



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Nombre del proyecto:

Cuantificación de flavonoides en complejos flavonoide-ciclodextrina formados mediante el uso de fluidos supercríticos

Proyecto genérico correspondiente:

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

Alumna: Kimberly Pineda Vaquero **Matricula:** 2182032204

Asesores:

Dra. Julia Cassani Hernández
No. Eco. 29529

Dr. Luis José López Méndez
No. Eco. 12772022

Lugar de realización: Laboratorio de Biotransformaciones N-201, UAM Xochimilco

Fecha de inicio y término: 12 de julio de 2022 al 12 de enero de 2023

Índice

1. Introducción	4
2. Marco Teórico	5
2.1 Ciclodextrinas	5
2.2 Complejos de inclusión	6
2.3 Flavonoides	6
2.4 Hesperidina	7
2.5 Neoponcirina	8
2.6 Fluidos supercríticos	8
2.7 Formación de complejos de inclusión mediante fluidos supercríticos	10
2.8 Métodos espectroquímicos de análisis cuantitativo	11
2.8.1 Mediciones espectroscópicas	11
2.8.2 Espectroscopia Ultravioleta y Visible	12
2.8.3 Importancia del UV-Vis en el análisis cuantitativo	12
3. Planteamiento del problema	12
4. Hipótesis	13
5. Objetivo general	13
6. Objetivos específicos	13
7. Materiales	13
8. Equipos	14
9. Metodología	14
9.1 Formación de complejos de inclusión mediante uso de CO ₂ supercrítico	14
9.1.1 Formación de complejos de inclusión con hesperidina mediante uso de CO ₂ supercrítico	14
9.1.2 Formación de complejos de inclusión con neoponcirina mediante uso de CO ₂ supercrítico	15
9.2 Elaboración de curvas de calibración	15
9.2.1 Elaboración de curvas de calibración de hesperidina	15
9.2.2 Elaboración de curvas de calibración de neoponcirina	15
9.3 Cuantificación de flavonoide	16

9.3.1 Obtención y análisis de muestra para la cuantificación de hesperidina	16
9.3.2 Obtención y análisis de muestra para la cuantificación de neoponcirina	16
9.3.3 Cálculo del total de flavonoide.....	16
9.4 Prueba de disolución	17
9.4.1 Obtención y análisis de muestra para la prueba de disolución de hesperidina y neoponcirina	17
9.4.2 Cálculo de la concentración de disolución.....	17
10. Resultados y discusión	18
10.1 Curvas de calibración	18
10.2 Resultados de la cuantificación de flavonoide	19
10.2.1 Análisis de la cuantificación de hesperidina	19
10.2.2 Análisis de la cuantificación de neoponcirina	20
10.3 Resultados de la prueba de disolución	20
10.3.1 Análisis de la prueba de disolución de hesperidina	21
10.3.2 Análisis de la prueba de disolución de neoponcirina	21
11. Conclusiones	22
12. Referencias.....	23

1. Introducción

Los flavonoides son un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos generados por el metabolismo secundario de los vegetales y se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Estos compuestos son de suma importancia para el desarrollo de las plantas y actúan como agentes protectores contra la luz UV, son responsables de la coloración de las flores e intervienen en la polinización (López L., 2002). También presentan diversas propiedades benéficas para la salud humana como lo son propiedades antioxidantes, antiperoxidativas, antifúngica, antitrombogénica, antitumoral, efectos antiarrítmicos y antiisquémicos (Cartaya et al., 2001).

Existen algunos flavonoides como la hesperidina y neoponcirina que presentan una amplia actividad biológica, sin embargo, su utilidad farmacéutica se encuentra limitada debido a su baja solubilidad en agua. Una estrategia para mejorar la solubilidad de estos compuestos es la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas y mediante el uso de fluidos supercríticos (Londoño et al., 2007).

Las ciclodextrinas son una clase de oligosacáridos cíclicos de glucosa. Estas son utilizadas por la industria farmacéutica, para incrementar la solubilidad acuosa de fármacos, generando así una mejora en la biodisponibilidad. Esto se puede lograr gracias a la propiedad que tienen las ciclodextrinas para formar sistemas conocidos como complejos de inclusión.

El uso de fluidos supercríticos se ha presentado como una estrategia en química verde, y se ha reportado que puede ser utilizada para la formación de complejos de inclusión, con una disminución en los tiempos de reacción y una mayor carga de fármaco.

Por lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo de investigación se utilizará CO₂ supercrítico para la formación de complejos de inclusión con los flavonoides hesperidina y neoponcirina. La cantidad y contenido de cada flavonoide en los complejos de inclusión será determinada mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en las curvas de calibración construidas a partir de UV-Vis.

2. Marco Teórico

2.1 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por 6, 7 u 8 unidades de D-glucosa unidos a través de enlaces glucosídicos α -1-4, llamadas α , β y γ ciclodextrinas respectivamente y son ampliamente utilizados como excipientes de uso farmacéutico (Pellicer, 2016).

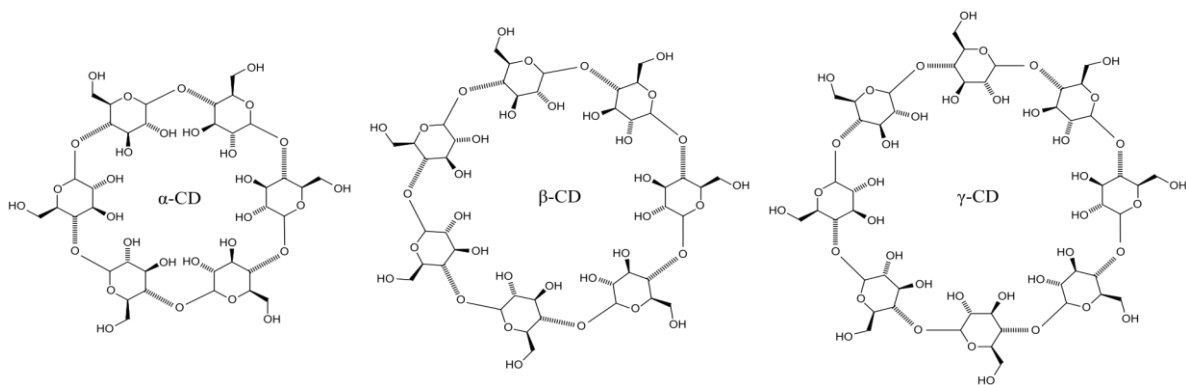


Figura 1. Estructura química de α , β y γ -ciclodextrinas.

