



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Máster en Ingeniería Industrial

MÁSTER EN INGENIERÍA INDUSTRIAL

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Encapsulación de antioxidantes naturales mediante proceso Supercritical Anti Solvent (SAS)

Autora: Dña. Iria Nerea Giraldes Fernández
Tutor: D. Ángel Martín Martínez

Valladolid, Julio 2022



Resumen

Diversos antioxidantes naturales, como la quercetina, rutina o catequina, presentes por ejemplo en las uvas, tienen importantes aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica, pero estas aplicaciones están limitadas por una baja estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad del compuesto. En este TFM, se estudiará el desarrollo de formulaciones que mejoren estas características mediante la encapsulación de rutina en materiales portadores como el Eudragit®, y se realizará de forma experimental la encapsulación mediante la técnica Supercritical Anti Solvent (SAS) con CO₂.

Para caracterizar la morfología y el tamaño de las partículas obtenidas en este proceso se han utilizado la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la difracción de rayos X, cuyos resultados evidencian mejores características respecto al compuesto sin tratar. Con el objetivo de corroborar estos resultados, se realizó un estudio mediante espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

Por último, se ha determinado la cantidad de rutina presente en el producto final utilizando la técnica espectroscópica ultravioleta visible (UV-Vis), obteniendo resultados favorables, que denotan una correcta encapsulación del compuesto.

Con este trabajo, se ha comprobado que la técnica SAS es una herramienta prometedora para encapsular compuestos alimentarios que contribuyan a mejorar la calidad de vida y la salud de las personas.

Palabras clave

Proceso SAS, rutina, Eudragit®, CO₂ supercrítico, encapsulación.

Abstract

Several natural antioxidants, such as quercetin, rutin or catechin, present for example in grapes, have important applications in the food and pharmaceutical industry, but these applications are limited by low stability, solubility and bioavailability of the compound. In this project, the development of formulations that improve these characteristics by rutin encapsulation in carrier materials such as Eudragit® will be studied, and the encapsulation will be experimentally performed using the Supercritical Anti Solvent (SAS) technique with CO₂.

To characterize the morphology and size of the particles obtained in this process, scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction have been used. Results show better characteristics with respect to the untreated compound. In order to corroborate these results, a study was carried out using Fourier transform infrared spectrophotometry (FT-IR).



Finally, the amount of rutin present in the final product was determined using the ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopic technique, obtaining favorable results, which denote a correct encapsulation of the compound.

With this work, it has been proven that the SAS technique is a promising tool for encapsulating food compounds that contribute to improving the quality of life and health of people.

Key words

SAS process, rutin, Eudragit®, supercritical CO₂, encapsulation.



Índice

1. Introducción y objetivos	9
1.1. Introducción	9
1.2. Objetivo del proyecto.....	11
2. Estado del arte	15
2.1. Flavonoides.....	15
2.1.1. Rutina.....	16
2.2. Encapsulación de ingredientes activos	17
2.3. Purificación del extracto y eliminación del disolvente.....	20
3. Metodología y desarrollo experimental.....	25
3.1. Reactivos.....	25
3.2. Descripción del proceso.....	25
3.3. Experimentos para la encapsulación de partículas.....	26
3.4. Equipos individuales	28
3.5. Caracterización del producto.....	30
4. Resultados experimentales y discusión	35
4.1. Micronización de la rutina pura.....	35
4.2. Caracterización estructural de la rutina pura procesada con el método SAS ...	36
4.3. Coprecipitación de rutina y Eudragit®	37
4.4. Caracterización estructural de la coprecipitación de rutina-Eudragit® procesados por SAS	40
5. Conclusiones y trabajo futuro.....	45
5.1. Conclusiones	45
5.2. Trabajo futuro	46
6. Referencias bibliográficas	51





Capítulo 1. Introducción y objetivos





1. Introducción y objetivos

1.1. Introducción

Los polifenoles son una fuente principal de antioxidantes para el ser humano [1]. Son derivados de las plantas y se consumen en la dieta en forma de frutas, verduras, especias y hierbas en la dieta. La ingesta de polifenoles varía ampliamente entre culturas, grupos étnicos e incluso dentro de una misma localización geográfica [2, 3].

Una gran parte de los polifenoles de la dieta se consumen en forma de flavonoides, aunque los hábitos culturales y dietéticos de cada lugar dictan las formas de polifenoles que se consumen. Por ejemplo, en los países del noreste de Asia, como China y Japón, las isoflavonas son la principal fuente de polifenoles junto con otros flavonoides derivados de té, verduras y frutas [2, 3]. En los países del sureste de Asia, como la India, un porcentaje importante de la población consume grandes cantidades de curcumina como resultado de la ingesta de las especias de la cúrcuma [4]. En los países europeos, una gran población consume lignanos como resultado de la ingesta del salvado de cereales, panes integrales o aceites de semillas de lino [2, 3].

La mayoría de la población toma cantidades suficientes de polifenoles en la dieta y disfruta de los efectos beneficiosos de su consumo. Sin embargo, un gran porcentaje de adultos que vive en países occidentales y desarrollados y una población adulta más pequeña, pero creciente, que vive en países en vías de desarrollo, no toma la cantidad suficiente de polifenoles en la dieta. La causa de esta falta de interés se atribuye al ritmo de vida cada vez más acelerado, a la falta de tiempo y al aumento de los alimentos procesados y las cadenas de comida rápida en todo el mundo [5-7].

Cada vez más, las personas desean tomar suplementos o complejos vitamínicos que les proporcionen los mismos efectos beneficiosos de los polifenoles de la dieta, sin comer o comiendo cantidades mínimas de frutas y verduras [5]. Además, los polifenoles de la familia de los flavonoides tienen un interés creciente debido a su utilización en el tratamiento de muchas enfermedades que afectan a los seres humanos. Numerosos estudios sobre estos compuestos han coincidido en sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antipiréticas, analgésicas, antiinflamatorias y antivirales, entre otras [8-12].

Por otra parte, la demanda de alimentos nutritivos, funcionales y saludables por parte de los consumidores ha llevado a la industria alimentaria a investigar nuevas tecnologías capaces de producir ingredientes con mejores propiedades fisicoquímicas utilizando estos compuestos, ya que por sí solos, los flavonoides poseen una estabilidad baja [13], pueden perder gran parte de su biodisponibilidad tras su consumo, durante su paso por el tracto gastrointestinal [14, 15] y su solubilidad en agua es muy reducida [16]. Por este motivo, el tipo de tecnología que se emplee para la mejora de estas propiedades desempeña un papel importante [13].

Tradicionalmente, las técnicas de micronización se utilizaban en la industria farmacéutica, pero en las últimas décadas varios estudios han revelado su inmenso potencial en la



industria alimentaria. La reducción del tamaño de las partículas y el aumento de la superficie de contacto aumentan las propiedades funcionales y fisicoquímicas, como la capacidad de retención de agua, la solubilidad y la capacidad antioxidante [17].

Si estas micropartículas con propiedades mejoradas se encapsulan, se consiguen otras ventajas como la protección del compuesto activo de su rápida degradación. Las múltiples aplicaciones de los materiales encapsulados en las industrias farmacéutica, alimentaria, cosmética, textil y biomédica en los últimos años hacen que este tipo de proceso sea muy atractivo y se haya potenciado su investigación [18].

Las técnicas convencionales para la encapsulación de micropartículas suelen estar asociadas a un impacto medioambiental adverso debido a las grandes cantidades de disolventes orgánicos, tensioactivos y otros aditivos utilizados, lo que provoca emisiones de compuestos orgánicos volátiles y otros flujos residuales. Además, la combinación de altas temperaturas y productos químicos necesarios en la mayoría de estos procesos pueden provocar la degradación de los compuestos encapsulados [18].

Una de las técnicas más prometedoras es la encapsulación basada en fluidos supercríticos, debido al uso reducido de disolventes orgánicos, a la baja temperatura del proceso para alcanzar el estado supercrítico, a la capacidad de disolver compuestos bioactivos solubles en lípidos [13] y a su posible aplicabilidad a escala industrial [19–22]. Además, estos fluidos no imponen ningún efecto negativo sobre la salud humana y el medio ambiente [17].

La encapsulación consiste en atrapar ingredientes activos sensibles como los antioxidantes, los flavonoides, las vitaminas, los aceites insaturados, las enzimas o las células en una envoltura o cápsula. El resultado es un polvo de pequeño tamaño con mayor estabilidad química y una protección superior contra la luz, la humedad, la temperatura, el pH o el oxígeno [19, 20]. El material atrapado puede ser líquido, sólido o gaseoso; y también se conoce como material del núcleo, activo o relleno. El material de recubrimiento o portador también puede denominarse cápsula, material de pared o membrana. La cápsula puede estar hecha de azúcares, proteínas, polisacáridos naturales y modificados, lípidos o polímeros sintéticos [19].

