important dye used by the cosmetic industry is the carminic acid (CA), a natural polyphenolic compound that confers a characteristic red color to the products, and also would provide protection against oxidation. Several studies show that the adsorption and grafting between natural polyphenols with antioxidant capacity, and silica nanomaterial is possible, without losing the polyphenol antioxidant activity or stability.

The aim of this work is to prepare and characterize a bifunctional dye-antioxidant nanomaterial based carminic acid (CA) decorated solid core-mesoporous shell silica nanoparticles. The CA nanoparticles were incorporated into an o/w emulsion containing vitamin E as lipophilic bioactive compound, and its properties as a dye and as an antioxidant chemical stabilization capacity was evaluated, by determining the vitamin E consumption with and without the addition of the CA nanomaterial, under forced temperature and oxidation conditions.

Silica nanoparticles have been largely used to stabilize Pickering emulsions, which are stabilized by the presence at the interface of solid particles instead of a surfactant. One of the advantages of the core-shell silica nanoparticles is the solid core providing enough density to allow the nanoparticle to remain at the emulsion interface. Another advantage is that the mesoporous shell improves the immobilization, either by adsorption or by covalent linking of: dyes, antioxidants, drugs or other bioactive compounds, adding a new function to the nanoparticle. Grafting of carminic acid (CA) to core-shell nanoparticles was achieved by using EDC/NHS as coupling agents. The resulting nanoparticles were spherical and homogeneously sized, (around 182 nm of diameter). A notorious change of emulsion color was observed when the nanomaterial was added. The nanomaterial incorporation also improved chemical stability. The decrease of vitamin E consumption, demonstrated a considerable antioxidant effect for the developed nanomaterial. These results allow to consider this nanomaterial as a bifunctional dye-antioxidant nanoexcipient when incorporated into a w/o emulsion.

# 1. INTRODUCCIÓN

Una emulsión es un sistema disperso, formado por una mezcla de dos o más líquidos inmiscibles, que constituyen un sistema heterogéneo (dos o más fases), en el cual una se dispersa uniformemente en la otra en forma de glóbulo, denominándose cada una, fase interna (discontinua o dispersa) y fase externa (continua o dispersante), respectivamente [1, 2, 4]. Las emulsiones son inestables desde el punto de vista termodinámico, ya que al dispersarse un líquido inmiscible en otro, en forma de gotas pequeñas, se produce un aumento en el área interfacial entre ambas fases, produciéndose un aumento en la energía libre, y en consecuencia, el sistema tenderá a recuperar su estado inicial de menor energía, agrupando así los glóbulos hasta fusionarlos (coalescencia) y formar nuevamente dos fases inmiscibles con menor área interfacial [3, 4]. Usualmente, las fases que componen una emulsión son aceite, o una disolución orgánica, y agua, o una disolución acuosa. Se denomina emulsión aceite en agua (o/w), si glóbulos de aceite se encuentran dispersos en agua o; agua en aceite (w/o), si el agua está dispersa en aceite. Se han descrito también sistemas trifásicos, en los que el agua se dispersa en aceite y este a su vez en agua, formando un sistema de tipo agua en aceite en agua (w/o/w) y también se pueden formar sistemas (o/w/o) [3, 4, 5].

Incorporando un tercer componente, denominado emulsificante, es posible estabilizar el sistema, ya que es capaz de formar un film o capa alrededor de los glóbulos impidiendo la coalescencia [6]. Existen diferentes tipos de emulsificantes, y dependiendo de su mecanismo, se pueden clasificar en 3 grupos: agentes tensoactivos, coloides hidrofílicos y sólidos finamente divididos [4, 6, 10]. El emulsificante estabiliza la emulsión permitiendo una aplicación práctica.

Las emulsiones son ampliamente utilizadas en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. En la industria farmacéutica se utilizan como vehículo para sustancias o fármacos que, por su solubilidad, su estabilidad, sus pobres características organolépticas (mal sabor u olor) entre otras razones, son de difícil administración, permiten elaborar formulaciones parenterales con fármacos liposolubles, o mejorar la biodisponibilidad de fármacos de administración tópica [7].

Las emulsiones son versátiles y de acuerdo al uso deseado, pueden formularse para obtener un aspecto, una viscosidad o una textura determinadas; pueden ser fluidas, semisólidas, coloreadas, opacas, brillantes, etc. Esta cualidad permite a la industria cosmética elaborar productos con características sensoriales y organolépticas muy diversas y específicas [2, 8, 9].

En cuanto al método de elaboración y su relación con el tamaño del glóbulo, se debe controlar la temperatura, velocidad y tiempo de agitación durante la emulsificación, velocidad de enfriamiento y considerar la elección del equipo a utilizar [7]. La elección del emulsificante determina la estabilidad, e influye en el tipo de emulsión que se formará (o/w ó w/o). Si este es más soluble en la fase acuosa, es probable que la emulsión resultante sea o/w; si es más soluble en la fase oleosa esta será w/o. Sin embargo, también dependerá de las cantidades relativas de fase oleosa y acuosa en la emulsión [4, 6]. Los componentes de la fase oleosa están estrechamente relacionados con la viscosidad y con la percepción sensorial de la emulsión (al aplicar la emulsión). Adicionalmente, el tamaño de glóbulo determina la apariencia de la emulsión, y dependiendo de este, las emulsiones se pueden clasificar en macroemulsiones, que poseen un tamaño de glóbulo entre 0,1 y 10  $\mu\text{m}$ , por lo que son opacas y de color blanco, mientras que las microemulsiones tienen tamaños de glóbulos entre 10 y 200 nm, y tienen una apariencia de un líquido o gel translúcido [6].

Considerando que son de uso farmacéutico, cosmético y alimentario, se debe procurar elaborar productos seguros y eficaces, manteniendo las cualidades iniciales, la estabilidad de las sustancias activas y el efecto para el cual fueron formulados [3, 8, 14].

## **1.1 EMULSIFICANTES**

Los emulsificantes pueden estabilizar la emulsión a través de diferentes mecanismos y cada uno con diferentes características y ventajas. El primer grupo corresponde a los agentes tensoactivos, moléculas de carácter anfifílico, capaces de ubicarse entre ambas fases, reduciendo la tensión interfacial [4, 6]. Los tensoactivos pueden ser de carácter iónico o no iónico, y pueden ser más o menos solubles, en la fase oleosa o en la fase acuosa [6]. El

emulsificante se elige en relación a la composición de la fase oleosa y al valor del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de ésta. El valor de BHL del tensoactivo, o el BHL resultante de una combinación de tensoactivos, debe ser igual al BHL que posee la fase oleosa [7]. Un segundo tipo de emulsificante, son los coloides hidrofílicos, que en una emulsión o/w, forman un film multimolecular alrededor del glóbulo. Estos pueden aumentar la viscosidad del sistema, contribuyendo a mejorar la estabilidad de la emulsión [4, 6]. Un tercer grupo, corresponde a los sólidos finamente divididos, partículas capaces de adsorberse en la interfase de los líquidos inmiscibles que conforman la emulsión, formando una capa densa, muy estable a la coalescencia. Se adsorben en la fase grasa o acuosa, dependiendo del ángulo de contacto que se forme entre la partícula y el medio [11, 15]. Este tipo de emulsiones, se denomina “emulsiones de Pickering”, dado el investigador que las desarrolló o simplemente denominadas “Emulsiones Pickering”. Las emulsiones “Pickering” tienen ventajas que las convierten en una alternativa a las emulsiones estabilizadas con tensoactivos, considerando la asociación de estos a efectos irritantes sobre la piel [10, 12, 15 y 16].

## 1.2 ESTABILIDAD DE EMULSIONES

La inestabilidad de las emulsiones puede tener su origen en diferentes fenómenos físicos y químicos. Los fenómenos físicos que las originan son 4, y corresponden al crecimiento o maduración de Ostwald, el *creaming* o cremado, la floculación y la coalescencia. El crecimiento de Ostwald es un fenómeno en el cual las gotas más pequeñas se disuelven y se fusionan en otra gota más grande, aumentando su tamaño. Es posible evitarlo si se obtiene una distribución homogénea de este [6, 7].

El cremado es un proceso en el cual los glóbulos de la fase se desplazan hacia la superficie de la emulsión, cuando la densidad de estos es menor que la densidad de la fase dispersante; o si su densidad es mayor a la de la fase dispersante, sedimentan producto de la gravedad (*caking*) [2, 4]. Este fenómeno se puede aminorar, aumentando la viscosidad de la emulsión y así disminuir la velocidad con la que los glóbulos difunden a través de esta; también, disminuyendo el tamaño de glóbulo; y evitando grandes diferencias entre las densidades de ambas fases [4]. Otro fenómeno de inestabilidad es la floculación, en el cual

los glóbulos se agregan acelerando el proceso de cremado, pero sin perder su forma. Este fenómeno puede ser revertido redispersando los glóbulos, y puede ser evitado, recurriendo a la estabilización electroestática y estérica, utilizando tensoactivos iónicos o tensoactivos no iónicos con un grupo hidrofílico voluminoso (emulsión o/w) [2, 6, 7].

Los diferentes fenómenos que provocan inestabilidad pueden presentarse en forma simultánea, y particularmente la floculación, es un proceso que puede ocurrir previo al fenómeno de cremado, y este a su vez, puede ser anterior a la coalescencia [6]. A diferencia de la floculación y el cremado, la coalescencia es un proceso irreversible, en el cual dos o más gotas se fusionan para formar una sola. Al aproximarse una gota a otra, por difusión, la distancia entre ambas disminuye, hasta fusionarse formando gotas más grandes, que generan finalmente la separación total de las fases. Este fenómeno espontáneo, eventualmente llevará a la emulsión a su estado inicial de dos fases inmiscibles. Para evitar la coalescencia se puede modificar el tensoactivo, incorporar cristales líquidos para evitar el acercamiento de dos gotas, aumentar la viscosidad, o utilizar otro tipo emulsificante, como los sólidos finamente divididos, los cuales son buenos estabilizadores frente a la coalescencia [6, 11].

Las emulsiones también pueden presentar inestabilidades químicas, debido a incompatibilidades entre los diferentes componentes en ella. Un componente puede afectar la solubilidad de otro, o si bioactivos fotosensibles han sido incorporados en la emulsión, estos pueden degradarse fácilmente, perdiendo su actividad [7]. También, existen reacciones que dan cuenta de incompatibilidades, como reacciones ácido-base y de oxidación. Las emulsiones suelen estar constituidas por mezclas de aceites o grasas, derivados de ácidos grasos, que pueden oxidarse fácilmente, perdiendo sus características organolépticas. Estas reacciones de oxidación se favorecen en presencia de oxígeno [7]. Para evitar este tipo de inestabilidades se incorporan agentes antioxidantes como el butilhidroxitolueno, o quelantes, como el EDTA, capaces de secuestrar metales responsables de la oxidación [7]. Las emulsiones tienen un importante porcentaje de agua por lo que se incorporan conservantes para prevenir el desarrollo de microorganismos. Los conservantes requieren especial cuidado en el control de pH pues su efectividad puede verse disminuida si no es el adecuado [13]. Existen diferentes ensayos que permiten caracterizar una emulsión y evaluar la estabilidad de ésta [13].

### **1.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES**

Existen diferentes metodologías que permiten evaluar si una emulsión cumple con las cualidades que debe poseer, y si es segura para el uso final que se le dará. Realizar una inspección visual de la emulsión permite caracterizar el color y el aspecto, presencia de separación de fases o cremado. Se evalúa el olor, que podría también, indicar presencia de enranciamiento de los componentes grasos. Otras evaluaciones son: la determinación del tipo de emulsión, el tamaño de glóbulo y su distribución, reología y pH, entre otros. El tamaño de glóbulo y su distribución están asociados a la presencia de inestabilidades, pues determina la posible aparición de fenómenos como la floculación, cremado o coalescencia [13]. Otro atributo a caracterizar es la reología, que depende del comportamiento del flujo del sistema, pues determina la forma de aplicación y elección del envase para la emulsión. Un cambio en la reología también podría ser indicativo de inestabilidad, por lo que se incluye en el control de calidad y se evalúa midiendo la viscosidad utilizando un viscosímetro. Por otra parte, el pH debe ser controlado, pues está asociado a la finalidad deseada de la emulsión, deberá mantener un pH 5 si la emulsión se aplicará en la piel, además, cambios en el pH pueden alterar la solubilidad y estabilidad de otras componentes. Finalmente se deben realizar estudios de estabilidad acelerada, en los cuales la emulsión se expone a condiciones exageradas, las que incluyen ciclos de alta y baja temperatura, frente a las cuales la emulsión deberá mantener las características establecidas a través de los controles mencionados anteriormente.

### **1.4 INDUSTRIA COSMÉTICA**

Las emulsiones, en forma de lociones (líquidas) y cremas (semisólidas) son las más comunes preparaciones cosméticas, mejoran la hidratación y suavidad de la piel, son fáciles de utilizar, poseen un sensorial agradable y entregan sustancias bioactivas que mejoran las características propias de la piel o cabello [6]. A diferencia de la industria farmacéutica, en el mercado cosmético es imprescindible elaborar un producto con características organolépticas satisfactorias para los consumidores. El formulador debe seleccionar los



componentes de la emulsión, considerando el uso del producto y estabilidad, pero también, atributos como el color, olor, textura, fluidez, extensibilidad, brillo, pigmentación sobre la piel, sensación al tomar el producto desde su envase (*pick up*), consistencia durante la aplicación (*rub out*) y la posterior sensación que deja en la piel (*afterfeel*). El producto debe lograr el beneficio que dicen tener (*claim*), considerar el tipo de piel del usuario y características adicionales como “a prueba de agua” o “larga duración”. Las cremas y lociones, además del emulsificante, están constituidas por emolientes, humectantes, agentes viscosantes, colorantes, preservantes, antioxidantes y perfume, pero también contienen activos cosméticos como vitaminas y antioxidantes, filtros solares, hidratantes, activos *antiage*, entre muchos otros.

Las características sensoriales (tacto) están determinadas por los emolientes de la emulsión. Emolientes polares como aceite de macadamia, permite aumentar la extensibilidad, mientras que aceites apolares como parafina son ocluyentes por lo que aumentan la retención de agua en la piel, pero disminuye la extensibilidad del producto sobre esta [51, 25]. El uso de grasas de mayor punto de fusión como parafina sólida, formará emulsiones con consistencia semisólida. También se pueden incorporar polímeros hidrofílicos como gomas en la fase acuosa, lo que aumenta eficientemente la viscosidad, pero afectará el sensorial formando una crema más pegote. Los antioxidantes en las emulsiones, y en otros productos cosméticos, permiten conservar activos como ácidos grasos o vitaminas [26]. Existen antioxidantes de diferente naturaleza y características y su elección dependerá de la aplicación y la compatibilidad con la formulación. Igualmente, los colorantes son de importancia en productos cosméticos e imprescindibles en productos decorativos, existen orgánicos, inorgánicos y naturales. Su elección dependerá entre otras cosas, de la solubilidad y el área de aplicación (ojos, labios, rostro, cuerpo, etc.), esta última se debe ajustar a las regulaciones de cada país, que determina el área y tipo producto en el que se permite su uso. Un ejemplo en la gama de los rojos es el ácido carmínico, un colorante orgánico muy utilizado en cosméticos y alimentos [17, 18 y 19].

Un último aspecto de la industria cosmética, es que esta debe seguir las tendencias de consumo del mercado y considerarlas en el desarrollo del producto. Algunas tendencias de

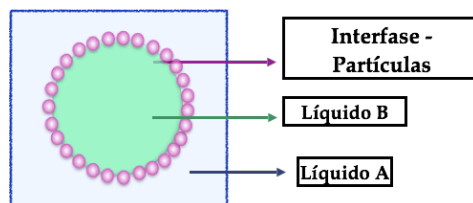
hoy son “Cosmética natural” o “Amigables con el medio ambiente”; otras, promueven la exclusión de ciertos componentes como por ejemplo parabenos y se denominan “libres de...” o “... *free*” e incluso existen tendencias que promueven cambios en los procesos de fabricación o evaluación de la seguridad, como “libres de maltrato animal” o “*cruelty free*”; y aquellas que buscan la disminución de la huella de carbono en la elaboración de un producto [21].

## 1.5 EMULSIONES PICKERING

Las emulsiones Pickering, a diferencia de las emulsiones clásicas estabilizadas con tensoactivos, son estabilizadas por partículas sólidas que se ubican en la interfase. Esto les confiere el carácter de “*free surfactant*” o “libres de tensactivos”, lo que las hace atractivas para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, debido a la tendencia de disminuir el uso de tensoactivos, actualmente cuestionados por afectar la función barrera de la piel, causando irritación en ella [21, 22]. Otras ventajas de interés de las emulsiones Pickering, es su gran estabilidad a la coalescencia y el crecimiento de Oswald, dado que ofrecen una estabilidad mecánica en la interfase y, por otro lado, también permiten incorporar funcionalidad dependiendo de las propiedades de la partícula misma [16, 23]. Tanto la industria cosmética como la farmacéutica y alimentaria, han aprovechado las ventajas de estas emulsiones [24]. Los glóbulos son estables a la coalescencia porque la energía cinética de ellos, al colisionar entre sí, es insuficiente para remover las partículas. Las emulsiones Pickering, de aplicación biomédica, suelen utilizar partículas inorgánicas como la sílice, u orgánicas basadas en polímeros, como polímeros de ácido láctico-co-glicólico (PLGA), celulosa, almidón, entre otros [23, 10, 11]. Dependiendo del carácter de la partícula escogida, se pueden obtener emulsificantes biodegradables, que también son atractivos, debido a la tendencia de fabricar productos amigables con el medio ambiente [21, 23].