Su estructura molecular en el exterior es hidrofílica y relativamente lipofílica en la cavidad interior. De acuerdo con estas características son capaces de formar complejos de inclusión por medio de enlaces no covalentes, los cuales estabilizan a una gran variedad de moléculas en medios tanto líquidos como sólidos. Un ejemplo es la β -ciclodextrina, en cuya cavidad puede incluirse una parte o la molécula completa (Espinosa et al., 2005).

Es debido a estas características que las ciclodextrinas se han utilizado en la industria farmacéutica para mejorar la estabilidad de los fármacos contra la oxidación, hidrólisis, el calor, la luz, humedad relativa y temperatura durante su almacenamiento. Otro beneficio que aportan es la capacidad de eliminar olores y sabores indeseables. (Cheirsilp et al., 2016) Uno de sus usos más importantes en el área farmacéutica es para mejorar la solubilidad de los fármacos lo cual en muchos casos también mejora la biodisponibilidad (Muñoz et al., 1995).

2.2 Complejos de inclusión

Los complejos de inclusión son sistemas que presentan la estructura de un clatrato, es decir una molécula que contiene un segundo tipo de molécula. El compuesto huésped se sitúa en la cavidad del hospedador sin alterar su estructura de forma significativa pudiendo formar compuestos cristalinos a partir de moléculas en cualquier estado de la materia (Ortega, 2016).

Las ciclodextrinas tienen una cavidad interna no polar y grupos hidroxilos en su superficie y la inclusión de compuestos hidrofóbicos se llevan a cabo por interacciones hidrofóbicas entre la molécula huésped y las paredes de la cavidad de la ciclodextrina. Las interacciones Van Der Waals y/o puentes de hidrógeno también pueden ayudar con la unión del huésped (Muñoz et al., 1995).

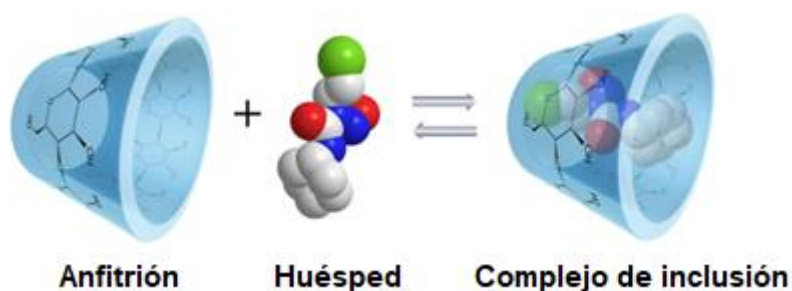


Figura 2. Formación de complejos de inclusión.

Algunas otras contribuciones importantes de los complejos de inclusión formados por las ciclodextrinas son que modifican las características fisicoquímicas de la molécula huésped, modifican la actividad química del huésped y pueden estabilizar sustancias sensibles a la luz o al oxígeno (Szejtli, 1985).

2.3 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales, ampliamente distribuidos en diversas plantas, frutas y verduras. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Lopez L., 2002), como se ilustra en la figura 3.

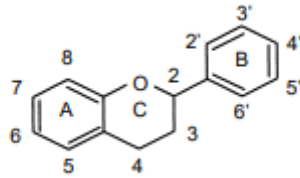


Figura 3. Estructura general de un flavonoide.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Además, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen efectos antiinflamatorios, analgésicos, antifúngicos, ansiolíticos, entre muchos otros (Cartaya et al., 2001).

2.4 Hesperidina

La hesperidina es un flavonoide glicosídico que se compone por un flavonoide denominado hesperitina y un disacárido denominado rutinosa, fue descubierto en 1827 por Lebreton y es uno de los flavonoides más abundantes encontrados en la cáscara de los cítricos (Martínez et al., 2002). La hesperidina tiene efectos antioxidantes, anti-inflamatorios, antibiótico, anti-carcinogénicos, antidepresivos, entre otros y se utiliza como tratamiento auxiliar asociado con el cansancio, las alergias, los calambres musculares y el dolor en las extremidades. Sin embargo, se ha encontrado que la hesperidina, tras su administración oral y al ser absorbida, presenta una baja biodisponibilidad (<25%) lo que limita su potencial terapéutico (Londoño, 2007).

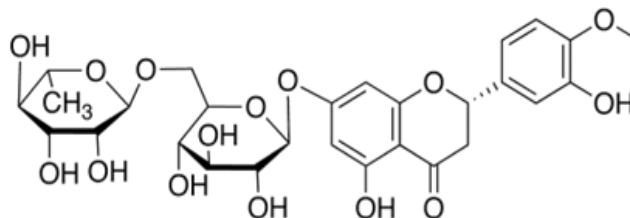


Figura 4. Estructura molecular de la hesperidina.

2.5 Neoponcirina

Didymin es un glicósido dietético también conocido como neoponcirina o isosakuranetina-7-*O*-rutinosida. Se encuentra comúnmente en las frutas cítricas como la mandarina, naranja y toronja. También puede ser extraído de una planta nativa de México denominada *Clinopodium mexicanum*, comúnmente conocida como “toronjil de menta”, utilizada en la medicina tradicional para tratar la ansiedad, problemas gastrointestinales y como analgésico (Alvarado et al., 2020). Debido a su alto contenido en los cítricos y su fácil extracción se considera como un fármaco económico, no-tóxico, seguro y efectivo (Yao et al., 2018).

Se ha reportado que la neoponcirina posee una variedad de efectos farmacológicos, como lo son, efectos anticarcinogénicos, antioxidantes, antinociceptivos, anti-inflamatorios, neuroprotectivos, hepatoprotectores y ansiolíticos. (Yousof, 2019). Cassani et al. (2013) estudio los efectos ansiolíticos y antinociceptivos de la 2(s)-neoponcirina en ratones, aislada de las hojas de *Clinopodium mexicanum* y el estudio demostró que la neoponcirina posee propiedades neuro-farmacológicas, tales como efectos ansiolíticos y antinociceptivos.

