



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**



División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura Química Farmacéutica Biológica

### REPORTE DE INVESTIGACIÓN

#### **Determinación de parámetros fisicoquímicos en la formación de complejos de inclusión entre $\beta$ -ciclodextrina y glicósidos de flavonoide**

##### **Proyecto genérico correspondiente:**

Biotransformaciones. Desarrollo de métodos biocatalíticos de síntesis y preparación de compuestos orgánicos biológicamente activos.

Presenta:

Gabriel Villavicencio González  
Matricula: 2182044277

Asesores:

Dra. Julia Cassani Hernández  
No. Eco. 29529

Dr. Luis José López Méndez  
No. Eco. 12772022

**Lugar de Realización:** Laboratorio de Biotransformaciones  
**Fecha de inicio y término:** Del 04 de julio de 2022 al 04 de enero de 2023

# Índice

## Tabla de contenido

1. Introducción .....	4
2. Antecedentes.....	5
2.1. Concepto e historia de las ciclodextrinas .....	5
2.2. Estructura química.....	6
2.3. Biocompatibilidad.....	6
2.4. Reactividad.....	7
2.5. Complejos de inclusión.....	7
2.6 Formación de complejos de inclusión .....	8
2.7 Uso de complejos de inclusión.....	9
2.8 Industria alimentaría.....	9
2.9 Industria de cuidado personal .....	10
2.10 Industria farmacéutica .....	10
2.11 Flavonoides .....	10
2.12 Hesperidina .....	11
2.13 Rutina .....	12
2.14 Métodos para determinar constantes de equilibrio en la formación de complejos de inclusión de ciclodextrinas .....	13
2.15 Método de Hildebrandt .....	14
2.16 Diagrama de solubilidad de fases.....	15
2.17 Relación de la $K_e$ respecto a la estabilidad de complejo obtenido y sus propiedades.....	17
2.18 Determinación de constantes de asociación por medio de titulación .....	18
3. Planteamiento del problema .....	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivo General .....	19
6. Objetivos Particulares .....	19
7. Material y métodos. ....	20
8. Determinación de las constantes de equilibrio mediante titulaciones UV-Vis .....	20
8.1. Método general para la determinación de la constante de equilibrio.....	20
8.2. Determinación de la constante de equilibrio entre $\beta$ CD y RUT mediante titulación UV-Vis .....	20

8.3 Diagrama de solubilidad de fases de RUT con $\beta$ CD .....	21
8.4 Diagrama de solubilidad de fases de HES con $\beta$ CD .....	21
9. Resultados y análisis.....	22
9.1 Determinación de la constante de equilibrio entre $\beta$ CD y HES mediante titulación UV-Vis .....	22
9.2 Determinación de la constante de equilibrio entre $\beta$ CD y RUT mediante titulación UV-Vis .....	23
9.3 Diagrama de solubilidad de fases de RUT con $\beta$ CD .....	25
10. Recomendaciones.....	26
11. Aportes a la sociedad .....	27
12. Conclusiones.....	27
13. Bibliografía.....	28

# 1. Introducción

La química supramolecular se ha establecido como un terreno fértil y prometedor en el diseño y desarrollo de sistemas acarreadores de fármacos. En este contexto, las ciclodextrinas (CDs) se presentan como agentes capaces de mejorar de manera significativa las propiedades de diversas moléculas, esto mediante la formación de sistemas conocidos como complejos de inclusión, los cuales mejoran la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de compuestos con potencial terapéutico.

Entre las moléculas que presentan problemas de solubilidad para su posterior desarrollo se encuentran los glicósidos de flavonoides, tales como la hesperidina (HES), y la rutina (RUT), que han suscitado un interés notable debido a su potencial farmacológico como agentes ansiolíticos y antidepresivos. A pesar de exhibir propiedades terapéuticas prometedoras, su limitada solubilidad acuosa es un impedimento significativo para lograr una biodisponibilidad óptima, dificultando su aplicación clínica efectiva.

El presente estudio explora la formación de complejos de inclusión entre la  $\beta$ -CD y los glicósidos de flavonoide RUT y HES, con el fin de dilucidar la dinámica de su equilibrio y obtener parámetros fisicoquímicos clave que rigen esta interacción, y así estimar la estabilidad y eficacia de estos sistemas portadores de fármacos.

En específico el objetivo primordial de esta investigación es determinar la constante de equilibrio, la estequiometría y la eficiencia de encapsulación de estos complejos. Para alcanzar esta meta, se emplearán técnicas de titulación y análisis mediante regresión no lineal de datos experimentales. Estas herramientas se erigen como medios indispensables para determinar con precisión los aspectos clave de la interacción entre la  $\beta$ - y los glicósidos de flavonoide, ofreciendo un panorama de la termodinámica de este proceso.

En conclusión, este trabajo pretende contribuir significativamente al desarrollo de sistemas portadores de fármacos más eficaces y especializados, fundamentados en el entendimiento de las interacciones moleculares entre las CD y los flavonoides. Este conocimiento tiene el potencial de impactar la formulación de terapias dirigidas

al tratamiento de condiciones asociadas con la ansiedad y la depresión, abriendo nuevas perspectivas en el campo de la medicina farmacológica.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Concepto e historia de las ciclodextrinas

Las CDs son oligosacáridos cíclicos no reductores, formados por monómeros de glucosa, unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Se producen a partir de la degradación del almidón por la reacción catalizada por la enzima ciclodextrina glucosiltransferasa (CGTasa), que da origen a estas estructuras toroidales, rígidas y con una cavidad interior de volumen específico [1].

Las CDs fueron descubiertas por Villiers en 1891, quien a partir de un kilogramo de almidón digerido por *Bacillus amylobacter*, logró obtener 3 gramos de una sustancia que denominó celulosina, debido a su gran similitud con la celulosa [2]. Más tarde en 1903 Schardinger fue el primero en aislar el microorganismo *Bacillus macerans*, que es capaz de generar la CGTasa. Tiempo después, al realizar la caracterización de la celulosina de Villiers, se dio cuenta que era una mezcla de dos oligosacáridos cíclicos, los cuales denominó dextrina cristalina  $\alpha$  y dextrina  $\beta$ .

Estas moléculas empezaron a generar gran interés, especialmente por el descubrimiento del químico alemán Pringsheim, quien se percató de la capacidad de cambiar las propiedades como solubilidad, estabilidad y velocidad de disolución de distintas moléculas [3].

Actualmente se clasifican como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ CD, dependiendo si el número de monómeros de glucosa es seis, siete u ocho respectivamente. La  $\beta$ CD es la más utilizada, debido a su accesibilidad, precio y por su gran capacidad de formar complejos de inclusión con una gran variedad de compuestos con pesos moleculares que oscilan entre 200 y 800 Daltons [4].

