



## TESIS

# **“VALORIZACIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DEL ORÉGANO MEXICANO Y LIMÓN MEXICANO MEDIANTE LA GENERACIÓN DE PRODUCTOS ENRIQUECIDOS CON FLAVONOIDES (PINOCEMBRINA Y HESPERIDINA ) DE POTENCIAL INTERÉS BIOLÓGICO.”**

QUE PRESENTA:

**MARÍA FERNANDA CUEVAS GONZÁLEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. HECTOR FLORES MARTÍNEZ**

CODIRECTOR DE TESIS:

**DR. JOSÉ DANIEL PADILLA DE LA ROSA**

REVISORES DE TESIS:

**DR. JUAN FLORENCIO GÓMEZ LEYVA**

**DRA. IRMA GUADALUPE LÓPEZ MURAIRA**

---

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

---

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. JUNIO, 2022.

### **Agradecimientos.**

Al Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco, por ser pilar importante en mi formación profesional y personal, a los que lo conforman y que de manera directa o indirecta realizaron su aporte para que este día se viera reflejado en culminación. Al CIATEJ por abrirme las puertas y permitirme realizar parte de este proyecto en sus instalaciones.

Al Dr. Héctor Flores Martínez, por ser mi director de tesis y brindarme una excelente orientación, soporte y motivación en mi formación científica. Por todo su apoyo y confianza para la realización de este proyecto en su laboratorio que contribuye de manera positiva en mi desarrollo profesional y personal.

Al Dr. J. Daniel Padilla de la Rosa, por su importante aporte, colaboración y amabilidad durante mi estancia en la unidad de Tecnología Alimentaria y durante el desarrollo de este trabajo. Así como a mis revisores la Dra. Irma Guadalupe y el Dr. Juan Florencio por sus aportaciones las cuales permitieron un buen desarrollo de la investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su valiosa contribución económica.

A la maestra Caro, porque representa parte importante del Laboratorio de Alimentos y Productos Naturales al siempre estar al pendiente de lo necesario. A Carmelita, por apoyarme y recibirme desde el primer día que ingrese, por brindarme sus conocimientos y aportaciones los cuales me permitieron adentrarme cada vez más en mi tema de investigación, por los buenos ratos y amistad. A Ángela, por siempre tener disposición y entusiasmo de apoyarme en la realización de algunas pruebas experimentales, por su confianza y amistad.

A mis compañeros y amigos por todo el apoyo y tiempo compartido.

A Juan Manuel, por ser parte importante en mi vida, mi apoyo incondicional en cada momento. Por todo el amor, cariño y paciencia durante todo este desarrollo, por creer siempre en mí y ser mi compañero de aventuras, por ser un gran impulso para seguir buscando nuevas metas y ser mejor cada día.

A mis padres, por siempre apoyarme y darme la oportunidad de tener una excelente formación educativa en el transcurso de mi vida, lo cual me ha llevado a cumplir una meta más en mi vida. Y sobre todo a mi madre ya que siempre me ha enseñado a ser una mujer fuerte y me ha inspirado en cada momento a ser mejor cada día.

A todos ellos, muchas gracias.

## Resumen.

El orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) y la industria de cítricos como el limón, constituyen materias primas de gran valor comercial principalmente por la presencia de los compuestos volátiles contenidos en su aceite esencial, en el caso del limón esta industria participa intensivamente en diferentes sectores de la industria. Sin embargo, poco aprovechamiento se ha dado a sus altos contenidos de compuestos fenólicos hidrosolubles presentes en ambas materias primas (orégano y limón), con probadas capacidades antioxidantes. Dentro de ellos, en el orégano mexicano destaca el elevado contenido de pinocembrina, flavanona con propiedades de gran importancia alimenticia y para la salud por su actividad protectora contra la isquemia cerebral, y en los cítricos como el limón la hesperidina, flavanona con múltiples actividades bioactivas destacando la capacidad antioxidante, actividades cardioprotectoras, antiinflamatorias, entre otras. Durante el proceso extractivo del aceite esencial de orégano derivado de su hoja, se genera una gran cantidad de residuos sólidos ricos en flavonoides, los cuales son mínimamente aprovechados e incluso llegan a constituir una fuente de contaminación por su mala disposición como desecho. Con el fin de valorizar este desecho agroindustrial, se caracterizó mediante la determinación del contenido de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y contenido de pinocembrina, observando un mayor contenido de pinocembrina en el extracto de orégano sin aceite esencial (0.766 mg/mL) con respecto al de orégano sin tratamiento (0.659 mg/mL). Los resultados sugieren que el bagazo residual de la extracción del aceite esencial puede ser aprovechado con gran potencial por su alto contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y pinocembrina (27.93 mg/g BS). Para lograr la concentración de pinocembrina, se evaluaron dos métodos de separación: columna cromatográfica con silica gel (hidrofílica) y separación con extracción automatizada en fase sólida hidrofóbica (Ultra C18) pudiendo generarse productos enriquecidos en pinocembrina con gran pureza, con eficiencias de recuperación de pinocembrina de 54.50 y 90.13 %, respectivamente. Debido a la baja solubilidad, biodisponibilidad y tasa de disolución que contribuyen a la reducción de la bioactividad de estos flavonoides importantes (pinocembrina y hesperidina) presentes en los residuos, se llevó a cabo la inclusión molecular con beta ciclodextrinas ( $\beta$ -CD), las cuales de acuerdo a sus propiedades estructurales brindan a las moléculas una mayor solubilidad en medios acuosos, tal fue el caso, ya que al encapsular la pinocembrina su solubilidad aumentó en un factor de 2 a 4 veces más presentando así mismo una eficiencia de encapsulación de 94.98, 51.06 y 42.75 % para las muestras total, sobrenadante y precipitada, respectivamente. En el caso de hesperidina se buscaron las condiciones óptimas de encapsulación las cuales se encontraron principalmente en temperaturas de 40°C y relaciones de flavonoide:CD de 1 y 3, de tal manera que la solubilidad de los encapsulados obtenidos aumentó de 3 a 12 veces más, con eficiencias de encapsulación que fueron del 80 a 95 % para las muestras totales, 68 a 80 % para muestras precipitadas y para muestras sobrenadantes se encontraron eficiencias de encapsulación de 14 a 22 %. El presente trabajo contribuye al potencial desarrollo de nuevos productos y procesos de valorización de residuos en la creciente industria de extracción de aceites esenciales naturales y en la industria del procesamiento de cítricos.

## Summary

Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) and the citrus industry, such as lemon, constitute raw materials of great commercial value, mainly due to the presence of volatile compounds contained in its essential oil. In the case of lemon, this industry participates intensively in different sectors of the industry. However, little use has been made of its high content of water-soluble phenolic compounds present in both raw materials (oregano and lemon), with proven antioxidant capacities. Among them, Mexican oregano highlights the high content of pinocembrin, a flavanone with properties of great nutritional and health importance due to its protective activity against cerebral ischemia, and in citrus fruits such as lemon hesperidin, a flavanone with multiple bioactive activities highlighting the antioxidant capacity, cardioprotective activities, anti-inflammatory, among others. During the extractive process of the essential oil of oregano derived from its leaf, a large amount of solid waste rich in flavonoids is generated, which is minimally used and even becomes a source of pollution due to its poor disposal as waste. In order to value this agro-industrial waste, it was characterized by determining the content of total phenols, antioxidant activity (DPPH) and pinocembrin content, observing a higher content of pinocembrin in the oregano extract without essential oil (0.766 mg/mL) with respect to that of oregano without treatment (0.659 mg/mL). The results suggest that the residual bagasse from the extraction of the essential oil can be exploited with great potential due to its high content of polyphenols, antioxidant capacity and pinocembrin (27.93 mg/g BS). To achieve the concentration of pinocembrin, two separation methods were evaluated: column chromatography with silica gel (hydrophilic) and separation with automated extraction in hydrophobic solid phase (Ultra C18), being able to generate products enriched in pinocembrin with high purity, with recovery efficiencies of pinocembrin of 54.50 and 90.13 %, respectively. Due to the low solubility, bioavailability and dissolution rate that contribute to the reduction of the bioactivity of these important flavonoids (pinocembrin and hesperidin) present in the residues, molecular inclusion with beta cyclodextrins ( $\beta$ -CD) was carried out, the which, according to their structural properties, provide the molecules with greater solubility in aqueous media, such was the case, since when pinocembrin was encapsulated, its solubility increased by a factor of 2 to 4 times more, also presenting an encapsulation efficiency of 94.98, 51.06 and 42.75 % for the total, supernatant and precipitated samples, respectively. In the case of hesperidin, the optimal encapsulation conditions were sought, which were found mainly at temperatures of 40°C and flavonoid:CD ratios of 1 and 3, in such a way that the solubility of the encapsulates obtained increased from 3 to 12 times. Furthermore, with encapsulation efficiencies ranging from 80 to 95 % for total samples, 68 to 80 % for precipitated samples and for supernatant samples, encapsulation efficiencies of 14 to 22 % were found. This work contributes to the potential development of new products and waste valorization processes in the growing natural essential oil extraction industry and in the citrus processing industry.

## ÍNDICE GENERAL

Introducción.....	1
1. Objetivos. ....	3
1.1    Objetivo general.....	3
1.2    Objetivos específicos.....	3
2. Justificación.....	4
3. Fundamento teórico.....	5
3.1    Generalidades del orégano mexicano ( <i>Lippia graveolens HBK</i> ).....	5
3.1.1    Composición del orégano mexicano ( <i>Lippia graveolens HKB</i> ). ....	6
3.1.2    Importancia comercial, usos y aplicaciones del orégano mexicano ( <i>Lippia graveolens</i> ). ....	7
3.1.3    Producción de aceite esencial y residuos generados. ....	8
3.2    Características generales del limón mexicano ( <i>Citrus aurantifolia</i> ). ....	9
3.2.1    Composición del limón mexicano ( <i>Citrus Aurantifolia</i> ).....	10
3.3    Origen, estructura y distribución de los polifenoles. ....	11
3.3.1    Características generales de los flavonoides. ....	12
3.3.2    Clasificación de los flavonoides. ....	13
3.3.3    Generalidades de pinocembrina.....	15
3.3.4    Generalidades de hesperidina. ....	16
3.4    Ciclodextrinas. ....	18
3.4.1    Antecedentes de la inclusión molecular con ciclodextrinas. ....	19
4. Materiales y métodos. ....	23
4.1    Materia prima.....	23
4.2    Reactivos y estándares. ....	23
4.3    Extracción de aceite esencial del orégano mexicano ( <i>L. graveolens HBK</i> ) por arrastre de vapor de agua. ....	23
4.4    Obtención del extracto hidroetanólico de los residuos sólidos generados en la extracción de aceite esencial de orégano mexicano ( <i>L. graveolens HBK</i> ).....	24
4.5    Métodos separativos de los extractos concentrados de orégano mexicano. ....	24
4.5.1    Fraccionamiento por purificador automatizado Isolera, Biotage. ....	24
4.5.2    Fraccionamiento por columna cromatográfica y silica gel.....	24

4.6	Identificación de los flavonoides presentes en las fracciones por cromatografía en Capa Fina (TLC).....	25
4.7	Encapsulación de flavonoides por inclusión molecular con ciclodextrinas.....	25
4.7.1	Diseño experimental para optimización de la inclusión molecular de hesperidina. ....	26
4.7.2	Confirmación de la formación de los complejos de inclusión.....	27
4.8	Métodos analíticos. ....	27
4.8.1	Determinación de Fenoles Totales. ....	27
4.8.2	Capacidad Antioxidante por DPPH.....	27
4.8.3	Cuantificación de pinocembrina por densitometría.....	27
4.8.4	Cuantificación de hesperidina por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). 28	
4.8.5	Prueba de solubilidad. ....	28
5.	Resultados y discusiones.....	29
5.1	Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y pinocembrina de los extractos de orégano mexicano.....	29
5.2	Fraccionamiento de los extractos de orégano con purificador automatizado Isolera Biotage.....	30
5.2.1	Identificación de flavonoides presentes en las fracciones del extracto de orégano mexicano. ....	31
5.2.2	Identificación de flavonoides presentes en las fracciones del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. ....	33
5.3	Fraccionamiento del extracto de orégano sin aceite esencial por cromatografía en columna y silica gel. ....	36
5.4	Cuantificación de pinocembrina presente en las fracciones del extracto de orégano sin aceite esencial.....	37
5.5	Encapsulación de pinocembrina por inclusión molecular con ciclodextrinas. ....	39
5.5.1	Confirmación de los complejos de inclusión.....	39
5.5.1.1	Espectroscopia FT-IR de los complejos de inclusión pinocembrina- $\beta$ -ciclodextrina.....	39
5.5.2	Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y pinocembrina de los encapsulados.....	42
5.5.3	Determinación del porcentaje de solubilidad de los complejos de inclusión pinocembrina- $\beta$ -CD.....	44
5.5.4	Determinación de eficiencias de encapsulación por inclusión molecular. ....	45

5.5.5	Optimización del proceso de encapsulación de hesperidina por inclusión molecular con ciclodextrinas.....	47
5.5.6	Determinación de eficiencias de encapsulación por inclusión molecular de hesperidina- $\beta$ -CD. ....	55
5.5.7	Confirmación de los complejos de inclusión.....	58
5.5.8	Determinación del porcentaje de solubilidad de los complejos de inclusión hesperidina- $\beta$ -CD óptimos de acuerdo a la eficiencia de encapsulación. ....	62
6.	Conclusiones. ....	64
7.	Referencias bibliográficas. ....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de la especie <i>Lippia graveolens</i> HBK. A) Tallo vellosa con hojas ramificadas. B) Racimo de flores. C) Arbusto del orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> HBK.....	5
<b>Figura 2.</b> Morfología de la especie <i>Citrus aurantifolia</i> . A) Árbol de limón mexicano. B) Fruto con corte transversal. C) Fruto y flor.....	9
<b>Figura 3.</b> Anatomía del limón mexicano ( <i>Citrus aurantifolia</i> ).....	10
<b>Figura 4.</b> Estructura química básica del esqueleto flavonólico.....	12
<b>Figura 5.</b> Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides. Se señalan ejemplos de algunos compuestos que son característicos de cada grupo.....	15
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la pinocembrina (5,7-dihydroxiflavanona).....	15
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la hesperidina (hesperetina 7- O - $\beta$ -rutinosido).....	17
<b>Figura 8.</b> Dimensiones moleculares de las ciclodextrinas nativas $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ .....	18
<b>Figura 9.</b> Cromatograma obtenido en el fraccionamiento del extracto concentrado de orégano mexicano.....	30
<b>Figura 10.</b> Cromatograma obtenido en el fraccionamiento del extracto de orégano mexicano concentrado sin aceite esencial.....	31
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F254, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 13-fraccion 13. 14-fracción 14. 15-fraccion 15. 16-fracción 16.....	32
<b>Figura 12.</b> Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F254, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 17-fraccion 17. 18-fracción 18. 19-fraccion 19. 20-fracción 20. ....	32
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F <sub>254</sub> , fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de	



orégano mexicano. P-pinocebrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 21-fracción 21. 23-fracción 23. 24-fracción 24. 42-fracción 42.....33

**Figura 14.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocebrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-hispidulina. 14-fracción 14. 15-fracción 15. 16-fracción 16. 17-fracción 17.....34

**Figura 15.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocebrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-Hispidulina. 18-fracción 18. 19-fracción 19. 20-fracción 20. 21-fracción 21.....34

**Figura 16.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocebrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-Hispidulina. 23-fracción 23. 24-fracción 23. 24-fracción 24. 25-fracción 25. 26-fracción 26. 27-fracción 27. 28-fracción 28.....35

**Figura 17.** Columna cromatografía de silica gel y colector de fracciones automático.....36

**Figura 18.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracción rica en pinocebrina.....36

**Figura 19.** Curva de calibración de la densidad óptica generada por pinocebrina.....37

**Figura 20.** Espectros FT-IR de  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), mezcla física, muestra total, sólidos precipitados, sólidos sobrenadantes y fracción de pinocebrina seca. Se consideró una región en un rango de  $4000-500\text{ cm}^{-1}$ .....41

**Figura 21.** Actividad antioxidante (DPPH) de la fracción de pinocebrina sin encapsular y las diferentes muestras de pinocebrina- $\beta$ -CD (Total, precipitado y sobrenadante).....43

**Figura 22.** Gráficas de superficie de respuesta para los efectos de la relación flavonoide/CD (g Hes/g  $\beta$ -CD) y la temperatura de encapsulación en los diferentes modelos de acuerdo a la muestra (A, total; B, Precipitado; C, sobrenadante).....51

**Figura 23.** Espectros FT-IR de  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), hesperidina, mezcla física y muestra total (3) 40°C. Se consideró una región en un rango de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  .....59

**Figura 24.** Espectros FT-IR de  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), hesperidina, mezcla física y muestra precipitado (3) 40°C. Se consideró una región en un rango de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  .....60

**Figura 25.** Espectros FT-IR de  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), hesperidina, mezcla física y muestra sobrenadante (1) 50°C. Se consideró una región en un rango de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  .....61

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Aplicaciones de ciclodextrinas (CDs) en otros compuestos para la mejora de sus propiedades limitantes.....	1
<b>Cuadro 2.</b> Diseño experimental aplicado para la optimización de la inclusión molecular del flavonoide hesperidina con $\beta$ -ciclodextrina, aplicado al encapsulado total, precipitado y sobrenadante.....	26
<b>Cuadro 3.</b> Determinación de fenoles totales y actividad antioxidante (DPPH) de diferentes extractos de orégano mexicano.....	29
<b>Cuadro 4.</b> Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 13, 14, 15 y 16. ....	32
<b>Cuadro 5.</b> Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 17, 18, 19 y 20.....	32
<b>Cuadro 6.</b> Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 21, 23, 24 y 42.....	33
<b>Cuadro 7.</b> Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 14, 15, 16 y 17.....	34
<b>Cuadro 8.</b> Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones 18, 19, 20, 21 y 22.....	34
<b>Cuadro 9.</b> Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones 23, 24, 25, 26, 27 y 28.....	35
<b>Cuadro 10.</b> Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5.....	36
<b>Cuadro 11.</b> Fracciones del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial obtenidas mediante el equipo Isolera, Biotage.....	38
<b>Cuadro 12.</b> Fracción del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial obtenido con cromatografía en columna y sílica gel.....	38
<b>Cuadro 13.</b> Determinación de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y pinocembrina de las muestras de pinocembrina encapsuladas con $\beta$ -ciclodextrina.....	42
<b>Cuadro 14.</b> Determinación del porcentaje de solubilidad en agua de los diferentes complejos de inclusión de pinocembrina- $\beta$ -CD y su verificación por fenoles totales.....	44

<b>Cuadro 15.</b> Eficiencia de encapsulación de los complejos de inclusión de $\beta$ -CD-Pinocembrina en las diferentes partes de la muestra.....	45
<b>Cuadro 16.</b> Resultados experimentales obtenidos para la optimización del proceso de encapsulación de hesperidina en la muestra total por inclusión molecular con $\beta$ -CD.....	47
<b>Cuadro 17.</b> Resultados experimentales obtenidos para la optimización del proceso de encapsulación de hesperidina en la muestra precipitada por inclusión molecular con $\beta$ -CD.....	48
<b>Cuadro 18.</b> Resultados experimentales obtenidos para la optimización del proceso de encapsulación de hesperidina en la muestra sobrenadante por inclusión molecular con $\beta$ -CD.....	49
<b>Cuadro 19.</b> Términos y coeficientes de los modelos obtenidos en la optimización del proceso de encapsulación de hesperidina- $\beta$ -CD en las diferentes partes de la muestra.....	51
<b>Cuadro 20.</b> Condiciones de operación óptimas y porcentaje de desviación para las diferentes variables respuesta entre valores calculados y experimentales.....	53
<b>Cuadro 21.</b> Eficiencia de encapsulación de la muestras total de los complejos de inclusión $\beta$ -CD-Hesperidina.....	54
<b>Cuadro 22.</b> Eficiencia de encapsulación de las muestras precipitadas de los complejos de inclusión $\beta$ -CD-Hesperidina.....	56
<b>Cuadro 23.</b> Eficiencia de encapsulación de la muestras sobrenadante de los complejos de inclusión $\beta$ -CD-Hesperidina.....	57
<b>Cuadro 24.</b> Determinación del porcentaje de solubilidad en agua de los diferentes complejos de inclusión de hesperidina- $\beta$ -CD y su verificación por fenoles totales.....	62

### Abreviaturas.

mg.....	Miligramo.
g.....	Gramo.
Kg.....	Kilogramo.
μL.....	Microlitro.
mL.....	Mililitro.
L.....	Litro.
μm.....	Micrómetro.
mm.....	Milímetro.
mmHg.....	Milímetros de mercurio.
cm.....	Centímetro.
ppm.....	Parte por millón.
mM.....	Milimolar.
N.....	Normal.
rpm.....	Revoluciones por minuto.
nm.....	Nanómetro.
UV.....	Ultravioleta.
°C.....	Grados Celsius.
CD.....	Ciclodextrina.
MSR.....	Metodología de superficie de respuesta.
DPPH.....	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
GA.....	Ácido gálico.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	Carbonato de sodio.

## Introducción.

Los compuestos fitoquímicos son sustancias químicas presentes de manera natural en los alimentos de origen vegetal, éstos se definen como aquellos componentes no nutritivos o no esenciales de los alimentos pero que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos del organismo. Existen más de 2,000 fitoquímicos en vegetales que se agrupan en clases de acuerdo con su función y sus características estructurales, tal es el caso de los terpenos, alcaloides, componentes nitrogenados y compuestos fenólicos. Entre estos últimos se encuentran los flavonoides, los cuales constituyen el grupo más importante dentro de los polifenoles vegetales debido a que son considerados micronutrientes en la dieta animal, abundan en la naturaleza y aportan gran parte del sabor y color a los vegetales (Cartaya y col., 2001), por lo que tienen un importante y significativo valor medicinal, alimentario y económico.

Los flavonoides son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos, dentro de los cuales las flavanonas, flavonas y flavonoles están principalmente presentes en cítricos y plantas medicinales (Martínez, 2002), aunque las flavanonas se han encontrado en mayor concentración en estas matrices en relación con las flavonas y los flavonoles. Algunas flavanonas representan un especial interés desde el punto de vista alimentario y farmacéutico, como lo es el caso de la hesperidina presente en la cáscara del limón mexicano y de la pinocembrina, encontrada en el orégano mexicano. Éstos compuestos presentan una gran importancia e interés debido a sus propiedades antialérgicas, anticancerígenas, antihipotensivas, antimicrobianas, vasodilatadoras, antiinflamatorias, antiproliferativas y antioxidantes (Widmer y col., 2015; Asensi y col., 2011). Adicionalmente, en el caso de la pinocembrina existen reportes sobre la presencia de actividad protectora contra isquemia cerebral (Chung y col., 2010). Los flavonoides tienen un alto potencial para ser utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria debido a sus numerosas propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas, sin embargo, su aplicación se ve restringida ya que se caracterizan por presentar solubilidad limitada en medios acuosos, una biodisponibilidad pobre y baja estabilidad sobre factores externos como la temperatura, el pH y la luz (Brglez y col., 2016). Con el fin de aprovechar sus características funcionales y preservar la integridad estructural de estas moléculas bioactivas, es necesario protegerlas sin afectar sus propiedades biológicas. A este respecto, diversos autores han estudiado las ciclodextrinas como medio de encapsulación. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos capaces de formar complejos de inclusión debido a su cavidad hidrófoba y su exterior hidrófilo, actuando como receptores versátiles para distintos sustratos (Sánchez, 2017). Actualmente se han reportado estudios que indican el favorecimiento de la solubilidad y biodisponibilidad en sistemas biológicos de las moléculas bioactivas (molécula huésped) al ser encapsuladas con ciclodextrinas (CDs), siendo así la inclusión molecular con CDs una opción prometedora para la estabilización de este tipo de compuestos flavonoides (pinocembrina y hesperidina). Con el objetivo de poder generar productos flavonoides naturales con alta estabilidad y solubilidad,

es importante evaluar la eficiencia de la inclusión molecular con ciclodextrinas, como alternativa tecnológica enfocada hacia el aprovechamiento de compuestos flavonoides provenientes de materias primas de amplia disponibilidad como lo son los residuos de productos cítricos y del orégano mexicano.

## **1. Objetivos.**

### **1.1 Objetivo general.**

Valorizar los residuos agroindustriales del orégano mexicano y limón mexicano como fuente de sustancias flavonoides (pinocembrina y hesperidina) mediante la generación de productos de potencial interés para la industria alimentaria y farmacéutica.

### **1.2 Objetivos específicos.**

1. Extraer y purificar flavonoides a partir de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK).
2. Enriquecer extractos hidroetanólicos de orégano mexicano para concentración de pinocembrina mediante columnas de fraccionamiento polar y no polar.
3. Evaluar rendimientos de encapsulación de fracciones enriquecidas en pinocembrina utilizando  $\beta$ -ciclodextrina como medio encapsulante.
4. Determinar y evaluar las condiciones de proceso para la formación de complejos de hesperidina mediante inclusión molecular con  $\beta$ -ciclodextrina para favorecer su solubilidad en medios acuosos.



## 2. Justificación.

El orégano mexicano representa una materia prima con un gran valor potencial por su composición en metabolitos secundarios biológicamente activos, el cual tiene la presencia de pinocembrina, flavanona con propiedades importantes para la salud, dentro de las cuales se reporta la presencia de actividad protectora contra isquemia cerebral (Chung y col., 2010). México ocupa el segundo lugar como productor mundial de orégano con la especie *L. graveolens* y su mayor importancia comercial se debe al contenido del aceite esencial derivado de la hoja de esta planta, considerado de excelente calidad en el mercado internacional por su alta concentración de timol y carvacrol (Mastelić y col., 2008). Sin embargo, cuando se realiza la extracción del aceite esencial a partir de las hojas de orégano se genera una gran cantidad de subproducto, residuo al que se le conoce como “bagazo” formado por las hojas que quedan después de la extracción, este residuo es rico en compuestos bioactivos como flavonoides, con actividad antioxidante y antimicrobiana (Corral, 2011; Rolando, 2007), y de acuerdo a SEMARNAT (2001) este subproducto constituye aproximadamente el 95 % en peso seco de su peso inicial.

Del mismo modo, el cultivo de los cítricos genera en la actualidad importantes ingresos en México y otros países, ya que constituyen el principal producto frutícola a nivel mundial (Vélez y col., 2012). El aprovechamiento industrial de los cítricos se ha convertido en una actividad intensiva en donde participan empresas dedicadas a toda la cadena productiva (productores, procesadoras, centros de distribución y exportadores), produciendo jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco, sin embargo, a medida que la producción crece, aumenta también la generación de residuos sólidos como lo es la cáscara, la cual representa alrededor del 45 % del fruto, se estima que se tienen alrededor de 900,000 toneladas de cáscaras de cítricos de las cuales 13,000 toneladas son de limón mexicano (Castillo y col., 2010). Este subproducto puede ser útil en otras actividades industriales ya que es rico en compuestos bioactivos, como lo son los flavonoides: en el caso de la cáscara del limón mexicano el flavonoide más abundante es la hesperidina (Nogata y col., 2006), al cual se ha reportado tener propiedades antioxidantes, antialérgicas, anticancerígenas, antimicrobianas, entre otras, sin embargo, no se aprovechan eficientemente por el desconocimiento de su amplio potencial.