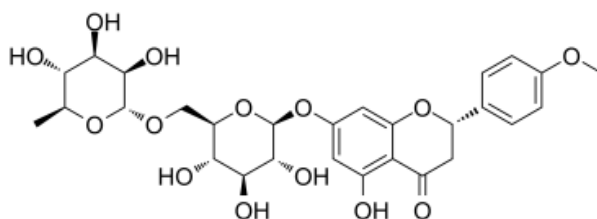


Figura 5. Estructura molecular de neoponcirina.

2.6 Fluidos supercríticos

Para poder dar una definición de un fluido supercrítico se puede partir del diagrama de fases del CO₂ mostrado en la fig. 6. En este se observa con líneas continuas, en función de la temperatura y presión, las condiciones de equilibrio de las distintas fases (líquido, sólido y vapor). Al final de la línea de equilibrio de las fases líquida y gaseosa, se puede observar lo que se conoce como temperatura crítica (T_c) y presión crítica (P_c). Por encima de este punto crítico la sustancia no se comporta como un líquido ni

un gas, pero posee propiedades de ambos, siendo este un fluido supercrítico. Este se comporta como un gas ya que es una sustancia que es compresible, siendo esta una característica que no tiene en estado líquido. Sin embargo, tiene la densidad de un líquido, y por ende su poder disolvente (Vázquez, 2008).

La densidad de los fluidos supercríticos está estrechamente relacionada con la presión y con la temperatura. A una temperatura constante, la densidad de un fluido supercrítico aumenta al incrementar la presión, por otro lado, a una presión constante la densidad disminuye al aumentar la temperatura (Valverde, 1995).

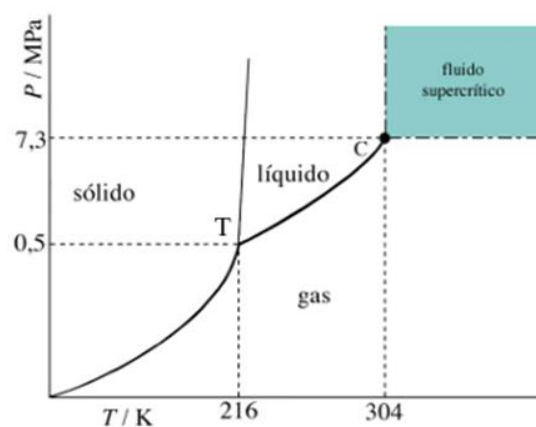


Figura 6. Diagrama de fases Presión-Temperatura del CO₂ (Tenorio, 2013).

Las propiedades disolventes de los fluidos supercríticos fueron inicialmente observadas por Hannay y Hogarth en el año 1879. En la década de 1960, Kurt Zosel utilizó CO₂ supercrítico para la extracción de la cafeína. La primera aplicación industrial del CO₂ supercrítico fue con la descafeinización del café, a finales de los años 70. Posteriormente surgieron diferentes aplicaciones para los fluidos supercríticos, como en la extracción a partir de sustratos sólidos, eliminación de impurezas tales como insecticidas de cereales, vegetales y suelos y limpieza en seco de tejidos, entre muchas otras aplicaciones (Barberio, 2019).

El CO₂ es un disolvente ampliamente utilizado debido a su baja temperatura crítica, no toxicidad, disponibilidad y bajo costo (Cid-Samamed et al., 2022). Se considera un disolvente “verde” debido a que se encuentra ampliamente disponible en la atmósfera, alimentos y bebidas, por lo que es seguro utilizar, es químicamente inerte, inodoro, no es inflamable, y no deja residuos al final del tratamiento gracias a su completa

evaporación en condiciones atmosféricas (Barberio, 2019). Una de las principales ventajas que presenta el CO₂ supercrítico es que su solubilidad puede controlarse fácilmente ajustando convenientemente la presión y la temperatura, permitiendo fraccionar mezclas donde todos sus componentes son solubles (Albo et al., 2013).

Algunos de las aplicaciones actuales más utilizadas del CO₂ supercrítico son las siguientes (Albo et al., 2013):

- Desactivación de bacterias, hongos y esporas.
- Encapsulación o recubrimiento.
- Extracción de productos naturales o de alto valor añadido (pigmentos, aceites, grasas, principios activos, entre otros).
- Impregnación en matrices orgánicas.
- Medio de reacción (hidrogenación, oxidación o polimerización).
- Micronización, cristalización u obtención de partículas.
- Procesamiento de plásticos.
- Separación o fraccionamiento de mezclas.
- Síntesis de nuevos materiales con propiedades únicas (aerogeles, nanopartículas, otros).

2.7 Formación de complejos de inclusión mediante fluidos supercríticos

Existen diferentes métodos para la formación de complejos de inclusión como el método de precipitación, de amasado, de molienda y CO₂ supercrítico, entre otros. El uso de CO₂ es una opción alternativa a los métodos tradicionales como el método de amasado o de co-precipitación, ya que estas técnicas pueden presentar algunas desventajas como el tiempo requerido y la presencia de disolventes orgánicos residuales (Banchero, 2021). Otra ventaja que tiene el método de CO₂ supercrítico es que puede ser utilizado a nivel industrial debido a que el uso de agua proporciona un buen rendimiento, a comparación de otros métodos (Wadhwa et al., 2017).

En el método con el uso de CO₂ supercrítico una cantidad determinada de ciclodextrina y del huésped se colocan en un reactor con CO₂ a una presión y temperatura específica. Después, el CO₂ es vaporizado debido a la disminución rápida de presión y se separa el complejo de inclusión (Wadhwa et al., 2017).

2.8 Métodos espectroquímicos de análisis cuantitativo

2.8.1 Mediciones espectroscópicas

En la espectroscopia se utilizan las interacciones de la radiación con la materia para obtener información sobre una muestra. Los métodos espectroscópicos analíticos se basan en medir la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies moleculares o atómicas de interés. Se pueden clasificar estos métodos de acuerdo con la región del espectro electromagnético utilizada o producida durante la medición, como lo son las regiones de rayos x, ultravioleta, visible, infrarrojo, entre otros. Los datos espectroscópicos suelen representarse por un espectro, que es una gráfica de la respuesta de interés en función de la longitud de onda o la frecuencia (Oliveros et al., 2009; Skoog et al., 2015).