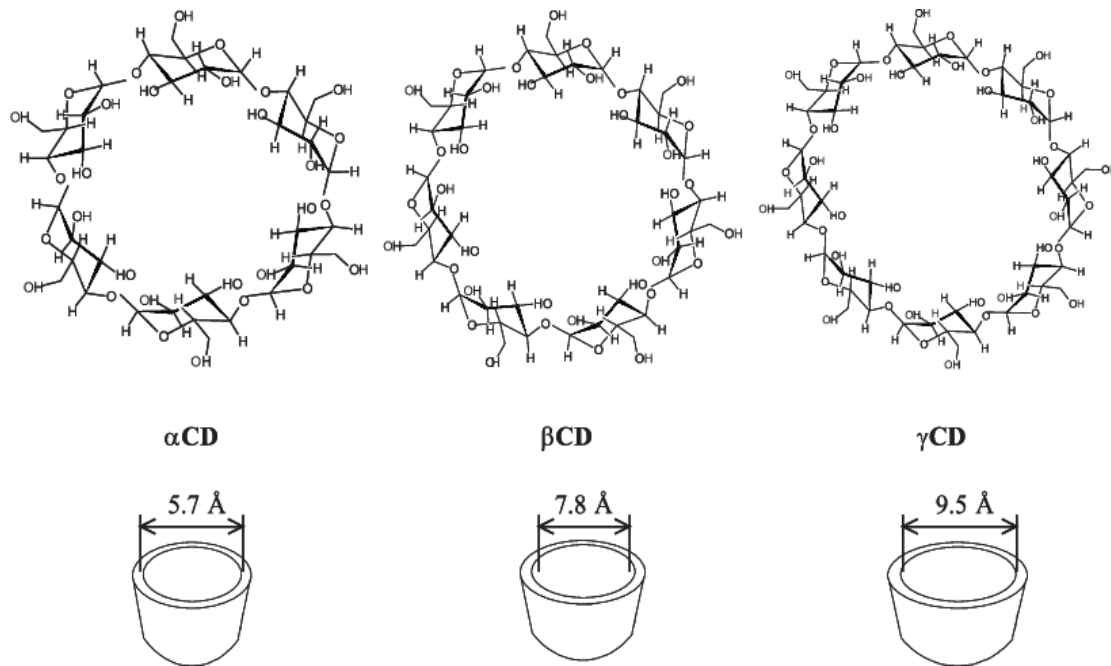


Figura 1. Estructuras de  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD y  $\gamma$ CD y su respectivo diámetro de cavidad en Å. [4].

## 2.2. Estructura química

Las CDs tienen una estructura tridimensional con forma cónica truncada, constituida por dos zonas, la interior, que es hidrofóbica y una zona exterior hidrofílica. Esto se debe al acomodo de los grupos funcionales de las moléculas de glucosa. Los grupos hidroxilo que constituyen la CD, se clasifican en secundarios y primarios, siendo los secundarios los situados en el borde más ancho del cono, mientras que los hidroxilos primarios se sitúan en el extremo angosto.

A pesar de su gran similitud estructural, entre ellas presentan distintas características fisicoquímicas. En cuanto a su solubilidad, la  $\gamma$ CD presenta una solubilidad de 25.6g por cada 100 ml de agua a 25°C, mientras que la  $\alpha$ CD 12.7 gramos/100 mL y la  $\beta$ CD 1.88 gramos/100mL en las mismas condiciones [5].

## 2.3. Biocompatibilidad

De acuerdo con reportes publicados por la "Food and Drug Administration" (FDA), las CDs son compuestos relativamente seguros para la administración animal y

humana, se ha demostrado que no presenta ninguna respuesta inmunológica, además de presentar un nivel de toxicidad bajo [6].

## **2.4. Reactividad**

En cuanto a su reactividad, existe una diferencia entre los tipos de hidroxilos que componen la molécula, siendo los secundarios menos reactivos, lo cual es una ventaja en términos de regioselectividad en síntesis química [7].

Las tres principales CDs nativas, presentan una alta estabilidad en medio alcalino y presentan valores de pKa entre 12,1 y 13,5, de modo que estos compuestos a pH bajo pueden presentar una hidrólisis ácida, provocando la ruptura del anillo y posteriormente la formación de oligosacáridos lineales y unidades de glucosa [8].

Una reacción que comparten en común todas las CD nativas es la hidroxilación por acción de la  $\alpha$ -amilasa, mientras que son inertes a la glucoamilasa. De igual manera, los derivados de CD presentan una mayor estabilidad ante la hidrólisis enzimática, debido a la entrada de los sustituyentes en lugar de los hidroxilos, lo cual dificulta el acceso a estas enzimas, disminuyendo su actividad hidrolítica [9].

## **2.5. Complejos de inclusión**

Los complejos de inclusión se forman cuando la molécula huésped se sitúa dentro de la cavidad del hospedador sin alterar su estructura [10].

Las CDs son capaces de formar dichos complejos de inclusión, siendo esta una de las características más llamativas de las CDs. las moléculas que suelen tomar el papel de huésped con las CDs tienen un carácter hidrofóbico, a causa de la naturaleza de la cavidad, donde se suelen presentar interacciones hidrofóbicas de tipo Van der Waals. Sin embargo, también pueden establecerse interacciones con huéspedes polares debido a la formación de puentes de hidrógeno con los hidroxilos primarios [2].

La estequiometría más común en los complejos de inclusión es 1:1 (huésped:anfitrión), sin embargo, también podemos encontrar complejos con

estequiometría 1:2, 2:1, o 2:2, esto depende de la naturaleza de los componentes puros, el tamaño de la cavidad de la CD, el equilibrio de asociación-disociación, así como la concentración del huésped y la CD [11, 12].

## 2.6 Formación de complejos de inclusión

Se ha reportado que en medio acuoso, hay unas cuantas moléculas de agua dentro de la cavidad de la CD, al ser ésta cara de carácter apolar, resulta una interacción muy poco favorable, esto genera un gradiente energético en favor de la sustitución por cualquier otra molécula huésped menos polar, lo que da lugar a la formación de un complejo de inclusión.

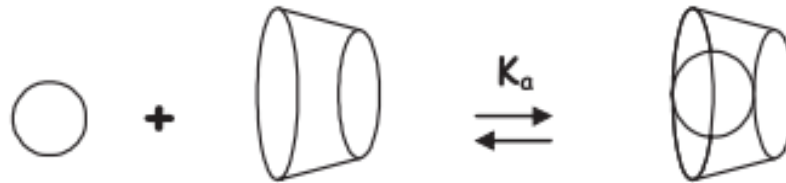


Figura 2. Formación de un complejo de inclusión de CD, donde el fármaco (huésped) interactúa con la CD (hospedador) [7].

Dependiendo del autor se exponen diversas etapas generales en la formación de los complejos de inclusión, en este caso describiré las etapas propuestas por Ponce en 2013 [13].

1. Desplazamiento de las moléculas de agua de la cavidad de la CD.
2. Formación de puentes de hidrógeno a medida que las moléculas de agua desplazadas pasan al seno de la disolución.
3. Disminución de las fuerzas hidrofóbicas repulsivas entre el huésped y el medio acuoso.
4. Incremento de las interacciones hidrofóbicas a medida que el huésped ingresa en la cavidad de la CD.

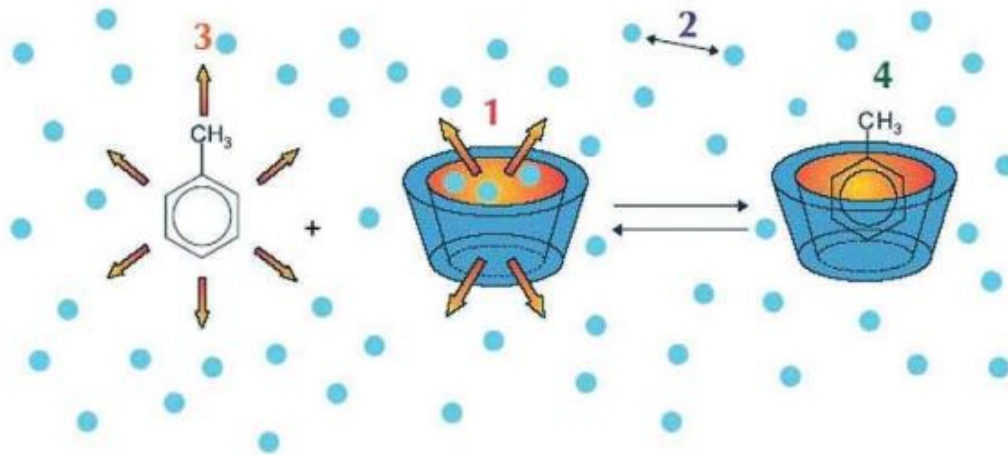


Figura 3. Representación gráfica de los pasos ocurridos, numerados del 1 al 4, en la formación de un complejo de inclusión de CD en medio acuoso, tomada de [14].