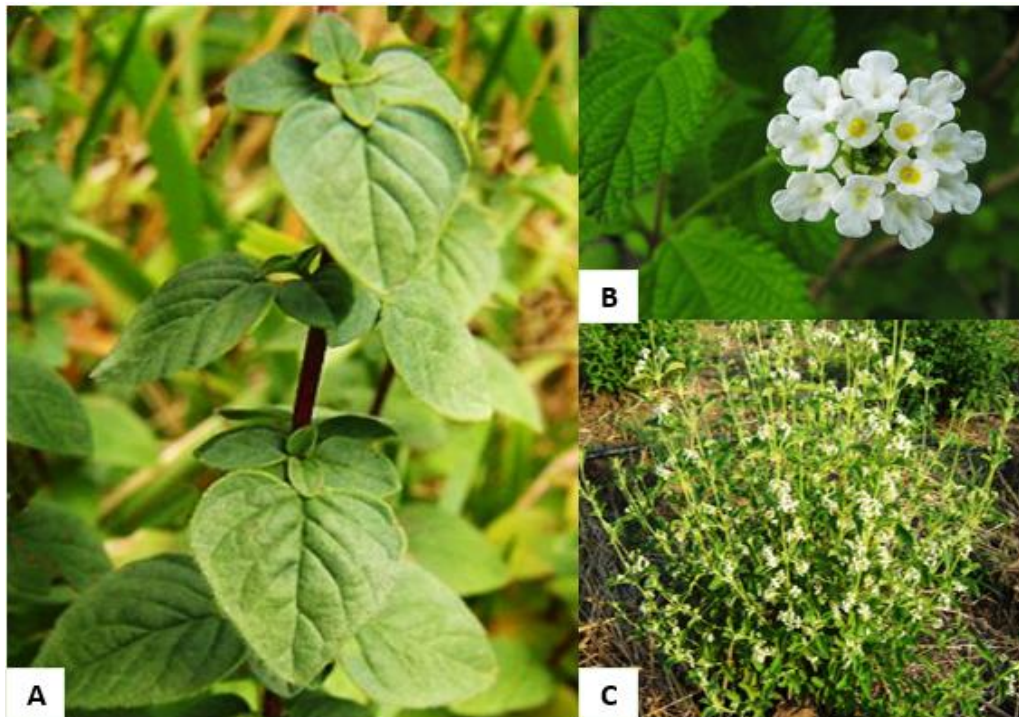
Una alternativa del aprovechamiento integral de estos subproductos es como materia prima para la extracción de flavonoides (aglicona, glicosilada), los cuales por sus múltiples propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas son insumos potenciales para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria; no obstante, dichos compuestos se caracterizan por su baja solubilidad y estabilidad generando un bajo aprovechamiento y poca biodisponibilidad en sistemas biológicos. Una estrategia eficaz para superar estas limitaciones es la inclusión molecular con ciclodextrinas, estrategia tendencia en la encapsulación de bioactivos que brinda productos con una mejora en su solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad sin afectar negativamente sus estructuras y actividades biológicas (Danieli y col., 1994; Sánchez., 2017), además, el resultado será potencialmente útil para poder generar un mejor aprovechamiento biológico e industrial y así dar valor agregado a estos importantes compuestos.

### 3. Fundamento teórico.

#### 3.1 Generalidades del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK).

El orégano (*Origanum vulgare*) es una planta herbácea, perenne y aromática que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Taxonómicamente tiene representantes en cuatro familias: Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae y Verbenaceae, siendo las dos últimas las más reconocidas (Huerta, 1997; Kintzios, 2002). Las especies de mayor importancia económica son el orégano griego (*Origanum vulgare Hirtum*), español (*Coridohymus capitatus*), turco (*Origanum onites*) y el mexicano (*Lippia graveolens* HBK) (Oliveira y col., 2007).

El orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) se distribuye en los climas semiáridos de México y de América Central (Mata y col., 2005), es una especie arbustiva caducifolia (que tira sus hojas al no haber humedad en el suelo), perteneciente a la familia Verbenaceae. La planta de orégano llega a alcanzar hasta 2 metros de altura y 1 metro de diámetro de cobertura foliar, es muy ramificada, con un crecimiento relativamente rápido y un ciclo de vida entre cinco y diez años, siendo resistente a la sequía (Mata y col., 2005).



**Figura 1.** Morfología de la especie *Lippia graveolens* HBK. A) Tallo vellosos con hojas ramificadas. B) Racimo de flores. C) Arbusto del orégano mexicano *Lippia graveolens* HBK (Fuente: Lizama, 2020).

La floración comienza unas siete semanas después del inicio de la formación del follaje, esta planta tiene la característica de auto polinizarse. Además, *Lippia graveolens* desarrolla frutos en forma de cápsulas secas donde se encuentran las semillas las cuales empiezan a formarse de dos a tres semanas después del inicio de la floración. El tiempo de maduración se va

observando por el cambio de color de verde a amarillento y por la caída de las hojas, este periodo varía de acuerdo con la zona geográfica, aunque de manera general ocurre entre octubre y noviembre, tiempo recomendable para colectar la semilla. Las semillas son de color café, de forma ovoide y de tamaño menor a 0.5 milímetros. Se ha estimado que en un kilogramo existen alrededor de 2'100,000 semillas. Bajo condiciones óptimas de humedad y de temperatura (15 a 20°C), la semilla germina después de una semana (CONAFORT, 2008).

### 3.1.1 Composición del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HKB).

La composición y concentración de todos los compuestos y metabolitos secundarios presentes en las plantas dependen de su genotipo, factores climáticos, altitud, tiempo de cosecha y estado de crecimiento (Pereira y col., 2016). Se ha reportado que el orégano contiene algunos macronutrientes como proteína, lípidos, carbohidratos y cenizas, además de minerales entre los que se encuentran el calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, zinc, cobre, manganeso y selenio (García y col., 2012). Sin embargo, el potencial biológico del orégano mexicano está relacionado con compuestos conocidos como metabolitos secundarios o fitoquímicos (Odhiambo y col., 2014). Asimismo, las propiedades terapéuticas y farmacológicas de estas plantas, así como el potencial antioxidante biológico, se atribuyen a estas moléculas. Entre los compuestos fitoquímicos que presenta el orégano mexicano pueden clasificarse en: compuestos volátiles y fenólicos.

Los compuestos volátiles son los principales responsables de las características sensoriales presentes en el orégano, dado que su concentración modifica el olor y el sabor de las hojas. En el género *Lippia*, la fracción de aceite esencial representa los compuestos volátiles, Machado y col., (2010) determinaron que la composición del aceite esencial de *L. graveolens* H. B. K. contiene monoterpenos, sesquiterpenos, entre otros componentes (Wagner y col., 2003). Si bien el timol y el carvacrol son los compuestos más abundantes y económicamente importantes en los aceites esenciales de *L. graveolens*, existen otros compuestos que son significativos, como el  $\beta$ -cariofileno, el p-cimeno, el  $\alpha$ -humeleno, el óxido de cariofileno, el 1,8-Cineol,  $\gamma$ -terpineno y otros (Arias y col., 2020).

Los fenólicos son los compuestos bioactivos más relevantes presentes en *L. graveolens*. Recientemente, Cortés y col., (2021) han reportado que el orégano mexicano contiene diversos compuestos fenólicos como flavonoides, triterpenos, saponinas, quinonas y taninos, estos últimos en altas concentraciones. Mediante ensayos cromatográficos de extractos de orégano mexicano también se identificaron 62 compuestos fenólicos, siendo cuantificados los principales como: taxifolina, apigenina 7-O-glucósido, florizina, eriodictiol, quercetina, naringenina, hispidulina, pinocembrina, galangina y genkwanina.

Su importante contenido de compuestos antioxidantes no volátiles destaca al orégano mexicano como una materia de uso potencial para las industrias farmacéuticas y alimentaria debido a sus diversas propiedades con aplicaciones biotecnológicas (Saxena y col., 2014). De este modo, la presencia y caracterización de fitoquímicos en plantas aromáticas y especias estimulan el uso y comercialización de productos con mayor valor agregado.

### 3.1.2 Importancia comercial, usos y aplicaciones del orégano mexicano (*Lippia graveolens*).

El orégano es una planta de distribución mundial, el cual está representado principalmente por dos especies: *Origanum vulgare* (Lamiaceae) nativo de Europa, y *L. graveolens* (Verbenaceae), originaria de América. Su importancia económica se debe a sus usos, no sólo como condimento de alimentos sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores, motivos que lo han convertido en un producto de exportación (Arcila y col., 2004). La producción global del orégano es estimada en alrededor de 15 000 toneladas, siendo Turquía el principal productor con exportaciones que superan las 10 000 toneladas anuales seguido de México, Grecia y otros países (Villavicencio y col., 2007; Koksál y col., 2010).

El mayor consumidor de orégano es Estados Unidos de América quien importa 6 mil toneladas anuales (Olivier, 1996). México cuenta con cerca de 40 especies conocidas de orégano, siendo algunas de ellas endémicas, las cuales se distribuyen en varios estados de la República Mexicana. La principal especie comercial producida en México pertenece al género *Lippia*, siendo los principales estados productores: Chihuahua, Durango, Tamaulipas, Coahuila, Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y Baja California Sur (Villavicencio y col., 2007). Por ejemplo, 90 % de la producción de *L. graveolens* en Coahuila se obtiene de zonas silvestres y de este volumen, 80 % de hoja seca es exportada. La producción anual se encuentra alrededor de 3 000 toneladas de las cuales 2 000 son exportadas a Estados Unidos de América. Las exportaciones del orégano mexicano están destinadas también al Reino Unido, Alemania, Francia y Canadá (CONAFOR, 2009).

El orégano es una planta aromática cultivada en varias regiones, cuyo valor comercial se debe a sus características como especia, condimento y propiedades medicinales (Koksál y col., 2010). Se usa ampliamente en platos mexicanos y norteamericanos, en la elaboración de alimentos como, salsas, bebidas alcohólicas, productos horneados, carnes y productos cárnicos, condimentos, productos lácteos, vegetales procesados y bocadillos (Leung y col., 1996). Se sabe que esta planta tiene la capacidad de conservar y realzar naturalmente el sabor de los alimentos, por lo tanto, su importante contenido de compuestos antioxidantes no volátiles destaca al orégano mexicano como un posible aditivo alimentario. Cabe mencionar que a nivel regional, los productores suelen vender las hojas recolectadas sin aportar ningún valor añadido (Cano y col., 2012). Industrialmente, el principal producto del orégano mexicano es el aceite esencial, que ha sido ampliamente estudiado y caracterizado (Soto y col., 2013), el cual se emplea como fragancia en jabones, perfumes, cosméticos, saborizantes, entre otros productos (Koksál y col., 2010), permitiendo resaltar y fijar aromas, además, en estudios recientes se ha demostrado presentar actividad biológica (contra hongos, bacterias, insectos y virus), antioxidante y desinfectante; también se emplea en la medicina tradicional como antiespasmódico, motivo por el cual se han convertido en un producto de exportación. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud estima que cerca del 80 % de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos, por ejemplo, los terpenoides, para sus cuidados primarios de salud (Dafarera y col., 2000).

### 3.1.3 Producción de aceite esencial y residuos generados.

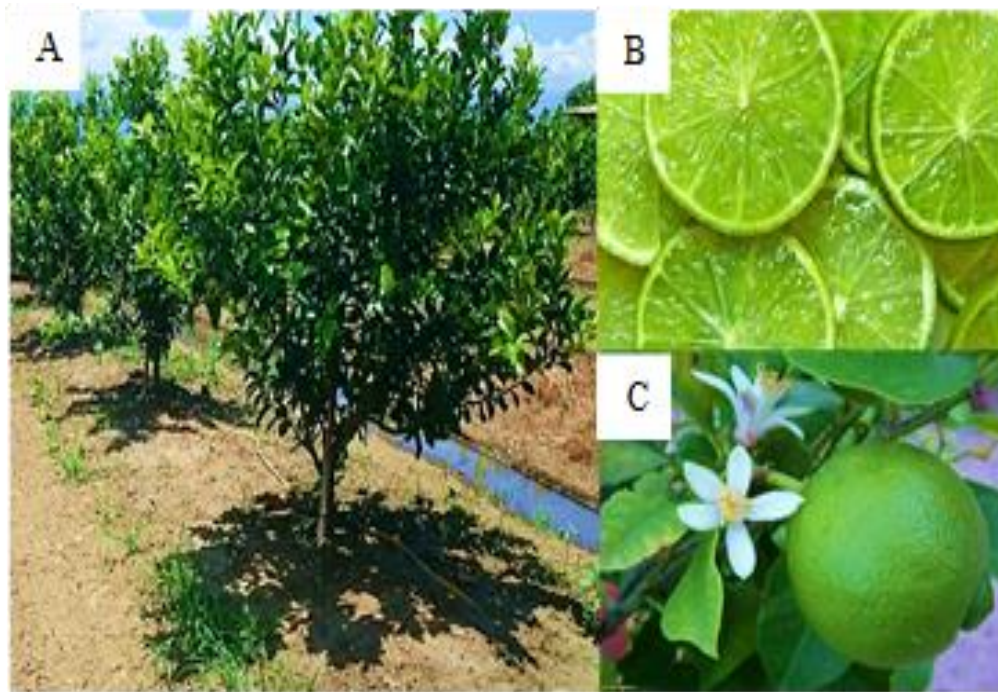
El orégano mexicano (*L. graveolens*) es un recurso forestal no maderable de gran importancia económica. Su valor comercial radica principalmente en el contenido del aceite esencial derivado de la hoja de esta planta, considerado de excelente calidad en el mercado internacional por su alta concentración de timol y carvacrol (Mastelić y col., 2008). El aceite esencial de orégano se extrae principalmente en empresas estadounidenses y europeas que lo comercializan a nivel mundial, con un costo de 170 dólares promedio para el año 2002 (CONAFOR, 2005), utilizándose en la industria alimenticia como inhibidor de crecimiento de hongos contaminantes y bacterias patógenas relacionadas con los alimentos (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *Salmonella sp.*). En alimentos procesados se emplea como antioxidante para la elaboración de embutidos y para conservar alimentos como el salmón, atún y sardinas; en la industria refresquera y licorera el aceite esencial de esta planta se utiliza como fijador y saborizante. También es utilizado en la fabricación de aceite para aeronáutica, limpieza de piezas automotrices y en la elaboración de veladoras, además, se usa como esencia y fijador de olor de perfumes de marcas comerciales reconocidas, así como en la manufactura de jabones y productos de aromaterapia (SEMARNAT, 2015). En la actualidad, existe evidencia que establece que los aceites esenciales de orégano podrían ejercer efectos positivos sobre la salud humana por sus múltiples propiedades (Islam y col., 2016).

Para la extracción del aceite esencial del orégano mexicano (*L. graveolens*), el método más conveniente es el de destilación por arrastre de vapor de agua (Torres y col., 1992), del cual se obtiene un rendimiento que se encuentra entre 2 a 6 % de aceite esencial en orégano silvestre, esta variación se debe a la altitud del lugar, época de recolección, entre otros (Acevedo y col., 2013). Sin embargo, cuando se realiza la extracción del aceite esencial a partir de las hojas de orégano se genera una gran cantidad de subproducto, residuo al que se le conoce como “bagazo” formado por las hojas que quedan después de la extracción, este residuo es rico en compuestos bioactivos como flavonoides con actividad antioxidante y antimicrobiana (Corral, 2011; Rolando, 2007), y de acuerdo a SEMARNAT (2001) este constituye aproximadamente el 95 % en peso seco de su peso inicial. En la industria del orégano el producto de comercialización es el aceite esencial, y el bagazo es considerado un desecho (Rolando, 2007) este residuo es mínimamente utilizado como materia de fermentación y compostaje, el resto comúnmente se queman a cielo abierto, se dejan en campo o se depositan en sitios no regulados, debido al gran volumen residual esto presenta problemas de contaminación ambiental potencialmente graves y alto costos de manejo. Por otro lado, actualmente ya se ha reportado que el material residual de *L. graveolens* puede ser una rica fuente de compuestos bioactivos que podrían valorizarse para incrementar los ingresos económicos de los agricultores mexicanos (Cid y col., 2019; Arias y col., 2020).

### 3.2 Características generales del limón mexicano (*Citrus aurantifolia*).

Se considera que la especie que dio origen al limonero proviene del continente asiático, donde posteriormente fue introducido por los árabes al norte de África y al continente Europeo (principalmente a España). De tal modo que, a partir de la colonización española, fue introducido a México llegando a ocupar un lugar importante a nivel nacional en la citricultura nacional (Eckert y Eask, 1989; Dussel, 2002), principalmente en las costas del Pacífico Mexicano en los estados de Colima, Michoacán, Oaxaca y Guerrero, con presencia en Jalisco y Nayarit.

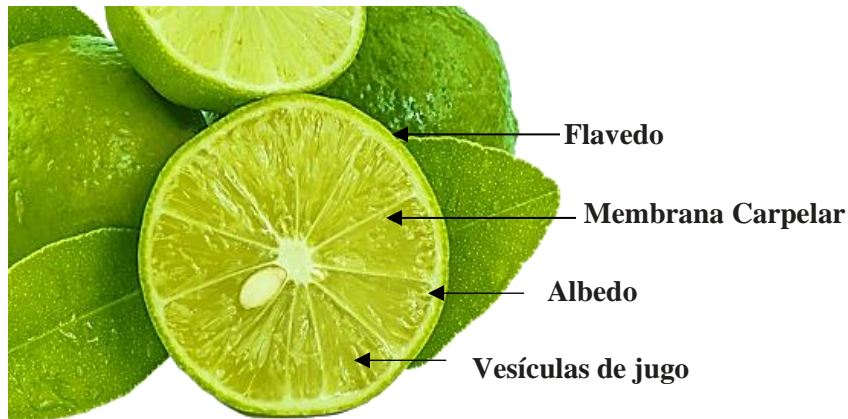
El limonero es un árbol o arbusto pequeño, que pocas veces sobrepasan los 4 metros de altura, pertenece la familia de Rutáceas, al género *Citrus* y a la especie *Citrus aurantifolia* (Dussel, 2002). Los árboles que pertenecen al género *Citrus aurantifolia* se caracterizan por tener tronco leñoso con una corteza verde amarillenta y ramas delgadas con espinas cortas, hojas pequeñas y aromáticas, redondas en la base y de color verde pálido. Presenta flores blancas pediceladas, provenientes de la axila foliar y a su fruto se le llama limón. El limón mexicano, es un fruto hesperidio pequeño y redondo-oval, con una leve protuberancia en la extremidad, no mide más de 6 cm de diámetro, su cáscara (flavedo) es fina y verde (amarilla en su madurez) rica en glándulas oleíferas, el interior (albedo) es blanco, amargo y esponjoso; tienen abundantes semilla, con pulpa jugosa y muy ácida dividida en 9-12 gajos (carpelos) (SAGARPA, 2016).



**Figura 2.** Morfología de la especie *Citrus aurantifolia*. A) Árbol de limón mexicano. B) Fruto con corte transversal. C) Fruto y flor (Fuente: Dussel, 2002).

### 3.2.1 Composición del limón mexicano (*Citrus Aurantifolia*).

El limón es una de las frutas que mayor uso tiene, incluyendo el culinario, en bebidas, industrial y medicinal, esto se debe a su rico sabor y la fuente importante de nutrientes que éste representa.



**Figura 3.** Anatomía del limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) (Fuente: Martínez, y col., 2008).

Se ha investigado la composición de cada una de las partes del limón mexicano donde han destacado compuestos importantes para la nutrición, medicina e industria, cada parte se representan esquemáticamente en la Figura 3. Las vesículas de jugo, ubicadas en el endocarpio, contienen el jugo, que constituye aproximadamente el 50 % del peso total de una naranja típica. La cáscara está formada por el flavedo (epicarpio y mesocarpio externo) y el albedo (mesocarpio interno). Flavedo y albedo representan, respectivamente, alrededor del 10 y 25 % de la fruta entera. El flavedo es rico en glándulas oleíferas de las cuales se extraen los aceites esenciales (principalmente d-limoneno), contiene pigmentos principalmente clorofilas y carotenos (Dussel, 2002). El albedo y la membrana carpelar generalmente es rico en celulosa, hemicelulosa, lignina y sustancias pécticas; Además, se sabe que en el flavedo y el albedo se encuentran compuestos fitoquímicos pertenecientes a los flavonoides, tal es el caso de las flavonas de las cuales se producen principalmente como O-glicosilada y las flavanonas, siendo éstos derivados de naringenina, eriodictiol, hesperidina, eriocitrina, ácidos caféico y ferúlico, que son potentes antioxidantes e inhiben la actividad carcinogénica, entre otros compuestos (Tomas, 2014). La mayoría de los azúcares, el ácido cítrico del fruto y el ácido málico (responsables del sabor ácido de este alimento) se encuentran en el jugo que poseen las vesículas; algunos estudios han indicado que estos ácidos potencian la acción de la vitamina C y poseen un notable efecto antiséptico. Las vesículas de jugo también contienen una importante cantidad de fibra, compuestos nitrogenados, lípidos y diversas sustancias inorgánicas (Loussert, 1992). La mayor parte de la fruta (casi el 90 %) es agua. Por otra parte, los minerales, aminoácidos, compuestos aromáticos y pectinas están presentes en menor proporción. Estos porcentajes varían mucho dependiendo de la variedad, madurez, área y prácticas de cultivo.

### 3.3 Origen, estructura y distribución de los polifenoles.

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas las cuales los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales, otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Quiñones y col., 2002).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias (Quiñones y col., 2002):

1. La ruta del ácido siquímico. Proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). Esta ruta es dependiente de la luz e inicia en los plastos por condensación de dos productos fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fofato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. Tras diversas modificaciones, se obtiene el ácido siquímico, del que derivan directamente algunos fenoles. La vía del ácido siquímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido r-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa, transforma el ácido  $\rho$ -cumárico en  $\rho$ -cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal.
2. La ruta de los poliacetatos. Proporciona las quinonas y las xantonas. Comienza a partir de una molécula inicial de acetyl CoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas.

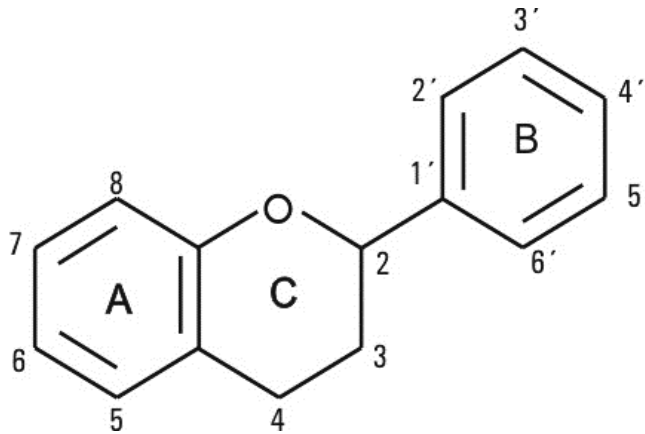
Por otro lado, se encuentran las rutas mixtas, las cuales combinan precursores tanto de la vía del ácido siquímico como de la ruta de los poliacetatos. Este es el caso de un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides.



### 3.3.1 Características generales de los flavonoides.

Los flavonoides, nombre que deriva del latín "*flavus*", cuyo significado es "amarillo", son considerados metabolitos secundarios vegetales que, como otros principios activos vegetales, se originan mediante una ruta biosintética mixta y constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano ( $C_6-C_3-C_6$ ), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se numeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números primos para el anillo B. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos, y el anillo B junto con la unidad  $C_3$  proceden de la ruta del ácido siquímico (Quiñones y col., 2002).



**Figura 4.** Estructura química básica del esqueleto flavonólico.

Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre, llamados agliconas flavonoides. Además, se pueden presentar como sulfatos, dímeros o polímeros. Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), o como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono. De todas estas formas naturales, los O-glucósidos son los mayoritarios.

Los flavonoides desempeñan una variedad de actividades biológicas en plantas, animales y bacterias. En las plantas, se sabe desde hace mucho tiempo que los flavonoides se sintetizan en sitios particulares y son responsables del color y aroma de las flores, en las frutas para atraer a los polinizadores y en consecuencia, la dispersión de la fruta para ayudar a la germinación de semillas y esporas, así como al crecimiento y desarrollo de las plántulas. Los flavonoides funcionan como moléculas de señal, compuestos alopáticos, fitoalexinas, agentes desintoxicantes y compuestos defensivos antimicrobianos (Panche y col., 2016).

A los flavonoides también se les han atribuido efectos positivos en la salud humana y animal y el interés actual es la terapia de enfermedades y la quimio prevención. Actualmente existen alrededor de 6000 flavonoides que contribuyen a los pigmentos coloridos de frutas, hierbas,

vegetales y plantas medicinales. Los flavonoides están asociados con un amplio espectro de efectos que promueven la salud y son un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutraceuticas, farmaceuticas, medicinales, alimentarias y cosméticas (Panche y col., 2016). Esto se debe a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas unidas a su capacidad para modular las funciones enzimáticas celulares clave. También se sabe que son potentes inhibidores de varias enzimas, como la xantina oxidasa (XO), la ciclooxigenasa (COX), la lipoxigenasa y la fosfoinositido 3-quinasa (4-6).

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. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica; se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria) de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma). Por ello, como resultado de todas estas propiedades desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Martínez y col., 2002). Los flavonoides también se utilizan para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares, debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar. Algunos flavonoides pueden presentar actividad hepática protectora, antialérgica, antitrombótica, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas (Gasaly y col., 2020). Otra de las propiedades de los flavonoides es su capacidad para contribuir a las propiedades de los alimentos, como el sabor o la dulzura. Son utilizados en la industria de los cosméticos por su actividad desodorante y reductora de la hiperpigmentación causada por la vejez.

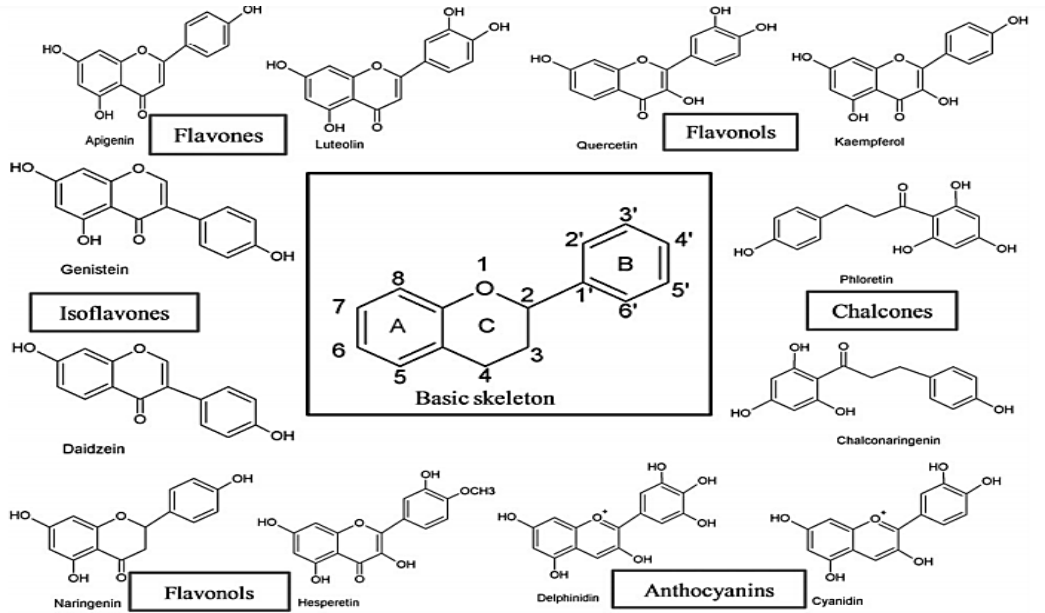
### **3.3.2 Clasificación de los flavonoides.**

Existen varios subgrupos de flavonoides. La clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son (Quiñones y col., 2002):

1. Flavonoles. Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C<sub>4</sub> y una insaturación entre los carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C<sub>3</sub>. Las principales fuentes de flavonoles son las verduras, frutas, té y el vino. La quercetina es el compuesto más representativo. La biosíntesis de flavonoles es un proceso

fotosintético, por ello, estos compuestos se localizan principalmente en el tejido externo y aéreo de la planta. La distribución y la concentración de los flavonoles puede ser distinta incluso en frutas procedentes de la misma planta, esto se debe a que la localización de los frutos y la exposición al sol.