Las partículas se mojan en forma parcial por el líquido de cada fase [23]. La emulsión formada será aceite en agua, o agua en aceite (w/o), dependiendo de la afinidad de esta por cualquiera de las fases. Si la partícula es parcialmente más hidrofílica, forma un ángulo menor a 90° con la fase acuosa, y se formará una emulsión aceite en agua (o/w), en caso contrario, si la partícula es parcialmente más hidrofóbica, con un ángulo menor a 90° entre la

partícula y la fase oleosa, se formará una emulsión w/o. Si la partícula posee una afinidad muy marcada por cualquiera de las fases, no será posible estabilizar la emulsión. Sin embargo, existen otros factores que pueden influir en la estabilidad, como la concentración de la partícula, su forma, características de la superficie y su tamaño, además del pH y la fuerza iónica del medio [1, 23]. En la Figura 1 se muestra un esquema de una emulsión Pickering.



**Figura 1.** Esquema de una emulsión Pickering

## 1.6 NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE Y SU USO

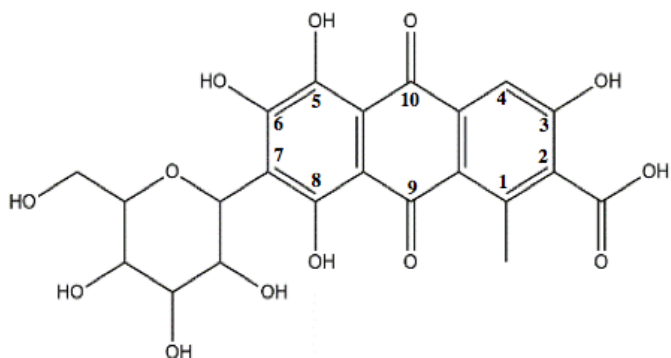
Una amplia variedad de materiales se ha empleado para desarrollar emulsiones Pickering [27, 28]. Uno de los más destacados corresponde a la sílice ( $\text{SiO}_2$ ), sistema ideal para investigar reacciones interfaciales que involucran especies generadas fotoquímicamente porque son fácilmente funcionalizables, son ópticamente transparente y tienen un área específica elevada [33]. En las últimas décadas, la utilización de nanopartículas de sílice (SNPs), como sistemas de administración de fármacos, ha sido de interés en la investigación farmacéutica. Diversos estudios han demostrado que los vehículos porosos de sílice podrían ser utilizados en el desarrollo de formas farmacéuticas para moléculas de baja solubilidad en agua [34]. Esto, debido a que las nanopartículas de sílice poseen características únicas, tales como: facilidad de preparación, una apropiada biocompatibilidad (vía tópica), gran área superficial específica, un volumen de poros y un tamaño de poro regulable, con una distribución estrecha, presentando también alta estabilidad química y física [35]. La presencia de poros permite una gran área superficial, la cual puede ser modificada con relativa facilidad, posibilitando la adsorción, conjugación y encapsulación de diversas moléculas de interés farmacológico y el control de su liberación [36]. Desde que Stöber y col. en 1968, desarrollaron un método simple que permite la obtención de nanopartículas de sílice, a través de la policondensación de TEOS

(tetraetilortosilicato) en un medio alcohólico catalizado por amoníaco, se ha visto un aumento en los estudios sobre la cinética y elucidación de mecanismos que expliquen la morfología y la incidencia de ciertos parámetros como temperatura, concentración de TEOS, amoníaco o tipo de solvente sobre el tamaño de partícula [34, 37-39]. Las nanopartículas de sílice también se pueden sintetizar como un sistema de dos partes, un centro sólido y una capa porosa, lo que se denomina como nanopartícula *core-shell*.

## 1.7 ÁCIDO CARMÍNICO

El ácido carmínico (CA) es un colorante orgánico natural, que pertenece a la familia de los rojos, y se extrae de un insecto llamado cochinilla (*Dactylopius coccus*), nativo de Centro y Sudamérica [29]. Debido a su buena calidad de tinción, seguridad y la preferencia por colorantes naturales, es muy utilizado en la industria textil, alimentaria y cosmética, específicamente en los cosméticos decorativos, típicamente en lápices labiales, y tiene la ventaja, de poder ser utilizado en el área del ojo [19, 30]. El ácido carmínico, como se observa en la Figura 1 es una hidroxiantraquinona con una cadena lateral de glucosa en la posición 7. Posee un ácido carboxílico en C2, un grupo metilo en C1 y 4 hidroxilos en los carbonos 3, 5, 6 y 8 [50]. Los valores reportados de sus pKa son: 5,78; 8,85; 10,27; 11,51 y 3,39; por lo que en medios con pH mayor a 3 se encontrará cargado negativamente [19, 31]. En solución y a pH menor a 2 adquiere un color amarillo, mientras que a pH mayor a 7 un color violeta. Es soluble en agua, alcohol y soluciones alcalinas, e insoluble en éter, benceno y cloroformo [53]. Se ha reportado su capacidad antiviral y antitumoral, además de una importante actividad antiradicalaria [30]. En el trabajo de Guo-Xiang Li y col. se evaluó la capacidad antioxidante del ácido carmínico para proteger el DNA y eritrocitos contra el efecto oxidativo inducido por AAPH, determinando que, cada molécula de ácido carmínico atrapa casi 3 radicales peroxilos y disminuye la velocidad de formación de TBARS [32]. Cálculos teóricos prueban que el hidroxilo de la posición 6 participa en el atrapamiento del radical perioxilo. Nazareno y col. reportaron una importante actividad radicalaria frente a DPPH y ABTS como agentes oxidantes, comparable con el ácido ascórbico y quercetina. Estos resultados, desde

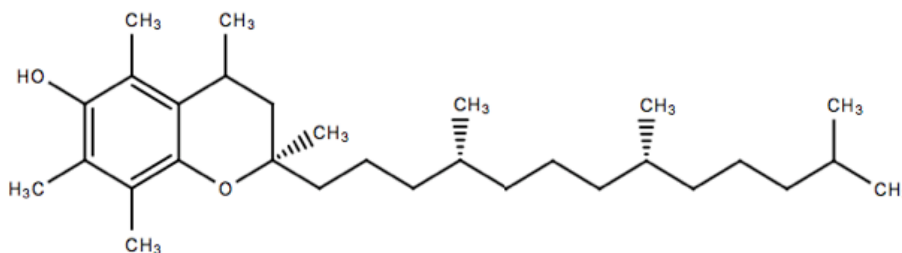
el punto de vista tecnológico, permiten considerar al CA como compuesto bifuncional, utilizándose como colorante y a la vez como antioxidante.



**Figura 2.** Estructura química del ácido carmínico.

## 1.8 VITAMINA E

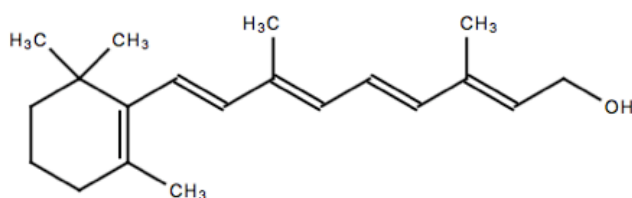
La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) es un compuesto muy utilizado en productos cosméticos destinados a prevenir el envejecimiento de la piel (cosméticos *antiage*) Es un antioxidante liposoluble que juega un papel clave en la protección de las membranas celulares contra la peroxidación causada por los radicales libres y en la reducción de la fotocarcinogénesis [47]. Thiele y col. concluyeron que el  $\alpha$ -tocoferol es uno de los mejores antioxidantes en la epidermis de los humanos, y que su depleción es un marcador temprano y sensible del daño oxidativo generado por el ambiente [48]. La vitamina E se encuentra disponible tanto en su forma de alcohol libre como de su éster, sin embargo, los beneficios en una emulsión que contiene vitamina E dependen de la concentración pero también su estabilidad en ella.



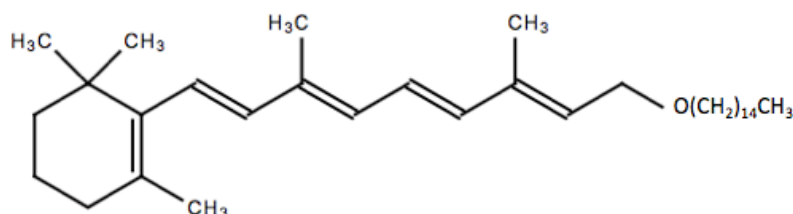
**Figura 3.** Estructura química de la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol).

## 1.9 VITAMINA A

La vitamina A (trans retinol) y sus derivados naturales como el retinolaldehído, el ácido retinoico y algunos ésteres de retinol, así como otros derivados sintéticos, pertenecen a una clase de compuestos llamados “retinoides”. El retinol es una molécula de 20 átomos de carbono que contiene un anillo ciclohexenil, una cadena lateral con cuatro dobles enlaces (todos en configuración trans) y un alcohol como grupo terminal. Todos los retinoides trans, con dobles enlaces de la cadena lateral isoprenoide en configuración trans, sufren reacciones de degradación características de sus dobles enlaces, lo que resulta en una pérdida total o parcial de la bioactividad de la vitamina A [40, 41]. La vitamina A es esencial para el desarrollo de mamíferos, para la visión, sistema inmune y diferenciación del tejido epitelial. En productos farmacéuticos, la vitamina A ha sido ampliamente utilizada debido a que es crucial para el control de la queratinización normal de la piel [40-43]. Semenzato y col. investigaron la relación entre estabilidad física de una emulsión o/w y la estabilidad química del palmitato de retinol, concluyendo que la estabilidad de este compuesto depende estrictamente de la estabilidad de la formulación [45].



**Figura 4.** Estructura química del retinol.



**Figura 5.** Estructura química del palmitato de retinol.

## 2. DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA

Las emulsiones Pickering estabilizadas con partículas adsorbidas en la interfase son más estables a la coalescencia ya que son capaces de estabilizar mecánicamente el glóbulo, además las partículas tienen la ventaja de que pueden ser modificadas, adquiriendo funcionalidad. Las emulsiones Pickering de uso tópico han demostrado mejorar la absorción del activo incorporado y al ser libre de tensoactivos, se evita la irritación que estos producen. Las nanopartículas de sílice han sido ampliamente utilizadas en emulsiones Pickering, pudiéndose modificar su superficie y así posteriormente funcionalizarlas para distintos propósitos. Las emulsiones cosméticas requieren la adición de colorantes, y de antioxidantes para mejorar la estabilidad de sus activos y de la fase oleosa. Considerando la tendencia de desarrollar productos de origen natural, el ácido carmínico, un colorante natural de color rojo intenso y muy utilizado en la industria cosmética, es seguro y ha demostrado poseer propiedades antioxidantes. **Dados estos antecedentes, en esta tesis se propone elaborar nanopartículas de sílice de tipo *core-shell*, modificadas previamente con un grupo aminopropil y posteriormente, conjugarlas con ácido carmínico e incorporarlas en emulsiones o/w, con el objetivo de evaluar su capacidad antioxidante y colorante.** Se incluirá, en la fase interna, vitamina A o vitamina E, como modelos de activos liposolubles, ya que son sensibles a la oxidación y muy utilizados en los productos *antiage* por sus propiedades antioxidantes. En el ensayo de oxidación, se utilizará como antioxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a diferentes concentraciones, realizando este ensayo a temperatura ambiente y a 40 °C. Con este trabajo se busca obtener un nanoexcipiente bifuncional capaz de mejorar la estabilidad de la emulsión, disminuir la degradación de las vitaminas, conferir color a esta y aprovechar las ventajas de una emulsión Pickering.

### 3. HIPÓTESIS

El ácido carmínico conjugado a una nanopartícula de sílice modificada proveerá un nuevo nanomaterial (antioxidante y colorante) que incorporado en una emulsión Pickering o/w aumentará la estabilidad de compuestos bioactivos como la vitamina A y la vitamina E.

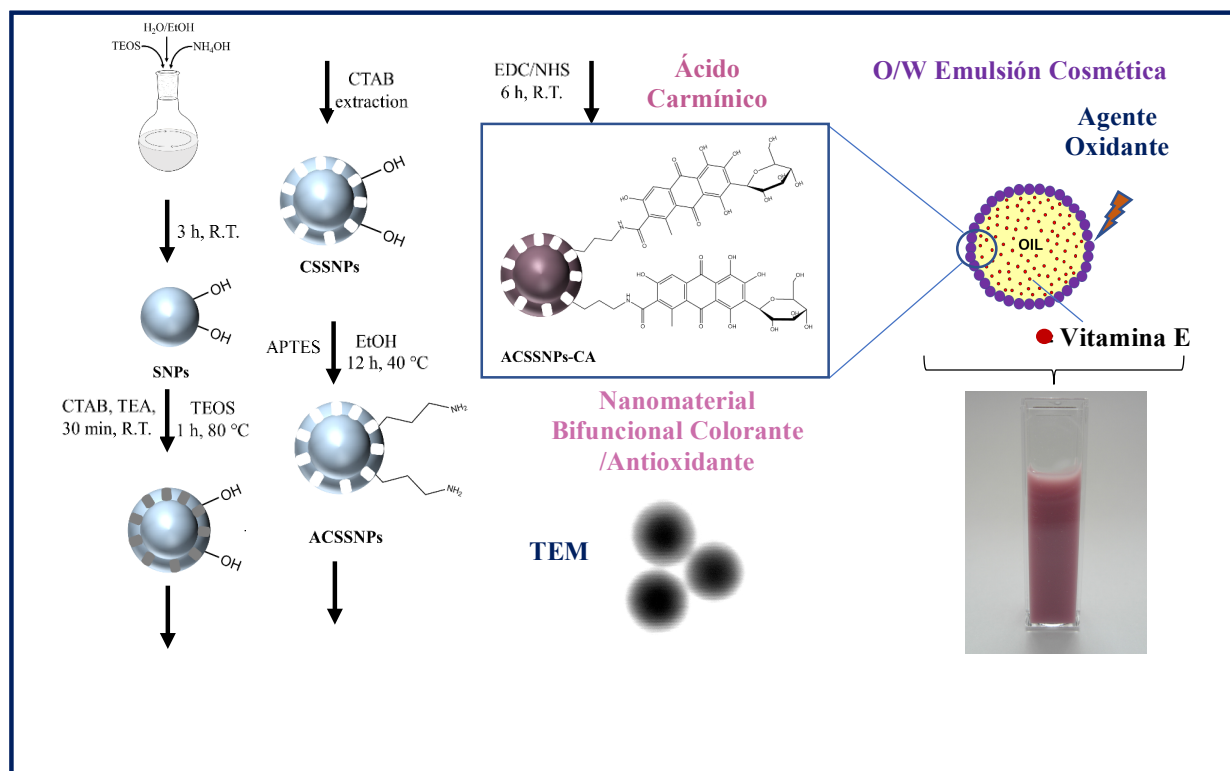


Figura 6. Graphical Abstract



## 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de nanopartículas de sílice modificadas y conjugadas con ácido carmínico como estabilizantes de vitamina A y vitamina E en emulsiones Pickering o/w.

## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de sílice *core-shell* conjugadas con ácido carmínico.
- Cuantificar la cantidad de ácido carmínico unido a las nanopartículas.
- Caracterizar las nanopartículas sintetizadas (con y sin ácido carmínico) en función del tamaño y su distribución, potencial Z e imagen.
- Evaluar la reactividad que tiene el ácido carmínico contra el oxígeno singlete al estar unido covalentemente a la nanopartícula y adsorbido a ella.
- Preparar y caracterizar emulsiones o/w con y sin la incorporación de nanopartículas conjugadas con ácido carmínico, evaluando la compatibilidad del sistema ACMSNPs-CA con los constituyentes de la emulsión.
- Evaluar la estabilidad química de emulsiones o/w y sus bioactivos vitamina A y/o vitamina E, con y sin la incorporación de nanopartículas.
- Caracterizar las emulsiones preparadas, evaluando pH, viscosidad y aspecto.
- Evaluar el efecto del ácido carmínico en solución y conjugados a las nanopartículas en el espectro de absorción UV-Visible utilizando diferentes solventes.

## 6. MATERIALES

### 6.1 REACTIVOS

Tetraetilortosilicato (TEOS, 98%), (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES,  $\geq 98\%$ ), N-Hidroxisuccinamida (NHS, 98%), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiámid (EDC,  $\geq 98\%$ ), y un tamiz molecular de 3 Å fueron comprados a Sigma-Aldrich. El ácido carmínico (CA,  $\geq 92\%$ ), ácido clorhídrico fumante (HCL, 37%), y trietilamina (TEA, 99 %) fueron obtenidos de Merck, al igual que el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 97 %) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 %). El hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH, 28 – 30%) y el cloruro de sodio (NaCl, 99%) fueron comprados a J.T. Baker. Los tensoactivos utilizados en las emulsiones, Tween 60<sup>®</sup> y Span 60<sup>®</sup>, fueron obtenidos de CRODA<sup>®</sup>. La glicerina utilizada como humectante y el aceite mineral son de Sudelab<sup>®</sup>. El aceite de ricino, monoestearato de glicerilo neutro y el preservante metilparabeno son de Lipo<sup>®</sup>. Los compuestos activos  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E, 96 %) y palmitato de retinol estándar (vitamina A) fueron comprados a Sigma-Aldrich. El palmitato de retinol como componente de la emulsión fue adquirido del producto comercial Tanvimil<sup>®</sup> A 100000UI. Finalmente, el ácido trifluoracético (TFA, 99%) fue adquirido en Sigma Aldrich. Todos los reactivos y materias primas se utilizaron sin previa purificación.

