



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas
Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica

**“Estrategia sintética para la conjugación de quercetina
en nanopartículas de sílice”**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

KARLA ODETTE CALDERÓN RODAS

Director	Director	Director
Dr. Javier E. Morales Valenzuela	Prof. Vicente Castro Castillo	Dr. Germán R. Günther Sapunar
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéutica	Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica	Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica

Santiago de Chile

2020

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecer a mi familia, que los amo mucho, el apoyo incondicional durante este largo proceso de aprendizaje en el mundo de las ciencias y la vida.

Al Braulio, mi amor, por ser como es, apoyarme siempre con lo que se me ocurra hacer y mostrarme otros puntos de vista.

Al profe Vicente, que en paz descanse, por lo que me enseñó de química orgánica y tener en cuenta mis ideas.

A los profes Javier y Germán por seguir adelante con este trabajo a pesar de todo lo sucedido.

A mis amigas de la vida, por estar siempre presentes de algún modo, aunque estén lejos.

A mis amigos que conocí en la u, no esperaba que fuesen tan cercanos, pero sí lo son.

Al Martin y al Christian sobre todo durante este último tiempo.

A los del laboratorio por las tardes de química y música.

A la Yazmin que siempre está pendiente.

A los profes de orgánica por mostrarme tan bonita y complicada rama de la química.

Y muchas personas más, que saben que no soy muy expresiva.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	2
Índice.....	3
Índice de Figuras.....	6
Glosario de términos y Abreviaturas.....	7
Resumen.....	8
Summary.....	9
1.Introducción.....	10
2. Descripción de la propuesta.....	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivo general.....	16
4.1. Objetivos específicos.....	16
5. Materiales.....	17
5.1. Reactivos.....	17
5.2. Solventes.....	17
6. Instrumentación.....	18
6.1. Tamaño de partícula y potencial zeta.....	18
6.2. Microscopía electrónica de barrido.....	18
6.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	18

6.4.	Centrífuga.....	18
6.5.	Resonancia magnética nuclear de protones, Carbono 13 y Dept.....	18
7.	Metodologías.....	19
7.1.	Esquemas de las rutas sintéticas y sus protocolos de síntesis.....	19
7.2.	Propuestas de protocolos de síntesis de las estrategias presentadas.....	21
7.2.1	Protocolos de síntesis para esquema de la primera propuesta (Figura 3).....	21
7.2.1.1.	Síntesis de 2-(2,2- difenilbenzo[d][1,3] dioxol-5- il) -3,5,7- trihidroxi-4H-cromen-4-ona. (B).....	21
7.2.1.2.	Síntesis de 2-(2,2- difenilbenzo[d][1,3] dioxol-5- il)-5- hidroxio -3,7-bis(metoximetoxi)- 4H-cromen-4-ona. (C).....	21
7.2.1.3.	Síntesis de 2-(2,2,-difenilbenzo[d][1,3] dioxol-5-il)-3,7-bis(metoximetoxi)-4-oxo-4H-cromen-5-il (3-(trietoxisilil)propil)carbamato. (D).....	22
7.2.1.4.	Síntesis de 2- (3,4- dihidrofenil)-3,7-bis(metoximetoxi)-4-oxo-4H-cromen-5-il (3-trietoxisilil) propil carbamato. (E).....	22
7.2.1.5.	Síntesis de 2-(3,4,-dihidroxifenil)- 3,7- dihidroxio- 4-oxo- 4H-cromen-5-il (3-(trietoxisilil)propil) carbamato (F).....	22
7.2.2.	Protocolos de síntesis para esquema de la segunda propuesta (Figura 4).....	23
7.2.2.1.	Síntesis de 3,7-bis(benciloxi)-2-(3,4-(benciloxi) fenil)-5-hidroxio-4H-cromen-4-ona (II).....	23
7.2.2.2.	Síntesis de 6-bromohexanoato de bencilo (III).....	23

7.2.2.3. Síntesis de 4-bromobutanoato de bencilo (III*)	24
7.2.2.4. Síntesis de Bencil 6-((3,7-bis(benciloxi)-2-(3,4-(bis(benciloxi)fenil)-4-oxo-4-cromen-5-il)oxi) hexanoato. (IV).	25
7.2.2.5. Síntesis del ácido 6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-3,7-dihidroxi-4-oxo-4H-cromen-5-il)oxy)hexanoico (V).	25
7.2.2.6. Síntesis de 6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-3,7-dihidroxi-4-oxo-4H-cromen-5-il)oxi)-N-(3-(trietoxisilil)propil)hexanamida. (VI).	26
7.3. Síntesis de nanopartículas de sílice con capa mesoporosa, modificada superficialmente con grupo amino.	26
7.4. Adsorción y evaluación de quercetina en nanopartículas.	28
7.5. Caracterización de nanopartículas.	29
8. Resultados y Discusión.	30
8.1. Funcionalización selectiva de quercetina.	30
8.2. Protección de haloácidos.	34
8.3. Reacción de Williamson.	36
8.4. Estrategias de conjugación de quercetina con nanopartículas.	37
8.5. Caracterización de las nanopartículas: tamaño, distribución, potencial superficial y morfología.	42
8.6. Eficiencia de adsorción de quercetina en nanopartículas.	44
9. Conclusión.	45
10. Referencias.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de un flavonoide.

Figura 2. Estructura química de quercetina.

Figura 3. Esquema general de la primera propuesta de ruta sintética.

Figura 4. Esquema general de la segunda propuesta de ruta sintética.

Figura 5. Estructura química del 4-bromobutanoato de bencilo.

Figura 6. Cambio estructural de quercetina debido a la reacción con bromuro de bencilo.

Figura 7. Espectro ^1H NMR del compuesto **II**.

Figura 8. Espectro ^{13}C del compuesto **II**.

Figura 9. Espectro ^1H NMR del compuesto **III**.

Figura 10. Espectro ^1H NMR del compuesto **IV**.

Figura 11. Propuesta para la conjugación del compuesto **VI** en la nanopartícula.

Figura 12. Propuesta para la conjugación del compuesto **V** en la nanopartícula modificada con grupos amino

Figura 13. Esquema para la formación del enlace amida utilizando EDC y NHS como agentes activantes.

Figura 14. Propuesta para la conjugación compuesto **F** en la nanopartícula de sílice correspondiente la primera propuesta de ruta sintética.

Figura 15. Nanopartículas *core-shell* sin modificación superficial. Núcleo sólido con capa mesoporosa.

Figura 16. Nanopartículas de núcleo sólido con capa mesoporosa y quercetina adsorbida.

GLOSARIO DE ABREVIACIONES Y TÉRMINOS

DMF: dimetilformamida.

THF: tetrahidrofurano.

DIC: N, N'-diisopropilcarbodiimida.

DMAP: 4-dimetilaminopiridina.

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

HCl: ácido clorhídrico.

TEA: trietilamina.

APTES: (3-aminopropil) trietoxisilano.

CD₃Cl: cloroformo deuterado.

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

DLS: Dispersión dinámica de la luz.

SNPs: Nanopartículas de sílice de centro sólido.

CMSNPs: Nanopartículas de sílice de centro sólido con capa mesoporosa (*core-shell*).

ACMSNPs: Nanopartículas de sílice de centro sólido con capa mesoporosa recubierta con grupo amino.

ACMSNPs-QUE_{ads}: Nanopartículas de sílice de centro sólido con capa mesoporosa recubierta con grupo amino y quercetina adsorbida.

RESUMEN

La sílice es un material prometedor para el desarrollo de nuevos nanomateriales, cuyo uso puede ser de interés para diversas disciplinas como la medicina y las ciencias farmacéuticas. Los distintos tipos de nanopartículas de sílice poseen características importantes para su uso, siendo mecánicamente estables, químicamente inertes y biocompatibles, pudiendo ser utilizadas para incorporar fármacos, biomoléculas y antioxidantes, entre otros, mediante mecanismos de adsorción, oclusión y/o unión covalente.

Entre las moléculas más estudiadas en cuanto a incorporación a las nanopartículas de sílice destacan los flavonoides, compuestos bioactivos a los que, derivada de su conocida actividad antioxidante, se les atribuyen muchas propiedades: como antidiabéticos, anticancerosos y antiinflamatorios, entre otras, contribuyendo al cuidado de la salud. Uno de los flavonoides más estudiados es la quercetina, que se encuentra comúnmente en frutas y verduras presentes en nuestra dieta y que además posee un alto potencial como antioxidante.

En este trabajo proponemos modificar la superficie de nanopartículas de sílice mediante la funcionalización superficial con quercetina, con el objetivo de obtener un nanomaterial antioxidante y que en el futuro pueda ser utilizado en formulaciones farmacéuticas con actividad fotoprotectora. Para esto, se diseñaron estrategias sintéticas que permitirán esta conjugación y también se propusieron protocolos de síntesis para cada paso de estas estrategias.

Estas estrategias incluyen dos propuestas que contemplan la modificación estructural de la quercetina y cuatro propuestas para la conjugación de la quercetina modificada estructuralmente con la superficie de las nanopartículas de sílice. Además, se realizó la síntesis de las nanopartículas de sílice, evaluándose sus características morfológicas, imágenes de microscopía y potencial Z. Entre los estudios realizados, se evaluó también la capacidad de adsorción de la quercetina sobre la superficie de las nanopartículas, obteniéndose como resultado un bajo porcentaje de adsorción.

De acuerdo a esto, se infiere que la unión covalente sería la mejor opción para la conjugación de este flavonoide con las nanopartículas de sílice, manteniendo intacta la estructura de la quercetina que ejerce la actividad antioxidante y así el sistema conjugado pueda exhibir potencialmente actividad fotoprotectora.

SUMMARY

"Synthetic strategy for the conjugation of quercetin in silica nanoparticles"

Silica is a promising material for the development of new nanomaterials, whose use may be of interest to several disciplines such as medicine and pharmaceutical sciences. The different types of silica nanoparticles have important characteristics for their use, being mechanically stable, chemically inert, and biocompatible, and can be used to incorporate drugs, biomolecules and antioxidants, among others, through adsorption, occlusion and / or covalent binding mechanisms.

Among the most studied molecules in terms of incorporation into silica nanoparticles, flavonoids stand out, bioactive compounds that, derived from their well-known antioxidant activity are attributed many properties: as antidiabetic, anticancer and anti-inflammatory, among others, contributing to health care. One of the most studied flavonoids is quercetin, which is commonly found in fruits and vegetables that are present in our diet, and which also has a high potential as an antioxidant.

In this work, we propose to modify the surface of silica nanoparticles through surface functionalization with quercetin, with the aim of obtaining an antioxidant nanomaterial that in the future can be used in pharmaceutical formulations with photoprotective activity. For this, synthetic strategies that will allow this conjugation were designed, also synthesis protocols were proposed for each step of these strategies.

These strategies include two proposals contemplating the structural modification of quercetin, and four different proposals for the conjugation of the structurally modified quercetin with the surface of the silica nanoparticles. In addition, the synthesis of silica nanoparticles was carried out, evaluating their morphological characteristics, images, and Z potential. Among the carried-out studies, quercetin adsorption on the surface of the nanoparticles was also evaluated, obtaining a low percentage of adsorption.

In summary, it is inferred that covalent bonding would be the best option for the conjugation of this flavonoid-silica nanoparticles, maintaining the quercetin structure that exerts antioxidant activity intact, and thus the conjugated system could potentially exhibit photoprotective activity.

1. INTRODUCCIÓN

La emergente disciplina de los nanomateriales farmacéuticos requiere de la aplicación de principios químicos y físicos involucrados en la ciencia de los materiales, a los desafíos en áreas como la administración de fármacos, la estructura y las propiedades de los polvos y la fabricación y procesamiento de sistemas de partículas para su uso en nuevas formulaciones [1–3]. Las nanopartículas (NP) se han utilizado para incorporar (por oclusión [4], adsorción no covalente [5] y unión covalente [6]) diferentes moléculas, tales como: fármacos [7], fotosensibilizadores [8], biomoléculas [9], antioxidantes [10] y otros [11] y liberarlos posteriormente. Las nanopartículas se han preparado con frecuencia utilizando biomoléculas (proteínas [12], lípidos [13, 14]), polímeros [15, 16], metales [17, 18] y óxidos como la sílice [19].

La sílice u óxido de silicio (SiO_2) es un material atractivo tanto para la química, la medicina como para las ciencias farmacéuticas, puesto que es un material ópticamente transparente, químicamente inerte, mecánicamente estable, biocompatible, y la síntesis de nanopartículas con este material es relativamente fácil [20, 21]. Además, para la funcionalización de la superficie de la sílice se han reportado una amplia variedad de procedimientos de recubrimiento [22-24].

Dentro de los procedimientos más utilizados se encuentra la preparación de nanopartículas de SiO_2 mesoporosas (MSNP) recubiertas con grupos amino (AMSNP). Este tipo de NP recubiertas se han utilizado para la adsorción, estabilización y separación de compuestos carboxílicos y fenólicos (por ejemplo, los flavonoides) mediante interacciones de enlaces de hidrógeno [25, 26].

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de origen natural, ampliamente distribuidos en el reino vegetal [27-29], encontrándose predominantemente en frutas cítricas [27], hierbas [27], hojas de té [28], legumbres [27], frutas y vegetales [29,30]. Se han identificado más de 4.000 de estos compuestos, los cuales son clasificados de acuerdo a su estructura química en flavonoles, flavonas, antocianinas, flavanonas, flavanos e isoflavonas, entre otros.

El organismo humano no es capaz de sintetizar flavonoides, por lo que deben ser consumidos en la dieta (frutas y vegetales) [30-33]. La estructura básica de estos compuestos deriva del anillo benzo- γ -pirano, específicamente, a un esqueleto hidrocarbonado del tipo $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ (difenilpirano),

compuesto de dos anillos bencénicos (A y B) ligados a través de un anillo pirano (C) [29,32,34] (**Figura 1**).