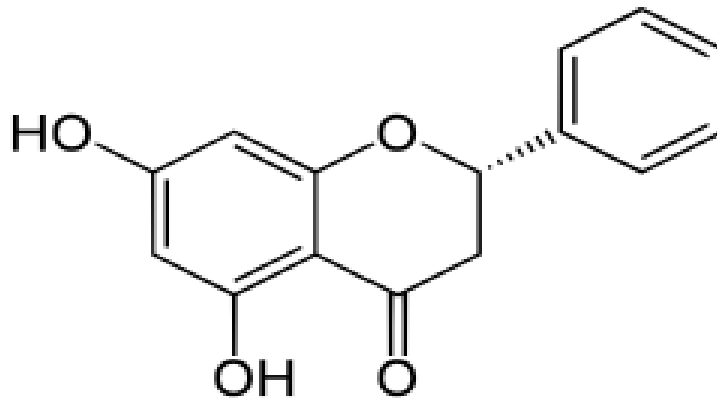
2. Flavonas. Poseen un grupo ceto en el carbono C<sub>4</sub> y una insaturación entre los carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>. Son los flavonoides menos abundantes en los alimentos. Perejil y apio representan la única fuente comestible de flavonas. La piel de las frutas también posee grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas.
3. Flavanonas (dihidroflavonas). Son análogos de las flavonas con el anillo C saturado. Se glucosilan principalmente por la unión de un disacárido en el carbono C<sub>7</sub>. Las flavanonas aparecen a altas concentraciones en cítricos, en tomates, y también se encuentran en ciertas plantas aromáticas como la menta. Las flavanonas se localizan mayoritariamente en las partes sólidas de la fruta, en particular en el albedo (membranas que separan los segmentos de las frutas). Por ello, su concentración es hasta cinco veces mayor en la fruta que en los zumos.
4. Isoflavonas. Poseen un anillo bencénico lateral en posición C<sub>3</sub>. Las isoflavonas poseen grupos hidroxilos en los carbonos C<sub>7</sub> y C<sub>4</sub>, al igual que sucede en la estructura molecular de la hormona estriol (uno de los tres estrógenos mayoritarios junto al estradiol y la estrona). Se pueden presentar como agliconas, o a menudo conjugadas con glucosa, pero son termosensibles y pueden hidrolizarse durante su procesamiento industrial y durante su conservación. Se presentan casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas.
5. Antocianidinas. Son compuestos hidrosolubles, y constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La glucosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A. También es posible la glucosilación de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B, aunque esta glucosilación aparece con menos frecuencia. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, en el vino tinto y en algunos vegetales, aunque aparecen mayoritariamente en las frutas.
6. Flavanoles. Poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C<sub>3</sub>. Pueden aparecer como monómeros o como polímeros con distintos grados de polimerización. A diferencia de otros grupos de flavonoides, sus combinaciones de tipo heterosídico (entre el grupo reductor del azúcar y un grupo tiol) son poco habituales. Los flavanoles más representativos en los alimentos pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí y como oligómeros (procianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados).



**Figura 5.** Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides. Se señalan ejemplos de algunos compuestos que son característicos de cada grupo.

### 3.3.3 Generalidades de pinocembrina

La pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona) es una flavonoide aglicona con un peso molecular de 256.25 g/mol. Es un compuesto natural que se encuentra en propóleos, frutas, verduras, nueces, semillas, hierbas, especias, tallos, flores, té y vino tinto (Jiang y col., 2004). Este compuesto puede ser aislado y purificado mediante diversas técnicas cromatográficas (Rasul y col., 2013).



**Figura 6.** Estructura química de la pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona).

Es uno de los fitoquímicos más importantes entre los flavonoides (Kumar y col., 2007), ya que es ampliamente utilizado en la medicina tradicional china. En la última década, varios estudios han demostrado sus notables efectos farmacológicos, ya que tiene un gran potencial para tratar las enfermedades neurodegenerativas como lo es la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson y otras disfunciones neuronales como la isquemia cerebral (Liu y

col., 2014), dando una amplia ventana de tiempo terapéutico, que puede atribuirse a sus efectos antiexcitotóxicos (Rasul y col., 2013), reduciendo así la mortalidad y mejorando la actividad farmacológica. Dada su importante eficacia en la isquemia cerebral, la pinocembrina ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de China (CFDA) como un nuevo fármaco de tratamiento para el accidente cerebrovascular isquémico y actualmente está en curso en ensayos clínicos de fase II (Shen y col., 2019).

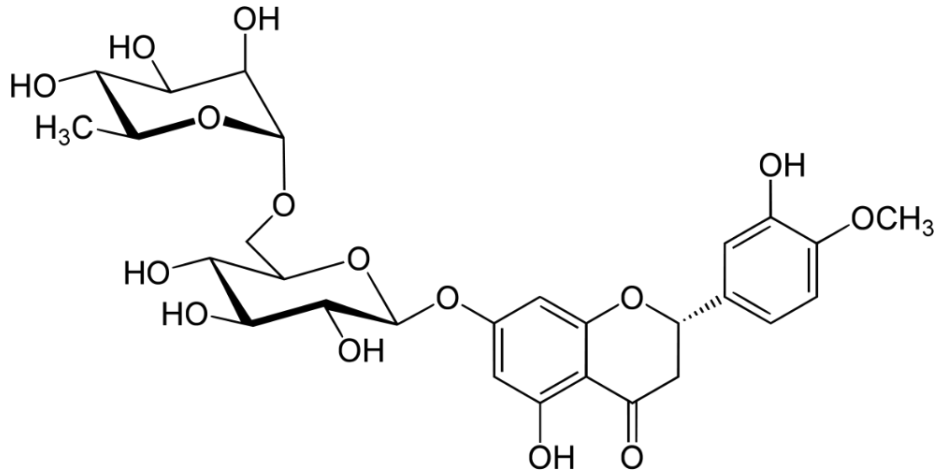
La pinocembrina también exhibe varias actividades biológicas interesantes, como antibacteriana, antioxidante, antifúngica, anti inflamatoria, antitumoral contra el melanoma tanto *in vitro* como *in vivo* (Zheng y col., 2018), vasodilatadoras y anti-fibrosis pulmonar. Tales hallazgos indican que es un compuesto prometedor para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas de acción múltiple. Además, la pinocembrina podría usarse como un anti alimentador natural para insectos y una nueva herramienta para proteger las plantas de insectos dañinos, especialmente en la agricultura orgánica (Napal y col., 2009).

Como se observa, la pinocembrina es un producto natural con un peso molecular pequeño y es un componente biológicamente activo, sin embargo, el uso de pinocembrina está muy limitado por su baja solubilidad en agua y biodisponibilidad (Zhou y col., 2014). Aunque se ha hecho un gran esfuerzo para mejorar dicha y estabilidad mediante la introducción de algunas técnicas de modificación biosintética o nanodispersión (Kalogeropoulos y col., 2009; Yan y col., 2005) las cuales brinden un enfoque útil para obtener nuevos productos para el cuidado de la salud a base de pinocembrina con alta solubilidad en agua, alta biodisponibilidad y baja toxicidad.

#### **3.3.4 Generalidades de hesperidina.**

La hesperidina (hesperetina 7- O - $\beta$ -rutinosido) es un bioflavonoide derivado de una hesperetina, formado por un disacárido (rutinosa) unido a una flavanona (hesperitina) a través de un enlace glicosídico, con un peso molecular de 610.6 g/mol; este compuesto fue descubierto por primera vez en 1827 por Lebreton (Fluckiger, 1986).

La hesperidina se produce a partir de la hidrólisis alcalina del ácido hespereténico y el floroglucinol, que durante la hidrólisis ácida se convierte en hesperetina, l-ramnosa y D-glucosa. Su actividad biológica se debe a la presencia de restos hidroxilo en los anillos heterocíclico y aromático. Además, existe una estrecha relación entre la presencia y el número de fracciones hidroxilo con la potencial capacidad antioxidante de la hesperidina (Garg y col., 2001).



**Figura 7.** Estructura química de la hesperidina (hesperetina 7- O - $\beta$ -rutinósido).

Este flavonoide naturalmente se encuentra en abundancia en el género *Citrus* (como naranjas, limones o toronjas), representa la molécula con mayor importancia dentro de este grupo y se encuentra en mayor cantidad en la cáscara de los cítricos, representando así un subproducto económico (Garg y col., 2001; Parhiz y col., 2015).

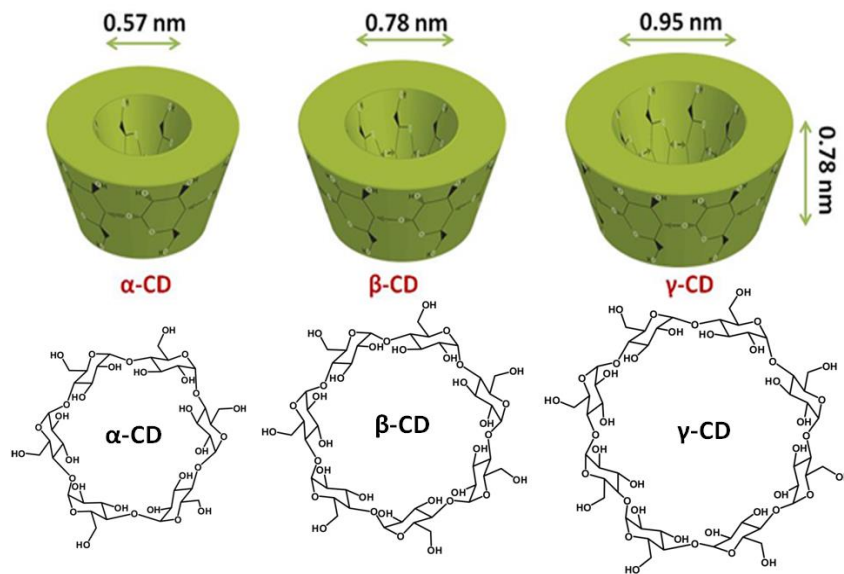
En la medicina herbal clásica la hesperidina es ampliamente utilizada y presenta un excelente perfil de seguridad. Se ha informado que poseen diversas actividades farmacológicas, incluidas cardioprotectoras (Agrawal y col., 2014), hepatoprotectoras (Tabeshpour y col., 2020), neuroprotectoras (Roohbakhsh y col., 2014), hipolipemiantes, anticancerígenos (Ferreira de Oliveira y col., 2020), antidiabético (Dhanya y col., 2020), antimicrobiano, antiinflamatorio y antioxidante (Parhiz y col., 2015). Estas actividades farmacológicas han reflejado directamente los potenciales terapéuticos de la hesperidina en el tratamiento de múltiples afecciones médicas, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus, la miocardiopatía diabética, la disfunción endotelial, la aterosclerosis y los trastornos neurodegenerativos (Mahmoud y col., 2019). Además, actualmente existen fragmentos de evidencia disponibles que apoyan el uso prometedor de la hesperidina en la profilaxis y el tratamiento de COVID 19 (Haggag y col., 2020).

Sin embargo, la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, como la hesperidina, parece ser algo limitada por su baja polaridad (Gonzales y col., 2015; Kay y col., 2017). Por lo que las tendencias actuales se dirigen hacia el desarrollo de estrategias de liberación controlada y mejora de la solubilidad para garantizar una entrega adecuada al sitio de acción y un mejor aprovechamiento de las propiedades bioactivas que estas moléculas presentan.

### 3.4 Ciclodextrinas.

La inclusión molecular es un proceso de encapsulación que ha sido aplicado recientemente, siendo las ciclodextrinas (CDs) el agente principal de encapsulamiento. Las CD son uno de los complejos anfitrión-huésped más utilizados para moléculas orgánicas.

Representan una familia de oligosacáridos cíclicos y su estructura consiste en una disposición cíclica de unidades de D (+)-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Se pueden diferenciar según su número de glucosas en  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD (6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente) (Chaudhari y col., 2019). Estos productos se consideran naturales y resultantes de degradación del almidón degradado por la glucosiltransferasa (Garnero y col., 2018).



**Figura 8.** Dimensiones moleculares de las ciclodextrinas nativas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

Las ciclodextrinas presentan una forma tridimensional, con forma de cono y presentan diferentes polaridades en sus superficies interior y exterior, siendo el exterior una parte hidrofílica y a su vez el interior hidrofóbico (Franzini y col., 2018; Ho y col., 2017). Sus grupos hidroxilos primarios y secundarios se colocan en el borde estrecho y ancho, respectivamente. En este sentido los hidroxilos primarios pueden rotar y reducir el diámetro de la ciclodextrina mientras que los hidroxilos secundarios forman fuertes enlaces de hidrógeno y le dan rigidez a la ciclodextrina (Przybyla y col., 2020). Debido a esta estructura particular, las CDs pueden encapsular moléculas huésped que conducen a la creación de complejos de inclusión. La formación de complejos de inclusión de compuestos hidrofóbicos ocurre principalmente por interacciones hidrofóbicas entre las paredes de la cavidad de la ciclodextrina y las moléculas huésped. Además, otras fuerzas, como las interacciones dipolo-dipolo y van der Waals, pueden estar implicadas en la unión del huésped (Cheirsilp y col., 2016). Las CDs se pueden utilizar para incorporar moléculas no polares con una dimensión

adecuada en la cavidad aumentando su solubilidad en agua (Ho y col., 2017). Según Tian y col. (2020), esta encapsulación característica es muy útil para ser utilizada en diferentes industrias.

Una de las consideraciones principales que se toman en cuenta para llevar a cabo la inclusión molecular es el tamaño de la cavidad de la CD ya que éste está relacionado con el grado de ajuste, que es un parámetro crítico para lograr una incorporación óptima con las CDs. Por lo tanto, cada tipo de CDs tendrá diferentes tipos de cavidades. Las  $\alpha$ -CD poseen pequeñas cavidades, por lo que no son capaces de aceptar muchas moléculas. Las  $\gamma$ -CD son de mayor tamaño en comparación con la mayoría de las moléculas que pueden formar complejos. Adicionalmente, es recomendable considerar las cargas y momentos dipolo de las CDs, por ejemplo, CDs hidrofóbicas no pueden interactuar de manera eficiente para favorecer la formación de algunos complejos solubles. De manera general, se considera que el diámetro de la cavidad de las  $\beta$ -CD es el más apropiado para distintas moléculas (Menezes y col., 2019).

Según la literatura (Braga y col. 2021; Crumling y col., 2017), las ciclodextrinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD), son “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) por la FDA (Food and Drug Administration) por lo que se consideran compuestos valiosos que pueden aplicarse en diferentes campos industriales como el alimentario o farmacéutico, etc.

Según Matencio y col. (2020), las ciclodextrinas pueden presentar una gran cantidad de beneficios ya reportados y analizados en diferentes campos, y a veces interrelacionados, como la ciencia/tecnología/ingeniería de los alimentos, farmacéutica, ingeniería química, ciencias ambientales, entre otros campos, en donde emplean a las ciclodextrinas ya que presentan propiedades como: eliminación de sabores u olores indeseables, estabilización de condiciones bióticas o abióticas, control de reacciones químicas, alargamiento de la vida útil y formulación de productos. Del mismo modo el uso de CDs se ha incrementado significativamente durante las últimas décadas para mejorar y preservar los compuestos bioactivos inestables, favorecer la biodisponibilidad y liberación de estas moléculas con actividades bioactivas, entre otros beneficios (Ogunbadejo y col., 2021). De esta manera se observa que el enfoque de encapsulación que emplean las ciclodextrinas se usa ampliamente en distintos sectores y etapas de desarrollo.

### **3.4.1 Antecedentes de la inclusión molecular con ciclodextrinas.**

Las ciclodextrinas han sido reconocidas como una alternativa conveniente para solucionar los problemas encontrados en las propiedades de distintas moléculas a través de la formación de complejos de inclusión, en los que cada molécula huésped está rodeada por el entorno hidrofóbico de la cavidad CD. Estas son oligosacáridos cíclicos capaces de incluir total o, al menos parcialmente en su cavidad hidrofóbica, una gran cantidad de moléculas con estructuras diferentes. Este proceso de inclusión conduce a cambios en las propiedades fisicoquímicas del huésped como la solubilidad, la velocidad de disolución, la biodisponibilidad, entre otras. Las CDs se utilizan ampliamente en productos farmacéuticos, sistemas de administración de fármacos, cosméticos y en las industrias alimentaria y química. Se pueden encontrar en medicamentos disponibles comercialmente, incluidas tabletas, gotas para los ojos y ungüentos



(Cid y col., 2022) así como en la formulación de algunos alimentos. Su uso es exitoso en complejos de inclusión con compuestos bioactivos obtenidos de plantas en los cuales se incluyen polifenoles, alcaloides, polisacáridos, entre otros, dando lugar a extensas investigaciones en varias áreas de aplicación para tratar de superar las limitaciones que estas moléculas presentan y poder aprovechar de mejor manera sus importantes propiedades. A continuación, se muestran algunas investigaciones realizadas por distintos autores, enfocadas en la mejora de compuestos con propiedades bioactivas cuyo limitante principal de su uso era la baja solubilidad acuosa y biodisponibilidad.

Anwer y col. (2014) estudiaron el Diosmina (DIOS) un flavonoide con una fuerte actividad antioxidante, así como con otros efectos importantes en condiciones inflamatorias, cáncer y el tratamiento de úlceras, sin embargo, su solubilidad limita sus aplicaciones terapéuticas, por lo que desarrollaron una formulación hidrosoluble que permita una mejor disolución y absorción y en consecuencia, una mayor biodisponibilidad. Los complejos se obtuvieron por el método de amasado con una estequiometría de 1:1. La actividad antioxidante se midió por DPPH, obteniendo resultados muy interesantes en dicha prueba, ya que indicaron una mayor actividad antioxidante cuando DIOS se acomplejó con  $\beta$ -CD en comparación con DIOS puro. Esta actividad antioxidante mejorada del complejo DIOS- $\beta$ -CD probablemente se debió a una mayor solubilidad del complejo binario activo, lo que resultó en una mayor solubilidad, disolución y actividad antioxidante. Comportamiento similar fue reportado por Ho y col. (2017) quienes realizaron estudios con catequina, flavonoide cuyas aplicaciones potenciales están limitadas por su inestabilidad. Ellos realizaron complejos de inclusión con  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y CD-M $\beta$  para su aplicación en complementos alimenticios y para la salud. El complejo con  $\beta$ -CD se utilizó para la evaluación de la estabilidad, propiedades fisicoquímicas y antioxidantes, donde obtuvieron como resultado la mejora de solubilidad de la catequina y su estabilidad frente a la temperatura, la luz y el oxígeno también mejoró. La actividad antioxidante se midió por reducción de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) donde el complejo de inclusión resultó con una actividad antioxidante de 24 mg, mientras que la de la catequina sola era de 4.7 mg, lo que representa un aumento de aproximadamente tres veces mayor que la actividad del compuesto puro.

Así mismo, Tommasini y col. (2004) desarrollaron una investigación referente a la inclusión de dos flavanonas hesperetina y naringenina con el objetivo de aumentar su solubilidad y la tasa de disolución. En esta investigación empleó el método de coprecipitación con una temperatura de agitación de 30°C en una relación molar 1:1 con diferentes variaciones de pH, en donde obtuvieron como resultado la mejora de las propiedades indeseables de la hesperetina y la naringenina, como la solubilidad y, en consecuencia, aumentar la biodisponibilidad; pudieron observar que la complejación de los flavonoides mejora la disolución acuosa en diferente grado según las condiciones del medio. Por otra parte, en un estudio más reciente Wang y col. (2021) estudio las características de unión de cuatro tipos de CDs ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD y M- $\beta$ -CD) y ocho tipos de flavonoides (DMY, hesperitina, naringenina, quercetina, luteolina, Morin, Kaempferol y Daidzein) con el mismo objetivo de mejorar la solubilidad y estabilidad de los flavonoides. Realizaron la formación de complejos por el método de coprecipitación a una temperatura de 30°C y una relación molar de 1:1, donde tuvieron como

resultado la formación de los complejos con casi todas las CDs a excepción de  $\alpha$ -CD, la cual no permitió la inclusión de ningún flavonoide, lo impresionante fue que  $\beta$ -CD y M- $\beta$ -CD tienen un diámetro de cavidad favorable requerido para la unión estable con todos los flavonoides estudiados. Una vez formado el complejo de inclusión y con base en las pruebas realizadas, pudieron observar que los flavonoides con  $\beta$ -CD y M- $\beta$ -CD mejoraron su solubilidad en agua y formaron complejos más estables debido a la inclusión de los flavonoides en la cavidad hidrofóbica de las CDs a través de un extremo del anillo B, lo que tiene una contribución significativa a la formación de los enlaces de hidrógeno.

También se han desarrollado algunas investigaciones sobre la inclusión molecular de los flavonoides de interés como hesperidina y pinocembrina. Entre las cuales se encuentra Sánchez y col., (2017) quien estudió la hesperidina obtenida de cáscara de naranja con la finalidad de mejorar su solubilidad y aumentar su estabilidad en jugos suplementados con el flavonoide permitiendo tener jugos ricos en antioxidante natural sin afectar su palatabilidad, en dicha investigación emplearon  $\beta$ -CD,  $\alpha$ -CD y  $\gamma$ -CD en una relación molar 1:1. La formación de los complejos se llevó en agitación a 25°C, en donde obtuvieron como resultado un complejo estable a la luz, temperatura y pH, mejorando hasta 3 veces más su solubilidad comparada al compuesto sin encapsular. Por otro lado Du y col. (2019) realizaron la formación del complejo de inclusión de pinocembrina con dos CDs, dimetil- $\beta$ -ciclodextrina (DM- $\beta$ -CD) y trimetil- $\beta$ -ciclodextrina (TM- $\beta$ -CD), en las cuales se utilizó una relación molar de 1:1. Los resultados mostraron que la estabilidad y la solubilidad en agua de la pinocembrina mejoraron significativamente después de la formación de los complejos de inclusión, la capacidad de inclusión de pinocembrina y DM- $\beta$ -CD fue mejor que la de TM- $\beta$ -CD, debido a la cavidad que presenta la CD, lo cual al igual que Wang y col. (2021) demuestran la importancia de conocer la estructura de la molécula huésped y el diámetro de la CD.

Otros ejemplos de la aplicación de estos medios de inclusión para proteger varios compuestos y mejorar sus propiedades se pueden observar en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Aplicaciones de ciclodextrinas (CDs) en otros compuestos para la mejora de sus propiedades limitantes.

CD	Huésped	Actividad	Propiedades mejorada	Referencia
$\beta$ -CD	Cianidina-3-O-glucósido	Antioxidante, antiinflamatorio	Biodisponibilidad y protección térmica	(Fernandes y col., 2017)
$\beta$ -CD	<i>S. baicalensis</i> BA	Antiinflamatorio, antioxidante, antitumoral	Estabilidad térmica y oxidativa	(Hădăruga y col., 2016)
HP- $\beta$ -CD	Clavo de olor	Antioxidante	Evitar la degradación y pérdida de compuestos activos.	(Cetin y col., 2017)
HP- $\beta$ -CD	Cumestrol	Cicatrizante	Biodisponibilidad y solubilidad	(Bianchi y col., 2018)
$\beta$ -CD	$\beta$ -ácidos del lúpulo	Antimicrobiana	Aumento en la solubilidad	(Gu y col., 2020)

Como se observa en los antecedentes descritos anteriormente, las CDs se pueden aplicar en compuestos de gran variedad de productos y procesos de distintas industrias mejorando sus propiedades limitantes y por consecuencia se tiene mayor aprovechamiento de sus propiedades bioactivas. Sin embargo, actualmente el desarrollo de hospedantes bioactivos aún está en curso, ya que la formación de complejos suele ser específica por las propiedades estructurales que cada molécula huésped presenta, además, el desarrollo de estos procesos no buscan ser sólo simples y reproducibles, sino también económicamente rentables ya que es fundamental para que su aceptación generalizada esté garantizada en diversos campos como la producción de alimentos y medicamentos.

#### **4. Materiales y métodos.**

##### **4.1 Materia prima.**

El orégano mexicano (*L. graveolens* HBK) seleccionado es proveniente de la localidad de Huejuquilla, Jalisco, ubicada a una latitud de 22° 450´ N, una longitud de 103° 450´ O y a una altura de 1.450 metros sobre el nivel del mar; la muestra de orégano mexicano fue obtenida tras el proceso tradicional de vareo y secado al sol durante 3 días después del corte en etapa de floración al 10 %, manteniendo un contenido de humedad del 10 % w/w.

El flavonoide hesperidina, es extraído especies de cítricos (pureza  $\geq 80$  %) el cual se adquirió en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania).

##### **4.2 Reactivos y estándares.**

Los estándares flavonoides de galangina (99.3 %) y naringenina (99.4 %) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania); mientras que pinocembrina (99.8 %), hispidulina (98,9%) y taxifolina (99.1 %) se adquirieron de PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Alemania).

El reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico (GA) y di (phenyl)-(2, 4, 6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Otros reactivos y productos químicos son de grado reactivo analítico.

##### **4.3 Extracción de aceite esencial del orégano mexicano (*L. graveolens* HBK) por arrastre de vapor de agua.**

La extracción de aceite esencial del orégano mexicano se realizó con el método de hidrodestilación con arrastre de vapor (Hernández y col., 2008). Para extraer el aceite esencial, se realizó una limpieza separando el material inorgánico y orgánico que no pertenecía a la especie a trabajar como raíces, tallos y tierra; para trabajar se seleccionaron las hojas y las flores del orégano mexicano de las cuales se colocaron 50 g en un matraz balón de 1000 mL, posteriormente se añadieron 500 mL de agua destilada. Se montó el equipo de destilación cuyas partes incluyen un condensador vertical, controlador de presión y una trampa de decantación. La muestra se llevó a ebullición suave manteniendo un tiempo de extracción constante de 4 horas. Transcurrido el tiempo de destilación se suspendió el calentamiento, se midió y se recuperó el aceite esencial obtenido con ayuda de la trampa de decantación.

Finalmente, los residuos sólidos generados en la extracción de aceite esencial (bagazo de orégano) fueron filtrados utilizando papel filtro, se pesaron y se sometieron a un proceso de secado con temperatura de 40°C en una estufa (GL-70A - Fab, Nacional), colocando la muestra en charolas de aluminio previamente pesadas. La muestra fue retirada de la estufa hasta obtener un peso constante. Con los residuos sólidos secos (humedad 8-10 % w/w), se procedió a realizar un extracto hidroetanólico.

#### **4.4 Obtención del extracto hidroetanólico de los residuos sólidos generados en la extracción de aceite esencial de orégano mexicano (*L. graveolens* HBK).**

La obtención del extracto hidroetanólico, se realizó utilizando el método de maceración con agitación y temperatura controlada, optimizado por Flores y col. (2016). El sistema de operación contó con reflujo para evitar pérdidas por evaporación.

Los residuos sólidos (orégano mexicano sin aceite esencial) fueron sometidos a molienda y tamizado, con el propósito de obtener la granulometría deseada (0.423 mm) y así facilitar el proceso de extracción. La extracción se realizó en un matraz balón de 500 mL, con una relación soluto-solvente 1:20, siendo 7.5 g de orégano seco sin aceite esencial como material de extracción y como solvente 150 mL de etanol en agua al 58 %. El tiempo de extracción fue de 1 hora con temperatura y agitación controlada de 300 rpm. Una vez terminada esta operación, el extracto obtenido se filtró y concentró 10 volúmenes en un rotavapor vertical a vacío (IKA RV 10) con temperatura de 40-45°C y presión de 500 mmHg.

El proceso fue repetido utilizando como material de extracción orégano mexicano (*L. graveolens* HBK) sin tratamiento previo, es decir con aceite esencial.