Desde el punto de vista tecnológico, hoy en día, supone un reto preservar la actividad de estos ingredientes activos y se complica aún más por la creciente demanda de compuestos en polvo que estén libres de residuos de disolventes y que tengan un impacto ínfimo en los parámetros de calidad de los alimentos y medicamentos una vez incorporados a la formulación. En particular, la encapsulación basada en fluidos supercríticos ofrece el beneficio de preparar formulaciones en polvo libres de trazas de disolventes, con altas eficiencias de encapsulación, un alto porcentaje de ingrediente activo y un escalado sencillo [20, 23] y, concretamente, la encapsulación con dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) representa una tecnología verde capaz de producir ingredientes funcionales con una estabilidad mejorada, una alta carga y una protección frente a los agentes ambientales.



Además, permite ajustar parámetros del proceso, como la temperatura, la presión y el caudal, haciendo que la muestra resultante pueda diseñarse fácilmente para adaptar la liberación controlada del compuesto activo, o para alcanzar niveles específicos de sabor, olor y color [13]. Por esta razón, es el fluido supercrítico más utilizado en los procesos de encapsulación debido a su baja toxicidad, su bajo coste, su fácil eliminación y su no inflamabilidad [22] y posee una alta volatilidad, una temperatura crítica suave (31 °C) y una presión crítica baja (73,8 bar) [24].

Entre las técnicas de encapsulación supercrítica existentes, las que utilizan $scCO_2$ como antisolvente tienen más probabilidades de éxito en las aplicaciones industriales porque los compuestos alimentarios son generalmente poco solubles o incluso insolubles en $scCO_2$ [22]. Concretamente, uno de los procesos más versátiles para la encapsulación con $scCO_2$ es el proceso de antisolvente supercrítico (SAS), en el que el soluto de interés se disuelve primero en un disolvente convencional y, esta disolución, se pulveriza de forma continua junto con el $scCO_2$ en una cámara a presión y temperatura constantes. El CO_2 a alta presión actúa como antisolvente, disminuyendo la solubilidad de los solutos en la mezcla. Por tanto, se produce una sobresaturación que conduce a la formación de núcleos y micropartículas. También es posible producir coprecipitados poliméricos en un único paso, utilizando un polímero soluble en el mismo disolvente que el compuesto activo [25].

1.2. Objetivo del proyecto

Los flavonoides, como antes se ha indicado, son compuestos fenólicos que forman parte de la dieta humana. Estos, se encuentran presentes en verduras, semillas, frutas y en algunas bebidas, como en vino o la cerveza. Al principio no se comprobó su acción sobre la salud del organismo, pero más tarde se demostraron los valiosos efectos que producen, gracias a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres, a sus efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos y la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías [26].

Los compuestos fenólicos interactúan con otras macromoléculas en los alimentos o, una vez ingeridos, en la digestión; lo que afecta significativamente a su bioaccesibilidad en el organismo [27]. Como consecuencia de esto, el cuerpo absorbe una muy pequeña cantidad de ellos.

La encapsulación de estos ingredientes activos es un método que puede influir positivamente en la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad en el cuerpo humano, ya que garantiza el recubrimiento del componente activo y su entrega dirigida a una parte específica del organismo, además de su liberación de manera controlada [28].

En el presente proyecto se estudió la encapsulación de rutina, un flavonoide presente en algunas plantas y frutas, en Eudragit® mediante la técnica de coprecipitación SAS en unas condiciones de temperatura, presión y caudal prefijadas y constantes durante todos los ensayos. El objetivo fue desarrollar una formulación que permitiese mejorar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de la rutina para poder utilizar la muestra resultante en aplicaciones dentro de las industrias alimentaria y farmacéutica.





Capítulo 2. Estado del arte



2. Estado del arte

2.1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias naturales con estructuras fenólicas que se encuentran presentes en frutas, verduras, cereales, cortezas y flores, aparte de alimentos como el cacao, el té y el vino [28]. Son los responsables del color y el aroma de las flores y atraen a los polinizadores, contribuyendo a la dispersión de los frutos para ayudar a la germinación de semillas y esporas [29], además de actuar como agentes protectores para el organismo ante los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental o sustancias químicas presentes en los alimentos [28].

Fueron descubiertos por el científico húngaro Albert Szent-Györgyi, que ganó el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937 y quien les otorgó el nombre de “vitamina P”. A partir de ahí, han ido ganando interés por parte de los investigadores, de tal modo que hoy en día son el grupo de polifenoles más estudiado por su poder terapéutico frente a una gran variedad de enfermedades [30].

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que tienen propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les aporta una gran capacidad antioxidante. Su estructura química consta de un esqueleto carbonado C6-C3-C6, donde los componentes C6 son anillos de fenilos A y B, ligados mediante un anillo C. Si el anillo C es un pirano heterocíclico, produce catequinas y antocianidinas; y si el anillo C es una pirona, produce flavonoles, flavonas, isoflavonas y flavanonas [28–31]. Las distintas variedades de flavonoides se diferencian en la concentración de saturación y en los sustituyentes del anillo C, mientras que los compuestos individuales, dentro de cada uno de estos grupos, se distinguen por la sustitución de los anillos A y B [30]. Por ello, se han identificado hasta 10.000 compuestos diferentes [31].

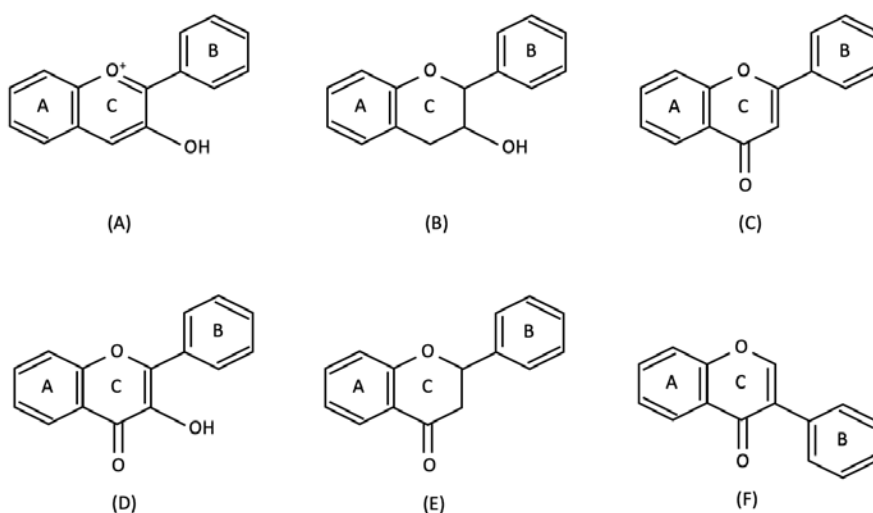


Figura 1. Estructura química general de las principales clases de flavonoides. (A) Antocianidinas, (B) catequinas, (C) flavonas, (D) flavonoles, (E) flavanonas y (F) isoflavonas.

Estos compuestos no se producen de manera natural en el organismo, sino que deben incorporarse en la dieta o en forma de suplementos [32] y se estima que su ingesta diaria media por persona es de 23 mg. La transformación de los flavonoides en el organismo tiene lugar en el hígado y en el colon, excretándose una parte importante en la orina [28].

Un aspecto fundamental para evaluar los efectos biológicos que producen los flavonoides en el ser humano es la bioaccesibilidad y, consecuentemente, la biodisponibilidad [27, 28]. La biodisponibilidad de las sustancias activas se define como la tasa o grado de absorción de estas a través de las células del tracto gastrointestinal. En cambio, la bioaccesibilidad se define como el contenido del compuesto activo que se libera del alimento en el tracto digestivo y que puede ser absorbido por este [27].

Los motivos por los que los flavonoides poseen una baja bioaccesibilidad se pueden deber a su escasa estabilidad en soluciones acuosas o en el sistema digestivo, su difícil absorción a través de las membranas y su interacción con otras macromoléculas presentes en los alimentos durante el proceso [33].

2.1.1. Rutina

La rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$, cuya masa molecular es 610,517 g/mol) es un derivado natural de la flavona, que se encuentra presente en el té verde, las semillas de la uva, la manzana, el pimiento rojo o los cítricos [28], y tiene aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica [34]. Desde el punto de vista químico, se trata de un glucósido compuesto por la aglicona flavonólica quercetina y el disacárido rutinosa (**figura 2**) [35].

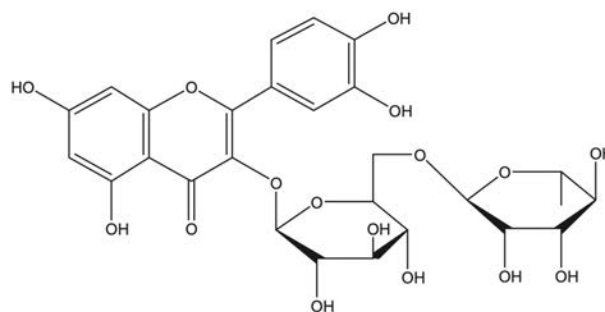


Figura 2. Estructura química de la rutina [36].

