

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADSORCIÓN DE LOS
FLAVONOIDES QUERCETINA Y RUTINA EN LA
ESTABILIDAD QUÍMICA DE EMULSIONES PICKERING O/W
EMULSIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE
MESOPOROSAS***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al título de Químico(a) Farmacéutico(a) y al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas área de especialización en industria por:

CONSTANZA SOLANGE AZÚA ARAYA

Director de Tesis: Dr. Javier Eduardo Morales Valenzuela

Santiago-Chile

Diciembre 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

CONSTANZA SOLANGE AZÚA ARAYA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas, Área de Especialización: Industria, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Javier Eduardo Morales Valenzuela _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mario Díaz _____

Dra. Lilian Abugoch _____

Dr. Alfredo Molina _____

DEDICATORIA

A mis abuelos, los pilares de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda la gente que me ha acompañado durante este largo camino, amigas, pareja y especialmente a mi familia que me ha estado apoyando y aconsejando. Quiero agradecerles a mis padres Mariela y Eduardo por enseñarme a atreverme a hacer lo que quiero a pesar del miedo y por siempre recordarme que puedo hacer todo lo que me proponga.

Quiero agradecerles a mis abuelos Carmen y Manuel por su gran contribución a la persona que soy hoy en día, nada de esto sería posible sin ustedes, espero que desde donde están ahora, estén orgullosos de mí.

Finalmente, quiero agradecerle a mi profesora Edda Costa por empezar este camino conmigo y apoyarme cuando me sentí perdida y a mi profesor tutor Javier Morales Valenzuela por creer en mi y en mis capacidades, por orientarme cuando no sabía que camino tomar y por acompañarme en cada paso de este trabajo.

Gracias a todos y cada uno de ustedes, mi esfuerzo y dedicación para ustedes

TABLA DE CONTENIDO

<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>i</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>iv</i>
<i>GLOSARIO</i>	<i>v</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>vi</i>
<i>SUMMARY</i>	<i>viii</i>
1.INTRODUCCIÓN	1
EMULSIONES Y EMULSIONES PICKERING	1
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE	5
ESTABILIDAD DE EMULSIONES	8
POLIFENOLES: QUERCETINA Y RUTINA	9
ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS: ASTAXANTINA Y VITAMINA E	13
2.DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA	16
ESQUEMA DE LA PROPUESTA	1
3.HIPÓTESIS:	18
4.OBJETIVO GENERAL	18
5.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
6.REACTIVOS Y SOLVENTES	19
7.INSTRUMENTACIÓN	19
8. METODOLOGÍA	21
8.1. Síntesis nanopartículas de sílice mesoporosas modificadas con grupos amino de cadena larga y corta	21
8.2 Caracterización de nanopartículas: MSNP, AMSNP-APTES y AMSNP-DETA	22

8.3 Capacidad de adsorción de los polifenoles a la superficie de la nanopartícula (en solución de glicerina 10%).	19
8.3.1 Metodología analítica.	19
8.3.2 Carga de flavonoides en nanopartículas de sílice mesoporosas.	19
8.3.3 Análisis de datos: isothermas de adsorción.	20
8.4 Emulsión o/w: preparación y evaluación.	21
8.5 Evaluación del efecto de la adsorción de los polifenoles a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas, sobre la oxidación de emulsiones con vitamina E solubilizada en el glóbulo de la emulsión.	23
8.5.1 Metodología analítica.	23
8.5.2 Evaluación efecto de la adsorción de polifenoles a las nanopartículas sobre el consumo de vitamina E.....	23
8.5.2.1 Evaluación emulsión base.	23
8.5.2.2 Evaluación emulsión base con incorporación de polifenoles	24
8.5.2.3 Evaluación emulsión base con incorporación de nanopartículas con distinto largo de cadena.....	24
8.5.2.4 Evaluación efecto de la adsorción de polifenoles a nanopartículas de sílice sobre la oxidación de vitamina E.....	25
8.6 Evaluación del efecto de la adsorción de los polifenoles a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas, sobre la oxidación de emulsiones con astaxantina solubilizada en el glóbulo de la emulsión.	27
8.6.1 Metodología analítica	27
8.6.2 Evaluación del efecto de la adsorción de polifenoles a las nanopartículas sobre el consumo de astaxantina.....	27
8.6.2.1 Evaluación emulsión base	27
8.6.2.2 Evaluación emulsión con incorporación de polifenoles.....	28
8.6.2.3 Evaluación emulsión con incorporación de nanopartículas con distinto largo de cadena.....	28
8.6.2.4 Evaluación del efecto de la adsorción de polifenoles a nanopartículas de sílice sobre el consumo de astaxantina.....	28

8.7 Evaluación del efecto de polifenoles fotooxidados adsorbidos a la superficie de las nanopartículas sobre la vitamina E en la emulsión Pickering.	29
.....	
8.7.1 Caracterización quercetina fotooxidada.....	29
8.7.2 Capacidad de adsorción de la quercetina fotooxidada a las nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas	29
8.7.3 Evaluación del efecto de la adsorción de quercetina fotooxidada a nanopartículas de sílice sobre el consumo de astaxantina.	30
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
9.1 Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas con grupos amino de cadena larga y corta.....	31
9.2 Caracterización de las nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas con grupos amino de distinto largo, con y sin polifenoles adsorbidos.	33
9.3 Metodología analítica.	37
9.3 Capacidad de adsorción de los flavonoides a la superficie de las nanopartículas en solución de glicerina 10%.....	40
9.4 Emulsión o/w: preparación y caracterización.	47
9.5 Evaluación del efecto de la adsorción de los polifenoles a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas, sobre la oxidación de emulsiones Pickering o/w.....	53
9.5.1 Metodología analítica.	53
9.5.2 Evaluación de emulsiones o/w con incorporación de nanopartículas de sílice modificadas con grupos aminos y polifenoles adsorbidos.	54
9.5.2.1 Estabilidad química de las emulsiones: el “particular caso” de vitamina E	56
9.5.2.2 Estabilidad química de las emulsiones: incorporación de astaxantina.	60

9.6 Evaluación del efecto de la adsorción de la quercetina fotooxidada a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas, sobre la oxidación de emulsiones con astaxantina.....	71
9.6.1 Caracterización de la quercetina fotooxidada mediante HPLC	71
9.6.2 Capacidad de adsorción de quercetina fotooxidada a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas.	73
9.6.3 Evaluación consumo de astaxantina en una emulsión Pickering o/w estabilizada con nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas y quercetina fotooxidada en su fase acuosa.	74
10. CONCLUSIONES.....	76
11. BIBLIOGRAFÍA.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Propuesta básica de trabajo: Emulsión Pickering o/w con antioxidantes adsorbidos desde la fase acuosa.vii</i>	vii
<i>Figura 2. Modelo de emulsión Pickering o/w. Figura de elaboración propia.....3</i>	3
<i>Figura 3. Esquema método de Stöber con funcionalización a través del método post sintético de injerto. Figura adaptada de Zulkiflee y col. 2022... 6</i>	6
<i>Figura 4. Estructura química de la quercetina. Figura obtenida de..... 12</i>	12
<i>Figura 5. Estructura química de la rutina. Figura obtenida de 13</i>	13
<i>Figura 6. Estructura química de la vitamina E (α-tocoferol). Figura obtenida de 14</i>	14
<i>Figura 7. Estructura química de la astaxantina. Figura obtenida de 15</i>	15
<i>Figura 8. Proceso polimerización en la síntesis de nanopartículas de sílice [10]. Figura obtenida de Llinás y col. 2014. 31</i>	31
<i>Figura 9. Estructura a) (3-aminopropil)-triétoxissilano (APTES) y b) N-(3-Trimetoxissililpropil)-Dietilentriamina (DETA). Figura obtenida de 32</i>	32
<i>Figura 10. Fotografías de nanopartículas de sílice mesoporosas (MSNP) tomadas a través de microscopía electrónica de barrido (TEM)..... 35</i>	35
<i>Figura 11. Espectros FT-IR de a) Flavonoides quercetina y rutina, b) Nanopartículas aminofuncionalizadas con distinto largo de cadena (AMSNP-APTES y AMSNP-DETA), c) Nanopartículas aminofuncionalizadas de cadena larga con polifenoles adsorbidos (AMSNP-D-Q y AMSNP-D-R), d) Nanopartículas aminofuncionalizadas de cadena corta con polifenoles adsorbidos (AMSNP-A-Q Y AMSNP-A-R). 37</i>	37
<i>Figura 12. Adsorción de quercetina a nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas. a) cantidad de quercetina adsorbida (q) en función de la cantidad inicial agregada (Co) para 100 mg de AMSNP-DETA, b) cantidad de quercetina adsorbida (q) en función de la cantidad inicial incorporada (Co) para 100 mg de AMSNP-APTES, c) Isoterma de Langmuir para datos experimentales de quercetina en AMSNP-APTES y d) Isoterma de Freundlich para quercetina en AMSNP-APTES, e) Isoterma de Langmuir para datos experimentales de quercetina en AMSNP-DETA y f) Isoterma de Freundlich para quercetina en AMSNP-DETA. 43</i>	43

Figura 13. Adsorción de Rutina a nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas. a) cantidad de rutina adsorbida (q) en función de la cantidad inicial agregada (C_0) para 100 mg de AMSNP-DETA, b) cantidad de rutina adsorbida (q) en función de la cantidad inicial incorporada (C_0) para 100 mg de AMSNP-APTES, c) Isoterma de Langmuir para datos experimentales de rutina en AMSNP-DETA, d) Isoterma de Langmuir para rutina en AMSNP-APTES, e) Isoterma de Freundlich para rutina en AMSNP-DETA y f) Isoterma de Freundlich para rutina en AMSNP-APTES.....	44
Figura 14. Emulsiones E3(5%glicerina), E4 (2,5% glicerina), E5 (2% glicerina), E6 (1% glicerina) y E7 (0% glicerina) luego de 72 horas en estufa a 40°C y con presencia de H₂O₂.....	49
Figura 15. a) emulsión base con quercetina 0,1%, b) emulsión base con quercetina 0,05%, c) emulsión base con quercetina 0,01%, d) emulsión base con rutina 0,1%, e) emulsión base con rutina 0,05%, f) emulsión base con rutina 0,01, g) emulsión base (0,5% vitamina E).....	49
Figura 16. a) emulsión base con AMSNP-APTES 1%, b) emulsión base con AMSNP-APTES 0,5%, c) emulsión base con AMSNP-APTES 0,1%, d) emulsión base con AMSNP-DETA 1%, e) emulsión base con AMSNP-DETA 0,5%, f) emulsión base con AMSNP 0,1%.....	50
Figura 17. Fotografías emulsiones base con vitamina E en el interior del glóbulo. a) y b) corresponde a emulsiones con nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas con APTES; c) y d) a emulsiones con nanopartículas aminofuncionalizadas con DETA; por su parte e) corresponde a una emulsión con quercetina y f) corresponde a una emulsión con rutina.....	51
Figura 18. Emulsiona con 0,1% de astaxantina recién incorporada (naranja intenso) y luego de someterse a estufa a 40°C por un periodo prolongado de tiempo (rosa pálido).....	52
Figura 19. Gráficos y ecuaciones de las curvas de calibración de vitamina E en acetona y en metanol.....	54
Figura 20. Gráficos de consumo de vitamina E en emulsión a) con polifenol rutina en la fase acuosa; b) con polifenol quercetina en la fase acuosa; c) con AMSNP-DETA en la interfase y d) con AMSNP-APTES en la interfase, bajo condiciones de estrés con H₂O₂ 5% y 40°C.....	58
Figura 21. Gráficos de consumo de vitamina E en emulsiones Pickering con AMSNP-APTES y polifenol quercetina al a) 0,01% y b) 0,1%, bajo condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂ 5% y 40°C.....	60

<i>Figura 22. Gráfico de consumo de astaxantina en emulsión O/W, bajo condiciones de estrés con H₂O₂ al 5%, en estufa a 40°C y a través de fotólisis con lámpara UV.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 23. Gráficos de consumo de astaxantina en emulsión a) con polifenoles quercetina y rutina; b) con AMSNP-DETA y AMSNP-APTES, bajo condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂ 5% y fotólisis.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 24. Gráficos de consumo de astaxantina en emulsión con polifenol solubilizado en su fase acuosa y en emulsión estabilizada con AMSNP y polifenol a) quercetina y b) rutina.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 25. Gráficos de consumo de astaxantina en emulsión base, con polifenol solubilizado en su fase acuosa y en emulsión estabilizada con AMSNP y polifenol a) quercetina y b) rutina.</i>	<i>68</i>
<i>Figura 26. Gráficos de consumo de astaxantina en emulsión base, con a) AMSNP-DETA y b) AMSNP-APTES y en emulsión estabilizada con AMSNP y polifenol.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 27. Cromatogramas HPLC de a) quercetina sin fotolizar y b) quercetina fotooxidada.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 28. Gráficos consumo de astaxantina en emulsión base, emulsión con quercetina en su fase acuosa y emulsión con quercetina y AMSNP en comparación a una emulsión con AMSNP y quercetina fotooxidada.....</i>	<i>75</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Formulaciones de emulsiones.	22
Tabla 2.	Cantidades agregadas a la emulsión para la incorporación de polifenoles.....	24
Tabla 3.	Cantidades agregadas a la emulsión para la incorporación de AMSNP-DETA.....	25
Tabla 4.	Cantidades agregadas a la emulsión para la incorporación de AMSNP-APTES.....	25
Tabla 5.	Cantidades agregadas a la emulsión para la incorporación de AMSNP-APTES y polifenol quercetina en distintas concentraciones.....	26
Tabla 6.	Valores de potencial zeta de las nanopartículas mesoporosas, aminofuncionalizadas y con flavonoides adsorbidos.....	33
Tabla 7.	Valores de tamaño de las nanopartículas en términos de número, volumen e intensidad.....	34
Tabla 8.	Máximos de absorbancia de los flavonoides quercetina y rutina en los distintos solventes.	38
Tabla 9.	Curva de calibración de los flavonoides quercetina y rutina en los solventes etanol, glicerina 10% y agua.	38
Tabla 10.	Valores de desviación estándar relativa para las metodologías analíticas de los flavonoides quercetina y rutina en los distintos solventes.....	39
Tabla 11.	Resultados del cálculo de eficiencia de encapsulación (EE) y de porcentaje de carga (LC) de los flavonoides en sus distintas concentraciones a los distintos tipos de nanopartículas.	41
Tabla 12.	Valores de viscosidad de emulsión con astaxantina 0,1% y vitamina E 0,5% luego de agitación, de 24 horas de reposo y con 0,5% de AMSNP-DETA.....	53
Tabla 13.	Porcentaje de recuperación de vitamina E.	53

GLOSARIO

- **AX:** Astaxantina.
- **ACN:** Acetonitrilo.
- **AMSNP:** Nanopartículas de Sílice Mesoporosas Aminofuncionalizadas.
- **AMSNP-APTES:** Nanopartículas de Sílice Mesoporosas Aminofuncionalizadas con grupos amino de cadena corta / APTES.
- **AMSNP-DETA:** Nanopartículas de Sílice Mesoporosas Aminofuncionalizadas con grupos amino de cadena larga /DETA.
- **AMSNP-A-R:** Nanopartículas de Sílice Mesoporosas Aminofuncionalizadas con APTES y con rutina incorporada.
- **AMSNP-A-Q:** Nanopartículas de Sílice Mesoporosas Aminofuncionalizadas con APTES y con quercetina incorporada.
- **AMSNP-D-R:** Nanopartículas de Sílice Mesoporosas Aminofuncionalizadas con DETA y con rutina incorporada.
- **AMSNP-D-Q:** Nanopartículas de Sílice Mesoporosas Aminofuncionalizadas con DETA y con quercetina incorporada.
- **API:** Principio Activo.
- **APTES:** Aminopropil Trietoxisilano.
- **CTAB:** Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio.
- **DAD:** Detector de arreglo de diodos.
- **DETA:** N-(3-Trimetoxisililpropil)-Dietilentriamina.
- **DLS:** Dispersión Dinámica de Luz.
- **E-AX:** Emulsión base con astaxantina incorporada al interior del glóbulo de aceite.
- **E-VE:** Emulsión base con vitamina E incorporada al interior del glóbulo de aceite.
- **FT-IR:** Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.
- **HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
- **H₂O₂:** Peróxido de Hidrógeno.
- **MSNP:** Nanopartículas de Sílice Mesoporosas.
- **O/W:** Aceite en Agua.
- **Q:** Quercetina (Quercetin).
- **R:** Rutina (Rutin).
- **TEM:** Microscopio Electrónico de Transmisión.
- **SNP:** Nanopartículas de Sílice.
- **TEOS:** Tetraetil Ortosilicato.
- **TFA:** Ácido Trifluoroacético.
- **UV-vis:** Espectroscopía en Rango Ultravioleta y Visible.
- **VIT. E:** Vitamina E.

RESUMEN

El uso de emulsiones Pickering, sistemas considerados como “libres de tensoactivos” al ser estabilizados por la adsorción de partículas a su interfase, es de gran importancia para la industria y sus consumidores pues poseen la característica de ser “amigables con el medio ambiente”. En particular, el uso de nanopartículas de sílice como emulgentes en estos sistemas ha sido ampliamente utilizado, pues son partículas fáciles de sintetizar, con una gran área superficial y pueden ser modificadas en su superficie con moléculas de distinta naturaleza, ya sea a través de uniones covalentes o de interacciones de carácter electrostático.

De esta forma, la interacción de la sílice con compuestos polifenólicos con propiedades antioxidante, que permitan la estabilización de la interfase de emulsiones o/w es una interesante área de estudio para la obtención de una barrera antioxidante que estabilice compuestos lábiles solubilizados al interior del glóbulo oleoso, obteniendo un emulgente sólido con propiedades antioxidantes que sea de utilidad para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria.

El objetivo de esta tesis es evaluar el efecto de la adsorción de flavonoides sobre la estabilidad química de una emulsión Pickering o/w; para lo cual se seleccionaron los antioxidantes quercetina y rutina, los que de forma individual fueron solubilizados a bajas concentraciones en la fase acuosa de la emulsión previamente estabilizada con nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas con APTES y DETA.

Los resultados obtenidos del estudio de capacidad de adsorción, muestran altos porcentajes de eficacia de adsorción de los flavonoides a las nanopartículas aminofuncionalizadas cuando estas están dispersas en una solución de glicerina al 10%.

La evaluación del efecto sobre la estabilidad oxidativa se realizó midiendo el consumo de compuestos bioactivos como la vitamina E y la astaxantina en emulsiones expuestas a condiciones de estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno y almacenamiento en estufa a 40°C y, con peróxido de hidrógeno y fotólisis con una lámpara de luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos en el estudio de consumo de astaxantina evidenciaron que, las emulsiones que contenían rutina en su fase acuosa y nanopartículas en su interfase mostraron un claro efecto protector con respecto a la emulsión con solo rutina en su fase acuosa, mientras que, para el flavonoide quercetina, la emulsión que contenía AMSNP-APTÉS presento una disminución del consumo de astaxantina. Así, las emulsiones que contenían rutina/AMSNP-DETA y quercetina/AMSNP-APTÉS fueron las que presentaron un mayor efecto protector sobre la estabilidad química de la emulsión con respecto a una emulsión base y a las emulsiones con solo flavonoide en su fase acuosa.

El análisis de resultados muestra que la incorporación de una baja cantidad de flavonoide (0,01%) a emulsiones que contienen nanopartículas mesoporosas aminofuncionalizadas, no contribuye a la estabilidad química de la emulsión bajo las condiciones de fotooxidación realizadas en este estudio.

Finalmente, al incorporar quercetina oxidada a la formulación estudiada, no se evidenció un efecto protector del producto fotooxidado sobre la estabilidad de astaxantina, indicando que la oxidación del flavonoide podría ser la razón de la ausencia del efecto antioxidante de los flavonoides observado en este trabajo.

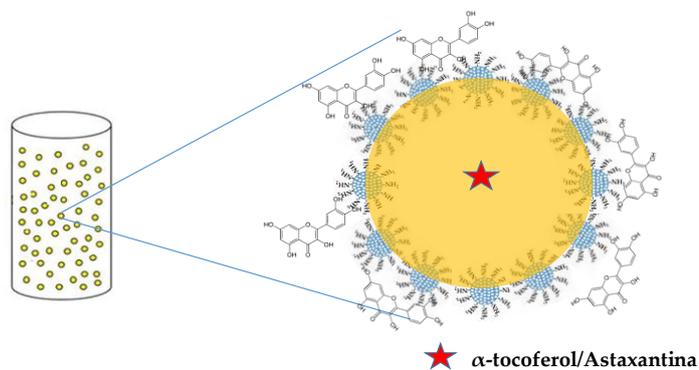


Figura 1. Propuesta básica de trabajo: Emulsión Pickering o/w con antioxidantes adsorbidos desde la fase acuosa.

SUMMARY

The use of Pickering emulsions, systems considered "surfactant-free" as they are stabilized by the adsorption of particles at their interface, is of great importance for the industry and its consumers, since they have the characteristic of being "environmentally friendly". In particular, the use of silica nanoparticles as emulsifiers in these systems has been widely used, since they are easy to synthesize particles, with a large surface area and can be modified on their surface with molecules of a different nature, either through covalent bonds or electrostatic interactions.

In this way, the interaction of silica with polyphenolic compounds with antioxidant properties, which allow the stabilization of the interface of o/w emulsions, is an interesting area of study to obtaining an antioxidant barrier that stabilizes labile compounds solubilized inside the oily globule, obtaining a solid emulsifier with antioxidant properties that is useful for the pharmaceutical, cosmetic and food industries.

The objective of this thesis is to evaluate the effect of flavonoid adsorption on the chemical stability of a o/w Pickering emulsion; for which the antioxidants quercetin and rutin were selected, which were individually solubilized in low concentration in the aqueous phase of the emulsion previously stabilized with amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles with APTES and DETA.

The results obtained from the adsorption capacity study show high percentages of adsorption efficiency of the flavonoids to the aminofunctionalized nanoparticles when they are dispersed in a 10% glycerin solution.

The evaluation of the effect on oxidative stability was carried out by measuring the consumption of bioactive compounds such as vitamin E and astaxanthin in emulsions exposed to conditions of oxidative stress generated by hydrogen peroxide and storage in an oven at 40°C and, with hydrogen peroxide and photolysis with an ultraviolet light lamp.

The results obtained in the astaxanthin consumption study showed that, the emulsions containing rutin in its aqueous phase and nanoparticles in its interface showed a clear protective effect with respect to the emulsion with only rutin in its aqueous phase, while for the flavonoid quercetin, the emulsion containing AMSNP-APTES showed a decrease in the consumption of astaxanthin. Thus, the emulsions containing rutin/AMSNP-DETA and quercetin/AMSNP-APTES were the ones that presented a greater protective effect on the chemical stability of the emulsion with respect to a base emulsion and emulsions with only flavonoids in their aqueous phase.

The analysis of results shows that the incorporation of a low amount of flavonoid (0.01%) to emulsions containing aminofunctionalized mesoporous nanoparticles does not contribute to the chemical stability of the emulsion under the photooxidation conditions carried out in this study.

Finally, when incorporating oxidized quercetin to the studied formulation, a protective effect of the photo-oxidized product on the stability of astaxanthin was not evidenced, indicating that the oxidation of the flavonoid could be the reason for the absence of the antioxidant effect of flavonoids observed in this work.

1. INTRODUCCIÓN

EMULSIONES Y EMULSIONES PICKERING.

Las emulsiones son sistemas dispersos ampliamente utilizados en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Las emulsiones farmacéuticas pueden ser utilizadas como vehículos para ser administrados por diversas vías. Así, para la vía oral, las emulsiones aumentan la absorción y protegen a los principios activos (API) lipofílicos, además de enmascarar sabores o texturas no placenteras; mientras que, para la vía tópica, las emulsiones aumentan la permeabilidad del activo y, dependiendo del tipo de emulsión, pueden ser fácilmente removibles de la piel o tener un efecto oclusivo que ayuda a hidratar la capa superior de la piel evitando la evaporación [1,2].

Una emulsión es un sistema disperso formado por la mezcla de dos o más líquidos inmiscibles, que constituyen un sistema heterogéneo, en el cual uno de estos líquidos se dispersa uniformemente en el otro en forma de pequeños glóbulos. Al primero se le denomina fase externa (continua o dispersante), mientras que a los glóbulos se les denomina fase interna (discontinua o dispersa). Según el tipo de líquido que corresponda a cada fase, existen dos tipos de emulsiones predominantes: 1) las emulsiones aceite en agua (o/w), si la fase interna corresponde a glóbulos de aceite y la fase externa a agua; 2) agua en aceite (w/o) en el caso inverso, donde el agua está dispersa como glóbulos en el aceite. Además, se han descrito sistemas trifásicos, agua en aceite en agua (w/o/w), donde el agua está dispersa en aceite y éste a su vez está disperso en agua; y también un sistema de tipo aceite en agua en aceite (o/w/o) [1,2,3,4].

Estos sistemas pueden encapsular ingredientes activos dentro de los glóbulos. Así, si el API es hidrofílico se solubilizará en una emulsión de tipo w/o, mientras que, si el API es hidrofóbico, se solubilizará en una emulsión de tipo o/w. Esta capacidad de solubilizar compuestos dentro de los glóbulos le permite a la emulsión proteger al

activo, mejorando su biodisponibilidad, además de controlar su liberación desde los glóbulos [1].

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, ya que al dispersar un líquido en otro -en forma de pequeñas gotas o también llamados glóbulos- se produce un aumento del área interfacial entre ambas fases, produciendo un aumento de la energía libre y, en consecuencia, el sistema tenderá a recuperar su estado inicial de menor energía, agrupando así los glóbulos hasta fusionarlos y formar nuevamente dos fases inmiscibles con menor energía interfacial. Para evitar este fenómeno se necesita el uso de un estabilizante que se localice en la interfase de la emulsión, formando un film o capa alrededor de los glóbulos impidiendo su agregación (coalescencia) [3,5].

Este estabilizante es conocido como emulsificante, el cual puede ser de 3 tipos dependiendo de su mecanismo: agentes tensoactivos, coloides hidrofílicos y sólidos finamente divididos [2, 4]. Los más comunes son los agentes tensoactivos, que pueden ser de carácter iónico, no iónico o anfifílicos. Un tensoactivo o surfactante corresponde a una sustancia química que modifica las propiedades de la superficie o interfase al adsorberse formando un film monomolecular, disminuyendo la tensión superficial y reduciendo la energía libre [4,6]. Existen algunos tensoactivos que pueden provocar irritación y reacciones alérgicas, por lo que sus aplicaciones son limitadas en las industrias alimentarias, cosmética y farmacéutica. Los coloides hidrofílicos, en su mayoría naturales, forman un film multimolecular alrededor de los glóbulos en emulsiones o/w, aumentando la viscosidad de la fase externa, produciendo la mejora en la estabilidad de la emulsión [2,6]. Mientras que, los sólidos finamente divididos, son partículas que se adsorben a la interfase entre dos líquidos inmiscibles formando un film sólido alrededor de los glóbulos dispersos. Las emulsiones que utilizan este tipo de emulsificante son denominadas emulsiones Pickering [2,6], esto les confiere a estas emulsiones el carácter de ser “*free surfactant*”, lo que las hace muy atractivas para la industria y la población (figura 2) [2,7].

Las emulsiones Pickering se caracterizan por poseer una buena estabilidad, alta resistencia contra la coalescencia, y versatilidad [2, 3,7]. Se han utilizado numerosos tipos de partículas para preparar este tipo de emulsiones, como partículas de sílice, metálicas, arcillas naturales, polímeros, celulosa y almidón; entre otras [1]. Estas emulsiones pueden fabricarse utilizando los mismos métodos que para la fabricación de emulsiones convencionales, como son la homogeneización convencional, la homogeneización a alta presión y la sonicación [1,3].