2.8.1.1 Proceso de absorción

La Ley de Beer-Lambert nos indica cuantitativamente cómo la cantidad de atenuación depende de la concentración de las moléculas absorbentes y de la longitud de la trayectoria donde ocurre la absorción. Conforme la luz atraviesa un medio que contiene un analito absorbente, la intensidad disminuye a medida que el analito es excitado. La transmitancia, T , de la disolución es la fracción incidente de la radiación transmitida por la disolución. La absorbancia, A , de una disolución está relacionada con la transmitancia de una forma logarítmica, a medida que la absorbancia de una disolución incrementa, la transmitancia disminuye (Skoog et al., 2015).

De acuerdo con la Ley de Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes, c , y a la longitud de la trayectoria, b , del medio absorbente y a es una constante de proporcionalidad llamada absortividad.

$$A = \log(P_0/P) = abc$$

Cuando se expresa la concentración en moles por litro y b en cm, la constante de proporcionalidad se llama absortividad molar y se representa con el símbolo ϵ (Skoog et al., 2015).

$$A = \epsilon bc$$

2.8.2 Espectroscopia Ultravioleta y Visible

La absorción de radiación ultravioleta y visible es utilizada en gran medida para identificar y determinar muchas especies químicas inorgánicas, orgánicas y bioquímicas. La espectroscopia de absorción molecular en las regiones ultravioleta y visible del espectro se utiliza en su mayor parte para el análisis cuantitativo y posiblemente es aplicada de manera más extensa en los laboratorios químicos y clínicos que cualquier otra técnica (Ávila et al., 2021).

La absorción de la radiación ultravioleta y visible por parte de las moléculas ocurre en una o más bandas de absorción electrónica, cada una de las cuales está compuesta por varias líneas discretas estrechamente agrupadas.

2.8.3 Importancia del UV-Vis en el análisis cuantitativo

La espectrofotometría es una técnica ampliamente utilizada en los laboratorios para el análisis cuantitativo debido principalmente a su sencillez operativa y a la rapidez en el análisis. Algunas características importantes de los métodos espectrofotométricos son (Skoog et al., 2015):

- Amplia aplicabilidad: La mayoría de las especies inorgánicas, orgánicas y bioquímicas absorben radiación ultravioleta y visible y, por lo tanto, son sujetos de determinaciones cuantitativas directas.
- Sensibilidad alta: Los límites típicos de detección para la espectroscopia de absorción varían entre 10^{-4} a 10^{-5} M.
- Selectividad moderada a alta: Se puede encontrar una longitud de onda a la cual el analito absorbe la radiación.
- Buena exactitud: Los errores relativos en la concentración encontrados con un procedimiento espectrofotométrico se encuentran en el intervalo del 1 al 5%.
- Simplicidad y conveniencia

3. Planteamiento del problema

En México aproximadamente 1 de cada 5 personas podría desarrollar alguna vez en su vida algún trastorno de ansiedad, se ha estimado que esta proporción podría aumentar debido a los problemas psicosociales generados a partir de la pandemia

por covid-19. Por ello el desarrollo de alternativas farmacológicas que no conlleven tantos efectos secundarios como los tratamientos actuales, cobra relevancia en la investigación básica nacional. Aprovechando la riqueza de medicina herbolaria en nuestro país para la búsqueda de nuevas entidades farmacológicas, es que en el presente proyecto de investigación se plantea incrementar la solubilidad acuosa de la neoponcirina, un flavonoide extraído de *Clinopodium mexicanum*. Así como de hesperidina un flavonoide comercial extraído de cáscaras de cítricos.

4. Hipótesis

Empleando el método de CO₂ supercrítico para la formación de complejos de inclusión β -CD/Hesperidina y β -CD/Neoponcirina, utilizando diferentes condiciones de reacción (presiones de 12, 17 y 22 MPa a una temperatura de 55°C), se obtiene una mayor cantidad y solubilidad de los complejos de inclusión al compararlo con los controles obtenidos.

5. Objetivo general

La cuantificación de flavonoide (hesperidina o neoponcirina) contenido en complejos de inclusión formados mediante el uso de CO₂ supercrítico.

6. Objetivos específicos

1. La formación de complejos de inclusión utilizando CO₂ supercrítico.
2. Elaboración de curvas de calibración utilizando UV-Vis.
3. Cuantificación del contenido total de flavonoide y de la solubilidad de complejos de inclusión β -CD/Hesperidina y β -CD/Neoponcirina utilizando UV-Vis.

7. Materiales

La hesperidina (Hes) y β -cyclodextrina (β -CD) se obtuvieron de Sigma Aldrich. El extracto de neoponcirina (Neo) se obtuvo a partir de *Clinopodium mexicanum* de acuerdo con la metodología descrita en el artículo publicado por Cassani y colaboradores (2013). Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de grado analítico.

8. Equipos

Se utilizó un sistema para la formación de complejos de inclusión por CO₂ supercrítico (Figura 7), un espectrofotómetro UV-Vis, una balanza analítica y un agitador Thermomixer.

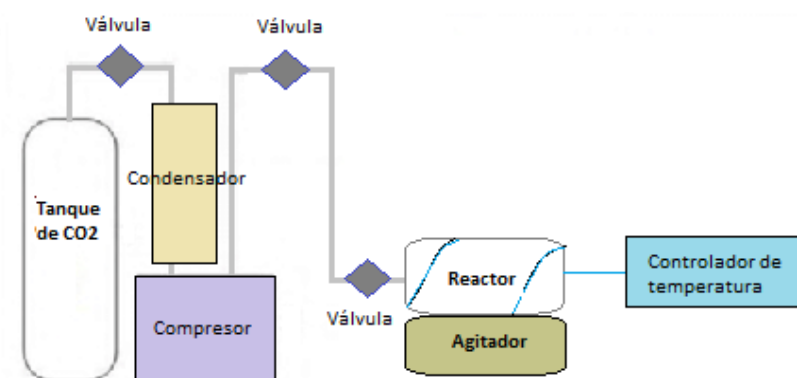


Figura 7. Esquema del sistema para el proceso de formación de complejos de inclusión utilizando CO₂ supercrítico.