Este flavonoide posee funciones clínicamente beneficiosas en la prevención de enfermedades [34], incluyendo actividades antioxidantes, citoprotectoras, anticancerígenas, neuroprotectoras y cardioprotectoras [35]. Sin embargo, su escasa biodisponibilidad, debido a su baja solubilidad en medio acuoso, su escasa estabilidad y su limitada permeabilidad, suponen una limitación en este campo [34, 37]. Una manera de mejorar la solubilidad en agua es reducir el tamaño de las partículas y/o encapsularlas y así aumentar la superficie de contacto del polifenol con el disolvente, lo que lleva a obtener una mayor biodisponibilidad y actividad biológica [37].

Es importante tener en cuenta el material de recubrimiento que se va a utilizar en el proceso de encapsulación del compuesto activo, debido a que puede tener un efecto significativo en el éxito del proceso y en el patrón de liberación del activo encapsulado. La



elección del material de soporte debe tener en cuenta una serie de parámetros, como el material que se va a recubrir y las características deseadas de las microcápsulas finales. Fundamentalmente, debe poseer propiedades estabilizadoras, encapsuladoras, térmicas y nutricionales útiles, además de ser económico, no reactivo y, a menudo, biodegradable [38].

La técnica SAS puede utilizarse para coprecipitar una amplia gama de materiales portadores y compuestos activos. La aplicación más sencilla de este proceso implica la disolución del material portador en la misma disolución orgánica que el compuesto activo. Las concentraciones iniciales de la sustancia activa y del material portador en esta disolución son parámetros clave para determinar la morfología de las partículas finales. Otro parámetro importante en la precipitación con antisolvente supercrítico es la temperatura, ya que la interacción entre los polímeros y el fluido supercrítico puede conducir a la separación de fases líquido-líquido dando lugar a un precipitado no homogéneo [38].

El uso de Eudragit® en la encapsulación contribuye a liberar el fármaco de manera controlada en el organismo y en el lugar deseado, consiguiendo terapias más efectivas y eliminando la posibilidad de suministrar una dosis inferior o superior a la necesaria. Eudragit® son polímeros con diferentes grados de solubilidad que se utilizan para recubrir compuestos activos [39].

Este tipo de polímeros ofrecen una protección frente a la humedad y el enmascaramiento de olores y sabores. Además, son versátiles ya que la elección de un Eudragit® específico puede realizarse en función del tipo de liberación del fármaco deseada. En el mercado existen varios tipos de Eudragit® definidos como polímeros sensibles al pH, ya que son solubles a diferentes valores de pH. En este trabajo se emplearon dos variedades de este polímero. El primero fue Eudragit® E100, soluble en el jugo gástrico hasta un pH de 5 y, por tanto, utilizado generalmente en sistemas de liberación inmediata. El otro fue Eudragit® L100, que garantiza la liberación del fármaco a valores de pH superiores a 6, a partir de la sección central del intestino delgado [40].

2.2. Encapsulación de ingredientes activos

La encapsulación es un proceso de producción de pequeñas partículas en el que el compuesto activo se mezcla o se recubre con un polímero que lo protege de los efectos negativos externos y que permite liberar el compuesto activo de manera controlada en el organismo [34], además de mejorar su estabilidad química [13].

Muchos de los métodos de encapsulación que existen, utilizan grandes cantidades de disolventes orgánicos, elevadas temperaturas, requieren etapas de postratamiento para eliminar los residuos del producto final, poseen un escaso control del tamaño y la morfología de las partículas, además de una baja eficiencia. Todos estos inconvenientes se pueden suprimir con la utilización de técnicas que utilizan fluidos supercríticos que, además, reducen el tamaño de las partículas, controlan la morfología y la distribución de



tamaños sin degradar ni contaminar el producto, además de ser respetuosos con el medio ambiente [18, 41, 42].

Un fluido supercrítico es una sustancia que se encuentra por encima de su temperatura y presión críticas. El punto crítico representa la temperatura y la presión más altas a las que la sustancia puede coexistir como vapor y como líquido en equilibrio. Las propiedades físicas de los fluidos supercríticos suelen describirse como intermedias entre las de un líquido y un gas. Suelen mostrar densidades similares a las de los líquidos, pero viscosidades, conductividades térmicas y difusividades comparables con las de los gases. Esto hace que tengan propiedades beneficiosas para la solubilización de fármacos, la plastificación de polímeros y la extracción de disolventes orgánicos o impurezas, que son características afines a los líquidos; pero también, propiedades de transporte que se asemejan a los gases, mejorando la transferencia de masa y promoviendo la selectividad de las extracciones o las reacciones que se producen [38].

El fluido supercrítico más utilizado en las industrias farmacéutica y alimentaria es el scCO_2 , porque es inerte, no tóxico y se puede eliminar en su totalidad tras el proceso mediante despresurización. Además, tiene una temperatura crítica baja, que permite operar con temperaturas cercanas al ambiente, evitando que se degrade el compuesto activo. También se pueden variar sus propiedades físicas modulando la presión y la temperatura, lo que se puede utilizar en los procesos de encapsulación para producir partículas de tamaño controlado y regular [43].

Particularmente, el proceso SAS está basado en la miscibilidad completa de gran parte de los disolventes orgánicos volátiles con scCO_2 , utilizando presiones moderadas (entre 80 y 150 bar) [42]. Este proceso puede funcionar en modo discontinuo o semicontinuo [38] (**figura 3**). En él, la disolución formada por el disolvente orgánico y el compuesto activo se pulveriza por la parte superior de un recipiente en el que el CO_2 fluye en condiciones supercríticas. El CO_2 satura el disolvente líquido, dando lugar a la precipitación del soluto por el efecto antisolvente [44].

La cinética de formación de las partículas por el método SAS es rápida en comparación con las técnicas que usan antisolventes líquidos, debido a las propiedades de transporte favorables del scCO_2 [38].

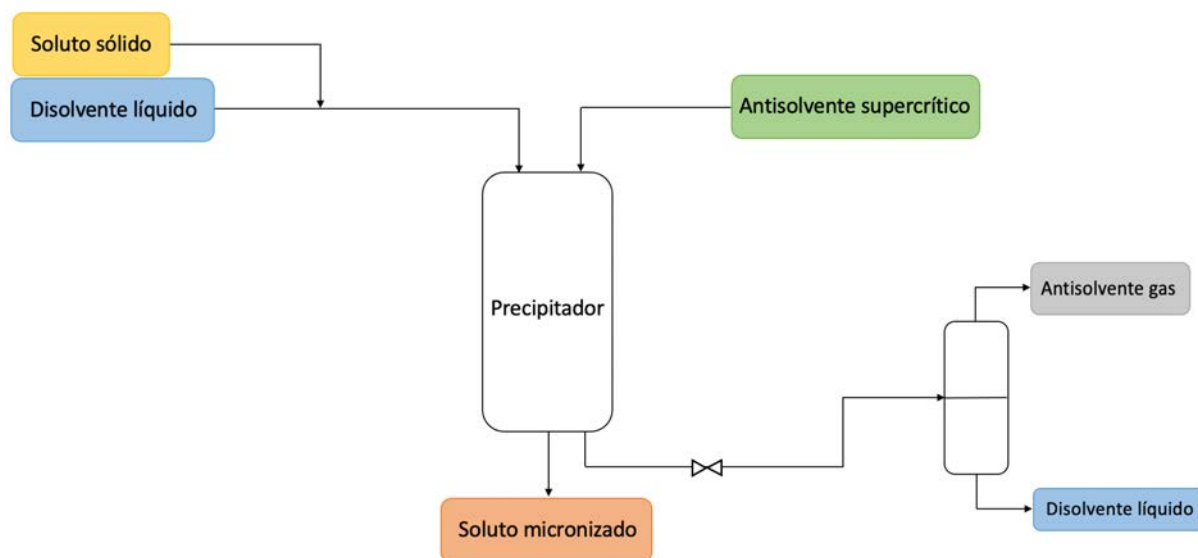


Figura 3. Esquema del proceso SAS.

Para que el proceso SAS se lleve a cabo correctamente, tienen que darse dos condiciones: en primer lugar, que el disolvente orgánico líquido y el scCO_2 sean completamente miscibles en las condiciones del proceso y, por último, que el soluto sea insoluble en el scCO_2 . Esto se consigue trabajando por encima del punto crítico de la mezcla entre el disolvente orgánico y el CO_2 , ya que el equilibrio entre el disolvente y el CO_2 puede verse desplazado por la presencia del soluto en concentraciones relativamente altas [45]. Con lo cual, trabajando a presiones y temperaturas por encima de las críticas, garantizamos la insolubilidad del soluto en el CO_2 y, consecuentemente, la precipitación de las partículas del compuesto de interés [42].

Manipulando las condiciones de presión, temperatura, concentración del soluto o proporción del disolvente frente al CO_2 suministrado en el proceso SAS, se puede controlar el tamaño y la morfología de las partículas y su estructura cristalina [42], tal y como se explica a continuación.