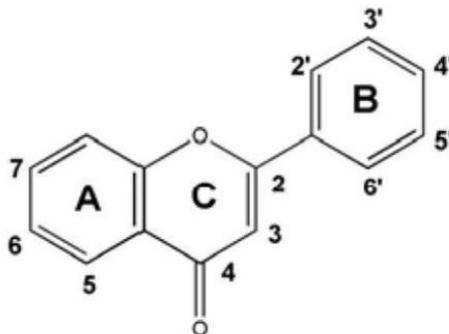


Figura 1. Estructura básica de un flavonoide.

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

En humanos, han demostrado tener efectos benéficos para la salud, siendo potenciales agentes antidiabéticos [28,35] con actividad sobre el sistema cardiovascular y protección de la actividad vascular y hepática [29]. Además, participan en mecanismos antiinflamatorios y analgésicos [36], siendo también importantes agentes anticancerosos [28,29,37]. Adicionalmente las isoflavonas, dada su estructura, pueden ser importantes agentes en el tratamiento de la osteoporosis y la terapia de reemplazo hormonal [38].

A nivel farmacológico estos compuestos destacan por sus propiedades antioxidantes, logrando inhibir procesos de peroxidación lipídica, presentando efectos antimutagénicos y capacidad de inhibir diversas enzimas [39]. Por esta razón, desempeñan un papel esencial en la protección contra el daño oxidativo producido por radicales libres y especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente).

En las plantas, flavonoles como morina, quercetina, y otros, actúan como enzimas inhibidoras, proporcionan color, textura y también son agentes con actividad reductora, actividad antifúngica y bactericida [29,40].

Quercetina

La quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona) (Figura 2) es un flavonol presente en frutas, vegetales y plantas como manzanas, cebollas y sauco [41]. Se han descrito varias propiedades beneficiosas para este compuesto, entre ellas anticancerígenas [42], antiinflamatorias [43] y de protección cardiovascular [44-46]. Además, la quercetina ha mostrado interesantes efectos protectores contra la radiación UV-B [47-48], por lo tanto, su incorporación en la formulación de potenciales medicamentos y/o cosméticos puede ser beneficiosa para la salud de la piel. Sin embargo, su aplicación tecnológica (formulaciones farmacéuticas y cosméticas) es limitada porque este compuesto polifenólico es sensible a varios factores ambientales como la luz, el oxígeno y el pH, entre otros [49].

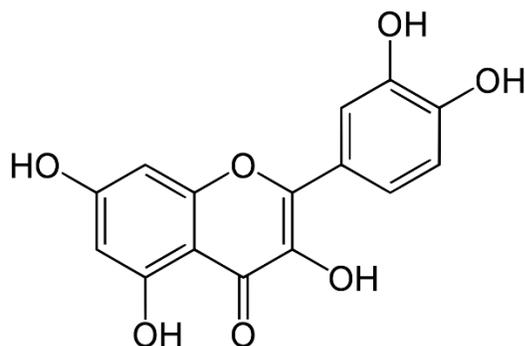


Figura 2. Estructura química de quercetina

Nanopartículas de sílice y su uso

La sílice (SiO_2) es un sistema interesante para investigar reacciones interfaciales ya que es fácilmente funcionalizable y como nanopartícula presenta un área específica elevada [50]. 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 [51]. 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 [52]. 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 posible control de su liberación [53].

Desde que Stöber y colaboradores [52], desarrollaron un método simple de obtención de nanopartículas de sílice, a través de la policondensación de tetraetilortosilicato (TEOS) 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 [52-56].

Nanopartículas de sílice como plataforma para el transporte de activos

Varios trabajos han mostrado la factibilidad de utilizar nanopartículas como sistemas de estudio para incluir moléculas antioxidantes. Parida y colaboradores [57,58], investigaron el comportamiento de adsorción de algunos pigmentos catiónicos sobre el gel de sílice con y sin modificación superficial. Los resultados muestran que las características de la superficie promueven una diferente orientación de los pigmentos y además reducen el área superficial debido a la modificación química. Por otra parte, Bardina y colaboradores [59], estudiaron las propiedades de adsorción sobre el gel de sílice antes y después de la modificación de su superficie con polietilenglicol (PEG).

Etienne y Walcarius [60], investigaron la reactividad química y estabilidad de las superficies de sílice funcionalizadas con grupos aminopropil en medio acuoso, determinando la importancia del pH para mantener la estabilidad del sistema. Parida y colaboradores [61], estudiaron la adsorción de moléculas orgánicas sobre superficies de sílice, la cual ya ha demostrado poder

actuar como base para la síntesis de polímeros de alto peso molecular y biomoléculas de importancia médica. Hassanien y Abou-El-Sherbini [62], sintetizaron y caracterizaron sílice porosa funcionalizada con morina, determinando la utilidad de este sistema, por ejemplo, en metodologías de preconcentración para la extracción de metales en aguas residuales.

Zhang y colaboradores [10] informaron respecto a la utilización de partículas magnéticas de hierro modificadas con sílice superficial para la adsorción de flavonoides desde extractos de raíces de *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Ambati y colaboradores [63], propusieron la utilización de nanopartículas de sílice como vehículo de la enzima catalasa, evaluando la incorporación, actividad antioxidante y cesión de estas enzimas en la nanopartícula. Cao y colaboradores [64] compararon la biodisponibilidad oral de silimarina formulada en nanopartículas porosas de sílice sin modificación superficial. También se han realizado estudios para la utilización de nanopartículas mesoporosas de sílice en medicina, para la entrega de fármacos y genes, debido a la unión que se da entre la sílice y el extremo de SiRNA [65-67].

Berlier y colaboradores [68] utilizaron NPs de sílice mesoporosa MCM -41 como vector para el uso del glucósido rutina en formulaciones tópicas, logrando sintetizar, caracterizar y funcionalizar la superficie con éxito, mediante grupos aminopropil; sin embargo, la actividad antioxidante de la rutina no se vio mejorada al ser incluida en este vehículo; es más, se vio disminuida cuando se incorpora en MCM-41 funcionalizada. Sapino y colaboradores [69] utilizaron nanopartículas mesoporosas de sílice como nanotransportadores tópicos para la entrega de quercetina; siendo estos resultados prometedores para un futuro sistema de entrega de activos en formulaciones tópicas.

Los estudios informados respecto a la inmovilización de polifenoles en nanopartículas de sílice con fines farmacéuticos y/o cosméticos siguen siendo limitados. La importancia de incorporar polifenoles a nanopartículas radica principalmente en la baja hidrofiliidad de éstos, además de la exposición a factores externos, que generan inestabilidad química, cuando se administran.

2. DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA

En base a los antecedentes, este trabajo propone modificar la superficie de nanopartículas de sílice mediante la funcionalización superficial con quercetina, con el objetivo de obtener un nanomaterial antioxidante y que en el futuro pueda ser utilizado en formulaciones farmacéuticas con actividad fotoprotectora. Se proponen estrategias sintéticas para la obtención de derivados de quercetina que permitan la unión covalente de este polifenol a la superficie de la sílice. Además, se comparará esta estrategia con un nanomaterial de sílice de iguales características, pero en el cual, la quercetina ha sido adsorbida a su superficie.

Para la modificación del flavonoide se proponen dos estrategias sintéticas (Figuras 3 y 4), las cuales serán monitoreadas mediante cromatografía de placa fina TLC, y también por espectroscopia, tanto RMN- H^1 como C^{13} y espectroscopia infrarroja.

Ambas propuestas siguen pasos similares de síntesis, esto es, protección, funcionalización y desprotección de los grupos hidroxilos. La primera propuesta, como se observa en el esquema de la Figura 3, consiste en la protección de los hidroxilos (OH) presentes en la estructura de la de quercetina, a excepción del que se encuentra en el carbono 5 del anillo A (Figura 1), luego la funcionalización con un grupo silil utilizando para ello 3-(trietoxisilil)propil isocianato, y finalmente, la desprotección de los hidroxilos protegidos anteriormente, obteniéndose de esta forma, una quercetina silil funcionalizada.

La segunda ruta sintética, incluye también la protección de los hidroxilos (OH) de la quercetina, excepto el OH ya mencionado anteriormente (hidroxilo en C5 de anillo A). Luego, se propone realizar una reacción de Williamson sobre el hidroxilo que se encuentra libre, para incluir una cadena metilénica de largo variable con un ácido carboxílico terminal, obteniendo un derivado ácido de quercetina, seguido de la desprotección de la molécula para que posteriormente reaccione con el (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES). De ser posible la obtención de la molécula modificada, el siguiente paso es la funcionalización a la nanopartícula. Además, proponemos utilizar en la reacción de Williamson, compuestos de distinto largo de cadena (por ejemplo, 4, 6 u 11 carbonos) con lo cual se podría espaciar la quercetina de la superficie de la nanopartícula, permitiendo establecer cuál es la distancia adecuada para maximizar la capacidad antioxidante del nanomaterial desarrollado.

3. HIPÓTESIS

El desarrollo de estrategias sintéticas permitirá funcionalizar quercetina para su conjugación en nanopartículas de sílice, estabilizando este flavonoide, pudiendo generar en el futuro un nanosistema que, dadas sus propiedades antioxidantes, pueda ser utilizado en formulaciones fotoprotectoras.

4. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar estrategias de síntesis para la conjugación de quercetina en nanopartículas de sílice.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Proponer rutas sintéticas para la funcionalización de quercetina con silanos.
- ✓ Proponer metodologías experimentales para las rutas sintéticas.
- ✓ Identificar espectroscópicamente las moléculas sintetizadas.
- ✓ Sintetizar nanopartículas de sílice *core-shell* para la conjugación y adsorción de quercetina.
- ✓ Caracterizar las nanopartículas sintetizadas (con y sin quercetina) en función del tamaño y su distribución, potencial zeta e imagen.

5. MATERIALES

5.1. Reactivos

Quercetina dihidrato (QUER, $\geq 95\%$) (Sigma-Aldrich), Tetraetilortosilicato (TEOS, 98%) (Sigma Aldrich), (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES, $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich), Bromuro de bencilo (Sigma-Aldrich), carbonato de potasio (Sigma-Aldrich), carbonato de cesio (Sigma-Aldrich), alcohol bencílico (Sigma-Aldrich), N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (Sigma-Aldrich), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Sigma-Aldrich) fueron utilizados tal cual se recibieron, sin tratamiento previo. El ácido 6-bromohexanoico (Sigma-Aldrich) y el ácido 4-bromobutírico (Sigma-Aldrich) debieron protegerse para ser utilizados en las reacciones. El ácido clorhídrico fumante (HCl, 37%), trietilamina (TEA, 99 %), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 97 %) y el hidróxido de amonio (NH_4OH , 28-30%) fueron comprados a J.T. Baker y utilizados tal como se recibieron.

5.2. Solventes

Los solventes empleados fueron: etanol grado HPLC, agua Milli-Q, DMF, THF, cloroformo, acetato de etilo, bencina de petróleo y agua destilada. Todos se usaron sin purificación, exceptuando el agua, que se purificó mediante un Sistema Milli-Q Plus Millipore, para obtener agua bidestilada.

6. INSTRUMENTACIÓN

6.1. Tamaño de partícula y potencial zeta

Las medidas de tamaño y potencial zeta de las nanopartículas se obtuvieron mediante el analizador Zetasizer Nano Z controlado por el programa Zetasizer software (Malvern, Reino Unido).

6.2. Microscopia electrónica de barrido

Las imágenes de las nanopartículas fueron obtenidas con un Microscopio Electrónico de Barrido FEI™ Inspect modelo F50, con un voltaje de aceleración de 10.000 kV.

6.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cuantificación de quercetina 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, utilizando una columna Chromolith RP-18e de 100 x 4,6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5µm.

6.4. Centrífuga

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

6.5. Resonancia magnética nuclear de protones, carbono 13 y Dept

Todos los espectros se obtuvieron de un equipo Bruker modelo ADX-300. Estos espectros fueron analizados mediante el programa de análisis de espectros MestreNova. Los espectros están referenciados en base a CD₃Cl.

7. METODOLOGÍA

En una primera etapa se planificaron las posibles rutas sintéticas para el logro del objetivo propuesto en este trabajo. De esta forma, se plantearon dos esquemas sintéticos para la funcionalización de quercetina y otros para la posterior unión con las nanopartículas de sílice.