### 6.2 SOLVENTES

Los solventes empleados, etanol, metanol, 2-propanol, acetona, dimetil sulfóxido y acetonitrilo (ACN), fueron grado HPLC (Merck). El agua bidestilada (18.2 M $\Omega$  cm) fue purificada usando un Sistema Milli-Q Plus Millipore.

## **7. INSTRUMENTACIÓN**

### **7.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA**

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

### **7.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Microscopio Electrónico de Barrido FEI™ inspect modelo F50, con un voltaje de aceleración de 10.000 kV. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

### **7.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

Para medir la cantidad de vitamina A y E en las emulsiones, se utilizó un equipo HPLC Agilent serie 1100, con detector de arreglo de diodos (DAD), usando una columna Chromolith RP-18e de 100 x 4,6 mm diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm. La cuantificación de ácido carmínico se realizó mediante un HPLC Shimadzu LC-20AT con detector de arreglo de diodos (DAD), un desgasificador DGU-20A5R, un autosampler SIL-20A y un horno CTO20A/20AC.

### **7.4 VISCOSÍMETRO**

Para medir la viscosidad de las emulsiones, se utilizó un viscosímetro HB Brookfield DV2T utilizando diferentes velocidades y con una aguja N° 5.

## **7.5 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA**

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, se realizó utilizando un equipo Interspec 200-X FTIR.

## **7.6 ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE**

Los espectros de absorción tanto para ácido carmínico en solución como para las nanopartículas conjugadas con ácido carminico se midieron en un espectrofotómetro Agilent 8453.

## **7.7 MEDICIÓN de pH**

El pH de las emulsiones se midió con un pH-metro modelo Jenco Vision Plus pH6175.

## **7.8 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD**

Para todos los estudios de estabilidad se utilizó una cámara de estabilidad marca Memmert.

## **7.9 PREPARACIÓN EMULSIONES**

Para la preparación de todas las emulsiones se utilizó un agitador de paleta IKA Eurostar 20 Digital.

## **7.10 CENTRÍFUGA**

Durante la preparación de todas las nanopartículas se utilizó una centrífuga marca Hermle y modelo Z326K.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON CAPA DE SÍLICE MESOPOROSA, MODIFICADA SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO

La síntesis de nanopartículas de sílice sólidas se realizó a partir de la reacción de Stöber [34-39]. Se midieron 88 mL de etanol, 5,96 mL de agua desionizada y 2,56 mL de hidróxido de amonio. Posteriormente se agregaron 3,46 mL TEOS y se dejó reaccionar durante 4 horas con una agitación de 850 rpm a temperatura ambiente. Las nanopartículas obtenidas, se recolectaron centrifugando a 8500 rpm y se realizaron sucesivos lavados con etanol. Finalmente se secaron y almacenaron para continuar la síntesis.

Para formar la capa mesoporosa se disolvieron 2 g de CTAB en 20 mL de agua, se agregaron 30  $\mu$ L de TEA, se agitó y calentó hasta total disolución. Posteriormente se agregaron 150 mg de las nanopartículas y se agitó por 30 minutos a 40 °C. Luego la suspensión se calentó hasta 80 °C, se adicionaron 300  $\mu$ L de TEOS gota a gota y se agitó durante 1 hora a 80 °C. Finalmente, las nanopartículas obtenidas se lavaron una vez con etanol y una vez con una solución de NaCl 1%, seguida de centrifugación, y luego se mantuvo en agitación con NaCl 1% durante toda la noche, para al día siguiente lavar 2 veces con etanol. El producto final se resuspendió en etanol seco.

La funcionalización de las nanopartículas con el grupo aminopropil se realizó resuspendiendo las nanopartículas (300 mg) en 50 mL de etanol utilizando un matraz de fondo redondo y agregando 500  $\mu$ L de APTES. Se mantuvo en agitación durante 12 horas a 40 °C. Las nanopartículas fueron lavadas con sucesivos volúmenes de etanol. Se secaron y guardaron para una continuar la ruta de síntesis.

## **8.2 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS, MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO, y POSTERIORMENTE CONJUGADAS CON ÁCIDO CARMÍNICO (ACMSNPs-CA)**

La última etapa de la ruta de síntesis corresponde a la conjugación entre las nanopartículas modificadas con un grupo aminopropil y el grupo funcional ácido carboxílico del ácido carmínico. La formación de la amida se obtuvo utilizando EDC/NHS como agentes activantes. En un balón se pesaron 3 mg de ácido carmínico y se disolvieron en agua. Por otra parte, se pesaron 2,33 mg de EDC y 2,8 mg de NHS, se disolvieron previamente en agua y se agregaron al balón. Se sonicó por 15 minutos y luego se adicionó la suspensión de nanopartículas ya sintetizadas y se mantuvo con agitación durante 4 horas. Las nanopartículas obtenidas se lavaron con etanol mediante centrifugación para remover los reactivos presentes sin reaccionar. Las nanopartículas se secaron a 40 °C por 24 horas y almacenaron para luego incorporarlas en las emulsiones.

## **8.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON Y SIN ÁCIDO CARMÍNICO CONJUGADO**

La caracterización de las nanopartículas modificadas superficialmente con grupo amino y unidas covalentemente con ácido carmínico, se realizó midiendo el tamaño, su distribución de tamaño, el potencial Zeta, utilizando espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica de barrido (SEM) y dispersión dinámica de luz.

Para realizar las mediciones del tamaño, distribución y potencial Z en el equipo Nanosizer, las muestras se diluyeron veinte veces en etanol, agua y soluciones tamponadas a diferentes pH. Los espectros infrarrojo fueron obtenidos a través de un equipo Interspec 200-X FTIR. Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la morfología de las nanopartículas, su tamaño y distribución. Para ello se suspendieron las nanopartículas en etanol y se tomó un alícuota la cual fue llevada a una grilla de cobre, se agregó ácido fosfotúngstico 0,5 % y se dejaron secar por 24 h. Finalmente las grillas con las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

#### **8.4 EFICIENCIA DE UNIÓN ENTRE ÁCIDO CARMÍNICO Y LA NANOPARTÍCULA (ACMSNPs-CA)**

Se realizó una curva de calibración para evaluar la linealidad del método. Posterior a la síntesis de nanopartículas con ácido carmínico, se recolectaron todas los sobrenadantes obtenidos y se analizó cada uno de ellos. Para esto, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se diluyeron con etanol, llevando a un volumen final de 10 mL, para posteriormente ser analizados por HPLC. Las muestras se monitorearon a 499 nm, y la fase móvil constituida por MeOH : TFA (70:30), el flujo fue de 1,0 mL/min., y el volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$ . El mismo procedimiento se utilizó para un estándar de ácido carmínico con una concentración final igual a  $4 \times 10^{-3}$  M. A partir de las áreas cromatográficas obtenidas de la solución muestra y del estándar, se calculó la cantidad de ácido carmínico remanente y por diferencia, la cantidad de ácido carmínico unido a la nanopartícula. Los resultados fueron expresados como mg de ácido carmínico por cada 100 mg de nanopartículas.

#### **8.5 DETERMINACIÓN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE DE NANOPARTÍCULAS CONJUGADAS CON ÁCIDO CARMÍNICO EN DIFERENTES SOLVENTES (ACMSNPs-CA)**

Las muestras de nanopartículas, tanto las modificadas con grupo amino como las conjugadas con ácido carmínico, fueron resuspendidas en etanol, agua, DMSO, glicerina, aceite mineral y acetona, utilizando la misma concentración. Se midió el espectro de absorción de las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico, utilizando las nanopartículas modificadas con grupo amino como blanco. Para la preparación de las suspensiones de nanopartículas, se pesaron entre 2 a 4 mg de cada nanopartícula y se resuspendieron en cada uno de los solventes. Así mismo, se prepararon soluciones de ácido carmínico utilizando los mismos 6 solventes, midiéndose sus espectros de absorción, para luego compararlos con los obtenidos para las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico. Finalmente se evaluaron los cambios en el espectro de absorción UV-Visible.

## 8.6 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE. DESACTIVACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE

Para evaluar la capacidad antioxidante del nanosistema (ACMSNPs-CA), se determinó su desactivación por oxígeno singlete  $^1\text{O}_2$ , especie excitada del oxígeno que participa en forma significativa en reacciones de oxidación de biomoléculas. Para esto, se detectó el decaimiento de la fosforescencia de la señal del  $^1\text{O}_2$  a 1275 nm, utilizando un equipo PicoQuant Fluotime 200. De esta forma, se determinó la constante de velocidad de desactivación total ( $k_q$ ). El oxígeno singlete fue generado por fotosensibilización de rosa de bengala, adsorbida electrostáticamente a la nanopartícula *core-shell* y también funcionalizada con el grupo amino. La nanopartícula sin CA (ACMSNPs) se utilizó como control bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Los valores de  $k_q$  se calcularon graficando la pendiente de la ecuación de Stern-Volmer que se muestra a continuación:

$$\tau^{-1} = \tau_0^{-1} + k_q[Q]$$

Donde  $\tau^1$  y  $\tau_0^{-1}$  corresponden al inverso del tiempo de vida del oxígeno singlete en presencia y ausencia del desactivador, respectivamente.

## 8.7 EVALUACIÓN DE EMULSIONES COMERCIALES

En este trabajo se estudió el uso como colorante y la capacidad antioxidante de las nanopartículas con una corona mesoporosa modificada con grupo aminopropil y luego conjugada con ácido carmínico (ACMSNPs-CA). Para eso se incorporan las ACSMNPs-CA en una emulsión que contiene vitamina E o vitamina A, y se evalúa si las nanopartículas son capaces de disminuir el consumo de estos compuestos, que son ampliamente utilizados como activos antienvjecimiento en productos cosméticos. En una primera instancia se evaluó la posibilidad utilizar emulsiones comerciales que incluyese Vitamina E o Vitamina A dentro de sus componentes, agregando a estas formulaciones las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico (ACMSNPs-CA), para posteriormente evaluar el efecto antioxidante y su



uso como colorante. Es por esto, que primero se cuantificaron las vitaminas contenidas en los productos comerciales, sin embargo, los resultados encontrados no fueron favorables, pues en los cromatogramas obtenidos para los análisis de cuantificación no se observaron señales correspondientes a Vitamina E o A ni a derivados de estas. Se trabajó con la crema St. Ives® Humectación diaria con Vitamina E, la que declaraba tener Vitamina E como acetato de tocoferol, por lo que para analizarla se utilizó como referencia (o estándar) cápsulas de vitamina E como acetato de tocoferol disponibles en el comercio.

Es por esto que se decidió preparar las emulsiones en el laboratorio e incorporarles las vitaminas.

## **8.8 EMULSIÓN O/W: PREPARACIÓN y EVALUACIÓN**

La formulación utilizada para las emulsiones fue preparada a partir de modificaciones realizadas a una emulsión o/w clásica, con un número reducido de componentes, típicamente utilizados en emulsiones, (alcohol cetílico, aceite mineral, glicerina etc.). Estas modificaciones, se realizaron considerando los puntos de fusión de los componentes de la fase grasa y la viscosidad de los componentes en general. La emulsión debía ser estable para poder llevar a cabo todos los ensayos, y suficientemente fluida, para permitir la difusión de la solución de peróxido de hidrógeno utilizada como agente oxidante, pero también, capaz de mantener las nanopartículas en suspensión. Se evaluaron diferentes formulaciones hasta determinar una que cumpliera con aquellos requisitos. Para todas las emulsiones preparadas, se pesó, por separado, la cantidad de materias primas correspondientes a la fase grasa y fase acuosa, suficiente para preparar 100 g de emulsión. Ambas fases fueron calentadas en un baño de agua, hasta alcanzar una temperatura de 70 °C. La proporción adecuada de los tensoactivos utilizados se determinó de acuerdo al BHL requerido por la formulación, correspondiente a un 20% de fase la grasa. A las 24 horas, se evaluó si existía separación de fases y si las emulsiones eran lo suficientemente fluidas. Aquellas formulaciones que, visualmente, presentaron separación de fases tras 24 horas a temperatura ambiente; o no mostraron una fluidez adecuada, fueron descartadas inmediatamente. Aquellas que cumplieron con los requisitos se prepararon nuevamente, pero incorporando vitamina A y E.

En la Tabla 1 se muestran los componentes utilizados, y sus respectivos porcentajes para las diferentes emulsiones. Se prepararon 14 emulsiones y en 11 de ellas (E1 a E11) se utilizaron porcentajes decrecientes de alcohol cetílico, acetite mineral y monoestearato de glicerilo neutro. Para 3 de aquellas 11, se incorporó aceite de ricino.

	% Materias Primas														
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E-VE	E-VA
<b>Monoestearato de glicerilo (MEG) %</b>	3	3	1,5	1	1	1	0,5	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Alcohol cetílico %</b>	2	2	1	1	0	0,5	0,5	1	0	1	1	1,5	1,5	1,5	1,5
<b>Aceite mineral %</b>	10	6	9	9	9	9	9	9	9	9	9	7	7	7	7
<b>Aceite de Ricino %</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	3	3	3	3
<b>Vitamina E %</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5	-
<b>Vitamina A %</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
<b>Tween 60 ® %</b>	2,1	1,6	1,5	1,4	1,2	1,3	1,2	1,3	1,6	1,6	1,6	1,7	2,0	2,4	2,4
<b>Span 60 ® %</b>	0,9	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,9	1,1	1,1
<b>Glicerina %</b>	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4
<b>Metilparabeno %</b>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>Agua csp 100 g</b>	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp	csp
<b>ACMSNPs-CA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

**Tabla 1.** Formulaciones de emulsiones

## **8.9 PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE EMULSIONES O/W CON VITAMINA A, VITAMINA E Y NANOPARTÍCULAS**

Desde la emulsión E11 en adelante, se continuó reformulando, pero además se decidió incluir las vitaminas y las nanopartículas. En las emulsiones E11 y E14 se modificó, además, la cantidad de glicerina y la de tensoactivos, para lograr la estabilidad y las características de fluidez ya mencionadas. En esta etapa se evaluó la inestabilidad de la emulsión (cremado, floculación, etc.) a temperatura ambiente y a 40 °C por 24 hrs, incorporando la solución de peróxido de hidrógeno e incluyendo las nanopartículas ACMSNPs-CA. La formulación finalmente elegida para todos los ensayos fue la E14, y las emulsiones se denominaron E-VE y E-VA, las cuales se muestran en la Tabla 1.

Se seleccionaron porcentajes de 0,5 % para vitamina E y 0,2 % para vitamina A, concentraciones habituales en productos cosméticos comerciales. Para la emulsión de vitamina E se utilizó  $\alpha$ -tocoferol (96 % p/p) y para la emulsión con vitamina A, se utilizó el producto comercial Tanvimil®A, cápsulas de palmitato de retinol, debido a la escasez de estándar disponible en el mercado. La cantidad de producto (Tanvimil®A) que se debía incorporar en la emulsión para obtener una concentración final de 0,2 %, se calculó, considerando la cantidad de palmitato de retinol declarada en el producto, y el peso de la cápsula. Las cápsulas de vitamina A fueron previamente valoradas mediante HPLC para corroborar la cantidad declarada en el producto, utilizando las condiciones de trabajo de Satoshi Yakata y col., que fueron también utilizadas para la cuantificación de vitamina A en las emulsiones, tal como se describe más adelante.

## **8.10 PORCENTAJE DE INCORPORACIÓN DE VITAMINA E y VITAMINA A**

La cuantificación de las vitaminas incorporadas en las emulsiones E-VE y E-VA se realizó, pesando 25 mg de emulsión, llevándolos a un matraz de 25 mL, luego se agregaron 5 mL de isopropanol y 10 mL de metanol. La muestra se sonicó por 5 minutos y se llevó a volumen con metanol. La dispersión se sonicó, centrifugó, y filtró (0,45  $\mu$ m), para finalmente inyectarla en el equipo HPLC. Para la vitamina E se utilizó una fase móvil MeOH : H<sub>2</sub>O (97:3), un flujo de 1,5 mL/min. y un volumen de inyección de 50  $\mu$ L, monitoreando a una longitud de onda de 290 nm [53]. En el caso de la vitamina A se utilizó MeOH como fase

móvil, un flujo de 2 mL/min. y un volumen de inyección de 50  $\mu$ L, monitoreando en este caso a 325 nm [54]. Se evaluó la linealidad de las metodologías por curvas de calibración.

## **8.11 INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON GRUPO AMINO, Y CON GRUPO AMINO CONJUGADAS CON ÁCIDO CARMÍNICO EN EMULSIONES O/W**

Se prepararon emulsiones con nanopartículas con grupo aminopropil, y con nanopartículas con grupo aminopropil, pero posteriormente conjugadas con ácido carmínico. La concentración para ambas fue de 0,5 %. Para incorporar las nanopartículas, estas se dispersaron primero en glicerina, para luego incorporar la emulsión en pequeñas porciones agitando cada vez con un agitador magnético. La etapa de evaluación de las emulsiones del punto 8.9 permitió definir la metodología para la incorporación de las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico.