- A presiones más altas, se produce un mayor grado de sobresaturación del soluto, una nucleación más rápida y, como resultado, un menor tamaño de las partículas [46].
- El tamaño de las partículas aumenta con la concentración del soluto. Cuando la concentración es baja, la saturación seguida de la precipitación se produce más tarde durante el proceso de expansión de las gotas. Este retraso permite que se produzca la nucleación, pero no un gran crecimiento de las partículas dentro del tiempo de precipitación y, como resultado, se generan partículas más pequeñas. Cuando la concentración es alta, las partículas precipitan pronto durante la expansión y el crecimiento domina sobre la nucleación, lo que conduce a un aumento del tamaño de las partículas [46].
- El tamaño de las partículas disminuye cuando aumenta el caudal de CO_2 . A medida que aumenta el caudal, el diámetro inicial de la gota y el tiempo de evaporación se reducen, y el tamaño medio de las partículas también lo hace [46].



Por otra parte, es posible encapsular los compuestos activos en membranas poliméricas. En este caso, la disolución está compuesta por dos solutos (el compuesto activo y el polímero) y el disolvente que se quiera utilizar. La disolución se pulveriza por la parte superior del precipitador, dando lugar a una solución micelar que, una vez sometida al proceso SAS y tras despresurizar de forma repentina el $scCO_2$, hace que el polímero crezca sobre las partículas del compuesto activo ya precipitadas, originando partículas sólidas con estructura micelar [42, 46].

La encapsulación del ingrediente activo en Eudragit® ha sido estudiada por varios autores, quienes comprobaron que se forman soluciones sólidas entre el Eudragit® y el compuesto activo mediante enlaces de hidrógeno, convirtiendo el producto en estado amorfo. Estas condiciones favorecen la biodisponibilidad del compuesto [47, 48]. Por este motivo, en este proyecto se empleó este polímero como material de recubrimiento para la rutina.

2.3. Purificación del extracto y eliminación del disolvente

Habitualmente, el producto final de un proceso de extracción no se puede utilizar directamente en aplicaciones prácticas. Este producto puede contener compuestos no deseados que deben ser eliminados y, es por ello, especialmente importante la eliminación de los disolventes utilizados en el proceso de extracción, si estas sustancias no pueden permitirse en el producto final o debido al coste que supone el proceso de su eliminación o postratamiento. Además, las propiedades físicas (tamaño y morfología de las partículas, estructura cristalina, etc.) suelen ser tan importantes como la composición química del producto y pueden desempeñar un papel fundamental en la actividad biológica y las aplicaciones prácticas del material [49].

En los productos farmacéuticos y alimentarios suele haber cantidades remanentes de disolventes como resultado de las técnicas empleadas para su producción. La creciente concienciación de la sociedad respecto a la salud ambiental y humana ha inspirado nuevos enfoques tecnológicos que permiten reducir o, en algunos casos, eliminar por completo los disolventes de los productos finales. Por supuesto, la mejor estrategia para lograr este fin es evitar por completo el uso de disolventes tóxicos en cada proceso, pero en los casos en los que esto no es posible, se requieren técnicas de eliminación de disolventes [50].

Los disolventes orgánicos pueden acumularse en el cuerpo y causar diferentes efectos perjudiciales para la salud. Por ello, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos) ha clasificado los disolventes residuales en tres clases, según su riesgo potencial para la salud humana y ha establecido unos límites de uso por parte de las industrias de estos disolventes [50, 51]:

- Clase 1: disolventes que deben evitarse por ser potencialmente cancerígenos, además de ser peligrosos para el medio ambiente. Estos están limitados a 2–1500 ppm. Ejemplos de este tipo de disolventes son el hexano o el 1,1 y 1,2-dicloroetano.



- Clase 2: disolventes limitados, causantes de una toxicidad irreversible como la neurotoxicidad. Los límites de este tipo se encuentran entre 50 y 3000 ppm. El hexano, la piridina y el metanol forman parte de este grupo de disolventes.
- Clase 3: disolventes con bajo potencial tóxico para el ser humano, donde no es necesario un límite de exposición basado en la salud. Las concentraciones inferiores a 5000 ppm se consideran aceptables para esta clase de disolventes. El etanol, la acetona o el acetato de etilo están incluidos en esta lista.

Por otro lado, la Comisión Europea ha publicado una directiva vinculada a los disolventes permitidos en la industria alimentaria [52]. Se han establecido varios límites en función del proceso en el que se utiliza el disolvente. Algunos se aceptan para cualquier uso si el proceso cumple con unas buenas praxis en su fabricación. Siendo estos: el propano, el butano, el acetato de etilo, el etanol, el dióxido de carbono, el óxido nitroso y la acetona [49].

Para eliminar los disolventes presentes en el producto final es necesario manipular algunas variables fisicoquímicas, siendo las más habituales la presión y la temperatura, como ocurre en el método SAS. Esto, normalmente, implica un cambio de fase de al menos uno de los componentes de la mezcla inicial, lo que consume una cantidad considerable de energía. De hecho, se estima que el 60 % de la energía consumida en la industria farmacéutica se debe al uso de disolventes durante la producción de compuestos activos [53].

En este proyecto, al utilizar el método SAS, se evitan los pasos posteriores al procesamiento, el filtrado y el secado de los cristales formados, necesarios en un proceso de cristalización convencional, debido a que se obtiene directamente un producto seco [49].

En el siguiente capítulo se describirán los materiales empleados en los estudios experimentales, así como los compuestos químicos, los equipos utilizados y el procedimiento seguido.





Capítulo 3. Metodología y desarrollo experimental





3. Metodología y desarrollo experimental

3.1. Reactivos

Los reactivos empleados en el presente trabajo se describen a continuación:

- Hidrato de rutina, $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot x H_2O$ (≥ 94 % (HPLC), en polvo. Sigma-Aldrich. CAS: 207671-50-9).
- Eudragit® E100 (copolímero compuesto por metacrilato de dimetilo, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo en proporción 1:2:1, en gránulos. Evonik Industries. CAS: 24938-16-7).
- Eudragit® L100 (copolímero de ácido metacrílico y metilmetacrilato en proporción 1:1, en polvo. Evonik Industries. CAS: 25086-15-1).
- Alcohol etílico deshidratado absoluto, C_2H_6O (99,9 %. Dávila Villalobos. CAS: 64-17-5).

3.2. Descripción del proceso

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó la técnica de precipitación con antisolvente supercrítico (SAS), con el objetivo de producir rutina pura y encapsular la rutina en Eudragit® para mejorar su biodisponibilidad, su estabilidad y su solubilidad en sustancias polares, como el agua. Para hacer la disolución se empleó como disolvente orgánico etanol.

En la **figura 4** se muestra el diagrama de flujo del proceso SAS. El sistema consta de dos bombas, una se utiliza para inyectar la disolución y otra para bombear el CO_2 al interior del precipitador. En la parte inferior del precipitador hay un filtro de partículas donde queda retenida la muestra sólida y, a continuación, otro filtro para eliminar del disolvente los restos sólidos que puedan haber quedado. Posteriormente, hay un separador que se encarga de escindir la corriente en dos: por la parte inferior se recoge el disolvente residual y por la parte superior se evacúa el CO_2 .

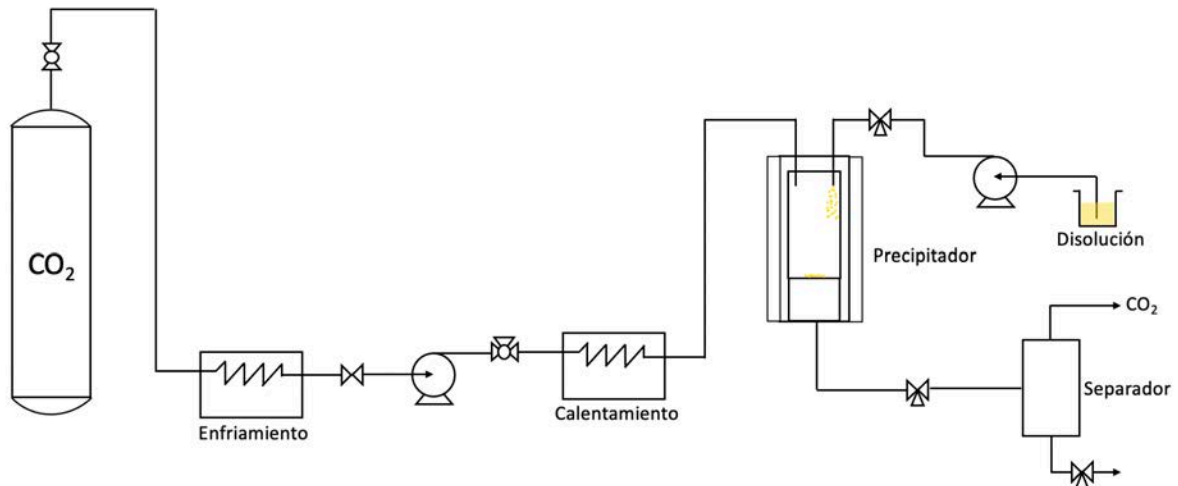


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso SAS.

3.3. Experimentos para la encapsulación de partículas

En este proyecto, el proceso SAS se operó de manera semicontinua, con unas condiciones de presión y temperatura de 100 bar y 40 °C. Los caudales de la disolución y del antisolvente fueron de 5 ml/min y de 2 kg/h, respectivamente.