En la formación de complejos de inclusión, no es necesario que exista enlaces covalentes, ya que las interacciones electrostáticas o las fuerzas de van der Waals son las que predominan cuando el huésped se inserta en la cavidad [10].

## 2.7 Uso de complejos de inclusión

Existen diversas ventajas de estos complejos de inclusión, como por ejemplo mejorar la solubilidad de los huéspedes insolubles en agua, conseguir una mejor estabilidad de huéspedes lábiles ante la oxidación, radiación UV y el calor, al igual que el control de la volatilidad, enmascaramiento de sabores y eliminación de olores. Es por esto por lo que han sido muy utilizados por diversas industrias, con el objetivo de mejorar las características de sus productos, como se detalla a continuación:

## 2.8 Industria alimentaría

En esta industria se utilizan las CDs para proteger los sabores de las formulaciones en procesos de congelación-descongelación exposición a microondas. En otros casos las CDs se utilizan para dar una mayor durabilidad al sabor en largos períodos de tiempo, así como para mejorar el sabor de bebidas alcohólicas como el whisky y la cerveza. De igual forma se ha utilizado para extraer el colesterol de productos de origen animal, por ejemplo, del huevo y algunos productos lácteos, también se

utilizan para eliminar compuestos fenólicos que causan oscurecimiento enzimático, entre muchas otras utilidades.

## 2.9 Industria de cuidado personal

Se emplean las CDs para controlar la liberación de fragancias en perfumes, ambientadores y detergentes, de igual forma se puede utilizar para controlar el olor en pañales, productos menstruales y toallas de papel.

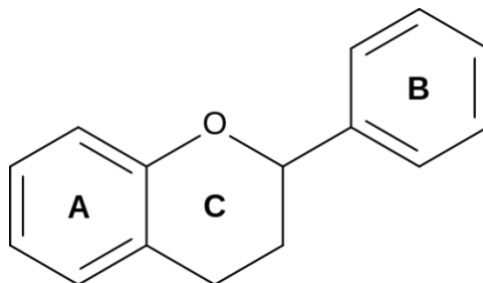
## 2.10 Industria farmacéutica

Se utilizan este tipo de complejos para mejorar la solubilidad de moléculas poco solubles en agua, para así aumentar la biodisponibilidad y poder reducir la dosis administrada al paciente. Además, se han ocupado para enmascarar efectos irritantes, así como sabores y olores desagradables en la formulación de algunos medicamentos.

Igualmente se han utilizado estos complejos para dar una liberación controlada a medicamentos, por ejemplo, de la ciprofloxacina (antibiótico de la familia de las quinolonas) mediante el diseño del sistema de administración de fármacos (hidrogel) que contiene  $\beta$ -CD a través de la formación de redes por interacciones supramoleculares [15].

## 2.11 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos que están constituidos por dos anillos aromáticos, unidos por medio de un anillo de pirano, de manera que presentan una estructura base tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, como se muestra en la imagen 1.



#### Figura 4. Estructura general de flavonoides (C6-C3-C6).

Estos compuestos se encuentran principalmente en vegetales superiores, en las zonas más expuestas al sol, como las flores, hojas y frutos, siendo estos compuestos producto de su metabolismo secundario, que sirven como pigmento, atrayendo así a los polinizadores, al igual que tienen un efecto antioxidante [16].

Debido a que el cuerpo humano no puede sintetizar este tipo de sustancias por su propia cuenta y presentan ciertas características protectoras y antioxidantes, deben ser incorporadas como nutrientes esenciales en la dieta. Actualmente el ser humano obtiene estos nutrientes de los siguientes alimentos: frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja [17].

En cuanto a su actividad farmacológica, estos compuestos destacan por presentar propiedades antioxidantes, puesto que pueden inhibir la lipoperoxidación. También poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir ciertas enzimas.

Los efectos antioxidantes de los flavonoides dependen principalmente de su capacidad por neutralizar radicales libres, sus propiedades quelantes de hierro, así como la inactivación de las oxidadas (lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa), previniendo la formación de especies reactivas de oxígeno evitando así el estrés oxidativo [18].

### **2.12 Hesperidina**

La HES (3,5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicosido) es un glicósido de flavona abundante en los cítricos, sobre todo en la naranja y el limón, es económica, segura y farmacológicamente activa. Este compuesto fue aislado del mesocarpio de la naranja por primera vez por el químico francés Lebreton [19].

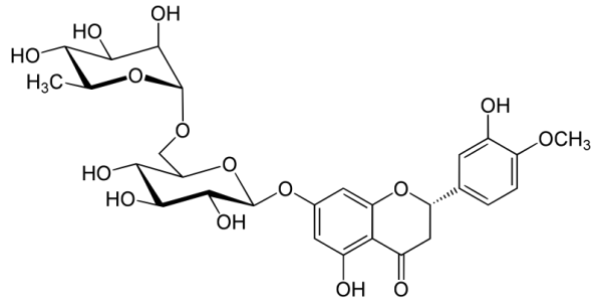


Figura 5. Estructura molecular de HES

Actualmente se sabe que la HES tiene propiedades antioxidantes, por su capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se encuentran en el organismo, pero además se le han atribuido propiedades analgésicas, como antiagregantes plaquetarios, venotónicas, vasculoprotectoras, flevolíticas, y antiváricosos. Debido a que protegen el endotelio vascular, actúan sobre la microcirculación aumentando la resistencia y permeabilidad de estos [20].

La HES tiene una solubilidad acuosa de 4.95  $\mu\text{g/mL}$  a 25  $^{\circ}\text{C}$ , y su solubilidad no varía con cambios en el pH dentro del rango de 1.2 a 9. Sin embargo, más allá de este intervalo, su solubilidad aumenta, aunque conlleva la degradación del compuesto [21]. Dada su escasa solubilidad en agua, la utilidad farmacéutica de la HES se ha visto limitada. Por ello, se ha explorado su inclusión en sistemas que mejoran su solubilidad y, en consecuencia, su biodisponibilidad, como los complejos de inclusión con CD [22].

### 2.13 Rutina

La RUT (quercetina-3-ramnosil glucósido) es un glicósido de flavonol, también conocido como vitamina P, que contiene un glucósido (glucosa y ramnosa) unido en el carbono 3 del anillo pirano, como se muestra en la figura 7 [23].

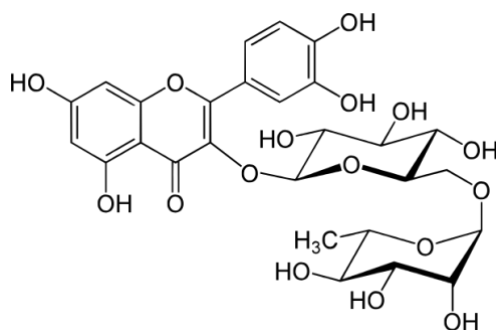


Figura 7. Forma molecular de RUT

Esta molécula se puede encontrar en alimentos como la cebolla, uvas, frijoles rojos, manzanas, tomates, siendo el trigo sarraceno una de las principales fuentes naturales de este compuesto y en bebidas como el vino tinto y el té negro.