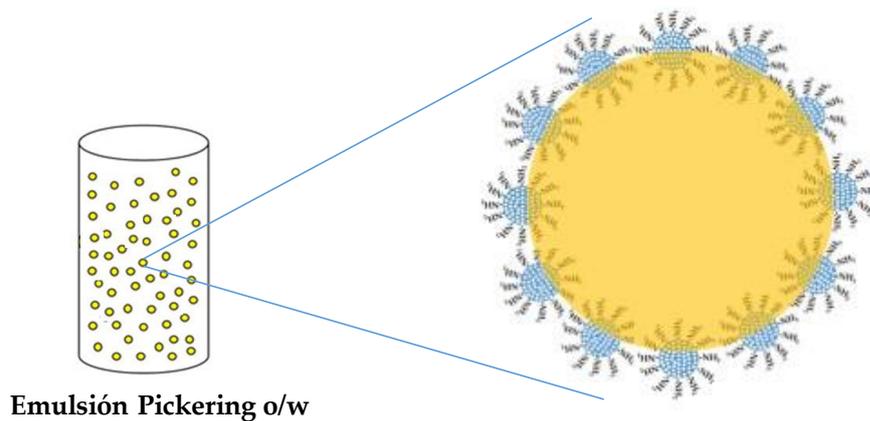


Figura 2. Modelo de emulsión Pickering o/w. Figura de elaboración propia.

Las partículas sólidas para ser utilizadas en emulsiones Pickering deben tener la mojabilidad suficiente para interactuar con ambas fases, lo que les permite adsorberse irreversiblemente y fijarse en la interfase aceite-agua alrededor de los glóbulos, formando una densa capa de adsorción que provee de una barrera física para prevenir el contacto entre glóbulos. La **mojabilidad** de la partícula está determinada por un **ángulo de contacto** entre ambas fases y entre una fase y la partícula, siendo este ángulo equivalente al BHL en el caso de emulsiones estabilizadas con surfactante, pues denota la afinidad relativa de las partículas por el aceite y el agua.

Si el ángulo es menor a 90° , las partículas estabilizan emulsiones o/w y si el ángulo es mayor a 90° , las partículas estabilizan emulsiones w/o. Para tener un firme anclaje de las partículas a la interfase, el ángulo debe ser cercano a 90° , aunque esta regla no

siempre se cumple, pues existen otros parámetros que influyen en el tipo de emulsión y que pueden invertir esta regla [1, 2, 3,7].

Otros parámetros importantes que afectan la estabilidad y el tipo de emulsión son los tipos de componentes de la **fase oleosa y la proporción de fase oleosa/fase acuosa**. La elección del tipo de aceite de la fase oleosa es crucial, debido a que condiciona directamente al ángulo de contacto. Además, su polaridad puede inducir un cambio en el tipo de emulsión y su viscosidad puede influir en el tamaño de glóbulo, ambos factores influenciando su estabilidad, pues es un factor amortiguador para las partículas, ya que enlentece la velocidad de difusión y adsorción de las partículas. La proporción de fase oleosa/fase acuosa tiene efecto sobre el tamaño del glóbulo y en el tipo de emulsión. Así, si se aumenta la proporción de la fase dispersa, esto conduce a un aumento del área de la interfase y -por otra parte- si mantenemos la cantidad de partículas constante, no sería posible estabilizar un área interfacial mayor.

Es de conocimiento que las partículas utilizadas para estabilizar emulsiones Pickering deben ser sustancialmente más pequeñas que los glóbulos, pues este afecta a la estabilidad y tamaño de glóbulo. Estas partículas pueden presentar diferentes formas, siendo las más comunes las partículas de tipo esférico, aunque actualmente existen varios estudios con partículas no esféricas, cuyo mecanismo de estabilización no es exactamente el mismo que las primeras [1,7].

La **concentración de las partículas** puede inducir una inversión de fases y alterar el tamaño del glóbulo. De esta forma, cuando se utilizan concentraciones altas de nanopartículas, será menor el tamaño de glóbulo; sin embargo, es común que con bajas concentraciones se observen inestabilidades debido a la falta de partículas que estabilicen los glóbulos o también podría ocurrir que los glóbulos se estabilicen instantáneamente, lo que puede provocar un tamaño heterogéneo o que -aunque sean homogéneos- las partículas en exceso formen una red en la fase continua que aumente la estabilidad de la emulsión. [1,7].

Finalmente existen ciertas características de las emulsiones que se pueden modificar para mejorar su estabilidad, entre estas la carga superficial de la partícula. Además, la modificación del pH o de la concentración de electrolitos produce variaciones tanto en la carga como también en el ángulo de contacto, por lo que no es raro que el pH se controle para obtener ciertos valores deseados de estos parámetros [1].

NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE.

Como se describió anteriormente, una gran variedad de materiales pueden ser utilizados como emulsificador o estabilizante en emulsiones Pickering, siendo uno de los materiales más comúnmente utilizados las nanopartículas de sílice [2,8]. Su síntesis se realiza a través de una reacción de Stöber [9], que se basa en la condensación de un precursor de sílice que, en medio alcohólico, y en presencia de un catalizador correspondiente a hidróxido de amonio u otro álcali, condensará produciendo esferas de sílice amorfa. Esta reacción se modifica cuando se quiere conseguir nanopartículas de sílice mesoporosas, agregando un surfactante catiónico en condiciones básicas al precursor de sílice, el cual actúa como un molde o plantilla. En esta síntesis se tienen dos reacciones claves: la hidrólisis del alcóxido y la polimerización por condensación.

Estas nanopartículas inorgánicas poseen varias características atractivas, pues son inertes, biodegradables, biocompatibles con el cuerpo humano, son ópticamente transparentes, poseen una elevada área superficial que permite almacenar una gran carga, tienen un elevado volumen de poro que es modificable con una estrecha distribución, tienen una alta estabilidad física y química, son fácilmente sintetizables y son fácilmente modificables morfológicamente (control en tamaño, poro y forma) [2,9]. Cabe señalar que el tamaño, forma y regularidad de las partículas dependen de diversas variables que afectan la síntesis, como la temperatura, la velocidad de adición, la agitación y la cantidad de catalizador [10].

Como ya se describió anteriormente, uno de los principales atractivos de estas nanopartículas es la facilidad con la que se puede modificar su superficie, para lo cual existen varios métodos, como el método de injerto o el método de co-

condensación. El primero corresponde a un método post-sintético que permite incorporar grupos funcionales por silanización y el segundo corresponde a un método donde se agrega un siloxano funcionalizado junto al precursor de sílice. Esta segunda reacción permite una distribución homogénea y con morfología más controlada. Además, con el fin de conferir mayor complejidad a las nanopartículas se han descrito procesos de post funcionalización que permiten incorporar prácticamente cualquier grupo funcional, procesos que implican la formación de enlaces covalentes (figura 3) [10].

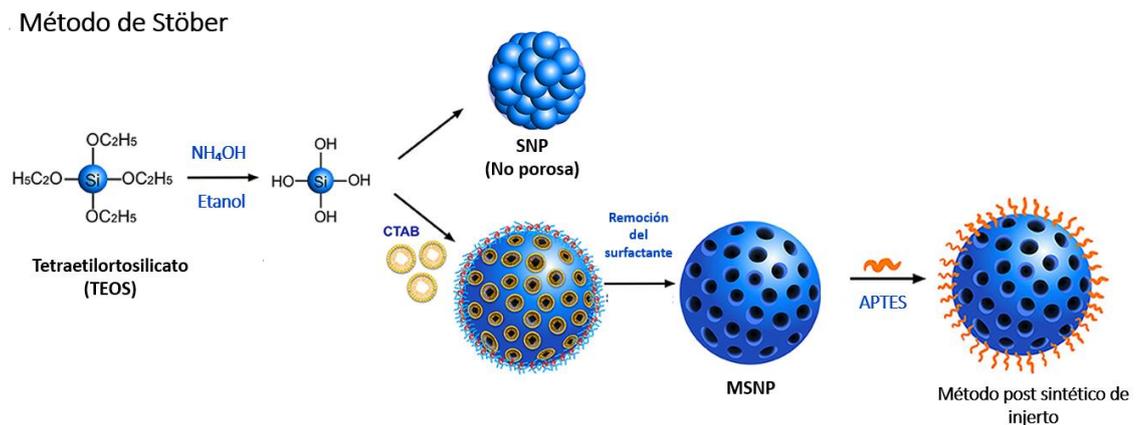


Figura 3. Esquema método de Stöber con funcionalización a través del método post sintético de injerto. Figura adaptada de Zulkiflee y col. 2022 (<https://doi.org/10.3390/polym14194219>).

Dadas estas características, varios estudios han estudiado la utilización de nanopartículas de sílice. Así, algunos trabajos se han enfocado en su utilización como emulgentes para estabilizar emulsiones Pickering y sus aplicaciones por vía tópica, donde el tamaño de las nanopartículas es un factor crucial, puesto que éstas no deben penetrar la barrera de la piel. Algunos estudios han definido que para evitar la penetración de la barrera de la piel, el tamaño de las nanopartículas debe ser superior a 75 nm [11,12,13,14].

Otros estudios encontrados en la literatura presentan más evidencia de la importancia de estas preparaciones, por ejemplo, Frelichowska y col. (2009) estudiaron

emulsiones Pickering o/w estabilizadas con nanopartículas de sílice, evidenciando que estas emulsiones podrían prepararse mediante métodos de emulsificación clásicos siempre que se usen aceites polares. Las emulsiones de este tipo fueron muy estables y no presentaron separación de fases; además determinaron que dado un tipo de aceite, existe un recubrimiento óptimo de las partículas de sílice [8].

Morales y col. (2020) funcionalizaron nanopartículas de sílice del tipo *core-shell* con ácido carmínico, incorporándolas a emulsiones o/w, evaluando su capacidad antioxidante y colorante [15]. Por su parte, Berlier y col. (2013) estudiaron la inmovilización y estabilización de quercetina en nanopartículas de sílice mesoporosas considerando la modificación superficial por funcionalización con octilo [16]. La inmovilización de quercetina en sílice funcionalizada con octilo aumentó la estabilidad sin disminuir la eficacia antioxidante, abriendo el camino para un empleo innovador de materiales compuestos mesoporosos en el campo del cuidado de la piel. Deligiannakis y col. (2012) introdujeron el término “nano-antioxidante”, donde se utilizaron nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas conjugadas con ácido gálico en su superficie [17]. Schlipf y col. (2015) evaluaron la adsorción de quercetina con NP de sílice funcionalizadas con titanio. La actividad antioxidante de la quercetina adsorbida en las NP se determinó a partir de la reducción del radical DPPH en presencia de antioxidantes [18]. Morales y col. (2019) reportaron un nuevo nano portador híbrido compuesto por nano esferas de sílice *core-shell* y ácido cafeico ligado a la superficie, evaluando su capacidad antioxidante *in vitro*. Los resultados mostraron que la actividad captadora de radicales del ácido cafeico inmovilizado se atenuó en las nano-esferas de sílice; sin embargo, se mejoraron otras propiedades antioxidantes como la actividad quelante del Fe^{2+} y la desactivación de oxígeno singulete [19]. Previamente, este mismo grupo de trabajo (Morales y col., 2016) evaluó la capacidad antioxidante y la cinética de adsorción de morina en nanopartículas de sílice, demostrando que la morina adsorbida en estas exhibe un efecto sinérgico sobre la capacidad antioxidante frente a radicales hidroxilos [20].

ESTABILIDAD DE EMULSIONES.

Probablemente la consideración más importante con respecto a las emulsiones es la estabilidad del producto final. La estabilidad de una emulsión está caracterizada por la ausencia de fenómenos físicos y químicos que originan la inestabilidad, además de la mantención de su aspecto final (olor, color y otras propiedades físicas).

Los glóbulos de una emulsión se encuentran en constante movimiento debido a efectos térmicos y gravitacionales, lo que provoca un constante choque entre ellos. La disrupción de la emulsión puede ocurrir a través de diferentes fenómenos físicos, los que corresponden al crecimiento o maduración de Ostwald, el cremado o *creaming*, la floculación y la coalescencia, estos fenómenos pueden o no ocurrir de forma independiente [2,4,6].

Además, las emulsiones contienen un gran porcentaje de agua, por lo que es necesario incorporar compuestos conservantes que prevengan el desarrollo de microorganismos que produzcan el deterioro de la emulsión. Los conservantes requieren especial cuidado en el control de pH pues su efectividad puede verse disminuida si no es el adecuado [2].

Por otra parte, las emulsiones también pueden presentar fenómenos de inestabilidad química, debido a incompatibilidades entre los componentes de su formulación, ya sea por cambios de la solubilidad de un componente por la adición de otro o por características innatas de algunos componentes, como es el caso de los activos fotosensibles que son fácilmente degradables. Existen reacciones que dan cuenta de incompatibilidades, como lo son las reacciones ácido-base, oxidación, fotólisis, entre otras. En particular las emulsiones están compuestas en parte por mezclas de aceites y/o grasas, derivados de ácidos grasos, que son fácilmente oxidables, lo que provoca la pérdida de sus características organolépticas y, en consecuencia, el deterioro del producto final. Por lo tanto, la oxidación de lípidos es una preocupación para la industria, ya que produce olores y sabores rancios, disminuye su vida útil, altera las texturas y el color, disminuyendo el valor nutricional y comercial en el caso de productos alimenticios [21]. Tradicionalmente, el uso de antioxidantes tradicionales

como butilhidroquinona terciaria (TBHQ), hidroxilanol butilado (BHA), hidroxiltolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG) o galato de octilo (OG) retardan la oxidación de aceites insaturados, minimizan los cambios de color y textura y previenen la inestabilidad química, como también pueden retardar la degradación de determinados principios activos como las vitaminas (A, E y C) o quelantes, como el EDTA, capaces de secuestrar metales responsables de la oxidación [2,3].

Sin embargo, en la actualidad, las investigaciones se enfocan en buscar antioxidantes de origen natural en vez de sintéticos o tradicionales [21], los cuales otorgarían también propiedades beneficiosas para la salud, como el control del fotoenvejecimiento en el caso de emulsiones tópicas. De esta forma, compuestos naturales como los polifenoles (tocoferoles y flavonoides) han atraído un creciente interés [22].

POLIFENOLES: QUERCETINA Y RUTINA.

Los polifenoles son una clase de compuestos naturales presentes en frutas y verduras (té, uvas, vino, cerveza, aceite de oliva, café, chocolate, cacahuets y otros) y se caracterizan por la presencia de uno o varios anillos de benceno con una o más funcionalidades hidroxilo. Comúnmente, los compuestos fenólicos presentes en la naturaleza se conjugan con azúcares o ácidos orgánicos y se pueden dividir en dos grupos principales, flavonoides y no flavonoides. La primera clase muestra una estructura básica caracterizada por dos anillos de benceno unidos a través de un anillo C de pirona heterocíclico, mientras que los no flavonoides consisten en un grupo heterogéneo de moléculas (ácidos benzoicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, lignanos y taninos hidrolizables, galotaninos y elagitaninos).

Los compuestos polifenólicos se caracterizan por una alta sensibilidad a varios factores ambientales. Así, estas sustancias naturales son sensibles al calor, la luz y el pH, y pueden oxidarse muy rápidamente con una pérdida considerable de actividad. Es por esto que el desarrollo de formulaciones que permitan estabilizar y proteger estos compuestos es actualmente de gran interés. Para superar los inconvenientes asociados con la baja estabilidad de los polifenoles, se han desarrollado varios

sistemas, entre los que se destacan su inclusión en estructuras supramoleculares caracterizadas por la presencia de cavidades donde la molécula puede difundir.

Existen varios estudios en la literatura que se enfocan en la utilización de antioxidantes naturales como estabilizadores de emulsiones, por ejemplo, **Luo y col. (2012)** demostraron que los flavonoides son capaces de estabilizar emulsiones o/w al adsorberse como partículas insolubles en agua a la superficie de los glóbulos de aceite, formando una capa de partículas difícil de remover y siendo una barrera estérica efectiva contra la coalescencia [23]. Además, mostraron que aparentemente no existe una relación simple entre el log P de los flavonoides y su habilidad de estabilizar en un modelo de emulsiones de n-tetradecano en agua [24]. De todas formas, es difícil predecir qué tan buen emulsificante será el flavonoide solo basándose en su estructura molecular y log P, lo que puede ser debido a la diferencia de tamaño, forma y carga superficial de estos compuestos que afectan su ángulo de contacto y energía de adsorción a la interfase aceite-agua [25].

Por otro lado, Kiokias y col. (2014) determinaron que la quercetina presenta un efecto antioxidante en un rango de concentraciones (0,75 a 3 mmol kg⁻¹) testado al utilizarlo en un modelo de emulsión alimentaria o/w, por lo que se concluyó que el potencial antioxidante de la quercetina aumenta con la concentración [21].

Noon y col. (2020) evaluaron la eficacia de 4 antioxidantes naturales (quercetina, curcumina, rutina y ácido ascórbico) para combatir la oxidación de lípidos en diferentes entornos de emulsiones o/w. Para las emulsiones que no contenían hierro, los compuestos quercetina y ácido ascórbico exhibieron los niveles más altos de inhibición de DPPH y ferrozina, proporcionando la mejor estabilidad oxidativa. Por el contrario, en presencia de hierro, la eficacia antioxidante se redujo drásticamente y, en algunos casos, resultó en actividad prooxidante [26].

Lue y col. (2016) estudiaron el efecto antioxidante de rutina y sus derivados (laurato de rutina y palmitato de rutina) en aceites y emulsiones o/w. Los resultados mostraron que el uso de alquilación de un flavonoide para que sea más lipofílico no mejora la actividad antioxidante, no habiendo concordancia con la **paradoja polar**. Esta paradoja expone que los compuestos lipofílicos o anfifílicos funcionan mejor en sistemas polares, como las emulsiones o/w, esto debido a la habilidad mejorada

de orientarse a sí mismos cerca de la interfase aceite-agua, donde la oxidación lipídica es iniciada en las emulsiones [27].

Noon y col. (2019) evaluaron el efecto de partículas de hidrato de rutina como antioxidantes para combatir la oxidación de lípidos en emulsiones Pickering o/w, siendo estas partículas estabilizadores físicos y químicos de emulsiones. Los resultados mostraron que las emulsiones eran estables por un máximo de 14 días, y su estabilidad oxidativa fue mayor que las emulsiones convencionales [25].

Yang y col. (2015) investigaron los efectos de los flavonoides sobre la estabilidad física y oxidativa de emulsiones o/w de aceite de soja, demostrando que la adición de 100 ppm de flavonoides como hesperidina, hesperitina, rutina y quercetina, mejoraron la estabilidad física de las emulsiones, pero no mostraron cambios en los valores de tamaño de partícula, en comparación con las emulsiones preparadas en ausencia de flavonoides. Además, la quercetina demostró la mayor actividad antioxidante, seguido por rutina, hesperitina y hesperidina [28].

Asimismo, existen múltiples estudios respecto de las distintas aplicaciones en las que se pueden utilizar, por ejemplo, en el ámbito de la industria cosmética. Cefali y col. (2019) estudiaron la adición de una mezcla de flavonoides para el desarrollo de una emulsión fitocosmética como protector solar, obteniendo una emulsión adecuada para la aplicación tópica que demostró ser antioxidante y protector UVA [29]. Dyja y col. (2017) estudiaron la liberación y retención cutánea de los flavonoides quercetina y rutina en formulaciones semisólidas con diferentes aditivos, concluyendo que la elección del solvente agregado es crucial para mejorar la liberación cutánea de los flavonoides [30].

Luo y col. (2012) mostraron la capacidad de los flavonoides tilirosido, rutina y naringina, de actuar como emulsificantes Pickering dependiente del pH. Esto debido a que existen cambios en la solubilidad de los compuestos en función del pH que puede incrementar la proporción de moléculas de flavonoides tensoactivas [24]. Particularmente en este estudio se plantea la incorporación de forma independiente de los polifenoles quercetina y rutina como antioxidantes hidrofílicos solubilizados en la fase acuosa de la emulsión, para evaluar el efecto de su adsorción a la interfase del glóbulo estabilizada con nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas.

La quercetina se encuentra abundantemente en varios vegetales y frutas comestibles, como la cebolla, manzanas, uvas rojas, brócoli, cereza, así como en el té y el vino tinto [31,32]. La quercetina es un compuesto polifenólico, que pertenece al grupo de los flavonoides, presenta una baja solubilidad en agua, una baja biodisponibilidad y alta inestabilidad a los cambios físicos y químicos [31,33] (figura 4).

Existe una creciente evidencia que muestra que la quercetina tiene un gran potencial terapéutico en la prevención y el tratamiento de enfermedades, ya que se le atribuyen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antiagregantes, y vasodilatadoras, lo que la convierte en una aplicación prometedora en la industria alimentaria funcional, cosmética y farmacéutica [31,32,33].

La quercetina es un conocido y eficiente antioxidante, que tiene un efecto protector de las células epiteliales gástricas contra el daño oxidativo; regula el balance entre los compuestos oxidantes y antioxidantes y puede proteger eficazmente a las células de la toxicidad genética y el daño inducido por la radiación al eliminar los radicales libres y aumentar los niveles de antioxidantes endógenos [32].

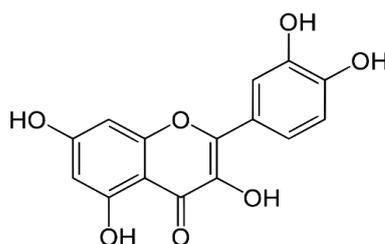


Figura 4. Estructura química de la quercetina.

Por otra parte, la rutina derivado natural de las flavonas, es un compuesto polifenólico de bajo peso molecular que se encuentra ampliamente distribuido en frutas y vegetales [34], como la pasiflora, el trigo sarraceno, los espárragos, las manzanas y el té [35]. Químicamente, la rutina es un glucósido de flavonol (quercetina y disacárido de rutinosa) que está compuesto por una porción fenólica básica ligada a la molécula de azúcar, lo que reduce su actividad biológica, pero hace que la molécula sea más soluble en el componente polar [29] (figura 5). Se le atribuyen diversas actividades farmacológicas que incluyen propiedades

antialérgicas, antiinflamatorias y vasoactivas, antitumorales, antibacterianas, antivirales, antiprotozoario, antiplaquetarias y antihipertensivas, entre otras; además de fortalecer los capilares de los vasos sanguíneos, resultado de su alta actividad captadora de radicales libres y capacidad antioxidante [34].

Es utilizada en la industria farmacéutica, cosmética y química como un antioxidante y colorante, así como en las industrias de alimentos para animales. Además, también se utiliza como conservante de alimentos, estabilizador y absorbente de rayos UV. La rutina también está presente en varios medicamentos a base de hierbas y preparaciones multivitamínicas disponibles en el mercado [35].

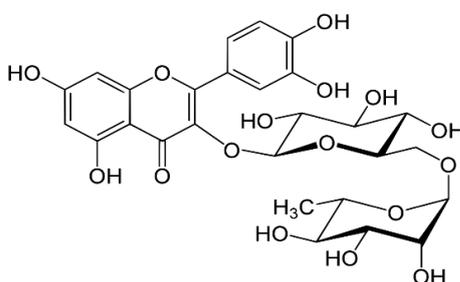


Figura 5. Estructura química de la rutina.

ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS: ASTAXANTINA Y VITAMINA E.

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas [36,37]. La oxidación es una reacción que puede generar radicales libres, que producen reacciones en cadena, dañinas para las células y otros sistemas. Los antioxidantes terminan reacciones removiendo a los radicales libres del sistema ya sea reaccionando con ellos y produciendo compuestos inocuos o interrumpiendo las reacciones de oxidación [36,37,38]. Existen una gran variedad de antioxidantes naturales entre los que se encuentran los compuestos vitamina E y astaxantina reconocidos por su alta actividad antioxidante, donde se ha reportado que este último sobrepasa ampliamente al primero [37,38].

La vitamina E es abundante en nuestra dieta y está presente en numerosos suplementos alimenticios [32]. La mayor fuente de vitamina E son los aceites vegetales, como el aceite de soja, maravilla, nuez, semilla de algodón, palma, trigo y germen de maíz, los que contienen relativamente altas cantidades de vitamina E (aproximadamente 50 mg de vitamina E/100 g de aceite). Además, es un compuesto ampliamente utilizado en productos cosméticos como shampoo y cremas destinadas a prevenir el envejecimiento de la piel [2,39].

El término Vitamina E es un colectivo usado para todos los compuestos tocoferoles (α -, β -, γ - y δ -tocoferol) y tocotrienoles (α -, β -, γ - y δ -tocotrienol) encontrados en los alimentos, estos compuestos son derivados del 6-cromanol, por lo que presentan un anillo cromo y una cola de fitilo, y cada compuesto difiere en el número y posición de los grupos metilos en el anillo [25,39,40,41] (figura 6).

La vitamina E es un importante antioxidante liposoluble cuyo papel principal es prevenir el daño tisular generado por radicales libres y por la fotocarcinogénesis [2]. De los 8 compuestos de la vitamina E, el α -tocoferol presenta la mayor actividad antioxidante, y su depleción es un marcador sensible del daño oxidativo generado por el ambiente. Este compuesto elimina los radicales peroxilo y pone fin a la oxidación de ácidos grasos polinsaturados (PUFAs), ya que, en presencia de α -tocoferol, los radicales peroxilo reaccionan con este en lugar de los hidroperóxidos del lípido, en consecuencia, se detiene la reacción en cadena de la producción de radicales peroxilo y se evita una mayor oxidación de los PUFA [39].

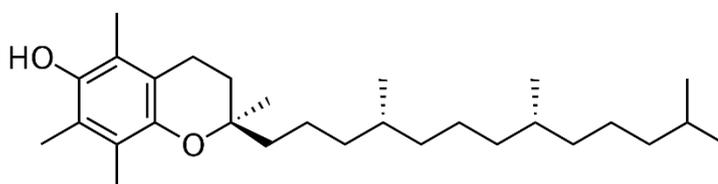


Figura 6. Estructura química de la vitamina E (α -tocoferol).

Por otra parte, la astaxantina o 3,3'-dihidroxi-caroten-4,4'-diona, es un caroteno de la familia de las xantófilas cuya principal fuente de obtención es la microalga *haematococcus pluvialis*, aunque también es posible encontrarla en alimentos más comunes como el salmón, langosta, camarón, trucha y besugo [36]. La astaxantina es un pigmento rojo con importantes aplicaciones en la industria nutracéutica,

cosmética y alimentaria, donde además de su efecto sobre la coloración es utilizada debido a su actividad antioxidante, que se ha reportado supera la del β -caroteno y la del α -tocoferol [36,37]. Es por esto que se le ha atribuido un efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer, enfermedades del sistema inmunológico y enfermedades neurodegenerativas, como también buenos resultados en protección ocular y de la piel. Particularmente para esta última, la astaxantina protege la piel gracias a sus propiedades antiinflamatorias, mejora el sistema inmunológico y suprime el daño causado por la inducción de metaloproteinasas (MPP) que degradan varios componentes de la matriz celular, incluidos el colágeno y la elastina [37].

La molécula de astaxantina tiene dos carbonos asimétricos en las posiciones 3 y 3', por lo que existen diferentes isómeros (3S, 3'S), (3R, 3'R) y (3R, 3' S) donde los isómeros con quiralidad (3S, 3'S) o (3R, 3'R) son los más abundantes y el primero tiene la mayor actividad antioxidante reportada [38]. También posee en su molécula dobles enlaces conjugados, grupos hidroxilos y cetónicos, que le confieren propiedades tanto lipofílicas como hidrofílicas. Particularmente los dobles enlaces conjugados son los responsables de la coloración rojiza y más importante de su alta capacidad antioxidante, ya que dona los electrones que reaccionan con los radicales libres, convirtiéndolos en productos estables, bloqueando así la cadena de reacción. A su vez, la astaxantina es capaz de captar los radicales libres en su anillo terminal, donde el hidrógeno en el metilo C3 es un sitio de captura de radicales [38] (figura 7).