En cuanto a la disolución, se utilizó en todos los ensayos 1 g de rutina en 300 ml de etanol y la proporción en masa empleada entre la rutina y el Eudragit fue 1:1 y 1:2, para optimizar la encapsulación de las partículas.

Por otro lado, para controlar las variables del proceso hicieron falta varios instrumentos que se describen a continuación. Para medir la temperatura del proceso se colocó una termorresistencia Pt-100 en el interior del recipiente de precipitación con una precisión de $\pm 0,1$ K. Para regular la presión se utilizó un medidor de presión digital DESIN TPR-10 (DESIN Instruments, España), con una precisión de $\pm 0,05$ MPa. En cuanto al flujo de masa de CO_2 , se controló con un caudalímetro de coriolis (Sensor MICRO Motion Elite CMF010NB, Transmisor MICRO Motion Elite RFT9739), con una precisión de $\pm 0,01$ kg/h.

La **figura 5** muestra la planta SAS utilizada en este trabajo. El CO_2 utilizado en el proceso se tomó de una bombona de gas y se comprimió posteriormente con la bomba dosificadora para alcanzar la presión deseada en la cámara del precipitador [54]. En la bañera se precalentó hasta la temperatura de operación seleccionada y posteriormente se introdujo en el precipitador de forma continua durante todo el experimento.

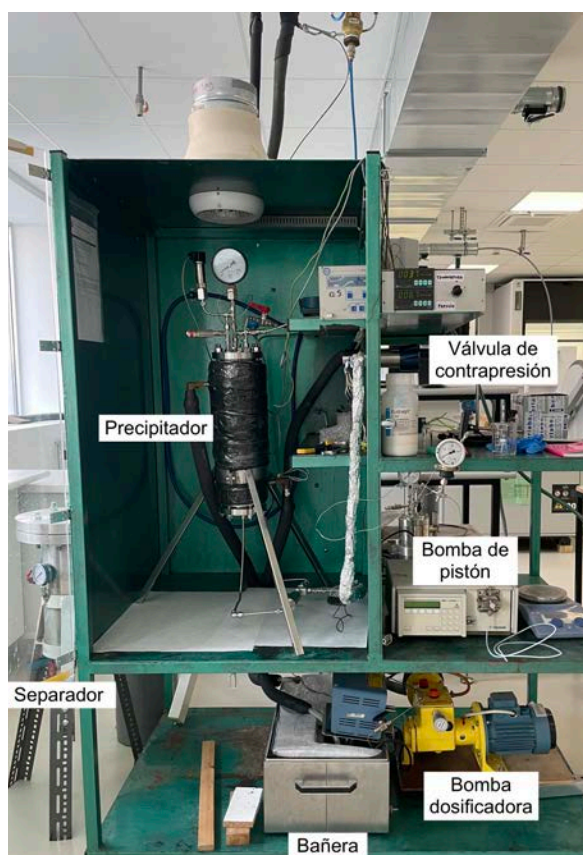


Figura 5. Planta SAS.

Una vez estabilizadas las condiciones de operación, se inyectó disolvente puro en el precipitador y, a continuación, la disolución de rutina y Eudragit® en etanol, utilizando una bomba cromatográfica de pistón. La disolución se inyectó de forma continua en el recipiente de precipitación a través de un capilar de 1/16 pulgadas. El precipitador es un recipiente encamisado con un volumen interno de 2,5 litros.

Debido a la sobresaturación del recipiente, la rutina precipita [54] y, una vez finalizado el proceso, se recogió la muestra en un filtro ubicado en el fondo del recipiente del precipitador, que consiste en un disco metálico poroso empleado como soporte de un filtro de material polimérico con un tamaño de poro de 0,1 μm . El disolvente condensado tras la despresurización se recogió en un separador flash y el CO_2 en fase gas se ventiló.

El proceso SAS consta de tres pasos, que han sido repetidos en cada uno de los experimentos. En primer lugar, se introducía el CO_2 supercrítico en el precipitador hasta alcanzar las condiciones de presión y temperatura deseadas (en este caso 100 bar y 40 $^\circ\text{C}$, respectivamente). Durante todo el experimento, estas condiciones se mantuvieron constantes. A continuación, se procedía a inyectar la disolución con una velocidad de 5 ml/min. Finalmente, una vez introducida toda la disolución en el recipiente, el flujo de CO_2 supercrítico se mantenía constante durante 30 minutos más con el objetivo de eliminar el disolvente orgánico restante del precipitado y que este se encontrara totalmente seco.

Una vez concluidos estos tres pasos, el precipitador se descomprimía con ayuda de la válvula de contrapresión y las partículas se recogían del filtro y las paredes del recipiente para su posterior análisis.

3.4. Equipos individuales

En cuanto a los equipos individuales utilizados durante el desarrollo experimental, se mencionan a continuación:

- Bomba de pistón Gilson 305. Esta se utilizó para la alimentación de la disolución de compuesto activo y agente encapsulante al interior del precipitador con una velocidad de 5 ml/min.



Figura 6. Bomba de pistón Gilson 305.

- Bomba dosificadora Dosapro Milton Roy Milroyal® modelo 140.S tarada en 140 bar con alivio hidráulico y sistema antirretorno. Esta se empleó para bombear el CO₂.



Figura 7. Bomba dosificadora Dosapro Milton Roy Milroyal® modelo 140.S.

- Válvula/regulador de contrapresión GO regulador modelo BP-66. Esta se utilizó para descomprimir el recipiente precipitador.

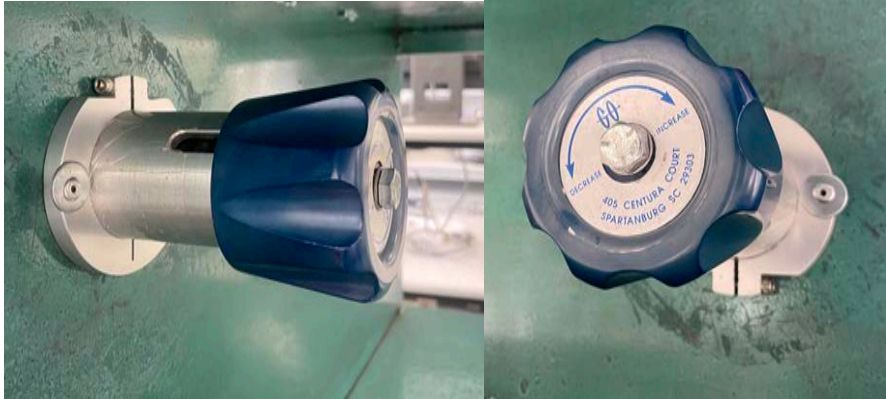


Figura 8. Válvula de contrapresión GO regulador modelo BP-66.

- Cámara de precipitación. Esta se empleó para precipitar las partículas de rutina pura tras su micronización y las partículas de rutina encapsuladas en Eudragit®.



Figura 9. Precipitador.

- Filtro de partículas situado en la parte inferior del precipitador. En él quedó retenida la muestra de rutina seca tras el proceso.



Figura 10. Filtro situado en la parte inferior del precipitador. (a) Componentes del filtro, (b) detalle del filtro metálico de partículas.

- Filtro. El elemento filtrante es de acero inoxidable y está formado por cinco capas de malla 316 que se sinterizan juntas para formar un elemento poroso integrado. Estos elementos son muy útiles en aplicaciones muy contaminadas y soportan presiones de hasta 350 bar. En este filtro se quedan retenidas el resto de partículas y pasa a través el disolvente residual.

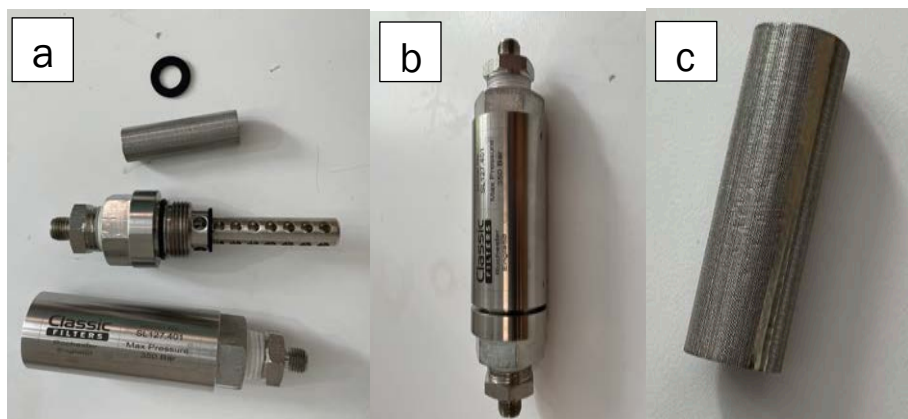


Figura 11. (a) Componentes del filtro, (b) montaje del filtro, (c) detalle del filtro de acero inoxidable.

3.5. Caracterización del producto

Para caracterizar las partículas formadas, se analizó su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un instrumento QUANTA 200 FEG, ubicado en la Unidad de Microscopía Avanzada del Parque Científico de la Universidad de Valladolid.



Esta técnica es una de las más versátiles para analizar la morfología de materiales orgánicos e inorgánicos a escala micrométrica, mediante la obtención de imágenes de su superficie [55–57].