#### **4.5 Métodos separativos de los extractos concentrados de orégano mexicano.**

##### **4.5.1 Fraccionamiento por purificador automatizado Isolera, Biotage.**

Posteriormente se realizó una purificación utilizando un sistema de extracción en fase sólida con ayuda de un purificador automatizado de laboratorio marca Isolera, Biotage, la corrida se realizó por duplicado. Se utilizó un cartucho SNAP Ultra C18 30 g, un bastidor de 16 x 100 mm y como solventes de la fase móvil se empleó: Solvente A (0.1 % ácido fórmico-agua) y solvente B (0.1 % ácido fórmico-acetonitrilo). El gradiente utilizado consistió en 5:24 min 5 % A, 3:00 min 5 % A, 9:00 min 5 % A, 9:00 min 100 % A, 3:00 min 100 % A, 3:00 min 5 % A; a un caudal de 25 mL/min y un volumen de inyección de ½ mL de extracto concentrado. La detección se realizó a longitudes de onda de 280 y 365 nm.

Al terminar la corrida, las fracciones obtenidas se sometieron a proceso de secado a una temperatura de 40°C en una estufa (GL-70A - Fab, Nacional), colocando las muestras en capsulas de cristal, hasta la evaporación total del solvente. Una vez evaporado el solvente, las fracciones secas se colocaron en tubos eppendorf y se almacenaron hasta su posterior análisis.

##### **4.5.2 Fraccionamiento por columna cromatográfica y silica gel.**

La separación por columna cromatográfica se realizó por duplicado utilizando una columna de 80 cm, empacada con 178 g de silica gel 60 A (malla 0.075-0.030 mm) previamente hidratada con acetonitrilo. El disolvente empleado como fase móvil fue acetonitrilo a distintas concentraciones (100, 90, 70, 50 %), donde la elución inicial fue con acetonitrilo al 100 %. Montada la columna cromatográfica se sembraron 8 mL de extracto concentrado (2 g de

extracto seco y 6 mL de etanol al 58 %). Las fracciones fueron captadas con un recolector de muestras automático conectado a la columna cromatográfica, este sistema contó con un flujo de 1 mL/min.

Al terminar el proceso de elución de la muestra, las fracciones obtenidas fueron secadas en una estufa (GL-70A - Fab, Nacional) a una temperatura de 40°C hasta la evaporación total del solvente. Una vez evaporado el solvente, las fracciones secas se colocaron en tubos eppendorf y se almacenaron hasta ser analizadas por cromatografía en Capa Fina (TLC) para la identificación de los flavonoides presentes.

#### **4.6 Identificación de los flavonoides presentes en las fracciones por cromatografía en Capa Fina (TLC).**

La identificación de los flavonoides presentes en las fracciones obtenidas en el proceso de purificación se realizó por cromatografía en capa fina usando una placa de aluminio TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> de 10 cm x 10 cm, como fase móvil se utilizó tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v). Se aplicaron estándares como pinocembrina, naringenina, hispidulina, galangina y taxifolina a una concentración de 1000 ppm, para determinar el factor de retención (Rf) el cual se define como la distancia que recorre un compuesto dividida entre la distancia total recorrida por la fase móvil. Los extractos y las fracciones secas fueron re suspendidas utilizando 2 mL de etanol al 58 %, se sembraron en la placa sobre la línea de origen trazada a 0.7 cm del borde inferior, colocando 1 aplicación del extracto concentrado y 5 aplicaciones de las fracciones; posteriormente la placa se colocó en la cámara cromatográfica la cual contenía un volumen de 20 mL de fase móvil. Se dejaron pasar 15 minutos, tiempo necesario para la corrida del solvente desde el origen hasta la marca de frente de solvente, una vez corrida la placa, esta se retiró de la cámara y se secó con ayuda de la campana de extracción. Finalmente, para el revelado de la placa se usó una lámpara de luz UV con una longitud de onda de 302 nm.

#### **4.7 Encapsulación de flavonoides por inclusión molecular con ciclodextrinas.**

Los complejos de inclusión de los flavonoides se realizaron con base en el método de coprecipitación, para pinocembrina este fue optimizado por Flores y col. (2016). La formación de los complejos se llevó a cabo por duplicado evaluando la muestra total, precipitado y el sobrenadante obtenido, cada tratamiento se llevó a cabo en un matraz de 125 mL, empleando como medio encapsulante beta-ciclodextrinas ( $\beta$ -CD) en una solución de 0.018 g/mL. En la solución de ciclodextrina se dispersó la fracción de pinocembrina manteniendo una relación de solidos suspendidos de 3.36:1 g/g de solidos de flavonoide-encapsulante. La suspensión se sometió a sonicación durante 30 minutos y posteriormente se llevó a una cámara de agitación y temperatura controlada durante 4.5 horas a 200 rpm manteniendo una temperatura constante de 50°C. Transcurrido el tiempo, los complejos se sometieron a reposo en cámara refrigeración a una temperatura de 5°C durante 24 horas.

Posteriormente, los complejos de inclusión se agitaron en centrífuga refrigerada (5°C) a 10,000 rpm durante 15 minutos para separar los sólidos precipitados y el sobrenadante. La muestra total, los sólidos precipitados y el sobrenadante se llevaron a un proceso de secado en una estufa con aire convectivo a temperaturas menores de 40°C. Los rendimientos de encapsulación se calcularon mediante el pesaje directo de los sólidos obtenidos en relación con los sólidos alimentados para cada muestra, además de la cuantificación del flavonoide encapsulado y determinación de los fenoles totales para cada uno de los productos obtenidos.

#### 4.7.1 Diseño experimental para optimización de la inclusión molecular de hesperidina.

Para llevar a cabo la formación del complejo de inclusión molecular hesperidina- $\beta$ -ciclodextrina y determinar las condiciones óptimas de encapsulamiento, se realizaron tres diseños experimentales correspondientes al encapsulado total, encapsulado precipitado y encapsulado sobrenadante, los cuales consistieron en diseños factoriales completos  $3^2$  con 9 combinaciones más duplicados, evaluando como factores la temperatura de agitación (30, 40 y 50 °C) y la relación w/w del flavonoide a encapsular (hesperidina)/medio encapsulante ( $\beta$ -CD) tal como se muestra en el siguiente cuadro.

Las variables respuesta medidas fueron el contenido de compuestos fenólicos totales y la cantidad de hesperidina presente en los encapsulados obtenidos.

El resto de las variables del proceso se mantuvieron constantes de acuerdo con el método de coprecipitación antes dado.

**Cuadro 2.** Diseño experimental aplicado para la optimización de la inclusión molecular del flavonoide hesperidina con  $\beta$ -ciclodextrina, aplicado al encapsulado total, precipitado y sobrenadante.

Corrida	Temperatura (°C)	Relación Flavonoide : $\beta$ -CD
1	30	1
2	30	2
3	30	3
4	40	1
5	40	2
6	40	3
7	50	1
8	50	2
9	50	3

El análisis de resultados se realizó mediante ANOVA con un grado de confianza del 95 % según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico de MiniTAB v 3.1.

#### **4.7.2 Confirmación de la formación de los complejos de inclusión.**

##### **4.7.2.1 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).**

Todas las muestras se analizaron cualitativamente para identificar diferentes tipos de enlaces. Los espectros FT-IR se recogieron de 500 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$  usando un espectrómetro Cary 630 FT-IR equipado con un módulo de muestreo ATR horizontal. Los datos fueron recolectados a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 20 escaneos, las lecturas para cada muestra se realizaron por duplicado. Los espectros FT-IR obtenidos se analizaron mediante el software ORIGIN 8.6.

#### **4.8 Métodos analíticos.**

##### **4.8.1 Determinación de Fenoles Totales.**

La cuantificación de los fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Cortés y col., 2021). Los extractos se diluyeron al 10 % y la reacción se llevó a cabo mezclando 0.5 mL de reactivo Folin 0.67 N y 0.5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.9 M. Después de 1 hora de reposo, las muestras se leyeron a 760 nm en un espectrofotómetro UV/Visible. Se utilizó ácido gálico (GA) como patrón de referencia.

##### **4.8.2 Capacidad Antioxidante por DPPH.**

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó mediante espectrofotometría visible en presencia del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH) a 518 nm en un espectrofotómetro UV/Visible. Se tomaron 2 mL de metanol al 80 % (blanco) y extractos diluidos al 0.1 %, respectivamente, luego se añadieron 2 mL de DPPH 2.5 mM recién preparado. La lectura del blanco y las muestras se realizaron después de 30 minutos. Los resultados fueron expresados en mg EqTx/mL para los extractos y en mg EqTx/g para las muestras encapsuladas, por motivo de comparación de rendimientos.

##### **4.8.3 Cuantificación de pinocembrina por densitometría.**

La cuantificación de pinocembrina se realizó con el software ImagenJ (Image Processing & Analysis in Java), midiendo la densidad generada por las muestras sembradas en las placas TLC Silica gel.

La curva de calibración se realizó con una placa TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 10 cm x 20 cm, utilizando como patrón de referencia pinocembrina en 15 concentraciones de 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000 y 7500 mg/L. En la misma placa se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra a analizar. Posteriormente se colocó la placa en la cámara cromatográfica la cual contenía un volumen de 20 mL de fase móvil (tolueno, éter etílico y ácido acético 10:9:1, v/v/v). Una vez corrida la placa, esta se retiró de la cámara y se secó con ayuda de la campana de extracción. El revelado de la placa se realizó con una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 302 nm, finalmente las placas se fotografiaron para ser procesadas mediante el uso del software.



Este método de cuantificación es aplicable cuando se colocan 10  $\mu\text{L}$  de la muestra problema en la placa TLC.

#### **4.8.4 Cuantificación de hesperidina por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizó para determinar el contenido de hesperidina en los encapsulados. Las muestras se prepararon en DMSO a una concentración de 1 mg/mL, asegurando la completa disolución de la hesperidina presente. Cada muestra se filtró con un filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$ , el volumen de inyección fue de 40  $\mu\text{L}$  en la unidad. El cromatógrafo utilizado fue un Water ACQUITY Arc con auto muestreo y una columna CORTECS® C18 2.7  $\mu\text{m}$  (4.6x150 mm). Como solventes de la fase móvil se empleó agua acidificada (ácido acético al 0.5 %) y metanol, filtrados previamente a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . El tiempo de análisis fue de 40 minutos a una temperatura de 24°C, con un flujo fue de 4 mL/min. La identificación se realizó con un detector de UV a 280 nm.

#### **4.8.5 Prueba de solubilidad.**

Se determinó el porcentaje de solubilidad de acuerdo con lo reportado por Cano y col. (2005), con algunas modificaciones que se describen a continuación: a 20 mL de agua destilada contenida en un vaso de 50 mL se le adicionó 0.200 g del encapsulado, se llevó a una plancha de agitación, a 1150 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, la solución se colocó en un tubo y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Una alícuota de 5 mL del sobrenadante se transfirió a un crisol previamente pesado, los cuales se secaron inmediatamente en estufa a 105°C durante 5 horas. Los resultados de solubilidad de los encapsulados se compararon con el obtenido de la muestra sin encapsular. El porcentaje de solubilidad se calculó por diferencia de peso según la ecuación 2.

**Ecuación 1.** Determinación del porcentaje (%) de solubilidad en agua.

$$\text{Solubilidad en agua (\%)} = \frac{\text{Peso sólidos en el sobrenadante} \times 4}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

## 5. Resultados y discusiones.

### 5.1 Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y pinocembrina de los extractos de orégano mexicano.

Los extractos de orégano mexicano (*L. graveolens*) fueron analizados y comparados mediante el contenido de fenoles, actividad antioxidante (DPPH) y contenido de pinocembrina (Cuadro 3). El análisis de Folin-Ciocalteu mostró que el contenido de compuestos fenoles totales para el extracto del orégano fue de 4.25 mg EAG/mL, valor similar al reportado por Cortés y col. (2021) quien también estudió el extracto de orégano mexicano (*L. graveolens*) y reportó un valor de 4.41 mg EAG/mL. Así mismo el extracto de orégano sin aceite esencial presentó una concentración de fenoles de 3.31 mg EAG/mL, valor mayor al reportado por Cid y col. (2019) quien realizó un extracto etanólico de los residuos sólidos del orégano (*Poliomintha longiflora*) el cual presentó un valor de 1.32 mg EAG/mL.

La capacidad antioxidante (DPPH) del extracto de orégano mexicano mostró un valor de 8.56 mg EqTx/mL, valor superior al reportado por Cortés y col. (2021) (7.54 EqTx /mL), dicha variación puede deberse al impacto sobre control en las condiciones de cultivo y de secado de la materia prima (Mulinacci, 2011). El extracto de orégano sin aceite esencial presentó un valor de 6.97 mg EqTx/mL, el cual es ligeramente menor comparado al extracto de orégano al que no se le ha extraído el aceite esencial. El potencial antioxidante y el contenido de fenoles de los dos extractos de orégano mostraron diferencias significativas entre ellos. Dichas variaciones podrían atribuirse a la diferencia en la composición química del orégano, ya que es bien sabido que el aceite esencial de orégano es rico en compuestos antioxidantes insolubles en medios polares (Loeza y col., 2020; Bautista y col., 2021).

**Cuadro 3.** Determinación de fenoles totales y actividad antioxidante (DPPH) de diferentes extractos de orégano mexicano.

Muestra	Fenoles totales (mg EAG/mL Ex)	DPPH (mg EqTx/mL Ex)	Pinocembrina (mg/mL Ex)
Extracto de orégano	4.25 ± 0.015 <sup>a</sup>	8.56 ± 0.033 <sup>a</sup>	0.659 ± 0.026 <sup>b</sup>
Extracto de orégano sin aceite esencial	3.31 ± 0.005 <sup>b</sup>	6.97 ± 0.033 <sup>b</sup>	0.766 ± 0.029 <sup>a</sup>

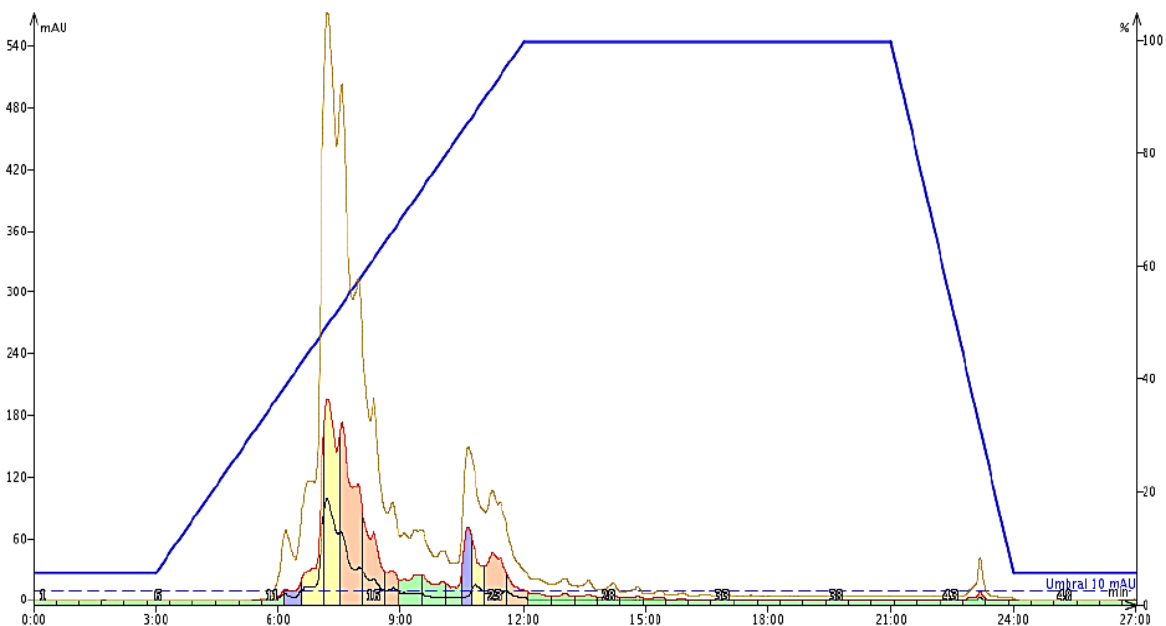
EAG, ácido gálico; EqTx, equivalente trolox. Las diferentes letras en superíndice indicaron diferencias significativas entre muestras según la prueba de Tukey (p <0.05).

Sin embargo, respecto al contenido de pinocembrina, compuesto de interés para la presente investigación, el extracto de orégano sin aceite esencial presentó una concentración mayor de este compuesto con un valor de 0.766 mg/mL Ex, mientras que el extracto de orégano presentó un valor de 0.659 mg/mL Ex, concentración mayor a la obtenida por Flores y col. (2016), quien reportó un valor de 0.574 mg/mL Ex, evaluando de igual manera un extracto hidroetanólico de orégano mexicano. Cabe mencionar que con respecto a la cuantificación de compuestos

polifenólicos (pinocembrina) presentes en el orégano sin aceite esencial no existen a la fecha trabajos científicos al respecto y la variación puede deberse a la baja solubilidad de este compuesto en medios acuosos, medio utilizado para la extracción del aceite esencial, generando una concentración relativa de este compuesto en el residuo correspondiente.

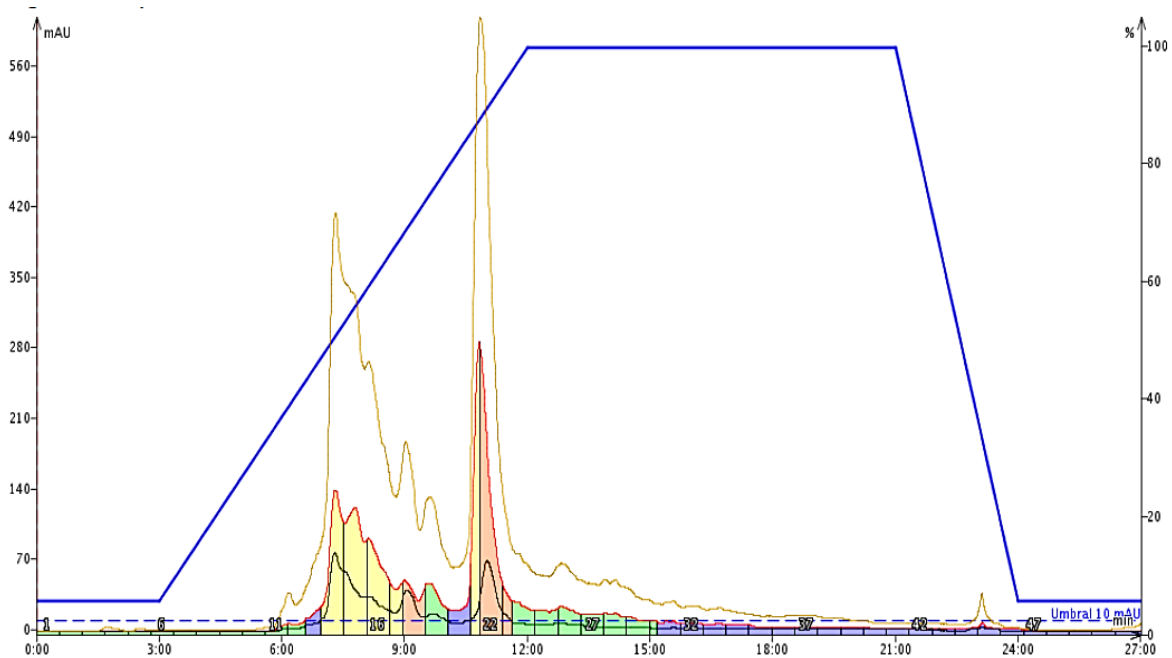
## 5.2 Fraccionamiento de los extractos de orégano con purificador automatizado Isolera Biotage.

Los extractos de orégano mexicano (*L. graveolens*) se concentraron 10 volúmenes con ayuda de un rota-evaporador al vacío (40-45°C y 500 mm Hg) y posteriormente se procedió a realizar el fraccionamiento de cada uno de extractos concentrados utilizando el purificador automatizado Isolera, Biotage, en el cual se inyectaron 0.5 mL de extracto en el cartucho. En la figura 1 se muestra el cromatograma obtenido en el proceso de purificación para el extracto de orégano, en el cual se utilizaron detecciones UV de 280 nm (rojo) y 365 nm (negro). Se observaron distintas absorbancias entre la fracción 11 hasta la fracción 28, donde los picos más concentrados se presentaron en la longitud de onda de 280 nm en la fracción 14. De acuerdo con Bedascasburre y col. (2006) los espectros de absorción UV de los flavonoides presentan 2 bandas características asociadas al anillo B (banda I) con un máximo de absorción en la región de 365 nm, y al anillo A (banda II) con una absorción mayor en la región de 280 nm. De tal modo que la respuesta cromatográfica (área de picos) obtenida en la purificación de los extractos de orégano está directamente relacionada con presencia de flavonoides, tal como se muestra en el cromatograma (Figura 9).



**Figura 9.** Cromatograma obtenido en el fraccionamiento del extracto concentrado de orégano mexicano.

En la Figura 10 se muestra el cromatograma obtenido en el fraccionamiento del extracto de orégano sin aceite esencial, en el cual se obtuvieron 15 fracciones con una concentración mayor en los picos generados, comparado con el fraccionamiento del extracto de orégano original, destacando la fracción 22, la cual mostró una alta detección en la absorbancia de 280 nm, este comportamiento puede deberse a la concentración de algunos compuestos durante el proceso de extracción del aceite esencial del orégano.



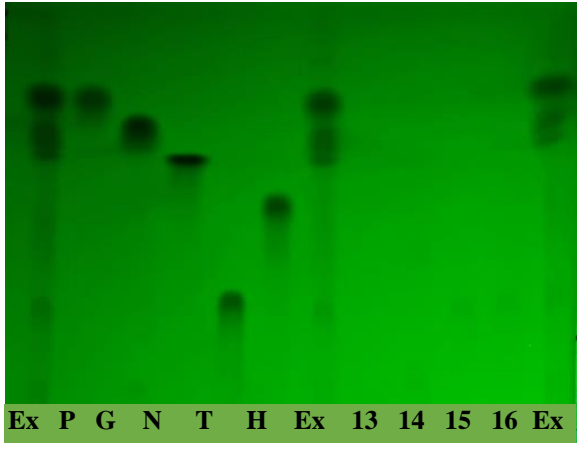
**Figura 10.** Cromatograma obtenido en el fraccionamiento del extracto de orégano mexicano concentrado sin aceite esencial.

### 5.2.1 Identificación de flavonoides presentes en las fracciones del extracto de orégano mexicano.

La purificación de los extractos generó distintas fracciones, por lo que se procedió a realizar la identificación de flavonoides presentes en cada una de ellas por cromatografía en capa fina (TLC), utilizando los estándares de pinocembrina, naringenina, hispidulina, eridictol, galangina y taxifolina que de acuerdo con Flores y col. (2016), son los compuestos mayoritarios presentes en el extracto de orégano mexicano. La identificación se pudo establecer haciendo una comparativa de los valores Rf de los estándares y los obtenidos en las fracciones.

En la Figura 11 se muestra el cromatograma TLC obtenido de los flavonoides estándares, el extracto y las fracciones 13, 14, 15 y 16, donde las fracciones 15 y 16 presentaron trazas de taxifolina. Dichos resultados se verifican en el Cuadro 4 donde se muestran el valor de Rf para taxifolina de 0.30.

**Cuadro 4.** Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 13, 14, 15 y 16.

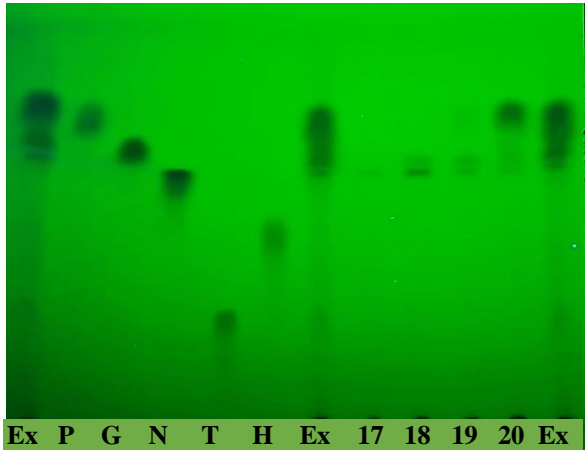


Muestra	Rf				
Extracto	0.30	0.50	0.61	0.68	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.68	-
Naringenina	-	-	0.61	-	-
Taxifolina	0.30	-	-	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Fracción 13	-	-	-	-	-
Fracción 14	-	-	-	-	-
Fracción 15	-	-	-	-	-
Fracción 16	0.30	-	-	-	-

**Figura 11.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 13-fracción 13. 14-fracción 14. 15-fracción 15. 16-fracción 16.

En la Figura 12 se muestra la identificación de los flavonoides presentes en las fracciones 17, 18, 19 y 20, donde la fracción 17 presentó naringenina con un Rf de 0.61 y la fracción 18 presentó naringenina y galangina con valores de 0.61 y 0.67 respectivamente, mientras que las fracciones 19 y 20 presentaron naringenina, galangina y pinocembrina con un Rf de 0.61, 0.67 y 0.76 respectivamente.

**Cuadro 5.** Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 17, 18, 19 y 20.

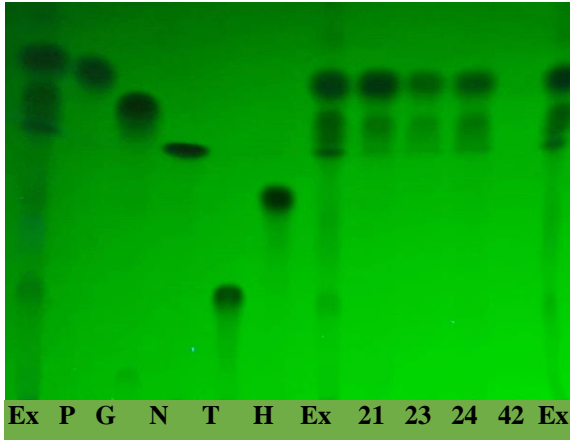


Muestra	Rf				
Extracto	0.30	0.50	0.61	0.68	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.68	-
Naringenina	-	-	0.61	-	-
Taxifolina	0.30	-	-	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Fracción 17	-	-	0.61	-	-
Fracción 18	-	-	0.61	0.67	-
Fracción 19	-	-	0.61	0.67	0.76
Fracción 20	-	-	0.61	0.68	0.76

**Figura 12.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 17-fracción 17. 18-fracción 18. 19-fracción 19. 20-fracción 20.

La Figura 13 muestra el cromatograma correspondiente a las fracciones 21, 23, 24 y 42, en el cual se observa que las fracciones 21, 23 y 24 presentan naringenina, galangina y pinocembrina con un Rf de 0.61, 0.68 y 0.77 respectivamente, resaltando el compuesto de interés (pinocembrina) que se observa en mayor concentración que el resto de los compuestos.

**Cuadro 6.** Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 21, 23, 24 y 42.



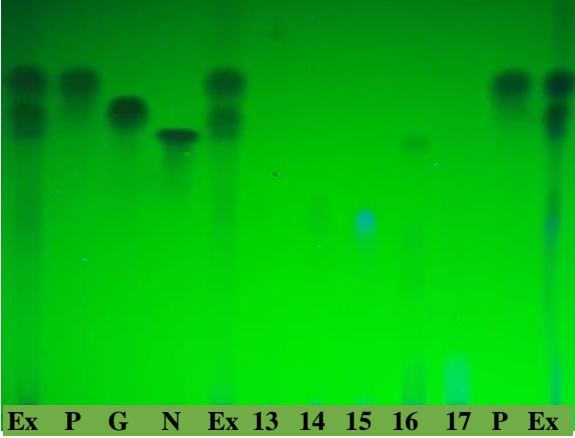
Muestra	Rf				
Extracto	0.30	0.50	0.61	0.68	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.68	-
Naringenina	-	-	0.61	-	-
Taxifolina	0.30	-	-	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Fracción 21	-	-	0.61	0.68	0.77
Fracción 23	-	-	0.61	0.68	0.77
Fracción 24	-	-	0.61	0.68	0.77
Fracción 42	-	-	-	-	-

**Figura 13.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 21-fracción 21. 23-fracción 23. 24-fracción 24. 42-fracción 42.

### 5.2.2 Identificación de flavonoides presentes en las fracciones del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial.