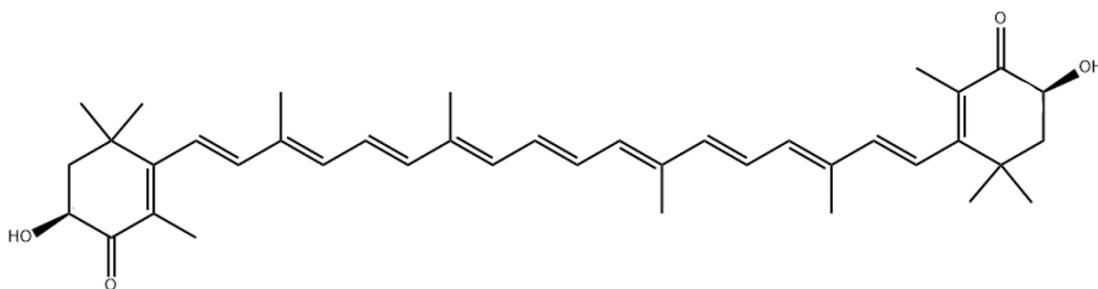


Figura 7. Estructura química de la astaxantina.

2. DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA

Las emulsiones Pickering estabilizadas con partículas adsorbidas a su interfase son más estables a la coalescencia y a la oxidación lipídica, mayormente, debido a la formación de una capa sólida en la interfase. Esta capa impide el paso de compuestos prooxidantes al interior del glóbulo de aceite, protegiendo así a los componentes grasos de la oxidación. Por consiguiente, su modificación es una de las estrategias actualmente utilizadas para conferirle mayor protección al glóbulo de aceite y a los compuestos lábiles en su interior.

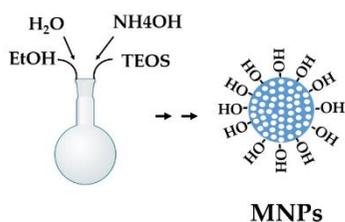
La utilización de compuestos polifenólicos como los flavonoides, cuyas propiedades antioxidantes son ampliamente conocidas, incorporándolos ya sea disueltos en la fase acuosa externa o unidos física o químicamente a la interfase de emulsiones Pickering, ha demostrado ser de gran influencia en el aumento de la estabilidad química de estas emulsiones.

Es por esto que esta tesis propone evaluar la estabilidad química de una emulsión Pickering o/w estabilizada con tensoactivos pero que además contiene nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas con grupos de cadena larga o corta e incorporar a bajas concentraciones a los flavonoides quercetina o rutina solubilizados en su fase acuosa, con el objetivo de evaluar el efecto de la adsorción de estos polifenoles a las nanopartículas sobre la estabilidad química de la emulsión, a través del consumo de un compuesto bioactivo lipofílico solubilizado dentro del glóbulo de aceite.

El siguiente esquema muestra en detalle la propuesta de este trabajo.

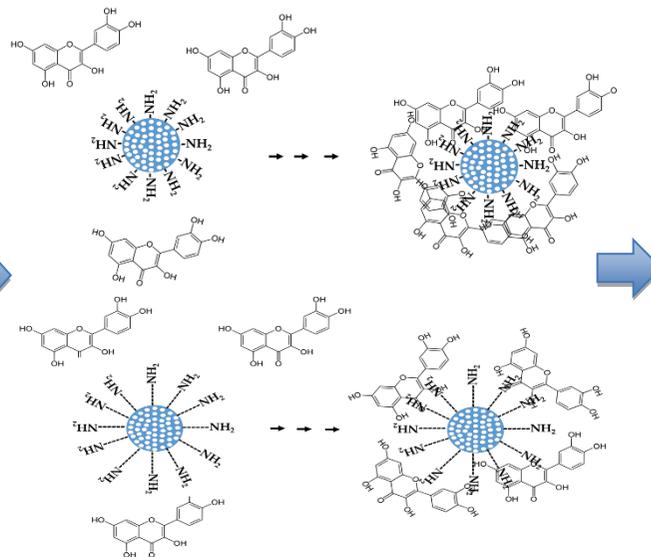
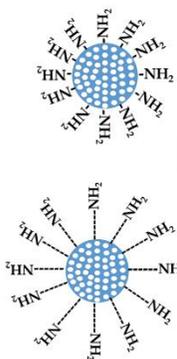
ESQUEMA DE LA PROPUESTA

1. Preparación y amino funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosas.

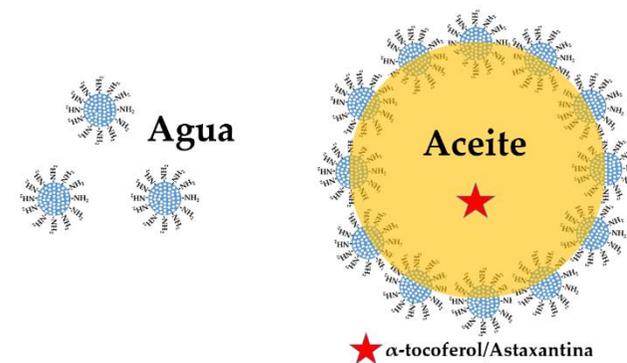


APTES

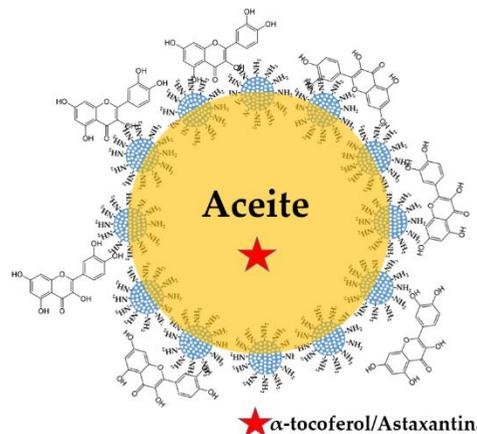
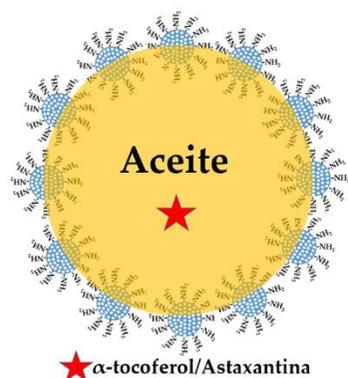
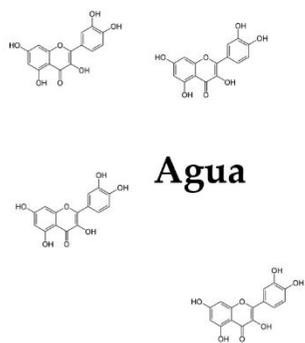
DETA



3. Incorporación a la emulsión Pickering o/w.



2. Evaluación de la adsorción de polifenoles a las nanopartículas en solución.



4. Evaluar capacidad de adsorción de los polifenoles a las NPS mesoporosas amino funcionalizadas y su efecto en la estabilidad química de la emulsión Pickering o/w.

3. HIPÓTESIS:

La adsorción de los flavonoides quercetina y rutina a la interfase de una emulsión Pickering o/w previamente estabilizada con nanopartículas de sílice mesoporosas amino funcionalizadas, aumentará la estabilidad química de compuestos bioactivos lábiles solubilizados al interior de los glóbulos de la emulsión, en comparación a cuando los flavonoides se encuentran solubilizados en la fase acuosa en ausencia de nanopartículas.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adsorción de los flavonoides quercetina y rutina a las nanopartículas de sílice mesoporosas sobre la estabilidad química de la emulsión Pickering o/w, a través del consumo de la vitamina E o astaxantina solubilizada dentro del glóbulo.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de sílice mesoporosas modificadas con grupos aminos de cadena corta y larga y caracterizarlas según criterios de tamaño, potencial zeta y espectro infrarrojo.
- Cuantificar la cantidad de cada flavonoide (quercetina y rutina) adsorbido a las nanopartículas.
- Preparar emulsiones Pickering o/w que contienen nanopartículas de sílice, flavonoides solubilizados en el medio acuoso y vitamina E o astaxantina solubilizados en el medio oleoso.
- Evaluar la estabilidad química de las emulsiones Pickering o/w a través del consumo por oxidación de vitamina E o astaxantina.

6. REACTIVOS Y SOLVENTES

Tetraetilortosilicato (TEOS, 98%), (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES 99%), N-(3-Trimetoxisililpropil)-dietilentiamina (DETA, grado técnico), quercetina dihidratada, mínimo 98% HPLC y (+)-alfa-tocoferol ($\geq 96\%$, HPLC), así como los tensoactivos Tween 60 y Span 60 fueron comprados a Sigma-Aldrich.

La rutina hidrato, el ácido clorhídrico fumante (HCl 37%), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 97%), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 30%), ácido trifluoroacético (99%), hidróxido de sodio (NaOH, $\geq 97\%$, pellets) y acetonitrilo grado HPLC, además de los solventes etanol, metanol y acetona grado HPLC fueron comprados a Merck.

El aceite mineral, el aceite de ricino, el alcohol cetílico y la glicerina fueron donados por diversos laboratorios cosméticos al Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

El agua bidestilada (18.2 M Ω cm) fue purificada usando un sistema Mili-Q Plus Millipore.

7. INSTRUMENTACIÓN

- **TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA:** estas medidas fueron obtenidas mediante el analizador Zetasizer nano Z, utilizando el software, zetasizer software (Malvern, Reino Unido) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- **CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA:** todas las mediciones de detección y cuantificación de los polifenoles quercetina y rutina, fueron realizadas a través del equipo HPLC Agilent 1100, con detector de arreglo de diodos (DAD), usando una columna Capcell Pak C18 5 μ M 4,6x250 mm.

- **ESPECTROSCOPIA INFRARROJA:** las mediciones de espectro IR se realizaron con el equipo Nicolet iS50 FT-IR de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSFERENCIA:** para la obtención de las imágenes de las SNPs se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca Hitachi, modelo HT-7700.
- **MICROSCOPIA ÓPTICA:** el tamaño de gota de las emulsiones fue determinado a través de un microscopio óptico Leica DM500 de la Universidad de Santiago de Chile.
- **ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE:** los espectros de absorción de los polifenoles se midieron en un espectrofotómetro Agilent 8453.
- **ESTUDIO DE ESTABILIDAD:** para el estudio de estabilidad en condiciones de estrés oxidativo se utilizó una estufa marca Memmert a 40°C.
- **PESAJE:** para todos los pesajes en este estudio se utilizó una pesa granataria Mettler Toledo PG203 y una pesa analítica Sartorius R200D.
- **CENTRÍFUGA:** para todos los estudios se utilizó una centrífuga marca Hermle modelo Z326 K.
- **PREPARACIÓN DE EMULSIONES:** las emulsiones fueron preparadas utilizando un agitador T18 digital Ultra Turrax marca IKA y una placa calefactora marca Stuart modelo CB162.
- **pH-METRO:** se utilizaron tiras de prueba ISOLAB Laborgeräte GmbH (pH 0-14).
- **SONICADOR:** todas las muestras fueron sonicadas en un baño ultrasonido Elma E30H.
- **PLACA AGITADORA:** para los análisis que requerían agitación con agitador magnético se utilizó una placa agitadora DLAB Scientific MS-H-S10 y una placa agitadora VWR VMS-C10.
- **LÁMPARA UV:** para lograr la oxidación de un polifenol se utilizó una lámpara de luz ultravioleta Blank-Ray B100AP.
- **VISCOSÍMETRO:** para la medición de viscosidad de la emulsión en estudio se utilizó un viscosímetro marca Brookfield, modelo LVT con velocidad de 6 y aguja número 3.

8. METODOLOGÍA

8.1. Síntesis nanopartículas de sílice mesoporosas modificadas con grupos amino de cadena larga y corta.

La síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas (SNPs) se realizó a través de una reacción de Stöber modificada. Para esto, en un matraz redondo de 500 ml se agregaron 480 ml de agua destilada y 1 g de CTAB, se colocó el matraz a baño maría a 80° C utilizando una placa calefactora y sometiendo la mezcla a agitación hasta total transparencia. Luego se agregaron 3,5 ml de NaOH 2M y se dejó la solución agitando por un periodo de 30 minutos. Una vez pasado el tiempo se agregaron 5 ml de TEOS a goteo, para luego tapar el sistema y dejarlo reaccionar por aproximadamente 2 horas. Después se centrifugo la dispersión por 20 minutos a 8500 RPM o por 15 minutos a 9500 RPM, descartándose el sobrenadante y continuos lavados con etanol 95°.

Luego las nanopartículas se dispersan en etanol, en un matraz de fondo redondo y se le agregan 25 ml de HCl. El matraz se colocó nuevamente en el sistema a baño maría con una temperatura de 100°C en la placa, con agitación y se dejó en reflujo toda la noche.

Posteriormente, se centrifugó la dispersión a 8500 RPM por 20 minutos o a 9500 RPM por 15 minutos en repetidas ocasiones siguiendo el siguiente esquema: en primer lugar, la muestra dejada durante la noche, segundo las nanopartículas reconstituidas con 30 ml etanol 95°, tercero nanopartículas reconstituidas con 30 ml de agua destilada y cuarto con 30 ml de etanol 95°, para finalmente reconstituir las nanopartículas con Etanol grado HPLC. Es importante aclarar que la reconstitución con agua destilada se puede realizar más de una vez en el caso en que la primera reconstitución se aprecie una cantidad de espuma mayor a 10 cc.

Una vez reconstituido con etanol HPLC hasta un volumen final de 200 ml se procede a calcular el rendimiento de la reacción para obtener la cantidad en miligramos de nanopartículas en 200 ml y así poder determinar la cantidad de DETA (N-(3-Trimetoxisililpropil)-Dietilentriamina) y APTES ((3-aminopropil) trietoxisilano) a

utilizar para la amino-funcionalización de las nanopartículas de sílice mesoporosas con cadenas de distinto largo.

Ya realizado el cálculo, se separaron las nanopartículas en dos porciones en matraces redondos de 100 ml cada uno, sobre el que se agregó gota a gota la cantidad determinada de APTES y DETA respectivamente, llevándolos a dos sistemas diferentes a baño maría con una temperatura de 40°C, sometido a agitación y reflujo durante toda la noche.

Finalmente, cada dispersión se centrifugó 3 veces a 8500 RPM por 20 minutos o a 9500 RPM por 15 minutos, reconstituyendo con etanol HPLC cada vez, para luego dejar secando las nanopartículas durante al menos dos días.

8.2 Caracterización de nanopartículas: MSNP, AMSNP-APTES y AMSNP-DETA.

La caracterización de las nanopartículas de sílice modificadas superficialmente con grupos aminos de cadena corta (AMSNP-APTES) y larga (AMSNP-DETA) se realizó midiendo el tamaño de las nanopartículas, su potencial Zeta y su espectro infrarrojo (IR).

Para realizar las mediciones de tamaño y potencial Z en el equipo nanosizer, se prepararon las siguientes muestras diluidas, en agua destilada para la medición de potencial Z y en etanol HPLC para la determinación de tamaño.

- MSNP
- AMSNP-DETA
- AMSNP-APTES
- AMSNP-D-Q
- AMSNP-D-R
- AMSNP-A-Q
- AMSNP-A-R

Por otra parte, para la medición del espectro Infrarrojo de las muestras antes mencionadas, se realizó utilizando el equipo Nicolet iS50 FTIR espectrómetro. Además, se tomaron imágenes en Microscopio electrónico de transmisión (TEM) marca Hitachi, modelo HT-7700, con velocidad de aceleración 120 kV máximo, utilizando una alícuota de 10µL de una muestra de nanopartículas AMSNP dispersa en agua miliQ.

8.3 Capacidad de adsorción de los polifenoles a la superficie de la nanopartícula (en solución de glicerina 10%).

8.3.1 Metodología analítica.

Antes del análisis de la capacidad de adsorción de polifenoles a las nanopartículas de sílice mesoporosas, se desarrolló y validó un método analítico por espectrofotometría UV-vis y HPLC.

En primer lugar, se realizó una curva en triplicado de 8 puntos con concentraciones en un rango entre 1×10^{-5} y 1×10^{-4} M, en 3 solventes diferentes (etanol, una solución de glicerina 10% y agua destilada), para lo cual se preparó una solución madre de cada flavonoide en etanol (0,0217 M de quercetina y 0,001035 M de rutina), para luego agregar 10 μ L cada vez a una cubeta con 3 ml de etanol, glicerina 10% o agua destilada, según corresponda. En cada incorporación de la alícuota, se midió la absorbancia en el espectro UV (200 nm-700 nm) para determinar el máximo de absorbancia del flavonoide en cada solvente mencionado, además de determinar la linealidad del método (r^2 : 0,999).

Una vez determinado el máximo de absorbancia en el espectrofotómetro, se pasó a determinar los parámetros de análisis en el equipo HPLC (fase móvil, flujo, entre otros). Luego, se realizó una curva de calibración de 6 puntos para cada polifenol en los distintos solventes en estudio.

8.3.2 Carga de flavonoides en nanopartículas de sílice mesoporosas.

Se preparó una solución stock de cada flavonoide, pesando aproximadamente 50 mg, los cuales fueron transferidos a en un matraz de 5 ml. La solución fue preparada utilizando etanol HPLC.

Aparte se pesó 50 mg de nanopartículas de sílice mesoporosas amino funcionalizadas con DETA y APTES en duplicado, a los que luego se les agregó un volumen de 20 ml de una solución de glicerina 10%, para luego sonicar hasta lograr la dispersión de las nanopartículas. Una vez dispersas se les agregó una alícuota determinada de la solución de la solución de flavonoide y se dejó agitando con agitador magnético durante toda la noche.

Posteriormente se procedió a trasladar la muestra a tubos de centrífuga, para luego centrifugar por 20 minutos a 8500 RPM o por 15 minutos a 9000 RPM. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente y guardado para su análisis por HPLC, y por su parte las nanopartículas fueron reconstituidas con 20 ml de solución de glicerina 10%, para luego ser centrifugadas, guardando nuevamente el sobrenadante. Ambos sobrenadantes fueron inyectados en el equipo HPLC para la determinación de la cantidad de flavonoide no adsorbido, siguiendo la metodología anteriormente descrita. Los resultados se expresaron como mg de polifenol por cada 100 mg de nanopartículas.

8.3.3 Análisis de datos: isotermas de adsorción [42].

Con las concentraciones determinadas en HPLC se pasó a determinar la eficiencia de encapsulación o adsorción y la eficiencia de carga de acuerdo con las siguientes fórmulas [43]:

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{M_0 - M_i}{M_0} * 100$$

$$\text{Eficiencia de carga (\%)} = \frac{M_0 - M_i}{M_m} * 100$$

Donde M_0 es la cantidad inicial agregada de polifenol, M_i es la cantidad encontrada en el sobrenadante, y M_m corresponde a la cantidad de nanopartículas en las que se adsorberán los flavonoides.

Por otra parte, se realizó un ajuste de los datos a modelos de isoterma de adsorción de Langmuir y de Freundlich. La isoterma de Langmuir (ecuación 1) es un modelo empírico basado en principios cinéticos que se basa en las suposiciones que la adsorción es en forma de monocapa en un número finito de sitios localizados homogéneos entre sí, con una energía de adsorción constante y sin interacción lateral ni impedimento estérico entre las moléculas [20, 44,45]; y la isoterma de Freundlich (ecuación 2) es un modelo empírico que describe una adsorción multicapa no ideal y

reversible aplicable a superficies heterogéneas con una distribución no uniforme, que pueden observarse a continuación [44,45,46]:

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

$$2) \quad \log \log (q_e) = \log K_f + \frac{1}{n} \log C$$

Donde q_e es la cantidad de polifenol adsorbido en el equilibrio (mg g^{-1}), C es la concentración de los polifenoles en solución (mg L^{-1}), Q_m es la capacidad de carga máxima en la monocapa sobre las nanopartículas (mg g^{-1}) y b es la constante de Langmuir para el equilibrio adsorbato-adsorbente (L mg^{-1}). Aparte, K_f es el coeficiente de Freundlich ($(\text{mg g}^{-1})(\text{L mg}^{-1})^{\frac{1}{n}}$), donde n es la constante de Freundlich (índice de la intensidad de adsorción o factor de heterogeneidad) el cual denota una adsorción favorable si el valor esta entre 1 y 10.

8.4 Emulsión o/w: preparación y evaluación.

La preparación de la emulsión utilizada en los siguientes ensayos se realizó modificando una emulsión básica utilizada en un estudio anterior, la que cuenta con un número reducido de componentes comúnmente utilizados en emulsiones de uso tópico. Las modificaciones se hicieron considerando que la preparación debía permanecer estable y lo suficientemente fluida para llevar a cabo los estudios necesarios [2].

En particular, para preparar las emulsiones (Tabla 1), se pesaron los componentes de la fase grasa/oleosa (aceite mineral, alcohol cetílico, aceite de ricino y vitamina E o astaxantina) y los tensoactivos a utilizar (Tween 60 y Span 60), mientras que aparte se pesaron los componentes de la fase acuosa (agua y glicerina), para luego calentar ambas fases por separado hasta una temperatura de 70°C aproximadamente. Una vez alcanzada esta temperatura en ambos vasos, se traspasó el contenido de la fase acuosa a la fase oleosa y se procedió a someter la mezcla a una agitación vigorosa de

8000 RPM utilizando para ello un agitador IKA ultra turrax durante 2,5 minutos, dejando luego enfriar la preparación hasta temperatura ambiente.

Las preparaciones sin vitamina E o astaxantina fueron sometidas a una evaluación de su estabilidad física. Para ello, cada formulación se evaluó a temperatura ambiente (25°C) y a 40°C, con y sin presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las preparaciones que se mantuvieron estables durante esta evaluación y presentaron una fluidez acorde a lo esperado, por lo que decide preparar emulsiones incorporando la vitamina E en un 0,1%, 0,5% y 1%, y la astaxantina en un 0,1%.

Además, se evaluó la estabilidad física y química de las preparaciones en estudio, que incluían a las que contenían polifenoles y nanopartículas, incluyendo dentro de sus propiedades las características organolépticas, viscosidad, pH y visualización de los glóbulos por microscópica óptica. Las propiedades organolépticas de aspecto, color y consistencia, se determinaron a través de una inspección visual de cada emulsión. Por otra parte, para la estabilidad física de las emulsiones con vitamina E, astaxantina y con incorporación de polifenoles y nanopartículas de sílice, se evaluó visualmente la presencia de inestabilidades (separación de fases, cremado, sedimentación o coalescencia), durante 24-72 horas a temperatura ambiente.

Por su parte, la estabilidad química de la emulsión se evaluó a través de un modelo consumo de vitamina E o astaxantina, donde se evaluó el efecto de la adsorción de los polifenoles a la superficie de las nanopartículas sobre el consumo de estos compuestos “marcadores” de la oxidación.

Tabla 1. Formulaciones de emulsiones.

MATERIAS PRIMAS	PREPARACIONES								
	E0	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	Em
Alcohol cetílico	1,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Aceite mineral	7	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Aceite de ricino	3	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Vitamina E/ Astaxantina	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5/ 0,1
Tween 60	2,4	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Span 60	1,1	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Glicerina	4	-	10	5	2,5	2	1	-	1
Agua	c.s.p								

8.5 Evaluación del efecto de la adsorción de los polifenoles a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas, sobre la oxidación de emulsiones con vitamina E solubilizada en el glóbulo de la emulsión.

8.5.1 Metodología analítica.

Antes de realizar este estudio, se realizó en primer lugar, una prueba del método de extracción utilizado [47], el cual consiste en pesar 250 mg de la emulsión con vitamina E y llevar esta muestra a un matraz de 25 ml, al cual se le agregaron 10 ml de metanol HPLC, sonicando la solución por 20 minutos, para luego completar con metanol. Después se tomó un volumen de esta solución (6 ml) y se pasó a través de un filtro de 0,45 µm para luego ser inyectado en el equipo HPLC, utilizando una fase móvil de metanol: agua (97:3), un flujo de 1,5 ml/min y una longitud de onda de 290 nm.

Además, se preparó una curva de calibración con concentraciones en el rango entre 3×10^{-5} M y 2.5×10^{-4} M de vitamina E en metanol para ser inyectada en el equipo HPLC.

8.5.2 Evaluación efecto de la adsorción de polifenoles a las nanopartículas sobre el consumo de vitamina E.

Se evaluó el efecto de la adsorción de polifenoles a nanopartículas sobre el consumo de vitamina E solubilizada en el glóbulo, siguiendo el siguiente procedimiento:

8.5.2.1 Evaluación emulsión base.

Se preparó la emulsión (punto 8.4), estabilizada con Tween 60 y Span 60 como tensoactivos y que contenía la vitamina E al 0,5% en el interior del glóbulo. Se

agregó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 5% y se sometió la emulsión a un estudio de estabilidad a 40 °C. Se obtuvieron muestras a los 0, 1, 2, 3, 4 y 7 días, analizando el consumo de la vitamina E según el método de extracción antes descrito.

8.5.2.2 Evaluación emulsión base con incorporación de polifenoles.

Se realizó el mismo procedimiento del punto anterior, pero agregando a la emulsión base 3 concentraciones diferentes de quercetina o rutina (0,1%-0,05%-0,01%).

Para esto, el polifenol fue solubilizado previamente en etanol (0,02985 M quercetina y 0,01649 M rutina), solución que fue agregada gota a gota en la emulsión bajo agitación con agitador magnético, además se agregó una pequeña cantidad de glicerina (0,01 g) y luego se llevaron todas las emulsiones al mismo peso final con agua destilada. La siguiente tabla (Tabla 2) muestra las cantidades agregadas para 10 g de emulsión aproximadamente.

Tabla 2. Cantidades agregadas a la emulsión para la incorporación de polifenoles.

0,1% polifenol	0,05% polifenol	0,01% polifenol
1 ml sol. polifenol	0,5 ml sol polifenol	0,1 ml sol polifenol
9 g emulsión	9 g emulsión	9 g emulsión
0,01 g glicerina	0,01 g glicerina	0,01 g glicerina
-	0,5 g agua	0,9 g de agua

8.5.2.3 Evaluación emulsión base con incorporación de nanopartículas con distinto largo de cadena.

Antes de evaluar el consumo de vitamina E de la emulsión base con la incorporación de nanopartículas, se realizó un estudio de adsorción de vitamina E en las nanopartículas. Para esto se pesaron 10 mg y 60 mg de AMSNP-DETA y AMSNP-APTES, y se preparó una solución concentrada de vitamina E en acetona HPLC (0,2325 M). Se agregaron 15 ml de acetona a las nanopartículas y se sonicaron hasta total dispersión. Luego se agregó a la dispersión una alícuota de la solución de vitamina E, dejando agitar durante toda la noche. Las muestras fueron analizadas al día siguiente.

Además, se realizó un cambio en el solvente utilizado en el método de cuantificación de vitamina E, por lo que se preparó una nueva curva de calibración con 4 puntos con concentraciones entre 3×10^{-5} M y 2.5×10^{-4} M de vitamina E en acetona HPLC para ser inyectado en el equipo.

Finalmente, para la evaluación del efecto de las nanopartículas en la emulsión base en el consumo de vitamina E en el tiempo, se preparó una emulsión con un 1% de vitamina E la cual se dividió en 3 partes de 3 gramos cada una, a la que luego se le incorporó las distintas cantidades de AMSNP-DETA (Tabla 3) y AMSNP-APTES (Tabla 4). Para esto, las nanopartículas se dispersaron en un volumen de acetona, las cuales fueron agregadas gota a gota a la emulsión, ayudando a la dispersión por agitación, y finalmente completando el peso con agua. Las siguientes tablas muestran las cantidades agregadas para 3 gramos de emulsión.

Tabla 3. Cantidades agregadas a la emulsión para la incorporación de AMSNP-DETA.

0,5% AMSNP-DETA	1% AMSNP-DETA	2% AMSNP-DETA
0,14 ml AMSNP-DETA	0,28 ml AMSNP-DETA	0,56 ml AMSNP-DETA
3 g emulsión	3 g emulsión	3 g emulsión
0,42 g agua	0,28 g agua	-

Tabla 4. Cantidades agregadas a la emulsión para la incorporación de AMSNP-APTES.