En cuanto a la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se utilizó un espectrómetro FT-IR Bruker ALPHA con un módulo de muestreo de reflexión total atenuada (ATR) de platino.

Se trata de una técnica analítica que se utiliza para identificar grupos funcionales orgánicos mediante la absorción de su radiación infrarroja a una determinada frecuencia. Dada la especificidad de las bandas de absorción infrarroja, la búsqueda de datos en bibliotecas de referencia constituye una herramienta poderosa para identificar enlaces químicos mediante esta técnica analítica [58].

Por otra parte, se analizaron las muestras mediante difracción de rayos X (XRD) en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid, situado en el Parque Científico. Se utilizó un equipo de difracción de rayos X Bruker Discover D8 A25 con un tubo de cerámica de cobre de 2,2 kW y un generador de 3 kW.

Esta técnica consiste en hacer incidir la radiación procedente de un tubo de rayos X sobre la muestra, con una longitud de onda λ y una distancia interplanar d . Este haz se refleja con un ángulo θ de acuerdo con la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \cdot \text{sen } \vartheta$$

Ecuación 1. Ley de Bragg.

El detector se mueve y va variando el ángulo que forma con la muestra, registrando el haz reflejado. El resultado de la intensidad en función del ángulo proporciona información sobre la estructura cristalina de la muestra [59].

La cantidad de rutina encapsulada en el interior de las partículas se determinó mediante el análisis espectrofotométrico a 418 nm utilizando un espectrofotómetro de ultravioleta visible (UV-Vis) Shimadzu UV-2550.

Esta técnica estudia la absorción de un haz de luz ultravioleta visible al atravesar la superficie de una muestra o reflejarse sobre ella [60]. El espectro ultravioleta está asociado con la excitación de los electrones desde niveles de energía más bajos hasta los más altos. Cada longitud de onda tiene una energía asociada, si esta es la adecuada para provocar la excitación de los electrones y, por tanto, su ‘salto’ al siguiente nivel energético, esta longitud de onda es absorbida. Un electrón es excitado desde un orbital lleno, que se encuentra en su estado fundamental, hacia un orbital antienlazante vacío, aumentando su energía. Cuanto mayor es el espacio entre los niveles energéticos, mayor es la energía necesaria para la transición del electrón, produciendo una luz de mayor frecuencia y, por consiguiente, una longitud de onda más corta [55, 61].

Se miden tanto la intensidad de la luz que pasa a través de la celda de referencia (I_0) como la intensidad para cada longitud de onda (I). El detector convierte la luz en corriente y el registrador genera una representación de la absorbancia frente a la longitud de onda (nm) de la muestra [55, 61].



La absorbancia (A) de la muestra sigue la siguiente expresión:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Ecuación 2. Absorbancia en función de la intensidad.

La absorbancia es proporcional a la concentración de la sustancia en disolución, siguiendo la ley de Lambert-Beer, por lo que esta técnica puede utilizarse para medir la concentración de dicha muestra. La ley de Lambert-Beer puede expresarse como [55, 62]:

$$A = \epsilon cl$$

Ecuación 3. Ley de Lambert-Beer.

Siendo, A la absorbancia de la muestra, l la dimensión de la cubeta en cm, c la concentración de la disolución en mol/dm³ y ϵ la extinción molar, que se mantiene constante para una sustancia particular en una determinada longitud de onda, en dm³/mol · cm [55, 62].



Capítulo 4. Resultados experimentales y discusión



4. Resultados experimentales y discusión

4.1. Micronización de la rutina pura

Inicialmente, se realizaron experimentos preliminares para micronizar la rutina pura, utilizando la técnica SAS con el objetivo de caracterizar su cristalización y morfología. Los experimentos se realizaron en las condiciones de operación antes descritas, a 40 °C y 100 bar, manteniéndolas constantes durante todo el proceso y haciéndolos por duplicado para comprobar la reproducibilidad de las muestras.

La **figura 12** muestra una comparativa de las imágenes obtenidas en el SEM para una muestra de rutina sin procesar y otra muestra de rutina sometida al proceso SAS, haciendo zoom a las partículas para visualizar su morfología y tamaño. Para facilitar su comparación, ambas imágenes se presentan con la misma relación de aumento.

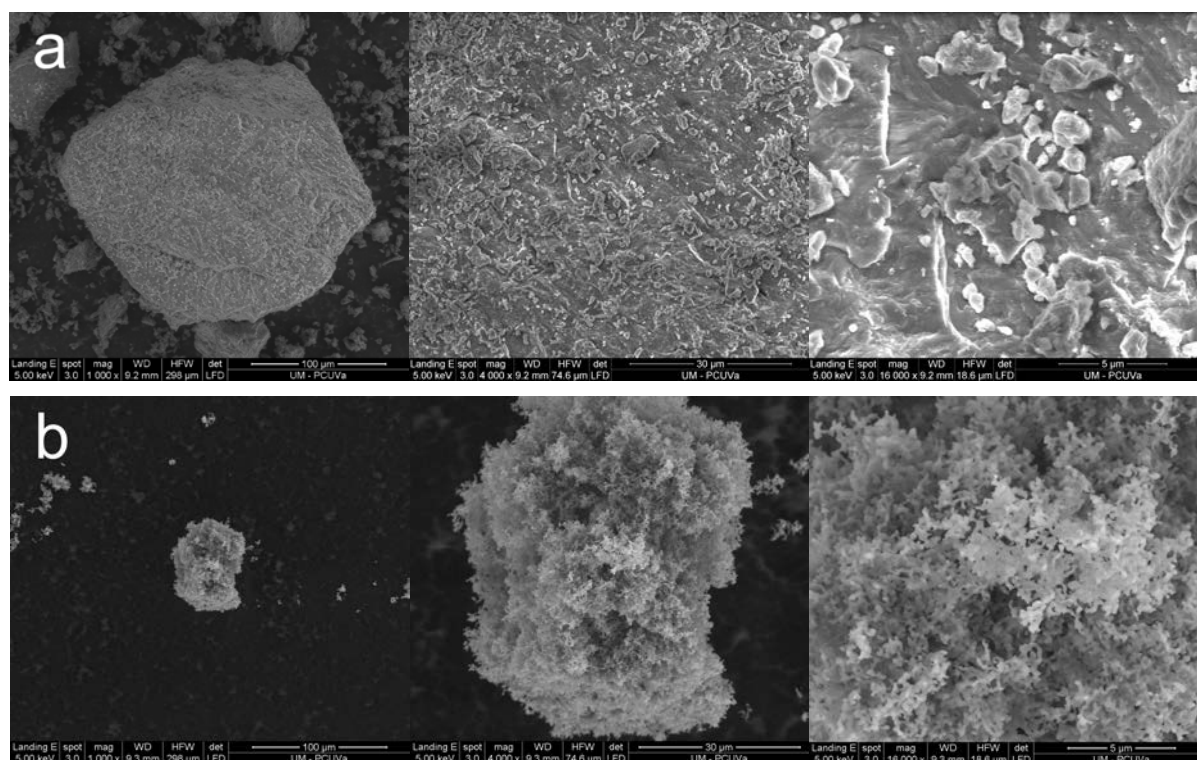


Figura 12. Imágenes del SEM de las partículas obtenidas por micronización utilizando el proceso SAS para la rutina pura: (a) rutina pura sin procesar y (b) rutina procesada mediante el método SAS. Las imágenes se presentan con la misma relación de aumento: a la izquierda 1000x, en el medio 4000x y a la derecha 16000x, correspondientes a una escala de 100 μm , 30 μm y 5 μm , respectivamente.

Como se puede observar, en la **figura 12a**, la rutina sin tratar presentó agregados de partículas de forma irregular con tamaños entre 80 y 200 μm .

En la **figura 12b**, al procesar la rutina con el método SAS, las partículas presentaron una superficie muy porosa, con apariencia de esponja y con una distribución de tamaños de partícula inferiores a la rutina comercial, por lo que el proceso mejora claramente las características de las partículas [63].

4.2. Caracterización estructural de la rutina pura procesada con el método SAS

La **figura 13** presenta los diagramas de difracción de rayos X de la rutina comercial y de la rutina procesada con la técnica SAS. El difractograma de la rutina sin procesar muestra picos intensos situados a $2\theta = 5,17^\circ, 7,28^\circ, 10,53^\circ, 14,84^\circ, 16,69^\circ$ y $26,73^\circ$, lo que indica que se trata de una estructura cristalina [63, 64]. Sin embargo, la rutina procesada con SAS mostró una curva amplia, sin picos característicos, lo que indica que se trata de una muestra amorfa, que potencia la solubilidad y biodisponibilidad del compuesto [65].