9. Metodología

9.1 Formación de complejos de inclusión mediante uso de CO₂ supercrítico

9.1.1 Formación de complejos de inclusión con hesperidina mediante uso de CO₂ supercrítico

En un reactor de 30 mL de acero inoxidable, provisto de un agitador magnético, se colocaron 30 mg de hesperidina y 16 mg β -ciclodextrina (1:1 molar). Después, como co-disolvente, se adicionó 500 μ L de etanol. Después de cerrar el reactor, se inyectó CO₂ a una presión de 5 MPa, y una vez alcanzada la temperatura deseada (55°C) se aumentó la presión según el experimento (Tabla 1). Pasado el tiempo de reacción de 1:45 h se suspendió el sólido en agua destilada, se liofilizó y se cuantificó por UV-Vis.

Experimento	Complejo	Presión
1	Hes/ β -CD	12 MPa
2		17 MPa
3		22 MPa

Tabla 1. Cuadro de experimentos de hesperidina en diferentes presiones.

9.1.2 Formación de complejos de inclusión con neoponcirina mediante uso de CO₂ supercrítico

En un reactor de 30 mL de acero inoxidable, provisto de un agitador magnético, se colocaron 30 mg de neoponcirina y 16 mg β-ciclodextrina en una relación 1:1 molar. Posteriormente, como co-disolvente, se adicionó 500 μL de etanol. Después de cerrar el reactor, se inyectó CO₂ a una presión de 5 MPa, y una vez alcanzada la temperatura deseada (55°C) se aumentó la presión según el experimento (Tabla 2). Pasado el tiempo de reacción de 1:45 h se suspendió el sólido en agua destilada, se liofilizó y se cuantificó por UV-Vis.

Experimento	Complejo	Presión
3	Neo/β-CD	12 MPa
4		17 MPa
5		22 MPa

Tabla 2. Cuadro de experimentos con neoponcirina en diferentes presiones.

9.2 Elaboración de curvas de calibración

9.2.1 Elaboración de curvas de calibración de hesperidina

A partir de una disolución Stock de 0.4 mg/mL en MeOH, se prepararon 7 disoluciones en un intervalo de concentraciones de 0.008 a 0.04 mg/ml. Estas disoluciones fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm en un rango de 0.1 a 1 u.a.

9.2.2 Elaboración de curvas de calibración de neoponcirina

A partir de una disolución Stock de 0.4 mg/mL en MeOH, se prepararon 9 disoluciones en un intervalo de concentraciones de 0.008 a 0.04 mg/ml. Estas disoluciones fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm en un rango de 0.1 a 1 u.a.

9.3 Cuantificación de flavonoide

9.3.1 Obtención y análisis de muestra para la cuantificación de hesperidina

Del polvo obtenido después de liofilizar se pesaron 4 mg de la muestra y se colocó en un matraz aforado de 5 mL, posteriormente se aforó con MeOH. De esta disolución se tomó una alícuota de 740 μ L y se colocó en un matraz aforado de 5 mL, el cual se aforó con MeOH. Posteriormente fue analizada en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm.

9.3.2 Obtención y análisis de muestra para la cuantificación de neoponcirina

Después de liofilizar se pesaron 4 mg de la muestra y se colocó en un matraz aforado de 5 mL, posteriormente se aforó con MeOH. De esta disolución se tomó una alícuota de 600 μ L y se colocó en un matraz aforado de 5 mL, el cual se aforó con MeOH. Posteriormente fue analizada en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm.

9.3.3 Cálculo del total de flavonoide

Para el cálculo del porcentaje de flavonoide se interpola la absorbancia en la curva de calibración, utilizando la ecuación de la recta del flavonoide, con lo que se obtiene la concentración 2 $[C_2]$. De la ecuación 1 se despeja la concentración 1 $[C_1]$ y se obtiene la ecuación 2, las cuales se muestran a continuación:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$C_1 = \frac{C_2 \times V_2}{V_1} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Teniendo en cuenta que los volúmenes varían para cada flavonoide, se sustituyen los datos y se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$C_1 = \frac{(C_2)(5 \text{ mL})}{(0.74 \text{ mL})} \quad (\text{Ecuación 3. Concentración de hesperidina})$$

$$C_1 = \frac{(C_2)(5 \text{ mL})}{(0.6 \text{ mL})} \quad (\text{Ecuación 4. Concentración de neoponcirina})$$

La obtención de mg de flavonoide se obtiene con la siguiente ecuación:

$$(C_1)(5 \text{ mL}) = \text{mg de Flavonoide} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Y para la obtención del porcentaje de flavonoide se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Flavonoide} = \frac{(\text{mg de Flavonoide}) (100)}{(4 \text{ mg de complejo})} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Posteriormente los resultados se grafican en Excel para su visualización.

9.4 Prueba de disolución

9.4.1 Obtención y análisis de muestra para la prueba de disolución de hesperidina y neoponcirina

De lo liofilizado se pesaron 5 mg de cada muestra, se colocaron en tubos Eppendorf y se agregó 1 mL de agua destilada a cada tubo. Posteriormente se colocaron los tubos Eppendorf en un agitador Thermomixer marca Eppendorf a 25°C y 1000 RPM por 20 horas. De los tubos Eppendorf se tomó una alícuota de 600 µL y se colocó en un matraz aforado de 5 mL, el cual se aforó con MeOH. Finalmente, las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm.

9.4.2 Cálculo de la concentración de disolución

Para la obtención de la concentración de disolución de neoponcirina y hesperidina primero se interpola la absorbancia en la curva de calibración utilizando la ecuación de la recta, obteniendo así la $[C_2]$.