0,5% AMSNP-APTES	1% AMSNP-APTES	2% AMSNP-APTES
0,13 ml AMSNP-APTES	0,28 ml AMSNP-APTES	0,55 ml AMSNP-APTES
3 g emulsión	3 g emulsión	3 g emulsión
0,42 g agua	0,27 g agua	-

8.5.2.4 Evaluación efecto de la adsorción de polifenoles a nanopartículas de sílice sobre la oxidación de vitamina E.

Finalmente se evaluó el efecto de la adsorción de polifenoles a las nanopartículas aminofuncionalizadas con distinto largo de cadena (AMSNP-DETA y AMSNP-APTES) sobre el consumo de vitamina E en el tiempo. Para esto se pesó una cantidad de emulsión base con vitamina E al 1% a la cual se le agregó una

alícuota de nanopartículas dispersas en etanol, sometiendo la emulsión a agitación, y luego dejarla reposando durante toda la noche.

Al día siguiente se agregó a la emulsión una alícuota de la solución de polifenol en etanol, agitándola y dejándola reposar por 1 hora. Una vez pasado este tiempo se agregó la alícuota de peróxido de hidrogeno a la emulsión.

La siguiente tabla (Tabla 5) muestra las cantidades agregadas de AMSNP-APTES 0,5%, 1% y 2%, y quercetina al 0,01% y 0,1% para 3,5 g de emulsión.

Tabla 5. Cantidades agregadas a la emulsión para la incorporación de AMSNP-APTES y polifenol quercetina en distintas concentraciones.

	0,5% AMSNP-APTES	1% AMSNP-APTES	2% AMSNP-APTES
0,01% Quercetina	0,17 ml AMSNP-APTES	0,35 ml AMSNP-APTES	0,69 ml AMSNP-APTES
	0,035 ml Quercetina	0,035 ml Quercetina	0,035 ml Quercetina
	3,5 g emulsión	3,5 g emulsión	3,5 g emulsión
	0,84 ml agua	0,66 ml agua	0,315 ml agua
0,1% Quercetina	0,17 ml AMSNP-APTES	0,35 ml AMSNP-APTES	0,17 ml AMSNP-APTES
	0,35 ml Quercetina	0,35 ml Quercetina	0,35 ml Quercetina
	3,5 g emulsión	3,5 g emulsión	3,5 g emulsión
	0,52 ml agua	0,34 ml agua	-

Las muestras se analizaron siguiendo el mismo procedimiento del punto anterior y agitando entre 30-40 minutos antes de la toma de muestra con agitador magnético.

8.6 Evaluación del efecto de la adsorción de los polifenoles a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas, sobre la oxidación de emulsiones con astaxantina solubilizada en el glóbulo de la emulsión.

8.6.1 Metodología analítica.

Para realizar este estudio se realizó en primer lugar una curva de calibración en triplicado de astaxantina en acetona, para lo cual se preparó una solución stock de astaxantina 0,001 M y a partir de ella se preparó una curva de calibración 7 puntos con concentraciones entre 1×10^{-5} M y 1.5×10^{-4} M. Las muestras fueron medidas en el espectrofotómetro a 490 nm.

La toma de muestra se realizó a través del siguiente procedimiento: de la emulsión en estudio se tomó 1 gramo el cual fue trasladado a una cubeta de fluorescencia, a la cual se le puso un agitador magnético pequeño y 50 μ L de H₂O₂, para luego colocar la muestra frente a una lampa ultravioleta, fotooxidándola por distintos periodos de tiempo. Una vez fotooxidada la muestra, se pesó en un matraz de 25 ml, 250 mg de emulsión para luego agregar un volumen de acetona HPLC y sonicar por 20 minutos; una vez pasado el tiempo se llevó a volumen final con acetona y se midió cada muestra en el espectrofotómetro Agilet 8453 a 490 nm.

8.6.2 Evaluación del efecto de la adsorción de polifenoles a las nanopartículas sobre el consumo de astaxantina.

8.6.2.1 Evaluación emulsión base.

Se preparó la emulsión base seleccionada en el punto 8.4 incorporando 0,1% de astaxantina solubilizada en la fase grasa. En primer lugar, se realizó un estudio de consumo del marcador bajo condiciones de estrés oxidativo en estufa a 40°C y con presencia de peróxido de hidrógeno al 5%, tomando muestras a los 0, 1, 2, 3, 4 y 7 días, de forma similar a la metodología utilizada en el punto 8.5.

En segundo lugar, se siguió el procedimiento descrito anteriormente (punto 8.6.1) tomando un gramo de emulsión base con 0,1% astaxantina y agregándole peróxido de hidrógeno al 5% para luego fotooxidar las muestras en periodos de tiempo de 5

minutos (0, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos), para luego tratar y analizar la muestra cómo se describió anteriormente.

8.6.2.2 Evaluación emulsión con incorporación de polifenoles.

Se realizó el mismo procedimiento del punto anterior, pero se agregó una solución stock de cada polifenol (0,03 M Rutina y 0.016 M quercetina), de las cuales se tomaron alícuotas que se agregaron a la emulsión gota a gota, y luego se agitó en forma constante por 15 minutos antes de proceder a fotooxidar y finalmente medir la absorbancia a 490 nm.

8.6.2.3 Evaluación emulsión con incorporación de nanopartículas con distinto largo de cadena.

Para la incorporación de las nanopartículas se pesó una cierta cantidad de nanopartículas que fueron dispersas en un volumen de etanol HPLC siguiendo la proporción de 40 mg de nanopartículas en 400 μ L de etanol. La muestra fue sonicada durante 15 minutos.

Luego se tomó una alícuota determinada para agregar 0,5% de AMSNP-DETA y AMSNP-APTES, la cual fue incorporada a la emulsión gota a gota bajo agitación constante por 15 minutos. Una vez pasado el tiempo indicado las muestras se fotooxidaron en periodos de 10 minutos (0, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos). Así, luego de sonicar por 20 minutos y aforar, las muestras fueron centrifugadas a 3700 RPM por 10 minutos, para luego medir su absorbancia a 490 nm.

8.6.2.4 Evaluación del efecto de la adsorción de polifenoles a nanopartículas de sílice sobre el consumo de astaxantina.

Además, se evaluó el efecto de la adsorción de los polifenoles quercetina y rutina junto a las nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas con distinto largo de cadena (AMSNP-DETA y AMSNP-APTES) sobre el consumo de astaxantina. Para esto se pesó una cantidad de emulsión que contenía 0,5% de astaxantina al interior de los glóbulos, a la cual se le agregó una alícuota de nanopartículas dispersas en etanol correspondientes al 0,5%, dejando la muestra bajo agitación durante toda la noche.

Al día siguiente se agregó a la emulsión una alícuota de solución de polifenol correspondiente al 0,01%, dejando la muestra bajo agitación por 1 hora. Una vez pasado el tiempo, las muestras se fotooxidaron y luego se midieron siguiendo la misma metodología del punto 8.6.2.3.

8.7 Evaluación del efecto de polifenoles fotooxidados adsorbidos a la superficie de las nanopartículas sobre la vitamina E en la emulsión Pickering.

Para este estudio preliminar, se seleccionó la quercetina como el polifenol a estudiar, procediendo a evaluar el efecto de la quercetina oxidada adsorbida a las nanopartículas con distinto largo de cadena sobre el consumo de vitamina E en una emulsión.

8.7.1 Caracterización quercetina fotooxidada.

En primer lugar, se procedió a fotooxidar la quercetina, evaluando el consumo de la señal de quercetina y aparición de productos de reacción a través de una metodología HPLC. Para esto, se preparó una solución stock de quercetina a la cual se le agregaron 500 µL de peróxido de hidrógeno para luego agitar y someter a fotooxidación a través de la exposición de la solución a la luz UV (220 nm) por 30 minutos. Luego, la solución fotooxidada fue inyectada en el equipo HPLC. Para la comparación de los cromatogramas se utilizó como blancos: una solución de quercetina sin fotolizar, el solvente utilizado, el solvente más peróxido fotolizado, una solución de quercetina sin peróxido fotolizada y la solución de quercetina con peróxido sin fotolizar.

8.7.2 Capacidad de adsorción de la quercetina fotooxidada a las nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas.

Posteriormente, se realizó la determinación de la adsorción de estos compuestos a las nanopartículas de sílice amino funcionalizadas, siguiendo la misma metodología descrita para los polifenoles en estudio descritos en el punto 8.3 utilizando una

solución de quercetina fotolizada y otra sin fotolizar para comparar los cromatogramas obtenidos.

8.7.3 Evaluación del efecto de la adsorción de quercetina fotooxidada a nanopartículas de sílice sobre el consumo de astaxantina.

Finalmente se realizó el estudio de consumo de astaxantina, para lo cual se siguió la misma metodología descrita anteriormente. Así, se pesó una determinada cantidad de emulsión que contenía 0,1% de astaxantina para luego agregar una alícuota de nanopartículas dispersas en etanol correspondientes al 0,5%, y dejar agitando toda la noche.

Al día siguiente se preparó una solución de quercetina, la cual se fotooxidó en presencia de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos. Luego se agregó a la emulsión una alícuota de quercetina fotolizada correspondiente al 0,01% dejando agitar por 1 hora. Una vez pasado el tiempo se procedió a la toma de muestra tal como se describió en el punto 8.6.2.4.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas con grupos amino de cadena larga y corta.

La síntesis de las nanopartículas de sílice mesoporosas se realizó siguiendo el método de sol-gel, basado en la reacción de Stöber [9], agregando el tensoactivo catiónico CTAB, como agente “*template*” o plantilla en una solución acuosa alcalina, el cual dirige la polimerización de silicatos a partir de la adición del precursor de sílice, que en este caso corresponde al TEOS (figura 8).

Cuando la concentración de CTAB es mayor que la concentración micelar crítica, éste se autoagrega formando micelas. Por su parte, las especies de sílice adquieren una carga negativa cuando el pH está por encima de su punto isoelectrico (IE:2,0). A pHs alcalinos los silicatos con una alta densidad de carga negativa se ensamblan a través de interacciones electrostáticas a las cargas positivas del CTAB, donde comienzan a condensarse formando una pared alrededor de las micelas, formando una estructura tridimensional unida por enlaces siloxanos (Si-O-Si). Luego se elimina el surfactante a través de un método de reflujo en alcohol acidificado con ácido clorhídrico o también por calcinación [48].

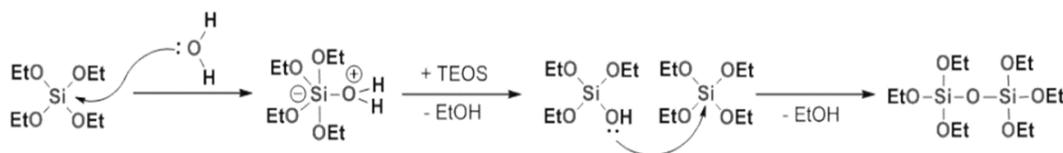


Figura 8. Proceso polimerización en la síntesis de nanopartículas de sílice
Figura obtenida de Llinás y col. 2014 [10].

Esta reacción permite obtener nanopartículas uniformes y con una morfología tanto del tamaño de poro y de la partícula definidos, al controlar parámetros de la reacción como temperatura, pH, concentración del surfactante elegido, entre otros. Estas partículas tienen como principal ventaja presentar una gran área superficial que permite la interacción con compuesto de interés, como es el caso de los polifenoles,

también posee una superficie funcionalizable, que es fácilmente modificable. Además, su proceso de fabricación es simple, escalable, costo efectivo y, como se describió anteriormente, controlable en sus parámetros [49].

Particularmente, la funcionalización de las nanopartículas se realizó luego de la eliminación del surfactante, utilizando el método post sintético de injerto o “*grafting*”, donde los grupos silanol (Si-OH) actúan como puntos de anclaje para los grupos deseados [10]. Para esto se utilizaron dos compuestos aminosilanos, (3-aminopropil)-trietoxisilano (APTES) y N-(3-Trimetoxisililpropil)-Dietilentriamina (DETA), ambos con grupos amino terminales, que se diferencian en el largo de la cadena presente y la presencia de dos aminas secundarias adicionales en DETA [50], esto le confiere a la nanopartícula un grado de diferencia en su hidrofobicidad y por tanto podría influir en el grado de adsorción de los polifenoles y, en consecuencia, en la estabilidad química del glóbulo (figura 9). La aminofuncionalización de las MSNPs es de gran utilidad actualmente, no solo por la facilidad con la que permite conjugar moléculas a la superficie, sino que también debido al aumento de las propiedades de adsorción de las nanopartículas a través de interacciones electroestáticas, como es el caso de la adsorción de compuestos polifenoles. Un ejemplo de esto es el estudio de Ghanimati y col (2017) donde amino-funcionalizaron la superficie de las nanopartículas para aumentar sus propiedades de adsorción y poder estudiar las cinéticas e isothermas de adsorción del antioxidante quercetina en distintas soluciones acuosas de etanol [46].

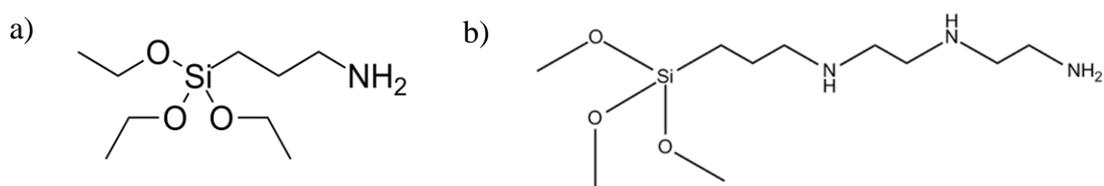


Figura 9. Estructura a) (3-aminopropil)-trietoxisilano (APTES) y b) N-(3-Trimetoxisililpropil)-Dietilentriamina (DETA).

9.2 Caracterización de las nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas con grupos amino de distinto largo, con y sin polifenoles adsorbidos.

- **Potencial zeta.**

Los valores de potencial zeta (mV) obtenidos de la medición en el equipo DLS de las nanopartículas en agua destilada, se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de potencial zeta de las nanopartículas mesoporosas, aminofuncionalizadas y con flavonoides adsorbidos.

	Potencial zeta (mV)	D.S
AMSNP	-39,93	1,14
AMSNP-DETA	29,86	1,55
AMSNP-D-Q	-8,13	2,38
AMSNP-D-R	-1,06	1,00
AMSNP-APTES	21,28	1,54
AMSNP-A-Q	13,93	1,94
AMSNP-A-R	19,7	1,79

En la tabla podemos observar que los valores de potencial zeta de las nanopartículas de sílice mesoporosas son negativos debido a la presencia de los grupos hidroxilos en su superficie. Por su parte, las nanopartículas funcionalizadas presentaron valores positivos, debido a la presencia de los grupos aminos en su superficie, particularmente las nanopartículas funcionalizadas con DETA tienen un potencial más positivo que las nanopartículas funcionalizadas con APTES, pues cuentan con dos aminas secundarias adicionales a la amina terciaria que poseen ambos compuestos. Por otro lado, al incorporar los polifenoles quercetina y rutina observamos como los valores de potencial zeta se vuelven más negativos debido a la presencia de los grupos hidroxilos de los flavonoides.

- **Tamaño de las nanopartículas.**

Los valores de tamaño (nm) en términos de número, volumen e intensidad obtenidos de la medición en el equipo DLS de las nanopartículas en etanol grado HPLC, se muestran en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de tamaño de las nanopartículas en términos de número, volumen e intensidad.

	Número		Volumen		Intensidad		PDI	
AMSNP-DETA	404,9	±103,9	449	±146,7	424,2	±121,6	0,358	±0,186
AMSNP-D-Q	434,5	±69,8	983,2	±1561,6	451,4	±76,08	0,346	±0,233
AMSNP-D-R	447,4	±161,9	494,4	±206,5	467,3	±179,8	0,484	±0,194
AMSNP-APTES	391,7	±100,3	409,9	±111,5	399,2	±104,8	0,516	±0,246
AMSNP-A-Q	397,2	±110,1	421,4	±128,7	407,7	±118,5	0,449	±0,304
AMSNP-A-R	398	±112,1	572,3	±485,4	429,8	±148,0	0,568	±0,152

Si nos centramos en los valores de la distribución de intensidad podemos observar que, si bien los datos no varían en gran escala y son consecuentes a lo esperado, el tamaño de las nanopartículas funcionalizadas con DETA (424 nm) es mayor que las funcionalizadas con APTES (399 nm) y que este tamaño aumenta al adsorber en su superficie a los polifenoles, donde se observa que las nanopartículas con rutina adsorbida (467 nm y 430 nm) a su superficie son ligeramente más grandes que con quercetina (451 nm y 408 nm) en cada tipo de nanopartículas (funcionalizadas con DETA y APTES, respectivamente).

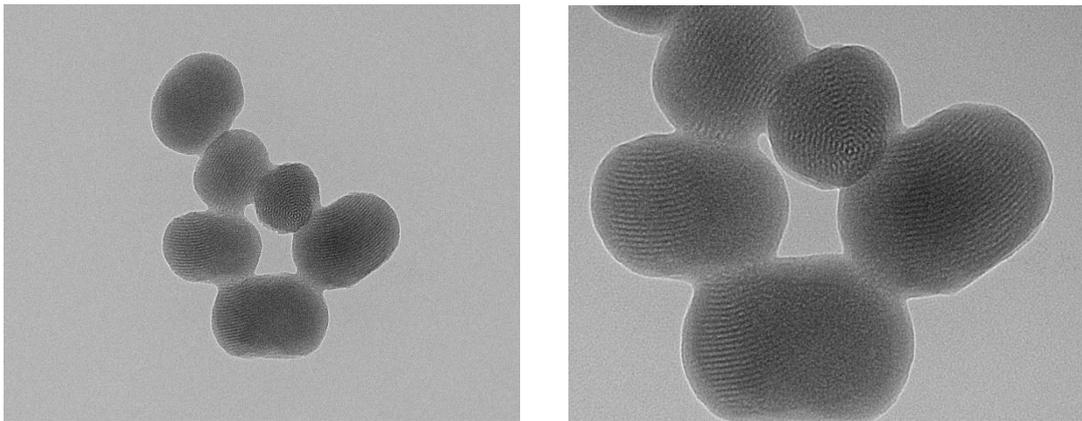


Figura 10. Fotografías de nanopartículas de sílice mesoporosas (MSNP) tomadas a través de microscopía electrónica de barrido (TEM).

La figura 10 muestra una imagen tomada con un microscopio electrónico de barrido (TEM) donde se aprecia claramente los poros presentes en las nanopartículas de sílice sintetizadas en este estudio. Es importante destacar que el DLS mide la distribución del tamaño de las partículas mientras se encuentran en movimiento, por lo que determina el diámetro hidrodinámico. Pero como se muestra en la figura 9 las nanopartículas pueden aglomerarse alterando el diámetro, haciéndolo mayor, debido a la presencia de un grupo aminopropil en su superficie [2]. Las nanopartículas sintetizadas en este trabajo presentan un tamaño aceptable para ser utilizadas de alrededor de 400 nm, no pudiendo penetrar la piel y, por tanto, considerándose un excipiente seguro de utilizar en emulsiones de uso tópico.

- **Espectroscopía FT-IR.**

Se obtuvo el espectro infrarrojo en el rango de 4000-400 cm^{-1} de los polifenoles quercetina y rutina dihidrato, como también de nanopartículas de sílice mesoporosas (MSNP), las MSNP con grupos aminos de cadena corta (APTES) y de cadena larga (DETA) y MSNP amino funcionalizadas con los polifenoles quercetina y rutina adsorbidas a su superficie (figura 11).

Los espectros muestran las bandas más características de los compuestos polifenólicos quercetina y rutina, esas bandas corresponden a los grupos O-H a 3400-3500 cm^{-1} , C=O a los 1680 cm^{-1} , C=C aromáticos entre 1600-1500 cm^{-1} , C-OH entre 1200-1400 cm^{-1} , C-O a 1600 cm^{-1} y C=C entre 2800-2900 cm^{-1} [51].

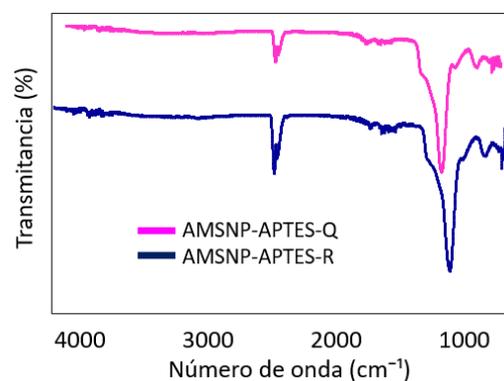
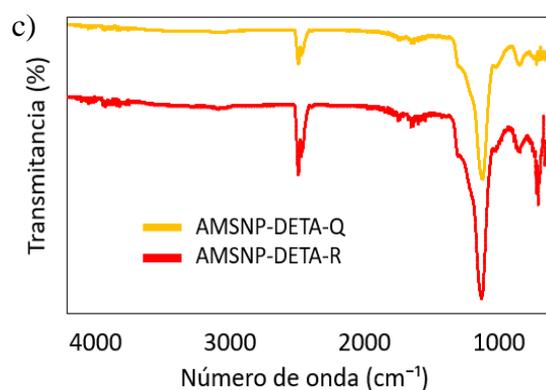
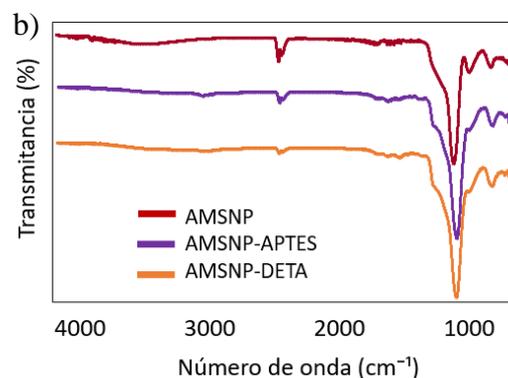
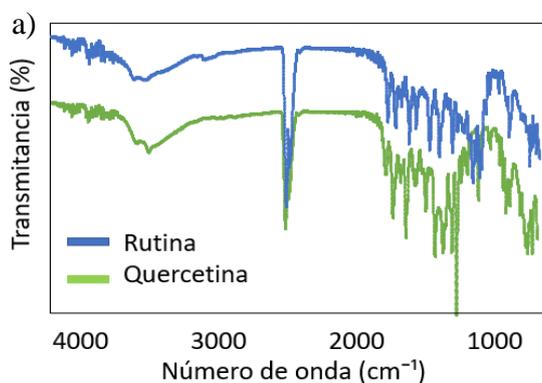


Figura 11. Espectros FT-IR de a) Flavonoides quercetina y rutina, b) Nanopartículas aminofuncionalizadas con distinto largo de cadena (AMSNP-APTES y AMSNP-DETA), c) Nanopartículas aminofuncionalizadas de cadena larga con polifenoles adsorbidos (AMSNP-D-Q y AMSNP-D-R), d) Nanopartículas aminofuncionalizadas de cadena corta con polifenoles adsorbidos (AMSNP-A-Q Y AMSNP-A-R).

Por su parte, el espectro de las nanopartículas de sílice mesoporosas muestra las bandas características de los grupos Si-O-Si entre los 1000-1200 cm^{-1} y de los grupos Si-OH y Si-O a los 940 cm^{-1} y a 795 cm^{-1} , como también la señal en 3300 cm^{-1} correspondiente a los grupos O-H. En los espectros de las nanopartículas amino funcionalizadas, se puede observar que las señales de los grupos OH y Si-OH disminuyen su intensidad, aparecen las bandas CH₂ entre 2900-2800 cm^{-1} asociadas a las cadenas de carbono de los grupos APTES y DETA y una nueva señal a 1380 cm^{-1} que corresponde a la del grupo Si-CH₂ y una señal a 1590 cm^{-1} de los grupos NH₂ [2,42].

Asimismo, los espectros de las nanopartículas aminofuncionalizadas con polifenoles adsorbidos a su superficie, al igual que el espectro anterior, mantienen las señales de las bandas CH₂ entre 2900-2800 cm^{-1} , mientras que las señales entre los 1400 y 1700 cm^{-1} se ven alteradas por la superposición con señales correspondientes a los polifenoles como la señal C=O en 1600 cm^{-1} , los C=C aromáticos entre 1600-1500 cm^{-1} y los C-O a 1600 cm^{-1} , aunque aún se puede percibir la señal NH₂ a 1590 cm^{-1} .

9.3 Metodología analítica.

Antes de realizar los análisis correspondientes a esta tesis, se desarrollaron las metodologías analíticas a utilizar. Se prepararon curvas de calibración de cada polifenol en estudio en distintos solventes, utilizando para ello los equipos de espectroscopía UV-visible y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Particularmente, cada polifenol fue solubilizado en 3 solventes diferentes: agua, glicerina 10% y etanol. Para UV-visible se obtuvieron los máximos de absorción utilizados luego para la metodología HPLC (Tabla 8).

Tabla 8. Máximos de absorbancia de los flavonoides quercetina y rutina en los distintos solventes.

<i>Polifenol</i>	Solvente	Máximo de absorbancia (nm)
Quercetina	Agua	366
	Glicerina 10%	368
	Etanol	374
Rutina	Agua	352
	Glicerina 10%	354
	Etanol	362

Una vez obtenidos los máximos de absorbancia, se prepararon las curvas de calibración de quercetina y rutina con concentraciones entre 3×10^{-5} M a 4×10^{-4} M, en los distintos solventes antes mencionados, obteniendo las siguientes curvas de calibración (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla Curva de calibración de los flavonoides quercetina y rutina en los solventes etanol, glicerina 10% y agua.

CURVA DE CALIBRACIÓN	AJUSTE LINEAL	R²
Quercetina en etanol	$y = 3E^{+07}x + 424,59$	0,993
Quercetina en glicerina 10%	$y = 3E^{+07}x + 38,379$	0,996
Quercetina en agua	$y = 4E^{+07}x + 279,64$	0,973
Rutina en etanol	$y = 2E^{+07}x - 4,7873$	0,996
Rutina en glicerina 10%	$y = 2E^{+07}x - 14,151$	0,995
Rutina en agua	$y = 1E^{+07}x + 150,28$	0,996

Parte de la validación de un método corresponde a la construcción de una curva de calibración, la cual debe estar construida con al menos 5 puntos y ser lineal. La linealidad determina sensibilidad de la recta donde existe una relación directa entre la señal del instrumento y la concentración de los analitos en estudio, para considerar una curva como lineal, su coeficiente de correlación (r) debe ser mayor a 0,99 [52]. Por lo que podemos considerar a todas las curvas -excepto a la curva de quercetina en agua- como lineales, considerando que el coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor a 0,98.

También se evaluó la sensibilidad de los métodos a utilizar, que corresponde a la capacidad del método de discriminar entre concentraciones semejantes de un analito o su capacidad de detectar pequeñas concentraciones de un analito en la muestra. Para esto se analizó la pendiente obtenida en las curvas lineales de los polifenoles en sus distintos solventes. Los resultados muestran que las curvas de quercetina en etanol y en glicerina 10% presentan la misma sensibilidad, mientras que para rutina la sensibilidad es menor para la curva de rutina en agua, pues posee una pendiente menor. Estos polifenoles son solubles en etanol, pero este solvente no es utilizado en volúmenes considerables en las emulsiones de uso tópico, por lo que en este estudio la metodología principal utilizada fue en glicerina 10%, solvente que pretende simular a la fase acuosa de la emulsión o/w en estudio, la cual mantiene la linealidad y la misma sensibilidad que en el solvente etanol.

Finalmente se evaluó la precisión de las diferentes metodologías, mediante la repetibilidad y precisión intermedia. La primera metodología corresponde a una serie de análisis sobre la muestra en las mismas condiciones operativas en el mismo laboratorio en un tiempo corto, mientras que la segunda corresponde a una serie de análisis de una muestra, pero en diferentes condiciones operativas en el mismo laboratorio (ya sea diferente analista, aparatos, o, como en el caso de este trabajo, días diferentes). Para esta evaluación se prepararon 3 muestras con la misma concentración y se midió cada una en triplicado, repitiendo el procedimiento al día siguiente; los resultados se determinaron a través de la obtención de valores de desviación estándar relativa (%DER), expuestos en la siguiente tabla (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de desviación estándar relativa para las metodologías analíticas de los flavonoides quercetina y rutina en los distintos solventes.