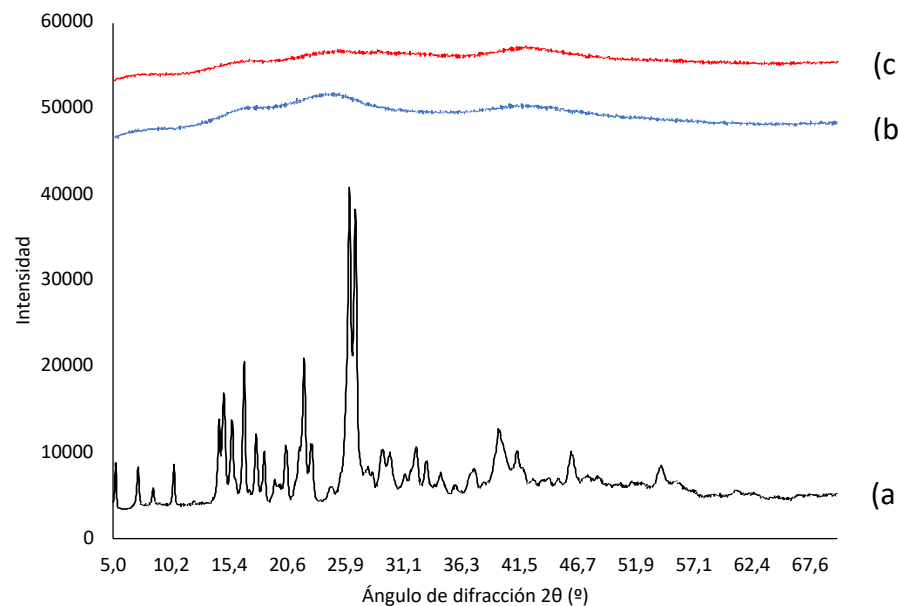


Figura 13. Difractograma de rayos X de (a) rutina comercial, (b) rutina procesada por SAS, (c) réplica de rutina procesada por SAS. Para mayor claridad, todos los diagramas han sido desplazados verticalmente en cantidades arbitrarias.

Estos resultados se confirmaron además mediante ensayos FT-IR, que se pueden observar en la **figura 14**.

El espectro FT-IR de la rutina comercial muestra varias bandas de absorción característica, incluyendo el estiramiento del grupo carbonilo a $1654\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, el del grupo éter a $1362\text{--}1169\text{ cm}^{-1}$ y la banda característica del argón a 1507 cm^{-1} [66, 67]. También se puede apreciar una banda prominente en 3406 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo hidroxilo, a 2958 cm^{-1} para el enlace C–H [66] y en 1383 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones del enlace C–OH [68].

Los espectros FT-IR de la rutina sin procesar y aquella procesada por SAS muestran diferencias significativas. En primer lugar, en la rutina procesada con SAS, la banda de estiramiento del grupo hidroxilo, situada entre 3500 y 3000 cm^{-1} muestra una concavidad mayor, que concuerda con la deshidratación del material debido al tratamiento con SAS. En segundo lugar, aparece una banda con mayor intensidad a $1654\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ que, como se indicó con anterioridad, se corresponde con el estiramiento del grupo carbonilo. Otra diferencia importante con la rutina comercial es la banda entre $1362\text{--}1169\text{ cm}^{-1}$ del grupo

éter, apreciablemente más amplia en las muestras procesadas. Todas estas diferencias en los espectros se pueden vincular a variaciones en la estructura cristalina del material, debido a la formación de rutina anhidra, también observada en la difracción de rayos X [48].

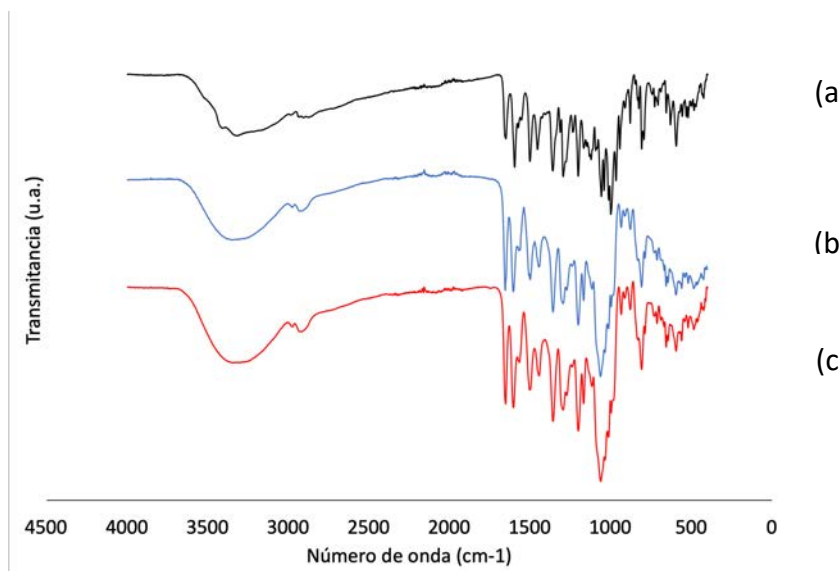


Figura 14. Espectros FT-IR de (a) rutina comercial, (b) rutina procesada por SAS, (c) réplica de rutina procesada por SAS. Para mayor claridad, todos los diagramas han sido desplazados verticalmente en cantidades arbitrarias.

4.3. Coprecipitación de rutina y Eudragit®

Para realizar los experimentos de coprecipitación con rutina y Eudragit®, se operó de manera idéntica al caso de la micronización de rutina pura. Todos los experimentos se realizaron en condiciones de presión y temperatura constantes de 40 °C y 100 bar. La única diferencia, fue la forma de preparar la disolución que posteriormente se inyecta en el precipitador.

En este caso, se realizaron varios ensayos con diferentes concentraciones de Eudragit®, y, por consiguiente, con diferentes proporciones en masa en la disolución inicial. Se eligió la relación en masas del compuesto activo/polímero como un parámetro principal del proceso a analizar, debido a que en resultados anteriores sobre la encapsulación de compuestos activos por coprecipitación con polímeros utilizando la técnica SAS indicaban que esta relación es la principal causa influyente en la morfología de las partículas formadas [48].

En este proyecto se utilizaron dos polímeros diferentes, Eudragit® E100 y Eudragit® L100 para la encapsulación de la rutina. Para preparar la disolución, se utilizaron proporciones de rutina/Eudragit® 1:1 y 1:2 (en unidades gramos de rutina/gramos de polímero). Con esta última proporción, como la cantidad de polímero es muy elevada, al someterla al proceso SAS no se obtenían partículas finas como con el resto de los experimentos, sino un producto plastificado, que no se pudo recoger, con lo cual, se descartó para posteriores análisis. En la **figura 15** se muestra el filtro tras este experimento con una cantidad mayor de polímero.



Figura 15. Filtro del precipitador tras la coprecipitación de rutina en Eudragit® en proporción 1:2.

En el caso de los experimentos en que se utilizó rutina/Eudragit® en proporción 1:1, se obtuvo una muestra en polvo finamente dividido, que fue analizado mediante las técnicas descritas anteriormente. La **figura 16** muestra las imágenes del SEM obtenidas de los ensayos de coprecipitación de la rutina con Eudragit® E100 y Eudragit® L100.

Las morfologías obtenidas indican que las partículas de rutina actúan como núcleos y se recubren por una película de polímero que, además, restringe el crecimiento de las partículas de rutina. En ambos casos puede apreciarse con claridad cómo el polímero se introduce entre los intersticios de la partícula, rodeándola completamente, lo que indica que la concentración de polímero es lo suficientemente alta para la encapsulación completa del compuesto activo [48].