En términos de sus efectos bioactivos, se ha evidenciado que la RUT exhibe actividad antioxidante, además de manifestar efectos antiinflamatorios, anticonvulsivos [24], antidiabéticos, neuroprotectores, antibacterianos y una baja toxicidad. A pesar de su potencial, su aplicación en formulaciones farmacéuticas se ve limitada por su escasa solubilidad, registrada en 0.13 mg/mL [25].

Para abordar este desafío y aprovechar plenamente los beneficios terapéuticos de la RUT, se han llevado a cabo experimentos destinados a mejorar su solubilidad. Estos incluyen la reducción del tamaño de partícula, la formulación en nanocristales y la mezcla con polímeros polares de cadena larga como PEG [25]. Actualmente, este principio activo se encuentra en diversas formulaciones de suplementos alimenticios que contienen vitaminas y minerales, así como en otros productos diseñados para mejorar la permeabilidad e integridad de las paredes capilares [26].

## 2.14 Métodos para determinar constantes de equilibrio en la formación de complejos de inclusión de ciclodextrinas

La formación de complejos de inclusión de CDs es un fenómeno químico de gran importancia en diversas aplicaciones, como la liberación controlada de fármacos, la separación de compuestos y la mejora de la solubilidad de sustancias insolubles.

La determinación de  $K_e$  en la formación de estos complejos es fundamental para comprender y controlar su comportamiento. Existen varios métodos que se utilizan para determinar estas constantes, estudiar las interacciones entre las CDs y los huéspedes. Una de las herramientas más utilizadas es la espectroscopia UV-Vis, debido a que ofrece ventajas significativas, como su sensibilidad y la posibilidad de obtener información sobre la estequiometría y la estabilidad del complejo. Sin embargo, existen otros métodos complementarios, como la resonancia magnética nuclear (RMN), y técnicas calorimétricas, que también se utilizan en la determinación de las constantes de equilibrio de los complejos de inclusión de CDs.

### 2.15 Método de Hildebrandt

En 1949 los investigadores Benesi y Hildebrandt publicaron una investigación donde trabajaban en la formación de complejos de yodo y moléculas orgánicas, en este trabajo realizaron un nuevo método para determinar la formación de estos complejos, a través de reacciones ácido-base. Actualmente este método es de los más utilizados para evidenciar la formación de complejos de inclusión de CD y la constante de equilibrio [27].

Este método se basa en la siguiente ecuación, para obtener la constante de formación, si la estequiometría del complejo de inclusión es 1:1

$$K = \frac{(FMC.\beta CD)}{(FMC) . (\beta CD)}$$

En donde (FMC. $\beta$ CD) representa la concentración del complejo de inclusión formado  $\beta$ CD y FMC.

(FMC) representa la concentración del fármaco y ( $\beta$ CD) la concentración de CD.

Este método se basa en las siguientes suposiciones.

- La concentración inicial de  $\beta$ CD y FMC son  $[\beta CD]_0$  y  $[FMC]_0$ .
- La concentración de (FMC. $\beta$ CD) es desconocida X.

Tomando como base la ecuación de Lambert Beer y considerando 1 cm de longitud del paso óptico, se puede describir la absorbancia a una longitud de onda, con la siguiente ecuación:

$$A = \varepsilon_{BCD}([\beta CD]_0 - X) + \varepsilon_{FMC}([FMC]_0 - X) + \varepsilon_{BDC.FMC} \cdot X$$

Teniendo en cuenta que la  $\beta$ CD no absorbe la longitud de onda en un rango de  $\lambda$  en el rango de 220 a 350, se puede simplificar de la siguiente manera:

$$\Delta A = A - \varepsilon S([FMC]_0)$$

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon \beta CD.FMC - \varepsilon FMC$$

$$[\beta CD]_0 \gg [FMC]_0$$

tomando las siguientes consideraciones, obtenemos las siguientes ecuaciones de Benesi-Hildebrand:

Modelo de Benesi - Hildebrand para estequiometría 1:1

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \varepsilon} + \frac{1}{k(\Delta \varepsilon) \cdot [\beta CD]}$$

Modelo de Benesi-Hildebrand para estequiometría 2:1

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \varepsilon} + \frac{1}{k(\Delta \varepsilon) \cdot [\beta CD]^2}$$

## 2.16 Diagrama de solubilidad de fases

El diagrama de solubilidad de fase es una técnica que fue descrita por Higuchi y Connors en 1965. Consiste en exponer una disolución con concentración alta del compuesto a estudiar, con una disolución de CD en medio acuoso, preparada en un intervalo de diferentes concentraciones. Dándonos como resultado un diagrama de solubilidad de fases, que representa el incremento en la solubilidad de la molécula huésped en función de la concentración de CD agregada, además este estudio nos

permite determinar la constante de equilibrio, el tipo de complejo y la estequiometría de equilibrio [28].

Existen dos tipos de diagramas de solubilidad de fases, el A y B. El diagrama tipo A representa una relación lineal entre la cantidad de molécula huésped solubilizada con respecto al aumento de la concentración de CD. Este tipo de diagrama de solubilidad se subdivide en tres subtipos, dependiendo del orden al cual se dirija la formación de los complejos de inclusión. Estas subclases son  $A_L$  (primer orden),  $A_P$  (segundo orden), y  $A_N$  si disminuye la solubilidad del complejo a causa del incremento en la concentración de CD.

En cuanto al tipo B, se refiere a un decrecimiento de la curva, debido a que el complejo formado con la CD se torna insoluble, en este caso sólo existen dos subtipos;  $B_i$ , el cual muestra que la formación del complejo es insoluble, generando una curva en forma de meseta; y  $B_s$ , en donde se observa un incremento parcial de la solubilidad (curva lineal) y posteriormente una caída en la misma (curva tipo meseta) [29].

El valor  $K_e$  del complejo de inclusión formado, se puede obtener a partir de la pendiente de la isoterma obtenida en el diagrama y la solubilidad inicial ( $S_0$ ) del fármaco en el medio [28].

A continuación, se presenta en la figura 8 de forma gráfica cada uno de los subtipos de diagramas de solubilidad de fases mencionadas anteriormente.

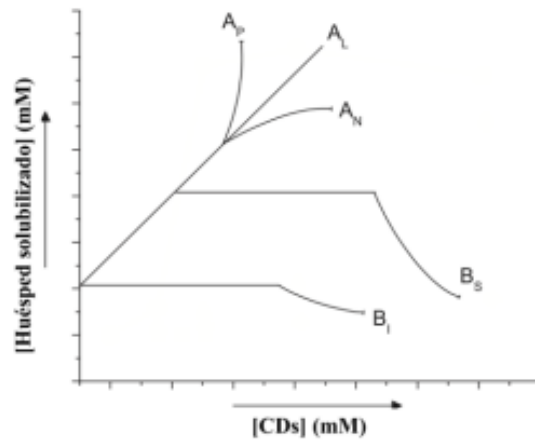


Figura 8. Tipos de Diagrama de solubilidad de fases en la formación de complejos con CDs.