7.1 Esquemas de las rutas sintéticas y sus protocolos de síntesis.

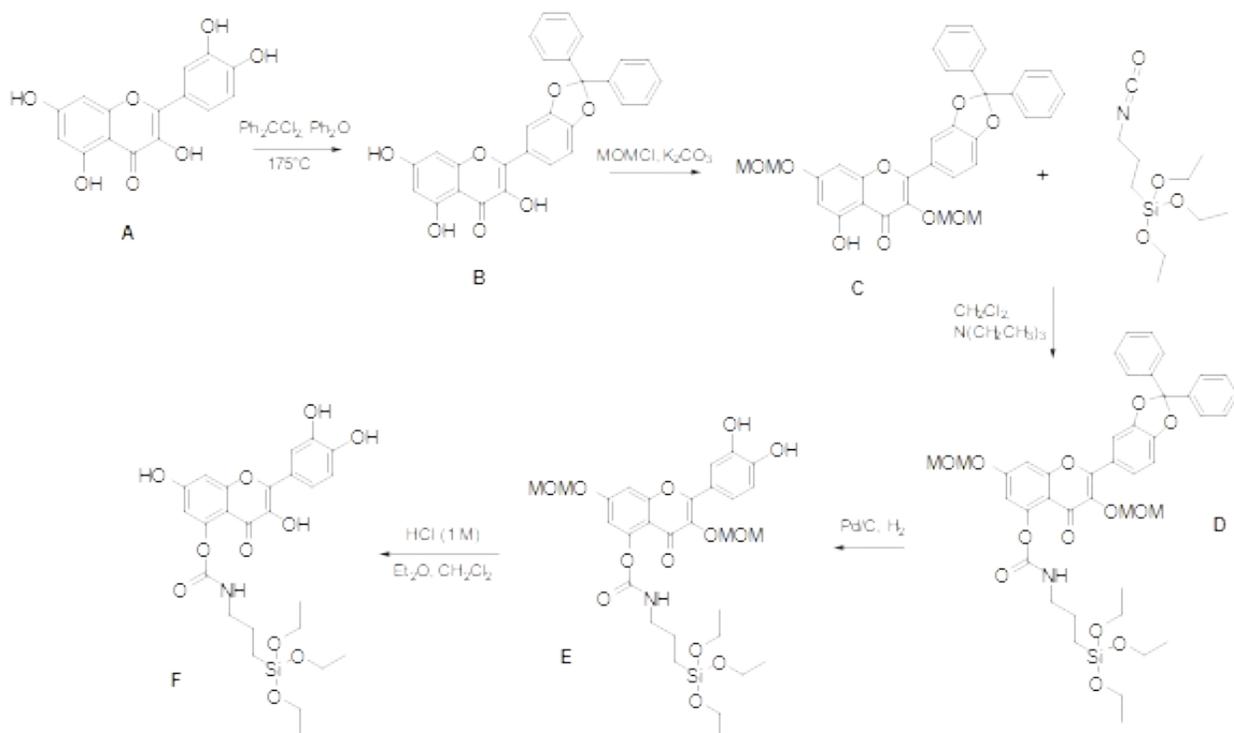


Figura 3. Esquema general de la primera propuesta de ruta sintética.

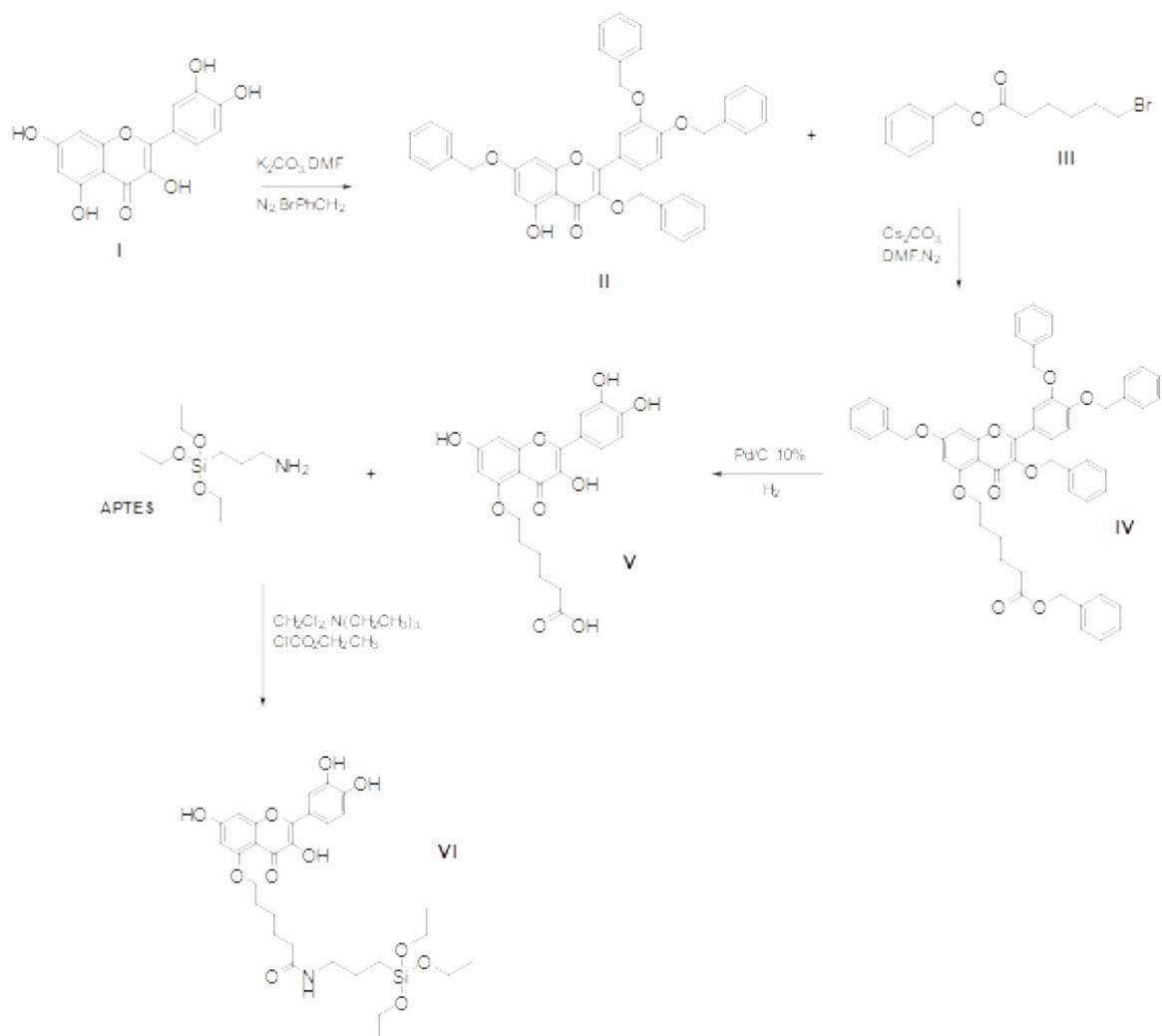


Figura 4. Esquema general de la segunda propuesta de ruta sintética.

7.2 Propuestas de protocolos de síntesis de las estrategias presentadas

7.2.1 Protocolos de síntesis para esquema de la primera propuesta (Figura 3)

7.2.1.1. Síntesis de 2-(2,2- difenilbenzo[d][1,3] dioxol-5- il) -3,5,7- trihidroxi-4*H*-cromen-4-ona. (B) [70]

En un balón se mezcla 302 mg de quercetina (1 mmol) y 20 ml de difenil éter. A esta mezcla se agregan 354 mg de diclorodifenilmetano (1,5 mmol) y se calienta a 175°C por 30 minutos. Se utiliza agitación magnética para favorecer la disolución.

La mezcla es enfriada a temperatura ambiente y se agrega 50 ml de éter de petróleo para obtener un compuesto sólido.

Luego el compuesto sólido es filtrado y purificado utilizando columna cromatográfica (25% acetato de etilo en éter de petróleo) para obtener el compuesto **B** como un sólido amarillo.

7.2.1.2. Síntesis de 2-(2,2- difenilbenzo[d][1,3] dioxol-5- il)-5- hidroxí -3,7-bis(metoximetoxi)- 4*H*-cromen-4-ona. (C) [70]

En un balón se agrega 1,28 ml de clorometil metil éter (16,84 mmol) a una mezcla que contiene 1,96 g del compuesto **B** (4,21 mmol) y 2,45 g de K₂CO₃ (17,68 mmol) en acetona seca a temperatura ambiente. Se utiliza agitación magnética para favorecer la disolución.

La mezcla de reacción se somete a reflujo suave durante 6 horas.

Luego de enfriar a temperatura ambiente, el producto de reacción se filtra.

El solvente es removido por destilación a presión reducida, seguido de la purificación del residuo en una columna cromatográfica de sílica gel (20% de acetato de etilo en éter de petróleo) obteniendo el compuesto **C** como un sólido amarillo.

7.2.1.3. Síntesis de 2-(2,2,-difenilbenzo[d][1,3] dioxol-5-il)-3,7-bis(metoximetoxi)-4-oxo-4H-cromen-5-il (3-(trietoxisilil)propil)carbamato. (D) [71]

A una solución de 1,5 ml del compuesto **C** (19.75 mmol) y 2,35 ml de trietilamina seca (17,85 mmol) en 10 ml de diclorometano, enfriada en un baño de hielo, se agrega gota a gota una solución de 4,45 ml de 3-(trietoxisilil) propil isocianato (17,85 mmol) en 5 ml de diclorometano. Luego de agitación continua durante 24 horas a temperatura ambiente, la solución resultante se destila a presión reducida, para evaporar el solvente obteniendo el compuesto **D**.

7.2.1.4. Síntesis de 2- (3,4- dihidrofenil)-3,7-bis(metoximetoxi)-4-oxo-4H-cromen-5-il (3-trietoxisilil) propil) carbamato. (E) [70]

A una solución de 100 mg del compuesto **D** (0,18 mmol) disuelto en etanol (10 ml) y THF (10 ml) se agrega Pd/C (10%, 2mg) ayudado de agitación vigorosa.

Luego, la atmósfera del recipiente es cambiada por hidrógeno.

Después de 8 horas, la mezcla de reacción se filtra a través de celite y se concentra el filtrado.

El crudo de reacción se pasa por una columna cromatográfica de sílica gel (50% acetato de etilo en éter de petróleo) para obtener el producto purificado como un sólido amarillo.

7.2.1.5. Síntesis de 2-(3,4,-dihidroifenil)- 3,7- dihidroxi- 4-oxo- 4H-cromen-5-il (3-(trietoxisilil)propil) carbamato (F). [70]

Se agrega ácido clorhídrico (1 ml) a una solución que contiene 404 mg del compuesto **E** (1 mmol) en una mezcla de diclorometano (5 ml) y éter (5 ml) a una temperatura de 0°C. La solución se mantiene en agitación constante.

La mezcla de reacción se deja entibiar a temperatura ambiente y continúa con agitación por 6 horas.

Luego la mezcla de reacción se diluye con una gran cantidad de acetato de etilo y se lava con agua y solución de NaCl.

La fase orgánica se deja secar con MgSO₄, se filtra, se concentra y luego el crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica (50% acetato de etilo en éter de petróleo) obteniéndose el producto final.

7.2.2 Protocolos de síntesis para esquema de la segunda propuesta (Figura 4).

7.2.2.1. Síntesis de 3,7-bis(benciloxi)-2-(3,4-(benciloxi) fenil)-5-hidroxi-4H-cromen-4-ona (II). [72]

En un balón de 250 ml se disuelve 1g de quercetina I (3,3 mmol) y 1,89 g de K_2CO_3 (13,6 mmol) en 20 ml de DMF a una temperatura de 0°C. Se utiliza agitación magnética para favorecer la disolución.

Luego de agitar por 5 minutos bajo atmósfera de nitrógeno, se agrega 1,6 ml de bromuro de bencilo (13,6 mmol) y se continúa con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente.

A la solución resultante se le agrega agua destilada, luego se separan las fases con acetato de etilo y se lava la fase orgánica con agua y solución saturada de NaCl.

La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se destila el solvente a sequedad. El residuo se purifica mediante columna cromatográfica de sílica gel utilizando cloroformo como fase móvil.

El producto obtenido corresponde a un polvo amarillo.

7.2.2.2. Síntesis de 6-bromohexanoato de bencilo (III) [73]

En un balón se agrega 4,33g de ácido 6-bromohexanoico (22,2 mmol) y 0,32 g de DMAP (2,6 mmol) en THF (40 ml) formándose una solución ligeramente opalescente, la cual se agita (con agitador magnético) y se enfría a 0°C. Posteriormente se agrega a la mezcla 1,9 ml de alcohol bencilico (18,5 mmol) seguido de 3,5 ml de DIC (22,2 mmol) en THF (10 ml) bajo atmósfera de nitrógeno.

Luego de 30 minutos a 0°C, se remueve el baño de hielo y la reacción se entibia a temperatura ambiente (15 minutos aprox.) continuando con agitación por 4 horas.

La reacción se detiene mediante la adición de agua destilada (10 ml) y luego se remueve el solvente.

El residuo ligeramente aceitoso y los cristales de color blancos son llevados a una mezcla de acetato de etilo y agua (1:1) y luego se realizan sucesivos lavados con una solución de bicarbonato de sodio.

Una vez evaporado el solvente de la fase orgánica se obtiene un residuo aceitoso, el cual se purifica mediante columna cromatográfica de sílica gel (acetato de etilo-hexano 1:9) obteniendo un aceite incoloro.

7.2.2.3. Síntesis de 4-bromobutanoato de bencilo (III*) [73]

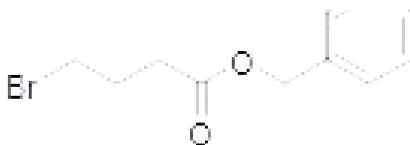


Figura 5. Estructura química 4-bromobutanoato de bencilo.

En un balón se agrega 3,73 g de ácido 4-bromobutírico (22,2 mmol) y 0,32 g de DMAP (2,6 mmol) disueltos en THF (40 ml), formándose una solución de color rosado claro y opalescente, la cual se agita y enfría a 0°C. Posteriormente se agrega 1,9 ml alcohol bencílico (18,5 mmol) seguido de 3,5 ml de DIC en THF (10 ml) bajo atmósfera de nitrógeno.

Luego de 30 minutos a 0°C, se remueve el baño de hielo y la reacción se entibia a temperatura ambiente (15 minutos aprox.) continuando con agitación por 4 horas.

La reacción se detiene mediante la adición de agua destilada (10 ml) y luego se remueve el solvente.

El residuo ligeramente aceitoso y los cristales blancos/rosados son llevados a una mezcla de acetato de etilo y agua (1:1) y se realizan sucesivos lavados con una solución de bicarbonato de sodio. Se evapora el solvente de la fase orgánica obteniéndose un residuo aceitoso ligeramente rosado. El compuesto se purifica mediante columna cromatográfica de sílica gel (acetato de etilo-hexano 1:9) obteniendo un aceite ligeramente rosado (casi incoloro).