	%DER			
	Rutina	Día 1	Día 2	Interdía
Etanol	1,43	1,16	0,07	
Glicerina 10%	2,15	1,89	0,10	
Agua	5,13	2,01	2,93	
	Quercetina	Día 1	Día 2	Interdía
	Etanol	1,36	2,38	0,20
Glicerina 10%	3,44	6,60	0,61	
Agua	3,35	5,34	0,87	

9.3 Capacidad de adsorción de los flavonoides a la superficie de las nanopartículas en solución de glicerina 10%.

La adsorción es un proceso donde una sustancia líquida, gaseosa o sólida se adhiere a la superficie de otro material a través de uniones iónicas, covalentes o metálicas entre los átomos del adsorbato y el adsorbente [53]. La afinidad a la superficie del adsorbente, en este caso correspondiente a las nanopartículas de sílice mesoporosas, está determinada por la compatibilidad entre estas últimas y las moléculas que se busca adsorber en ellas, para lo cual se funcionalizó la superficie de las nanopartículas mesoporosas con grupos amino de distinto largo, la cual ha demostrado en estudios anteriores [16] que aumenta la capacidad de adsorción de los polifenoles por las nanopartículas al incorporar a una partícula con grupos -OH, una capa de grupos -NH₂ en su superficie que pueden interaccionar electrónicamente como los grupos -OH presente en los polifenoles.

Para esta funcionalización se utilizaron distintos grupos aminosilanos comúnmente utilizados como *linkers* (figura 8), el 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) y N1-(3-trimetoxisililpropil) dietilentriamina (DETA) para estudiar si existía diferencia en la adsorción de los polifenoles dependiendo del largo y de los grupos presentes en la cadena adicionada a la nanopartícula. Por otra parte, los flavonoides quercetina y rutina se diferencian en la presencia de un OH en posición 3 del anillo B para quercetina, y el reemplazo de este OH por un rutósido en el caso de rutina. Noon y col. (2020) donde evaluaron la eficacia de 4 antioxidantes naturales entre los que se encuentran los polifenoles rutina y quercetina, evaluando su capacidad de combatir la oxidación lipídica en emulsiones de tipo o/w según su habilidad de captar radicales libres y quelar metales, donde se encontró que ambos presentan una buena actividad antioxidante como captador de radicales libres, la que es mayor para el caso de la quercetina en comparación con la rutina por la presencia del disacárido rutinosa [26], entre otros estudios [21,31].

La evaluación de la capacidad de adsorción de los polifenoles a las AMSNP se realizó a través de la cuantificación de polifenol que no se adsorbió, utilizando una metodología HPLC previamente validada. Para esto, se incorporaron cantidades

crecientes de cada polifenol en duplicado en una solución de glicerina al 10%, la cual pretende imitar a la fase acuosa de la emulsión utilizada durante este estudio; obteniendo como resultado (Tabla 11) una eficiencia de encapsulación en promedio del 98% para el flavonoide quercetina. Por su parte, el polifenol rutina dio como resultado un porcentaje de encapsulación que disminuye en promedio de un 68% a un 51% a medida que se aumenta la cantidad inicial de rutina para AMSNP-DETA, mientras que para las AMSNP-APTES el porcentaje disminuye desde un 83% a un 45% mediante aumenta la cantidad de inicial de rutina.

Por otra parte con respecto a los porcentajes de eficiencia de carga (LC) presentados en la Tabla 11, podemos observar que a la mayor concentración utilizada en este estudio, este porcentaje es de un 17% en promedio para quercetina para ambos tipos de nanopartículas, mientras que para rutina el porcentaje disminuye a un 9% para las nanopartículas aminofuncionalizadas con APTES y a un 10% para las aminofuncionalizadas con DETA, lo que indica que rutina posee una afinidad ligeramente mayor por las nanopartículas aminofuncionalizadas con DETA.

Tabla 11. Resultados del cálculo de eficiencia de encapsulación (EE) y de porcentaje de carga (LC) de los flavonoides en sus distintas concentraciones a los distintos tipos de nanopartículas.

	Cantidad inicial (mg)	AMSNP-APTES		AMSNP-DETA	
		%EE	%LC	%EE	%LC
Quercetina	5,9	98,46	5,81	98,40	5,81
	12	98,73	11,85	98,01	11,76
	17,7	97,56	17,27	97,63	17,28
Rutina	3,64	82,94	3,02	68,12	2,48
	12	58,65	7,04	51,00	6,12
	20	45,57	9,11	51,28	10,26

En los gráficos a) y b) de las figuras 12 y 13 observamos que para ambos polifenoles las cantidades iniciales (C_0) utilizadas no fueron suficientes para observar la saturación esperada en estos casos. No obstante, de los resultados de eficiencia descritos anteriormente (Tabla 11) y de estos gráficos se puede rescatar el hecho que

la quercetina posee una afinidad alta y similar por ambos tipos de nanopartículas de sílice amino funcionalizadas y que su afinidad es mayor por éstas en comparación con la rutina, la cual posee una afinidad más variable entre ambas nanopartículas.

Además, se utilizaron los modelos de isothermas de Langmuir [45] y Freundlich [44] para obtener información acerca de los mecanismos de adsorción, las propiedades superficiales y el grado de afinidad del adsorbente por el adsorbato.

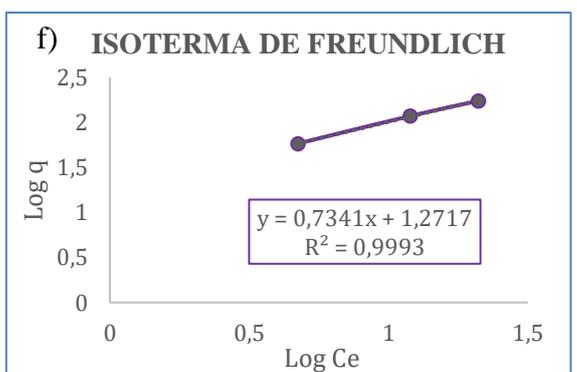
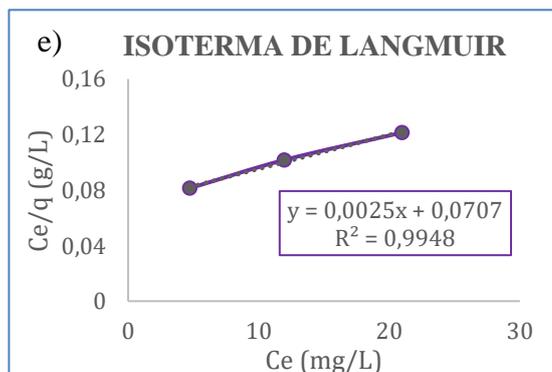
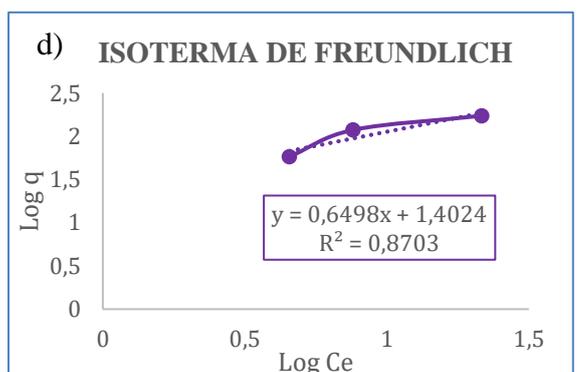
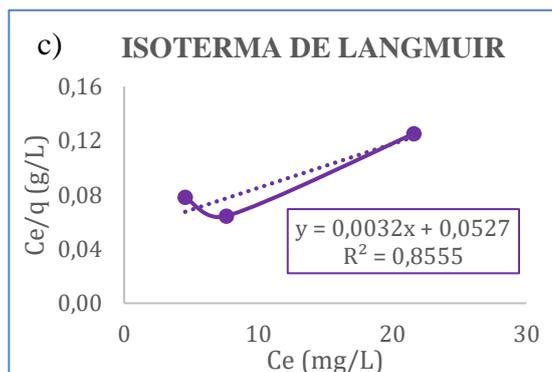
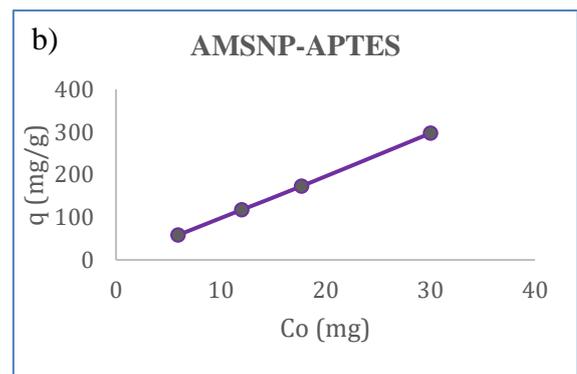
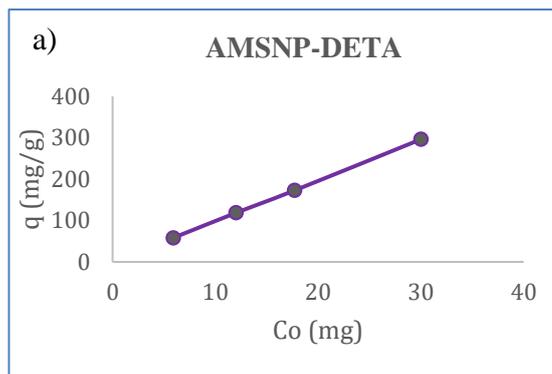


Figura 12. Adsorción de quercetina a nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas. a) cantidad de quercetina adsorbida (q) en función de la cantidad inicial agregada (C_0) para 100 mg de AMSNP-DETA, b) cantidad de quercetina adsorbida (q) en función de la cantidad inicial incorporada (C_0) para 100 mg de AMSNP-APTES, c) Isoterma de Langmuir para datos experimentales de quercetina en AMSNP-APTES y d) Isoterma de Freundlich para quercetina en AMSNP-APTES, e) Isoterma de Langmuir para datos experimentales de quercetina en AMSNP-DETA y f) Isoterma de Freundlich para quercetina en AMSNP-DETA.

El análisis basado en el coeficiente de determinación (r^2) nos indica que para los datos experimentales de la adsorción de quercetina a AMSNP (figura 12), el modelo que mejor se ajusta es el de la isoterma de Freundlich, por lo que el fenómeno de adsorción ocurriría en forma de multicapa sobre la superficie de las partículas.

Del gráfico de la isoterma de Freundlich (figura 12-d y f) se pudo obtener el valor de la constante de Freundlich, también llamado índice de intensidad de adsorción o factor de heterogeneidad (n) cuyos valores son de 1,538 para AMSNP-DETA y 1,362 para AMSNP-APTES, siendo ambos valores mayores a 1 lo que denota una adsorción favorable adsorbato-adsorbente mediante fisisorción de la quercetina por las nanopartículas aminofuncionalizadas, mientras que los valores de la pendiente, 0,65 y 0,73 son cercanos a cero lo que indica la heterogeneidad de la superficie de las nanopartículas.

De la pendiente de los gráficos pertenecientes a la isoterma de Langmuir (figura 12-c y e) se obtuvo el valor teórico de la capacidad máxima (Q_m) de adsorción de la monocapa de Langmuir que corresponde a 312,5 mg/g para AMSNP-DETA y 400 mg/g para AMSNP-APTES, lo que puede indicar una afinidad ligeramente mayor por este último, aunque los valores son altos para ambos casos y concuerdan con el alto porcentaje de incorporación que presenta la quercetina por ambos tipos de nanopartículas.

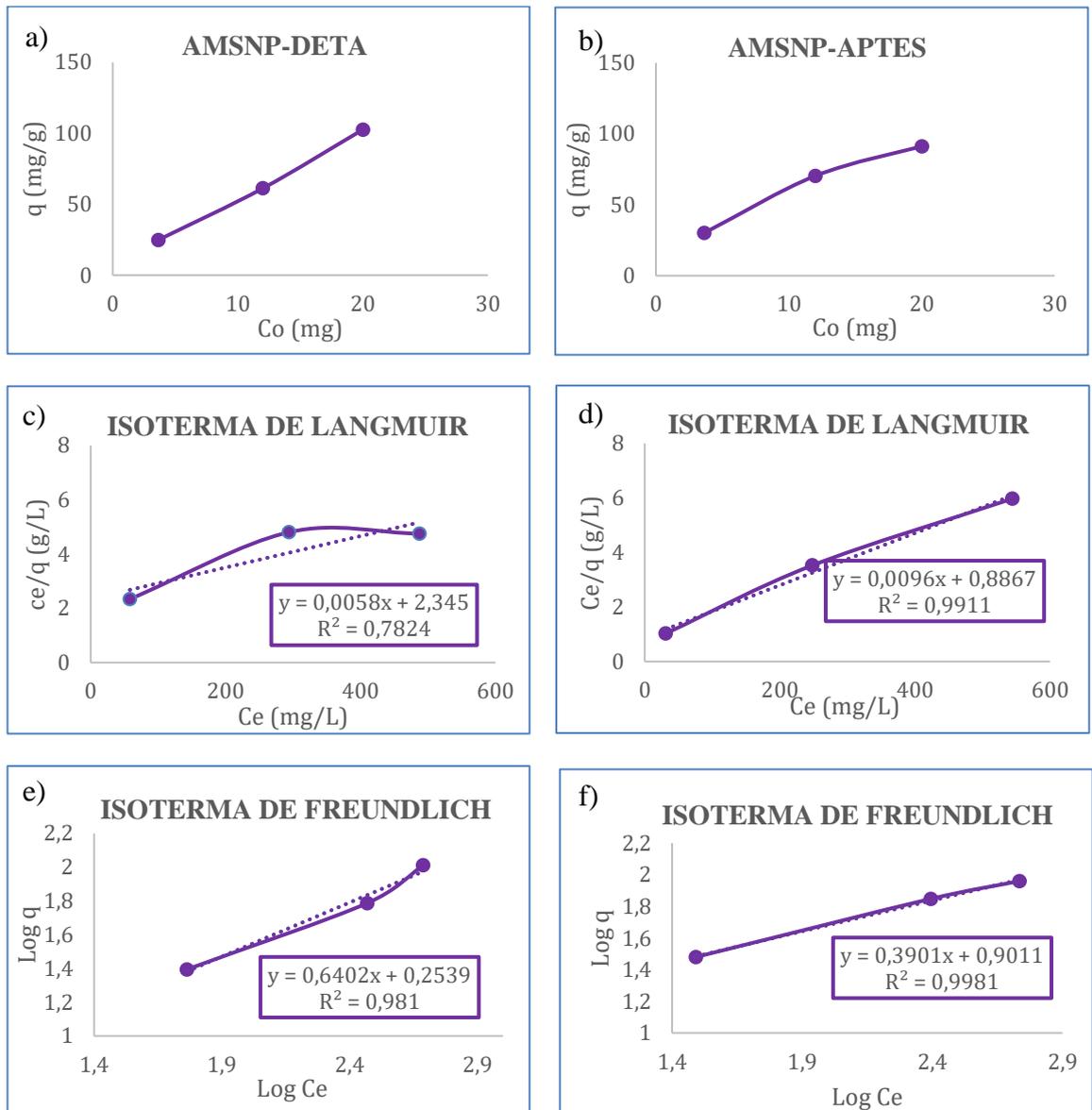


Figura 13. Adsorción de Rutina a nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas. a) cantidad de rutina adsorbida (q) en función de la cantidad inicial agregada (C_0) para 100 mg de AMSNP-DETA, b) cantidad de rutina adsorbida (q) en función de la cantidad inicial incorporada (C_0) para 100 mg de AMSNP-APTES, c) Isotherma de Langmuir para datos experimentales de rutina en AMSNP-DETA, d) Isotherma de Langmuir para rutina en AMSNP-APTES, e) Isotherma de Freundlich para rutina en AMSNP-DETA y f) Isotherma de Freundlich para rutina en AMSNP-APTES.

Para el caso de la rutina, los datos experimentales de la adsorción de ésta a nanopartículas de sílice, siguiendo un análisis de coeficiente de determinación, se

ajustan de mejor manera a la isoterma de Freundlich, aunque particularmente en el caso de rutina adsorbida en AMSNP-APTES, los datos también se ajustan bien a la isoterma de Langmuir (figura 13).

De la pendiente de los gráficos de la isoterma de Langmuir (figura 13-c y d) se obtuvo el valor teórico de la capacidad máxima (Q_m) de adsorción de la monocapa de Langmuir; para la adsorción de las AMSNP-DETA el valor es de 172,4 mg/g y para las AMSNP-APTES es de 104,2 mg/g, este último es concordante con el último punto experimental del gráfico (figura 12-b) donde se comienza a ver una ligera curvatura, además estos datos concuerdan con los porcentajes de incorporación a la máxima concentración en estudio, siendo mayor la incorporación a AMSNP-DETA (51%). Del gráfico de la isoterma de Freundlich (figura 12-e y f) se pudo obtener el valor de la constante de Freundlich, también llamado índice de intensidad de adsorción o factor de heterogeneidad (n) cuyos valores para AMSNP-DETA y AMSNP-APTES son de 1,56 y 2,56 respectivamente, ambos mayores a 1 lo que denota una adsorción favorable adsorbato-adsorbente mediante fisisorción de la rutina sobre las nanopartículas, además los valores de las pendientes cercanos a cero, 0,64 y 0,39 respectivamente, lo que indica una superficie heterogénea de las nanopartículas.

Los resultados aquí descritos demuestran altos valores de incorporación de los flavonoides en estudio a las nanopartículas de sílice mesoporosas amino-funcionalizadas, consecuente con lo que muestra la literatura, donde anteriormente Berlier y col (2013) aminofuncionalizaron la superficie de nanopartículas de sílice mesoporosas adsorbiendo al polifenol rutina, donde reportaron la observación de un aumento considerable en la adsorción de rutina en las nanopartículas amino-funcionalizadas con respecto a las nanopartículas sin funcionalizar, indicando que el grupo aminopropil juega un rol importante por interacciones de tipo Van de Waals con el polifenol, lo que es concordante con los resultados encontrados donde el polifenol rutina presenta una mayor afinidad por AMSNP-DETA que presenta dos aminas secundarias adicionales que aumentan las interacciones electroestáticas presentes [16].

Además los valores de incorporación de nanopartículas (mg de polifenol/ g de nanopartícula) son mayores a los encontrados en la literatura, donde Arriagada y col (2016) encontraron que el polifenol morina presentaba valores altos (11 mg/g), en comparación a otros valores de adsorción máxima a las nanopartículas aminofuncionalizadas [20]; sucede lo mismo en el caso de Schlipf y col (2015) que evaluaron la adsorción de quercetina en nanopartículas no funcionalizadas, funcionalizadas con grupos decil y funcionalizadas con TiO_2 , donde se encontró que la quercetina se adsorbía en mayor cantidad en las nanopartículas con TiO_2 en su superficie con respecto a los otros dos tipos de nanopartículas [18]. Khan y col (2017) siguen esta misma línea evaluando la interacción de nanopartículas mesoporosas funcionalizadas con y sin TiO_2 en su superficie, obteniendo resultados similares a los anteriores donde los flavonoides presentan una afinidad mucho menor por las nanopartículas sin funcionalizar [54].

Además, los datos obtenidos en estos estudios se ajustan mayormente a la isoterma de Freundlich lo que es concluyente con lo obtenido en este estudio. En específico, Schlipf y col. indican que los datos se ajustan a la isoterma de Langmuir a bajas concentraciones; pero, a concentraciones mayores -como las utilizadas en este estudio- los datos se ajustan mejor a un modelo de tipo II aumentando la adsorción de quercetina, debido a la formación de una multicapa en la superficie de la nanopartícula, sugiriendo que la adsorción de polifenoles del tipo flavonoide inicia como una monocapa y luego comienza a adsorberse en forma de multicapas apiladas adsorbidas por fuerzas electrostáticas, de forma no uniforme, sobre una superficie heterogénea; lo que concuerda con lo encontrado en esta tesis donde se utilizaron concentraciones altas de polifenol dando como resultado un mejor ajuste a la isoterma de Freundlich.

Finalmente es importante destacar que existen otros factores externos a la interacción adsorbente y adsorbato que pueden afectarlo, como lo es el caso de pH y del solvente. Esto fue mencionado en el estudio de Ghanimati y col (2017), donde evaluaron la cinética de adsorción e isotermas del antioxidante quercetina en nanopartículas de sílice amino-funcionalizadas en soluciones acuosas de etanol,

obteniendo como resultado que a pH alcalinos se tiene la condición óptima de adsorción debido a que la quercetina se encuentra ionizada por lo que se incrementa la atracción electrostática con la superficie de las nanopartículas. Además, la relación entre el solvente y la capacidad de adsorción está relacionada con la solvatación de la quercetina en la mezcla de agua y etanol, dando como resultado una mayor adsorción 1,56 mg/g cuando la solución contiene etanol 100%, lo que puede deberse a la naturaleza orgánica del flavonoide y los grupos funcionales de la nanopartícula que facilitan la obtención de interacciones más fuertes, al estar en un solvente orgánico como el etanol en agua [46]. En comparación, la cantidad de polifenol adsorbida en este trabajo fue mucho mayor; lo que no puede asociarse al pH pues éste se mantuvo en un rango cercano a pH 5-6, mientras que como solvente se utilizó glicerina en un 10% (p/p) en lugar de etanol que, al igual que éste, actúa como un solvente orgánico, además de ser un medio donde el polifenol no posee buena solubilidad.

9.4 Emulsión o/w: preparación y caracterización.

Las emulsiones se prepararon siguiendo una formulación base previamente utilizada, constituida por materias primas ampliamente empleadas en la formulación de emulsiones de administración tópica.

Su fase grasa está compuesta principalmente por aceite mineral (*mineral oil*) y aceite de ricino (*castor oil*), este último es de gran importancia debido a su alto contenido de ácido ricinoleico, un ácido graso monoinsaturado de 18 átomos de carbono con un grupo hidroxilo en posición beta al doble enlace. Este hidroxilo permite que el ácido ricinoleico proporcione una mayor estabilidad oxidativa al glóbulo de aceite, mejorando su vida útil en comparación a otros aceites al evitar la formación de peróxidos [2,55]. Por su parte, el aceite mineral es una mezcla incolora de varios compuestos hidrocarbonados obtenidos del petróleo, usado en formulaciones tópicas debido a sus propiedades humectantes (emolientes y oclusivas) [56]. En menor proporción en la formulación, se utilizó el alcohol cetílico, el cual es una molécula de cadena lineal que posee 16 átomos de carbono, cuya característica principal es su habilidad de aumentar la viscosidad y la estabilidad de las emulsiones o/w [57].

Los resultados de la evaluación visual demuestran que la formulación inicial (E0) era estable en las condiciones de estudio, pero no presentó la fluidez ideal requerida, por lo que se probó una nueva formulación (E1) que contuvo la mitad de la fase grasa, y la fase acuosa sin glicerina. La formulación E1 se mantuvo estable bajo las condiciones de estudio, pero luego de incorporar la glicerina (E2) a la fase acuosa, la estabilidad se perdió completamente, provocando la separación de fases debido al aumento de la densidad de la fase acuosa. Es por esto que las siguientes formulaciones (E3 a E7) se formularon con cantidades decrecientes de glicerina.

Posteriormente, las formulaciones fueron sometidas a una evaluación visual de la estabilidad física (24 y 72 horas, con y sin presencia de peróxido de hidrógeno, a temperatura ambiente y a 40°C) lo que dio como resultado que, de las 5 formulaciones preparadas (E3 a E7), solamente las 3 últimas se mantuvieron estables (E5 a E7), mientras que las dos primeras presentaron una leve separación, tal y como se muestra en la Figura 14. Finalmente, se seleccionó la formulación E6 para proseguir con el resto de los estudios, basado en la fluidez apropiada de la emulsión y la presencia de glicerina en la fase acuosa, pues la formulación E5 presentaba menor fluidez al movimiento, importante para la correcta incorporación de sustancias como los polifenoles y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Por otra parte, la formulación E7 no contenía glicerina en su fase acuosa, la cual es necesaria para actuar como un cosolvente que mejora la solubilidad de los polifenoles en la fase acuosa, además de actuar como un humectante que impide la evaporación del agua.



Figura 14. Emulsiones E3(5% glicerina), E4 (2,5% glicerina), E5 (2% glicerina), E6 (1% glicerina) y E7 (0% glicerina) luego de 72 horas en estufa a 40°C y con presencia de H₂O₂.

Asimismo, se evaluó la estabilidad física de la emulsión base seleccionada, incorporando la vitamina E, y luego por separado los polifenoles (rutina y quercetina) y las nanopartículas aminofuncionalizadas (AMSNP-DETA y AMSNP-APTES) (figura 15). Esta evaluación física se hizo por inspección visual luego de 24 horas a temperatura ambiente y con presencia de peróxido, observándose que todas las emulsiones se mantuvieron estables por más de 24 horas.

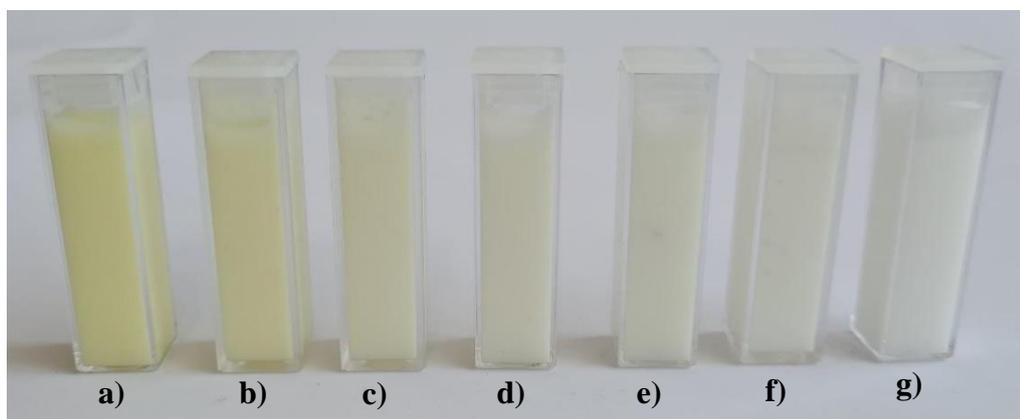


Figura 15. a) emulsión base con quercetina 0,1%, b) emulsión base con quercetina 0,05%, c) emulsión base con quercetina 0,01%, d) emulsión base con rutina 0,1%, e) emulsión base con rutina 0,05%, f) emulsión base con rutina 0,01, g) emulsión base (0,5% vitamina E).

Las emulsiones presentaron características organolépticas similares en cuanto a fluidez, además poseían un aroma característico derivado de la mezcla de componentes que conforman la fase grasa, en especial del aceite de ricino. El cambio más significativo observado fue la coloración de la emulsión; ya que, en presencia de polifenoles, el color de la emulsión cambia a un amarillo muy suave al agregar rutina o a un amarillo más intenso al agregar quercetina, que se vuelve más potente al incorporar cantidades crecientes del polifenol tal y como se muestra en la Figura 15.