Partiendo de un diagrama de solubilidad de fases, se puede determinar la constante de equilibrio ( $K_e$ ) de un complejo huésped-CD, en una estequiometría 1:1, utilizando la siguiente ecuación:

$$K_e = \frac{\text{pendiente}}{S_0(1 - \text{pendiente})}$$

La variable  $S_0$  es la ordenada al origen y representa la solubilidad del huésped en agua pura y la variable pendiente, representa la pendiente de la parte lineal obtenida del diagrama de solubilidad [13].

### 2.17 Relación de la $K_e$ respecto a la estabilidad de complejo obtenido y sus propiedades

El valor de  $K_e$  es importante para determinar si el complejo de inclusión fue formado y es adecuado para su aplicación práctica, puesto que complejos con  $K_e$  muy bajas, presentan un desprendimiento prematuro de la molécula huésped, mientras que un valor de  $K_e$  muy alta podría presentar una liberación tardía de la molécula huésped, dando como resultado, la nula mala o absorción de esta. Para evitar las dificultades mencionadas es que el valor de  $K_e$  que se recomienda debe de encontrarse en un intervalo de 100 y 5000  $M^{-1}$ . [13].

## **2.18 Determinación de constantes de asociación por medio de titulación**

Las titulaciones en química supramolecular implican la adición gradual de un anfitrión (la molécula que se une al huésped) a una solución que contiene un huésped (la molécula que forma el complejo) y la medición de cambios en alguna propiedad física o química a medida que se forma el complejo. Estos cambios se utilizan para determinar  $K_e$ , que es una medida de la fuerza de la interacción entre el ligando y el huésped.

La información obtenida a través de estas titulaciones es esencial para diseñar y optimizar sistemas supramoleculares con aplicaciones específicas, como la liberación controlada de fármacos o la catálisis. Además, proporciona una comprensión más profunda de cómo las interacciones no covalentes influyen en la estructura y la función de las moléculas en la química supramolecular [30].

## **3. Planteamiento del problema**

La formación de complejos de inclusión entre  $\beta$ -CD y glicósidos de flavonoides ofrece una prometedora perspectiva en el diseño de sistemas acarreadores de fármacos, mejorando significativamente propiedades terapéuticas de estas moléculas. La determinación precisa de la constante de equilibrio y la estequiometría de estos complejos es esencial para comprender su estabilidad y eficacia como vehículos de fármacos. Sin embargo, la complejidad inherente a estas interacciones y las limitaciones en la experimentación suelen provocar complicaciones en su determinación. La simplificación de modelos puede subestimar la verdadera naturaleza de la interacción, lo que puede generar resultados inconsistentes o inexactos, obstaculizando el desarrollo efectivo de estos sistemas acarreadores. Por tanto, la comprensión de estas complicaciones y la búsqueda de métodos precisos y confiables para determinar estos parámetros fisicoquímicos son aspectos cruciales para avanzar en el diseño y aplicación efectiva de complejos de inclusión como acarreadores de fármacos.

## **4. Hipótesis**

La detección de cambios en el espectro UV-Vis, nos permitirá el uso de modelos no lineales para determinar la  $K_e$  y la estequiometría de los complejos, mejorando así la comprensión de la dinámica de interacción.

## **5. Objetivo General**

Investigar y caracterizar la formación de complejos de inclusión entre la  $\beta$ -CD y glicósidos de flavonoide (HES y RUT) mediante espectroscopia UV-Vis, enfocándose en la determinación de la constante de equilibrio y la estequiometría de estos complejos. Este estudio busca contribuir al entendimiento de las interacciones moleculares, para el diseño de sistemas acarreadores de fármacos más eficaces y especializados.

## **6. Objetivos Particulares**

1. Determinar la constante de equilibrio y la estequiometría del complejo de inclusión entre  $\beta$ -CD y HES mediante una titulación por UV-vis y análisis de regresión no lineal.
2. Determinar la constante de equilibrio y la estequiometría del complejo de inclusión entre  $\beta$ -CD y RUT utilizando una titulación por UV-vis y análisis de regresión no lineal.
3. Determinar la eficiencia de formación del complejo de inclusión entre  $\beta$ -CD y HES mediante diagrama de solubilidad de fases.
4. Determinar la eficiencia de formación del complejo de inclusión entre  $\beta$ -CD y RUT mediante diagrama de solubilidad de fases.

## 7. Material y métodos.

### Reactivos.

HES (98 % m/m), RUT (98 % m/m) y la  $\beta$ -CD (98 % m/m) fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich*, Metanol (RA) fue obtenido de *TecsiQuim S.A*, Agua destilada.

### Equipo.

Balanza analítica AG245 METLER, Sonicador COLE-PARMER 08895 Espectrofotómetro UV/Vis VELAB VE-5100UV, ThermoMixer Eppendorf 0101726.

## 8. Determinación de las constantes de equilibrio mediante titulaciones UV-Vis

### 8.1. Método general para la determinación de la constante de equilibrio

Se realizaron titulaciones UV-Vis añadiendo secuencialmente alícuotas (en un rango de 20 a 300  $\mu$ L) de una solución madre de  $\beta$ -CD de 13 mM a una solución de 0.05 mM de HES en agua. Se registró el espectro UV-Vis inicial de la HES, y los cambios en la absorbancia ( $\Delta A$ ) se calcularon utilizando la fórmula:  $\Delta A = A(\text{complejo}) - A(\text{libre})$ . El cálculo de la constante de equilibrio implica ajustar una regresión no lineal a un modelo 1:1 basado en la siguiente ecuación.

$$\Delta A = \varepsilon \left( \frac{1}{2} \left( G_o + H_o + \frac{1}{K_f} \right) - \sqrt{\left( G_o + H_o + \frac{1}{K_f} \right)^2 + 4[H_o][G_o]} \right)$$

En donde:  $\varepsilon$  es la absorptividad molar del complejo de inclusión,  $G_o$  es la concentración inicial de HES,  $H_o$  corresponde a la concentración inicial de  $\beta$ -CD y  $K_f$  es la constante de formación del complejo de inclusión.

### 8.2. Determinación de la constante de equilibrio entre $\beta$ CD y RUT mediante titulación UV-Vis

Se realizaron titulaciones UV-Vis añadiendo secuencialmente alícuotas (en un rango de 20 a 300  $\mu$ L) de una solución madre de  $\beta$ -CD de 13 mM a una solución de

0.05 mM de RUT en agua. Se registró el espectro UV-Vis inicial de la RUT, y los cambios en la absorbancia ( $\Delta A$ ) se calcularon utilizando la fórmula:  $\Delta A = A(\text{complejo}) - A(\text{libre})$ . El cálculo de la constante de equilibrio implica ajustar una regresión no lineal a un modelo 1:1 basado en la siguiente ecuación.

$$\Delta A = \varepsilon \left( \frac{1}{2} \left( G_o + H_o + \frac{1}{K_f} \right) - \sqrt{\left( G_o + H_o + \frac{1}{K_f} \right)^2 + 4[H_o][G_o]} \right)$$

### **8.3 Diagrama de solubilidad de fases de RUT con $\beta$ CD**

Se preparan 7 disoluciones acuosas de la  $\beta$ CD en un volumen de 1 mL de agua ultrapura, y en un rango de concentraciones de 0 a 16 mM. A cada una de estas disoluciones se le adiciona el mismo exceso de RUT (10.0 mg). Las muestras se mantienen bajo agitación vigorosa y a una temperatura de 37 °C durante 5 días. Transcurrido este tiempo, cada una de las suspensiones resultantes se filtran. Entonces las disoluciones son analizadas por UV-Vis para la cuantificación de RUT solubilizada con una curva de calibración previamente construida. Finalmente, se grafica la concentración de RUT contra a concentración de  $\beta$ CD.