7.2.2.4. Síntesis de Bencil 6-((3,7-bis(benciloxi)-2-(3,4-(bis(benciloxi)fenil) -4-oxo-4-cromen-5-il)oxi) hexanoato. (IV). [72]

En un balón de 250 ml se disuelve 1,2 g del compuesto **II** (1,8 mmol) y 3,52 g de Cs₂CO₃ (10,8 mmol) en 20 ml de DMF a temperatura ambiente.

Luego de agitar por 30 minutos con agitación magnética, bajo atmósfera de nitrógeno, se agrega 2,6 g del compuesto **III** (9,11 mmol) a la mezcla de reacción y se continúa agitando por 24 horas. A la solución resultante se le agrega agua destilada y luego acetato de etilo, lavando la fase orgánica con agua destilada y solución de cloruro de sodio.

La fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidro y concentrada mediante destilación a presión reducida.

El residuo se purifica por columna cromatográfica de sílica gel utilizando cloroformo como fase móvil, obteniendo el compuesto deseado como un sólido de color damasco/amarillo pálido.

7.2.2.5. Síntesis del ácido 6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-3,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-croman-5-il)oxi)hexanoico (V). [72]

A una solución del compuesto **IV** (0,11 mmol) se le agrega 10% Pd/C (40 wt%) agitándose por 6 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno.

La solución resultante es filtrada a través de celite y concentrada al vacío.

EL residuo se purifica usando columna cromatográfica de sílica gel con cloroformo/metanol como fase móvil.

7.2.2.6. Síntesis de 6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-3,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-croman-5-il)oxi)-*N*-(3-(trietoxisilil)propil)hexanamida. (VI). [74]

En un balón de fondo redondo de 3 bocas se agrega 0,05 mmol del compuesto **V**, 50 ml de diclorometano y 0,1 mol de trietilamina. La mezcla de reacción se pone en baño agua-hielo con agitación magnética, luego se agrega 0,1 mol de etil clorofornato gota a gota y se agita por 2 horas a temperatura ambiente.

Luego se agrega 0,1 mol de APTES gota a gota, manteniendo la mezcla de reacción en baño agua-hielo con agitación, posteriormente la mezcla continúa agitándose por 6 a 8 horas a temperatura ambiente.

Los solventes son removidos a presión reducida.

El residuo obtenido se deposita en 100 ml de agua muy fría y se agita por 10 minutos.

El sólido obtenido luego de filtrar se recristaliza en agua para obtener el compuesto **VI**.

7.3 Síntesis de nanopartículas de sílice con capa mesoporosa, modificada superficialmente con grupo amino.

La síntesis de nanopartículas de sílice sólidas se realizó basándose en la reacción de Stöber [52-56]. Para esto, en un balón de fondo redondo de 250 ml se agregan, 88 ml de etanol y 6 ml de agua Milli-Q, los cuales se mantuvieron en agitación por 5 minutos, luego 2,6 ml de hidróxido de amonio fueron agregados y se continuó agitando por 15 minutos. Luego se agregaron 3,4 ml TEOS gota a gota 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 y agua intercaladamente, centrifugando luego de cada lavado y suspendiendo las nanopartículas en el solvente que corresponde al siguiente lavado. Finalmente, después del último lavado con etanol, se secaron y almacenaron para continuar la síntesis.

Para formar la capa mesoporosa, en un balón de 250 ml, se disolvieron 4 g de CTAB en 50 ml de agua Milli-Q. La mezcla se calienta a baño maría a 80°C y se agita por 1 hora, luego se agregaron 60 µl de TEA y se mantuvo la agitación hasta total disolución (1 hora

aproximadamente). Posteriormente se agregaron 840 mg de las nanopartículas y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Luego la suspensión se calentó hasta 80°C, se adicionaron 400 µl de TEOS gota a gota y se agitó durante 1 hora y 30 minutos a 80°C. Finalmente, las nanopartículas obtenidas se centrifugaron y fueron suspendidas en etanol (100 ml) en un balón con agitación magnética, se agregaron 10 ml de HCl al 37% y se dejó en agitación durante una noche en condiciones de reflujo, 80°C por unas horas (3 a 4 horas). Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las nanopartículas y se lavaron varias veces con etanol, para eliminar cualquier rastro de HCl.

La funcionalización de las nanopartículas con el grupo aminopropil se realizó suspendiendo las nanopartículas en 100 ml de etanol utilizando un matraz de fondo redondo y agregando 2 ml de APTES. Se mantuvo en agitación durante 4 horas a 40°C y luego durante una noche solo con agitación a temperatura ambiente. Las nanopartículas fueron lavadas con sucesivos volúmenes de etanol y luego del último lavado suspendidas en 63 ml de etanol.

Se tomó una alícuota de 500 µl de la suspensión anterior, agregándola a un frasco de masa conocida. Esta se dejó secar en una placa calefactora, y luego por diferencia de masas se obtuvo la cantidad de nanopartículas en ese volumen, 9 mg, y se extrapola a los 63 ml, obteniendo 1134 mg, de nanopartículas. Para adsorber quercetina sobre las nanopartículas, guiándose por la proporción 100 mg de nanopartículas por 20 mg de quercetina, se calcularon 226 mg de quercetina, los cuales se agregaron junto a las nanopartículas a un balón, suspendiéndolas en un volumen de 75 ml con etanol, agitando la suspensión durante una noche. Luego se centrifuga y se guarda el sobrenadante de volumen conocido, se realiza un segundo lavado con etanol (40 ml) y también se guarda el sobrenadante, las nanopartículas se dejan secar para experiencias posteriores.

7.4. Adsorción y evaluación de quercetina en nanopartículas.

Los experimentos de adsorción realizaron mediante el modo batch, para obtener la eficiencia de incorporación (EE%) y eficiencia de carga (DL%). Previamente en el laboratorio, se establecieron las condiciones óptimas para este tipo de experimentos. Se preparó una solución stock de 2 mg ml⁻¹ de quercetina, luego se tomó un volumen requerido y se añadieron a 30 ml de una suspensión de nanopartículas en un frasco de vidrio (50 ml). Después de la adición de la alícuota de quercetina, la suspensión se mantuvo bajo agitación hasta alcanzar el equilibrio y subsecuentemente se centrifugaron a 8000 rpm por 20 minutos, luego se extrajo una alícuota de sobrenadante para su análisis por HPLC con el fin de determinar la cantidad de quercetina no adsorbida.

La eficiencia de encapsulación (%EE) y el porcentaje de carga de fármaco (%DL), se determinan utilizando las siguientes fórmulas:

$$\%EE = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100$$

$$\%DL = \frac{C_i - C_f}{Peso\ total} * 100$$

Donde C_i y C_f son las cantidades de compuesto inicialmente agregadas en las nanopartículas desarrolladas y la cantidad de compuesto no encapsulado determinada por el método HPLC, respectivamente. El peso total es la cantidad total de nanopartículas y compuesto en la preparación final.

7.5. Caracterización de nanopartículas.

La caracterización de las nanopartículas se realizó midiendo el tamaño, la distribución de tamaño y el potencial Zeta. También fueron caracterizadas utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para realizar las mediciones del tamaño, distribución y potencial zeta en el equipo Zetasizer, las muestras se diluyeron veinte veces en etanol, agua y soluciones tamponadas a diferentes pH. 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. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Funcionalización selectiva de quercetina.

Quercetina es un flavonoide que ha sido ampliamente estudiado, dadas sus propiedades terapéuticas derivadas de su significativa capacidad antioxidante. Esta capacidad antioxidante es atribuible a los grupos hidroxilo que presenta en su estructura, principalmente al catecol del anillo B (Figura 1 y 2), al hidroxilo en el carbono 3 del anillo C (Figura 1 y 2) y a la conjugación de la cetona del carbono 4 con el doble enlace presente en ese mismo anillo, por lo que las estrategias propuestas en estudio para unir en forma covalente este polifenol a la superficie de una nanopartícula de sílice, debe considerar mantener la mayor cantidad de esos grupos hidroxilo libres para no modificar o alterar en forma significativa la capacidad antioxidante de este compuesto [75-76].

En literatura se ha evidenciado que las modificaciones generalmente se realizan en los hidroxilos más disponibles como, por ejemplo, los del catecol del anillo B [70,76-79], lo que en teoría modificaría la capacidad antioxidante del flavonoide (aumentándola o disminuyéndola, dependiendo de si se incorporan grupos donadores o aceptores de electrones). Por ello se determinó que la funcionalización debía realizarse en el OH del carbono 5 del anillo A (Figura 1) evitando la formación del puente de hidrógeno formado con la cetona, dejando disponibles estos sistemas para que ejerzan su actividad antioxidante. Con estas consideraciones nuestra propuesta es proteger todos los grupos hidroxilos a excepción del correspondiente al carbono 5 del anillo A.

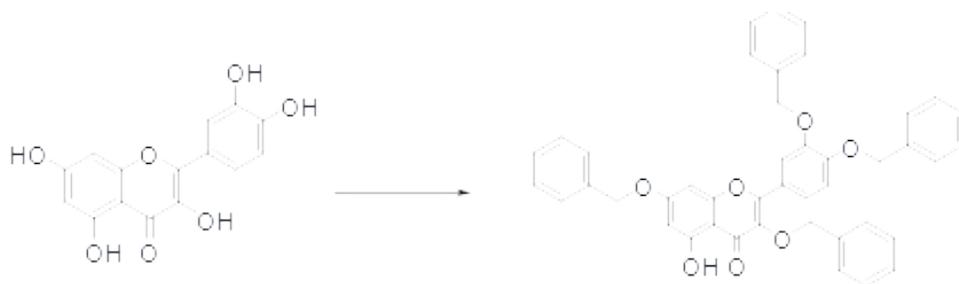


Figura 6. Cambio estructural de quercetina debido a la reacción con bromuro de bencilo.

De acuerdo a las estrategias sintéticas propuestas, solamente se pudo realizar en forma experimental la síntesis de la segunda propuesta, dada la dificultad en el traslado desde el extranjero de uno de los reactivos claves en la funcionalización de la quercetina de la primera estrategia, 3-(trietoxisilil)propil isocianato. Por esta razón, se escogió trabajar con la segunda opción, la cual parecía ser más sencilla, pero experimentalmente complicada de ejecutar.

Esta protección se realizó basándose principalmente en el estudio de Kato y colaboradores [72], en el cual realizan protecciones de los hidroxilos para obtener finalmente derivados glicósidos de quercetina, el rendimiento de esta protección es de 65%, lo que en este caso resulta ser un poco menor, alrededor de 50-60 %, ya que la reacción fue realizada en distintas ocasiones para así contar con suficiente compuesto. Según Kajjout y Rolando [79] la reactividad nucleofílica de los hidroxilos de la quercetina obedece a la siguiente secuencia: 3>>7>>5 para los anillos C y A (posición 3 y posiciones 5 y 7 respectivamente) y 4' >> 3' para el anillo B dando acceso específico a los 5 grupos fenólicos. De acuerdo con esto y con las cantidades estequiométricas utilizadas, se puede predecir que la protección será selectiva (Figura 6). De esta reacción se obtuvo como producto un polvo amarillo, que luego de su purificación en columna de sílica gel utilizando cloroformo como fase móvil, fue monitoreado cualitativamente mediante placa TLC al compararlo con el precursor, quercetina, y el grupo protector, bromuro de bencilo, observando su separación y purificación por este medio. Se analizó por espectroscopia de resonancia magnética nuclear, carbono 13 y DEPT, obteniéndose los siguientes espectros en los cuales se evidencia la protección esperada (Figuras 7 y 8).