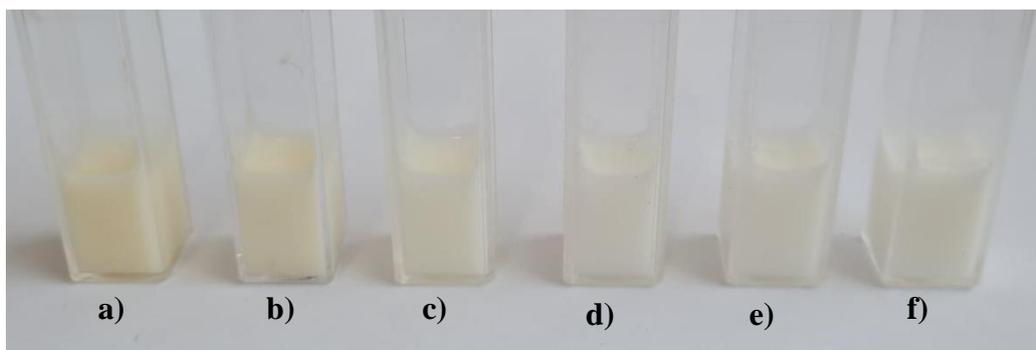
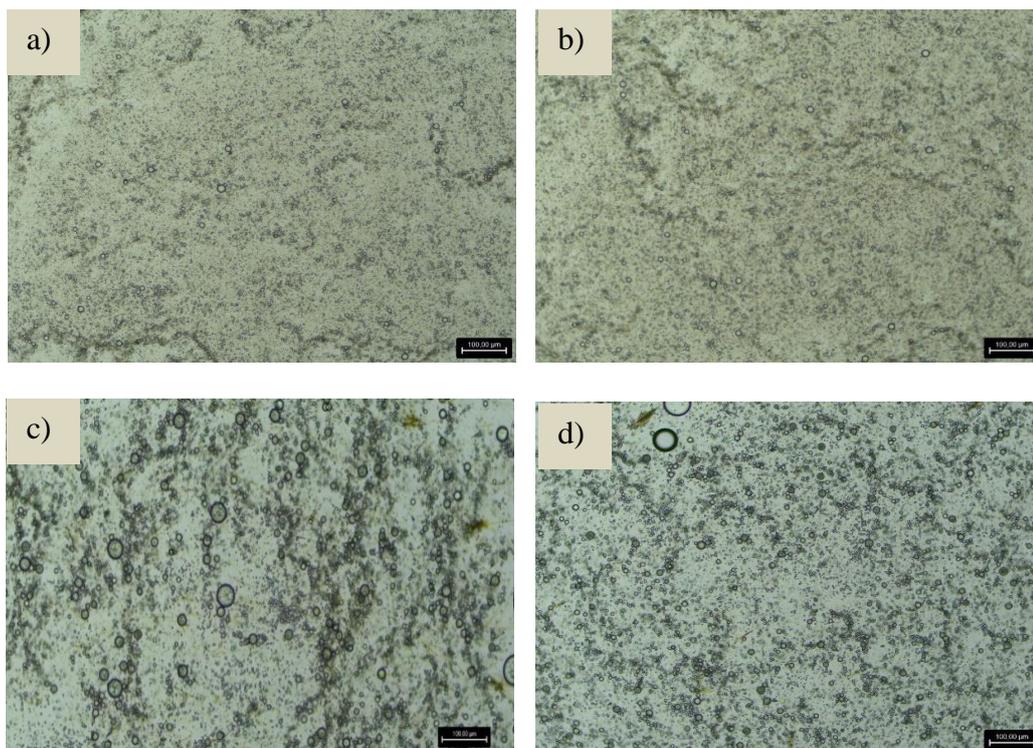


Figura 16. a) emulsión base con AMSNP-APTÉS 1%, b) emulsión base con AMSNP-APTÉS 0,5%, c) emulsión base con AMSNP-APTÉS 0,1%, d) emulsión base con AMSNP-DETA 1%, e) emulsión base con AMSNP-DETA 0,5%, f) emulsión base con AMSNP 0,1%.

Las emulsiones con nanopartículas de sílice mesoporosas incorporadas no presentaron grandes cambios entre sí en términos de aspecto y olor. Para el caso de su coloración, las emulsiones con AMSNP-APTÉS presentaron un tono ligeramente amarillo, mientras que las emulsiones con AMSNP-DETA se mantuvieron con una coloración blanca, tal como se muestra en la figura 16.



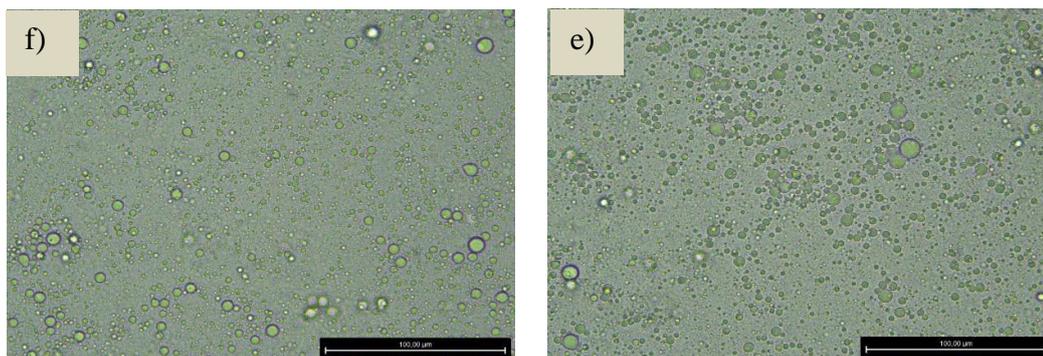


Figura 17. Fotografías emulsiones base con vitamina E en el interior del glóbulo. a) y b) corresponde a emulsiones con nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas con APTES; c) y d) a emulsiones con nanopartículas aminofuncionalizadas con DETA; por su parte e) corresponde a una emulsión con quercetina y f) corresponde a una emulsión con rutina.

Las emulsiones se caracterizaron a través de microscopía óptica (figura 17). Los glóbulos de aceite presentan un tamaño alrededor de $10\ \mu\text{m}$ y con una distribución homogénea. El tamaño del glóbulo de aceite está influenciado en mayor grado por la concentración de nanopartículas dispersas inicialmente en la fase acuosa y por la cantidad de fase grasa en la emulsión [35-37].

El tamaño de la gota es un factor importante a controlar, pues las reacciones de oxidación lipídica ocurren en su superficie, por tanto, con un tamaño de glóbulo pequeño se espera una mayor oxidación lipídica debido al aumento del área superficial. Los resultados de este estudio muestran un tamaño pequeño del glóbulo de aceite, de modo que se tiene una gran área superficial, lo que potencialmente podría generar un aumento de la oxidación lipídica. Sin embargo, Norton y col (2011) demostraron que este factor pierde importancia al incorporar a la superficie interfacial una capa de nanopartículas sólidas que rodee al glóbulo [58]. Para este trabajo, esta capa se formó por nanopartículas de sílice y de los polifenoles rutina y quercetina, capaces de adsorberse a la superficie del glóbulo.

Por su parte, la medición del pH mostró que todas las emulsiones poseen un pH entre 5 y 6, independiente de la incorporación de flavonoides y de nanopartículas aminofuncionalizadas, donde los primeros se encontrarían en su forma no ionizada

dentro de este rango de pH. Los resultados obtenidos coinciden con el pH adecuado para el uso de estas formas farmacéuticas, considerando que las emulsiones de uso tópico deben tener un pH similar al de la piel (pH 5,5).

Finalmente, para la misma emulsión base descrita, se incorporó en la fase grasa el compuesto astaxantina al 0,1%, como compuesto lipofílico lábil. La incorporación de este compuesto bioactivo provocó un cambio notorio en la coloración de la emulsión, la cual adquirió un color naranja intenso, mientras que el resto de las características organolépticas y pH se mantuvieron similares al resto de las emulsiones en estudio. Esta emulsión fue sometida a una evaluación de estabilidad en forma visual luego de 24 horas, donde no se observó ningún indicio de inestabilidad física (figura 18).



Figura 18. Emulsión con 0,1% de astaxantina recién incorporada (naranja intenso) y luego de someterse a estufa a 40°C por un periodo prolongado de tiempo (rosa pálido).

Por otra parte, la medición de la viscosidad se realizó utilizando un viscosímetro Brookfield a una velocidad de 6 y utilizando una aguja número 3, bajo tres condiciones diferentes. Los resultados (Tabla 12) muestran un aumento de la viscosidad desde la primera medición (emulsión recién agitada), con 24 horas de reposo y luego de la incorporación de nanopartículas aminofuncionalizadas con DETA, resultados que son concordantes con lo evidenciado en la literatura [38].

Tabla 12. Valores de viscosidad de emulsión con astaxantina 0,1% y vitamina E 0,5% luego de agitación (medición 1), de 24 horas de reposo (medición 2) y con 0,5% de AMSNP-DETA (medición 3).

	Medición 1	Medición 2	Medición 3
EM-Astaxantina	800 mPa*s	2500 mPa*s	3800 mPa*s
EM-Vitamina E	400 mPa*s	600 mPa*s	1000 mPa*s

9.5 Evaluación del efecto de la adsorción de los polifenoles a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas, sobre la oxidación de emulsiones Pickering o/w.

9.5.1 Metodología analítica.

Una vez seleccionada la emulsión base a utilizar, se procedió a probar la metodología descrita por Nada y col. para la determinación de vitamina E en emulsiones. Así, se cuantificó la cantidad de vitamina E en emulsiones que contenían diferentes porcentajes de este compuesto (Tabla 13) [47].

Tabla 13. Porcentaje de recuperación de vitamina E.

Vit E	Cantidad inicial (mg)	Cantidad recup. (mg)	% recuperación
0,1%	26,32	11,67	44,33
0,5%	102,71	56,89	55,39
1%	208,43	116,29	55,79

Los resultados obtenidos muestran un porcentaje de recuperación de vitamina E cercano al 55%, utilizando una curva de calibración previamente preparada en los solventes metanol y acetona (figura 19).

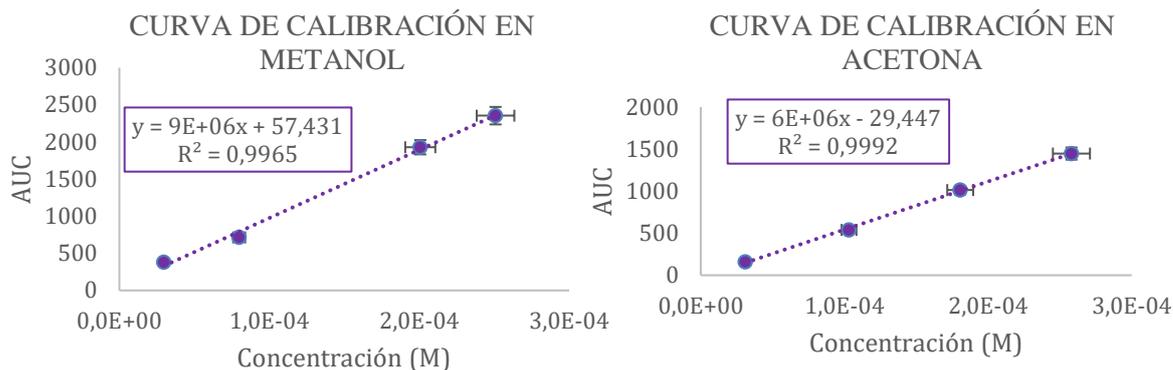


Figura 19. Gráficos y ecuaciones de las curvas de calibración de vitamina E en acetona y en metanol.

9.5.2 Evaluación de emulsiones o/w con incorporación de nanopartículas de sílice modificadas con grupos aminos y polifenoles adsorbidos.

La pérdida de la estabilidad química en una emulsión ocurre cuando se degrada la fase grasa producto de la oxidación de lípidos. Existen varios factores que pueden influenciar la velocidad de la oxidación lipídica en una emulsión, por ejemplo, la estructura molecular de los lípidos, el calor, la luz, las características físicas de los glóbulos de la emulsión, las condiciones de procesamiento y la presencia de antioxidantes y prooxidantes en el sistema [58].

La peroxidación lipídica implica un mecanismo de reacción de radicales libres que es de naturaleza no enzimática y autocatalítica, que puede desencadenarse por diversos agentes como iones metálicos en presencia de agentes reductores, radiación ionizante o ultravioleta, y colorantes y pigmentos fotoactivados [54]. Particularmente la autooxidación mediada por radicales libres proveniente de los lípidos ocurre cuando estos atacan un ácido graso mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno alílico débilmente enlazado, el radical alquilo resultante se estabiliza resonando con un sistema dieno conjugado [59]. La adición de oxígeno molecular a un radical alquilo produce un radical peroxilo conjugado, que al extraer un hidrógeno de otro lípido produce un hidroperóxido y un nuevo radical alquilo [59].

Para este estudio se seleccionaron materias grasas poco susceptibles a la oxidación lipídica ya descritas anteriormente, se utilizaron temperaturas controladas, sin contacto directo con la luz, además las emulsiones fueron preparadas siguiendo las mismas condiciones descritas en el punto 8.4, utilizando tensoactivos (Tween 60 y Span 60) para mantener la estabilidad física, específicamente el tamaño del glóbulo de la emulsión durante el estudio. Además, se determinó el consumo de compuestos lipofílicos sensibles a la oxidación (vitamina E y astaxantina), solubilizados en la fase oleosa, como indicador de la estabilidad química de la emulsión, específicamente del daño oxidativo producido bajo las condiciones establecidas en este estudio.

Estabilidad oxidativa utilizando vitamina E y astaxantina.

Como se ha mencionado, se determinó la estabilidad oxidativa de la emulsión mediante el consumo de vitamina E y astaxantina solubilizadas en emulsiones independientes. Para esto, se desarrollaron las metodologías de análisis respectivas que, para el caso de la vitamina E fue la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y, para el caso de la astaxantina, se utilizó la espectrofotometría UV-visible. Los resultados del seguimiento del consumo de vitamina E en ausencia y presencia de distintas cantidades de ambos flavonoides (quercetina y rutina) y también de ambos tipos de nanopartículas (funcionalizadas con DETA y APTES) fueron erráticos y muy confusos, siendo totalmente inesperados. A pesar de las repeticiones y cambios realizados, los resultados de vitamina E siguieron siendo cuestionables, lo que finalmente atribuimos a fallas en los tiempos que transcurren desde la oxidación hasta el análisis de la muestra por HPLC. Este tiempo se vio significativamente reducido cuando se reemplazó la vitamina E por astaxantina, la cual se determinó su consumo por espectrofotometría UV.

A pesar de lo evidenciado, se mostrarán los resultados obtenidos para ambos compuestos.

9.5.2.1 Estabilidad química de las emulsiones: el “particular caso” de vitamina E

En primer lugar, se utilizó la vitamina E (α -tocoferol) solubilizada al interior de los glóbulos. El α -tocoferol es un antioxidante natural que posee la capacidad de atrapar radicales libres solubles en los lípidos. Los radicales \bullet OH atacan al α -tocoferol por diferentes vías: a través de una abstracción de hidrógeno de los grupos fenólicos OH y metilo y por adición electrofílica del OH en varias posiciones del anillo aromático [60].

Este ensayo permitió evaluar si la adición de nanopartículas aminofuncionalizadas con distinto largo de cadena a una emulsión, que además contenía una cantidad determinada de flavonoides solubilizados en su fase acuosa, era capaz de disminuir el consumo de vitamina E en comparación a una emulsión que contenía solamente el flavonoide. Considerando que las nanopartículas se ubicarán preferentemente en la interfase, como también que los polifenoles seleccionados, quercetina y rutina, son capaces de adsorberse en altos porcentajes a las nanopartículas ubicadas en la interfase del glóbulo de aceite. Esta propuesta se basa en la evidencia reportada en la literatura que sugiere que la oxidación lipídica puede ser controlada al cambiar el grosor y las propiedades de la capa interfacial de los glóbulos [58].

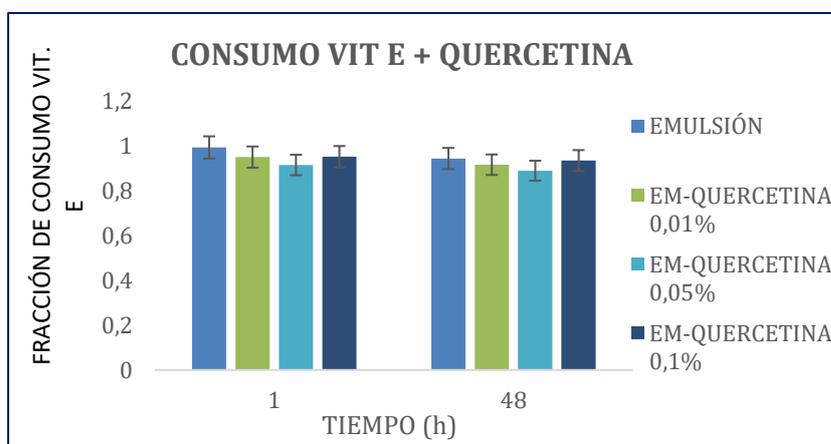
En primer lugar, se analizó si existía un efecto protector sobre la estabilidad química al incorporar en la fase acuosa de la emulsión, tres concentraciones diferentes de flavonoides (0,01% - 0,05% - 0,1%) con respecto a una emulsión sin polifenoles (figura 20-a y b). Los resultados mostraron que, para las emulsiones con quercetina, no se observan cambios significativos en el consumo de la vitamina E con respecto a la emulsión sin quercetina (figura 20-a). Ahora bien, con rutina el consumo de vitamina E es mayor que con quercetina (figura 20-b). Dado que los valores obtenidos resultaron muy variables, no puede decirse si existe un efecto prooxidante para estas concentraciones.

Posteriormente, se incorporaron nanopartículas en el sistema, sin presencia de flavonoides, evaluando si las nanopartículas aminofuncionalizadas con distinto largo

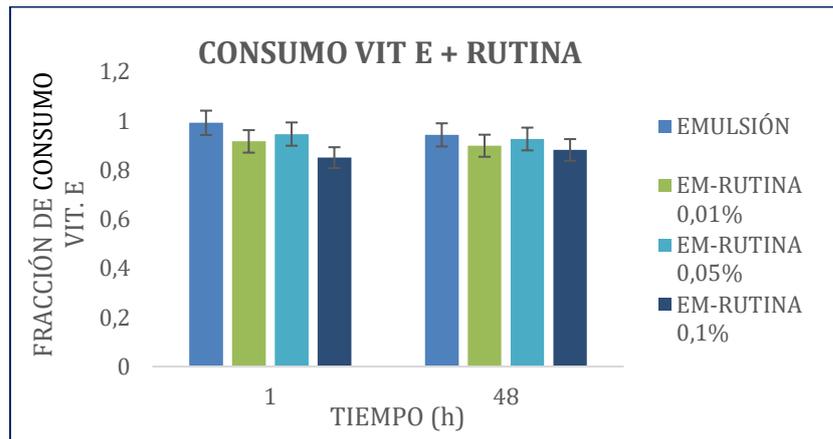
de cadena (AMSNP-DETA y AMSNP-APTES) poseían en sí similares propiedades protectoras sobre la estabilidad química de la emulsión (figura 20-c y d). Los resultados mostraron que el consumo de vitamina E cuando la emulsión contenía nanopartículas aminofuncionalizadas con DETA en distintas concentraciones, fue mayor luego de 1 hora de estar sometido a estufa a 40°C, aumentando luego a valores cercanos a 0,15 (figura 20-c). Para el caso de las AMSNP-APTES observamos cambios más significativos, donde el consumo aumenta en presencia de las nanopartículas llegando a valores cercanos a 0,4 luego de 48 horas en estufa a 40°C (figura 20-d).

Según estos resultados no se observa un efecto protector sobre la estabilidad química por parte de ambos flavonoides, ni tampoco de las nanopartículas cuando se utiliza vitamina E como compuesto bioactivo solubilizado en el glóbulo oleoso. Como ya mencionamos, esto es paradójico debido a que se esperaba todo lo contrario, siendo atribuido este comportamiento a fallas en la metodología analítica empleada, que demora el análisis desde que ocurre la degradación de la vitamina E hasta cuando se obtiene la señal por HPLC.

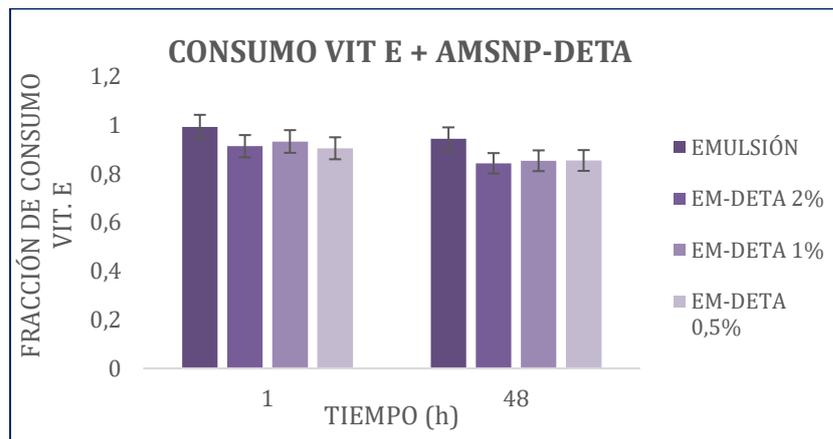
a)



b)



c)



d)

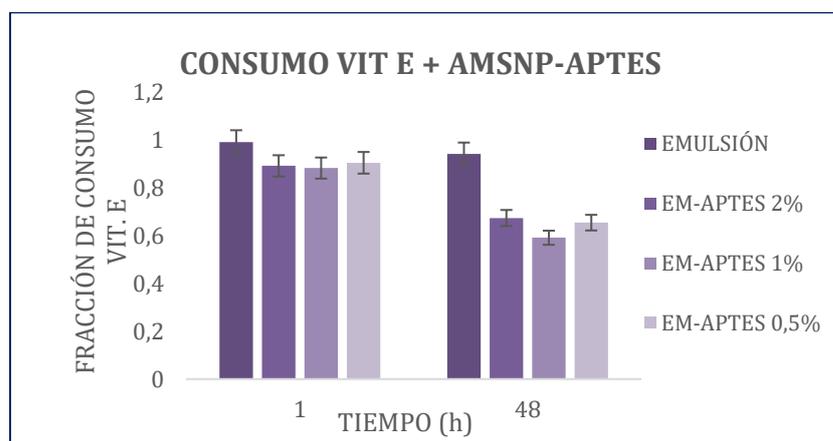
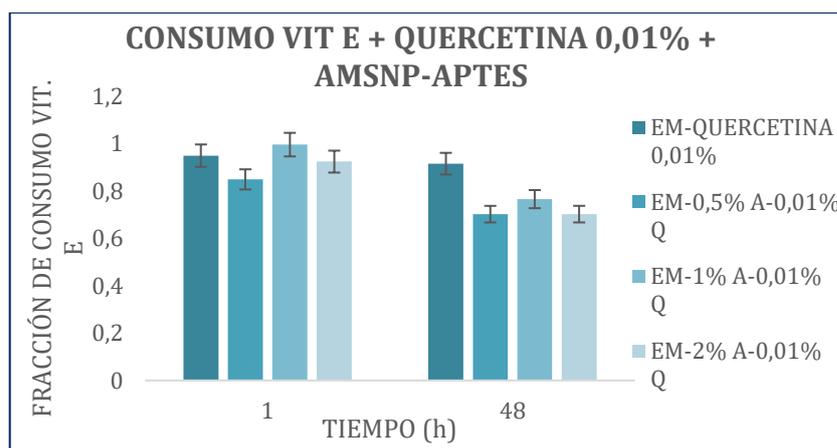


Figura 20. Gráficos de consumo de vitamina E en emulsión a) con polifenol rutina en la fase acuosa; b) con polifenol quercetina en la fase acuosa; c) con AMSNP-DETA en la interfase y d) con AMSNP-APTRES en la interfase, bajo condiciones de estrés con H₂O₂ 5% y 40°C.

Finalmente se evaluó la diferencia entre el consumo de vitamina E de una emulsión que contenía los polifenoles disueltos en su fase acuosa, y otra emulsión que contenía nanopartículas aminofuncionalizadas y polifenoles disueltos que tenían la posibilidad de interactuar con la interfase de estas nanopartículas. Para este caso en particular, se seleccionaron dos concentraciones de quercetina (0,01% y 0,1%) y se utilizaron 3 concentraciones de AMSNP-APTES. Los resultados muestran que a concentraciones bajas de quercetina (0,01%) (figura 21-a) el consumo de vitamina E luego de 1 hora en condiciones de estrés oxidativo, se ve ligeramente mejorado e igualado por las mayores concentraciones de nanopartículas (1% y 2%), pero este efecto se ve drásticamente reducido a valores de consumo mayores a 0,2 luego de 48 horas, manteniendo la tendencia de consumo. A pesar de esto, la emulsión que contiene 0,01% de quercetina y 1% de AMSNP-APTES es la que entrega mayor protección contra la oxidación lipídica.

Por otra parte, cuando se utilizan concentraciones mayores de quercetina (0,1%) (figura 20-b) se observa que el consumo de vitamina E, para la concentración más alta de nanopartículas, es mayor que cuando la emulsión contiene una concentración baja de quercetina. Mientras que para las otras dos concentraciones de nanopartículas los valores de consumo disminuyen con respecto a los obtenidos a 0,01% de quercetina. En particular, solo la emulsión que contenía 0,1% de quercetina y 1% de AMSNP-APTES presentó una disminución del consumo de vitamina E tanto luego de 1 hora como de 48 horas bajo condiciones de estrés oxidativo en estufa a 40°C, en comparación a la emulsión que contenía solo quercetina 0,1% en su fase acuosa.

a)



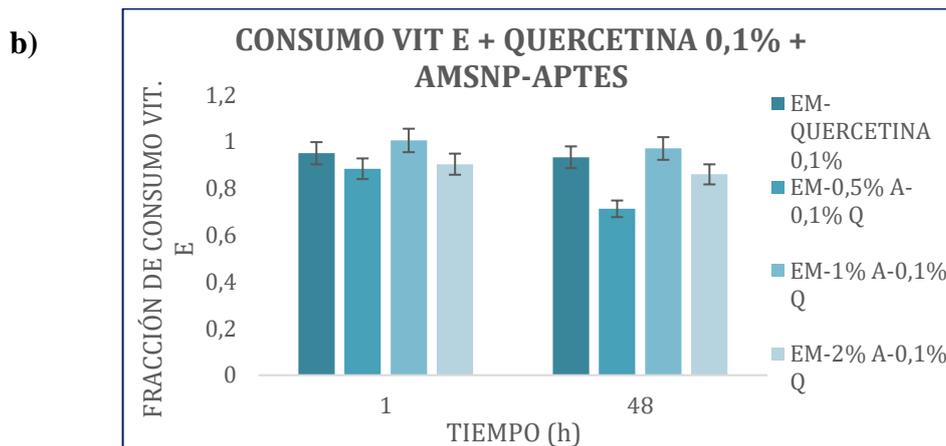


Figura 21. Gráficos de consumo de vitamina E en emulsiones Pickering con AMSNP-APTES y polifenol quercetina al a) 0,01% y b) 0,1%, bajo condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂ 5% y 40°C.

Debido a los resultados poco concluyentes del análisis de consumo de vitamina E, se decidió realizar este análisis cambiando el compuesto bioactivo solubilizado dentro del glóbulo de aceite por astaxantina 0,1%.

9.5.2.2 Estabilidad química de las emulsiones: incorporación de astaxantina.

La astaxantina es un beta caroteno ampliamente estudiado debido a sus propiedades como colorante y su gran actividad antioxidante, la que se sabe es mayor que la del α -tocoferol.

Para el estudio del consumo de astaxantina, se decidió utilizar H₂O₂ al 5%, sometiendo la muestra a fotólisis a temperatura ambiente para así generar el radical hidroxilo. El tratamiento de muestra se mantuvo similar al utilizado por la vitamina E, utilizando como solvente la acetona y cuantificando a través de la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible a 479 nm. Para esto, se realizó una curva de calibración de astaxantina en acetona la que dio como resultado un ajuste lineal $y = 5121,2 * X - 0,0221$, con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,9987$.

Previo al estudio principal, se realizó una comparación de las metodologías utilizadas para generar estrés oxidativo, donde se comparó una emulsión base con AX al 0,1% utilizando por una parte el método de estrés oxidativo de estufa a 40°C con H₂O₂ y,

por otra parte, generando el radical hidroxilo por fotólisis y H_2O_2 . En este estudio se observó que utilizando el método de fotólisis se observaba una diferencia significativa del consumo de AX luego de 15 minutos, observándose cambios en la protección de la estabilidad química de la emulsión (figura 22). De esta forma, se descarta la utilización del método de estufa debido a la mayor eficiencia del método de fotooxidación.