Posteriormente, para el cálculo de $[C_1]$, ésta se despeja de la ecuación 1 y se colocan los volúmenes correspondientes, como se muestra en la ecuación 7.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$C_1 = \frac{C_2 \times V_2}{V_1} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$C_1 = \frac{(C_2) (5 \text{ mL})}{(0.6 \text{ mL})} \quad (\text{Ecuación 7. Disolución de hesperidina y neoponcirina})$$

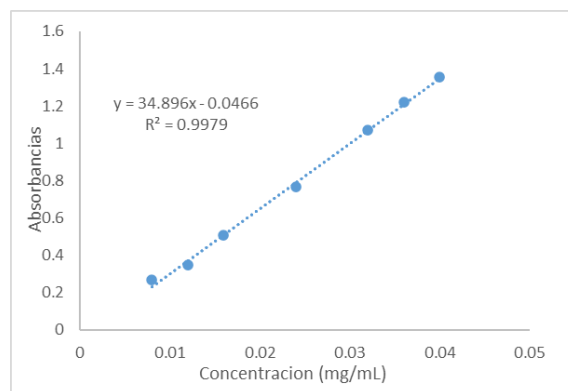
Después se analizan los resultados en Excel y se muestran en graficas para su mejor visualización.

10. Resultados y discusión

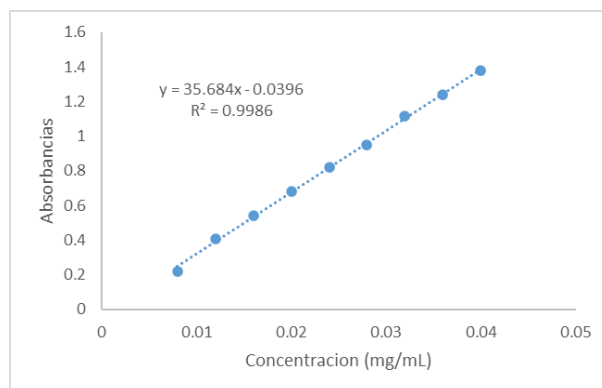
Los sólidos obtenidos de Hes- β CD y Neo- β CD mediante el uso de CO₂ supercrítico fueron analizados mediante el cálculo del total de flavonoide obtenido y la disolución acuosa que presenta el flavonoide.

10.1 Curvas de calibración

Después de la metodología descrita anteriormente se graficaron los datos y se obtienen las siguientes curvas de calibración.



Gráfica 1. Curva de calibración de hesperidina.



Gráfica 2. Curva de calibración de neoponcirina.

En la Gráfica 1 y 2 se observan las curvas de calibración de hesperidina y neoponcirina respectivamente, y fueron elaboradas utilizando un espectrofotómetro UV-Vis y una celda de cuarzo de 1 cm a una absorbancia de 284 nm. Según la Ley de Lambert y Beer, la absorbancia está relacionada directamente con la concentración de la sustancia, y se puede representar gráficamente mediante una curva de calibración. Estas curvas de calibración se utilizaron para determinar la

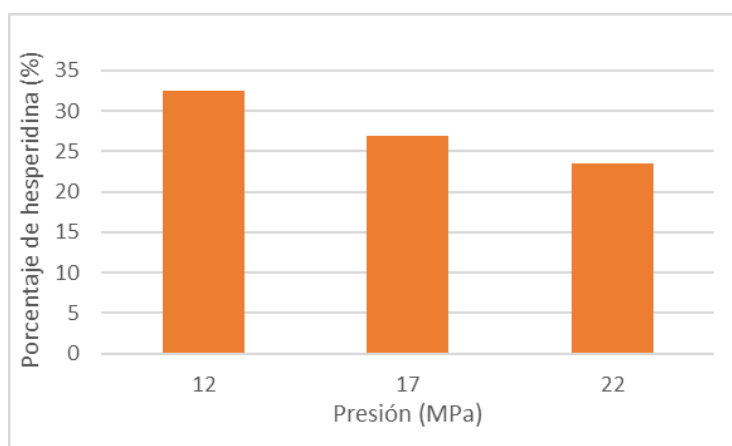
cantidad y contenido de flavonoide en los complejos de inclusión mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas.

En la gráfica 1 se puede observar que presenta una relación lineal con una R^2 de 0.9986 y en la gráfica 2 se puede observar una R^2 de 0.9979, lo que indica que ambas gráficas presentan una relación lineal debido a que el R^2 obtenido es mayor a 0.995. Por lo tanto, se puede concluir que las curvas de calibración obtenidas son útiles para la cuantificación de los flavonoides de interés.

10.2 Resultados de la cuantificación de flavonoide

Una vez elaborado los complejos se realiza la metodología descrita para la cuantificación de flavonoide, se grafican los resultados y se obtienen las gráficas 3 y 4.

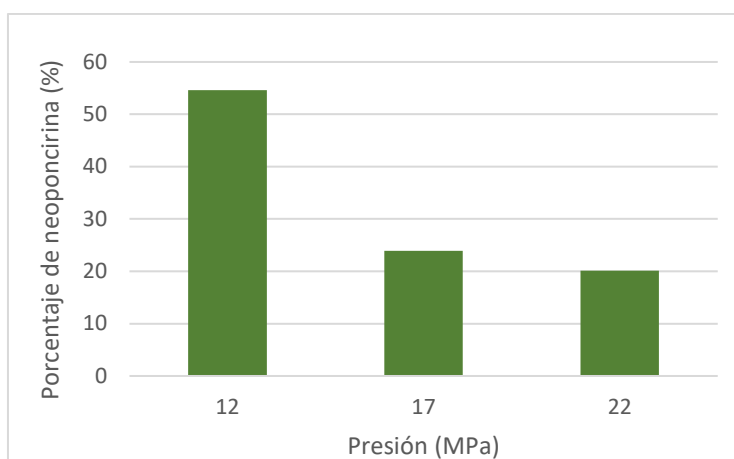
10.2.1 Análisis de la cuantificación de hesperidina



Gráfica 3. Cuantificación de hesperidina (T.: 55°C)

En la gráfica 3 se puede observar que la cantidad máxima de hesperidina (32.4 %) se obtuvo utilizando una presión de 12 MPa. A una presión de 17 y 22 MPa se observa una disminución evidente en la cantidad de hesperidina obtenida. En este caso, la disminución en cantidad de flavonoide obtenido es menor que con el experimento con neoponcirina pero sigue esta tendencia de disminución.