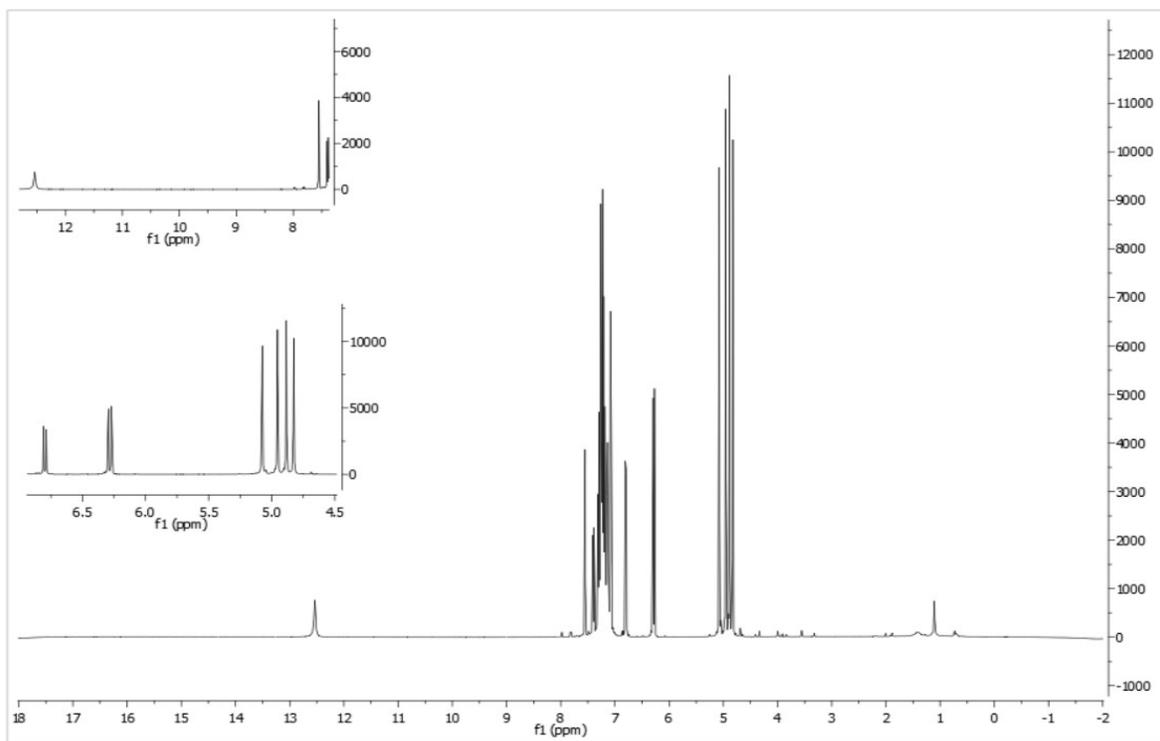
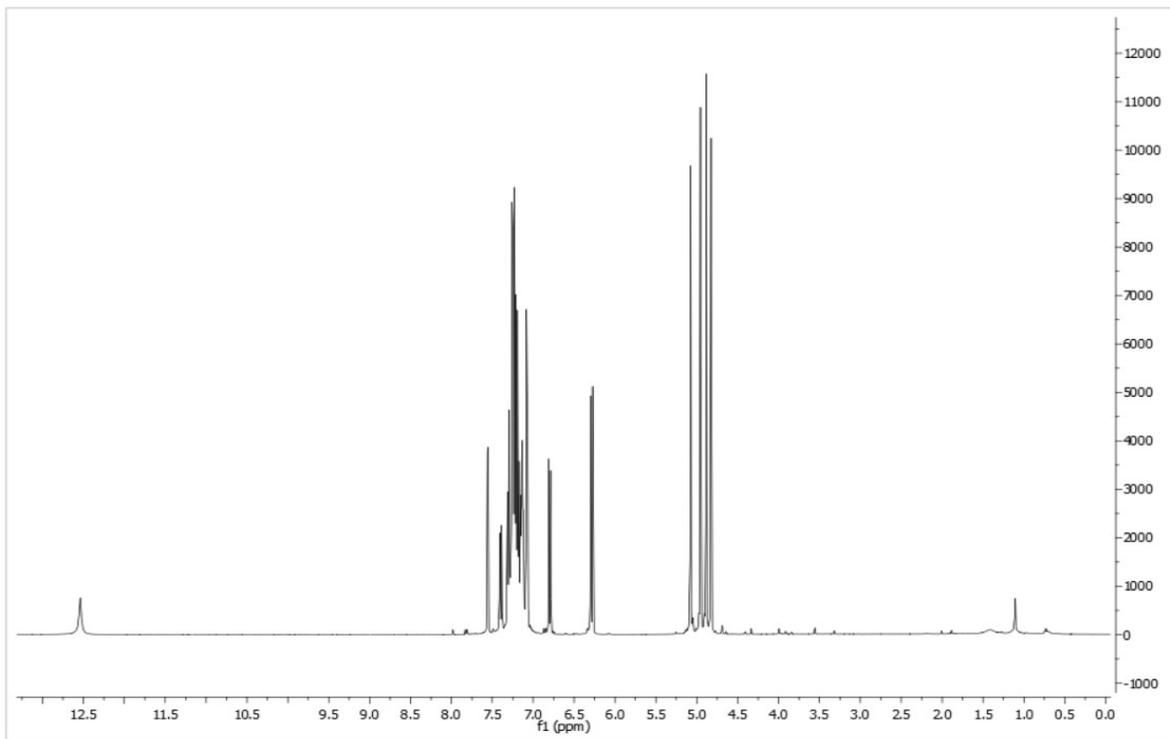


Figura 7. Espectro ^1H NMR del compuesto II.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 12.54 ppm (s, 1H), 7.56 ppm (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.40 ppm (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, 1H), 7.33 – 7.03 ppm (m, 20H), 6.80 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.28 ppm (dd, $J = 10.7, 2.2$ Hz, 2H), 5.08 ppm (s, 2H), 4.96 ppm (s, 2H), 4.89 ppm (s, 2H), 4.83 ppm (s, 2H).

En la Figura 7, se evidencia la protección de los hidroxilos, dado que, la única señal en el espectro relacionada a un hidrógeno unido a oxígeno es la que corresponde al OH del carbono 5 del anillo A en 12,54 ppm. Las demás señales, como se puede observar en la lectura del espectro, corresponden a los CH de la estructura básica de la quercetina y a los CH alifáticos y aromáticos correspondientes al grupo protector.

Las señales observadas para el producto corresponden a las reportadas para este compuesto en la literatura. [72]

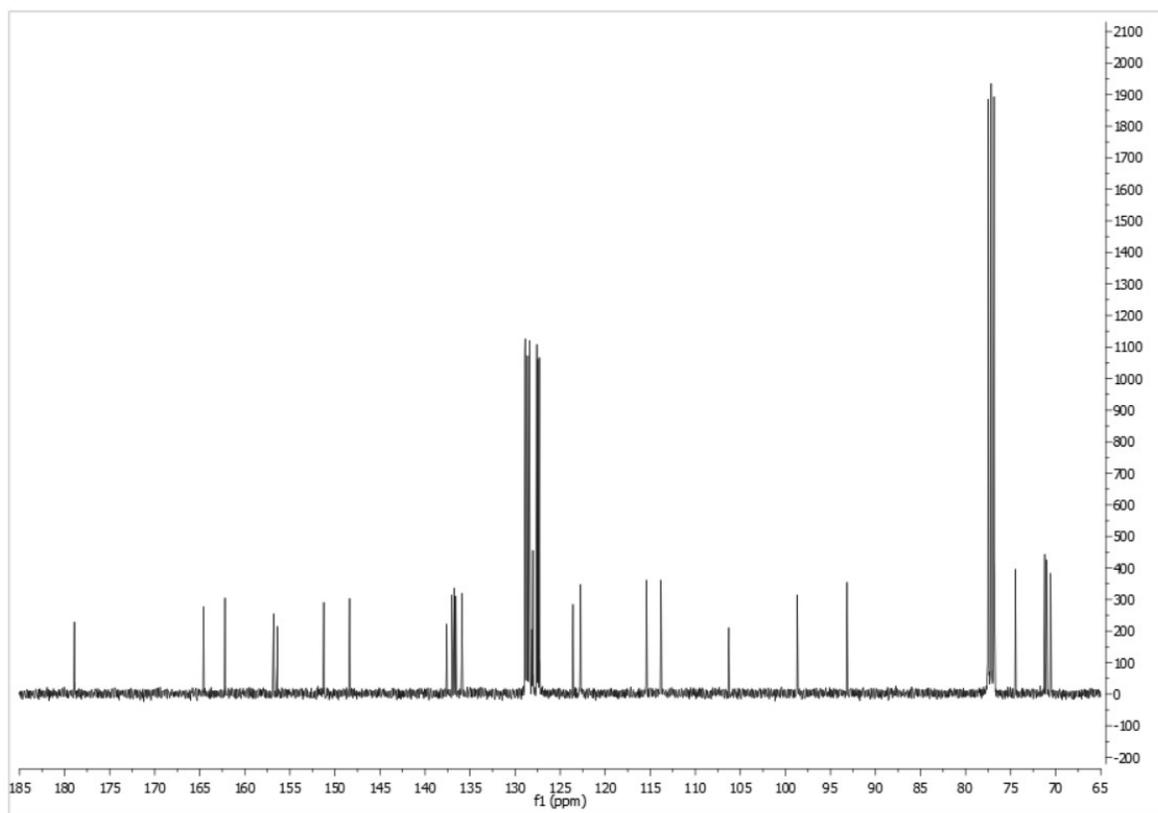


Figura 8. Espectro ^{13}C del compuesto **II**.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 178.91 (s), 164.57 (s), 162.20 (s), 156.80 (s), 156.40 (s), 151.23 (s), 148.36 (s), 137.59 (s), 137.04 (s), 136.78 (s), 136.58 (s), 135.92 (s), 128.89 (s), 128.73 (s), 128.62 (s), 128.43 (s), 128.14 (s), 128.02 (s), 127.59 (s), 127.47 (s), 127.30 (s), 123.57 (s), 122.73 (s), 115.42 (s), 113.80 (s), 106.28 (s), 98.68 (s), 93.16 (s), 77.48 (s), 77.16 (s), 76.84 (s), 74.46 (s), 71.21 (s), 70.98 (s), 70.55 (s).

Mediante este espectro y DEPT se puede corroborar la estructura química de la molécula presentada respecto a los carbonos.

Al analizar los tres espectros se deduce que es la molécula correspondiente al compuesto **II**.

8.2. Protección de haloácidos.

Se debe realizar con anterioridad la protección del ácido carboxílico del ácido 6-bromohexanoico y del ácido 4-bromobutírico, para posteriormente ser utilizados en la síntesis de Williamson, la cual es necesaria para formar el compuesto **IV**, ya que, al ser utilizados sin estar protegidos, la reacción ácido-base con el carbonato predominaba por sobre la reacción de sustitución. La Figura 9 muestra el espectro correspondiente al 6-bromohexanoato de bencilo. Para el otro ácido, se utilizó el mismo protocolo de reacción para formar el 4-bromobutanoato de bencilo y solo se corroboró por placa TLC.

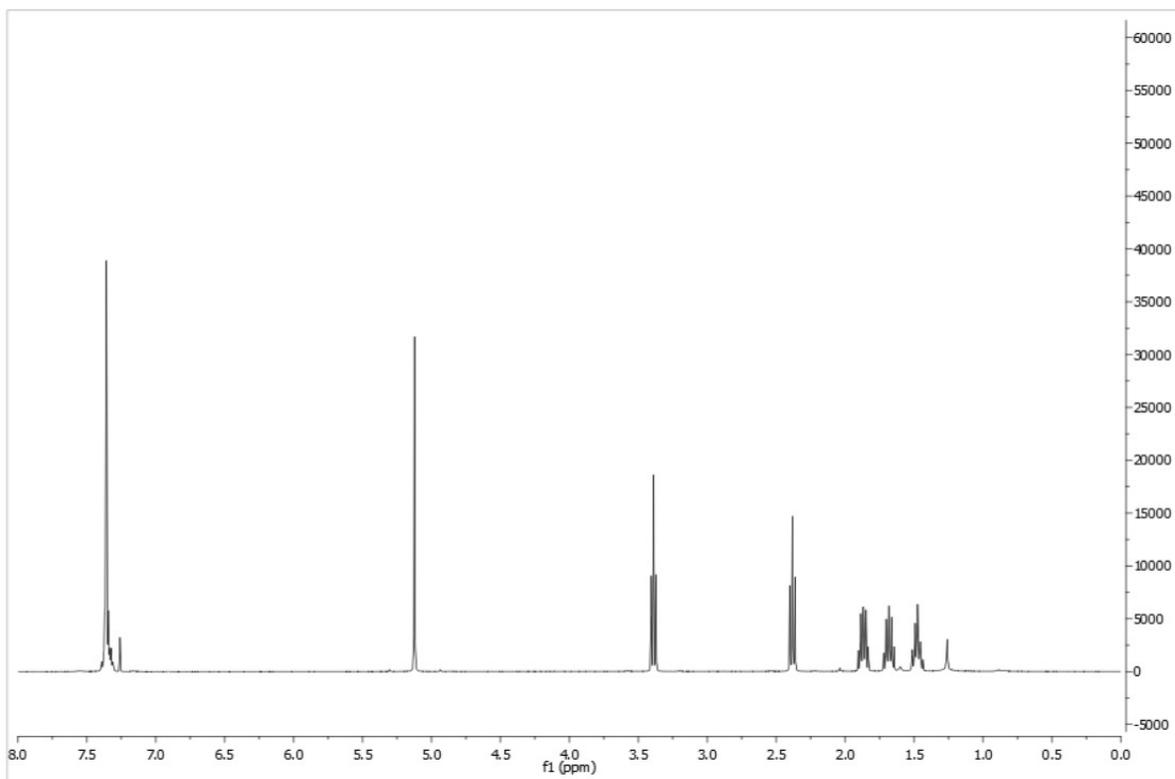


Figura 9. Espectro ^1H NMR del compuesto **III**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.43 – 7.29 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 3.39 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.91 – 1.83 (m, 2H), 1.68 (dt, $J = 20.6, 7.5$ Hz, 2H), 1.47 (tt, $J = 9.9, 6.3$ Hz, 2H).

Al observar el espectro de la Figura 9, se puede evidenciar la protección del ácido 6-bromohexanoico debido a la ausencia de la señal característica de los ácidos carboxílicos, pero si está presente la señal del CH_2 y de los hidrógenos aromáticos del benceno correspondiente al grupo protector. De acuerdo a lo planteado, el análisis de las placas TLC muestra diferencias con los precursores. El compuesto obtenido corresponde a uno de tipo aceitoso incoloro.

Este mismo protocolo de síntesis puede también utilizarse para la protección de haloácidos con distintos largos de cadena, los cuales se proponen utilizar con la finalidad de estudiar si el largo de cadena puede influir en la disposición de la quercetina en la superficie de la nanopartícula y en el efecto antioxidante que puede tener frente a los ROS [80] generados por la acción de los rayos UV en la piel [81] [82] [83], dado que al existir distintos largos de cadena en una misma nanopartícula o tener varias nanopartículas cada una con un largo de cadena en particular, se puede tener “barreras” en distintos niveles contra las especies reactivas de oxígeno y/o contra la radiación UV directamente.