### **8.4 Diagrama de solubilidad de fases de HES con $\beta$ CD**

Se preparan 8 disoluciones acuosas de la  $\beta$ CD en un volumen de 1 mL de agua ultrapura, y en un rango de concentraciones de 0 a 15 mM. A cada una de estas disoluciones se le adiciona el mismo exceso de HES (10 mg). Las muestras se mantienen bajo agitación vigorosa y a una temperatura de 37 °C durante 5 días. Transcurrido este tiempo, cada una de las suspensiones resultantes se filtran. Entonces las disoluciones son analizadas por UV-Vis para la cuantificación de HES solubilizada con una curva de calibración previamente construida. Finalmente, se grafica la concentración de RUT contra a concentración de  $\beta$ CD.

## 9. Resultados y análisis

### 9.1 Determinación de la constante de equilibrio entre $\beta$ CD y HES mediante titulación UV-Vis

Se llevó a cabo una titulación UV-Vis para determinar la constante de formación ( $K_f$ ) y la estequiometría del complejo  $\beta$ CD/HES en el equilibrio. El experimento se realizó añadiendo secuencialmente una disolución concentrada de  $\beta$ CD a una disolución acuosa de HES.

La HES libre tiene un máximo de absorción a 284 nm y un hombro a 328 nm, correspondientes a diferentes transiciones electrónicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los anillos aromáticos.

Los cambios en el espectro de absorción debidos a la formación del complejo se pueden observar en el máximo de 284 nm (Figura 9). A medida que aumenta la concentración de  $\beta$ CD, disminuye la absorbancia gradualmente, acompañado de un ligero corrimiento al rojo. Estos cambios en la absorbancia son indicativos del confinamiento de la HES en la cavidad de la  $\beta$ CD. Además, se observó una disminución en la absorbancia a 225 nm. Los espectros de absorbancia mostraron un punto isobéptico a 287 nm, indicando un equilibrio entre el complejo HES/ $\beta$ CD y sus componentes libres.

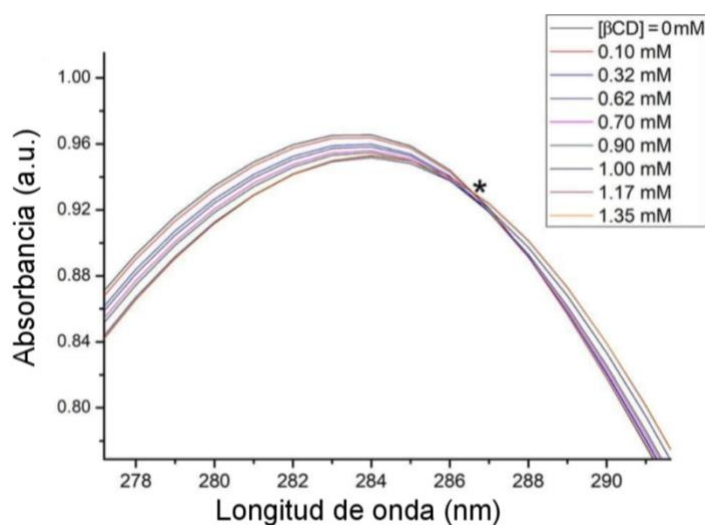


Figura 9. Espectros de UV-Vis de HES 0.05 mM con adiciones sucesivas de  $\beta$ CD nativa 0.13 mM

Para analizar cuantitativamente la interacción huésped-anfitrión, se determinó la constante de equilibrio ( $K_e$ ) utilizando un método de ajuste no lineal, en la figura 10 se observa la regresión obtenida para un modelo con una estequiometría de 1:1. El valor obtenido de  $K_f$  fue de  $1643.59 \text{ M}^{-1}$ . Este valor sugiere una notable estabilidad en la interacción entre la  $\beta$ CD y la HES.

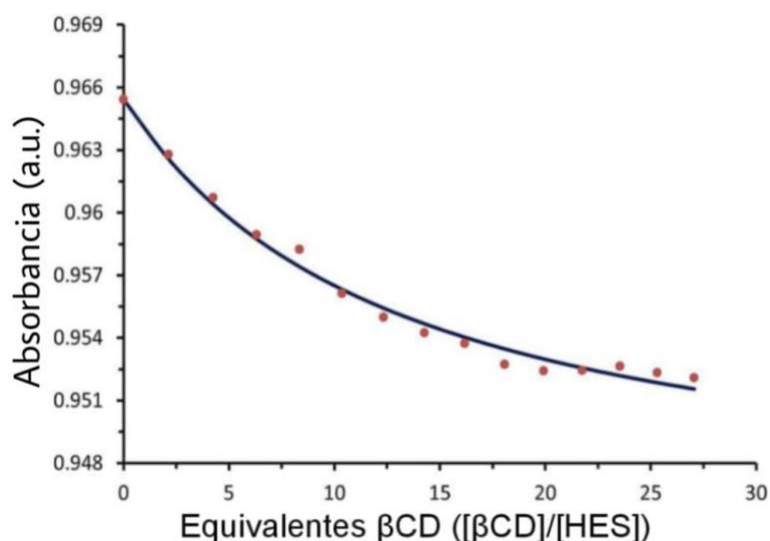


Figura 10. Ajuste no lineal de acuerdo con una estequiometría 1:1 de las variaciones de absorción en la titulación  $\beta$ CD/HES

## 9.2 Determinación de la constante de equilibrio entre $\beta$ CD y RUT mediante titulación UV-Vis

Se realizó el experimento correspondiente de titulación para determinar  $K_e$  y la estequiometría del complejo  $\beta$ CD/RUT en el equilibrio. De la misma manera que en el caso anterior, el experimento se realizó añadiendo secuencialmente una solución concentrada de  $\beta$ CD a una solución acuosa de RUT.

La RUT libre tiene un máximo de absorción a 282 nm y un hombro a 330 nm, correspondientes a diferentes transiciones electrónicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los anillos aromáticos.

Los cambios en el espectro de absorción debidos a la formación del complejo se pueden observar en el máximo de 282 nm (Figura 11). En este caso a medida que

aumenta la concentración de  $\beta$ CD, aumenta la absorbancia gradualmente, acompañado de un ligero corrimiento al rojo. Estos cambios en la absorbancia son indicativos del confinamiento de la RUT en la cavidad de la  $\beta$ CD. A diferencia del complejo con HES, en este caso no se alcanza a distinguir ningún punto isosbástico, esto se puede deber a que los cambios en la absorbancia son menos pronunciados, por otro lado, el incremento en la absorbancia a medida que aumenta la concentración de  $\beta$ CD, se puede relacionar con una estabilización del estado excitado lo que provoca que incremente el coeficiente de absorptividad molar.