## **8.12 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES**

### **8.12.1 ESTABILIDAD FÍSICA Y COLOR DE LAS EMULSIONES**

Durante la etapa de formulación, la evaluación de la posible presencia de inestabilidades (separación de fases, cremado, sedimentación o coalescencia), se realizó durante 24 y 72 horas y se consideraron los factores descritos anteriormente (temperatura ambiente, 40 °C, incorporación de ACMSNPs-CA, solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Finalmente, para caracterizar las emulsiones, se evaluó su estabilidad física y color. La caracterización del color se evaluó preparando 3 emulsiones de vitamina E con concentraciones de 0,1%, 0,5% y 1% de ACMSNPs-CA. Toda emulsión de VE con ACMSNPs-CA, se denominó E-VE-CA. Además, se evaluó el color de una emulsión con un 0,5% de ACMSNPs-CA a tiempo 0 y después de 48 horas de exposición a las condiciones de estrés utilizadas durante los ensayos, las cuales corresponden a:

- Temperatura ambiente
- A 40 °C
- Temperatura ambiente con la adición de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%
- A 40 °C con la adición de una solución de una solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%

### **8.12.2 VISCOSIDAD**

La viscosidad de las emulsiones se midió con un viscosímetro Brookfield DVII y aguja N° 5, luego de mantener las emulsiones en reposo por 24 horas. Se comparó la viscosidad entre emulsiones preparadas sin nanopartículas y con 0,1 %, 0,5% y 1% de nanopartículas. Por otra parte, la viscosidad fue medida a distintas velocidades de cizalla para obtener información de su comportamiento reológico.

### **8.12.3. ESTABILIDAD QUÍMICA**

#### **8.12.3.1 DETERMINACIÓN DE pH**

Se midió el pH de 3 emulsiones, una sin nanopartículas (E-VE), una emulsión con ACMSNPs (E-VE-NH<sub>2</sub>) y otra con ACMSNPs-CA (E-VE-CA), utilizando un pH-metro JencoVision Plus pH 6175.

#### **8.12.3.2 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS CONJUGADAS CON ÁCIDO CARMÍNICO, EN EMULSIONES CON VITAMINA A Y E**

Para evaluar la eficiencia antioxidante de las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico, en emulsiones, se utilizó como modelo lipofílico y compuesto bioactivo, las vitaminas E y A. Se prepararon dos emulsiones, una con vitamina E al 0,5% y otra con vitamina A al 0,2%, las cuales se sometieron a condiciones forzadas de oxidación y temperatura. Para realizar el ensayo se trabajó con emulsiones sin nanopartículas, denominadas E-VE y E-VA, emulsiones con nanopartículas amino modificadas, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VA-NH<sub>2</sub>, y emulsiones con nanopartículas conjugadas con ácido carmínico al 0,5 %

designadas como E-VE-CA y E-VA-CA. Cada una se expuso a temperatura ambiente; a temperatura ambiente y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5% y 3 %; a 40 °C y, a 40 °C con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5% y 3 %. A las 36 y 120 horas, se analizó y cuantificó la cantidad de vitamina A y E en cada emulsión y se calculó la cantidad encontrada respecto de la cantidad de vitamina cuantificada a tiempo 0. Ambas vitaminas se determinaron mediante HPLC con las metodologías descritas anteriormente.

La determinación de los tiempos de muestreo y las condiciones del ensayo se determinaron a partir de pruebas previas en las que se evaluó si el peróxido de hidrógeno a distintas temperaturas, era suficiente para observar un consumo significativo en la cantidad de vitamina.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON CAPA MESOPOROSA, MODIFICADA SUPERFICIALMENTE CON GRUPO AMINO

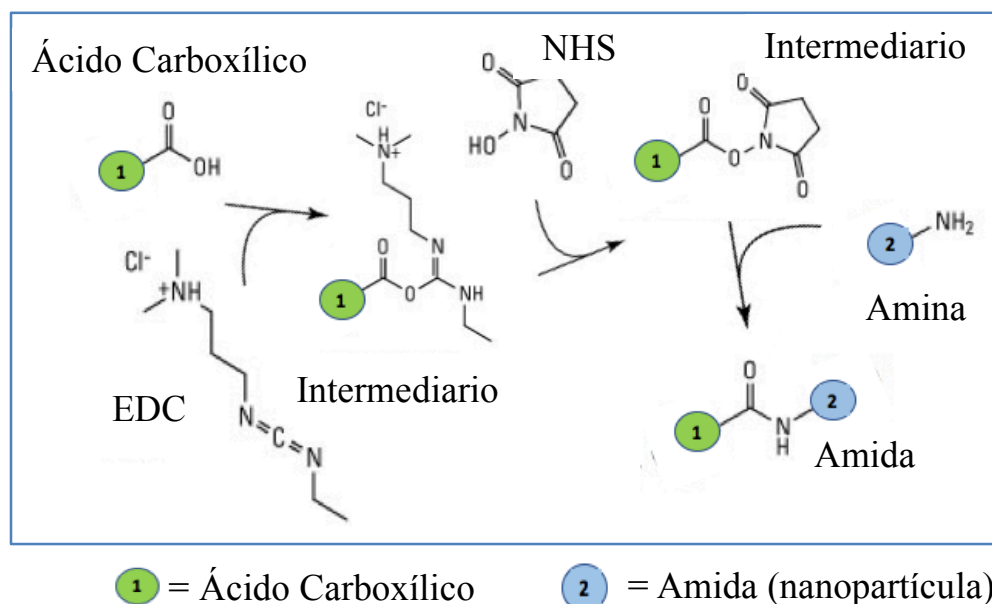
La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo utilizando el método de Stöber [34-39]. Se prepararon primero las nanopartículas compactas (SNPs) en un medio etanólico/solución alcalina para lograr primero, la hidrólisis de la sílice, y luego la condensación de los grupos silanoles que formará la nanopartícula sólida. Para formar la capa mesoporosa alrededor de la nanopartícula sólida, se utilizó el tensoactivo CTAB. En la superficie de las micelas formadas, se condensa una capa de sílice a partir de la adición de TEOS como precursor. Después de lavar y remover el tensoactivo con una solución de cloruro de sodio al 1%, se obtiene la nanopartícula de centro compacto y capa mesoporosa. La carga positiva del CTAB atrae la sílice condensada, de carga opuesta, permitiendo una correcta formación de la capa mesoporosa [36, 37]. Wen-jing Jiang y col. incorporaron Rodamina B y fluoresceína a nanopartículas mesoporosas con un centro compacto, planteando que las nanopartículas compactas unidas a colorantes pueden aumentar la cantidad incorporada de éstos, si la nanopartícula es porosa [55]. La capa porosa permite aumentar la superficie disponible para interactuar con el colorante. Sin embargo, Wen-jing Jiang y col. aclaran, que una unión covalente entre la nanopartícula y el colorante, requiere un grupo funcional en la superficie para reaccionar con el colorante.

A su vez la presencia de un centro compacto impide que aquellas moléculas ubicadas en la superficie migren hacia el interior favoreciendo que se encuentren más disponibles para reaccionar y otorgan una densidad suficiente a la nanopartícula para que esta pueda ubicarse en la interfase de la emulsión. Este tipo de sistemas de nanopartículas, con un centro de sílice sólido, y una capa de sílice mesoporosa se determina *core-shell* [55].



## 9.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS SUPERFICIALMENTE MODIFICADAS CON GRUPO AMINO (ACMSNPs) Y POSTERIORMENTE CONJUGADAS COVALENTEMENTE CON ÁCIDO CARMÍNICO (ACMSNPs-CA)

Las ACMSNPs-CA se formaron a partir de la reacción entre el grupo ácido carboxílico del ácido carminico y la amina de la ACMSNP. Se utilizó NHS y EDC como especies activantes capaces de catalizar la reacción.

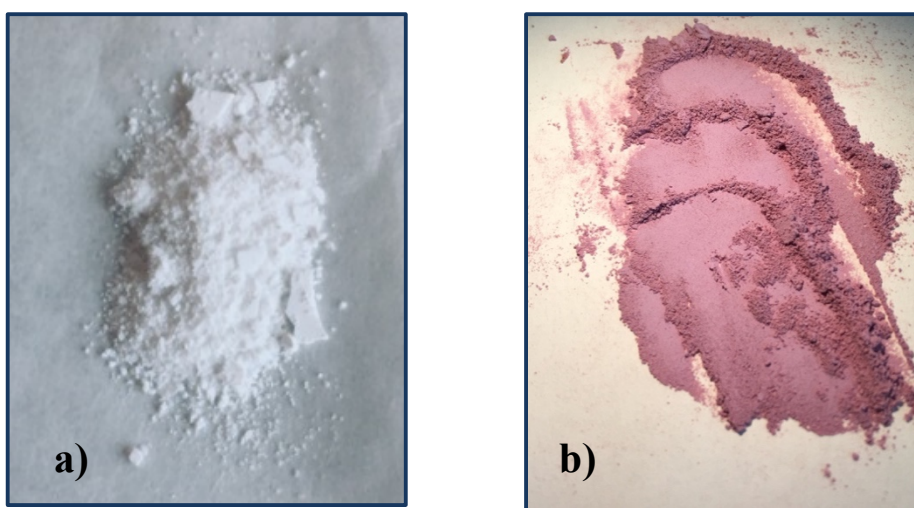


**Figura 7.** Esquema de reacción para formación de enlace amida entre  $-\text{COOH}$  y  $\text{NH}_2$  de ácido carminico y grupo aminopropil respectivamente.

El EDC reacciona con el  $-\text{COOH}$  del ácido carminico permitiendo que se forme un intermediario (O-ácilurea) con un mejor grupo saliente que el hidroxilo inicial, facilitando el desplazamiento a través del ataque nucleofílico de la amina al carbono del ácido carboxílico. Es necesario que se acidifique el medio con  $\text{HCl}$  0,1 N ya que la EDC es más eficiente a un pH de 4,5. Sin embargo, el intermediario O-ácilurea es inestable en soluciones acuosas, lo que podría impedir la reacción con la amina e hidrolizarse, resultando en la reconstitución del ácido carboxílico. La inclusión de NHS en la reacción permite mejorar la eficiencia, pues reacciona con el intermediario O-ácilurea formando un intermediario más estable en medio

acuoso, para la conjugación con la amina de la ACMSNP. En la Figura 7 se muestra un esquema de la reacción.

Luego, las nanopartículas sintetizadas se secaron a 40 °C por 24 horas. Al comparar el color entre las SNPs, CMSNPs y ACMSNPs, no se observan diferencias, siendo todas de color blanco, mientras que las ACMSNPs-CA son de un color rosado intenso. Por otra parte, después de sucesivos lavados con etanol no se apreció coloración en el solvente y la intensidad del color de las ACMSNP-C no disminuyó. Estos resultados evidencian la exitosa unión del ácido carmínico a la nanopartícula.



**Figura 8.** Imagen de las nanopartículas como polvo seco. a) Imagen de nanopartículas *core-shell* mesoporosas modificadas con grupo aminopropil secas (ACMSNPs). b) Imagen de nanopartículas *core-shell* mesoporosas modificadas con grupo aminopropil, posteriormente conjugadas con ácido carmínico (ACMSNPs-CA).

### 9.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON Y SIN UNIÓN COVALENTE CON ÁCIDO CARMÍNICO

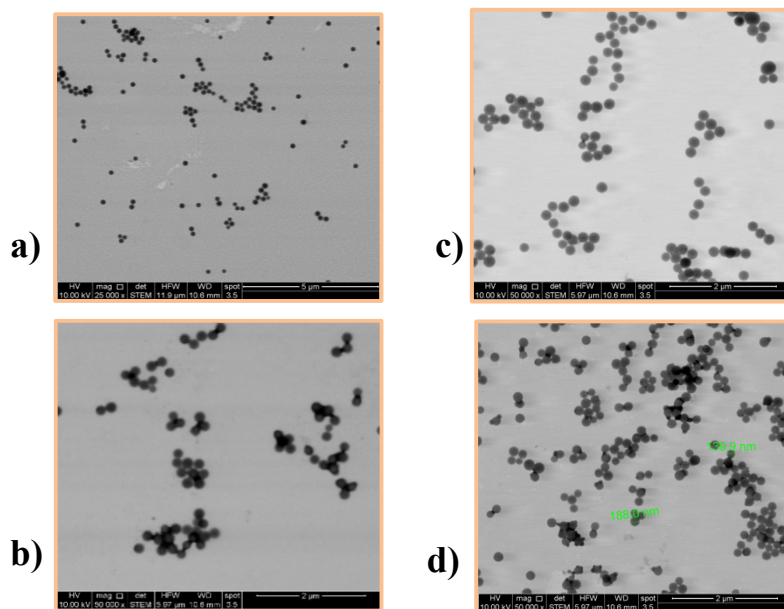
#### 9.3.1 ESPECTROSCOPIA IR

La reacción de conjugación entre la nanopartícula (ACMSNP) y el ácido carmínico (CA) se evaluó mediante espectroscopía infrarroja, con la cual se confirmó la formación del enlace amida entre el CA y la ACMSNP. La señal característica para los grupos ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ ), en las CMSNPs, aparece a 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ , las bandas a 2982  $\text{cm}^{-1}$  y 2940  $\text{cm}^{-1}$ , corresponden a las

del grupo metileno ( $-\text{CH}_2$  presente en la cadena propílica del APTES), la señal característica del grupo  $\text{NH}_2$  aparece a  $1518\text{ cm}^{-1}$ , mientras que la señal que se observa a  $3300\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la del enlace OH del agua que se encuentra adsorbida. Adicionalmente, el espectro de las ACMSNPs-CA muestra bandas a  $1638\text{ cm}^{-1}$  y  $1544\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a la presencia del enlace amida [57, 58].

### 9.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

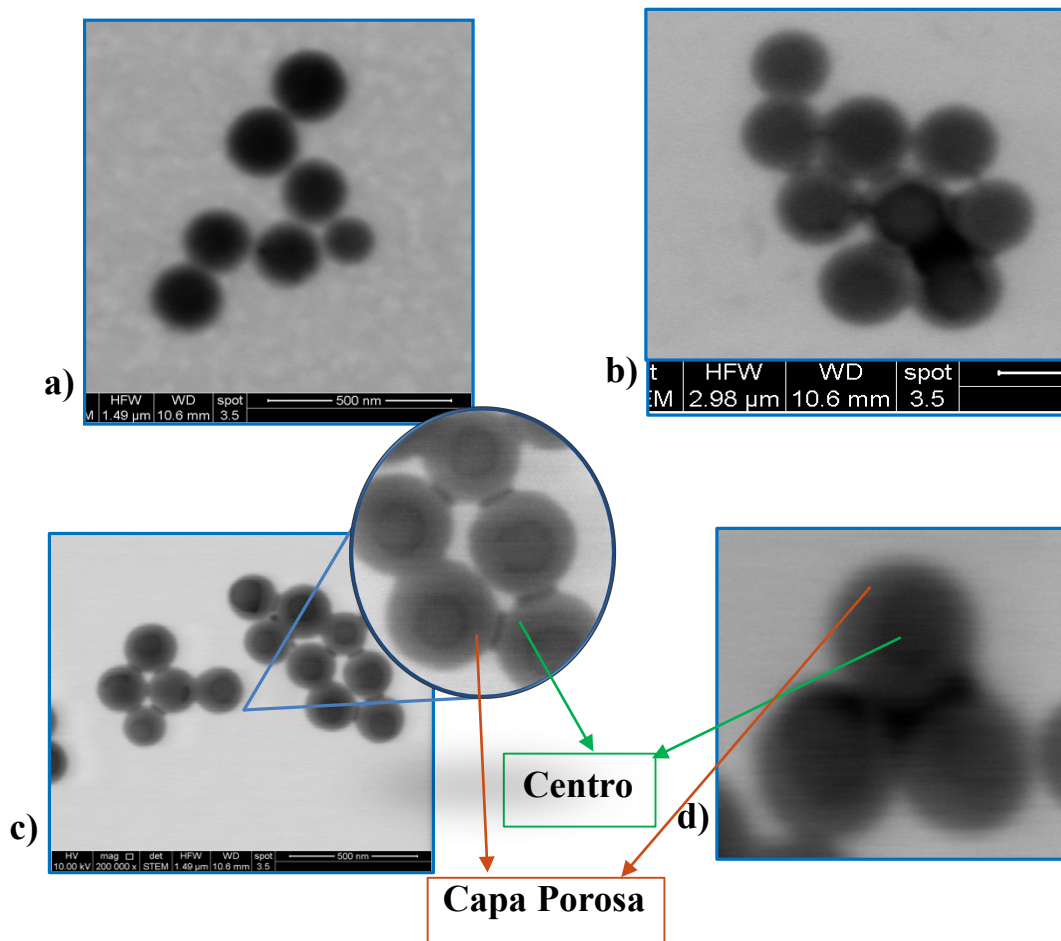
Se evaluaron las nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido para observar su morfología y tamaño. Se observaron los cuatro tipos de nanopartículas (SNPs, CMSNPs, ACMSNPs y ACMSNP-CA) y además se compararon las ACMSNPs-CA de dos batches diferentes. En las imágenes presentadas en la Figura 9, se observa que todas las nanopartículas, desde las compactas hasta las conjugadas con ácido carmínico, son de forma esférica y de un tamaño homogéneo.



**Figura 9.** Imágenes de microscopía de barrido electrónico. **a)** Nanopartículas sólidas (SNPs). **b)** Nanopartículas con capa mesoporosa (CMSNPs). **c)** Nanopartículas mesoporosas modificadas con grupo amino (ACMSNPs). **d)** Nanopartículas mesoporosas modificadas con grupo amino, posteriormente conjugadas con ácido carmínico (ACMSNPs- CA).

En la Figura 10a, correspondiente a la imagen de la nanopartícula de centro sólido (SNP), se observa que ésta tiene una forma esférica y bien definida, y al compararla con las

nanopartículas de las imágenes de las Figuras 10b y 10c, se observa que en estas, existe un centro bien definido, de un color levemente más oscuro y un margen que lo separa, de un marcado anillo, de un color más tenue. Las imágenes de las Figuras 10b y 10c corresponden a las CMSNPs y ACMSNPs. Esta descripción, también se distingue en la Figura 10d, que corresponde a las ACMSNPs-CA y se ajusta a la conformación de una nanopartícula de tipo *core-shell*, asignándose este anillo externo, a la capa porosa. Se observa que este anillo, es menos nítido en las SNPs de la Figura 10a, donde no se distingue claramente el margen antes mencionado, como ocurre en las imágenes de CMSNPs, ACMSNPs y ACMSNPs-CA (10b, 10c y 10d).