Del mismo modo, se realizó la identificación por medio de cromatografía en capa fina (TLC) de los flavonoides presentes en las fracciones obtenidas a partir del extracto de orégano sin aceite esencial. Las fracciones 14 y 15 mostraron trazas de eriodictiol con un Rf de 0.47, mientras que la fracción 17 presentó naringenina con Rf de 0.64 (Cuadro 7, Figura 14).

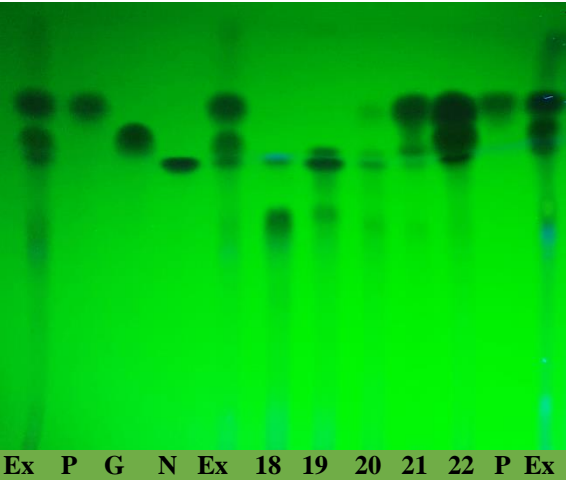
**Cuadro 7.** Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 14, 15, 16 y 17.



Muestra	Rf				
Extracto	0.47	0.5	0.64	0.71	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.71	-
Naringenina	-	-	0.64	-	-
Hispidulina		0.5			
Eriodictiol	0.47	-	-	-	-
Fracción 14	0.47	-	-	-	-
Fracción 15	0.47	-	-	-	-
Fracción 16	-	-	0.64	-	-
Fracción 17	-	-	-	-	-

**Figura 14.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-hispidulina. 14-fracción 14. 15-fracción 15. 16-fracción 16. 17-fracción 17.

**Cuadro 8.** Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones 18, 19, 20, 21 y 22.




Muestra	Rf				
Extracto	0.47	0.5	0.64	0.71	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.71	-
Naringenina	-	-	0.64	-	-
Hispidulina	-	0.5	-	-	-
Eriodictiol	0.47	-	-	-	-
Fracción 18	-	0.5	0.64	-	-
Fracción 19	-	0.5	0.64	0.71	-
Fracción 20	-	0.5	0.64	-	0.77
Fracción 21	-	0.5	0.64	-	0.77
Fracción 22	-	-	0.64	0.72	0.77

**Figura 15.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-Hispidulina. 18-fracción 18. 19-fracción 19. 20-fracción 20. 21-fracción 21.

En la Figura 15 se muestra el cromatograma obtenido de los flavonoides estándares, el extracto y las fracciones 18, 19, 20, 21 y 22, donde la fracción 18 presentó hispidulina y naringenina, la fracción 19 hispidulina, naringenina y galangina, mientras que en las fracciones 20, 21 y 22 se observó la presencia de hispidulina, naringenina, galangina y pinocembrina, destacando la fracción 22 en la cual se presentó de manera más concentrada la pinocembrina. Dichos

resultados se verifican en el Cuadro 8 donde se muestran los valores de Rf para cada compuesto. Finalmente, en la Figura 16 se muestra el cromatograma obtenido de los flavonoides estándares, el extracto y las fracciones 23, 24, 25, 26, 27 y 28, en las cuales se observó la presencia de naringenina, galangina y pinocembrina, éstas en menor saturación comparadas con las fracciones anteriores (21 y 22). Los valores de Rf para cada compuesto se muestran en cuadro 9.

**Cuadro 9.** Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones 23, 24, 25, 26, 27 y 28.



Muestra	Rf				
	0.47	0.50	0.64	0.71	0.77
Extracto	0.47	0.50	0.64	0.71	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.71	-
Naringenina	-	-	0.64	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Eriodictiol	0.47	-	-	-	-
Fracción 23	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 24	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 25	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 26	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 27	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 28	-	-	0.64	-	0.77

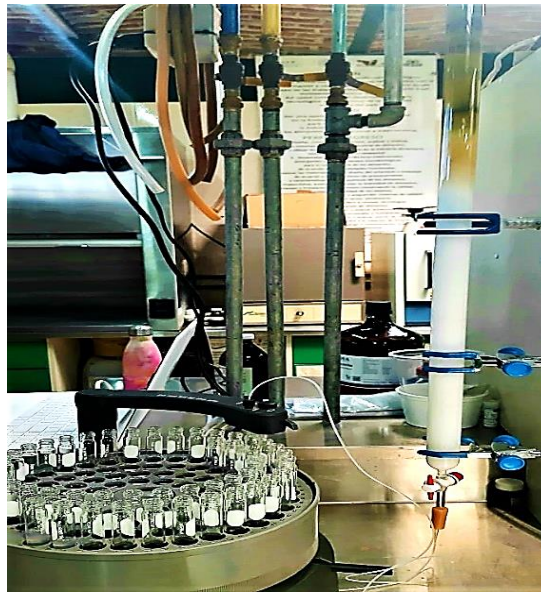
**Figura 16.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracciones obtenidas en la purificación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-Hispidulina. 23-fracción 23. 24-fracción 23. 24-fracción 24. 25-fracción 25. 26-fracción 26. 27-fracción 27. 28-fracción 28.

Una vez analizados los resultados de identificación cromatográfica (TLC), estos permitieron verificar el fraccionamiento y la presencia de los flavonoides que se encuentran en los distintos extractos de orégano mexicano, destacando la presencia de pinocembrina, uno de los flavonoides mayoritarios en el orégano mexicano, seguido de galangina y naringenina (Lin y col., 2007). Estos 3 flavonoides se encontraron juntos en algunas fracciones de los extractos, que de acuerdo con lo señalado por Flores y col. (2016) esto puede deberse a la gran similitud estructural y abundancia dentro del orégano mexicano.



### 5.3 Fraccionamiento del extracto de orégano sin aceite esencial por cromatografía en columna y silica gel.

El fraccionamiento del extracto de orégano sin aceite esencial obtuvo un buen fraccionamiento empleado el equipo Isolera, Biotage, sin embargo, se comparó con otro método de separación con el objetivo de fraccionar cantidades mayores de extracto y utilizar cantidades menores de solventes, por lo que se empleó cromatografía en columna y silica gel (Figura 17). La columna se alimentó con 6 g de extracto, en el cual se obtuvieron alrededor de 60 fracciones que fueron analizadas por TLC y las fracciones con similitud y presencia de pinocembrina se juntaron en una sola fracción. Dicha fracción es rica en pinocembrina, en conjunto con galangina y naringenina (Figura 18).



**Figura 17.** Columna cromatografía de silica gel y colector de fracciones automático.

**Cuadro 10.** Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5.

	Muestra		Rf			
	Extracto	0.47	0.50	0.64	0.71	0.77
	Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
	Galangina	-	-	-	0.71	-
	Naringenina	-	-	0.64	-	-
	Fracción 1	-	-	0.64	0.71	0.77
	Fracción 1	-	-	0.64	0.71	0.77
	Fracción 1	-	-	0.64	0.71	0.77

**Figura 18.** Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV  $\lambda=302$  nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracción rica en pinocembrina. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-Pinocembrina. G-Galangina. N-Naringenina. 1-fracción 1 (Triplicado).

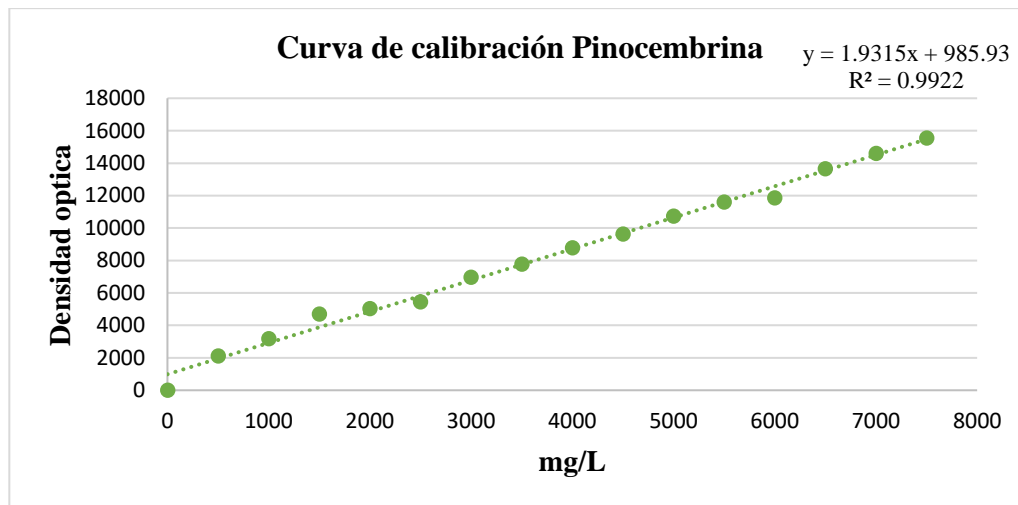
#### 5.4 Cuantificación de pinocembrina presente en las fracciones del extracto de orégano sin aceite esencial.

Al identificar los flavonoides presentes en las fracciones obtenidas por los dos diferentes métodos de fraccionamiento se encontró la presencia de pinocembrina, sin embargo, es importante conocer y evaluar la concentración que presenta cada una de las fracciones correspondientes a cada método. Para esto la cuantificación de pinocembrina se llevó a cabo por medio del software ImagenJ (Image Processing & Analysis in Java), midiendo la densidad generada en las placas TLC. Se realizó una curva de calibración empleando como estándar pinocembrina a distintas concentraciones. La curva de calibración densidad óptica vs miligramos de pinocembrina (mg P), mediante la aplicación de su regresión lineal con una  $R^2$  de 0.9922, produjo la siguiente ecuación:

**Ecuación 2.** Ecuación de regresión lineal para la cuantificación de pinocembrina.

$$y = 1.9315x10^5 + 985.93$$

Para efectos de comparación de resultados, se realizó una conversión de unidades en la ecuación de regresión expresándose en mg/L, la cual se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Curva de calibración de la densidad óptica generada por pinocembrina.

El análisis cuantitativo de pinocembrina de las fracciones obtenidas en cada método nos permitió observar las diferencias de concentración en cada una de ellas. El Cuadro 11 muestra el contenido de pinocembrina presente en las fracciones obtenidas con el equipo Isolera, Biotage, además de los rendimientos de recuperación correspondientes, los cuales dieron un total de 90.13 % de recuperación de este compuesto. La fracción 22 destacó por presentar una concentración mayor de pinocembrina con un valor de 11.22 mg/mL con una eficiencia de recuperación del 64 %, mientras que el resto de las fracciones presentaron concentraciones en un rango de 0.33 a 2.87 mg/mL, recuperando solo de 1.89 a 5.15 % de la pinocembrina alimentada. Con esta cuantificación se demuestra la importante saturación que presentó la fracción 22 en la placa TLC en la cual se concentró mayor cantidad de pinocembrina (Figura 15).

Asimismo, el Cuadro 12 muestra el contenido de pinocembrina presente en la fracción obtenida en cromatografía en columna y silica gel, la obtuvo una eficiencia de recuperación de pinocembrina del 54.50 %, con una concentración de 15.165 mg/mL.

**Cuadro 11.** Fracciones del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial obtenidas mediante el equipo Isolera, Biotage.

Muestras	Pinocembrina (mg/mL)	Pinocembrina (mg)	Rendimiento (%)
Fracción 21	0.87 ±0.015 <sup>b</sup>	0.348	4.98
Fracción 22	11.22 ±0.001 <sup>a</sup>	4.488	64.27
Fracción 23	0.76 ± 0.000 <sup>d</sup>	0.304	4.35
Fracción 24	0.90 ±0.001 <sup>c</sup>	0.360	5.15
Fracción 25	0.63 ± 0.002 <sup>e</sup>	0.252	3.60
Fracción 26	0.57 ± 0.001 <sup>f</sup>	0.228	3.26
Fracción 27	0.33 ± 0.001 <sup>h</sup>	0.132	1.89
Fracción 28	0.46 ± 0.000 <sup>g</sup>	0.184	2.63
<b>Total</b>			<b>90.13</b>

**Cuadro 12.** Fracción del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial obtenido con cromatografía en columna y silica gel.

Muestras	Pinocembrina (mg/mL)	Pinocembrina (mg)	Rendimiento (%)
Fracción 1	15.165 ± 0.012	75.825	54.50
<b>Total</b>			<b>54.50</b>

Al comparar los métodos de separación empleando el extracto de orégano sin aceite esencial, se puede observar que ambos métodos realizan una separación en el cual existe la presencia de pinocembrina en conjunto con otros compuestos, sin embargo, en el fraccionamiento con el equipo Isolera, Biotage existe mayor eficiencia de recuperación de pinocembrina (90.13 %) y mayor pureza en las fracciones, tal es el caso de la fracción 22. Mientras que en la separación con la columna cromatografía la cual permitía fraccionar mayor cantidad de extracto, las concentraciones de pinocembrina en la fracción fue menor y por tanto la eficiencia de recuperación de pinocembrina también fue menor (54.50 %). Estas variaciones pueden deberse a las interacciones y condiciones de trabajo en cada método, ya que el purificador automatizado Isolera, Biotage cuenta con un cartucho flash de fase inversa de alto rendimiento (30 g) con un caudal de 25 mL/min, mientras que la columna cromatográfica con silica gel (178 g) corresponde a una fase normal con caudal de 1 mL/min. Dichos factores pueden intervenir directamente en la eficiencia de recuperación y separación de los compuestos flavonoides, ya que de estos depende la asimetría de las bandas eluidas y la capacidad propia del sistema en general.

Arias y col. (2020) reportaron la cuantificación de pinocembrina en un quimiotipo rico en timol de *Lippia origanoides*, con un contenido de 75.40 mg de pinocembrina. Por su parte, Osti y col. (2010) al separar y purificar componentes de extractos de plantas empleado acetato de etilo, aisló 20 mg de pinocembrina de un extracto de *G. purpurascens* como un sólido ligeramente amarillo. Al comparar con los resultados obtenidos podemos observar que la concentración resultante de la columna con silica gel (75.825 mg) fue mayor a la reportada por Osti y col. (2010) y muy cercana a la obtenida por Arias y col. (2020), resaltando que en la presente investigación la materia de extracción empleada ha llevado un tratamiento previo por lo cual ya es denominado un residuo. Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos con la principal fuente de pinocembrina, el propóleo, que acuerdo a Granados y col. (2018) quienes aislaron pinocembrina empleando columna y silica gel de propóleos de 3 diferentes zonas (Zacatecas, Chihuahua y Durango), obtuvieron concentraciones de 114 a 330 mg respectivamente, valores mayores a los obtenidos, sin embargo, cabe mencionar que de acuerdo a Martínez y col. (2016) la producción de propóleos corresponde a un desarrollo lento y dicha producción se ve afectada por la variación estacional (Lluvias, calor, corrientes de aire).

### **5.5 Encapsulación de pinocembrina por inclusión molecular con ciclodextrinas.**

La encapsulación de pinocembrina se llevó a cabo utilizando la fracción 1 obtenida del método por columna y silica gel, como medio encapsulante se empleó  $\beta$ -ciclodextrina y tal como se describe en la sección 5.7 correspondiente a materiales y métodos se evaluaron 3 muestras, la muestra total, precipitada y el sobrenadante. Para lo anterior, se realizó la confirmación de la formación de los complejos de inclusión mediante ensayos de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier FT-IR. Posteriormente, se evaluó el contenido de FT, actividad antioxidante y pinocembrina, así como la determinación de la eficiencia de encapsulación. Finalmente se realizó la medición del porcentaje de solubilidad y eficiencia de encapsulación, mostrando a continuación los resultados obtenidos en cada prueba realizada.

#### **5.5.1 Confirmación de los complejos de inclusión.**

##### **5.5.1.1 Espectroscopia FT-IR de los complejos de inclusión pinocembrina- $\beta$ -ciclodextrina.**

En la Figura 20 se muestran los espectros FT-IR del encapsulado de pinocembrina, correspondientes a la muestra total, precipitado y sobrenadante, comparando con la mezcla física, la fracción de pinocembrina y la  $\beta$ -CD.

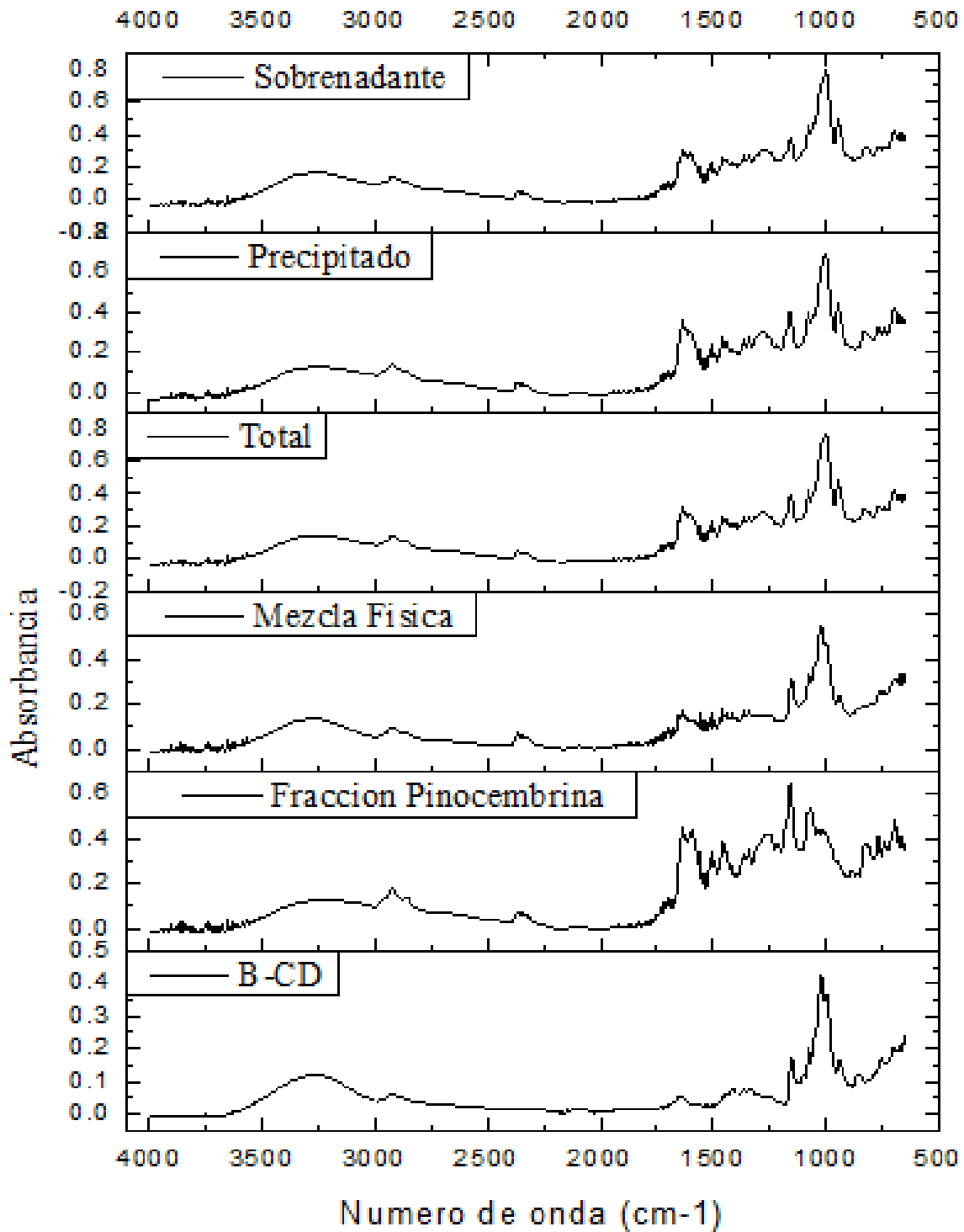
El espectro FT-IR de la  $\beta$ -CD están dominado por bandas de vibración características a los carbohidratos debido a que existen 7 unidades repetidas de glucosa en la molécula. Este mostró bandas con absorción a 3256  $\text{cm}^{-1}$  banda relativamente ancha e intensa correspondiente al estiramiento del O-H proveniente de la glucosa, 2907  $\text{cm}^{-1}$  banda de estiramiento del enlace C-H-, a 1634  $\text{cm}^{-1}$  aparece una banda asociada a la unión del enlace H-O-H característica al residuo de agua en la parte interna de la  $\beta$ -CD. La banda de 1329  $\text{cm}^{-1}$  corresponde la

deformación del enlace O-H, mientras que en el intervalo espectral ubicado a 1150, 1073, 1019 y 939  $\text{cm}^{-1}$  se muestran los picos más intensos correspondientes a bandas de estiramiento de los enlaces C-O-C y C-O en el grupo C-OH, bandas de unión en el enlace O-H, bandas de flexión de C-O-H y estiramiento del enlace C-C respectivamente.

El espectro de la pinocembrina exhibió bandas de absorción a 2913  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C-H, a 1634 y 1448  $\text{cm}^{-1}$  se observan picos característicos del anillo aromático y vibraciones dadas por el estiramiento del doble enlace O=C, las bandas 1262 y 1159  $\text{cm}^{-1}$  indicaron la vibración de estiramiento del grupo C-O-C, a 1062  $\text{cm}^{-1}$  se observó la vibración asociada al estiramiento de los enlaces C-H y C-O, las bandas a 823 y 764  $\text{cm}^{-1}$  se deben a la meta sustitución de los protones aromáticos y la banda de 695  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a una flexión fuera de plano del enlace =C-H, este tipo de absorción permite determinar el tipo de sustitución en el anillo aromático.

El espectro FT-IR de la mezcla física dio esencialmente una combinación de los espectros de  $\beta$ -CD pura y pinocembrina, existiendo una superposición de las bandas características de ambas moléculas y la presencia de ruido en las señales de pinocembrina asociadas a los enlaces O=C, C-O-C, C-H y C-O, lo cual puede deberse a la heterogeneidad y estequiometría de la muestra.

Por otro lado en la figura 20 también se observan los espectros FT-IR de los diferentes encapsulados en polvo (total, precipitado y sobrenadante), dentro de los cuales no se observa una diferencia marcada, ya que cada uno presenta señales asignadas a la  $\beta$ -CD y pinocembrina, sin embargo, en la muestra total y sobrenadante disminuyen ligeramente las señales principales del FT-IR de pinocembrina (1634 y 1448  $\text{cm}^{-1}$  picos característicos del anillo aromático y vibraciones dadas por el estiramiento del doble enlace O=C), lo que demuestra una complejación debido a la supresión del pinocembrina en la  $\beta$ -CD (Canbolat y col., 2014).



**Figura 20.** Espectros FT-IR de  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), mezcla física, muestra total, solidos precipitados, solidos sobrenadantes y fracción de pinocembrina seca. Se consideró una región en un rango de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.5.2 Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y pinocembrina de los encapsulados.

Las muestras obtenidas de la encapsulación de pinocembrina fueron analizadas y comparadas mediante la determinación de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y pinocembrina (Cuadro 13), además, dichas pruebas se le realizaron a la fracción de pinocembrina sin encapsular para observar el comportamiento de la misma.

La prueba de fenoles totales dio como resultado en la fracción de pinocembrina un contenido de 217.541 mg EAG/gP, mientras que en las muestras encapsuladas el tratamiento con mayor contenido de fenoles totales fue la muestra total con un valor de 175.432 mg EAG /g y con el valor mínimo el sobrenadante presentó una concentración de compuestos fenólicos de 85.770 432 mg EAG/g. Por otra parte, en la determinación del contenido de pinocembrina la fracción de sin encapsular presentó una concentración de 242.252 mg/gP valor mayor al obtenido en las muestras encapsuladas, ya que la muestra sobrenadante obtuvo un valor de 216.467 mg/g de pinocembrina, seguido de la muestra total con un contenido de 183.356 mg/g y con un valor mínimo, al igual que en la prueba de fenoles el precipitado presentó un valor de 143.398 mg/g de pinocembrina.

De esta manera se observa en el comportamiento de los resultados anteriores que al encapsular la pinocembrina, se disminuye el contenido fenólico y la concentración de pinocembrina, lo cual puede deberse a que se parte de una fracción concentrada que puede presentar mayor concentración de compuestos y al realizar el proceso de encapsulación y la mezcla con la CD, esta se diluye de tal manera que a realizar los cálculos en peso seco este comportamiento se ve reflejado.

**Cuadro 13.** Determinación de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y pinocembrina de las muestras de pinocembrina encapsuladas con  $\beta$ -ciclodextrina.

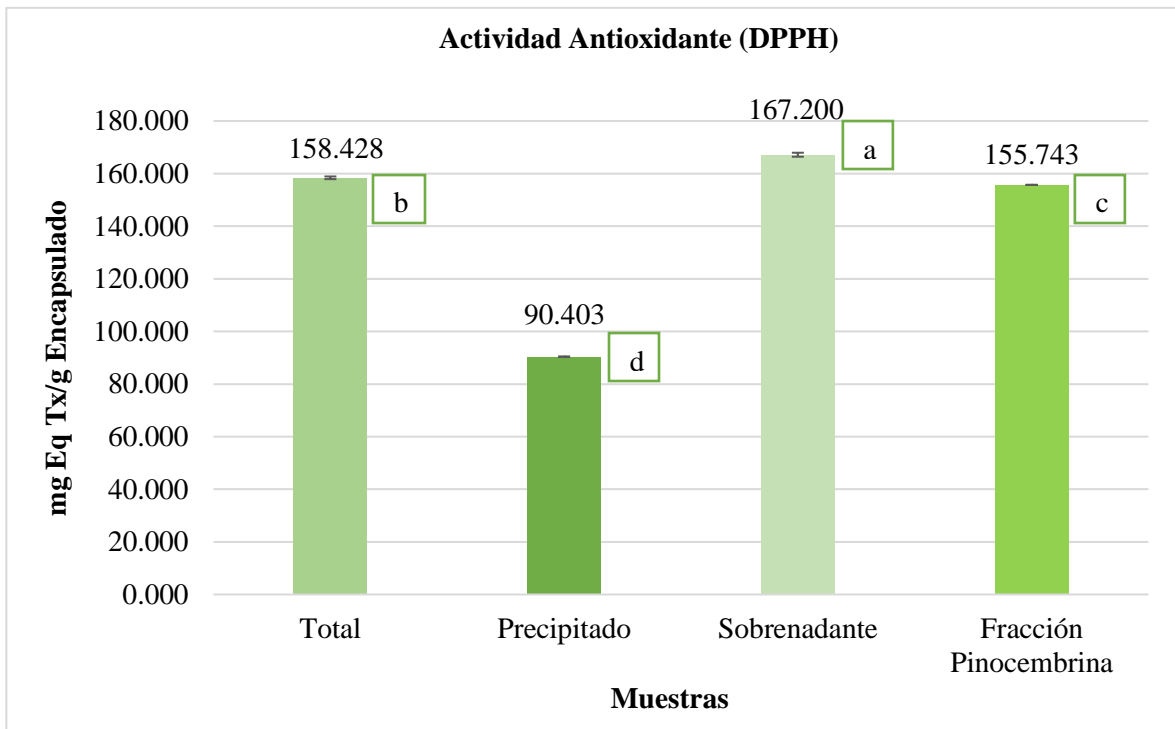
Muestra	Fenoles totales (mg EAG/g Encapsulado)	DPPH (mg EqTx/g Encapsulado)	Pinocembrina (mg/g Encapsulado)
Total	175.432 $\pm$ 0.4713 <sup>a</sup>	158.428 $\pm$ 0.5063 <sup>b</sup>	183.356 $\pm$ 0.4096 <sup>b</sup>
Precipitado	85.770 $\pm$ 0.3142 <sup>c</sup>	90.403 $\pm$ 0.0126 <sup>c</sup>	143.398 $\pm$ 0.1064 <sup>c</sup>
Sobrenadante	144.323 $\pm$ 0.7856 <sup>b</sup>	167.200 $\pm$ 0.7594 <sup>a</sup>	216.467 $\pm$ 0.0426 <sup>a</sup>

EAG, ácido gálico; EqTx, equivalente trolox. Las diferentes letras en superíndice indicaron diferencias significativas entre muestras según la prueba de Tukey (p <0.05).