10.2.2 Análisis de la cuantificación de neoponcirina



Gráfica 4. Cuantificación de neoponcirina (T.: 55°C)

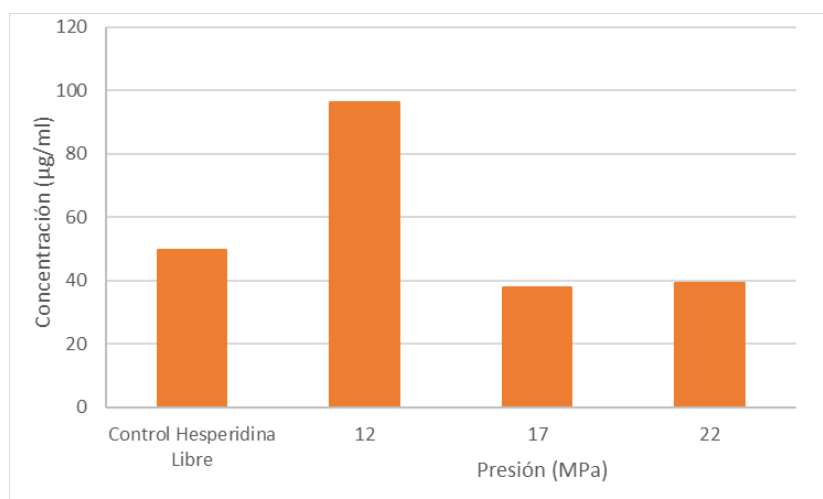
Se puede observar en la gráfica 4 una tendencia en donde a menor presión se obtiene una cantidad mayor de neoponcirina. La cantidad máxima de neoponcirina obtenida es de 54.59% a una presión de 12 MPa y a las presiones de 17 y 22 MPa hay una disminución significativa. En este caso, el aumento de presión no parece mostrar algún incremento en la cantidad de complejo obtenido.

La cantidad de neoponcirina puede variar dependiendo de las condiciones de reacción. Según Banchemo (2021) diversos autores han reportado diferentes resultados en cuanto al efecto que tienen la presión y temperatura en la eficiencia de la formación del complejo. Debido a que se utilizó una temperatura constante, la condición de reacción que fue modificada fue la presión y la literatura menciona que esta puede tener efectos positivos o negativos.

10.3 Resultados de la prueba de disolución

Después de realizar la metodología descrita anteriormente para esta prueba, los resultados de la prueba de disolución se analizan y se obtienen las gráficas 5 y 6.

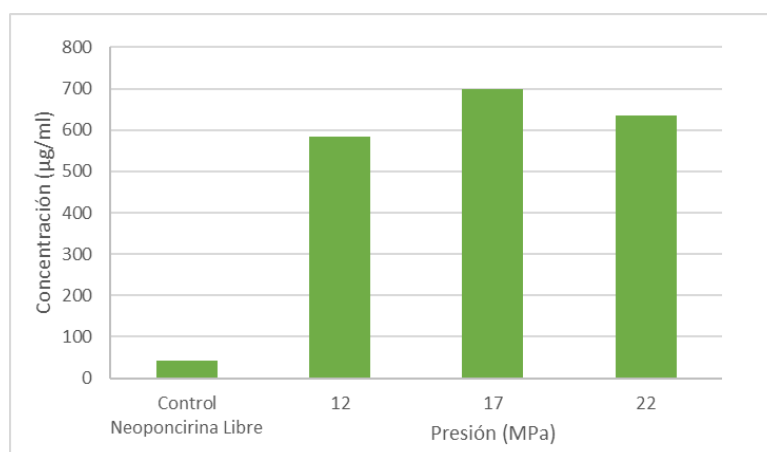
10.3.1 Análisis de la prueba de disolución de hesperidina



Gráfica 5. Gráfica de disolución de hesperidina.

En la gráfica 5 se puede observar una tendencia en donde la disolución del complejo disminuye conforme la presión aumenta. A una presión de 12 MPa se observa una concentración de 96.13 µg/mL, casi el doble que el control de hesperidina libre. Posteriormente a una presión mayor de 17 MPa se obtuvo una concentración de 37.32 µg/mL, y a 22 MPa una concentración de 39.13 µg/mL. El control de hesperidina libre en agua que se obtuvo con este método fue de una concentración de 49.69 µg/mL. Esta es diferente a la solubilidad de hesperidina reportada en la literatura de 4.95 µg/mL, lo cual puede deberse a las diferentes condiciones y métodos utilizados. El mejor resultado obtenido de la disolución del complejo Hes/ β -CD fue a una presión baja.

10.3.2 Análisis de la prueba de disolución de neoponcirina



Gráfica 6. Gráfica de disolución de neoponcirina.

En la gráfica 6 no se muestra una tendencia en específico en la disolución de neoponcirina. A una presión de 12 MPa se observa una concentración de 584.62 µg/mL, posteriormente a una presión mayor 17 MPa se obtuvo una concentración de 699.97 µg/mL, y a 22 MPa una concentración de 635.29 µg/mL. La mayor disolución del fármaco se obtuvo a una presión de 17 MPa.

Al comparar estos resultados con el control de neoponcirina libre obtenida, la disolución de neoponcirina a todas las presiones utilizadas fue mucho mayor.

Según Banchemo (2021), a una temperatura constante, la solubilidad del soluto incrementa con el aumento de la presión ya que la densidad y la capacidad de solubilidad del fluido también incrementa.

Por otro lado, la adición de un co-disolvente puede servir para incrementar el rendimiento del complejo y aumentar la solubilidad del soluto en un ambiente supercrítico (Banchemo 2021). En una investigación realizada por Grandelli y colaboradores (2012) reportan que el uso de etanol como co-disolvente fue exitoso y que puede incrementar la eficiencia de la formación del complejo, por lo que el uso de etanol en esta investigación pudo ser importante para la obtención de los complejos de inclusión.

11. Conclusiones

En este proyecto de investigación la formación de complejos de inclusión mediante el uso de CO₂ supercrítico se realizó de forma exitosa, obteniendo resultados que indican que es posible mejorar la disolución acuosa de hesperidina y neoponcirina mediante este método.

Al realizar las pruebas con hesperidina los mejores resultados en cuanto al contenido obtenido y su disolución fueron obtenidos a una presión de 12 MPa y a una temperatura de 55°C, lo que nos indica que estas son las mejores condiciones de reacción.

Con neoponcirina se obtuvieron resultados diferentes; el contenido de neoponcirina obtenida fue mayor que la obtenida con hesperidina, con unas condiciones de reacción de 12 MPa y 55°C. En la prueba de disolución de neoponcirina, el mejor resultado se obtuvo a una presión mayor (17MPa).