**Figura 10.** Ampliación de imágenes de nanopartículas con SEM. **a)** Nanopartículas sólidas (SNPs). **b)** Nanopartículas con capa mesoporosa (CMSNPs) **c)** Nanopartículas con capa mesoporosa modificada con grupo amino (ACMSNPs) **d)** Nanopartículas con capa mesoporosa modificada con grupo amino, posteriormente conjugadas con ácido carmínico (ACMSNPs- CA).

Los tamaños determinados para los cuatro tipos de nanopartículas no presentan diferencias significativas, con un valor promedio de 181,9 nm. En la Tabla 2 se informa el tamaño promedio de las nanopartículas, su diámetro total, el diámetro del núcleo sólido, y el espesor de su capa mesoporosa. Se analizaron las ACMSNPs y ACMSNPs-CA de dos batches diferentes (17 y 18) y se comparó si existían diferencias entre cada preparación (o batch). El tamaño obtenido para las nanopartículas, es adecuado para su incorporación en productos que serán aplicados sobre la piel, ya que nanopartículas de sílice con tamaño menor a 75 nm, no serán absorbidas a capas más profundas de la piel [59, 60].

	Tamaño (nm)		
	Diámetro (Centro sólido)	Espesor promedio de capa mesoporosa	Diámetro Total
<b>SNP-18</b>	-		178,2
<b>CMSNP-18</b>	123,0	31,85	187,8
<b>ACMSNP-18</b>	102,4	47,7	197,7
<b>ACMSNP-CA-18</b>	99,6	38,05	175,7
<b>ACMSNP-17</b>	103,9	39,7	183,4
<b>ACMSNP-CA-17</b>	112,7	35,75	188,0

**Tabla 2.** Tamaños de nanopartículas para batch 17 y 18.

El espesor promedio de la capa mesoporosa es de 36,9 nm y corresponde a un 20,3 % del diámetro total de la nanopartícula, mientras que el núcleo sólido representa el 58,4% del diámetro total.

### 9.3.3 POTENCIAL ZETA, TAMAÑO Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO

Los valores de tamaño de las NPs dispersas y potencial zeta, medidos en etanol y agua respectivamente, se muestran en la Tabla 3. Los resultados muestran un aumento de tamaño en la medida que la nanopartícula se modifica. Los valores de potencial Z son los esperados, con un valor de -50 mV para las SNPs y cercano a -1,56 mV para las ACMSNPs. Estos valores tienen relación con la carga superficial de la ACMSNP, que al estar conjugada con

el grupo aminopropil tendrá una carga positiva, o menos negativa, mientras que la compacta sin modificar, será más negativa por la presencia de los grupos hidroxilos en la superficie.

	ACMSNP-CA	Medio
<b>Tamaño promedio (nm)</b>	311,9	Etanol
<b>Potencial Z (mV)</b>	-10,53	Agua
	-17,61	pH 8
	-14,94	pH 7
	-2,60	pH 5
	19,63	pH 3

**Tabla 3.** Valores de potencial Z y tamaño para nanopartículas compactas (NPs), con capa mesoporosa (CMSNPs) y modificadas con grupo aminopropil, ACMSNPs.

Los tamaños determinados por DLS, para SNPs, CMSNPs y ACMSNPs son mayores que aquellos encontrados en el SEM, sin embargo, el resultado que arroja el microscopio se considera más confiable, pues el DLS mide las partículas mientras están en movimiento, por lo que solo determina un diámetro hidrodinámico. Además podrían, generarse aglomeraciones entre ellas, a diferencia del microscopio donde estas se encuentran fijas.

Las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico (Tabla 4), poseen un tamaño promedio de 311,9 nm, medido en etanol, y un potencial Z con un valor igual a -10,53 mV, medido en agua. Además, se evaluó el potencial Z en medios con diferentes valores de pH, utilizando soluciones tampón a pH 8, 7, 5 y 3. Se seleccionó un pH levemente alcalino, otro ácido y el pH 5, por ser un valor cercano al pH de la piel (5,5) y de las emulsiones destinadas a la piel.

	SNP	CMSNP	ACMSNP	Medio
<b>Tamaño promedio (nm)</b>	264,4	327,29	376,60	Etanol
<b>Potencial Z (mV)</b>	-50,15	-18,08	-1,56	Agua

**Tabla 4.** Valores de tamaño y potencial Z para nanopartículas conjugadas con ácido carmínico (ACMSNPs-CA).

Los valores de potencial Z medidos son consistentes con la carga superficial esperada para el ácido carmínico para cada pH. En la Tabla 4 se aprecia que los valores disminuyen de 19,63 a pH 3, a -17,61 a pH 8. El ácido carmínico posee 3 valores de pKa que corresponden a 3,0; 5,53 y 8,3 [31]. EL pKa de 3,0 corresponde al grupo ácido carboxílico cuando éste se encuentra en solución como ácido libre, sin embargo, en este caso se encuentra unido a la nanopartícula mediante el enlace amida, por lo que el valor del potencial Z dependerá de los otros valores de pKa de la molécula. A pH 3 o menor, la molécula estará no ionizada por lo tanto, existirá una carga superficial menos negativa, en este caso 19,3. A pH 5 aumentará la carga superficial negativa, pues alcanzará al segundo pKa (5,53), encontrándose el correspondiente grupo hidroxilo parcialmente ionizado. A un pH 7-8 se alcanzará el tercer pKa (8,3), por lo que ahora, este hidroxilo, se encontrará parcialmente ionizado, y el hidroxilo con pKa de 5,53 estará completamente ionizado. Es decir aumenta la carga superficial negativa, responsable de un potencial Z igual a -17,61.

#### **9.4 EFICIENCIA DE CONJUGACIÓN DE ÁCIDO CARMÍNICO UNIDO COVALENTEMENTE A LAS NANOPARTÍCULAS (ACMSNPs)**

La eficiencia de conjugación del ácido carmínico a la superficie de la nanopartícula, se evaluó, mediante HPLC, cuantificando la cantidad de ácido carmínico antes y después de la reacción entre éste y las nanopartículas. De acuerdo a los resultados, cada 100 mg de ACMSNPs se conjugan 4,24 mg de ácido carmínico. Este resultado se confirmó mediante TGA. Se consideró un valor de 4,3 mg para todos los experimentos realizados.

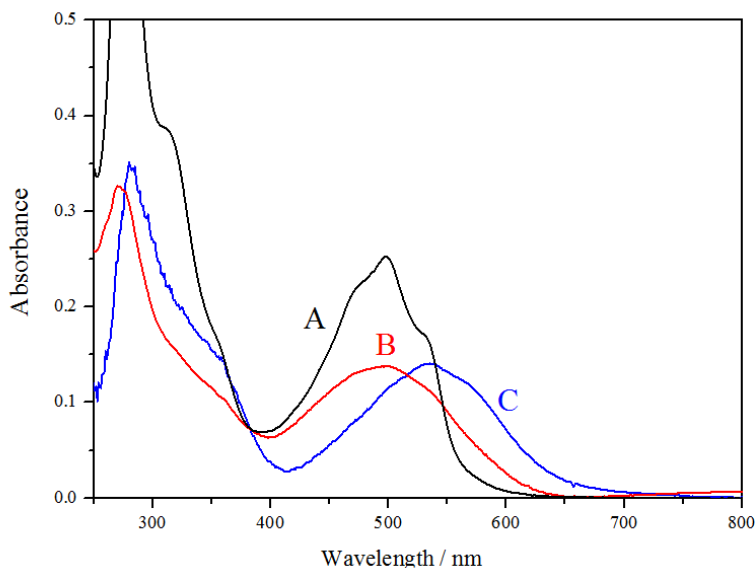
#### **9.5 DETERMINACIÓN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE DE NANOPARTÍCULAS CONJUGADAS CON ÁCIDO CARMÍNICO DISPERSAS EN DIFERENTES SOLVENTES**

Se midieron los espectros de absorción del ácido carmínico en solución y conjugado con las nanopartículas en diferentes solventes, evaluando sus posibles cambios. De acuerdo a parámetros como la constante dieléctrica y polaridad, fueron seleccionados los siguientes solventes: agua, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, acetona y también se incluyó el aceite

mineral y la glicerina, considerando que son componentes típicos de una emulsión. Al medir las suspensiones de ACMSNPs-CA se utilizaron como blanco las respectivas suspensiones de ACMSNPs en el mismo solvente. De esta forma, se trabajó con concentraciones (2 mg/mL) similares para todas las suspensiones y soluciones.

Los espectros obtenidos se compararon con el espectro del ácido carmínico disuelto en etanol, el cual presenta una absorbancia máxima a una longitud de onda de 499 nm y otra a 278 nm. Típicamente el ácido carmínico en etanol y solventes como el agua, a pH neutro, presentan una absorbancia máxima a los 278 nm la cual corresponde a una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  y otra banda a 500 nm que corresponde a una transición  $n \rightarrow \pi^*$ . Las suspensiones de ACMSNPs-CA en acetona, etanol y agua mostraron un desplazamiento batocrómico con un valor cercano a 550 nm. El desplazamiento batocrómico de ACMSNPs-CA en solventes polares podría deberse a que, en estos solventes, el grupo amino de la nanopartícula alcaliniza el medio, provocando que los fenolatos del CA se encuentren más ionizados, produciéndose un desplazamiento típicamente observado para el ácido carmínico en soluciones alcalinas. La Figura 11 muestra los espectros para la solución de ácido carmínico en etanol, y de las ACMSNP-Ca en aceite mineral y en solución acuosa de glicerina al 5 %. Las soluciones de ácido carmínico presentan longitudes de onda cercanas a 500 nm para todos los solventes, excepto para la solución de ácido carmínico en aceite mineral, donde no hay bandas definidas, sin embargo, en el espectro correspondiente a la suspensión de nanopartículas en aceite mineral, se observa una banda de absorción bien definida, aunque de baja intensidad, con una longitud de onda máxima a 503 nm, similar al espectro obtenido para el ácido carmínico en etanol.





**Figura 11.** Espectro de absorción UV–vis de (A) ácido carmínico (CA) en etanol, (B) ACMSNPs-CA dispersas en aceite mineral, y (C) ACMSNPs-CA dispersas en solución acuosa de glicerina al 5%.

## 9.6 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL NANOMATERIAL: DESACTIVACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE

Existen muchos alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos que son susceptibles a la degradación. Los productos cosméticos o farmacéuticos al ser aplicados sobre la piel se encuentran expuestos a los mismos factores que pueden provocar daño en ésta. Un factor capaz de degradar un producto de este tipo y dañar la piel, es la radiación UV. Existe evidencia, de que la radiación UVA produce efectos deletéreos en la piel, ya que cromóforos de ésta, o activos cosméticos contenidos en el producto cosmético, son sensibles a la radiación y por lo tanto, capaces de generar especies reactivas del oxígeno (ROS), en los cuales el oxígeno singlete cumple un importante rol. Dado esto, es de interés el estudio de la desactivación del oxígeno singlete por ACMSNPs-CA, para evaluar si este nanosistema híbrido y multifuncional, puede ser útil tanto como colorante como antioxidante en emulsiones.

Como se mencionó anteriormente, el CA adsorbido a las ACMSNPs, o denominadas ACMSNPs-CA<sub>AD</sub>, se utilizó como control de las ACMSNPs-CA (CA conjugado covalentemente). La desactivación de oxígeno singlete se obtuvo por monitoreo de la disminución de su señal de luminiscencia, en presencia de CA libre y en presencia de ambas nanopartículas, ACMSNPs-CA y ACMSNPs-CA<sub>AD</sub>. La constante de velocidad de desactivación total,  $k_T$ , se determinó mediante la suma de la constante de velocidad física de apagamiento ( $k_q$ ), y la constante de velocidad de la reacción química ( $k_r$ ). El valor estimado de  $k_T$ , para CA libre, es  $6,35 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , que indica que el CA es capaz de desactivar eficientemente al oxígeno singlete.

Por otra parte, cuando el CA se encuentra conjugado covalentemente con la ACMSNPs o adsorbido a ella, se observa un aumento en la desactivación del oxígeno singlete, probablemente debido a los grupos fenolatos que se presentan, como consecuencia de la alcalinización que los grupos aminos de las nanopartículas confieren al medio, provocando un cambio de color, que varía del naranja-rojo al morado intenso. El valor de  $k_T$  determinado a partir de la pendiente de la ecuación Stern-Volmer fue de  $1,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $1,68 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , para ACMSNPs-CA y ACMSNPs-CA<sub>AD</sub>, respectivamente. Este valor de  $k_T$  levemente más elevado, se explica por la desorción del CA, desde la ACMSNPs al medio. El CA libre (consecuencia de la desorción), en su forma de fenolato, es capaz de desactivar eficientemente el  $^1\text{O}_2$  en la proximidad de la nanopartícula, y también libre en la solución; contrario al resultado obtenido para el CA libre que bajo las condiciones experimentales se encuentra totalmente protonado. Por otra parte, cuando el CA se encuentra conjugado covalentemente a la nanopartícula, no existe el CA libre capaz de desactivar al oxígeno singlete, por lo tanto, el valor del  $k_T$  para las ACMSNPs-CA, es menor que el valor de  $k_T$  de ACMSNPs-CA<sub>AD</sub>. Sin embargo, considerando los valores de las constantes, no existe una diferencia significativa en la reactividad de cada nanosistema (adsorbido y covalente) frente al oxígeno singlete, por lo que ambos se pueden considerar útiles como agentes antioxidantes. El valor de  $k_T$  para estos nanosistemas es similar o mayor a valores reportados para moléculas como quercetina y morina, las cuales se encuentran ampliamente estudiadas, y consideradas eficientes antioxidantes.

## 9.7 EVALUACIÓN DE EMULSIONES COMERCIALES

Se analizó la crema comercial St. Ives con la misma metodología HPLC con la que se analizaron las emulsiones preparadas en el laboratorio, pero a una longitud de onda igual de 283 nm [53]. Lamentablemente, al analizar las muestras, no se observaron señales cromatográficas para la vitamina E como tocoferol acetato (283 nm) ni como  $\alpha$ -tocoferol (290 nm) por lo que la cantidad de vitamina E en la crema comercial, no pudo ser detectada ni cuantificada. Para el ensayo se utilizó como referencia (o estándar) tocoferol acetato de cápsulas de vitamina E comerciales.

## 9.8 EMULSIÓN O/W: PREPARACIÓN y EVALUACIÓN

Primero, se formuló una emulsión básica compuesta de un reducido número de componentes, en ausencia de vitaminas, pero que cumpliera con ser estable tanto a temperatura ambiente como a 40 °C, con la finalidad de mantenerse estable a lo largo de todos los ensayos. Además, esta emulsión debía ser lo suficientemente fluida, para permitir la difusión del peróxido de hidrógeno (agente oxidante) en la emulsión. Todas aquellas formulaciones que no se apreciaron notoriamente fluidas fueron descartadas. Aquellas que después de una apreciación visual, se consideraron lo suficientemente fluidas, fueron seleccionadas para evaluar su estabilidad por 24 y luego 72 horas a temperatura ambiente y a 40 °C. Solo a aquellas seleccionadas en esta etapa, se les incorporó las vitaminas (A o E) para evaluar nuevamente la estabilidad, pero incorporando además las nanopartículas y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las modificaciones realizadas se hicieron considerando el punto de fusión de las materias grasas, la viscosidad de los componentes utilizados, el porcentaje de fase grasa y otras características de la materia prima.

En la Tabla 5 se muestran las formulaciones preparadas. La emulsión E1 se descartó ya que presentó una consistencia semisólida. Para disminuir la viscosidad se puede disminuir el porcentaje de fase grasa, utilizar componentes grasos de bajo punto de fusión o líquidos con diferentes viscosidades. Sin embargo, disminuir la viscosidad contribuye a la inestabilidad de la emulsión. En la emulsión E2 se disminuyó el aceite mineral de un 10% a un 6 %, pues era el componente en mayor cantidad, sin embargo, aunque la emulsión fue estable, la

consistencia no varió, siendo igualmente semisólida. Luego en las emulsiones E3 y E4, se disminuyeron los componentes sólidos de la fase grasa: MEG y alcohol cetílico. Esta modificación cambió visiblemente la consistencia, volviéndola más fluida. Las formulaciones E3 y E4 fueron estables, sin embargo se reformuló para obtener una emulsión aún más fluida. En las emulsiones E5, E6, E7 y E8 se eliminó, o disminuyó, el alcohol cetílico o el MEG. En las emulsiones E8 y E9 se mantuvieron porcentajes similares de MEG y alcohol cetílico, aunque para mantener el porcentaje de fase grasa, se compensó con aceite de ricino, una materia prima líquida pero que aporta a la emulsión una viscosidad intermedia entre el aceite mineral y la que aportan las materias primas sólidas. Las emulsiones E5, E6, E7 y E8 resultaron muy fluidas pero inestables antes de las 48 horas a temperatura ambiente, mientras que E9 y E10 se mantuvieron fluidas y estables por 72 horas a temperatura ambiente y después de centrifugar a 3500 rpm por 15 minutos.