8.3. Reacción de Williamson.

La reacción de Williamson es complicada de realizar en este caso, debido a que debe abstraerse el protón que participa en la formación de un puente de hidrogeno con el carbonilo presente en el anillo C de la estructura de la quercetina. Se realizó esta etapa utilizando inicialmente NaH como base. En la Figura 10 se muestra el espectro correspondiente al producto de esta reacción, observándose que la muestra analizada estaba impura debido a las señales presentes. Luego de varias pruebas experimentales con distintas bases y distintas cantidades de equivalentes tanto de ácido como de base usados, finalmente se llegó a la utilización de carbonato de cesio como base, comprobándose la purificación del compuesto solo por placa TLC (el espectro quedó pendiente a pesar de haberse enviado la muestra debido a las circunstancias actuales). De acuerdo con el estudio de Kato y colaboradores [72] se realizó una metilación en el hidroxilo del carbono 5 después de proteger los demás hidroxilos de la quercetina. Utilizando este protocolo, es como se obtiene el compuesto **IV**, cambiando los reactivos K_2CO_3 por Cs_2CO_3 y yoduro de metilo por bromohexanoato de bencilo.

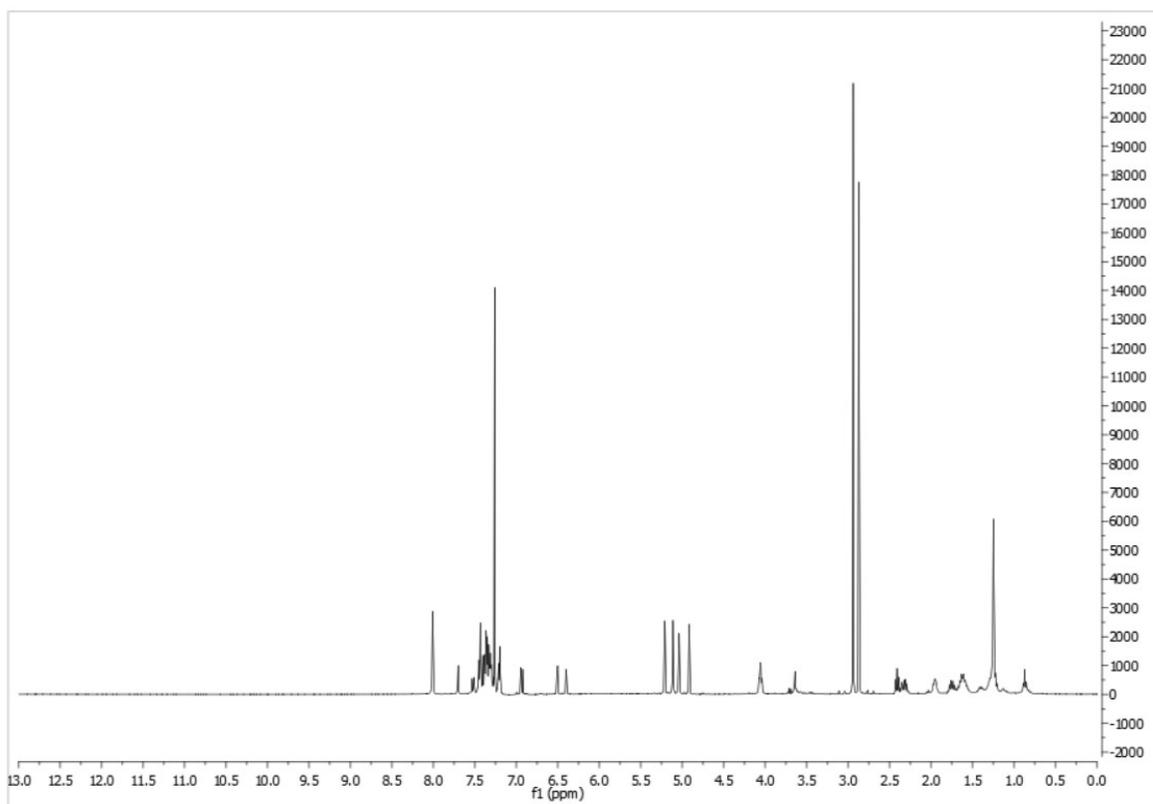


Figura 10. Espectro 1H NMR del compuesto **IV**.

Como se aprecia en la Figura 10, se evidencia un cambio en la estructura de la molécula al compararla con los precursores **II** y **III**. Según este espectro se puede asumir que la reacción transcurre según lo propuesto, dado que ya no se observa la señal del protón (entre 12 y 13 ppm) que corresponde al hidroxilo del carbono 5 del anillo A (Figura 1) debido a la formación del éter. Además, respecto a las señales de los CH₂, estas mantienen prácticamente el mismo desplazamiento químico, a excepción del CH₂ que correspondía al enlace del precursor a un bromo, ya que luego pasa a estar enlazado a un oxígeno (éter), resultando en un aumento en el desplazamiento químico en relación a los ppm en el espectro del 6-bromohexanoato de bencilo. Dado esto, se puede inferir que el compuesto **IV** fue obtenido en forma satisfactoria, por lo que se decide replicar la reacción usando carbonato de cesio como base, y luego comparando los productos obtenidos mediante cromatografía en placa fina (TLC), que permite de forma cualitativa la separación con los compuestos precursores, de los cuales ya se tenía un patrón de comparación.

8.4. Estrategias de conjugación de quercetina con nanopartículas.

Respecto a las reacciones restantes del esquema (las cuales no se pudieron realizar por los motivos mencionados anteriormente) se proponen algunas rutas a seguir, partiendo por la desprotección del compuesto **IV**, formando el compuesto **V**, y posterior reacción con APTES para la formación del compuesto **VI**, obteniendo de esta forma la quercetina silil funcionalizada (Figura 4). De acuerdo con lo que muestra la Figura 11, esta molécula al tener el grupo silil, puede utilizarse de esa forma en la síntesis de las nanopartículas, es decir, agregarla en lugar del APTES [84], formando la nanopartícula con la quercetina ya fijada su superficie, por medio del enlace covalente de la amida, compuesto **X**. Para saber si esto puede realizarse se podría determinar el incremento en el tamaño de partícula con respecto a la partícula inicial, ya que dependiendo del largo de cadena empleado se deberían observar diferencias en el tamaño de esta. Además, podría medirse de forma indirecta la cantidad de compuesto **VI** que logró recubrir el núcleo de la nanopartícula de silicio y la determinación de posibles cambios en el potencial Z de la nanopartícula.

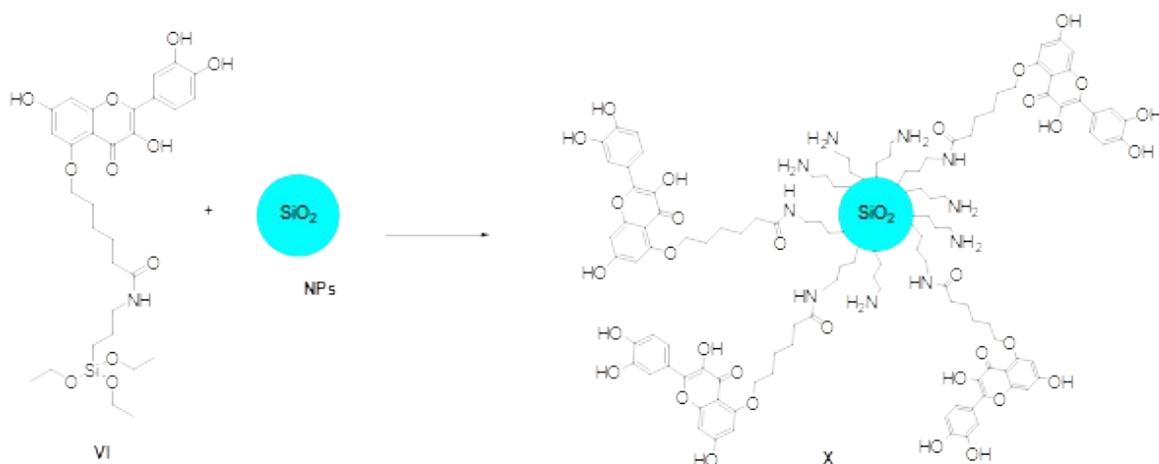


Figura 11. Propuesta para la conjugación del compuesto **VI** en la nanopartícula.

Otra opción para tener en consideración corresponde a la propuesta del esquema de la Figura 12, en el cual se observa la reacción del compuesto **V** con la nanopartícula recubierta con grupo amino, formándose el enlace amida sobre la misma nanopartícula [85-86]. Para saber si existe la formación del compuesto **X** podría medirse tamaño de partícula y potencial Z y también medición indirecta de la cantidad de compuesto **V** que reacciona con la nanopartícula.

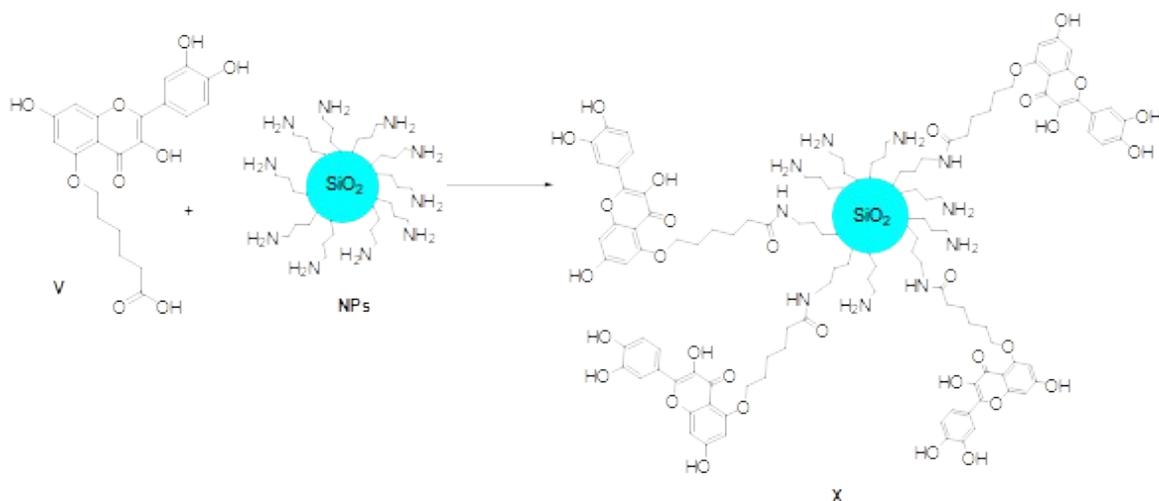


Figura 12. Propuesta para la conjugación del compuesto **V** en la nanopartícula modificada con grupos amino.

De acuerdo con la literatura la amida se podría obtener utilizando clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y N-Hidroxisuccinamida (NHS) como agentes activantes [86-87].

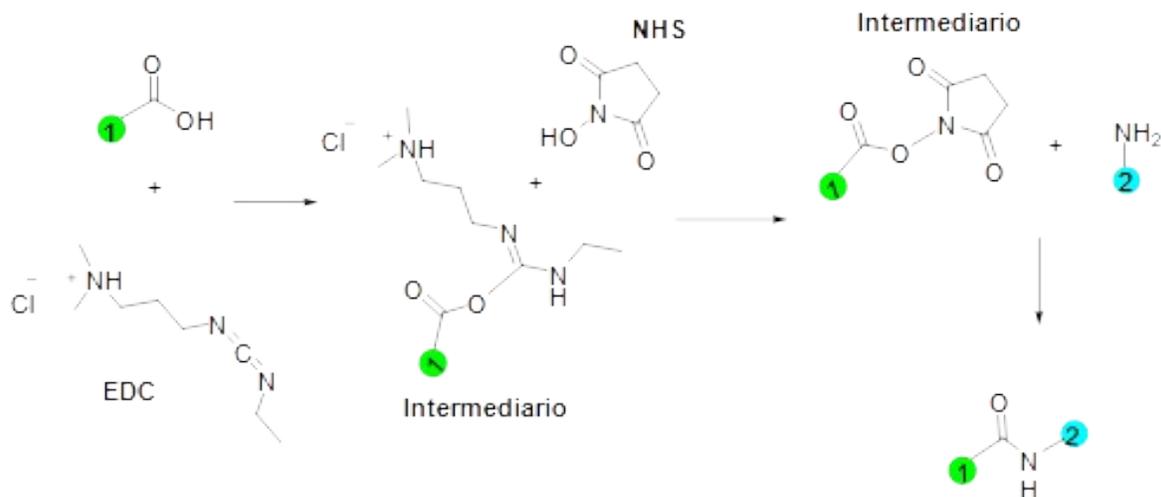


Figura 13. Esquema para la formación del enlace amida utilizando EDC y NHS como agentes activantes.

La formación del intermediario (O-acilurea) ocurriría mediante la reacción de EDC con el ácido carboxílico de la quercetina modificada (compuesto V). Este tendría un mejor grupo saliente que el hidroxilo del -COOH, facilitando el desplazamiento por el ataque nucleofílico de la amina al carbono carbonílico. Es necesario que se acidifique el medio con HCl 0,1 N ya que la EDC es más eficiente a un pH de 4,5. Sin embargo, el intermediario O-acilurea es inestable en medio acuoso, lo que podría impedir la reacción con la amina e hidrolizarse, reconstituyéndose el ácido carboxílico. La adición de NHS en la reacción permitiría mejorar la eficiencia, ya que reacciona con el intermediario O-acilurea formando un intermediario con mayor estabilidad en medio acuoso, para la conjugación con la amina de la ACMSNP.

Según lo que se muestra en la Figura 14, suponiendo la formación del compuesto F del primer esquema de propuesta de ruta sintética (Figura 3), podría realizarse la reacción de ese compuesto directamente con la nanopartícula sin modificación con grupo amino (NPs), siguiendo el protocolo de síntesis de las nanopartículas, para posteriormente agregar el compuesto F en lugar de APTES, obteniendo así el compuesto Y.