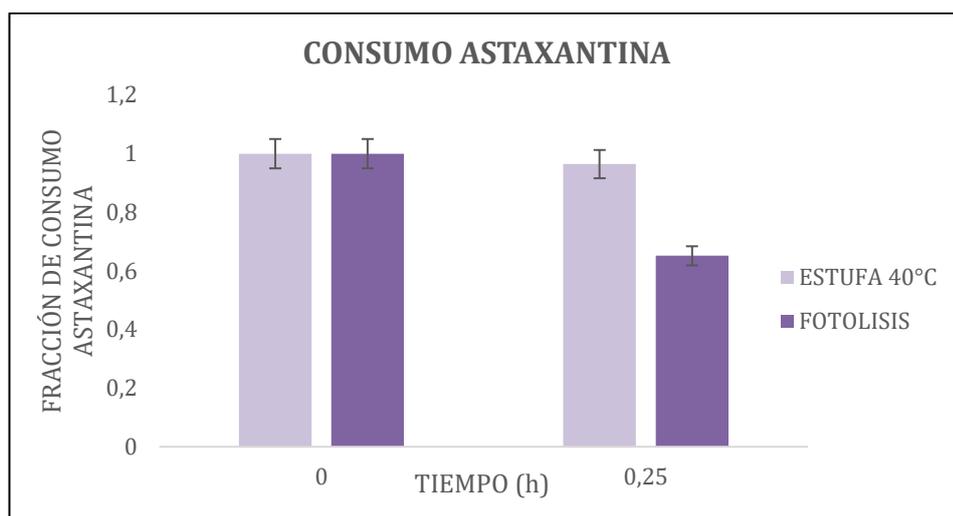


Figura 22. Gráfico de consumo de astaxantina en emulsión O/W, bajo condiciones de estrés con H_2O_2 al 5%, en estufa a 40°C y a través de fotólisis con lámpara UV.

Una vez seleccionada la metodología a utilizar se realizaron los mismos análisis antes realizados para vitamina E, donde en primer lugar se agregó una concentración de 0,01% de los flavonoides y luego se comparó su efecto sobre el consumo de astaxantina (figura 23-a). Se observó que para la quercetina a 0,01 % se aprecia una ligera disminución del consumo luego de 5 minutos de fotooxidación con respecto a la emulsión base. Sobre este tiempo el consumo aumenta a valores similares a los obtenidos cuando la emulsión contiene quercetina disuelta.

Por otra parte, rutina muestra un aumento más significativo del consumo de astaxantina luego de 5 minutos de fotooxidación, pero se iguala luego de 15 minutos a los valores obtenidos por la emulsión base y la emulsión con quercetina.

Estos resultados son similares a los encontrados en el estudio con vitamina E (figura 20) como marcador, donde no se evidencia un cambio significativo en el consumo respecto a la emulsión base cuando los flavonoides están disueltos y en ausencia de nanopartículas.

El efecto de los flavonoides sobre la oxidación lipídica ha sido ampliamente descrito en literatura, Kiokias y col (2014) evaluaron el efecto antioxidante de algunos flavonoides durante la oxidación de emulsiones o/w, demostrando que la quercetina presenta un claro efecto antioxidante al proteger a la emulsión del deterioro oxidativo, efecto que es dependiente de la concentración [21]. Yang y col (2015) evaluaron los efectos de los flavonoides en la estabilidad física y oxidativa de emulsiones o/w, encontrando que tanto quercetina como rutina disminuían los valores de peróxido, siendo el primero el que presentaba mayor capacidad antioxidante [28]. Por su parte, Atares y col (2012) estudiaron el efecto de 3 variables, entre las que se encontraba la presencia del flavonoide rutina en una emulsión o/w, obteniendo que la oxidación disminuía en cualquier caso donde se contara con la presencia de rutina en la emulsión, aunque la diferencia no era siempre estadísticamente significativa [22]. Noon y col (2020) evaluaron la eficacia de cuatro antioxidantes naturales, entre los que se encontraban los polifenoles rutina y quercetina, en su habilidad de combatir la oxidación lipídica en diferentes emulsiones o/w, donde los resultados demostraron que estos compuestos disminuían la formación de productos de oxidación primarios y secundarios [26].

Estos estudios demuestran la existencia de un efecto protector por parte de los flavonoides quercetina y rutina sobre una emulsión o/w, el que no se puede observar en los resultados de la figura 23-a, pues el consumo de astaxantina se mantiene en valores similares, esto puede ser debido a la baja concentración utilizada en este estudio (0,01%), escogida en base a la menor concentración utilizada en la evaluación del consumo de vitamina E, por lo que si se aumenta la concentración de polifenol es de esperar que aumente también el efecto protector de estos compuestos.

Por otro lado, ambos estudios presentan al polifenol quercetina como el flavonoide que presenta mejor efecto antioxidante y, por tanto, con mejor efecto protector

contra la oxidación lipídica; el cual está relacionado con la estructura que poseen estos compuestos, como lo es la estructura del anillo C, donde la quercetina posee un grupo 4-carbonilo y un doble enlace en la posición 2,3. En la literatura, la actividad antioxidante de la quercetina se atribuye a la formación de un radical ariloxilo estable tras la oxidación debido al doble enlace y la geometría planar resultante que deslocaliza el radical a lo largo de toda la molécula [21].

El estudio prosiguió con la evaluación de la adición de 0,5% de nanopartículas con distinto largo de cadena a la emulsión base sobre la estabilidad de astaxantina (figura 23-b). Los resultados obtenidos mostraron una disminución en el consumo de astaxantina en las emulsiones preparadas con ambos tipos de nanopartículas, obteniendo entre ellas valores muy similares (20,2% para la emulsión con AMSNP-APTES y 22% para la emulsión con AMSNP-DETA), esto implica una disminución del 14,8% y de un 13% del consumo de astaxantina con respecto a la emulsión base.

Los resultados obtenidos para el consumo de astaxantina siguen una tendencia esperada según lo encontrado en la literatura [3, 58], Norton y col (2011) investigaron el efecto de las propiedades físicas de una emulsión o/w sobre la oxidación lipídica de esta; los resultados de esta investigación demostraron que las nanopartículas de sílice aumentaron la estabilidad oxidativa de las emulsiones al actuar estas nanopartículas como una barrera física para los compuestos prooxidantes, como el H_2O_2 , en la fase acuosa y los hidroperóxidos en la interfase del glóbulo de aceite, reduciendo el contacto entre las fases y el área donde ocurre la reacción de oxidación, gracias a su habilidad de generar una capa sólida gruesa que rodea a los glóbulos de aceite.

Kargan, Norton y col (2011) evaluaron la habilidad potencial de las emulsiones Pickering para mejorar la estabilidad oxidativa de emulsiones o/w, donde llegaron a conclusiones similares a las demostradas anteriormente, en la cual la presencia de partículas, especialmente la de celulosa microcristalina y almidón modificado, aumentaron la estabilidad física de las emulsiones y disminuyeron la oxidación lipídica, debido a la formación de una capa interfacial gruesa, además de la capacidad intrínseca de estas partículas de atrapar radicales libres. Estos estudios

concluyeron que la modificación de la microestructura interfacial de una emulsión tiene un efecto predominante sobre la estabilidad oxidativa de una emulsión.

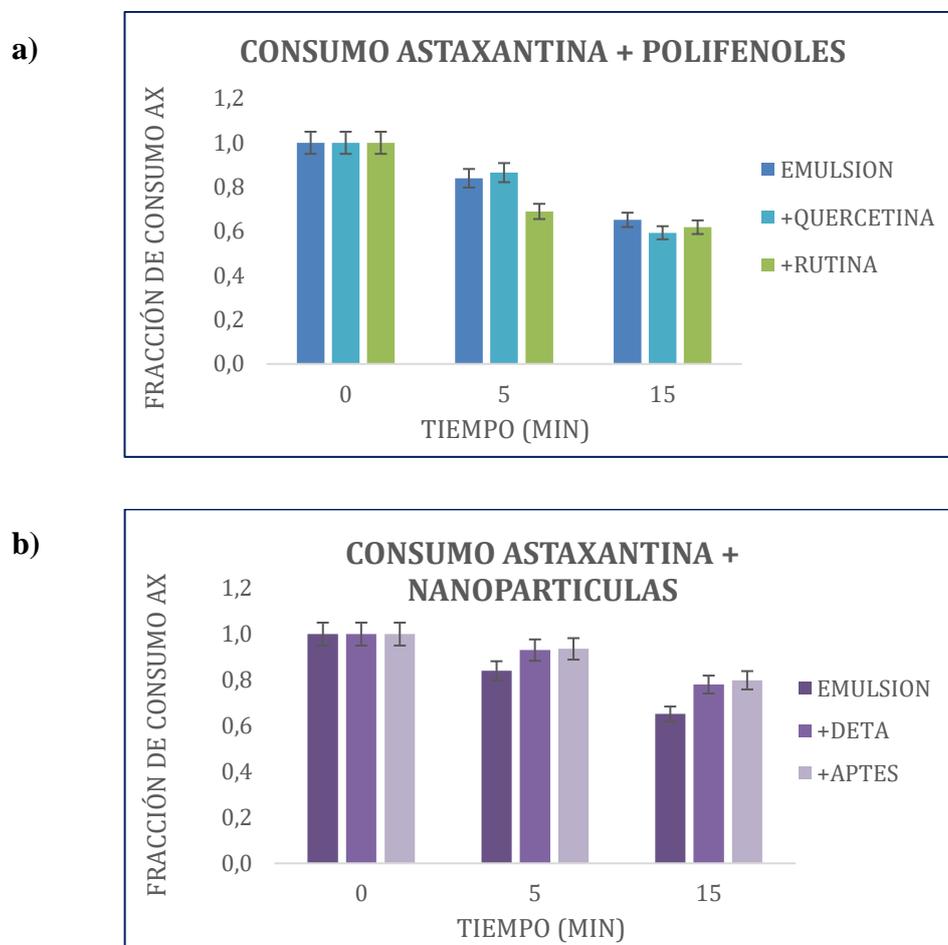


Figura 23. Gráficos de consumo de astaxantina en emulsión a) con polifenoles quercetina y rutina; b) con AMSNP-DETA y AMSNP-APTRES, bajo condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂ 5% y fotólisis.

Como se describió anteriormente, existen varios factores que pueden influenciar la oxidación lipídica, uno de ellos corresponde a la capa interfacial, pues la oxidación lipídica ocurre por la interacción entre los hidroperóxidos localizados en la superficie y los compuestos prooxidantes en la fase acuosa. Este estudio se centra principalmente en la estrategia de modificar las propiedades de la capa interfacial al incorporar en primer lugar nanopartículas que se adsorben de forma irreversible a la superficie del glóbulo de aceite, a las que luego se le adsorberán desde la fase acuosa

flavonoides con reconocida capacidad antioxidante, produciendo así una capa más gruesa de interfase -con propiedades antioxidantes- lo que debería aumentar la estabilidad oxidativa de las emulsiones en estudio.

Finalmente se realizó el mismo análisis agregando a la emulsión base 0,5% de nanopartículas aminofuncionalizadas y 0,01% del cada flavonoide por separado, comparando sus resultados con los obtenidos por la emulsión con solo el flavonoide disuelto en su fase acuosa. Los resultados (figura 24-a) muestran que el porcentaje de consumo de astaxantina luego de 15 minutos de fotooxidación, cambia desde un 41% correspondiente a la emulsión con solo quercetina en su fase acuosa, a un porcentaje similar cuando la emulsión contiene quercetina y AMSNP-DETA, mientras que se observa una disminución del consumo de astaxantina en la emulsión a un porcentaje de consumo del 23,8% con quercetina 0,01% y AMSNP-APTES 0,5%, con respecto a la emulsión con solo quercetina en su fase acuosa luego de 15 minutos de fotooxidación, lo que corresponde a una disminución del consumo del 17,2%, mostrando que este tipo de emulsión que presenta la mayor eficiencia contra la fotooxidación.

Por otra parte, para rutina (figura 24-b) observamos una disminución del consumo desde un 38,2% cuando la emulsión contiene solo rutina en su fase acuosa, a un 28% cuando la emulsión contiene rutina/AMSNP-APTES y a un 22,6% cuando la emulsión contiene rutina/AMSNP-DETA en su interfase, lo que corresponde a una disminución del 9,7% y del 15,6% para AMSNP-APTES y AMSNP-DETA, respectivamente. Estos valores muestran que la emulsión que contiene rutina solubilizada en su fase acuosa y AMSNP-DETA en su interfase es la que presenta mayor eficiencia contra la fotooxidación que la emulsión que contiene rutina/AMSNP-APTES.

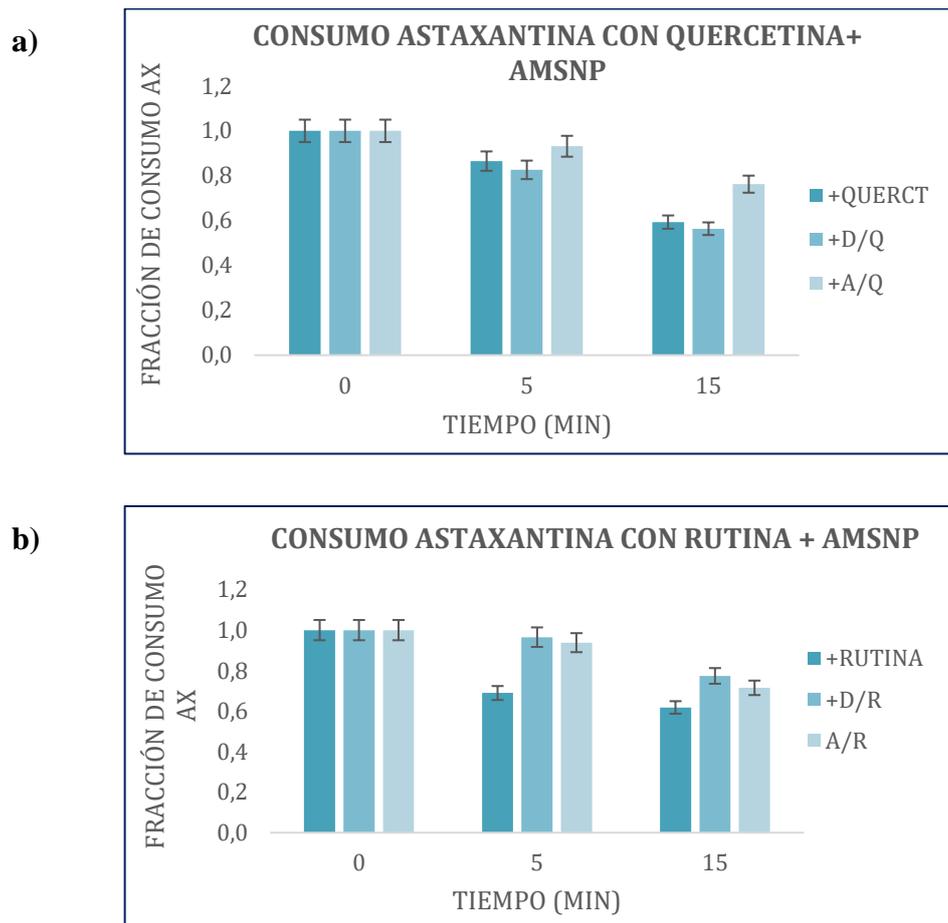


Figura 24. Gráficos de consumo de astaxantina en emulsión con polifenol solubilizado en su fase acuosa y en emulsión estabilizada con AMSNP y polifenol a) quercetina y b) rutina.

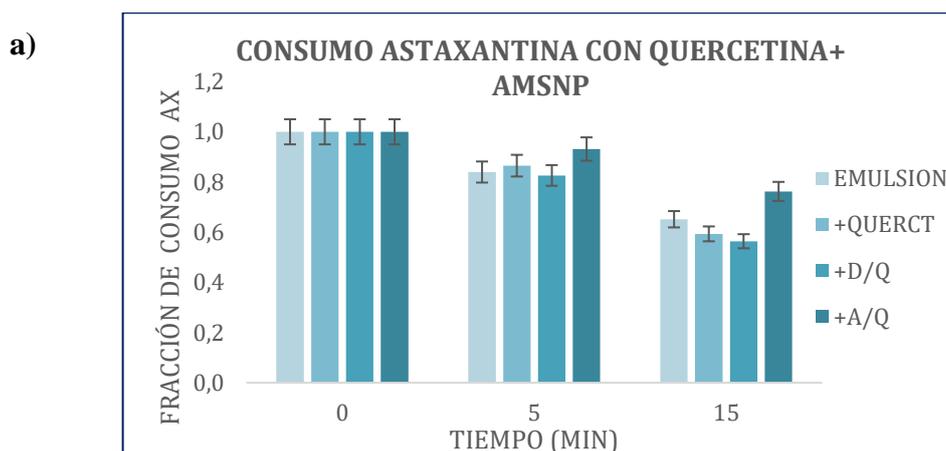
Los resultados de este estudio muestran que existe un efecto protector sobre la estabilidad química de la emulsión cuando se incorporan bajas concentraciones, tanto de los flavonoides como de las nanopartículas, con respecto a una emulsión que contiene solamente o el flavonoide solubilizado en su fase acuosa.

Por otro lado, si comparamos los resultados antes mencionados con los obtenidos del consumo de astaxantina sin flavonoides y sin nanopartículas (figura 25), tenemos que el porcentaje de consumo de astaxantina en la emulsión base es de un 35%, el cual es mayor al 23,7% de la emulsión con quercetina y AMSNP-APTES, donde el consumo disminuye en un 11,2%. Y también es mayor al 28,5% y 22,6% de las emulsiones

con rutina y AMSNP-APTÉS y AMSNP-DETA respectivamente, lo que indica una disminución del 6,5% y 12,4%. Por tanto, con respecto a la emulsión base tenemos estos tres tipos de emulsiones, que a baja concentración de flavonoides, poseen un efecto protector sobre la estabilidad oxidativa de una emulsión Pickering o/w.

Así, podemos concluir que tanto las emulsiones que contienen rutina/AMSNP-DETA y las que contienen quercetina/AMSNP-APTÉS, son las que presentan la mayor eficiencia relativa como estabilizador químico de emulsiones. Esto podría deberse a las interacciones electrostáticas entre los grupos hidroxilos del flavonoide con los aminos de la nanopartícula y/o por las interacciones hidrofóbicas entre la estructura hidrocarbonada del flavonoide y la cadena alquílica del DETA o APTÉS. Estas interacciones están condicionando la adsorción del flavonoide a la nanopartícula, la cual depende también de la solubilidad del flavonoide en el medio acuoso-glicerina que constituye el medio continuo de la emulsión.

La quercetina es un compuesto relativamente hidrofóbico que posee una alta afinidad por ambos tipos de nanopartículas y que se ubica preferentemente cerca del grupo amino terminal debido a sus interacciones electrostáticas, posiblemente provocando que la quercetina se encuentre más alejada de la interfase al estar en una emulsión con AMSNP-DETA que en una emulsión con AMSNP-APTÉS. Por otro lado, el flavonoide rutina es más hidrofóbico que la quercetina y su afinidad varía entre ambos tipos de nanopartículas, ubicándose preferentemente a lo largo de la cadena hidrocarbonada, estando más heterogéneamente distribuido en la interfase.



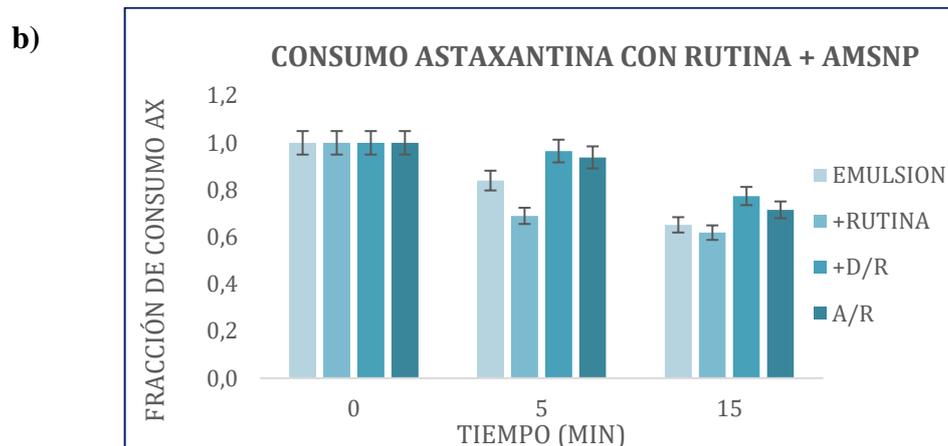
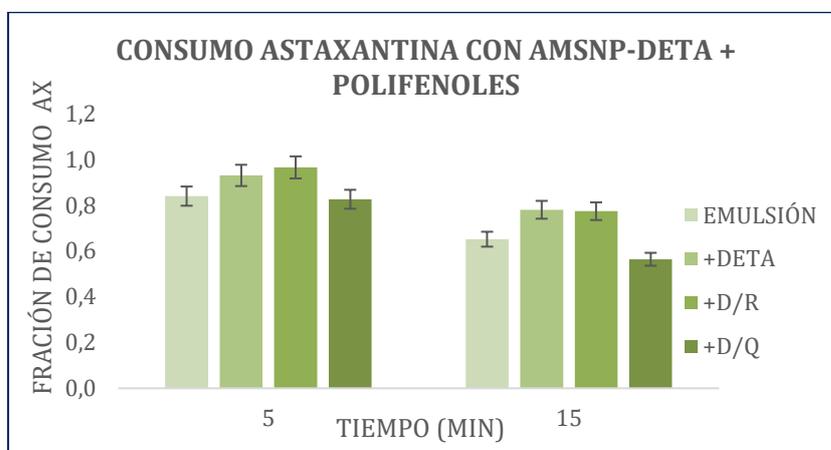


Figura 25. Gráficos de consumo de astaxantina en emulsión base, con polifenol solubilizado en su fase acuosa y en emulsión estabilizada con AMSNP y polifenol a) quercetina y b) rutina.

Este tipo de sistema que utiliza un emulgente nanopartícula-polifenol es de gran interés y pueden encontrarse varios estudios en la literatura (Yang 2021; Zhou 2019; Ju 2020) donde la combinación de partículas con antioxidantes, ya sea unidos covalentemente o formando complejos, mejora considerablemente tanto la estabilidad física como la estabilidad oxidativa de emulsiones o/w, dando énfasis a la importancia de la relación partícula/antioxidante y al aumento de la concentración del antioxidante [15,61,62,63]. En particular, en el estudio de Arriagada y col (2020) utilizaron nanopartículas con ácido carmínico unido covalentemente con la finalidad de tener doble función de antioxidante y colorante al ser incorporado en una emulsión o/w, esta combinación presentó un efecto protector sobre el consumo de vitamina E mayor al encontrado con nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas en el sistema, disminuyendo el porcentaje de degradación de vitamina E de un 14,5% a un 9,26% [15]. Este efecto se debería a la combinación entre la capacidad de las nanopartículas de formar una capa gruesa en la interfase de la emulsión que adquiere actividad antioxidante. Sin embargo, unir covalentemente no es la única forma de generar esta capa en la interfase, es así que Hu y col. (2022) estudiaron la doble estabilización de una emulsión Pickering con nanopartículas de sílice mesoporosas cargadas con galato de epigallocatequina (EGCG), lo que mejoró tanto la estabilidad

física como química de la emulsión en estudio; para este último, la combinación de nanopartículas cargadas con EGCG disminuyó el contenido de productos de oxidación [43].

a)



b)

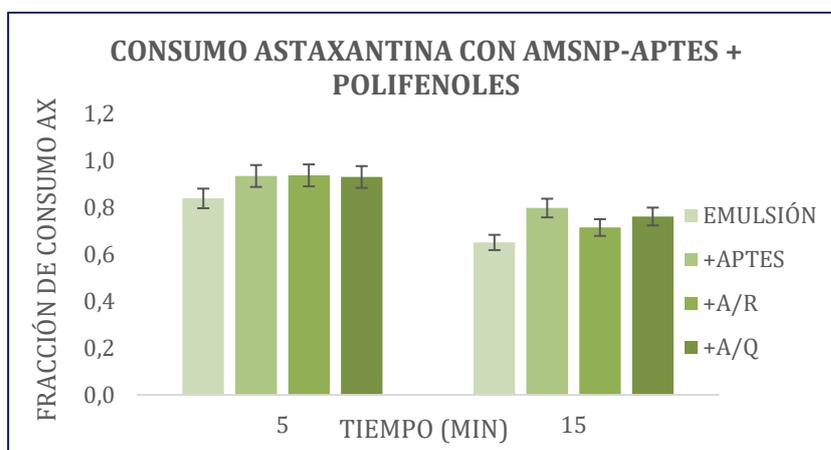


Figura 26. Gráficos de consumo de astaxantina en emulsión base, con a) AMSNP-DETA y b) AMSNP-APTES y en emulsión estabilizada con AMSNP y polifenol.

Si bien a simple vista los resultados de este estudio parecen concordar con la literatura anteriormente descrita, en un análisis más detallado, al comparar los resultados de las emulsiones que contienen flavonoides y nanopartículas con los obtenidos por las emulsiones con solo nanopartículas en su interfase, observamos que el consumo de astaxantina es mayor cuando está presente el flavonoide (figura 26).

Así, la emulsión base presenta un consumo de astaxantina de un 35% y la emulsión con AMSNP-APTES un consumo del 20,2%, lo que indica una disminución del 14,8%. Por otra parte, las emulsiones que contienen AMSMP-APTES más los flavonoides solubilizados en su fase acuosa presentaron porcentajes de consumo del 23,8% (para quercetina) y 28,5% (para rutina), los que corresponde a una disminución del 11,2% y 6,5%, respectivamente. Estos resultados muestran un aumento del consumo de astaxantina al incorporar un flavonoide a una emulsión Pickering estabilizada con AMSNP-APTES.

El mismo caso se repite con la emulsión con AMSNP-DETA, cuyo consumo fue del 22%, disminuyendo el consumo de astaxantina en un 13% con respecto a la emulsión base. Mientras que las emulsiones estabilizadas con AMSNP-DETA en su interfase y quercetina o rutina solubilizada en su fase acuosa presentaron porcentajes de consumo del 43,6% y del 22,6% respectivamente, lo que corresponde a un aumento del 8,6% con quercetina y una disminución del 12,4% con rutina. Estos resultados coinciden con lo anteriormente descrito, pues el consumo aumenta al incorporar el flavonoide a la emulsión.

Es importante destacar que, a diferencia de los estudios descritos anteriormente, en esta tesis no se utilizaron nanopartículas que tuvieran previamente unidas en forma covalente o físicamente los flavonoides, sino que éstos se solubilizaron en la fase acuosa de la emulsión en una mínima concentración utilizada (0,01 %), quedando disponibles para que una fracción o la totalidad de ellos se adsorba en la interfase en etapas de almacenamiento posterior a su preparación, tal como podría ocurrir a nivel comercial.

Los resultados anteriores muestran que la adición de bajas concentraciones de flavonoides solubilizados a la fase acuosa de una emulsión Pickering estabilizada con nanopartículas, disminuyeron el efecto protector generado por éstas, aumentando el consumo de astaxantina. Esto podría deberse a la oxidación del flavonoide por efecto del radical hidroxilo generado por fotólisis del agua oxigenada.

Esta reacción puede generar productos de oxidación que posean propiedades prooxidantes y que tengan la posibilidad de traspasar la barrera generada por la nanopartícula a través de sus poros, llegando al interior del glóbulo donde no hay

presencia de un antioxidante que pueda prevenir el efecto prooxidante, disminuyendo así el efecto protector de las nanopartículas sobre el sistema.

Estos resultados, indican la necesidad de agregar una mayor cantidad de flavonoide al sistema para reducir el efecto generado por la oxidación de la baja concentración de quercetina o rutina utilizada. Esto podría ser a través de la incorporación previa del flavonoide a las nanopartículas, protegiendo así al compuesto de una oxidación temprana y bloqueando el paso a productos de oxidación con características prooxidantes que puedan disminuir el efecto protector de las nanopartículas. Un ejemplo de esta idea es el estudio realizado por Hu y col. (2022) quienes incorporaron el compuesto epigallocatequina (EGCG) a las nanopartículas previo a su incorporación en la emulsión, concluyendo que el uso de un emulgente cargado con un antioxidante, cuya liberación es controlable en un área específica de la interfase, es la clave para retardar de manera eficiente la oxidación del sistema. Además, proponen que la estructura mesoporosa es capaz de proteger y estabilizar al EGCG de la oxidación, mientras éste es liberado lenta y progresivamente en un área específica de la interfase protegiendo a la fase oleosa de la oxidación [43].