La inestabilidad de E5, E6, E7 y E8, se puede deber a la eliminación y/o disminución de los componentes de alto punto de fusión y/o a la disminución del porcentaje total de la fase grasa, lo que contribuyó a la disminución de la consistencia y eventualmente a desestabilizar la emulsión. En las emulsiones E9 y E10, en cambio, se mantuvo el porcentaje total de fase grasa al incluir el aceite de ricino, y se mantuvo al menos un 1% de un componente con un mayor punto de fusión (MEG o alcohol cetílico). Se seleccionó la emulsión E10 pues contiene alcohol cetílico que posee un punto de fusión menor al del MEG y se reformuló, incorporando vitamina E (E11). La formulación E11 resultó estable a temperatura ambiente, tanto a las 24 como a las 72 horas, pero inestable a las 48 horas a 40 °C. A la misma formulación E11, se le incorporaron las nanopartículas, sin embargo, estas sedimentaron considerablemente antes de las 24 horas a temperatura ambiente. Se decidió aumentar la viscosidad, incrementando el alcohol cetílico y el aceite de ricino, pero disminuyendo el aceite mineral y la glicerina, e igualmente manteniendo la vitamina E (formulación E12). En la formulación E12 que contiene nanopartículas, casi no hubo sedimentación transcurridas 72 horas a temperatura ambiente, ni tampoco se observó separación de fases u otro tipo de inestabilidad. Por otra parte, después de centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm, solo se observaron pequeños flóculos, fácilmente de reconstituir. Sin embargo, a 40 °C y antes de las 72 horas, se observó una pequeña separación de fase. Se reformuló aumentando la

cantidad de tensactivo, relativo a un 20% de la fase grasa a un 25 % y 30 %, formulaciones denominadas E13 y E14, respectivamente. Solo la formulación E14 fue estable por más de 72 horas, a temperatura ambiente y a 40 °C, no habiendo sedimentación de las nanopartículas, manteniéndose así por más de 120 horas bajo estas mismas condiciones (temperatura ambiente y a 40 °C). Los mismos ensayos de estabilidad se realizaron para las emulsiones con vitamina A, no observándose inestabilidad. Se seleccionó la formulación E14 para realizar todos los ensayos, y a partir de ésta se prepararon 2 emulsiones: E-VE y E-VA, cada una con vitamina E y vitamina A, respectivamente, e incluyendo las ACMSNPs-CA. Las vitaminas se incorporaron previo a mezclar las fases grasa y acuosa. En el caso de la vitamina A, se encontró que las cápsulas poseen un 78% de palmitato de retinol respecto de lo declarado en el envase, por lo tanto, para 100 g de emulsión se agregaron aproximadamente 2 g del contenido en las cápsulas, En la Figura 14 se observa la separación de fases de las emulsiones E5 y E7, a diferencia de la E14.



**Figura 12.** Emulsiones terminadas, E5, E7 y E14.

En este trabajo, la fase grasa, se encuentra constituida principalmente por aceite mineral y aceite de ricino. Al seleccionar el aceite de ricino se consideró, además, que su mayor componente es el ácido ricinoleico (AR), un ácido graso monoinsaturado de 18 de carbonos con un grupo hidroxilo beta al doble enlace del ácido graso. La presencia del grupo hidroxilo permite que el AR sea menos susceptible a la oxidación, previniendo la formación de peróxidos. Es por esto que el aceite de ricino tiene una mayor vida útil en comparación a otros aceites comúnmente utilizados en emulsiones cosméticas y alimentos [61]. La

susceptibilidad a la oxidación por parte de aceites y lípidos es un factor a considerar muy importante en la calidad, seguridad y eficacia de las emulsiones. La peroxidación lipídica de lípidos emulsificados es un proceso de autooxidación a través de mecanismos en los que participan radicales libres. La reacción de oxidación se inicia, cuando radicales libres atacan al ácido graso, mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno del grupo metileno de la cadena alifática del lípido, produciendo principalmente hidroperóxidos [61]. Se seleccionó la vitamina E como compuesto bioactivo por ser un eficiente antioxidante y activo *antiage* utilizado en productos cosméticos. Los radicales OH atacan a la vitamina E a través de diferentes vías: reacciones de abstracción de hidrógenos desde el OH fenólico y de grupos metilo; y adiciones electrofílicas de OH en varias posiciones en el anillo aromático, siendo la vía más favorable la abstracción de hidrógeno desde el fenol y la adición electrofílica al anillo aromático [62].

### 9.9 PORCENTAJE DE INCORPORACIÓN DE VITAMINA E y VITAMINA A EN LAS EMULSIONES FABRICADAS

Una vez fabricadas las emulsiones, se cuantificó la cantidad de vitaminas contenidas en estas (0,5 % (VE) y 0,2 % (VA)). Para la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) se utilizó la metodología descrita en el trabajo de Nada y col. la cual fue previamente validada en el laboratorio. Los resultados encontrados se pueden observar en la Tabla 6. Por otra parte, se utilizó la metodología de Satoshi Yokata y Col. para la cuantificación del palmitato de retinol [54].

	Emulsiones	
	Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)	VitaminaA (palmitato de retinol)
Porcentaje experimental-1 (%)	0,507 %	0,178%
Porcentaje experimental-2 (%)	0,503 %	0,186 %
Porcentaje encontrado -1 (%)	0,509 %	0,170 %
Porcentaje encontrado -2 (%)	0,500 %	0,183 %

Tabla 5. Porcentaje de VE y VA en las emulsiones.

## 9.10 INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS EN EMULSIONES O/W

Al incorporar las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico (ACMSNPs-CA) en las emulsiones, estas se dispersaron primero en glicerina para luego agregar la emulsión sobre ellas, manteniendo el sistema bajo agitación. Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo de la formulación, se evaluó la capacidad de las nanopartículas para mantenerse en suspensión. Se evidenció que aumentando levemente la viscosidad de la emulsión, las nanopartículas logran estar suficientemente suspendidas para realizar todos los ensayos. La Figura 13, evidencia la presencia de sedimento en la emulsión E11, fenómeno que no se observa en la emulsión E12.



**Figura 13.** Emulsiones E11 y E12 terminadas.

## 9.11 ESTABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Se evaluaron los aspectos físicos y químicos en la estabilidad de las emulsiones. Se evaluó el color de las emulsiones, viscosidad y estabilidad física (cremado, separación de fases, coalescencia, etc.) La estabilidad química se evaluó cuantificando la cantidad de vitamina de las emulsiones, por efecto de la oxidación por  $H_2O_2$  bajo condiciones de temperatura.

### **9.11.1. ESTABILIDAD FÍSICA**

La caracterización de las emulsiones, en relación a su estabilidad física se evaluó utilizando la emulsión E-VE (emulsión sin nanopartículas) y otras dos emulsiones denominadas E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA, en las cuales se incorporó ACMSNPs y ACMSNPs-CA, respectivamente. Se verificó que la emulsión fuese de tipo o/w mediante la incorporación de agua a esta.

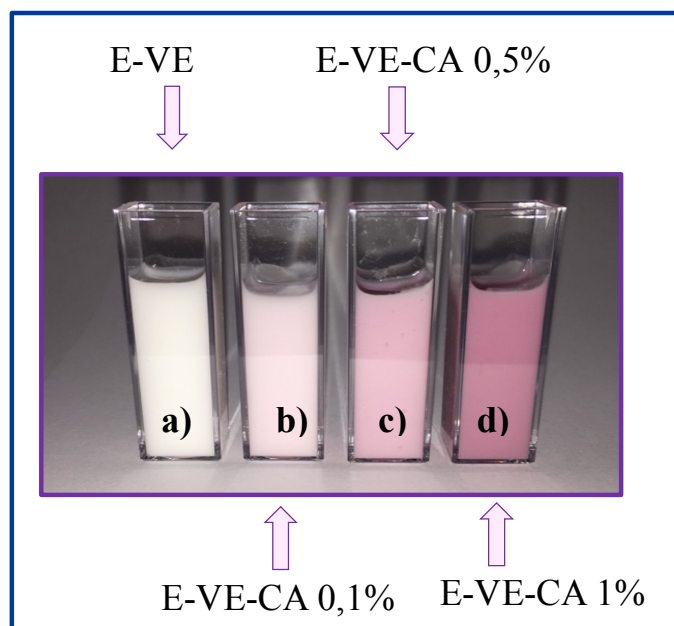
### **9.11.2 EVALUACIÓN DEL COLOR DE LAS EMULSIONES EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ACMSNPs-CA INCORPORADAS**

Para caracterizar el color de las emulsiones se preparó una emulsión sin nanopartículas y otras tres con diferentes concentraciones de ACMSNPs-CA. Las emulsiones se denominaron de la siguientes forma:

- E-VE: Emulsión sin nanopartículas.
- E-VE-CA 0,1%: Emulsión con 0,1% de ACMSNPs-CA.
- E-VE-CA 0,5%: Emulsión con 0,5% de ACMSNPs-CA.
- E-VE-CA 1%: Emulsión con 1% de ACMSNPs-CA.

La emulsión sin ACMSNPs-CA es de color blanco al igual que las emulsiones formuladas con ACMSNP<sub>s</sub>. Las 3 emulsiones con nanopartículas, presentaron un color rosa, con diferentes intensidades. La intensidad del color, como es de esperar, se relaciona directamente con la concentración de las nanopartículas en la emulsión. En la Figura 16 se observa que al aumentar el porcentaje de ACMSNPs-CA en la emulsión, el color rosa de estas es más intenso, pasando de rosa pálido a rosa oscuro.





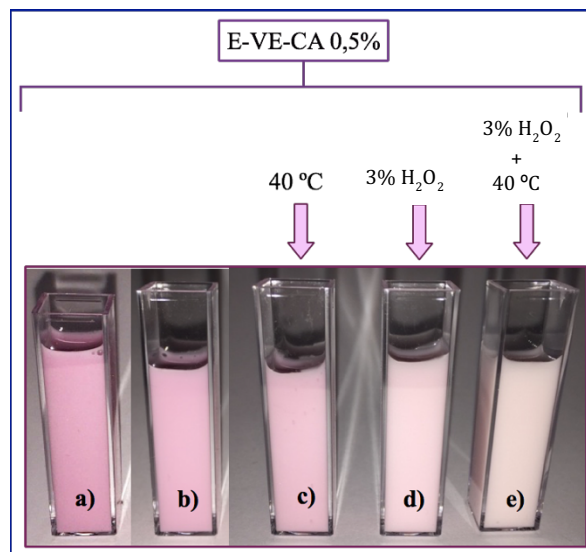
**Figura 14.** Color de emulsiones con diferentes concentraciones de ACMSNP-CA **a)** E-VE: Emulsión con VE sin nanopartículas. **b)** E-VE-CA 0,1%: Emulsión con VE y 0,1% de ACMSNPs-CA. **c)** E-VE-CA 0,5%: Emulsión con VE y 0,5% de ACMSNPs-CA. **d)** E-VE-CA 1%: Emulsión con VE y 1% de ACMSNPs-CA.

### 9.11.3 COLOR DE LAS EMULSIONES FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS

El color de la emulsión con VE y un 0,5 % de ACMSNPs-CA (E-VE-CA 0,5%) se evaluó tras 48 horas de exposición a las condiciones utilizadas durante los ensayos de oxidación, las cuales son las siguientes:

- E-VE-CA 0,5% a temperatura ambiente
- E-VE-CA 0,5% a 40 °C.
- E-VE-CA 0,5% a temperatura ambiente con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%
- E-VE-CA 0,5% a 40 °C con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%

En la Figura 15 se muestran los cambios de color observados para las emulsiones E-VE-CA, bajo las condiciones mencionadas.



**Figura 15.** Color de emulsiones E-VE-CA a tiempo 0, y después de 48 horas de exposición a las condiciones trabajo. **a)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a tiempo 0. **b)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a temperatura ambiente, después de 48 horas. **c)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a 40 °C, después de 48 horas **d)** Emulsión E-VE-CA 0,5%, después de 48 horas, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. **e)** Emulsión E-VE-CA 0,5% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, a 40 °C, después de 48 horas.

El análisis de las muestras sometidas bajo las condiciones anteriormente descritas, puede ser resumido en los siguientes puntos:

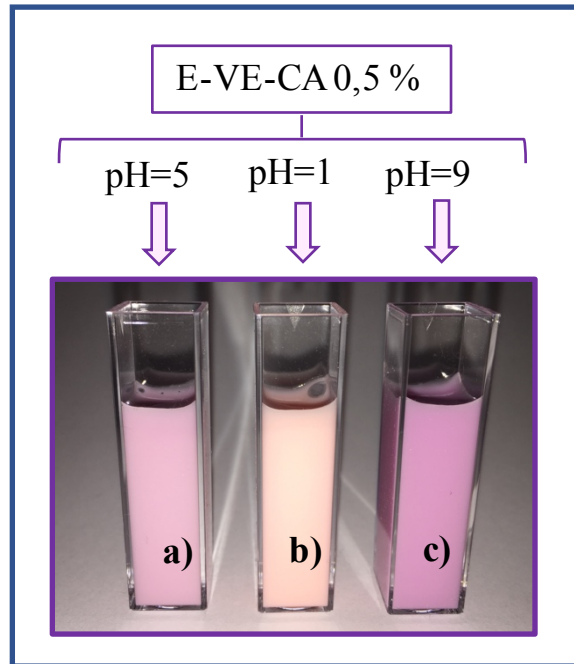
- a.- Tiempo de exposición: Emulsiones en ausencia de peróxido, no variaron su color, luego de 48 horas mantenidas a 40 °C.
- b.- Temperatura: Emulsiones en presencia de peróxido, presentan decoloración recién a las 48 hrs mantenidas a temperatura ambiente. Por otra parte, el aumento de la temperatura a 40 °C produce la decoloración de las emulsiones antes de las 24 horas.
- c.- El mayor cambio en la coloración de las emulsiones fue observado por la acción del peróxido a 40 °C.

El peróxido de hidrógeno es el responsable de la disminución en la intensidad del color, debido a que oxida al ácido carmínico unido a la nanopartícula. El cambio en el color se acentúa para la emulsión expuesta a mayor temperatura, debido al aumento en la velocidad de oxidación del ácido carmínico. En este sentido el ácido carmínico al ser oxidado, está contribuyendo a evitar la degradación de la vitamina E, ubicada en el interior del glóbulo, pues el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaccionará primero con el ácido carmínico conjugado a la nanopartícula

ubicada en la interfase, antes de difundir hacia el interior de glóbulo. Esta reacción afecta el color de la emulsión lo que podría limitar la posibilidad de utilizar una ACMSNPs-CA como colorante. Sin embargo, la presencia del ácido carmínico y la decoloración de este en la emulsión, podría ser útil como indicador de la estabilidad química de las emulsiones. No obstante, estas son condiciones forzadas, a las que no se encuentra habitualmente expuesto un producto cosmético o alimento, y en ese sentido, la emulsión en condiciones controladas de almacenamiento y temperatura, podría mantenerse estable por mayor tiempo, sin variar su color.

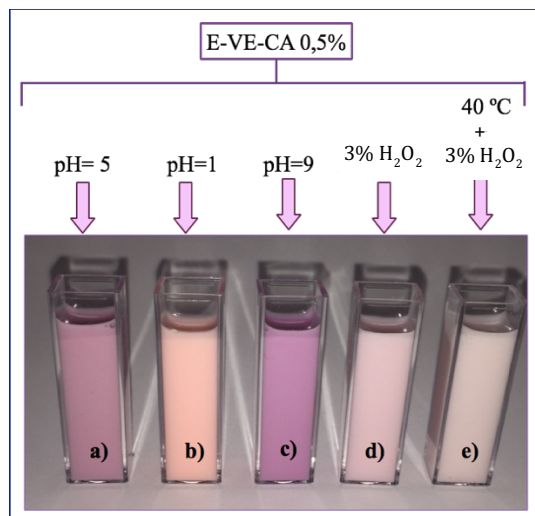
#### **9.11.4 VARIACIÓN DEL COLOR DE LAS EMULSIONES EN FUNCIÓN DEL pH**

Se evaluó el efecto del pH en las emulsiones con NPs. Para esto se utilizaron soluciones de HCl 0,1 N y NaOH 0,1N. El ácido carmínico en solución varía su color dependiendo del pH del medio, desde un anaranjado –amarillo a pH 1 a rojo violeta a pH sobre 7. En la Figura 18, se observan 3 emulsiones estudiadas: primero, la emulsión a) con NPs que originalmente tienen un pH de 5,7 y las otras b) y c), ajustadas a pH 1 y 9, respectivamente. En el caso de la emulsión a pH 9, el color es relativamente violeta (o morado), mientras que a pH ácido es de color anaranjado suave. A ambos pHs, los colores de las emulsiones son similares a los que presenta el ácido carmínico en solución, tanto en medio alcalino como en medio ácido. Esta característica del ácido carmínico se mantiene aun cuando se encuentra unido a la nanopartícula, por lo que, de incorporarse las ACMSNPs-CA a una formulación, se debe controlar el pH, pues podría afectar el aspecto del producto.



**Figura 16.** Imágenes de emulsión E-VE-CA en medios con distintos pH. **a)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a pH 5. **b)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a pH 1. **c)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a pH 9.