En la determinación de la actividad antioxidante la cual se calculó por medio del método de DPPH, se obtuvo un comportamiento diferente a las pruebas anteriores (Cuadro 13, Figura 21). Se observa que la actividad antioxidante de los complejos formados en la muestra total y sobrenadante son superiores a la de la pinocembrina libre (155.743 mg EqTx/g), ya que presentaron valores de 158.428 y 167.200 mg EqTx/g, respectivamente. Esto puede deberse a

la creciente solubilidad en agua de la pinocembrina por el proceso de encapsulación. Por lo tanto, la concentración requerida de componente activo disminuye y la actividad antioxidante aumenta con la formación de complejos de inclusión (Kamimura y col., 2014).

En un estudio realizado por Ho y col. (2017), se midió la actividad antioxidante del flavonoide catequina y sus complejos de inclusión obtenidos con  $\beta$ -CD, se encontró que la catequina al ser encapsulada con ciclodextrinas aumentaba hasta 3 veces más su actividad antioxidante que el compuesto puro. Esto se atribuyó al aumento de la solubilidad del compuesto dada por las interacciones con las ciclodextrinas. Del mismo modo, Costa y col. (2015) al encapsular aceites esenciales de *L. viridis*, *L. pedunculata* y *T. lotocephalus* con  $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD, tuvieron como resultado el mismo comportamiento, observaron que los aceites no mostraban actividad antioxidante por sí solos, mientras que los complejos preparados con ciclodextrina tenían una actividad antioxidante considerable, dicho incremento en la actividad antioxidante al igual que Ho y col. (2017) se lo atribuyeron al favorecimiento de la solubilidad dado por la encapsulación de los compuestos de baja polaridad presentes en los aceites esenciales.



**Figura 21.** Actividad antioxidante (DPPH) de la fracción de pinocembrina sin encapsular y las diferentes muestras de pinocembrina- $\beta$ -CD (Total, precipitado y sobrenadante).



### 5.5.3 Determinación del porcentaje de solubilidad de los complejos de inclusión pinocembrina-β-CD.

El porcentaje de la solubilidad de los complejos de pinocembrina-β-CD se determinó midiendo el porcentaje del encapsulado disuelto en agua a temperatura ambiente, y para confirmar que se trataba de pinocembrina encapsulada y no sólo β-CD se realizó una verificación midiendo y comparando los fenoles totales del encapsulado total y el encapsulado solubilizado en el medio acuoso. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 14. La fracción de pinocembrina sin encapsular resultó con una solubilidad del 12 %, mientras que la solubilidad para las muestras total, precipitado y sobrenadante fueron de 26, 20 y 45 % respectivamente, observándose de esta manera un aumento del 2 a 4 veces su solubilidad después de la formación de los complejos de inclusión, resaltando la muestra sobrenadante que fue la que presentó un incremento mayor en la solubilidad. Además, al realizar la verificación por medio de la determinación del contenido fenólico se observa en los resultados que el encapsulado solubilizado mostró un incremento de aproximadamente el doble en cuanto a la concentración en fenoles, lo cual demuestra que en la parte solubilizada existe la presencia de pinocembrina y de acuerdo con López y col. (2016) dicho incremento podría ser resultado de la función que realizan las ciclodextrinas en solución acuosa como solvente para extraer algunos compuestos fenólicos. Además, al ser las CDs más solubles en agua y en disolventes orgánicos, aumentan notablemente la solubilidad de estos compuestos insolubles y por lo tanto incrementa la concentración total del flavonoide en disolución (Núñez y col., 1997; Mercader y col., 2010).

**Cuadro 14.** Determinación del porcentaje de solubilidad en agua de los diferentes complejos de inclusión de pinocembrina-β-CD y su verificación por fenoles totales.

Muestras	% solubilidad	Encapsulado total	Encapsulado solubilizado
		Fenoles totales (mg EAG/g Encapsulado)	Fenoles totales (mg EAG/g Encapsulado)
Total	<b>26 ± 0.000<sup>b</sup></b>	175.432 ± 0.471 <sup>a</sup>	233.312 ± 0.245 <sup>c</sup>
Precipitado	<b>20 ± 0.000<sup>c</sup></b>	85.770 ± 0.314 <sup>c</sup>	265.030 ± 0.156 <sup>b</sup>
Sobrenadante	<b>45 ± 1.414<sup>a</sup></b>	144.323 ± 0.785 <sup>b</sup>	272.784 ± 0.521 <sup>a</sup>

Un estudio posterior de Zhou y col. (2014) reportaron valores de solubilidad del 13 y 16 % para complejos de pinocembrina con β-CD y HP-β-CD, respectivamente. En dicho estudio los autores consideraron que los valores de solubilidad obtenidos confirmaban la fiabilidad de la solubilidad en agua satisfactoria y que sería beneficioso para la utilización médica de este compuesto. Cabe mencionar que los valores que se obtuvieron en la presente investigación son superiores a los obtenidos por Zhou y col. (2014).

Por otra parte, Mercader y col. (2010) realizó un complejo de inclusión de quercetina, flavonoide similar estructuralmente a la pinocembrina, donde empleó  $\beta$ -CD obteniendo un buen acoplamiento, debido al tamaño de la cavidad hidrofóbica de las mismas, así mismo el aumento de solubilidad se vio reflejado, ya que aumento de 3 a 4 veces la solubilidad del compuesto sin encapsular, tal como ocurrió en el presente trabajo.

#### 5.5.4 Determinación de eficiencias de encapsulación por inclusión molecular.

La inclusión molecular de pinocembrina se llevó a cabo evaluando tres diferentes partes de la muestra correspondiente a la muestra total, el precipitado y sobrenadante, las cuales posiblemente pueden presentar diferentes propiedades y por lo tanto, también diferentes capacidades de interaccionar con la molécula de  $\beta$ -CD. Por lo anterior, se determinó el porcentaje de eficiencia de encapsulación, en base a la concentración de pinocembrina y al producto seco obtenido, los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 15.

La eficiencia de encapsulación fue mayor en la muestra total siendo esta de 94 %, a pesar de no presentar la concentración mayor en el contenido de pinocembrina (183.356 mg/g), este comportamiento se vio reflejado ya que la cantidad de producto seco obtenido aproximadamente corresponde al doble comparado con el resto las muestras, lo que produce un rendimiento mayor en proceso de encapsulación de la muestra total. Por otra parte, con una eficiencia de 51.06 % la muestra sobrenadante presentó el contenido mayor de pinocembrina con 216.467 mg/g, sin embargo, el producto encapsulado seco fue menor para esta muestra lo que resulta un rendimiento bajo, y tal como se plantea en la sección de antecedentes estos procesos no solo buscan ser simples y reproducibles, sino también económicamente rentables ya que es fundamental para que sean ampliamente aceptados en diferentes industrias como la alimentaria y farmacéutica. Sin embargo, es importante no descartar la muestra sobrenadante debido a su alta concentración de pinocembrina y a que presentó el mayor porcentaje de solubilidad, tal como se vio anteriormente. De esta manera el sobrenadante representa una potencial muestra para mejorar en trabajos posteriores su eficiencia de encapsulación y así obtener rendimientos mayores en el proceso de encapsulación.

**Cuadro 15.** Eficiencia de encapsulación de los complejos de inclusión de  $\beta$ -CD-Pinocembrina en las diferentes partes de la muestra.

Muestra	Encapsulado (g)	Rendimiento del proceso (%)	Concentración de pinocembrina (mg/g)	Eficiencia de encapsulación (%)
Total	1.265	96.71	183.356	<b>94.98</b>
Precipitado	0.728	55.65	143.398	<b>42.75</b>
Sobrenadante	0.576	44.03	216.467	<b>51.06</b>

Asimismo, estudios previos sobre inclusión molecular del extracto de orégano (*L. graveolens*) empleando  $\beta$ -CD y el método de coprecipitación (Flores y col., 2016), evaluaron el porcentaje de eficiencia de encapsulación en donde obtuvieron como resultados valores del 10 al 16 % para muestras precipitadas y del 62 a 63 % en muestras sobrenadantes, lo cual tenían eficiencias

globales del 73 al 77 %, los cuales son resultados inferiores en todos los casos comparados a los obtenidos en la presente investigación.

Hill y col. (2013) encapsularon eugenol, derivado fenólico, en  $\beta$ -CD en donde obtuvieron como resultado eficiencias de encapsulación del 90 % para muestras totales, siendo este ligeramente menor al valor obtenido en la muestra total de pinocembrina-  $\beta$ -CD. Por otra parte, Ciobanu y col. (2013) encapsularon 13 compuestos aromáticos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, canfeno, eucaliptol, limoneno, linalol, p-cimeno, mirceno, mentona, mentol, trans-anetol, pulegona y alcanfor) con diferentes CD ( $\beta$ -CD,  $\alpha$ -CD y  $\gamma$ -CD) donde obtuvieron diferentes rendimientos globales que iban del 9 a 90 %, teniendo como resultados las mayores eficiencias de formación de complejos (76 a 90 %) al emplear  $\beta$ -CD que  $\alpha$ -CD y  $\gamma$ -CD. De hecho, la  $\beta$ -CD podría encapsular hasta el 80 y el 99 % de los compuestos aromáticos presentes en los alimentos. Por lo tanto, se demuestra que con la  $\beta$ -CD es la CD de elección para mejorar la solubilidad. Dentro de los resultados obtenidos se observa que la muestra total presentó una eficiencia de encapsulación dentro del rango de mayor eficiencia.

Además, es importante mencionar que existen diversos factores que permiten la formación de los complejos de inclusión y por lo tanto éstos determinan la eficiencia de encapsulación, entre ellos se encuentran: el tamaño de la molécula a estudiar, la estequiometría, polaridades relativas, temperaturas, interacciones de Van der Waals y la posibilidad de formar puentes de hidrogeno, entre otros (Kalogeropoulos y col., 2009). De esta manera, se pueden observar distintos resultados ya que pueden existir propiedades tanto físicas y químicas que intervienen en la interacción con el medio encapsulante.

### 5.5.5 Optimización del proceso de encapsulación de hesperidina por inclusión molecular con ciclodextrinas.

Una vez realizadas las corridas experimentales de los diseños factoriales 3<sup>2</sup> correspondientes a la optimización de las condiciones del proceso de encapsulación de la hesperidina en la muestra total, precipitada y sobrenadante, se determinó el contenido de fenoles totales (mg de EAG/g de encapsulado) y hesperidina (mg/g de encapsulado) para cada uno de los productos obtenidos en las corridas.

Los resultados obtenidos respecto a la muestra total presentaron importantes variaciones en el contenido de FT con un valor mínimo de 67.700 mg EAG/g hasta valores mayores de 151.519 mg EAG/g. Para el caso de hesperidina se obtuvieron cantidades de 0.435 a 0.610 mg/g de encapsulado (Cuadro 16), los resultados mostraron el mismo comportamiento para las dos variables independientes, ya que los resultados mínimos los presentaron las corridas con combinaciones que tenían la relación Flavonoide/CD de 1, mientras que los resultados con valores mayores tanto de FT como en el contenido de hesperidina lo presentaron aquellas corridas con la relación Flavonoide/CD de 3. Es importante mencionar que en las corridas que se empleó la temperatura de 50°C las variables respuesta disminuyeron ligeramente, lo cual puede deberse al efecto de la temperatura sobre los complejos formados ya que al aumentar la temperatura es posible que empiecen a desnaturalizarse debido a que la hesperidina esté débilmente ligada, de manera que disminuye la estabilidad de los puentes de hidrogeno formados entre en flavonoide y la β-CD (Ross y col., 1996; Mercader y col., 2010).

**Cuadro 16.** Resultados experimentales obtenidos para la optimización del proceso de encapsulación de hesperidina en la muestra total por inclusión molecular con β-CD.

Variables del proceso			Variables respuesta	
Corrida	Temperatura (°C)	Flavonoide/CD (g Hes/g β-CD)	FT (mg EAG/g)	Hes (mg/g)
1	30	1	116.854 ± 0.574 <sup>d</sup>	0.460 ± 0.000 <sup>de</sup>
2	30	2	127.822 ± 0.148 <sup>c</sup>	0.565 ± 0.007 <sup>bc</sup>
3	30	3	128.093 ± 0.382 <sup>c</sup>	0.580 ± 0.000 <sup>ab</sup>
4	40	1	94.376 ± 0.557 <sup>e</sup>	0.490 ± 0.000 <sup>d</sup>
5	40	2	134.999 ± 0.489 <sup>b</sup>	0.590 ± 0.000 <sup>ab</sup>
6	40	3	140.280 ± 0.297 <sup>b</sup>	0.610 ± 0.000 <sup>a</sup>
7	50	1	67.700 ± 0.297 <sup>f</sup>	0.435 ± 0.021 <sup>e</sup>
8	50	2	121.458 ± 0.457 <sup>d</sup>	0.540 ± 0.014 <sup>c</sup>
9	50	3	151.519 ± 0.574 <sup>a</sup>	0.575 ± 0.007 <sup>abc</sup>

Respecto a la muestra precipitada (Cuadro 17), en la determinación de FT se obtuvieron valores mínimos de 148.676 mg EAG/g y valores mayores de 173.320 mg EAG/g, presentando los valores mínimos las corridas con la combinación Flavonoide/CD de 1, los valores mayores en

este caso fueron más variables ya que las corridas con relación Flavonoide/CD de 3 y temperatura de 40 y 50 °C presentaron valores mayores, pero al cambiar la temperatura a 30°C el valor mayor lo presentó la corrida con relación Flavonoide/CD de 2. En el contenido de hesperidina no existieron cambios tan radicales en los valores, sin embargo, aun así con diferencias significativas, se obtuvieron valores mínimos de 0.600 mg/g y valores mayores de 0.650 mg/g, donde los valores mínimos se presentaron en las temperaturas de 30 y 50°C con la relación Flavonoide/CD de 1 y en la temperatura de 40°C en combinación con la relación Flavonoide/CD de 2; por lo contrario los valores mayores en el contenido de hesperidina se obtuvieron a una temperatura de 30°C y relación Flavonoide/CD de 2, a 40°C en combinación con la relación Flavonoide/CD de 1 y a 50 °C con la relación Flavonoide/CD de 3.

**Cuadro 17.** Resultados experimentales obtenidos para la optimización del proceso de encapsulación de hesperidina en la muestra precipitada por inclusión molecular con  $\beta$ -CD.

Variables del proceso			Variables respuesta	
Corrida	Temperatura (°C)	Flavonoide/CD (g Hes/g $\beta$ -CD)	FT (mg EAG/g)	Hes (mg/g)
1	30	1	100.199 $\pm$ 0.382 <sup>f</sup>	0.605 $\pm$ 0.007 <sup>de</sup>
2	30	2	163.029 $\pm$ 0.000 <sup>c</sup>	0.615 $\pm$ 0.007 <sup>bcd</sup>
3	30	3	153.957 $\pm$ 0.574 <sup>de</sup>	0.610 $\pm$ 0.000 <sup>cde</sup>
4	40	1	148.676 $\pm$ 0.148 <sup>e</sup>	0.630 $\pm$ 0.000 <sup>b</sup>
5	40	2	165.196 $\pm$ 0.063 <sup>bc</sup>	0.600 $\pm$ 0.000 <sup>e</sup>
6	40	3	170.612 $\pm$ 0.382 <sup>ab</sup>	0.625 $\pm$ 0.007 <sup>bc</sup>
7	50	1	155.446 $\pm$ 0.297 <sup>d</sup>	0.620 $\pm$ 0.000 <sup>bcd</sup>
8	50	2	156.936 $\pm$ 0.574 <sup>d</sup>	0.630 $\pm$ 0.000 <sup>b</sup>
9	50	3	173.320 $\pm$ 0.765 <sup>a</sup>	0.650 $\pm$ 0.000 <sup>a</sup>

Los resultados obtenidos de la muestra sobrenadante presentaron diferentes valores en el contenido de FT con un valor mínimo de 41.024 mg EAG/g y un valor máximo de 74.471 mg EAG/g. Para el caso de hesperidina se obtuvieron cantidades variantes de 0.150 hasta 0.315 mg/g (Cuadro18). En este caso al igual que la muestra total, el contenido de FT y hesperidina mostraron un comportamiento similar, ya que los valores mayores lo presentaron las corridas con combinaciones que tenían la relación Flavonoide/CD de 3, mientras que los resultados con valores menores tanto de FT como en el contenido de hesperidina lo presentaron aquellas corridas con la relación Flavonoide/CD de 1.

Como se observa, en cada una de las muestras (total, precipitado y sobrenadante) las variables de proceso ensayadas sobre el proceso de inclusión generaron importantes efectos en las variables respuesta evaluadas, presentando incluso variaciones, las cuales se pueden atribuir a las mismas condiciones de cada proceso.

**Cuadro 18.** Resultados experimentales obtenidos para la optimización del proceso de encapsulación de hesperidina en la muestra sobrenadante por inclusión molecular con  $\beta$ -CD.

Variables del proceso			Variables respuesta	
Corrida	Temperatura (°C)	Flavonoide/CD (g Hes/g $\beta$ -CD)	FT (mg EAG/g)	Hes (mg/g)
1	30	1	41.024 $\pm$ 0.191 <sup>e</sup>	0.150 $\pm$ 0.000 <sup>h</sup>
2	30	2	56.055 $\pm$ 0.165 <sup>c</sup>	0.220 $\pm$ 0.000 <sup>e</sup>
3	30	3	58.086 $\pm$ 0.274 <sup>c</sup>	0.290 $\pm$ 0.000 <sup>b</sup>
4	40	1	55.649 $\pm$ 0.123 <sup>c</sup>	0.150 $\pm$ 0.000 <sup>h</sup>
5	40	2	55.920 $\pm$ 0.574 <sup>c</sup>	0.200 $\pm$ 0.000 <sup>f</sup>
6	40	3	65.128 $\pm$ 0.489 <sup>b</sup>	0.315 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>
7	50	1	41.025 $\pm$ 0.191 <sup>e</sup>	0.170 $\pm$ 0.000 <sup>g</sup>
8	50	2	47.660 $\pm$ 0.165 <sup>d</sup>	0.230 $\pm$ 0.000 <sup>d</sup>
9	50	3	74.471 $\pm$ 0.148 <sup>a</sup>	0.280 $\pm$ 0.000 <sup>c</sup>

El análisis de varianza efectuado para las variables respuesta obtenidas con el diseño experimental permitió evaluar los coeficientes de los términos significativos en los modelos de regresión. En el Cuadro 19 se reportan los coeficientes lineales (A, B, C, D) y los coeficientes interactivos (AC AD, BC Y BD) correspondientes a los diseños de las tres diferentes partes de la muestra, así como los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y correlación ajustados ( $R^2$  ajustado), siendo estos mayores de 96.15 y 92.72 %, respectivamente, lo cual nos indica la buena adecuación del modelo a los valores experimentales.

**Cuadro 19.** Términos y coeficientes de los modelos obtenidos en la optimización del proceso de encapsulación de hesperidina- $\beta$ -CD en las diferentes partes de la muestra.

Términos	Total		Precipitado		Sobrenadante	
	FT	Hes	FT	Hes	FT	Hes
	Coeficientes					
Constante	120.345	0.53833	154.122	0.620556	55.002	0.222778
A	3.912	-0.00333	-15.061	-0.01056	-3.28	-0.002778
B	2.874	0.025	7.282	-0.00222	3.897	-0.001111
C	-27.368	-0.07667	-19.349	-0.00222	-9.103	-0.066111
D	7.748	0.02667	7.598	-0.00556	-1.79	-0.006111
AC	19.965	0.00167	-19.514	-0.00278	-1.595	-0.00389
AD	-4.183	0.00333	16.37	0.01056	6.124	0.00611
BC	-1.474	0.000	6.62	0.01389	5.853	-0.00556
BD	4.032	0.000	-3.807	-0.01278	-1.189	-0.01556
$R^2$	99.80 %	98.26 %	99.77 %	96.15 %	99.34 %	99.92 %
$R^2$ Ajustado	99.62 %	97.72 %	99.56 %	92.72 %	98.76 %	99.84 %

A, temperatura 30°C; B, temperatura 40°C; C, flavonoide/CD 1; D, flavonoide/CD 2; AC, temperatura 30°C y flavonoide/CD 1; AD, temperatura 30°C y flavonoide/CD 2; BC, temperatura 40°C y flavonoide/CD 1; BD, temperatura 40°C y flavonoide/CD 2. FT, fenoles totales. Hes, hesperidina.

El análisis de correlación además permitió obtener las ecuaciones del modelo para cada diseño aplicado, dando ecuaciones de primer orden correspondientes a las variables respuesta (Hes y FT). En las ecuaciones que a continuación se muestran se integran todos los coeficientes resultantes en cada modelo, de los cuales al momento de realizar el cálculo se seleccionan los coeficientes de las variables que se desean manejar para la estimación y el resto de los coeficientes que no se emplean se igualan a cero, esto se hace sucesivamente realizando cada estimación, basándose en los diseños de regresión utilizados en el programa MiniTAB v 3.1.

**Ecuación 3.** Estimación de hesperidina (mg/g) en muestras totales.

$$\text{Hes (mg/g)} = 0.5383 - A + B - C + D + AC + AD + BC - BD$$

**Ecuación 4.** Estimación de fenoles totales (mg EAG/g) en muestras totales.

$$\text{FT (mg EAG/g)} = 120.345 + A + B - C + D + AC - AD - BC + BD$$

**Ecuación 5.** Estimación de hesperidina (mg/g) en muestras precipitadas.

$$\text{Hes (mg/g)} = 0.620556 - A - B - C - D - AC + AD + BC - BD$$

**Ecuación 6.** Estimación de fenoles totales (mg EAG/g) en muestras precipitadas.

$$\text{FT (mg EAG/g)} = 154.122 - A + B - C + D + AC + AD + BC - BD$$

**Ecuación 7.** Estimación de hesperidina (mg/g) en muestras sobrenadantes.

$$\text{Hes (mg/g)} = 0.222778 - A - B - C - D - AC + AD - BC - BD$$

**Ecuación 8.** Estimación de fenoles totales (mg EAG/g) en muestras sobrenadantes.

$$\text{FT (mg EAG/g)} = 55.022 - A + B - C - D - AC + AD + BC - BD$$

Donde: A= Temperatura 30°C.

B= Temperatura 40°C.

C= Flavonoide/CD 1.

D= Flavonoide/CD 2.

AC= Temperatura 30°C y flavonoide/CD 1.

AD= Temperatura 30°C y flavonoide/CD 2.

BC= Temperatura 40°C y flavonoide/CD 1.

BD= Temperatura 40°C y flavonoide/CD 2.

De esta manera en el Cuadro 20 se muestran las condiciones óptimas generadas por los diferentes modelos de regresión correspondientes a las variables respuesta ensayadas (contenido de hesperidina y fenoles totales), así como las desviaciones porcentuales de los valores experimentales con los calculados por medio de las ecuaciones resultantes en los modelos para cada muestra.



Los valores óptimos para las diferentes variables respuesta corresponden a los valores más altos de cada variable, los cuales dieron además una eficiencia de encapsulación mayor. Es importante mencionar que para que se lleve a cabo la formación de los complejos de inclusión CD-Huésped debe existir un equilibrio entre el huésped soluble, la ciclodextrina soluble y el complejo soluble. Con base en esto, es posible establecer que las condiciones óptimas son aquellas que permiten el desplazamiento a una mayor formación de complejo solubles o insolubles (Precipitado) manteniendo siempre el medio en equilibrio.

Es así que los resultados obtenidos indican que a una temperatura de 40°C y a relaciones de 1 y 3 se favorece el desplazamiento de la reacción hacia la formación de complejos existiendo así una mayor interacción entre la hesperidina y la CD, ya que dichos complejos alcanzan sus valores máximos de la molécula huésped de acuerdo al modelo empleado y a las distintas muestras. Con respecto a las desviaciones obtenidas entre lo predicho por los modelos y lo obtenido de forma experimental, se observó que los valores validan el modelo con las variables empleadas, ya que las desviaciones mayores fueron de 0.07 % para fenoles totales y 0.62 % para el contenido de hesperidina.

**Cuadro 20.** Condiciones de operación óptimas y porcentaje de desviación para las diferentes variables respuesta entre valores calculados y experimentales.

Muestra	Temperatura (°C)	Flavonoide/ CD (g Hes/g β-CD)	Optimo calculado Hes (mg/g)	Optimo experimental Hes (mg/g)	Desviación (%)	Optimo calculado FT (mg EAG/g)	Optimo experimental FT (mg EAG/g)	Desviación (%)
Total	40	2	0.590	0.590	0.00	134.99	134.99	0.00
Total	40	3	0.610	0.613	0.55	140.28	140.28	0.00
Total	50	2	0.540	0.543	0.62	121.458	121.548	0.07
Precipitado	30	1	0.605	0.605	0.00	100.199	100.2	0.00
Precipitado	40	1	0.630	0.630	0.00	148.676	148.676	0.00
Precipitado	40	3	0.625	0.625	0.00	170.612	170.341	-0.16
Sobrenadante	40	1	0.150	0.150	0.00	55.649	55.649	0.00
Sobrenadante	40	3	0.315	0.316	0.32	65.128	65.128	0.00
Sobrenadante	50	1	0.170	0.170	0.00	41.025	41.024	0.00

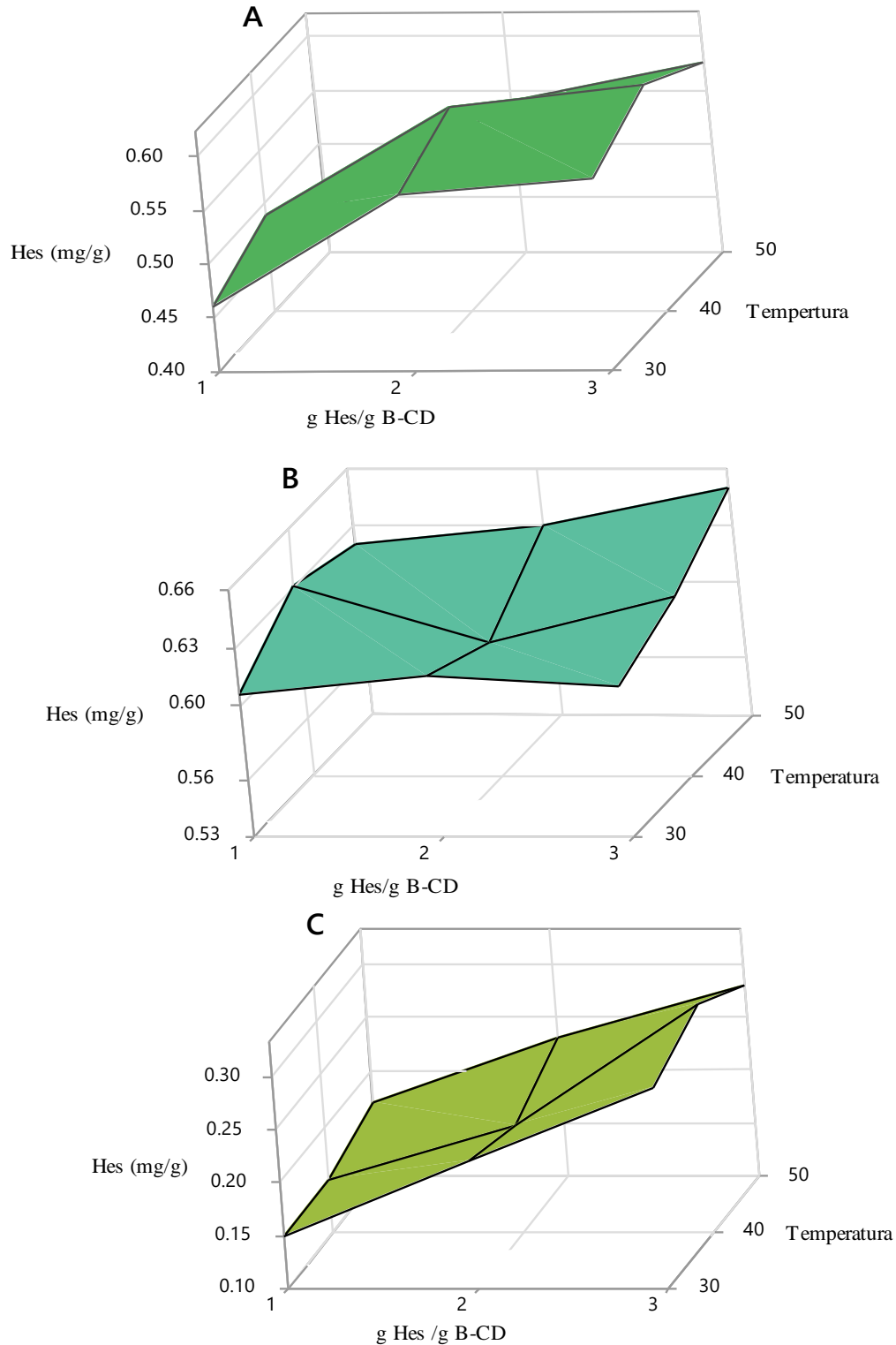
De acuerdo a la encapsulación llevada por distintos autores es posible predecir que las mejores condiciones de encapsulación son variables de acuerdo a cada molécula huésped. Por ejemplo Ficara y col. (2001) al encapsular hesperidina con β-CD encontró que las condiciones adecuadas que le permitía la inclusión de la molécula en la cavidad de la CD se encontraban al emplear una relación molar 1:1, temperatura ambiente y un tiempo prolongado de 72 horas. Así mismo, Hardaruga y col. (2012) obtuvieron las mejores condiciones de encapsulación de flavonoides a una temperatura de 50°C, una relación de Flavonoide: CD de 1:4, temperatura semejante a las óptimas en este trabajo.