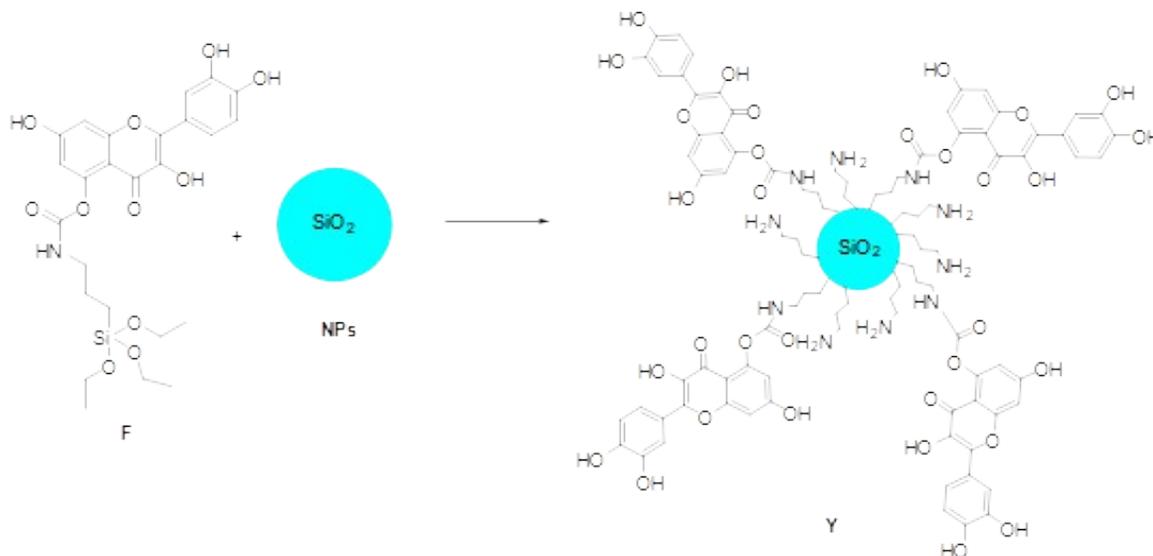


Figura 14. Propuesta para la conjugación compuesto **F** en la nanopartícula de sílice correspondiente la primera propuesta de ruta sintética.

Según los resultados obtenidos en forma experimental y también de acuerdo a las propuestas descritas para la conjugación de quercetina en nanopartículas de sílice, la mejor opción sería la propuesta explicada por el esquema de síntesis de la Figura 4, dado que, a pesar de ser compleja experimentalmente, si es factible realizarla en forma experimental ya que los reactivos son relativamente fáciles de adquirir.

La principal propuesta del trabajo es poder fijar en forma covalente la quercetina a la superficie de la nanopartícula, para evitar que se degrade o pierda sus propiedades antioxidantes, debido a que cuando la quercetina es adsorbida mediante interacciones electrostáticas puede tener muy bajo porcentaje en comparación a la unión covalente sobre la nanopartícula [5], esto claramente debe comprobarse experimentalmente, pero de acuerdo con la información obtenida de estudios de esta misma línea investigativa, se podría suponer que se obtendrían mejores resultados al estar estas moléculas unidas covalentemente a las nanopartículas. Para ello, por un lado, es necesario sintetizar las nanopartículas y por otro, funcionalizar la quercetina, guiándose por cualquiera de los dos esquemas de rutas sintéticas propuestos, aunque según los resultados obtenidos y basándose en cómo debería ser al acoplamiento de estos dos fragmentos, lo óptimo sería desarrollar la propuesta del esquema de la Figura 11, en el cual se hace reaccionar la superficie de la nanopartícula con el compuesto **VI**, formando así el compuesto **X**.

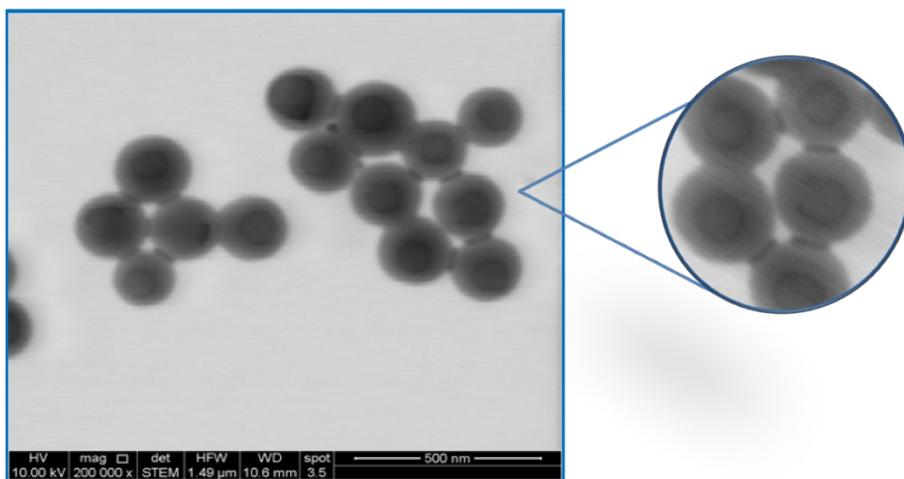
La formación de este compuesto **X** también puede realizarse siguiendo el esquema de la Figura 12, pero, dado que la reacción para formar la amida se realiza sobre la misma superficie de la nanopartícula, podrían ocurrir reacciones secundarias o que los reactivos utilizados para esta reacción alteren de algún modo la superficie de la nanopartícula. También puede que ocurra adsorción de la quercetina sobre la nanopartícula en vez de unirse covalentemente a ella. Sin embargo, de acuerdo con el esquema de la Figura 13, utilizando EDC y NHS como activantes para la formación de la amida, sería posible realizar la reacción directamente sobre la superficie de la nanopartícula. A pesar de esa posibilidad y debido a que la síntesis es más sencilla, es que este trabajo se inclina por el esquema de la Figura 11, dado que la formación de compuesto **X** ocurriría mediante agitación de ambas partes en presencia de etanol, lo que en teoría no debería afectar a la quercetina funcionalizada ni al núcleo de las nanopartículas y permitirá el recubrimiento que se desea lograr.

El objetivo del desarrollo de estas estrategias es contribuir a la investigación de las propiedades de nuevos vehículos y excipientes antioxidantes, otorgando propiedades de estos compuestos naturales a sistemas como las nanopartículas. De esta forma, compuestos como la molécula **X** y sus variaciones respecto al largo de cadena, dependiendo del haloácido que se quiera utilizar o combinaciones de estos, pueden presentar potencialmente actividad fotoprotectora, de ser así, podrían utilizarse en la forma farmacéutica/cosmética apropiada para este tipo de compuestos y ayudar a evitar un daño mayor en la piel al utilizarlos como fotoprotector.

8.5. Caracterización de las nanopartículas: tamaño, distribución, potencial superficial y morfología.

El tamaño de las nanopartículas de “núcleo sólido y capa mesoporosa amino modificadas” (ACMSNPs) es de 178 nm de diámetro y una distribución normal. Adicionalmente, se midió el tamaño para las nanopartículas sin modificación superficial (CMSNPs), obteniendo un tamaño promedio de 173 nm. Por otra parte, para las nanopartículas con quercetina adsorbida el tamaño promedio fue de 190 nm, lo que corrobora el aumento de tamaño esperado para las nanopartículas con y sin modificación superficial y sin cambios importantes en el tamaño cuando se adsorbe quercetina.

En la Figura 15, correspondiente a la imagen de la nanopartícula de centro sólido con una capa mesoporosa (CMSNPs), se observa que 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. Esta descripción, también se distingue en la Figura 16, que corresponde a las ACMSNPs-QUE_{ads} y se ajusta a la conformación de una nanopartícula de tipo core-shell, asignándose este anillo externo, a la capa porosa. El espesor promedio de la capa mesoporosa es de 37 nm y corresponde a un 20% del diámetro total de la nanopartícula, mientras que el núcleo sólido representa el 60% del diámetro total. Las figuras corresponden a imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas sintetizadas. Cada muestra se dispersó en etanol, luego se evaporó el solvente y se trató con una película de oro para su observación.



Figura

15.

Nanopartículas *core-shell* sin modificación superficial. Núcleo sólido con capa mesoporosa.

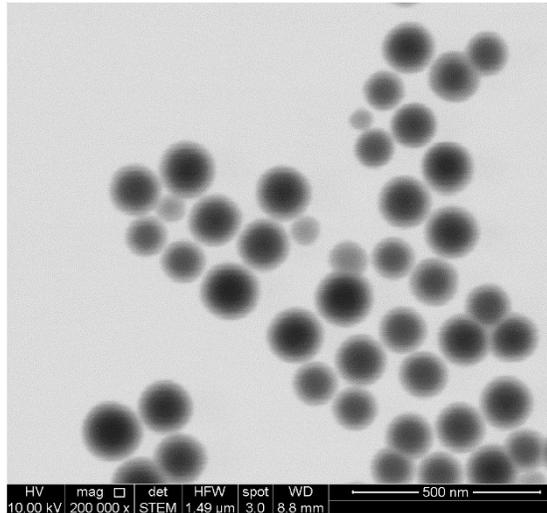


Figura 16. Nanopartículas de núcleo sólido con capa mesoporosa y quercetina adsorbida

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.

El potencial Z de las muestras estuvo dentro del rango de valores esperados, observándose para las nanopartículas superficialmente modificadas con APTES un valor promedio de +35 mV, en comparación con las nanopartículas sin funcionalizar, cuyo potencial Zeta es de -50mV. Para las nanopartículas con quercetina adsorbida el valor promedio fue de -2 mV. Esto se explica debido a la carga negativa que presenta la quercetina en las condiciones acuosas de medición en donde el flavonoide se encuentra levemente ionizado, por lo que la carga superficial de las nanopartículas se hace menos positiva cuando se adsorbe quercetina, lo que es coincidente con datos reportados en la literatura [69].

8.6. Eficiencia de adsorción de quercetina en nanopartículas (ACMSNPs)

La eficiencia de incorporación de quercetina a las nanopartículas (ACMSNPs), se realizó siguiendo el método de batch, determinando por HPLC la cantidad de quercetina no adsorbida, luego de 24 hrs. Este valor luego se restó a la cantidad inicial de flavonoide que se puso en contacto con una determinada cantidad en masa de nanopartículas. Posteriormente, se calculó la Eficiencia de Encapsulación (%EE) y la eficiencia de carga (%DL). De acuerdo a los resultados, cada 100 mg de ACMSNPs se adsorben 5 mg de quercetina, correspondiendo a un 40% de eficiencia de encapsulación, es decir, si se ponen 10 mg se adsorben 4 mg, y 4,7 % de eficiencia de carga, es decir, se incorporan 5 mg en 105 mg totales (100 mg de nanopartículas y 5 mg de quercetina).

9. CONCLUSIÓN

En este trabajo se postularon dos rutas sintéticas para la funcionalización de quercetina con grupos silanos. La primera propuesta, consistió en la protección de los hidroxilos presentes en la estructura de la quercetina, a excepción del que se encuentra en el carbono 5 del anillo A, luego la funcionalización con un grupo silil utilizando 3-(trietoxisilil)propil isocianato, y finalmente, la desprotección de los hidroxilos protegidos anteriormente, obteniendo, una quercetina silil funcionalizada. Para la segunda ruta sintética, se realiza una reacción de Williamson para modificar el hidroxilo libre, y luego incluir una cadena de carbonos de largo variable con un ácido carboxílico terminal, obteniendo un derivado ácido de quercetina.

Se proponen 4 estrategias para la conjugación de quercetina en la superficie de nanopartículas de sílice: a. quercetina modificada con grupo silil; b. quercetina modificada con un ácido carboxílico; c. Formación de enlace amida quercetina-nanopartícula y d. quercetina modificada con grupo isocianato. De estas estas estrategias, la más promisoría es la utilización de quercetina con grupo silil dado que es la más simple, económica y rápida.

Se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de sílice tipo *core-shell* conformadas de un núcleo sólido de tamaño 170 nm y una capa porosa de 37 nm correspondiente al 20% del tamaño de la nanopartícula. No se evidencian cambios significativos en el tamaño por la adsorción de quercetina en la superficie de la nanopartícula, pero si cambios en el potencial Zeta fueron evidenciados, variando de valores positivos cuando la superficie fue modificada con grupos aminopropil y cercanos a cero cuando el flavonoide fue adsorbido. La eficiencia de carga de quercetina en las nanopartículas fue de un 4,7%.

Los resultados obtenidos muestran que, debido al bajo porcentaje de adsorción de quercetina sobre la superficie de las nanopartículas, una unión covalente de este flavonoide con las nanopartículas de sílice podría contribuir a un sistema más estable y que pueda exhibir potencialmente actividad fotoprotectora, utilizándose en forma tópica, debido a las propiedades antioxidantes de la quercetina. Si bien esto requiere de muchos y variados estudios posteriores para establecer con certeza la existencia de esta actividad, se puede suponer que las modificaciones estructurales deben realizarse en el carbono 5 de la quercetina para mantener intacta la estructura conjugada que ejerce la actividad antioxidante.