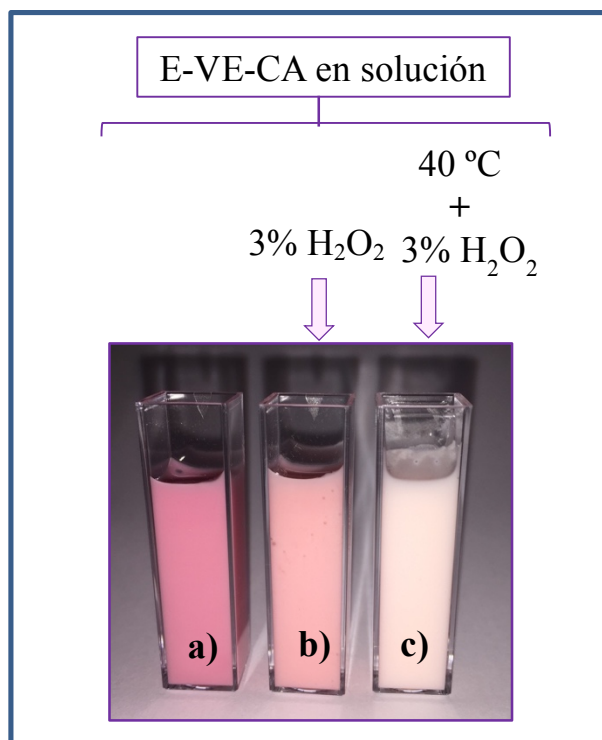
En la Figura 19, resume las variaciones del color de emulsiones con NPs, que fueron expuestas bajo las condiciones descritas anteriormente (pH 5, pH 1, pH 9, en presencia de peróxido a temperatura ambiente y en presencia de peróxido a 40 °C)



**Figura 17.** Emulsiones E-VE-CA frente a diferentes medios (pH, temperatura y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.) después de 48 horas. **a)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a pH 5. **b)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a pH 1. **c)** Emulsión E-VE-CA 0,5% a pH 9. **d)** Emulsión E-VE-CA 0,5% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. **e)** Emulsión E-VE-CA 0,5% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% a 40 ° C.

### 9.11.5 COLOR DE LAS EMULSIONES CON ÁCIDO CARMÍNICO EN SOLUCIÓN

Se evaluó y comparó la diferencia entre utilizar las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico o agregar el ácido carmínico en solución. En la Figura 20, se muestran las emulsiones con CA en solución, después de 48 horas, las que también experimentaron variación del color cuando se incorpora el peróxido de hidrógeno, o adicionalmente, si se incrementa la temperatura a 40 °C. El color que adquiere la emulsión varía levemente del color obtenido con la emulsión con ACMSNPs-CA al 0,5%. Una de las desventajas de adicionar el ácido carmínico en solución, es que se encontrará disuelto en la fase acuosa, a diferencia de cuando se encuentra unido a la nanopartícula, en que se ubicará preferentemente en la interfase, funcionando como una barrera de protección química alrededor del glóbulo, además de la estabilidad mecánica proporcionada por la nanopartícula.



**Figura 18.** Emulsiones con ácido carmínico en solución. **a)** Emulsiones con ácido carmínico en solución, sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a temperatura ambiente. **b)** Emulsiones con ácido carmínico en solución con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % **c)** Emulsiones con ácido carmínico en solución con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y a 40 °C.

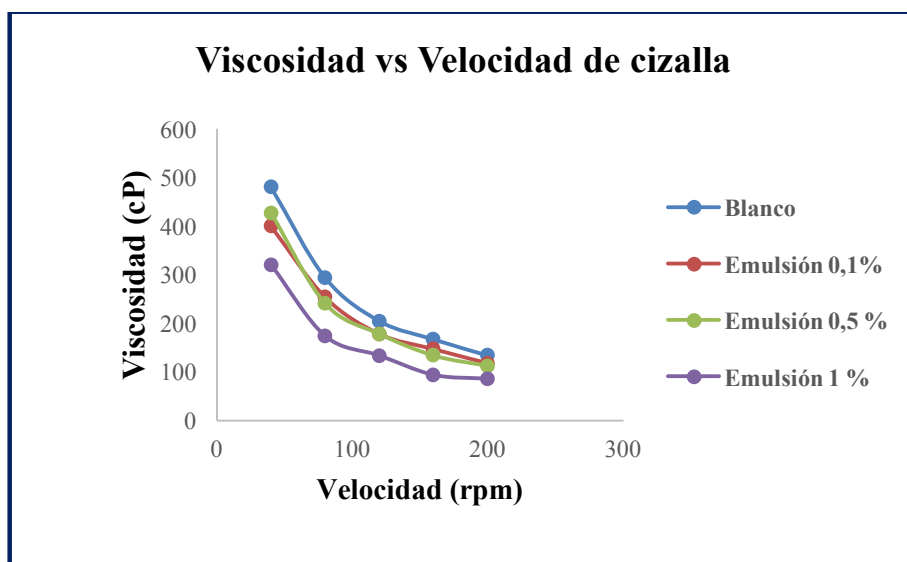
### 9.11.6 VISCOSIDAD

Se midió la viscosidad de emulsiones con diferentes concentraciones de nanopartículas. La viscosidad observada para las emulsiones con vitamina E utilizando concentraciones de 0,1% 0,5% y 1 % se presenta en la Tabla 7.

Velocidad (rpm)	E-VE (cps)	E-VE-CA 0,1 % (cps)	E-VE-CA 0,5 % (cps)	E-VE-CA 1 % (cps)
40	480	400	426,7	320
80	293,3	253,3	240,0	173,3
120	204,2	177,8	177,7	133,1
160	166,7	146,7	133,3	93,3
200	133,3	117,3	112,0	85,3

**Tabla 7.** Viscosidad de emulsiones E-VE, E-VE-CA 0,1 %, E-VE-CA 0,5 %, E-VE-CA 1 %.

En la Figura 19 se muestra el gráfico de la viscosidad en función de la velocidad de cizalla, observándose un comportamiento pseudoplástico, dado que la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad. Además, se observa que al aumentar la concentración de nanopartículas disminuye la viscosidad de la emulsión. El comportamiento usual al incorporar nanopartículas a una emulsión es que aumente la viscosidad, sin embargo, en este caso ocurre de forma inversa.



**Figura 19.** Gráfico de viscosidad versus velocidad de cizalla para 4 emulsiones (Blanco (sin nanopartículas) y con diferentes concentraciones de ACMSNPs-CA (0,1 %, 0,5% y 1%))

### 9.11.7 FORMA Y TAMAÑO DE GLÓBULO

En la imagen de la Figura 20, se observan los glóbulos de una emulsión que contiene ACMSNPs-CA, observándose globulos uniformes, con un tamaño de 4  $\mu\text{m}$  de diámetro.



**Figura 20.** Imagen microscópica de emulsión E-VE-CA

### **9.11.8 ESTABILIDAD QUÍMICA**

#### **9.11.8.1 CARACTERIZACIÓN DEL pH**

Se determinó el pH de emulsiones con vitamina E en ausencia y presencia de NPs que contenían y no ácido carmínico. El objetivo de esto, fue preparar una emulsión compatible con el pH 5,5 de la piel, considerando esta emulsión como modelo de un producto cosmético. En las 3 emulsiones se encontraron valores de pH 5,4; 5,3 y 5,7 para la emulsión E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA, respectivamente.

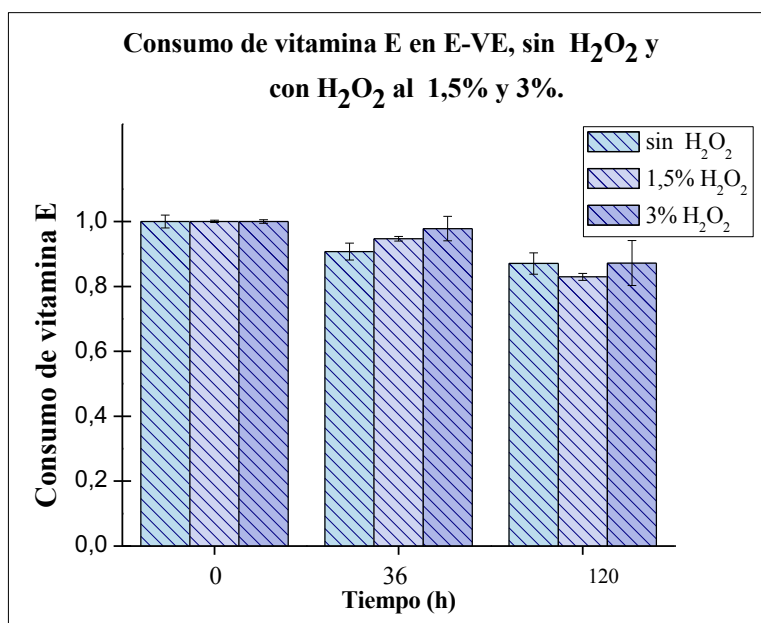
#### **9.11.8.2 ESTUDIO DE ESTABILIDAD QUÍMICA: CONSUMO DE VITAMINA E**

La evaluación de la estabilidad química se realizó a través de la determinación del consumo de la vitamina E incorporada en la emulsión, en ausencia y presencia de ACMSNPs-CA. Este ensayo permitió evaluar si las nanopartículas conjugadas con CA eran capaces de disminuir el consumo de VE en la fase oleosa, considerando que se ubicarán preferentemente en la interface de la emulsión, logrando una protección química. A partir de ensayos preeliminares, se decidió utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5% y 3 %, pues se observó un aumento suficiente en el consumo de vitamina E. De esta forma, se calculó la fracción de vitamina E respecto de la cuantificada a tiempo 0, determinando así el consumo de esta. Se evaluaron las emulsiones sin NPs, y con ACMSNPs y ACMSNPs-CA.

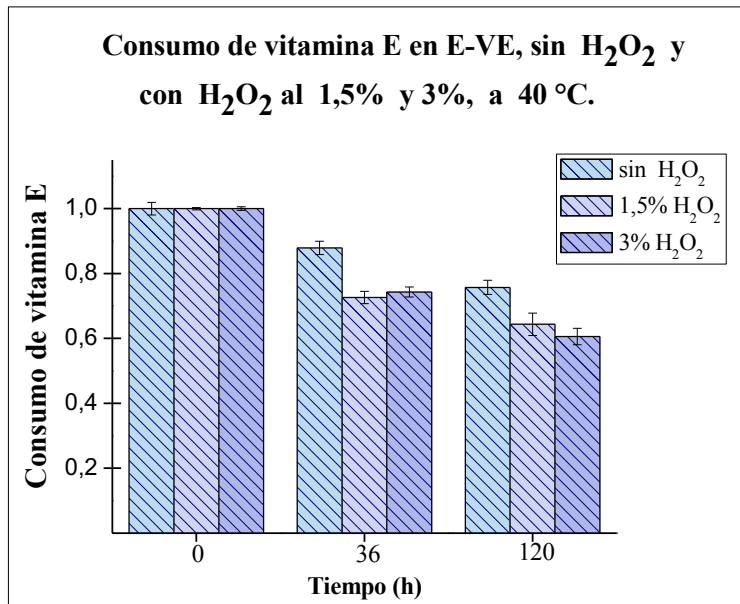


En primer lugar, se observó que al exponer la emulsión por mayor tiempo, existía un mayor consumo de VE. Sin embargo, al utilizar diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (1,5 % y 3%), el consumo de la vitamina no varió considerablemente, tanto a temperatura ambiente como a 40 °C. En la Figura 23, se muestra el gráfico del consumo de vitamina E, en ausencia y presencia de  $H_2O_2$  (1,5% y 3%), estudio realizado a temperatura ambiente. Se observa que no existe una gran disminución en el consumo de VE, transcurridas 120 horas. Sin embargo, en el gráfico de la Figura 24, se observa que a las 120 horas, utilizando las mismas concentraciones de peróxido de hidrógeno, pero en muestras expuestas a 40 °C, hay un aumento del consumo de VE desde un 12,8% a un 39,4%.

A su vez, las emulsiones que fueron expuestas sólo a 40 °C (sin  $H_2O_2$ ) también presentaron un consumo, sin embargo, este bastante menos pronunciado que aquellas con peróxido.

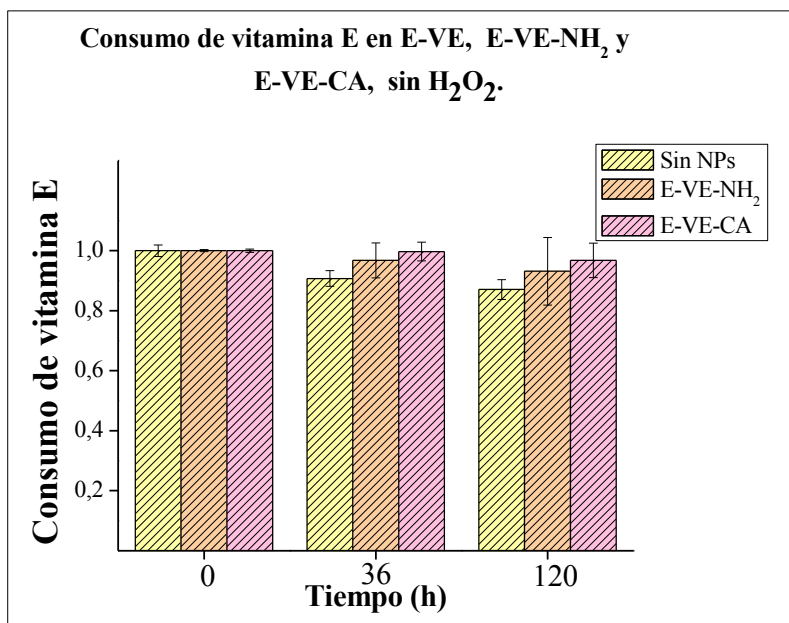


**Figura 21.** Gráfico de consumo de vitamina E en emulsión E-VE, con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ .

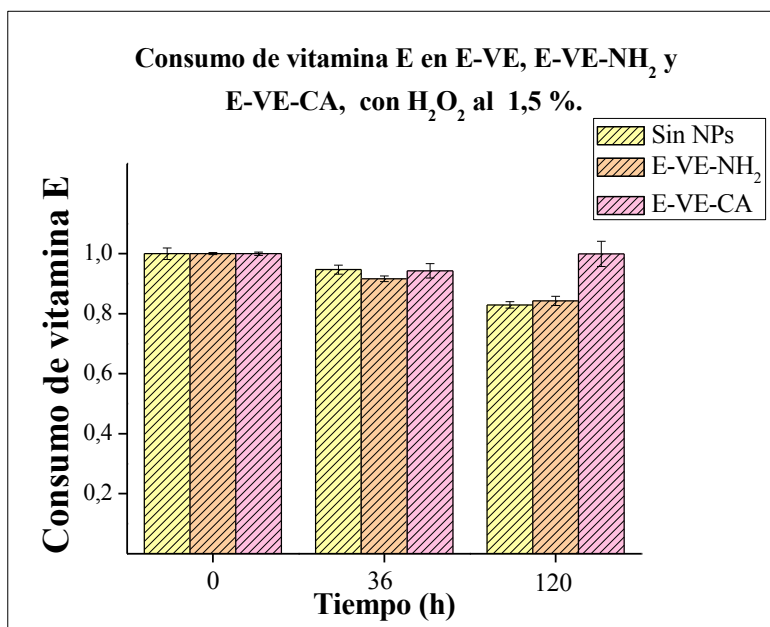


**Figura 22.** Gráfico de consumo de vitamina E en emulsión E-VE, con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a 40 °C.

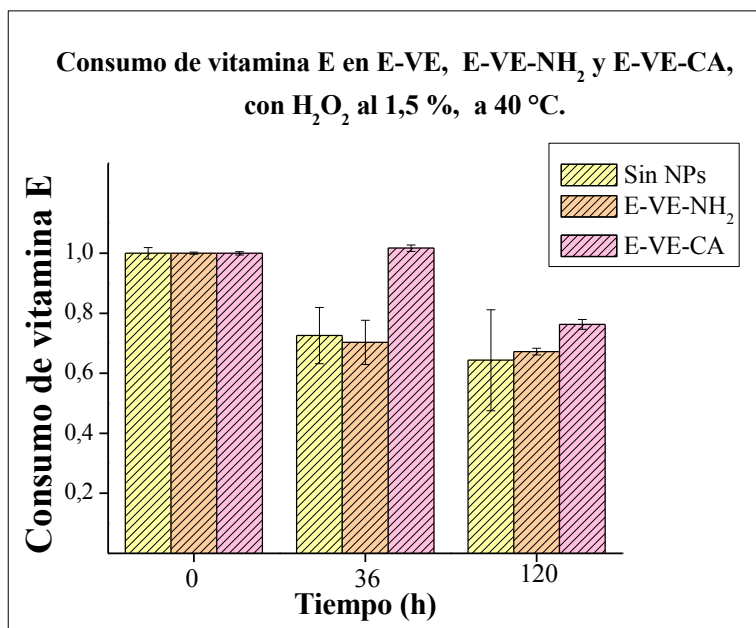
Al comparar el consumo de VE de las 3 emulsiones, E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub>, E-VE-CA, para las diferentes condiciones, se observó que las emulsiones, con nanopartículas conjugadas con CA (ACMSNPs-CA) presentaban un menor consumo de VE, evidenciándose el efecto protector de este nanomaterial antioxidante en las emulsiones. En las Figuras 25 y 26, se muestran los gráficos de las emulsiones sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5 %, a temperatura ambiente, con los 3 tipos de nanopartículas. En el gráfico de la Figura 27, correspondiente a las emulsiones con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5% a 40 °C, se observa que a las 120 horas, hay una pequeña disminución en el consumo de VE para las emulsiones con las ACMSNPs-CA, en comparación al gráfico de la Figura 26. Así mismo, en las Figuras 28 y 29 se muestran los gráficos de las emulsiones, cuando éstas se someten a 40 °C, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5% y 3%, respectivamente, observándose una importante disminución en el consumo de VE, especialmente transcurridas las primeras 36 horas, y en menor medida a las 120 horas. El efecto protector que otorgan las NPs a las emulsiones es más notorio al someter las emulsiones a oxidación forzada (agente oxidante) y condiciones aceleradas (40 °C).