El comportamiento en la encapsulación de hesperidina se puede apreciar en la Figura 22, ya que de acuerdo con el modelo de regresión, se generaron gráficos de superficie de respuesta y se utilizaron para expresar intuitivamente el efecto de las variables (temperatura de agitación y relación Flavonoide/CD) en la concentración de hesperidina encapsulada.

En la Figura 22 A se muestra el gráfico correspondiente a la muestra total, donde a mayor relación flavonoide/CD (g Hes/g  $\beta$ -CD) existió un incremento en la concentración de hesperidina y cuando la temperatura se encontró en 40°C que es la temperatura intermedia, la concentración de hesperidina llegó a su pico lo cual demostró que estas condiciones están permitiendo la concentración de hesperidina mediante la formación de complejos, ya que en temperaturas mayores (50°C) ya hay una ligera disminución en el contenido de hesperidina, que de acuerdo a Mercader y col. (2010) la mayoría de los complejos empiezan a desnaturalizarse y perder el equilibrio a partir de 50 y 60°C, esto debido a que la encapsulación con CDs se da por las interacciones de Van der Waals, formación de puentes de hidrogeno y polaridades principalmente, las cuales corresponden a enlaces de atracción débiles.

En la Figura 22 B se observa el comportamiento del precipitado, donde el incremento de la relación flavonoide/CD (g Hes/g  $\beta$ -CD) no mostró un efecto significativo, por lo que tiende a permanecer prácticamente constante. Sin embargo, la relación (g Hes/g  $\beta$ -CD) en combinación con la variable temperatura presentaron un efecto favorable, lo que permitió que a temperaturas de 50°C y relación de 3 la concentración de hesperidina fuera creciente. Este comportamiento puede explicarse debido a que las muestras precipitadas al ser más insolubles pueden ser más termo resistentes y formar interacciones más fuertes, lo que permite emplear temperaturas elevadas, las cuales favorecen la formación de complejos debido al aumento de la solubilidad y al favorecimiento de la reacción ya que las moléculas de hesperidina se mueven más rápido desplazando las moléculas de agua, acelerando así la tasa de inclusión. (Ma y col., 2018).

Y en la Figura 22 C se encuentra el resultado correspondiente al sobrenadante, observando un efecto de concentración creciente de hesperidina al aumentar la relación flavonoide/CD (g Hes/g  $\beta$ -CD) en conjunto con la temperatura, siendo este efecto más notable a temperaturas de 40°C. Sin embargo, en la temperatura máxima (50°C) con la relación (g Hes/g  $\beta$ -CD) 3 la concentración de hesperidina en el encapsulado sobrenadante comienza a disminuir, este efecto podría estar ocasionado por la desestabilización del complejo debido a la elevada temperatura (Mercader y col., 2010) observada también en la muestra total, además, fenómeno podría dar como resultado mayor hesperidina libre la cual se expone más fácilmente a la temperatura de proceso y secado dando una posible degradación no deseada (Brglez y col., 2016).



**Figura 22.** Gráficas de superficie de respuesta para los efectos de la relación flavonoide/CD (g Hes/g  $\beta$ -CD) y la temperatura de encapsulación en los diferentes modelos de acuerdo a la muestra (A, total; B, Precipitado; C, sobrenadante).

### 5.5.6 Determinación de eficiencias de encapsulación por inclusión molecular de hesperidina- $\beta$ -CD.

La determinación de la eficiencia de encapsulación de hesperidina se determinó en base a los sólidos obtenidos y la concentración de hesperidina en el producto encapsulado, lo cual proporciona un rendimiento del proceso y por tanto la eficiencia de encapsulación para cada muestra: total precipitado y sobrenadante (Cuadro 21, 22 y 23).

En el Cuadro 21 se observan los resultados correspondientes a la muestra total, donde las eficiencias de encapsulación mayor se encuentran resaltadas siendo de 95.97, 93.11 y 92.47 % correspondientes a los tratamientos Total (3) 40°C, Total (2) 50°C y Total (2) 40°C, respectivamente. Se puede observar que la temperatura promedio de una buena eficiencia en se mantiene en 40°C y a medida que la relación aumenta (2 y 3) la eficiencia de encapsulación también es mayor. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que cuando la temperatura del medio disolvente aumenta, la solubilidad de las CDs como del analito también aumenta, por lo tanto existe la probabilidad de formar más complejos de inclusión (Del Valle y col., 2004). Asimismo, se conoce que en los complejos que forman las CDs también es posible incluir más de una molécula huésped en la cavidad de las CDs, lo que puede estar pasando al aumentar la relación, sin embargo, no en todos los casos la relación y temperatura mayor da un porcentaje de eficiencia alto, lo cual de acuerdo a Mercader y col. (2010) puede deberse debido a que a altas temperaturas pueden desestabilizar los complejos y degradar el analito, al menos que estén fuertemente ligados.

**Cuadro 21.** Eficiencia de encapsulación de la muestra total de los complejos de inclusión  $\beta$ -CD-Hesperidina.

Muestras Total	Encapsulado (g)	Rendimiento del proceso (%)	Hes (mg/g)	Eficiencia de encapsulación (%)
Total (1) 30°C	0.903	77.17	0.460	<b>88.75</b>
Total (2) 30°C	1.507	85.86	0.565	<b>90.96</b>
Total (3) 30°C	2.211	94.48	0.580	<b>91.33</b>
Total (1) 40°C	0.827	70.68	0.490	<b>86.58</b>
Total (2) 40°C	1.467	83.59	0.590	<b>92.47</b>
Total (3) 40°C	2.209	94.40	0.610	<b>95.97</b>
Total (1) 50°C	0.907	77.52	0.435	<b>84.30</b>
Total (2) 50°C	1.614	91.96	0.540	<b>93.11</b>
Total (3) 50°C	2.204	94.18	0.575	<b>90.26</b>

Mientras que en el Cuadro 22 se muestran los resultados correspondientes a la eficiencia de encapsulación de las muestras precipitadas, los cuales indican que la eficiencia de encapsulación mayor corresponden al Precipitado (1) 30°C, Precipitado (1) 40°C y Precipitado (3) 40°C con porcentajes de 80.15, 75.25 y 76.47 % respectivamente. En este caso, comparado con la muestra total, se puede observar que las muestras con mayor eficiencia de encapsulación corresponden a la relación flavonoide/CD de 1, lo que indica que no es necesario elevar tanto la estequiometría (hesperidina: CD) para obtener buenos rendimientos de encapsulación. Además, las muestras de precipitado son las que mayor concentración de hesperidina presentan, mientras que las muestras totales presentan valores menores pero cantidades de producto seco mayores, que resulta en mejores resultados de eficiencias de encapsulación en la muestra total. Por otra parte, respecto a la temperatura, se puede observar que tanto en las muestras totales y precipitadas las eficiencias mayores ocurren a 40°C, este comportamiento esta en concordancia con Restrepo y col. (2008) quienes encontraron que la temperatura de encapsulamiento para una buena eficiencia de encapsulación con  $\beta$ -Ciclodextrinas se encontraba a 40°C.

**Cuadro 22.** Eficiencia de encapsulación de las muestras precipitadas de los complejos de inclusión  $\beta$ -CD-Hesperidina.

Muestras	Producto (g)	Rendimiento del proceso (%)	Hes (mg/g)	Eficiencia de encapsulación (%)
Precipitado (1) 30°C	0.620	52.99	0.605	<b>80.15</b>
Precipitado (2) 30°C	1.119	63.76	0.615	<b>73.52</b>
Precipitado (3) 30°C	1.690	72.22	0.610	<b>73.42</b>
Precipitado (1) 40°C	0.559	47.77	0.630	<b>75.25</b>
Precipitado (2) 40°C	1.148	65.41	0.600	<b>73.59</b>
Precipitado (3) 40°C	1.718	73.41	0.625	<b>76.47</b>
Precipitado (1) 50°C	0.555	47.43	0.620	<b>73.52</b>
Precipitado (2) 50°C	1.024	58.34	0.630	<b>68.92</b>
Precipitado (3) 50°C	1.578	67.43	0.650	<b>73.05</b>

Respecto a los productos sobrenadantes, en el Cuadro 23 se observan los resultados correspondientes, observando en las muestras resaltadas los valores que presentaron una eficiencia de encapsulación mayor de 21.24, 21.33 y 22.26 %, los cuales corresponden al Sobrenadante (1) 40°C, Sobrenadante (3) 40°C y Sobrenadante (1) 50°C respectivamente. En dichos resultados se puede observar que se presentan eficiencias de encapsulación menor respecto a las muestras totales y precipitadas, esto debido a que las muestras sobrenadante presentaron poca concentración de hesperidina y poca cantidad de producto viéndose reflejado en la eficiencia de encapsulación, lo que se demuestra que la mayor cantidad de hesperidina alimentada se concentra en la parte precipitada, sin embargo, con la confirmación de la formación de complejos por FT-IR (Sección 6.5.7) se pudo observar que la hesperidina encapsulada en el sobrenadante estaba incluida totalmente en la cavidad de la CD empleando una relación 1, mientras que en el precipitado no se pudo concluir la formación de complejos por el FT-IR debido a que no se vio un cambio considerable entre el complejo y la mezcla física, en el cual se analizó un complejo con relación 3. De esta manera estos resultados pueden concluir que el precipitado puede presentar una concentración mayor de hesperidina, pero no garantiza que este encapsulada en su totalidad, mientras que el sobrenadante el presentó cantidades menores pero por medio del FT-IR se comprueba que se encuentran incluidas totalmente en la  $\beta$ -CD.

**Cuadro 23.** Eficiencia de encapsulación de la muestra sobrenadante de los complejos de inclusión  $\beta$ -CD-Hesperidina.

Muestras	Producto (g)	Rendimiento del proceso (%)	Hes (mg/g)	Eficiencia de encapsulación (%)
Sobrenadante (1) 30°C	0.625	53.41	0.150	<b>20.03</b>
Sobrenadante (2) 30°C	0.598	34.07	0.220	<b>14.05</b>
Sobrenadante (3) 30°C	0.698	29.82	0.290	<b>14.41</b>
Sobrenadante (1) 40°C	0.694	59.31	0.150	<b>22.24</b>
Sobrenadante (2) 40°C	0.674	38.40	0.200	<b>14.40</b>
Sobrenadante (3) 40°C	0.951	40.64	0.315	<b>21.33</b>
Sobrenadante (1) 50°C	0.613	52.39	0.170	<b>22.26</b>
Sobrenadante (2) 50°C	0.630	35.89	0.230	<b>15.48</b>
Sobrenadante (3) 50°C	0.742	31.70	0.280	<b>14.79</b>

Anteriormente ya se han realizado estudios sobre la inclusión molecular con ciclodextrinas y la evaluación de su eficiencia de encapsulación, Żyżelewicz y col. (2018) informaron que al desarrollar el complejo de inclusión Catequina- $\beta$ -CD obtenido mediante la complejación a 40°C durante 2 y 3 horas, la relación de inclusión fue de 62.9 y 64.9 %, respectivamente, las cuales son menores a las obtenidas en las muestras totales y precipitados, pero superiores a la muestra sobrenadante de la presente investigación. Mientras que Zhiying y col. (2013) reportaron la encapsulación quercetina obtenida a partir de cebolla empleado  $\beta$ -CD, en el cual obtuvieron rendimientos totales de 71.1 %, valor muy semejante a los obtenidos en la muestra precipitada y menor comparado a las muestras totales del presente trabajo.

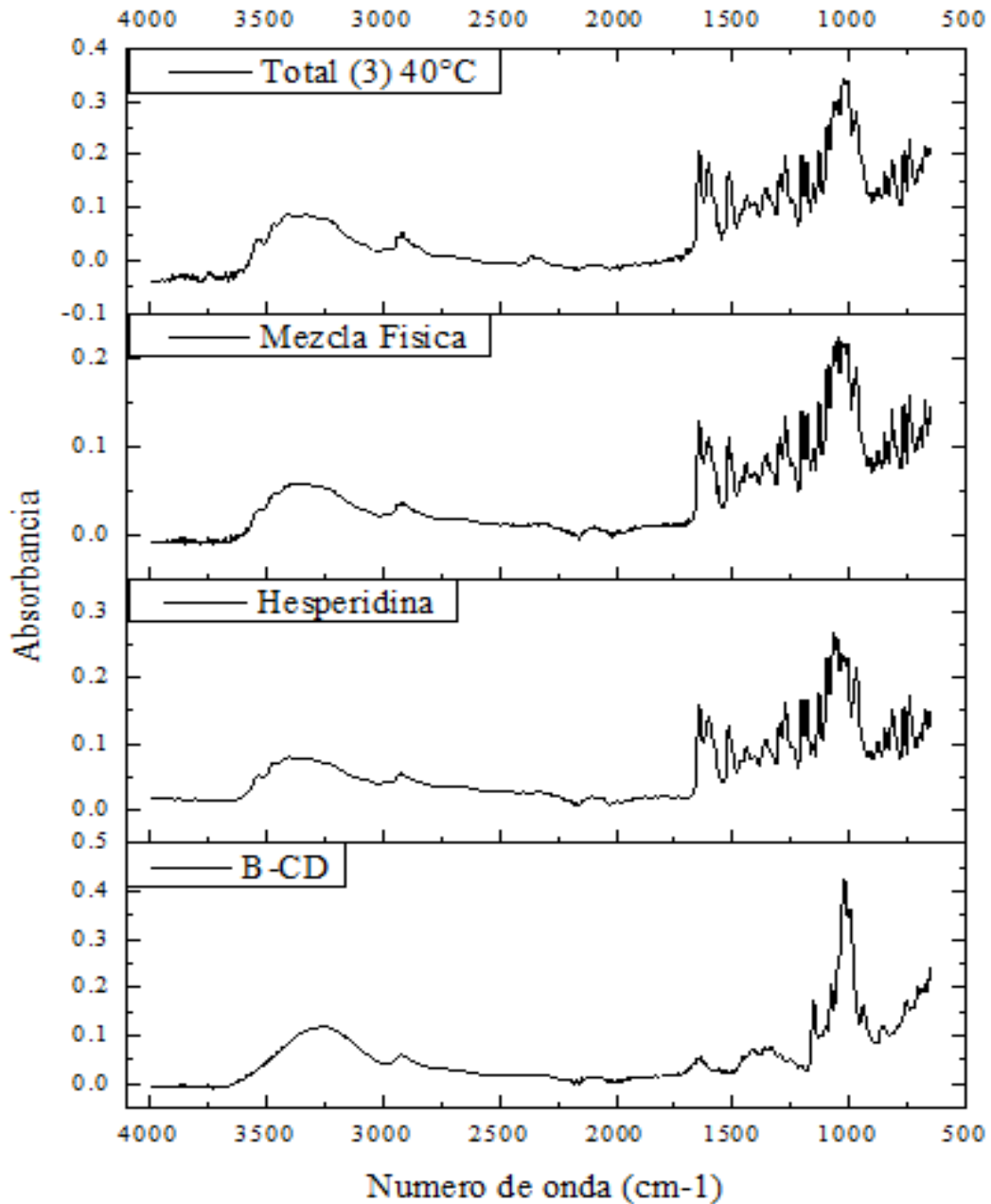
### 5.5.7 Confirmación de los complejos de inclusión.

#### 5.5.7.1 Espectroscopia FT-IR de los complejos de inclusión hesperidina- $\beta$ -CD.

Se realizó un análisis espectroscópico FT-IR a los mejores tratamientos correspondientes a cada muestra (Total, precipitado y sobrenadante) ya que los espectros correspondientes a la misma parte de la muestra no presentaron cambios tan representativos. Este análisis permitió confirmar la interacción y la formación de complejos entre el flavonoide y la CD. Asimismo, los espectros FT-IR del complejo se compararon con los de la mezcla física y las moléculas puras. En las Figuras 23, 24 y 25 se muestran los espectros de la  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), hesperidina, mezcla física y las muestras correspondientes.

El espectro FT-IR de la  $\beta$ -CD están dominado por bandas de vibración características a los carbohidratos debido a que existen 7 unidades repetidas de glucosa en la molécula. Este mostró bandas con absorción con un máximo de a 3274  $\text{cm}^{-1}$  banda relativamente ancha e intensa correspondiente al estiramiento del O-H proveniente de la glucosa, además existieron otras bandas características a 2927  $\text{cm}^{-1}$  banda de estiramiento del enlace C-H-, a 1653  $\text{cm}^{-1}$  aparece una banda asociada a la unión del enlace H-O-H característica al residuo de agua en la parte interna de la  $\beta$ -CD. La banda de 1329  $\text{cm}^{-1}$  corresponde la deformación del enlace O-H, mientras que en el intervalo espectral ubicado a 1151, 1073, 1021 y 939  $\text{cm}^{-1}$  se muestran los picos más intensos correspondientes a bandas de estiramiento de los enlaces C-O-C y C-O en el grupo C-OH, bandas de unión en el enlace O-H, bandas de flexión de C-O-H y estiramiento del enlace C-C respectivamente.

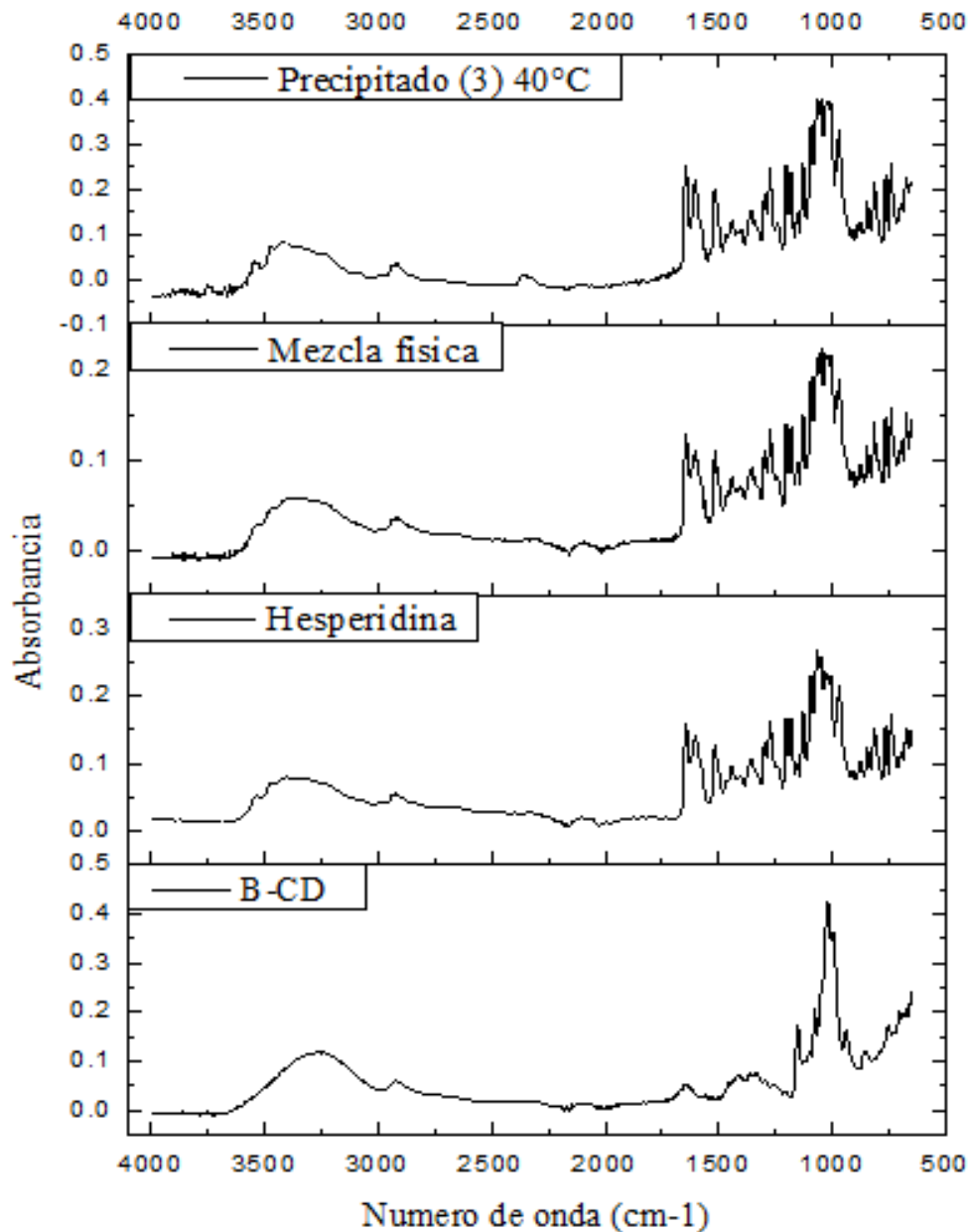
En el espectro FT-IR de hesperidina las bandas de absorción características se presentaron en 3363  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones de estiramiento del O-H, a 2937  $\text{cm}^{-1}$  banda de estiramiento de los enlaces C-H y C-H<sub>2</sub> alifático. Las bandas de vibración a 1645 y 1606  $\text{cm}^{-1}$  se dieron por el estiramiento del C=O en cetonas y a 1605, 1517, 1444  $\text{cm}^{-1}$  se dieron bandas por las vibraciones de valencia C=C en los anillos de benceno, demás existieron bandas de absorción en 967–740  $\text{cm}^{-1}$  las cuales son específicas para las vibraciones de pulsación en la unidad de glucopiranosil y las vibraciones de deformación de los enlaces C-H. Respecto a la mezcla física el espectro FT-IR dio una combinación de los espectros de la  $\beta$ -CD y hesperidina pura, destacando principalmente las bandas características de la hesperidina ya que en esta muestra no existe la encapsulación del compuesto y su estequiometría corresponde a 3:1 (Hesperidina/CD). El espectro FT-IR de la muestra total (3) 40°C (Figura 23) presentó pocas diferencias entre las bandas características de la hesperidina y la  $\beta$ -CD, sin embargo, se observó una ligera disminución y desplazamiento de la banda 967  $\text{cm}^{-1}$  característica de hesperidina, que como se mencionó anteriormente corresponde a las vibraciones de pulsación de la unidad glucopiranosil, lo cual puede deberse a la presencia del glucósido de la hesperidina en la cavidad de la  $\beta$ -CD, por que como lo reporta Ficarra y col. (2002) los cambios en las bandas características de las sustancias puras confirman la existencia de la formación del complejo como un nuevo compuesto con diferentes bandas espectroscópicas.



**Figura 23.** Espectros FT-IR de  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), hesperidina, mezcla física y muestra total (3) 40°C. Se consideró una región en un rango de 4000-500 cm<sup>-1</sup>.

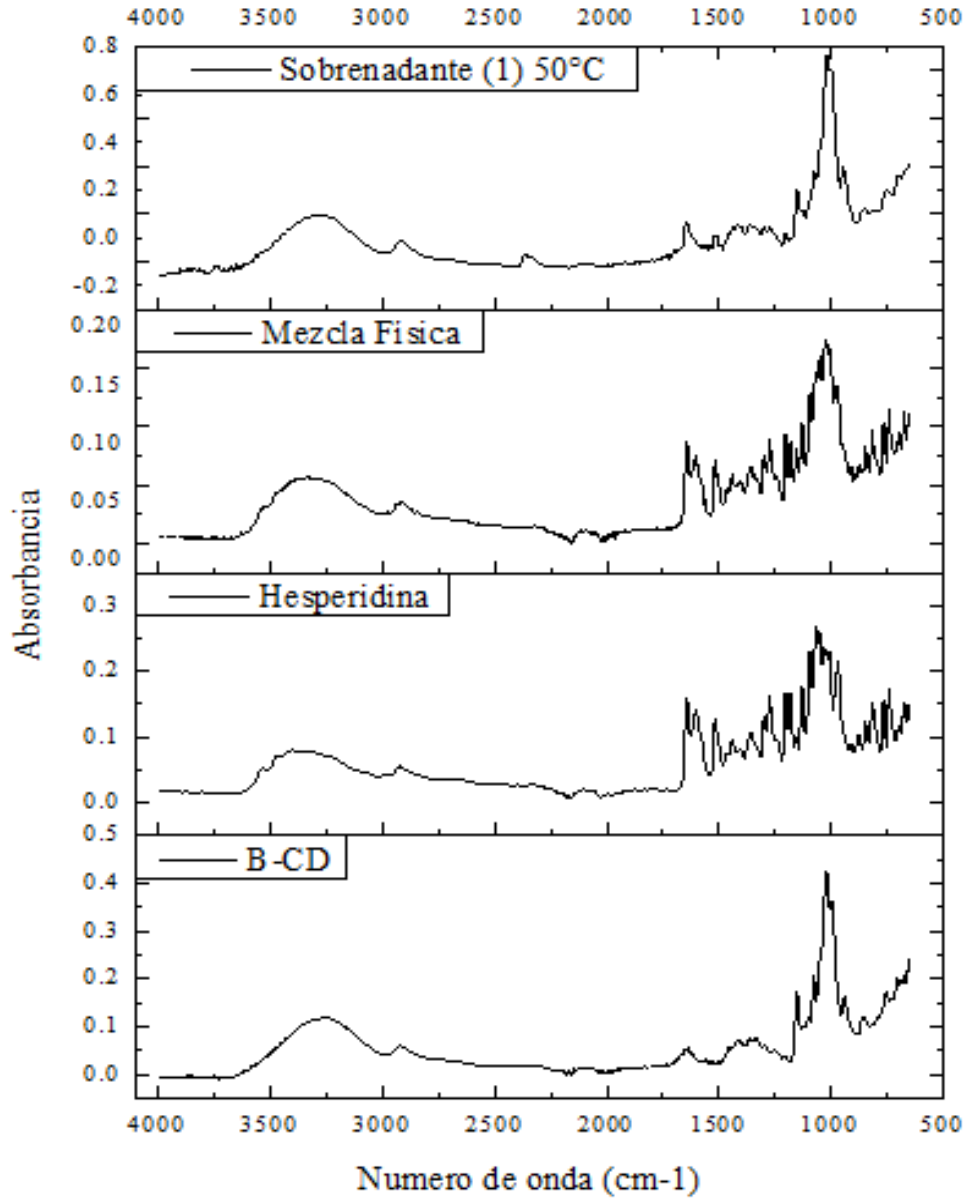
Por otra parte en referente a la muestra precipitada (3) 40°C la cual se muestra en la Figura 24, no mostró cambios notables con respecto a la mezcla física, por lo que no fueron concluyentes en cuanto a detectar la posible formación del complejo de inclusión por este método.