10. REFERENCIAS

1. Elliott, J. and B. Hancock, *Pharmaceutical materials science: An active new frontier in materials research*. Mrs Bulletin, 2006. **31**(11): p. 869-873.
2. Peppas, N.A., *Intelligent biomaterials as pharmaceutical carriers in microfabricated and nanoscale devices*. Mrs Bulletin, 2006. **31**(11): p. 888-893.
3. Shah, P., *Use of nanotechnologies for drug delivery*. Mrs Bulletin, 2006. **31**(11): p. 894-899.
4. Mortera, R., et al., *Pores occlusion in MCM-41 spheres immersed in SBF and the effect on ibuprofen delivery kinetics: A quantitative model*. Chemical Engineering Journal, 2010. **156**(1): p. 184-192.
5. Doane, T. and C. Burda, *Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(5): p. 607-621.
6. Hulchanskyy, T.Y., et al., *Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer*. Nano Letters, 2007. **7**(9): p. 2835-2842.
7. Rao, B.V.B., et al., *Controlled release of antimicrobial Cephalexin drug from silica microparticles*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2014. **34**: p. 9-14.
8. Kumar, R., et al., *Covalently dye-linked, surface-controlled, and bioconjugated organically modified silica nanoparticles as targeted probes for optical imaging*. Acs Nano, 2008. **2**(3): p. 449-456.
9. Chen, Y.P., et al., *A New Strategy for Intracellular Delivery of Enzyme Using Mesoporous Silica Nanoparticles: Superoxide Dismutase*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(4): p. 1516-1523.
10. Zhang, B., et al., *Synthesis of amino-silane modified magnetic silica adsorbents and application for adsorption of flavonoids from Glycyrrhiza uralensis Fisch*. Science in China Series B-Chemistry, 2008. **51**(2): p. 145-151.
11. Sun, X.X., et al., *Luciferase and Luciferin Co-immobilized Mesoporous Silica Nanoparticle Materials for Intracellular Biocatalysis*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(46): p. 18554-18557.
12. Queiroz, R.G., et al., *Radiation-synthesized protein-based drug carriers: Size-controlled BSA nanoparticles*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **85**: p. 82-91.
13. Kupetz, E. and H. Bunjes, *Lipid nanoparticles: Drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles*. Journal of Controlled Release, 2014. **189**: p. 54-64.
14. Mehnert, W. and K. Mader, *Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**: p. 83-101.
15. Masood, F., *Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2016. **60**: p. 569-578.
16. Yue, H. and G.H. Ma, *Polymeric micro/nanoparticles: Particle design and potential vaccine delivery applications*. Vaccine, 2015. **33**(44): p. 5927-5936.
17. Chandran PR, Thomas RT, *Gold Nanoparticles in Cancer Drug Delivery*. Nanotechnology Applications for Tissue Engineering 2015: 221–237.

18. Rai, M., et al., Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015. 496(2): p. 159-172
19. Wang, Y., et al., *Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications*. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2015. 11(2): p. 313-327.
20. Liberman, A., et al., *Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine*. *Surface Science Reports*, 2014. 69(2-3): p. 132-158.
21. Tang, L. and J.J. Cheng, *Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application*. *Nano Today*, 2013. 8(3): p. 290-312.
22. Park, J.T., et al., *Surface modification of silica nanoparticles with hydrophilic polymers*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2010. 16(4): p. 517-522.
23. Qiao, B., et al., *Surface modification to produce hydrophobic nano-silica particles using sodium dodecyl sulfate as a modifier*. *Applied Surface Science*, 2016. 364: p. 103-109.
24. Wang, X., et al., *Facile surface modification of silica nanoparticles with a combination of noncovalent and covalent methods for composites application*. *Composites Science and Technology*, 2014. 104: p. 1-8.
25. Guo, Y.Y., S. Rogelj, and P. Zhang, *Rose Bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of gram-positive bacteria*. *Nanotechnology*, 2010. 21(6).
26. Uppal, A., et al., *Photodynamic Action of Rose Bengal Silica Nanoparticle Complex on Breast and Oral Cancer Cell Lines*. *Photochemistry and Photobiology*, 2011. 87(5): p. 1146-1151.
27. Peterson, J. and J. Dwyer, *Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity*. *Nutrition Research*, 1998. 18(12): p. 1995-2018.
28. Tanwar B, Modgil R, *Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits*. *Spatula DD*, 2012; 2(1): 59-68
29. Di Carlo, G., et al., *Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. *Life Sciences*, 1999. 65(4): p. 337-353.
30. Haytowitz D. B, Bhagwat S., Holden J. M, *Sources of variability in the flavonoid content of foods*. *Procedia Food Science* 2013; 2: 46-51.
31. Liu, Z.H., Y. Kanjo, and S. Mizutani, A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. *Water Research*, 2010. 44(2): p. 567-577.
32. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002. 13(10): p. 572-584.
33. Vermerris W, Nicholson RL. *Phenolic compound biochemistry: Springer Science & Business Media*, 2007.
34. Havsteen, B.H., *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002. 96(2-3): p. 67-202.
35. Behloul, N. and G.Z. Wu, *Genistein: A promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment*. *European Journal of Pharmacology*, 2013. 698(1-3): p. 31-38.
36. Guardia, T., et al., *Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat*. *Farmacologia*, 2001. 56(9): p. 683-687.
37. Ravishankar, D., et al., *Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013. 45(12): p. 2821-2831.
38. Moreira, A.C., et al., *Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014. 143: p. 61-71.

39. Veverka, M., et al., *Novel quercetin derivatives: synthesis and screening for anti-oxidant activity and aldose reductase inhibition*. Chemical Papers, 2013. **67**(1): p. 76-83.
40. Orhan, D.D., et al., *Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids*. Microbiological Research, 2010. **165**(6): p. 496-504.
41. Wach, A., K. Pyrzynska, and M. Biesaga, *Quercetin content in some food and herbal samples*. Food Chemistry, 2007. **100**(2): p. 699-704.
42. Mansourizadeh, F., et al., *Efficient synergistic combination effect of Quercetin with Curcumin on breast cancer cell apoptosis through their loading into Apo ferritin cavity*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2020. **191**.
43. Lesjak, M., et al., *Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives*. Journal of Functional Foods, 2018. **40**: p. 68-75.
44. Deng, Q., et al., *Therapeutic Potential of Quercetin as an Antiatherosclerotic Agent in Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Review*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020. **2020**.
45. Patel, R.V., et al., *Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018. **155**: p. 889-904.
46. Porcu, E.P., et al., *Aqueous injection of quercetin: An approach for confirmation of its direct in vivo cardiovascular effects*. International Journal of Pharmaceutics, 2018. **541**(1-2): p. 224-233.
47. Dobrikova, A.G. and E.L. Apostolova, *Damage and protection of the photosynthetic apparatus from UV-B radiation. II. Effect of quercetin at different pH*. Journal of Plant Physiology, 2015. **184**: p. 98-105., 2014.
48. Lee, K.S. and S.N. Park, *Cytoprotective effects and mechanisms of quercetin, quercitrin and avicularin isolated from Lespedeza cuneata G. Don against ROS-induced cellular damage*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2019. **71**: p. 160-166.
49. Parisi O.I., Pouci F., et al., *Chapter 4 - Polyphenols and Their Formulations: Different Strategies to Overcome the Drawbacks Associated with Their Poor Stability and Bioavailability*. Polyphenols in Human Health and Disease, 2014. 1: p. 29-45.
50. Frederice, R., A.P.G. Ferreira, and M.H. Gehlen, *Molecular Fluorescence in Silica Particles Doped with Quercetin-Al³⁺ Complexes*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2010. **21**(7): p. 1213-1217.
51. Zhang, Y.Z., et al., *Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan*. Journal of Controlled Release, 2010. **145**(3): p. 257-263.
52. Stöber W., Fink A., Bohn E. J. *Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. 26(1): p.62-69.
53. Manzano, M., et al., *Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization*. Chemical Engineering Journal, 2008. **137**(1): p. 30-37.
54. Perro, A., et al., *Synthesis of hybrid colloidal particles: From snowman-like to raspberry-like morphologies*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **284**: p. 78-83.
55. Rahman, I.A., et al., *An optimized sol-gel synthesis of stable primary equivalent silica particles*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **294**(1-3): p. 102-110.
56. Green, D.L., et al., *Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles*. Journal of Colloid and Interface Science, 2003. **266**(2): p. 346-358.

57. Parida, S.K. and B.K. Mishra, *Adsorption of styryl pyridinium dyes on silica gel*. Journal of Colloid and Interface Science, 1996. **182**(2): p. 473-477.
58. Parida, S.K. and B.K. Mishra, *Adsorption of styryl pyridinium dyes on polyethylene-glycol-treated silica*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 1998. **134**(3): p. 249-255.
59. Bardina, I.A., N.V. Kovaleva, and Y.S. Nikitin, *Surface properties of initial and polyethylene glycol modified silica gels*. Russian Journal of Physical Chemistry, 2001. **75**(3): p. 442-445.
60. Etienne, M. and A. Walcarius, *Analytical investigation of the chemical reactivity and stability of aminopropyl-grafted silica in aqueous medium*. Talanta, 2003. **59**(6): p. 1173-1188.
61. Parida, S.K., et al., *Adsorption of organic molecules on silica surface*. Advances in Colloid and Interface Science, 2006. **121**(1-3): p. 77-110.
62. Hassanien, M.A. and K.S. Abou-El-Sherbini, *Synthesis and characterisation of morin-functionalised silica gel for the enrichment of some precious metal ions*. Talanta, 2006. **68**(5): p. 1550-1559.
63. Ambati, J., et al., *Engineered silica nanocarriers as a high-payload delivery vehicle for antioxidant enzymes*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(6): p. 2096-2103.
64. Cao, X., et al., *Oral bioavailability of silymarin formulated as a novel 3-day delivery system based on porous silica nanoparticles*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(6): p. 2104-2112.
65. Slowing, II, et al., *Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(11): p. 1278-1288.
66. Xia, T.A., et al., *Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs*. ACS Nano, 2009. **3**(10): p. 3273-3286.
67. Hom, C., et al., *Mesoporous Silica Nanoparticles Facilitate Delivery of siRNA to Shutdown Signaling Pathways in Mammalian Cells*. Small, 2010. **6**(11): p. 1185-1190.
68. Berlier, G., et al., *MCM-41 as a useful vector for rutin topical formulations: Synthesis, characterization and testing*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **457**(1): p. 177-186.
69. Sapino, S., et al., *Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: characterization and in vitro studies*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015. **89**: p. 116-125.
70. Li, N.G., et al., *An efficient partial synthesis of 4'-O-methylquercetin via regioselective protection and alkylation of quercetin*. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2009. **5**.
71. Choualeb, A., et al., *Routes to ruthenium-cobalt clusters and dicobalt complexes with new alkoxysilyl- or sulfur-functionalized alkynes. X-ray structures of $\text{NEt}_4 \text{RuCo}_3(\text{CO})(10)\{\mu(4)\text{-}\eta(2)\text{-HC}_2(\text{CH}_2)(2)\text{OC(O)NH}(\text{CH}_2)(3)\text{Si(OEt)}_3\}$ and $\text{Co}_2(\text{CO})(6)\{\mu(2)\text{-}\eta(2)\text{-HC}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)NH}(\text{CH}_2)(3)\text{Si(OEt)}_3\}$* . Organometallics, 2003. **22**(13): p. 2688-2693.
72. Kato, K., et al., *Effects of Functional Groups and Sugar Composition of Quercetin Derivatives on Their Radical Scavenging Properties*. Journal of Natural Products, 2016. **79**(7): p. 1808-1814.
73. Reddy, P.A., et al., *O-protected N-(2-nitrophenylsulfonyl)hydroxylamines: Novel reagents for the synthesis of hydroxamates*. Synthesis-Stuttgart, 2001(7): p. 1086-1092.

74. Guan, L.P., et al., *Synthesis and anticonvulsant activity of N-(2-hydroxyethyl) cinnamamide derivatives*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **44**(9): p. 3654-3657.
75. Hermankova, E., et al., *Redox properties of individual quercetin moieties*. Free Radical Biology and Medicine, 2019. **143**: p. 240-251.
76. Moalin, M., et al., *A Planar Conformation and the Hydroxyl Groups in the B and C Rings Play a Pivotal Role in the Antioxidant Capacity of Quercetin and Quercetin Derivatives*. Molecules, 2011. **16**(11): p. 9636-9650.
77. Mei, Q.G., et al., *Selective methylation of kaempferol via benzylation and deacetylation of kaempferol acetates*. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2015. **11**.
78. Hirpara, K.V., et al., *Quercetin and Its Derivatives: Synthesis, Pharmacological Uses with Special Emphasis on Anti-Tumor Properties and Prodrug with Enhanced Bio-Availability*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2009. **9**(2): p. 138-161.
79. Kajjout M., Rolando C., *Regiospecific synthesis of quercetin O- β -d-glucosylated and O- β -d-glucuronidated isomers*. Tethaedron, 2011, 67 (25): p. 4731-4741.
80. Volodymyr I. Lushchak., *Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification*. Chemico-Biological Interactions, 2014. 224: p. 164-171.
81. Hatahet, T., et al., *Dermal quercetin lipid nanocapsules: Influence of the formulation on antioxidant activity and cellular protection against hydrogen peroxide*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. **518**(1-2): p. 167-176.
82. Ferrara, F., et al., *Check updates Additive effect of combined pollutants to UV induced skin OxInflammation damage. Evaluating the protective topical application of a cosmeceutical mixture formulation*. Redox Biology, 2020. **34**.
83. Liebel, F., et al., *Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes*. Journal of Investigative Dermatology, 2012. **132**(7): p. 1901-1907.
84. Yamaura, M., et al., *Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2004. **279**(2-3): p. 210-217.
85. de Figueiredo, R.M., J.S. Suppo, and J.M. Campagne, *Nonclassical Routes for Amide Bond Formation*. Chemical Reviews, 2016. **116**(19): p. 12029-12122.
86. Valeur, E. and M. Bradley, *Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents*. Chemical Society Reviews, 2009. **38**(2): p. 606-631.
87. Khung, Y.L. and D. Narducci, *Surface modification strategies on mesoporous silica nanoparticles for anti-biofouling zwitterionic film grafting*. Advances in Colloid and Interface Science, 2015. **226**: p. 166-186.