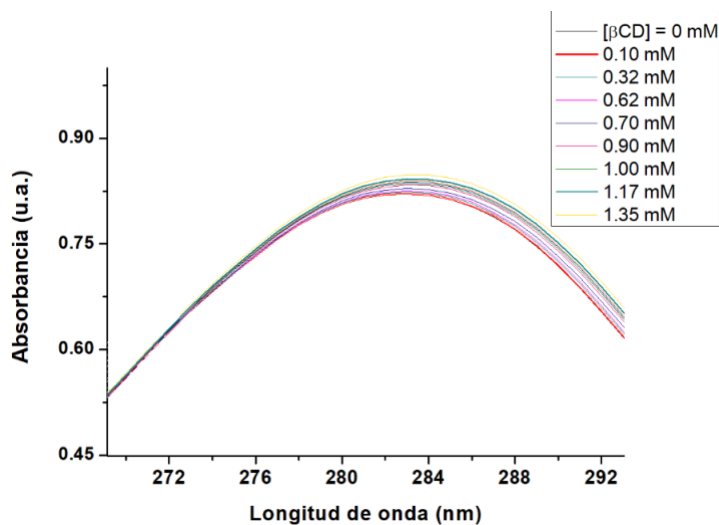


Figura 11. Espectros de UV-Vis de RUT 0.05 mM con adiciones sucesivas de  $\beta$ CD nativa 0.13 mM

Para analizar cuantitativamente la interacción huésped-anfitrión de interés, se determinó la constante de formación ( $K_f$ ) utilizando un método de ajuste no lineal, en la figura 12 se observa la regresión obtenida para un modelo con una estequiometría de 1:1. El valor obtenido de  $K_f$  fue de  $1964.14 \text{ M}^{-1}$ . Este valor sugiere una notable estabilidad en la interacción entre la  $\beta$ CD y la RUT.

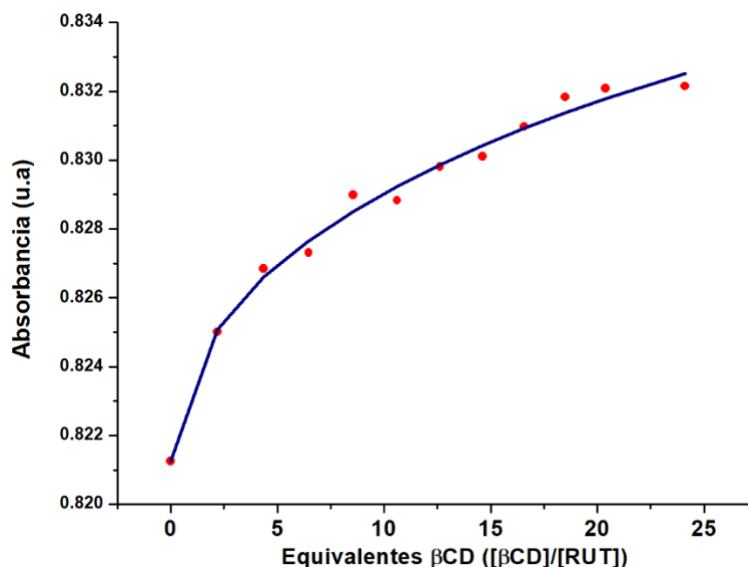


Figura 12. Ajuste no lineal de acuerdo con una estequiometría 1:1 de las variaciones de absorción en la titulación  $\beta$ CD/RUT

### 9.3 Diagrama de solubilidad de fases de RUT con $\beta$ CD

Este estudio se realizó tanto para los flavonoides como para la  $\beta$ CD nativa. En la Figura 12 se presentan los diagramas de solubilidad de fases. El primer aspecto a analizar es el perfil de los diagramas, con el fin de determinar el tipo de interacción que representan. Se observa que cada uno de los diagramas corresponde a un escenario tipo  $A_L$  (incremento lineal de la solubilidad del fármaco en función de la concentración del anfitrión). En los diagramas de solubilidad de fase, se destaca el incremento de concentración que muestran la RUT y la HES en función de la concentración de la  $\beta$ CD.

Si bien a partir de los diagramas de solubilidad de fase también se puede obtener la  $K_c$ , No es recomendable ya que el valor suele conllevar el error de la determinación de la solubilidad del huésped.

Otro parámetro que se puede obtener a partir del diagrama de solubilidad y que no necesita de la solubilidad inicial del huésped, es el valor de eficiencia de complejación (EC), Este parámetro se interpreta como la fracción de moléculas de CD que se encuentran formando el complejo con respecto a las moléculas de

anfitrión libres, se obtiene a partir de la pendiente del diagrama de solubilidad mediante la siguiente ecuación:

$$EC = \frac{m}{(1 - m)}$$

Los valores obtenidos fueron 0.004 para el complejo con HES y 0.006 en el caso del complejo con RUT. Si bien el valor de EC es mayor en el caso del complejo con RUT, de acuerdo al experimento de titulación, el complejo con HES es más estable.

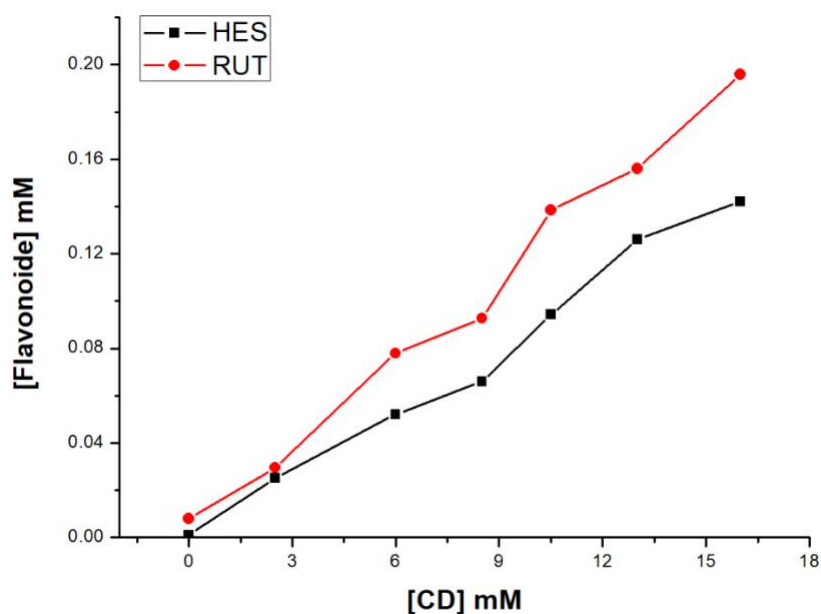


Figura 13. Diagramas de solubilidad de fase de RUT y HES en presencia de  $\beta$ CD

## 10. Recomendaciones

Los estudios mostrados en este trabajo muestran la capacidad de las ciclodextrinas para mejorar la solubilidad de RUT y HES, sin embargo el estudio se podría ampliar a otros flavonoides con problemas de solubilidad. También sería recomendable ampliar la caracterización con otras técnicas espectroscópicas para entender como es la interacción entre los flavonoides y la ciclodextrina. Finalmente para un alcance real de estos sistemas en el mercado es recomendable realizar pruebas In vivo donde se demuestre su superioridad con respecto al a HES y RUT sin acarreador.

## 11. Aportes a la sociedad

La investigación en sistemas acarreadores de fármacos contribuye al campo de la química supramolecular y es de gran importancia para el diseño de nuevos sistemas de administración más eficientes, disminuyendo la dosis requerida y reduciendo posibles efectos secundarios. Estos avances nos abren la puerta a un futuro en el cual los pacientes puedan acceder a vías de administración que les resulten más cómodas y efectivas.

## 12. Conclusiones

En este estudio se investigó y caracterizó la formación de complejos de inclusión entre la  $\beta$ CD y glicósidos de flavonoide, específicamente HES y RUT, mediante espectroscopia UV-vis.