**Figura 24.** Espectros FT-IR de  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), hesperidina, mezcla física y muestra precipitado (3) 40°C. Se consideró una región en un rango de 4000-500 cm<sup>-1</sup>.

En lo que respecta al espectro FT-IR de la muestra sobrenadante (1) 50°C, se observó que las bandas de absorción características de la hesperidina (1645, 1605, 1517, 1444 967 y 740 correspondientes al estiramiento del C=O, vibraciones de valencia C=C en los anillos de benceno, pulsación en la unidad de glucopiranosil y las vibraciones de deformación de los enlaces C-H) se suprimieron casi por completo, lo que indica que la molécula del flavonoide se puede encontrar completamente atrapada en la cavidad de la  $\beta$ -CD, formando así un complejo de inclusión.



**Figura 25.** Espectros FT-IR de  $\beta$ -ciclodextrina pura ( $\beta$ -CD), hesperidina, mezcla física y muestra sobrenadante (1) 50°C. Se consideró una región en un rango de 4000-500 cm<sup>-1</sup>.

### 5.5.8 Determinación del porcentaje de solubilidad de los complejos de inclusión hesperidina- $\beta$ -CD óptimos de acuerdo a la eficiencia de encapsulación.

La determinación del porcentaje de solubilidad de los complejos de hesperidina- $\beta$ -CD se realizó seleccionando los tres mejores tratamientos de cada muestra (Total, precipitado y sobrenadante) de acuerdo con la eficiencia de encapsulación. La solubilidad se les determinó midiendo el porcentaje de sólidos disueltos en agua a temperatura ambiente, y para la verificación de la presencia de hesperidina en la parte solubilizada se le determinaron los fenoles totales y se comparó con el encapsulado total. Los resultados obtenidos se muestran en la Cuadro 24. Adicionalmente, como tratamiento control se consideró la hesperidina sin encapsular, la cual presentó únicamente el 6 % de solubilidad.

**Cuadro 24.** Determinación del porcentaje de solubilidad en agua de los diferentes complejos de inclusión de hesperidina- $\beta$ -CD y su verificación por fenoles totales.

Muestra	% solubilidad	Encapsulado total	Encapsulado solubilizado
		Fenoles totales (mg EAG/g Encapsulado)	Fenoles totales (mg EAG/g Encapsulado)
Total (2) 40°C	<b>32 ± 0.000</b>	134.999	32.942
Total (3) 40°C	<b>15 ± 1.414</b>	140.280	34.028
Total (2) 50°C	<b>36 ± 0.000</b>	121.458	29.081
Precipitado (1) 30°C	<b>22 ± 2.828</b>	100.199	25.871
Precipitado (1) 40°C	<b>18 ± 0.000</b>	148.676	46.126
Precipitado (3) 40°C	<b>29 ± 1.414</b>	170.612	44.526
Sobrenadante (1) 40°C	<b>77 ± 1.414</b>	55.649	27.403
Sobrenadante (3) 40°C	<b>67 ± 1.414</b>	65.128	31.220
Sobrenadante (1) 50°C	<b>79 ± 1.414</b>	41.025	21.211

En los resultados obtenidos se observa que las muestras de sobrenadante son las que presentaron una solubilidad considerable siendo esta de 67 a 79 % lo cual corresponde a un incremento de hasta 12 veces su solubilidad. Mientras que la muestra precipitada fue la que presentó los porcentajes mínimos de solubilidad ya que estos iban del 18 al 29 %, aun así, fue notable que existió un aumento ya que al compararlo con el tratamiento control se observó que su solubilidad mejoró de 3 a 5 veces. Cabe mencionar que el precipitado, específicamente la muestra (3) 40°C mejoró 5 veces su solubilidad, lo cual representa un buen tratamiento ya que con los análisis previos se observa que existió una buena eficiencia de encapsulación (76.47 %) y a su vez una concentración mayor de hesperidina en el encapsulado (0.625 mg/g), sin embargo, la confirmación por el método FT-IR no se pudo concretar ya que no presenta una diferencia notoria a la mezcla física. Por otro lado, en la muestra sobrenadante (1) 50°C la cual presentó una buena solubilidad, se observó en el espectro FT-IR una encapsulación total de la molécula en la cavidad de la  $\beta$ -CD, lo cual es congruente con la mejora de la solubilidad.

Al comparar los resultados con algunos autores, se encontró que Sánchez y col., (2017) realizaron complejos de inclusión donde emplearon hesperidina y tres tipos de ciclodextrinas

( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD) a temperatura y agitación constantes (25°C y 200 rpm), donde tuvieron como resultado que al emplear  $\beta$ -CD en un complejo 1:1 la solubilidad aumentó hasta 3 veces, siendo útil dicho complejo como preservador natural y antioxidante en jugos naturales. Se pueden observar que los resultados obtenidos en la presente investigación son mayores lo cual puede brindar un mejor aprovechamiento.

Por otra parte, Ficarra y col. (2001) realizaron un complejo de hesperidina- $\beta$ -CD en una relación molar 1:1, empleando una temperatura ambiente durante 72 horas, donde tuvieron como resultado la inclusión de la hesperidina en la CD y una mejora en la solubilidad. Asimismo, Tommasini y col. (2004) también realizaron estudios de solubilidad del complejo de inclusión de hesperidina-  $\beta$ -CD el cual presentaba una estequiometría de 1:1, donde obtuvieron que la hesperidina aumentó su solubilidad hasta 30 veces más, cabe mencionar que la prueba realizada por Tommasini y col. (2004) se llevó a cabo empleando como medio un tampón de fosfato sódico 100 mM pH 6.5 y fueron aumentando exponencialmente la temperatura hasta llegar a los 90°C. Evidentemente este comportamiento permitió una mayor disolución de hesperidina en el medio comparado con lo obtenido en la presente investigación, debido a que cuando la temperatura aumenta la formación de los complejos también suele ser mayor ya que existe un desplazamiento de las moléculas y por tanto la solubilidad también suele aumentar, sin embargo, hay que tener en cuenta que a veces con el incremento de la temperatura se pueden desnaturalizar los complejos y por tanto perder la molécula huésped.

El aumento de la solubilidad de la hesperidina se atribuye a la formación de complejos de inclusión con  $\beta$ -CD, como lo demuestra el método FT-IR (Corciova y col., 2014). Además, dentro de los resultados se observa que en las diferentes muestras se obtuvieron incrementos variables, dependiendo de las condiciones de operación y la muestra ensayada. De manera general, los ensayos realizados demostraron una mejora en la actividad antioxidante, eficiencia de encapsulación y solubilidad, lo que en conjunto aumenta la posibilidad de usar los complejos de inclusión en diversas preparaciones o áreas de la industria.

## 6. Conclusiones.

El análisis comparativo entre los diferentes extractos de orégano mexicano (*L. graveolens*), con y sin aceite esencial, permitieron valorar el residuo sólido obtenido tras la extracción del aceite esencial de orégano, siendo fuente importante de pinocembrina por su contenido mayores de este compuesto (0.766 mg/mL), aun cuando presentaba valores ligeramente menores de fenoles totales y DPPH con respecto al extracto de orégano original. Por lo tanto, este subproducto residual representa una rica fuente de compuestos bioactivos que al valorizarse genera el desarrollo de nuevos productos y procesos, asimismo, se vería representado como una nueva fuente de ingresos económicos.

El fraccionamiento del orégano sin aceite esencial por dos diferentes métodos, permitió seleccionar la columna cromatográfica con silica gel (polar) como técnica de obtención de fracciones ricas en pinocembrina, ya que se lograron obtener eficiencias de recuperación considerables 54.50 %, colocar mayor cantidad de muestra, reducir el volumen del solvente respecto al purificador automatizado (no polar) que corresponde al otro método utilizado, además de que no existió diferencia notable en la pureza de las fracciones obtenidas en ambos métodos. De esta manera, este fraccionamiento e identificación proporcionó una fracción rica en pinocembrina compuesto bioactivos con múltiples propiedades, en conjunto con galangina y naringenina, que de acuerdo a lo registrado por Flores y col. (2016) esto puede deberse a la gran similitud estructural que estos presentan ya que son los compuestos flavonoides de mayor concentración dentro del orégano mexicano.

Al tener una fracción con alta concentración de un flavonoide importante como lo es la pinocembrina, fue importante considerar una estrategia eficaz que permitiera superar las limitantes que este compuesto presenta como su limitada solubilidad acuosa y biodisponibilidad, degradación, bajas tasas de absorción y el metabolismo rápido. Fue así que la encapsulación de pinocembrina con  $\beta$ -ciclodextrina permitió aumentar en un factor de 2 a 4 veces su solubilidad, resaltando la muestra sobrenadante, además de potenciar la actividad antioxidante de los complejos formados comparado con la pinocembrina sin encapsulada. Estos resultados traen consigo efectos sinérgicos ya que de acuerdo a la literatura al emplear las CDs se mejora la solubilidad, permitiendo un mayor aprovechamiento del compuesto y sus propiedades, destacando que la pinocembrina ya representa una nuevo fármaco de tratamiento para el accidente cerebrovascular isquémico y actualmente está en curso en ensayos clínicos de fase II (Shen y col., 2019), lo cual podría contribuir para reducir las dosis terapéuticas o bien, que exista una mejor absorción del compuesto en los sistemas biológicos. Además, al ser la pinocembrina un compuesto con múltiples propiedades bioactivas estas pueden ser de total importancia en otras industrias como la industria alimentaria, la cual actualmente busca la utilización de antioxidantes naturales que brinden la protección de la integridad del alimento.

La evaluación de las condiciones del proceso de encapsulación de hesperidina se lograron obtener de manera que la temperatura óptima del proceso resultó de 40°C generalmente, mientras que la relación flavonoide/CD en la que se podía concentrar mayor cantidad de hesperidina fue de 1 g Hes/g CD para precipitado y sobrenadante, y relación 3 g Hes/g CD para la muestra total, ya que permitía mantener de mejor manera el equilibrio y por tanto una mejor formación de complejos. Al mismo modo este encapsulamiento con  $\beta$ -CD permitió un incremento de la solubilidad de la hesperidina de 3 a 12 veces más, siendo la muestra sobrenadante la que presentó un mayor aumento de la solubilidad (67 a 79 %) lo que brindó importantes mejoras en las propiedades de la misma al igual que en la fracción de la pinocembrina, lo que permite un mejor aprovechamiento del flavonoide y mayor biodisponibilidad. Es importante recordar que la hesperidina es un compuesto flavonoide abundante en la cascara de limón mexicano con propiedades bioactivas interesantes y una vez mejoradas sus propiedades, se sugiere que este subproducto puede ser explotado en el campo de los antioxidantes, representando una fuente no convencional de metabolitos secundarios y a su vez se esto da un uso integral de un fruto producido en el país.

Finalmente, el presente trabajo contribuye al potencial desarrollo de nuevos procesos de valorización de residuos agroindustriales del orégano mexicano y limón mexicano los cuales hasta la actualidad son pocos aprovechados aun representando una fuente importante de compuestos flavonoides (pinocembrina y hesperidina) los cuales pueden ser utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica o agrícola debido a sus múltiples propiedades ahora ya mejoradas.

## 7. Referencias bibliográficas.

- Agrawal, Y.O. Sharma, P.K. Shrivastava, B. Ojha, S. HM Upadhyaya, Arya, D.S. Goyal, S.N. Das, A. (2014). La hesperidina produce actividad cardioprotectora a través de la vía PPAR- $\gamma$  en un modelo de cardiopatía isquémica en ratas diabéticas. PLoS ONE, 9 (11), pág. e111212, 10.1371/journal.pone.0111212
- Anwer MK, Jamil S., Ansari MJ, Al-Shdefat R., Ali BE, Ganaie MA, Abdel-Kader MS, Shakeel F. Complejos binarios y ternarios solubles en agua de diosmina con  $\beta$ -ciclodextrina: Caracterización espectroscópica, estudios de liberación y actividad antioxidante. J. Mol. Liq. 2014; 199: 35–41. doi: 10.1016/j.molliq.2014.08.012.
- Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J. R., Stashenko, E., & del Valle, J. M. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub> after steam distillation. Industrial Crops and Products, 146, 112170. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112170
- Asensi, M. Ortega, A. Mena, S. Feddi, F. Estrela, JM. (2011). Polifenoles naturales en la terapia del cáncer crítico Reverendo Clin. Ciencias de laboratorio , 48, págs. 197-216, 10.3109/10408363.2011.631268
- Bautista, I., Cristobal, N., Guillermo, C. G., Torres, C., Flores, C., Deepak, K., Chavez, M. L. (2021). Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) as Source of Bioactive Compounds: A Review. Molecules 2021, 26(17), 5156; <https://doi.org/10.3390/molecules26175156>.
- Bianchi SE, Machado BEK, Silva MGC, Silva MMA, Bosco LD, Marques MS, Horn AP, Persich L., Geller FC, Argenta D., y col. La asociación de cumestrol/hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina incorporada en hidrogel de hidroxipropilmetilcelulosa muestra un efecto de cicatrización de heridas: estudio in vitro e in vivo. EUR. J. Pharm. ciencia 2018; 119: 179–188. doi: 10.1016/j.ejps.2018.04.019.
- Braga, SS, Lysenko, K., El-Saleh, F. y Paz, FAA (2021). Complejos de ciclodextrina-efavirenz investigados mediante estudios de estado sólido y solubilidad. Procedimientos, 78 (1), 15. <https://doi.org/10.3390/IECP2020-08690>.
- Brglez M, M. Knez Hrnčič, M. Škerget., Ž. Knez. Bren, U. Polifenoles: métodos de extracción, acción antioxidante, biodisponibilidad y efectos anticancerígenos. Moléculas , 21 ( 2016 ) , pág. 901 , 10.3390/moléculas 21070901
- B.d.S. Lima, S. Shanmugam, J.d.S. Siqueira Quintans, L.J. Quintans-Junior, A.A. de Souza Araujo, Inclusion complex with cyclodextrins enhances the bioavailability of flavonoid compounds: a systematic review, Phytochem. Rev. 18 (2019) 1337–1359, <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09650-y>.
- Canbolat, M. F., Celebioglu, A., & Uyar, T. (2014). Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 115, 15–21. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.11.02

- Cano, M., Stringheta, P., Ramos, A., Cal, J, Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*: 6 (4), 420-428 (2005).
- Cetin Babaoglu H., Bayrak A., Ozdemir N., Ozgun N. Encapsulación de aceite esencial de clavo en hidroxipropil beta-ciclodextrina para caracterización, liberación controlada y actividad antioxidante. *J. Proceso de Alimentos. Preservar* 2017; 41: e13202. doi: 10.1111/jfpp.13202.
- Cid, T.SÁvila, R., Ochoa, C.E., Rivera, B.E., Nevárez, G.V. (2019). Actividad Antioxidante y Antimicrobiana del Aceite Esencial, Hidrosol y Extractos de Residuos Sólidos de Orégano Mexicano (*Poliomintha longiflora*). *Plantas* 2019, 8, 22.
- Ciobanu, A., Landy, D., & Fourmentin, S. (2013). Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Research International*, 53(1), 110–114. doi:10.1016/j.foodres.2013.03.048
- Crumling, M.A.King, K.A Duncan R.K. (2017). Cyclodextrins and Iatrogenic Hearing Loss: New Drugs with Significant Risk. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11 p. 355, 10.3389/fncel.2017.00355
- Cutrignelli A., Lopedota A., Denora N., Iacobazzi RM, Fanizza E., Laquintana V., Perrone M., Maggi V., Franco M. Un nuevo complejo de curcumina con sulfobutiléter-β-ciclodextrina: estudios de caracterización y evaluación in vitro de actividad citotóxica y antioxidante en células HepG-2. *J. Pharm. ciencia* 2014; 103: 3932–3940. doi: 10.1002/jps.24200.
- Cortés-Chitala, M. del C., Flores-Martínez, H., Orozco-Ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo, Á., Estarrón-Espinosa, M., & López-Muraira, I. (2021). Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. *Molecules*, 26(3), 702. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26030702>
- Dhanya, R. Jayamurthy, P. (2020). In vitro evaluation of antidiabetic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin under oxidative stress in skeletal muscle cell line. *Cell Biochem. Funct.* 38 (4), pp. 419-427, 10.1002/cbf.v38.410.1002/cbf.3478
- Cheirsilp, B. Rakmai, J. (2016). Formación de complejos de inclusión de ciclodextrina con su huésped y sus aplicaciones. *Biología, Ingeniería y Medicina*, 2 (1) (2016), pp. 1-6, 10.15761/bem.1000108
- Chaudhari P., Ghatge VM, Lewis SA Complejo de ciclodextrina supramolecular: diversidad, seguridad y aplicaciones en la terapéutica ocular. *Exp. ojo Res.* 2019; 189: 107829. doi: 10.1016/j.exer.2019.107829.
- Fernandes A., Rocha MAA, Santos LMNBF, Brás J., Oliveira J., Mateus N., de Freitas V. Blackberry anthocyanins: β-Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization. *Química alimentaria* 2018; 245:426–431. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.109.



- Ferreira de Oliveira, M.P. Santos, C. Fernandez, E. (2020). Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models *Phytomedicine*, 73, p. 152887, 10.1016/j.phymed.2019.152887
- Flores-Martínez, H.; León-Campos, C.; Estarrón-Espinosa, M.; Orozco-Ávila, I. Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Rev. Mex. Ing. Química* 2016, 15, 773–785.
- Franzini, A. Ciogli, F. Gasparrini, OH Ismail, C. Villani. (2018). Desarrollos recientes en separaciones quirales por cromatografía de fluidos supercríticos. *Análisis quiral: Avances en espectroscopia, cromatografía y métodos emergentes* (Segunda edición), Elsevier BV.
- G.N.D. Napal, M.C. Carpinella, S.M. Palacios, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3669.
- Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. *Química y farmacología del bioflavonoide cítrico hesperidina. Phytother Res* 2001; 15:655–69.
- Garnero, C., Zoppi, A., Aloisio, C. y Longhi, MR. (2018). Sistemas tecnológicos de entrega para mejorar las propiedades biofarmacéuticas. En *Fabricación a nanoescala, optimización, ampliación y aspectos biológicos de la nanotecnología farmacéutica*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813629-4.00007-3>
- Gonzales, G. B., Smagghe, G., Grootaert, C., Zotti, M., Raes, K., & Van Camp, J. (2015). Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: A sequential structure–activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metab*
- Granados P. J., Uribe U. N., García L. P., Ramos G. M., Rivero C. F & Pérez R. M. (2018). Effect of Pinocembrin Isolated from Mexican Brown Propolis on Diabetic Nephropathy. *Molecules* 2018, 23, 852; doi:10.3390/molecules23040852
- Hădăruga DI, Ünlüsayın M., Gruia AT, Birău C., Rusu G., Hădăruga NG Estabilidad térmica y oxidativa del aceite de salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.) y complejación con  $\beta$ -ciclodextrina. *Beilstein J. Org. química* 2016; 12: 179–191. doi: 10.3762/bjoc.12.20.
- Ho S., Yin Y., James D., Fong L. *LWT: ciencia y tecnología de los alimentos* Inclusión de complejos de catequina por  $\beta$ -ciclodextrinas: Caracterización y estabilidad de almacenamiento. *Ciencia de los alimentos LWT. Tecnología* 2017; 86:555–565. doi: 10.1016/j.lwt.2017.08.041.
- Ho, Y. Thoo, D. Young, L.F. (2017). Catequina encapsulada en ciclodextrina: efecto del pH, la humedad relativa y varios modelos alimentarios sobre la estabilidad antioxidante. *LWT: ciencia y tecnología de los alimentos*, 85, págs. 232 - 239, 10.1016/j.lwt.2017.07.028
- Huerta, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. *Biodiversitas*. 15:8-13
- Kay, C. D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Clifford, M. N., & Crozier, A. (2017). Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: A

- review of recent evidence. *Annual Review of Food and Technology*, 8(1), 155. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025636>.
- Kintzios, S. E. 2002. Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios, S. E. *The genera Origanum and Lippia*. 1st Edition. Taylor and Francis, New York. 3-8 p.
  - Lan, X., Wang, W., Li, Q. y col. La pinocembrina flavonoide natural: dianas moleculares y posibles aplicaciones terapéuticas. *Mol Neurobiol* 53, 1794–1801 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9125-2>
  - Mahalapbutr, P., Thitinthavet, K., Kedkham, T., Nguyen, H., Theu, L. thi ha, Dokmaisrijan, S., Rungrotmongkol, T. (2019). A theoretical study on the molecular encapsulation of luteolin and pinocembrin with various derivatized beta-cyclodextrins. *Journal of Molecular Structure*, 1180, 480–490. doi:10.1016/j.molstruc.2018.12.02
  - Mata-González, R. and Meléndez-González, R. 2005. Growth characteristics of Mexican oregano (*Lippia berlanieri Schauer*) under salt stress. *The Southwestern Naturalist*. 50:1-6.
  - Mahalapbutr, P., Thitinthavet, K., Kedkham, T., Nguyen, H., Theu, L. thi ha, Dokmaisrijan, S., Rungrotmongkol, T. (2019). A theoretical study on the molecular encapsulation of luteolin and pinocembrin with various derivatized beta-cyclodextrins. *Journal of Molecular Structure*, 1180, 480–490. doi:10.1016/j.molstruc.2018.12.02
  - Mahmoud, A.M., Hernández, R.J., Sandhu, M.A., Hussein. O.E. (2019). Beneficial effects of citrus flavonoids on cardiovascular and metabolic health. *Oxid. Med. Cell. Longev*, pp. 1-19, 10.1155/2019/5484138
  - Matencio, A. Navarro, S. García, F. López, J.M. (2020). Aplicaciones de las ciclodextrinas en la ciencia de los alimentos. Una revisión. *Trends in Food Science & Technology*, 104, pp. 132 - 143, 10.1016/j.tifs.2020.08.009
  - Mercader M.T., Núñez E. (2010). Tesis doctoral: Encapsulación de flavonoles en ciclodextrinas. Efecto en su actividad antioxidante. Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Universidad católica de san Antonio. Murcia, mayo 2010. <http://repositorio.ucam.edu/bitstream/handle/10952/78/TESIS%20PDF.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  - Menezes P.P, Andrade T.A., Frank L.A., Souza E., Trindade, G. Trindade, I., Serafini M.R., Guterres, S.S., Araújo A. (2019). Avances de nanosistemas que contienen ciclodextrinas y sus aplicaciones en productos farmacéuticos. *En t. J. Pharm.* 559:312–328. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.041.
  - N. Kalogeropoulos, S. Konteles, I. Mourtzinos, E. Troullidou, A. Chiou, V.T.J. Karathanos, *Microencapsul.* 26 (2009) 603.
  - Osti C. M., Torres V. J., Villagómez I. R., Castelán P. I. (2010) Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 0717-7917, vol. 9, núm. 5, 2010, pp. 359-367

- Oliveira, D. R.; Leitão, G. G.; Bizzo, H. R.; Lopes, D.; Alviano, D. S.; Alviano, C. S. and Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essentials oil of *Lippia origanoides* H. B. K. *Food Chemistry*. 101:236-240.
- Ogunbadejo, B. Al-Zuhair, S. (2021). MOF como matrices potenciales en la inmovilización de ciclodextrina glicosiltransferasa. *Moléculas*, 26 (3), pág. 680, 10.3390/moléculas 26030680
- Parhiz, H. Roohbakhsh, A. Soltani, F. Rezaee, R. Iranshahi, M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phyther. Res.*, 29 (3), pp. 323-331, 10.1002/ptr.5256
- Ponce Cevallos, Peggy Alejandra. (2013-08-07). Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de complejos de inclusión de  $\beta$ -ciclodextrinas y sus derivados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Przybyla, M.A., Yilmaz, G., Remzi, C. (2020). Ciclodextrinas naturales y sus derivados para la síntesis de polímeros. *Química de polímeros*, 11 (48). págs. 7582-7602, 10.1039/d0py01464h
- Ranganna S, Govindarajan VS, Ramana KV. Cítricos: variedades, química, tecnología y evaluación de la calidad. Parte II. Química, tecnología y evaluación de la calidad. *A. química. Crit Rev Food Sci Nutr* 1983; 18:313–86
- Rasul, A., Millimouno, FM, Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J. y Li, X. (2013). Pinocembrina: un compuesto natural novedoso con actividades farmacológicas y biológicas versátiles. *Investigación internacional de BioMed*, 2013, 379850. <https://doi.org/10.1155/2013/379850>.
- Roohbakhsh, A. Parhiz, H. Soltani, F. Rezaee, R. Iranshahi, M. (2014). Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin—a mini-review *Life Sci.*, 113 (1-2), pp. 1-6, 10.1016/j.lfs.2014.07.029
- Shen, X., Liu, Y., Luo, X., & Yang, Z. (2019). Advances in Biosynthesis, Pharmacology, and Pharmacokinetics of Pinocembrin, a Promising Natural Small-Molecule Drug. *Molecules*, 24(12), 2323. doi:10.3390/molecules24122323
- Tang, W. Zou, C. Da, C. Cao, Y. Peng, H. (2020). Una revisión sobre el desarrollo reciente de materiales a base de ciclodextrina utilizados en aplicaciones de campos petroleros. *Polímeros de carbohidratos*, 240, 116321, 10.1016/j.carbpol.2020.116321
- Tabeshpour, J. Hosseinzadeh, H. Hashemzaei, M. Karimi. G. (2020). A review of the hepatoprotective effects of hesperidin, a flavanon glycoside in citrus fruits, against natural and chemical toxicities. *Daru*, 28 (1), pp. 305-317, 10.1007/s40199-020-00344-x
- Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabrò, M. L., Stancanelli, R., & Ficarra, P. (2004). Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation

with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(2), 379–387. doi:10.1016/s0731-7085(03)00647-2

- Wang Y, Qiao X, Li W, Zhou Y, Jiao Y, Yang C, Dong C, Inoue Y, Shuang S. Study on the complexation of isoquercitrin with beta-cyclodextrin and its derivatives by spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 2009 Sep 14; 650(1):124-30. doi: 10.1016/j.aca.2009.05.038. Epub 2009 Jun 6. PMID: 19720183.
- Wang, R., Ding, B., & Liang, G. (2021). Interaction poses, intermolecular forces, dynamic preferences between flavonoids and maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Molecular Liquids*, 117068. doi:10.1016/j.molliq.2021.117068
- Y. Yan, A. Kohli, M. Koffas, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 5610.
- Zhao, R., Sandström, C., Zhang, H. y Tan, T. (2016). Estudio de RMN de los Complejos de Inclusión de  $\beta$ -Ciclodextrina con Isoflavonas. *Moléculas* (Basilea, Suiza), 21 (4), 372. <https://doi.org/10.3390/molecules21040372>
- Zhou, S.-Y., Ma, S.-X., Cheng, H.-L., Yang, L.-J., Chen, W., Yin, Y.-Q., Yang, X.-D. (2014). Host–guest interaction between pinocembrin and cyclodextrins: Characterization, solubilization and stability. *Journal of Molecular Structure*, 1058, 181–188. doi:10.1016/j.molstruc.2013.11.008
- Zhou, X., Qin, D., Xiang, B., & Xi, J. (2022). Cyclodextrin-based liquid-phase pulsed discharge extraction of flavonoids from tangerine (*Citrus reticulata*) pericarp: Optimization, antioxidant activity and storage stability. *Separation and Purification Technology*, 278, 119603. doi:10.1016/j.seppur.2021.119603