9.6 Evaluación del efecto de la adsorción de la quercetina oxidada a la superficie de las nanopartículas aminofuncionalizadas, sobre la oxidación de emulsiones con astaxantina.

Finalmente, se realizó un estudio final, donde se evaluó la capacidad de los productos de fotooxidación de quercetina, para generar un efecto sobre la estabilidad química de la emulsión, a través del seguimiento del consumo de astaxantina 0,1% como compuesto bioactivo lábil solubilizado dentro del glóbulo de aceite.

9.6.1 Caracterización de la quercetina fotooxidada mediante HPLC.

En primer lugar, se realizó la caracterización de la quercetina fotooxidada mediante cromatografía HPLC. Para esto, se compararon los cromatogramas del flavonoide quercetina antes y después del proceso de fotooxidación.

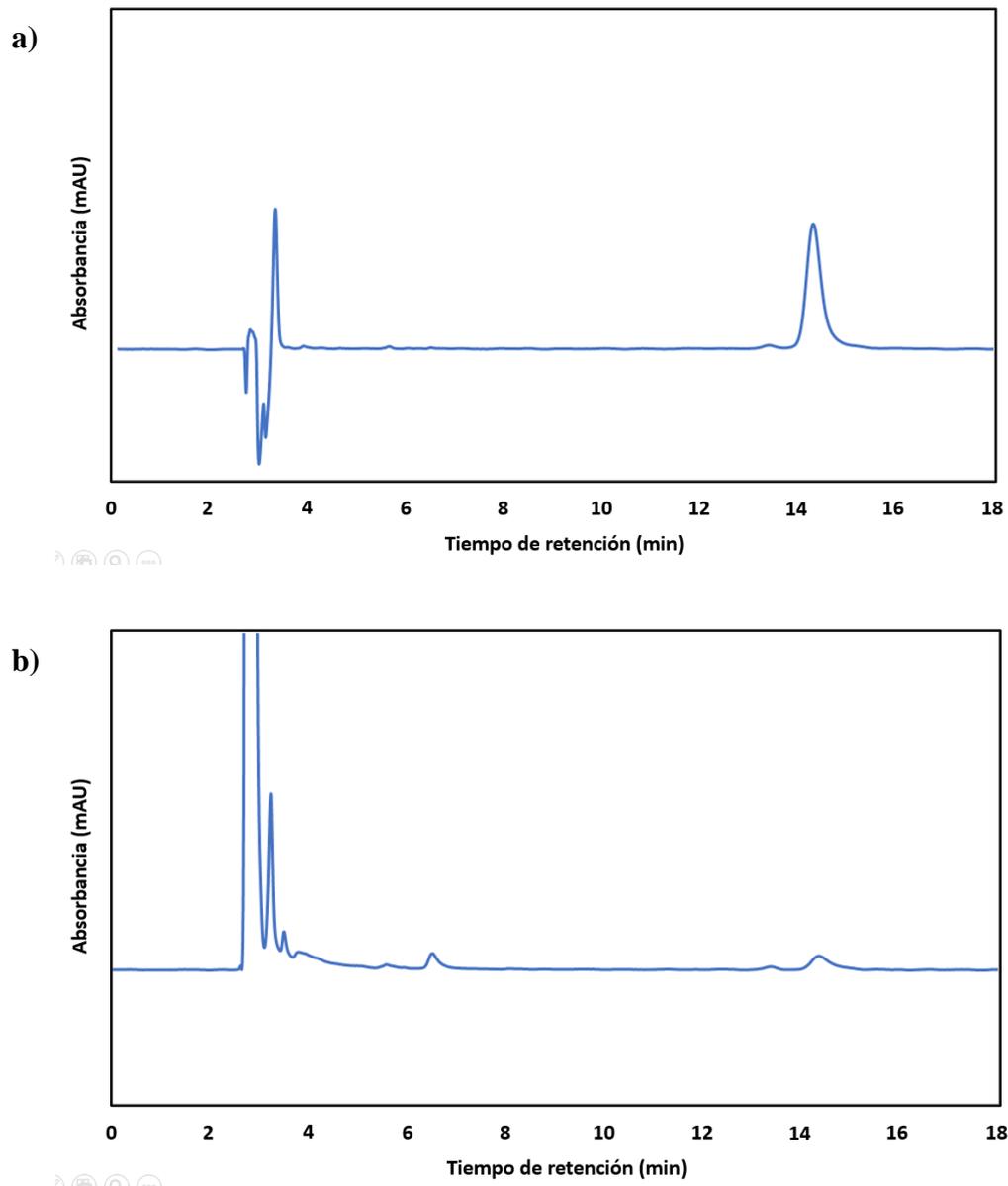


Figura 27. Cromatogramas HPLC de a) quercetina sin fotolizar y b) quercetina fotooxidada.

El cromatograma de la quercetina sin fotolizar a 220 nm presenta una señal a los 14,3 minutos. Mientras que el cromatograma de la quercetina fotolizada a 220 nm presentó una señal característica a los 6,5 minutos y una disminución significativa del área de la señal en 14,3 minutos (figura 27).

9.6.2 Capacidad de adsorción de quercetina fotooxidada a la superficie de las nanopartículas.

Durante este estudio se evaluó la capacidad de adsorción de la quercetina fotooxidada a las nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas con distinto largo de cadena. Este estudio se realizó de manera cualitativa comparando los cromatogramas de la adsorción de quercetina sin fotolizar a ambos tipos de nanopartículas con los cromatogramas de la adsorción de quercetina fotolizada. Los resultados mostraron que a bajas concentraciones de quercetina sin fotolizar tanto para las nanopartículas aminofuncionalizadas con DETA como con APTES, los cromatogramas a 220 nm solo presentan la señal a 14,3 minutos. Esto mismo ocurre para la quercetina fotolizada a concentraciones bajas, con una señal a 14,3 minutos con un área menor a la presentada con la quercetina sin fotolizar.

Por otra parte, a concentraciones mayores, para la quercetina sin fotolizar, los resultados muestran que tanto para la adsorción utilizando AMSNP-APTES como en AMSNP-DETA, solo aparece la señal a 14,3 minutos, mientras que para el caso de la quercetina fotolizada, el cromatograma de su adsorción en AMSNP-APTES se mantiene igual a los anteriores, pero el cromatograma de la adsorción de quercetina fotolizada en AMSNP-DETA presenta una señal nueva, aparte de la señal en 14,3 minutos, que corresponde a la señal en 6,5 minutos. Esta señal es característica del cromatograma de la quercetina fotolizada.

Estos resultados no son suficientes para determinar si la quercetina fotolizada es capaz de adsorberse a las nanopartículas, pero si puede inferirse una posible adsorción basado en el hecho que para el cromatograma a 220 nm de la adsorción en AMSNP-DETA aparece la señal característica de la quercetina oxidada en 6,5 minutos cuando se trabaja a concentraciones mayores y no en concentraciones menores, lo que podría indicar que a concentraciones mayores la quercetina fotolizada no se adsorbe completamente o existe una competencia con la quercetina en la solución.

9.6.3 Evaluación consumo de astaxantina en una emulsión Pickering o/w estabilizada con nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas y quercetina fotooxidada en su fase acuosa.

Finalmente, se realizó el estudio de consumo de astaxantina agregando la quercetina fotolizada en un 0,01% en la fase acuosa de cada emulsión estabilizada con nanopartículas aminofuncionalizadas con AMSNP-APTES o AMSNP-DETA, utilizando el mismo tratamiento de muestra y metodología de cuantificación de astaxantina que en el punto 9.7.

Los resultados de este estudio mostraron que, para ambos tipos de nanopartículas, la adición del flavonoide fotolizado produjo aumento del consumo de astaxantina con respecto a la emulsión base y a la emulsión con nanopartículas y quercetina sin fotolizar (figura 28).

Este efecto prooxidante en el caso de la emulsión Pickering estabilizada con AMSNP-DETA con quercetina fotooxidada en su fase acuosa, es de un 48% luego de 15 minutos de fotooxidación, el cual es un aumento del 13% del consumo de astaxantina con respecto a la emulsión base (35%), del 4% con respecto a la emulsión con quercetina sin fotolizar y AMSNP-DETA, y del 7% con respecto a una emulsión con solo quercetina sin fotolizar a baja concentración en su fase acuosa. Mientras que, para el caso de la emulsión Pickering estabilizada con AMSNP-APTES podemos observar que el consumo aumenta de forma más significativa al incorporar la quercetina fotooxidada, obteniendo un incremento del 27% del consumo de astaxantina con respecto a la emulsión base, del 38% con respecto a la emulsión con quercetina sin fotooxidar y AMSNP-APTES y, del 21% con respecto a la emulsión con quercetina sin fotooxidar solubilizada en su fase acuosa.

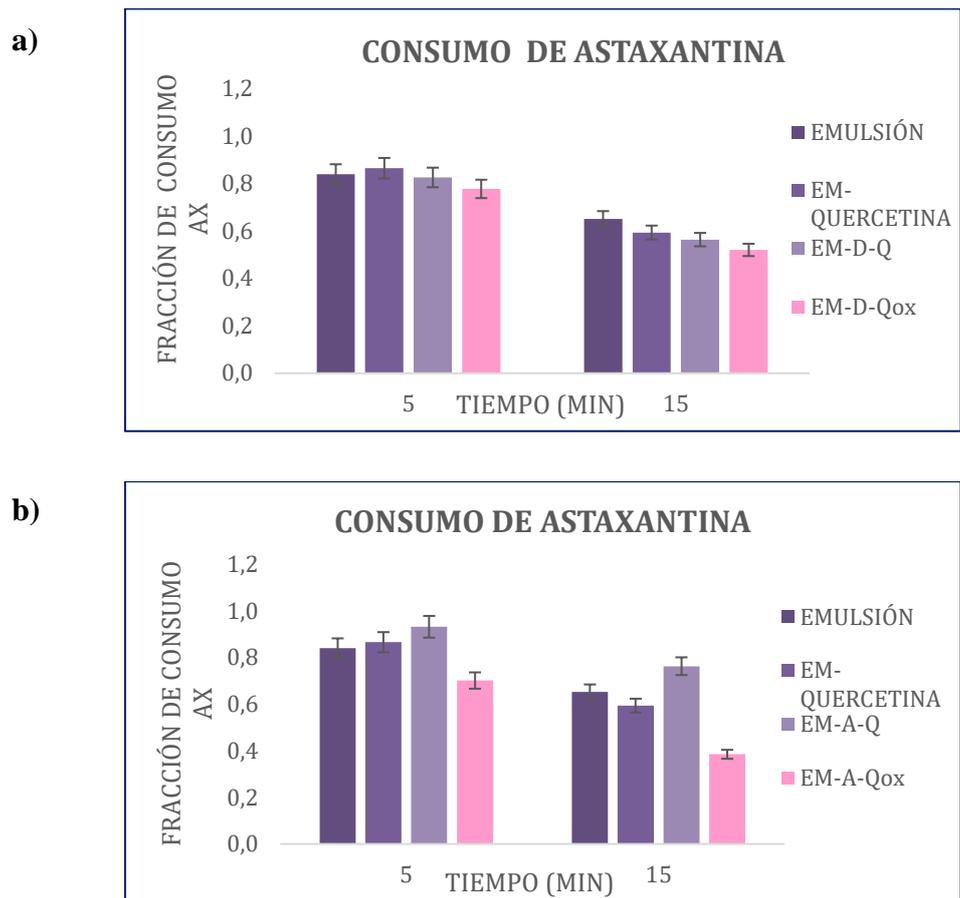


Figura 28. Gráficos consumo de astaxantina en emulsión base, emulsión con quercetina en su fase acuosa y emulsión con quercetina y AMSNP en comparación a una emulsión con AMSNP y quercetina fotooxidada.

Estos resultados permiten comprobar que los productos generados luego de la fotooxidación del flavonoide poseen propiedades prooxidantes capaces de aumentar en mayor o menor grado el consumo del compuesto bioactivo lábil astaxantina solubilizado dentro del glóbulo de aceite.

10. CONCLUSIONES

En este estudio, se obtuvieron nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas con APTES y DETA, con un diámetro hidrodinámico de 400 nm aproximadamente. Su visualización se realizó a través de microscopia electrónica de barrido, obteniendo nanopartículas esféricas, con una homogénea distribución de tamaño de poro y con un tamaño apropiado para su utilización a lo largo de este trabajo.

Los flavonoides quercetina y rutina son capaces de adsorberse a las nanopartículas amino funcionalizadas; la quercetina posee un porcentaje de eficacia de incorporación del 98% para ambos tipos de nanopartículas, no presentando una afinidad preferencial por ninguno de los grupos amino (DETA y APTES), mientras que para rutina los porcentajes varían en mayor medida entre los tipos de nanopartículas, aunque sigue siendo menor en comparación a la afinidad que presenta quercetina.

Respecto a los estudios de adsorción, los datos se ajustaron a la isoterma de Freundlich, indicando que la adsorción del polifenol estaría ocurriendo en forma de multicapas debido a interacciones electrostáticas entre los grupos expuestos sobre una superficie heterogénea.

Las emulsiones Pickering o/w preparadas en este estudio, que contenían una baja cantidad de fase grasa, presentaron buenas propiedades organolépticas y resultaron estables luego de 24 y 72 horas bajo condiciones de estrés oxidativo generado por la presencia de H_2O_2 y su almacenamiento en estufa a $40^\circ C$, por lo que se consideraron apropiadas para su utilización en los estudios de estabilidad química.

La evaluación del consumo de vitamina E no permitió obtener resultados confiables respecto a la estabilidad química de las emulsiones, lo que se asoció a dificultades en el tratamiento de muestra y metodología utilizada en condiciones oxidativas. Mientras que, la evaluación del consumo de astaxantina, evidenció que las emulsiones que contenían rutina en su fase acuosa y nanopartículas en su interfase

mostraron un claro efecto protector con respecto a la emulsión con solo rutina en su fase acuosa, disminuyendo el consumo en un 9,7% (AMSNP-APTES) y en un 15,5% (AMSNP-DETA). Por otra parte, para el flavonoide quercetina, la disminución del consumo de astaxantina en emulsiones que contenían AMSNP-APTES fue del 17%. Las emulsiones que contenían rutina/AMSNP-DETA y quercetina/AMSNP-APTES fueron las que presentaron un mayor efecto protector sobre la estabilidad química de la emulsión con respecto a una emulsión base y a las emulsiones con solo flavonoide en su fase acuosa.

El análisis de los resultados evidenció que la incorporación de una baja cantidad de flavonoide (0,01%) a emulsiones que contienen nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas, no contribuye a la estabilidad química de la emulsión bajo las condiciones de fotooxidación realizadas en este estudio.

Además, al incorporar quercetina fotooxidada a la formulación estudiada, no se evidenció un efecto protector del producto oxidado sobre la estabilidad de astaxantina, indicando que la oxidación del flavonoide podría ser la razón de la ausencia del efecto antioxidante de los flavonoides observado en este trabajo.

En conclusión, la adsorción de un flavonoide en baja concentración solubilizado en la fase acuosa de una emulsión pickering o/w, a las nanopartículas de sílice mesoporosas aminofuncionalizadas con distinto largo de cadena presenta un aumento del consumo con respecto a una emulsión que contiene solo el flavonoide. Sin embargo, este efecto es mayormente generado por la presencia de las nanopartículas, por lo que este método no es eficiente para utilizarse en la producción de un emulgente sólido antioxidante.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Albert, C., Beladjine, M., Tsapis, N., Fattal, E., Agnely, F., & Huang, N. (2019). Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release*. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.07.003
2. Ugarte Núñez, Catalina de los ángeles. Estudio del efecto de nanopartículas de sílice conjugadas con ácido carmínico como estabilizantes de vitamina E y vitamina A en emulsiones “Pickering o/w”. (Magister en ciencias farmacéuticas). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, 2019. 77 h.
3. Chen, L., Ao, F., Ge, X., & Shen, W. (2020). Food-Grade Pickering Emulsions: Preparation, Stabilization and Applications. *Molecules*, 25(14), 3202. doi:10.3390/molecules25143202
4. Singh, Y. (2006). *Martin’s physical pharmacy and pharmaceutical sciences*. New Jersey: Department of Pharmaceutics Ernest Mario School of Pharmacy Rutgers, The State University of New Jersey.
5. Vrolijk, M. F., Opperhuizen, A., Jansen, E. H. J. M., Godschalk, R. W., Van Schooten, F. J., Bast, A., & Haenen, G. R. M. M. (2015). The shifting perception on antioxidants: The case of vitamin E and β -carotene. *Redox Biology*, 4, 272–278. doi: 10.1016/j.redox.2014.12.017
6. Yamashita, Y., Miyahara, R., & Sakamoto, K. (2017). Emulsion and Emulsification Technology. *Cosmetic Science and Technology*, 489–506. doi:10.1016/b978-0-12-802005-0.00028-8
7. Frelichowska, J., Bolzinger, M.-A., & Chevalier, Y. (2010). Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(2), 348–356. doi: 10.1016/j.jcis.2010.08.019
8. Frelichowska, J., Bolzinger, M.-A., & Chevalier, Y. (2009). Pickering emulsions with bare silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 343(1-3), 70–74. doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.01.031

9. Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62–69. doi:10.1016/0021-9797(68)902725
10. Llinás, M. C., & Sánchez-García, D. (2014). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad*, 71(565).
11. Hirai T, Yoshikawa T, Nabeshi H, et al. Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days. *Die Pharmazie*. 2012 Aug;67(8):742-743. PMID: 22957443.
12. Starořnová, K.; Nielsen, J.B.; Roursgaard, M.; Knudsen, L.E. Transport of SiO₂ Nanoparticles through Human Skin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012, 111, 142–144. [CrossRef]
13. Ostrowski, A.; Nordmeyer, D.; Boreham, A.; Brodewolf, R.; Mundhenk, L.; Fluhr, J.W.; Lademann, J.; Graf, C.; Ruhl, E.; Alexiev, U.; et al. Skin barrier disruptions in tape stripped and allergic dermatitis models have no effect on dermal penetration and systemic distribution of AHAPS-functionalized silica nanoparticles. *Nanomedicine* 2014, 10, 1571–1581. [CrossRef]
14. Rancan, F.; Gao, Q.; Graf, C.; Troppens, S.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Kembuan, C.; Blume-Peytavi, U.; Rühl, E.; Lademann, J.; et al. Skin Penetration and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles with Variable Size, Surface Functionalization, and Colloidal Stability. *ACS Nano* 2012, 6, 6829–6842. [CrossRef]
15. Arriagada, F., Ugarte, C., Günther, G., Larraín, M. A., Guarnizo-Herrero, V., Nonell, S., & Morales, J. (2020). Carminic Acid Linked to Silica Nanoparticles as Pigment/Antioxidant Bifunctional Excipient for Pharmaceutical Emulsions. *Pharmaceutics*, 12(4), 376. doi:10.3390/pharmaceutics12040376
16. Berlier, G., Gastaldi, L., Sapino, S., Miletto, I., Bottinelli, E., Chirio, D., & Ugazio, E. (2013). MCM-41 as a useful vector for rutin topical formulations: Synthesis, characterization and testing. *International journal of pharmaceutics*, 457(1), 177-186.
17. Deligiannakis Y, Sotiriou G, Pratsinis S. Antioxidant and Antiradical SiO₂ Nanoparticles Covalently Functionalized with Gallic Acid. *E. ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2012; 4: 6609–6617.

18. Schlipf D, Jones C, Rankin S, Knutson B et al. Flavonoid adsorption and stability on titania-functionalized silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2015; 478: 15–21
19. Arriagada F, Günther G, Nos J, Nonell S, Olea-Azar C, Morales J. Antioxidant Nanomaterial Based on Core–Shell Silica Nanospheres with Surface-Bound Caffeic Acid: A Promising Vehicle for Oxidation-Sensitive Drugs. *Nanomaterials*, 2019; 9(2): 214.
20. Arriagada, F., Correa, O., Günther, G., Nonell, S., Mura, F., Olea-Azar, C., & Morales, J. (2016). Morin Flavonoid Adsorbed on Mesoporous Silica, a Novel Antioxidant Nanomaterial. *PLOS ONE*, 11(11), e0164507. doi: 10.1371/journal.pone.0164507
21. Kiokias, S., & Varzakas, T. (2014). Activity of flavonoids and β -carotene during the auto-oxidative deterioration of model food oil-in water emulsions. *Food Chemistry*, 150, 280–286. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.112
22. Atarés, L., Marshall, L. J., Akhtar, M., & Murray, B. S. (2012). Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure. *Food Chemistry*, 134(3), 1418–1424. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.221
23. Luo, Z., Murray, B. S., Yusoff, A., Morgan, M. R. A., Povey, M. J. W., & Day, A. J. (2011). Particle-Stabilizing Effects of Flavonoids at the Oil–Water Interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2636–2645. doi:10.1021/jf1041855
24. Luo, Z., Murray, B. S., Ross, A.-L., Povey, M. J. W., Morgan, M. R. A., & Day, A. J. (2012). Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 84–90. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.11.027
25. Noon, J., Mills, T. B., & Norton, I. T. (2019). The use of antioxidant rutin hydrate Pickering particles to combat lipid oxidation in O/W emulsions. *Journal of Food Engineering*, 109830. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109830
26. Noon, J., Mills, T. B., & Norton, I. T. (2020). The use of natural antioxidants to combat lipid oxidation in O/W emulsions. *Journal of Food Engineering*, 110006. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2020.110006

27. Lue, B.-M., Sorensen, A.-D. M., Jacobsen, C., Guo, Z., & Xu, X. (2016). Antioxidant efficacies of rutin and rutin esters in bulk oil and oil-in-water emulsion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(4), 1600049. doi:10.1002/ejlt.201600049
28. Yang, D., Wang, X.-Y., & Lee, J. H. (2015). Effects of flavonoids on physical and oxidative stability of soybean oil O/W emulsions. *Food Science and Biotechnology*, 24(3), 851–858. doi:10.1007/s10068-015-0110-3
29. Cefali, Ataide, Fernandes, Sousa, Gonçalves, Eberlin, Mazzola. (2019). Flavonoid-Enriched Plant-Extract-Loaded Emulsion: A Novel Phytocosmetic Sunscreen Formulation with Antioxidant Properties. *Antioxidants*, 8(10), 443. doi:10.3390/antiox8100443
30. Dyja, R., & Jankowski, A. (2017). The effect of additives on release and in vitro skin retention of flavonoids from emulsion and gel semisolid formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 39(4), 442–449. doi:10.1111/ics.12395
31. Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., ... Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, 40, 68–75. doi: 10.1016/j.jff.2017.10.047
32. Xu, D., Hu, M.-J., Wang, Y.-Q., & Cui, Y.-L. (2019). Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*, 24(6), 1123. doi:10.3390/molecules24061123
33. Wang, Wei, Deng, Xie, Huang, & Zheng. (2020). Improving Stability and Accessibility of Quercetin in Olive Oil-in-Soy Protein Isolate/Pectin Stabilized O/W Emulsion. *Foods*, 9(2), 123. doi:10.3390/foods9020123
34. Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 1060–1066. doi: 10.1016/j.lwt.2007.06.010
35. Patel, K., & Patel, D. K. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and*

- Related Inflammatory Diseases, 457–479. doi:10.1016/b978-0-12-813820-5.00026-x
36. Roldán, P. L., & Mach, N. (2012). Efecto del consumo de Astaxantina en la salud. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 18(3), 164-177.
 37. Gajardo Solari, S., Benites Vílchez, J., López Vivar, J., Burgos Hermosilla, N., Caro Galán, C., & Rojas Arredondo, M. (2011). Astaxanthin: natural antioxidants with various applications in cosmetics. *Biofarbo*, 6.
 38. Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(2), 185-196.
 39. Lee, G., & Han, S. (2018). The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*, 10(11), 1614. doi:10.3390/nu10111614
 40. Azzi, A. (2018). Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 92–103. doi: 10.1016/j.mam.2017.06.004
 41. Chow, C. K. (1991). Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(2), 215-232. doi:10.1016/0891-5849(91)90174-2
 42. Arriagada Soto Francisco Javier. Síntesis y evaluación antioxidante de un nuevo nanomaterial farmacéutico. (Doctorado en ciencias farmacéuticas). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, 2019.170h.
 43. Hu, J., Xu, R., & Deng, W. (2022). Dual stabilization of Pickering emulsion with epigallocatechin gallate loaded mesoporous silica nanoparticles. *Food Chemistry*, 396, 133675.
 44. Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical engineering journal*, 156(1), 2-10.
 45. Kalam, S., Abu-Khamsin, S. A., Kamal, M. S., & Patil, S. (2021). Surfactant adsorption isotherms: a review. *ACS omega*, 6(48), 32342-32348.
 46. Ghanimati, M., Jabbari, M., Farajtabar, A., & Nabavi-Amri, S. A. (2017). Adsorption kinetics and isotherms of bioactive antioxidant quercetin onto amino-functionalized silica nanoparticles in aqueous ethanol solutions. *New Journal of Chemistry*, 41(16), 8451-8458.

47. Nada, A., Krishnaiah, Y. S., Zaghloul, A. A., & Khattab, I. (2010). Analysis of vitamin E in commercial cosmetic preparations by HPLC. *Journal of Cosmetic Science*, 61(5), 353-365.
48. Wu, S. H., Mou, C. Y., & Lin, H. P. (2013). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3862-3875.
49. Tang, F., Li, L., & Chen, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced materials*, 24(12), 1504-1534.
50. Hsiao, I. L., Fritsch-Decker, S., Leidner, A., Al-Rawi, M., Hug, V., Diabaté, S., Weiss, C. (2019). Biocompatibility of amine-functionalized silica nanoparticles: the role of surface coverage. *Small*, 15(10), 1805400.
51. Abd El-Rahmanand, S. N., & Suhailah, S. (2014). Quercetin nanoparticles: Preparation and characterization. *Indian Journal of Drugs*, 2(3), 96-103.
52. Rodriguez, S. C. (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Revista Tumbaga*, 1(7).
53. Rajahmundry, G. K., Garlapati, C., Kumar, P. S., Alwi, R. S., & Vo, D. V. N. (2021). Statistical analysis of adsorption isotherm models and its appropriate selection. *Chemosphere*, 276, 130176.
54. Khan, M. A., Wallace, W. T., Islam, S. Z., Nagpure, S., Strzalka, J., Littleton, J. M., ... & Knutson, B. L. (2017). Adsorption and recovery of polyphenolic flavonoids using TiO₂-functionalized mesoporous silica nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*, 9(37), 32114-32125.
55. Patel, V. R., Dumancas, G. G., Viswanath, L. C. K., Maples, R., & Subong, B. J. (2016). Castor oil: properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. *Lipid insights*, 9, LPI-S40233.
56. Rawlings, A. V., & Lombard, K. J. (2012). A review on the extensive skin benefits of mineral oil. *International journal of cosmetic science*, 34(6), 511-518.
57. Fukushima, S., & Yamaguchi, M. (2001). Physical chemistry of cetyl alcohol: occurrence and function of liquid crystals in o/w creams. In *Surface and Colloid Science* (pp. 1-98). Springer, Boston, MA.
58. Kargar, M., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2011). The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *Journal of colloid and interface science*, 357(2), 527-533.

59. Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of free radicals in biology & medicine*, 1(2), 87-95.
60. Navarrete, M., Rangel, C., Corchado, J. C., & Espinosa-Garcia, J. (2005). Trapping of the OH radical by α -tocopherol: a theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(21), 4777-4784.
61. Zhou, B., Gao, S., Li, X., Liang, H., & Li, S. (2020). Antioxidant Pickering emulsions stabilised by zein/tannic acid colloidal particles with low concentration. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(5), 1924-1934.
62. Ju, M., Zhu, G., Huang, G., Shen, X., Zhang, Y., Jiang, L., & Sui, X. (2020). A novel Pickering emulsion produced using soy protein-anthocyanin complex nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 99, 105329.
63. Yang, F., Yang, J., Qiu, S., Xu, W., & Wang, Y. (2021). Tannic acid enhanced the physical and oxidative stability of chitin particles stabilized oil in water emulsion. *Food Chemistry*, 346, 128762.