Se determinó la constante de equilibrio y estequiometría del complejo  $\beta$ CD-HES y  $\beta$ CD-RUT mediante titulación UV-vis y análisis de regresión no lineal: Los resultados mostraron una constante de equilibrio adecuada para su aplicación como acarreador de fármacos. el ajuste de la regresión no lineal se realizó utilizando un modelo que asume una estequiometría 1:1. A su vez, se determinó la eficiencia de formación del complejo  $\beta$ CD-HES y  $\beta$ CD-RUT mediante el diagrama de solubilidad de fases.

Estos hallazgos contribuyen significativamente al entendimiento de las interacciones moleculares entre  $\beta$ -CD y flavonoides, lo que facilita el diseño de sistemas acarreadores de fármacos más eficaces y especializados. Las constantes de equilibrio y las estequiometrías determinadas en este estudio proporcionan una base para futuras aplicaciones y estudios de formulación de HES y RUT, ofreciendo una alternativa prometedora en el desarrollo de terapias basadas en complejos de inclusión.

## 13. Bibliografía

- [1] Alcalde, G. M. (1999). Modificación química y estabilización de glicosiltransferasas. [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid]. Repositorio institucional-Universidad Complutense de Madrid.
- [2] Martín, M. A. (1995). Las ciclodextrinas: características y aplicaciones de la formación de complejos de inclusión. *Ars Pharmaceutica*, 36(2), 187–198.
- [3] Pineda, A. (2017). Utilidad de las ciclodextrinas y derivados en el ámbito farmacéutico. [Tesis de Doctorado, Universidad de Sevilla]. Repositorio institucional-Universidad de Sevilla.
- [4] Fatima, N., Syed, H., Khalid, Liaqat, K., Zulfiqar, A., Munir, R., Khalid, K., Liaqat, A., Zulfiqar, R., & Munir. (2023). Beta-Cyclodextrin: A Cyclodextrin Derivative and its Various Applications *Crimson Publishers*. DOI:10.31031/PSPRJ.2023.04.000597
- [5] Zhi Yuan Biotechnology Co. (2020). Gamma Cyclodextrin. Recuperado a partir de: Native Cyclodextrin Manufacturers and Suppliers - China Native Cyclodextrin Factory – ZHI YUAN BIOTECHNOLOGY (cyclodextrins.com)
- [6] Wankar, J., Kotla, N. G., Gera, S., Rasala, S., Pandit, A., & Rochev, Y. A. (2020). Recent Advances in Host–Guest Self-Assembled Cyclodextrin Carriers: Implications for Responsive Drug Delivery and Biomedical Engineering. *Advanced Functional Materials*, 1909049. DOI:10.1002/adfm.201909049
- [7] Leyva, E., Moctezuma, E., Leyva, R y Oros, S. (2004). Estudio de los complejos de inclusión de ácido nalidíxico y ácido oxolínico con ciclodextrinas. *Rev. Sociedad de química de México*, 48, 189-195.
- [8] Poulson, B. G., Alsulami, Q. A., Sharfalddin, A., El Agammy, Emam. F., Mouffouk, F., Emwas, A.-H., Jaremko, L., et al. (2021). Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications. *Polysaccharides*, 3(1), 1–31.

- [9] Del Castillo, B. (2004). Complejos de inclusión con ciclodextrinas: perspectivas actuales y retos del futuro. [Tesis de Doctorado, Real Academia de Farmacia de Galicia]. Repositorio institucional.
- [10] Zhou, J.; Jia, J.; He, J.; Li, J.; Cai, J. Cyclodextrin Inclusion Complexes and Their Application in Food Safety Analysis: Recent Developments and Future Prospects. *Foods*. 2022, 11. <https://doi.org/10.3390/foods11233871>
- [11] Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5), 1743–1754. doi:10.1021/cr970022c
- [12] Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J.C., Simal-Gandara, J., Astray, G. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications, *Food Chemistry*, Volume 384, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132467>.
- [13] Ponce, P. (2013). Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de complejos de inclusión de  $\beta$ -ciclodextrinas y sus derivados. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Repositorio institucional-Universidad de Buenos Aires.
- [14] Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313–326. DOI:10.1002/ffj.
- [15] Cheirsilp, B., & Rakmai, J. (2017). Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biology, Engineering and Medicine*, 2(1). DOI: 10.15761/BEM.1000108
- [16] Luengo, L., & Tránsito, M. (2002). Flavonoides. *Offarm*, 21(4), 108–113.
- [17] Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. y Tuñón, M.<sup>a</sup> J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes., *Nutr. Hosp.* (2002) XVII (6) 271-278.
- [18] Escamilla, J. C., Cuevas M. E., & Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2).

- [19] Zanwar, A. (2014). Polyphenols in Human Health and Disease, Cardiovascular Effects of Hesperidin., (76), 989–992. DOI:10.1016/b978-0-12-398456-2.00076-1
- [20] Granados, E. A. (2003). Uso de flavonoides (hesperidina) en el tratamiento de venas varicosas vesicales sangrantes. *Actas Urológicas Españolas*, 27(9), 732-734.
- [21] Majumdar S, Srirangam R. (2009) Solubility, stability, physicochemical characteristics and in vitro ocular tissue permeability of hesperidin: a natural bioflavonoid. *Pharm. May*;26(5):1217-25. DOI: 10.1007/s11095-008-9729-6
- [22] Londoño, J., Sierra, J., & Ramírez, R. (2007). Efecto de la hesperidina sobre la captación de hdl en células hepáticas y evaluación de hesperidina liposomal sobre la oxidación de ldl. *Scientia et Technica*, 1(33).
- [23] Becho, J. R. M., Machado, H., & Guerra, M. de O. (2009). Rutina: estructura, metabolismo y potencial farmacológico. *Rev. Interdisciplin. Estud. Exp. Anim. Hum.* 21–25.
- [24] Barros, T. (2016). *Avaliação comportamental e bioquímica do efeito do extrato de polygala paniculata na neuroinflamação induzida pelo modelo de transtorno de estresse pós-traumático em camundongos*. [Tesis de Maestría, Universidad Federal de Santa Catarina]. Repositorio Institucional-Universidad Federal de Santa Catarina.
- [25] Sancineto, L., Ostacolo, C., Ortega-Alarcón, D., Jiménez-Alesanco, A., Ceballos-Laita, L., Vega, S., Santi, C. (2021). La l-arginina mejora la solubilidad y la actividad ANTI SARS-CoV-2 Mpro de la rutina, pero no la actividad antiviral en las células. *Moléculas*, 26 (19), 6062.
- [26] Castro, E., Linares, M., Robles, A., Vargas, J., & Vivanco, M. (2008). Descontaminación mediante radiación gamma del flavonoide rutina para aplicaciones médicas. *Rev. Instituto Peruano de Energía Nuclear.* (11) 230-234.

- [27] Fedosse, C. (2013). *Preparação e caracterização do complexo de inclusão  $\beta$ -ciclodextrina/(z)-jasmona e da fibra de algodão enxertada com  $\beta$ -ciclodextrina*. [Tesis de Maestría, Universidad Federal de Santa Catarina]. Repositorio Institucional- Universidad Federal de Santa Catarina.
- [28] Nur, O. A. (2021). Insights to the phase solubility diagrams of flurbiprofen with inclusion complex. *Journal of Research in Pharmacy*, 25(2)(25(2), 196–208. DOI:10.29228/jrp.10
- [29] Torralba, G. A. (2014). *Obtención y análisis termodinámico de los complejos de inclusión ácido ferúlico-ciclodextrinas*. [Tesis de Maestría, Universidad Tecnológica de la Mixteca]. Repositorio institucional- Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- [30] Thordarson, P. (2011) Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1305-1323.