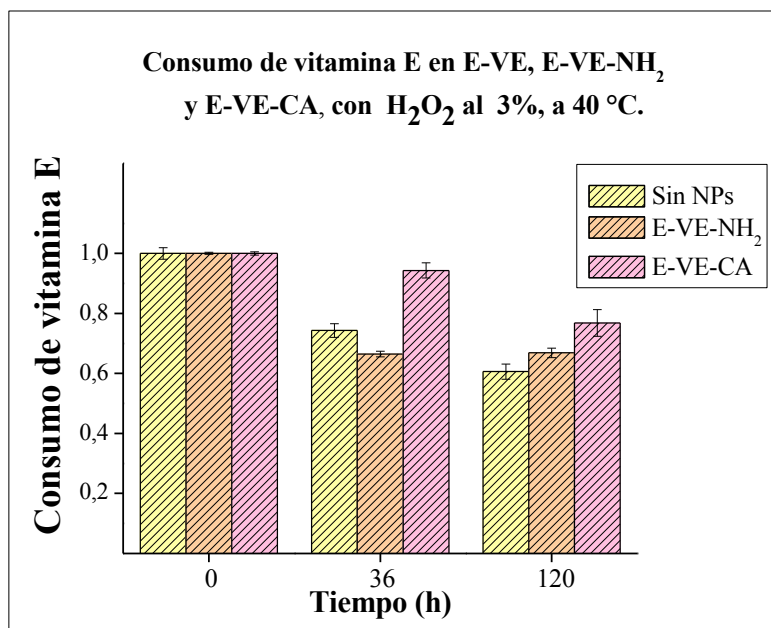
**Figura 23.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsión E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a temperatura ambiente.



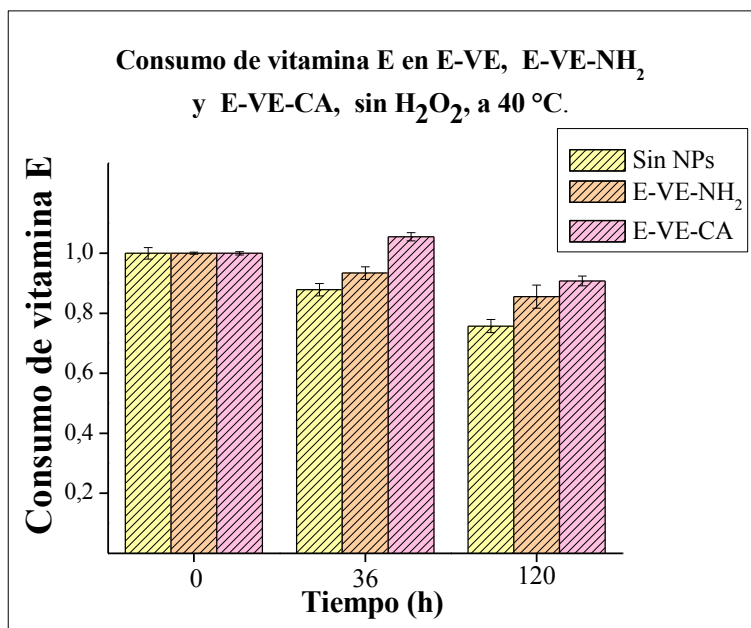
**Figura 24.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsiones E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5 %, a temperatura ambiente.



**Figura 25.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsiones E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5%, a 40 °C.



**Figura 26.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsiones E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, a 40 °C.



**Figura 27.** Gráfico de consumo de vitamina E en las emulsiones E-VE, E-VE-NH<sub>2</sub> y E-VE-CA sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 40 °C.

Los resultados del consumo de VE se pueden correlacionar con los cambios de color observados en las emulsiones. Las emulsiones E-VE-CA, expuestas al agente oxidante y a 40 °C, se decoloraron considerablemente, sin embargo bajo esas condiciones se obtuvieron menores consumos de VE, en comparación a aquellas emulsiones sin ACMSNPs-CA.

### 9.11.9.3 ESTUDIO DE ESTABILIDAD A PARTIR DE CONSUMO DE VITAMINA A

Los resultados encontrados para el consumo de vitamina A no fueron concluyentes pues los porcentajes de vitamina A para las diferentes muestras tenían un comportamiento errático.

## 10. CONCLUSIONES

Las nanopartículas de sílice modificadas y conjugadas posteriormente con ácido carmínico, incluidas en una emulsión Pickering o/w con vitamina E en su fase oleosa, estabilizan químicamente la emulsión, disminuyendo el consumo de vitamina, cuando se expuso a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (1,5 % y 3%) y a diferentes temperaturas.

Se prepararon nanopartículas de sílice sólidas con una capa mesoporosa de sílice conjugadas con ácido carmínico. Se obtuvieron nanopartículas monodispersas con un tamaño de 182 nm, donde la capa mesoporosa corresponde a un 20,9 % del diámetro total mientras que el centro sólido corresponde a una 58,6%.

El potencial Z de las nanopartículas cambia de negativo, debido a los grupos OH presentes en la superficie de la capa porosa, a uno más positivo, cuando se modifica con grupos  $NH_2$ . Las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico tienen un potencial Z negativo debido a los grupos OH del CA. Al aumentar el pH del medio, los grupos OH más ácidos, se ionizan, generando cambios hacia valores más negativos en el potencial Z. La cantidad de ácido carmínico unido a las nanopartículas fue de 4,3 mg por cada 100 mg de nanopartículas. Las nanopartículas modificadas con el grupo amino son de color blanco mientras que las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico son de color rosado intenso.

Tanto nanopartículas con CA adsorbido ( $ACMSNPs-CA_{AD}$ ) como con CA covalentemente conjugado ( $ACMSNPs-CA_{COV}$ ) presentan actividad antioxidante frente oxígeno singlete. Las  $ACMSNPs-CA_{AD}$  tienen una mayor constante de velocidad de desactivación total ( $k_T$ ) aunque entre, éstas y las  $ACMSNPs-CA_{COV}$  no se detectaron diferencias significativas.

Las emulsiones o/w con vitamina E en su fase oleosa, y con nanopartículas conjugadas con ácido carmínico ( $ACMSNPs-CA$ ), son estables hasta por 120 horas, a temperatura ambiente y a 40 °C. La incorporación de las  $ACMSNPs-CA$  genera un cambio de color rosado intenso, el cual es estable en el tiempo, si se controlan variables como: pH del medio u origen de especies reactivas. El pH de la emulsión es 5,7 y la intensidad de color rosado depende de la concentración de  $ACMSNPs-CA$ , frente a cambios de pH en el medio, se producen cambios de color, análogos a los que sufre el ácido carmínico en solución. Las nanopartículas conjugadas con ácido carmínico son eficientes como nanomaterial bifuncional, antioxidante

y colorante, y compatibles con un sistema bifásico como una emulsión o/w.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Rincón-Fontán M, Rodríguez-López L, Vecino X, Cruz J.M, Moldes A.B. Study of the synergic effect between mica and biosurfactant to stabilize Pickering emulsions containing Vitamin E using a triangular design. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019; 537:34–42
2. Watanabe K., 2017. *Skin Care Cosmetics*. En: *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Elsevier Inc. pp. 551-560
3. Ali Khan B, Akhtar N, Shoaib Khan H. M, Waseem K, Mahmood T, Rasul A, et al. Basics of pharmaceutical emulsions: a review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011; 5(25): 2715-2725.
4. Sinko P.J, Alshareifi. M. 2011. *Coarse Dispersions* En: *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Science*. Lippincott Williams & Wilkins. pp 747-799.
5. Lochhead R.Y. *Basic Physical Sciences for the Formulation of Cosmetic Products*. En: *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Elsevier Inc. pp 39-76
6. Yamashita Y., Miyahara R., Sakamoto K. 2017. *Emulsion and Emulsification Technology*. En: *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Elsevier Inc. pp. 489-506
7. 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 208-316.
8. Buchmann S. *Main Cosmetic Vehicles*. En: *Handbook of cosmetic and science technology*. Taylor and Francis. pp. 99-124
9. Epstein H., 2006. *Skin Care Products* En: *Handbook of cosmetic science and technology*. Taylor and Francis. pp 427-439
10. Marku D, Wahlgren M, Rayner M, Sjöö M, Timgren A. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012; 428: 1-7.



11. Zhu F. Review Starch based Pickering emulsions: Fabrication, properties, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2019; 85:129-137
12. B. Long, Huan S, Li Z, McClements D.J. Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocolloids*, 2017;. 66:144-153.
13. Perry R, Schueller R, Stability Testing of Cosmetic Products En: Handbook of 2006. Taylor and Francis. 2006; 655-666
14. Griffith C, Daigle H. Manipulation of Pickering emulsion rheology using hydrophilically modified silica nanoparticles in brine. *Journal of Colloids and Interface Science*, 2018; 509: 132-139
15. Frelichowska J, Bolzinger M.A, Valour J, Mouaziz H, Pelletier J, Chevalier Y. Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery. *International Journal of pharmaceutical*, 2006; 368: 7-15
16. Frelichowska, J, Bolzinger, M, and Chevalier, Y. Pickering emulsions with bare silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2009; 343: 70–74.
17. Otterstätter G., 2006. Colorants. En: Handbook of cosmetic and science technology. Taylor and Francis. pp 233-246
18. Schlossman M. L., 2006. Decorative Cosmetics. En: Handbook of cosmetic and science technology. Taylor and Francis. pp 555-591
19. Guillermin D, Debroyse T, Trigueiro P, Viguerie L, Rigaud B, Morlet-Savary F. New pigments based on carminic acid and smectites: A molecular investigation. *Dyes and Pigments*. 2019; 160: 971-982.
20. Kpogbemabou D, Lecomte-Nana G, Aimable A, Bieni M, Niknam V, Carrion COil-in-water Pickering emulsions stabilized by phyllosilicates at high solid content. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2014; 463: 85–92.
21. Marto J, Carriço C, Pinto P, Gonçalves L.M, Ribeiro H.M. Pop the Cork: Quercus suber for Naturally Sourced Antioxidants and Emulsion Stability. *Cosmetic and Toiletries*, 2019; 134 (1): 57-62
22. Glampedaki P, Dutschk V. Stability studies of cosmetic emulsions prepared from natural products such as wine, grape seed oil and mastic resin. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2014; 460: 306-311

23. Harman C, Patel M, Guldin S, Davies G. Recent Developments in Pickering Emulsions for Biomedical Applications. *Colloids and Interfaces science*, 2019. (accepted manuscript)
24. Chevalier Y, Bolzinger M. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2013; 439: 23–34
25. Dubuisson P, Picard C, Grisel M, Savary G. How does composition influence the texture of cosmetic emulsions? *Colloids and Surfaces A.*, 2018; 536: 38-46
26. Yehye W, Rahman N, Ariffin A, Hamid S, Alhadi A, Farkaad A. et. al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015; 101: 295-312
27. Frelichowska J, Bolzinger M, Chevalier Y. Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010; 351:348-356
28. Zhang J, Li L, Xu J, Sun D. Effect of cetyltrimethylammonium bromide addition on the emulsions stabilized by montmorillonite. *Colloid Polym Sci*, 2014; 292: 441–447
29. Rosu M, Suci R, Mihet M, Bratu I. Physical–chemical characterization of titanium dioxide layers sensitized with the natural dyes carmine and morin. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 2013; 16: 1551–1557
30. González E. A, García E, Nazareno M. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extracts. *Food Chemistry*, 2010; 119:358-362
31. Atabey H, Sari H, Al-Obaidi F. Protonation Equilibria of Carminic Acid and Stability Constants of Its Complexes with Some Divalent Metal Ions in Aqueous Solution. *J.Solution Chem*, 2012; 41: 793–803
32. Guo-Xiang Li, Zai-Qun Liu, Di Wu. Carminic acid: an antioxidant to protect erythrocytes and DNA against radical-induced oxidation. *J. Phys. Org. Chem*, 2009; 22: 883–887
33. Frederice R, Garcia A, Henrique M, Braz. Molecular Fluorescence in Silica Particles Doped with Quercetin-Al<sup>3+</sup> Complexes. *J, Chem. Soc.*, 21, 2010; 1213-1217.
34. Stöber W, Fink A, Bohn E. J. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Colloid Interface Sci*, 1968; 26: 62-69.
35. Zhang Y, Zhi Z, Jiang T, Zhang J, Wang Z, Wang S. J. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. *Journal of controlled Release*, 2010; 145: 257– 263.
36. Manzano M, Aina V, Arean C.O, Balas F, Cauda V, Colilla M., Delgado M.R, Vallet-Regi

- M. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: effect of particle morphology and amine functionalization, *Chemical Engineering Journal*, 2008; 137: 30–37.
37. Perro A., Reculosa S., Bourgeat E., Duguet E., Ravaine S., Synthesis of hybrid colloidal particles: From snowman-like to raspberry-like morphologies. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2006. 284- 285 78-83.
  38. Rahman I.A., Vejayakumaran P., Sipaut C., Ismail J., Bakar M., Adnan R., Chee C. An optimized sol-gel synthesis of stable primary equivalent silica particle. *Colloids Surf. A.*, 2007; 294:102-110.
  39. Green D., Lin J., Lam Y., Hu M., Schaefer D., Harris M., Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003; 266: 346-358.
  40. Mukherjee, S. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clinical Interventions in Aging*, 2006; 1(4), 327–348.
  41. Álvarez R, Vaz B, Gronemeyer, de Lera A. Functions, Therapeutic Applications, and Synthesis of Retinoids and Carotenoids. *Chem. Rev.*, 2014; 114: 1–125.
  42. Chaudhari A. Role of oxygen scavengers in limiting oxygen permeation into emulsions and improving stability of encapsulated retinol. *Journal of Food Engineering*, 2015; 157: 7-13.
  43. Alizadeh F, Bolhassani A, Khavari A, Bathaie S, Najji T, and Arbabi Bidgoli S. Retinoids and their biological effects against cancer. *International Immunopharmacology*, 2014; 18(1): 43-49.
  44. Tsunoda, T, Takabayashi K. Stability of all-trans-retinol in cream. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1995; 46(4):191- 198.
  45. Semenzato A, Baù A, Dall'aglio C, Nicolini M, Bettero A, Calliari I. Stability of vitamin A palmitate in cosmetic emulsions: influence of physical parameters. *Int J Cosmet Sci.*, 1994; 16(4): 139-147.
  46. Morales J, Valdés K, Morales J, Oyarzun-Ampuero F. Lipid nanoparticles for the topical delivery of retinoids and derivatives. *Nanomedicine*, 2015; 10(2): 253-269
  47. Vrolijk, M, Opperhuizen A, Jansen E, Godschalk R, Van Schooten F, Bast A, and Haenen

- G. The shifting perception on antioxidants: The case of vitamin E and  $\beta$ -carotene. *Redox Biology*, 2015; 4: 272–278.
48. Thiele J, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Mol Aspects Med.*, 2007; 28 (5-6): 646-67. 44
49. Ghosh R, Paria C, Paria S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. *Chemical Review*, 2012; 112: 2373-2423
50. Machatova Z, Barbierikova Z, Poliak P, Jancovicova , Lukes V, Brezova V Study of natural anthraquinone colorants by EPR and UV/vis spectroscopy. *Zuzana*, 2016; 132: 79-93
51. Miyahara R., 2017. Emollients. En: *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Elsevier Inc. pp. 245-253
52. Gamboa N, Leidinger W. La química del ácido carmínico. *Revista de química*, 1988; 2:128.
53. Nada A, Krishnaiah Y, Zaghoul A, Khattab I. Analysis of vitamin E in commercial cosmetic preparations by HPLC. *J. Cosmet. Sci.*, 2010; 61: 353–365 hplc
54. Yokota S, Oshio S. A simple and robust quantitative analysis of retinol and retinyl palmitate using a liquid chromatographic isocratic method. *Journal of food and drug analysis* 2018; 26: 504-511
55. Jiang W, Wu C, Zhang R. General assembly of organic molecules in core-shell mesoporous silica nanoparticles. *Materials Letters*, 2012; 77: 100–102
56. Yoshida K, Sekine T, Matsuzaki F, Yanaki T, and Yamaguchi M. Stability of Vitamin A in Oil-In-Water-In-Oil-Type Multiple Emulsions. *JAOCS*, 1999; 76, 2:1-6
57. Deligiannakis Y, Sotiriou GA, Pratsinis SE. Antioxidante and antiradical SiO<sub>2</sub> nanoparticles covalently functionalized with gallic acid ACS applied materials and interfaces Sotiriou GA, Pratsinis SE. 2012; 4 (12): 6609-17
58. Berlier G, Gastaldi I, Sapino S, Miletto I, Bottibelli E, Chirio D, et al. MCM-41 as a useful vector for rutin topical formulations: synthesis characterization and testing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 457 (1): 177-86
59. Michel K, Scheel J, Karsten S, Stelter N, Wind T. Risk assessment of amorphous silicon dioxide nanoparticles in a glass cleaner formulation. *Nanotoxicology*, 2012; 7(5): 974-988.

60. Ostrowski A, Nordmeyer D, Mundhenk L, Fluhr J, Lademann J, Graf C, Rühl E, Gruber AD. AHAPS-functionalized silica nanoparticles do not modulate allergic contact dermatitis in mice. *Nanoscale Research Letters*, 2014; 9: 524.
61. Patel VR, Dumancas GG, Viswanath LCK, Maples R, Subong BJJ. Castor Oil: Properties, Uses, and Optimization of Processing Parameters in Commercial Production. *Lipid Insights*. 2016; 9: LPI. S40233
62. Navarrete, M., Rangel, C., Corchado, J. C., and Espinosa-Garcia. J. (2005). Trapping of the OH Radical by  $\alpha$ -Tocopherol: A Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A.*, 109, 4777-4784