El método de CO₂ supercrítico es una buena alternativa para la formación de complejos de inclusión debido a que presenta numerosos beneficios, siendo los más destacables su capacidad disolvente y sus ventajas de ser no inflamable, no corrosivo, no tóxico y no cancerígeno, entre otras.

Una recomendación propuesta para investigaciones posteriores es tomar en cuenta la viabilidad de la formación de complejos de inclusión con el método de CO₂ utilizando otros flavonoides con problemas de solubilidad.

12. Referencias

Albo J., Álvarez A.L., Andres J.M., Bartolome C., Burgos S., Castro P., ..., Vega L. (2013) Usos del CO₂: Un camino hacia la sostenibilidad. Plataforma Tecnológica Española del CO₂, 1ra Edición, Gráficas Aries, S.A., España.

Alvarado A.M., García-Trejo F., Cardador-Martínez A., Magallán-Hernández F. (2020) *Clinopodium mexicanum*: potential and difficulties for the sustainable use of a Mexican medicinal plant. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat19(2):149–160.<https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.2.8>

Ávila-Camacho, F. J., Moreno-Villalba, L. M., Cerón-Montes, G. I., Garrido-Hernández, A., Cardoso-Chávez, C. A., & Pacheco-Piña, C. J. (2021). Diseño de un espectrofotómetro UV-VIS de bajo costo para la industria bioquímica: Una Revisión. Padi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI, 9(Especial2), 19-28. <https://doi.org/10.29057/icbi.v9iEspecial2.7788>

Banchemo, M. (2021). Supercritical Carbon Dioxide as a Green Alternative to Achieve Drug Complexation with Cyclodextrins. Pharmaceuticals, 14(6), 562. <https://doi.org/10.3390/ph14060562>

Barberio R. (2019) Fluidos supercríticos y líquidos iónicos: Ventajas y aplicaciones a bajo impacto ambiental. Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial.

Cartaya, O.; Reynaldo, I. (2001) Flavonoides: Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales, vol. 22, núm. 2, pp. 5-14 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba

Cassani J, Araujo AGE, Martínez-Vázquez M, Manjarrez N, Moreno J, Estrada-Reyes R. (2013) Anxiolytic-Like and Antinociceptive Effects of 2(S)-Neoponcirin in Mice. *Molecules*; 18(7):7584-7599. <https://doi.org/10.3390/molecules18077584>.

Cheirsilp B., Rakmai J. (2016) Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biol Eng Med* 2: doi: 10.15761/BEM.1000108

Cid-Samamed A, Rakmai J, Mejuto JC, Simal-Gandara J, Astray G. (2022) Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chem.* 1;384:132467. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132467. PMID: 35219231.

Espinosa F., Beatriz; Hernández J., Gabriel (2005) Formación, evaluación y caracterización del complejo de inclusión piroxicam/hidroxipropil-(beta)-ciclodextrina. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 36, núm, pp. 18-24 Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Distrito Federal, México

Grandelli, H.E.; Hassler, J.C.; Whittington, A.; Kiran, E. Melting point depression of piroxicam in carbon dioxide+co-solvent mixtures and inclusion complex formation with -cyclodextrin. *J. Supercrit. Fluid.* 2012, 71, 19–25. [CrossRef]

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*, vol. XIII, núm. 33, pp. 63-66 Universidad Tecnológica de Pereira Pereira, Colombia

Lopez Luengo, M^a Transito (2002) Flavonoides. *Revista El Sevier*. Vol. 21 Num. 4 pag. 105-113

Martinez F. S., Gonzalez G. J., M. Culebras, M.^a J. Tuñón (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*. Departamento de Fisiología, Universidad de León.

Muñoz-Botella, S.; Del Castillo, B. y Martin, M. A. (1995) Las ciclodextrinas: características y aplicaciones de la formación de complejos de inclusión. Laboratorio de Técnicas Instrumentales. Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia. U. C. M. 28040-Madrid. España.

Oliveros-Bastidas, Alberto de J.; Carrera, Ceferino A.; Marín, David. (2009) Estudio por Espectrofotometría UV-vis de la reacción entre los iones cianuro y picrato. Un ejemplo práctico de aplicaciones analíticas y estudios cinéticos. Revista Colombiana de Química, vol. 38, núm. 1, pp. 61-82, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Ortega M., C (2016) Modelización molecular de complejos de inclusión de ciclodextrinas con acetazolamida. Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Pellicer Balsalobre J. A. (2016) Aplicación de ciclodextrinas en distintos sectores industriales: biotecnología enzimática, industria alimentaria y descontaminación de aguas. Programa de Doctorado en Nutrición y Seguridad Alimentaria. Universidad Católica de Murcia.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). Fundamentos de química analítica (9a. ed. --). México D.F.: Cengage Learning.

Szejtli, J. (1985). Cyclodextrins: a new group of industrial basic materials. *Nahrung*, 29, 911-924

Tenorio, M. J. (2013). Síntesis de materiales porosos nanoestructurados metal-soporte en CO₂ supercrítico. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Valverde G, A. (1995) Extracción con Fluidos Supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas. Instituto de Estudios Almerienses.

Vasquez de Frutos L. (2008) Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales. Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid.

Wadhwa, G., Kumar, S., Chhabra, L., Mahant, S., & Rao, R. (2017). Essential oil-cyclodextrin complexes: An updated review. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 89(1–2), 39–58. <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0744-2>

Yao, Q., Lin, M.-T., Zhu, Y.-D., Xu, H.-L., & Zhao, Y.-Z. (2018). Recent Trends in Potential Therapeutic Applications of the Dietary Flavonoid Didymin. *Molecules*, 23(10), 2547. doi:10.3390/molecules23102547

Yousof Ali, Sumera Zaib, M. Mizanur Rahman, Susoma Jannat, Jamshed Iqbal, Seong Kyu Park, Mun Seog Chang (2019) Didymin, a dietary citrus flavonoid exhibits anti-diabetic complications and promotes glucose uptake through the activation of PI3K/Akt signaling pathway in insulin-resistant HepG2 cells of *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 305, Pag.180-194, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.03.018>.