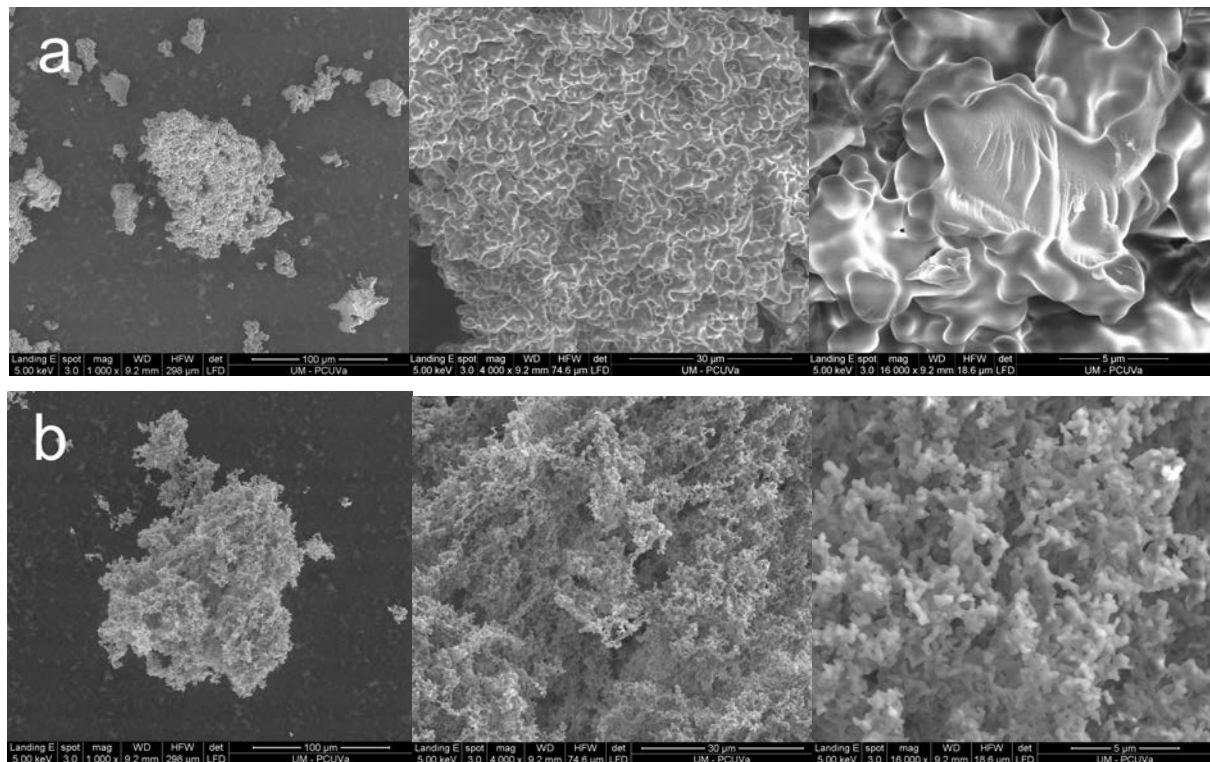


Figura 16. Imágenes del SEM de las partículas obtenidas por coprecipitación utilizando el proceso SAS para la encapsulación de rutina en Eudragit®: (a) rutina/Eudragit® E100 y (b) rutina/Eudragit® L100. Las imágenes se presentan con la misma relación de aumento: a la izquierda 1000x, en el medio 4000x y a la derecha 16000x, correspondientes a una escala de 100 µm, 30 µm y 5 µm, respectivamente.

Por otra parte, en este estudio se quiso conocer la concentración de rutina presente en las partículas encapsuladas tras someter las muestras al proceso SAS para verificar si se corresponde con la proporción rutina/polímero en la solución inicial. Para ello, se utilizó la espectrofotometría UV-Vis. En primer lugar, se realizó una recta de calibrado del compuesto activo (**figura 17**), preparando disoluciones de rutina pura en etanol a diferentes concentraciones.

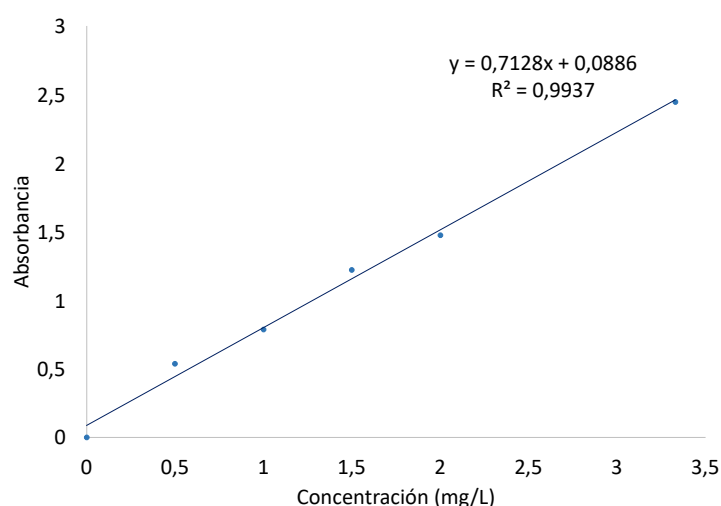


Figura 17. Recta de calibrado de la rutina disuelta en etanol.

Conocidas estas concentraciones se pueden comparar con las muestras obtenidas en el proceso SAS para cuantificar la cantidad de rutina presente en cada una de ellas tras el proceso.

La **tabla 1** presenta las composiciones en masa de los coprecipitados de rutina/Eudragit® medidas por espectroscopía UV-Vis, comparadas con las composiciones teóricas calculadas según la cantidad de compuesto activo y de portador presentes en la disolución inicial. Como puede observarse, se obtuvo una buena correlación entre las composiciones experimentales y las teóricas, lo que indica que se ha obtenido un alto rendimiento de precipitación del compuesto [48].

Tabla 1. Concentraciones teóricas y experimentales de rutina en los experimentos de coprecipitación con Eudragit® utilizando el método SAS.

Experimento	Cantidad de rutina teórica (% masa)	Cantidad de rutina experimental (% masa)
Rutina procesada	100	100,98 ± 0,64
Rutina/Eudragit® E100	50	49,56 ± 0,62
Rutina/Eudragit® L100	50	48,31 ± 0,61

4.4. Caracterización estructural de la coprecipitación de rutina–Eudragit® procesados por SAS

La encapsulación de rutina en Eudragit® fue estudiada mediante difracción de rayos X y los resultados se muestran en la **figura 18**.

Los diagramas de Eudragit® puro (**figuras 18b** y **18c**) se corresponden con los revisados en la literatura [69, 70]. Tal y como se esperaba, el difractograma de la mezcla física de rutina y Eudragit® sin procesar reflejó una superposición de los diagramas de ambos compuestos puros (**figuras 18f** y **18g**) [48].

El patrón de difracción de rayos X de la rutina muestra picos agudos que indican que este flavonoide es de naturaleza cristalina, mientras que los de Eudragit® muestran picos romos que indican su naturaleza amorfa. Cuando las muestras se someten al proceso SAS, la rutina forma un complejo con el Eudragit® y los picos agudos de la rutina se atenúan [69], demostrando que los experimentos de coprecipitación dieron lugar a productos con mayor homogeneidad y una estructura amorfa [48]. Este cambio en la cristalinidad puede ser la razón del aumento de la tasa de disolución de la rutina cuando se encapsula en el Eudragit®, como se ha descrito en apartados anteriores [69].

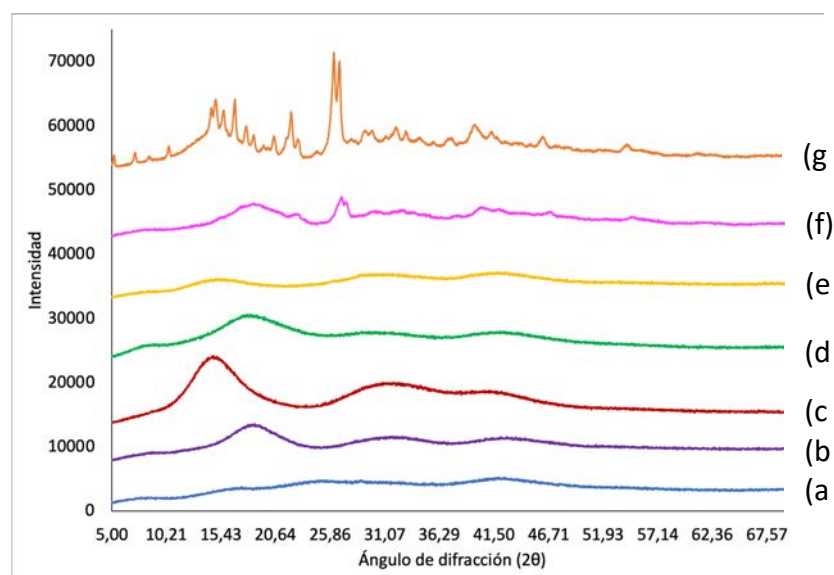


Figura 18. Difractograma de rayos X de (a) rutina procesada con SAS, (b) Eudragit® E100 comercial, (c) Eudragit® L100 comercial, (d) rutina encapsulada en Eudragit® E100 mediante SAS, (e) rutina encapsulada en Eudragit® L100 mediante SAS, (f) mezcla física de rutina y Eudragit® E100 sin tratar y (g) mezcla física de rutina y Eudragit® L100 sin tratar. Para mayor claridad, todos los diagramas han sido desplazados verticalmente en cantidades arbitrarias.

Como se comentó en apartados anteriores, las técnicas de encapsulación utilizando polímeros se pueden emplear para producir complejos de inclusión o estructuras micelares, que mejoran la solubilidad en agua y la velocidad con que se disuelve el compuesto activo. La interacción entre el polímero y el compuesto activo es detectable mediante espectroscopía FT-IR [47, 71].

La **figura 19** presenta los espectros FT-IR de las muestras de rutina en Eudragit®. Los espectros de los materiales poliméricos (**figuras 19b** y **19c**) presentan bandas características de los grupos esterificados a 1150–1190, 1240 y 1270 cm^{-1} , así como la

vibración del grupo carbonilo a 1730 cm^{-1} . Además, se observaron vibraciones en la cadena de hidrocarburos a 1385 , $1450\text{--}1490$ y 2950 cm^{-1} [72]. Por otra parte, los espectros de la rutina encapsulada en Eudragit® mediante el proceso SAS, al igual que en la rutina pura, muestran la banda del grupo hidroxilo más intensa debido a la deshidratación del compuesto y se observaron picos adicionales en 1730 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo del Eudragit® y en $1150\text{--}1190\text{ cm}^{-1}$ de los grupos éster, como se mencionó con anterioridad. Aparte de esto, no se observaron picos adicionales ni desplazamientos en las bandas características, lo que indica que no se produjeron interacciones químicas ni complejos entre el portador y la rutina [48, 72].

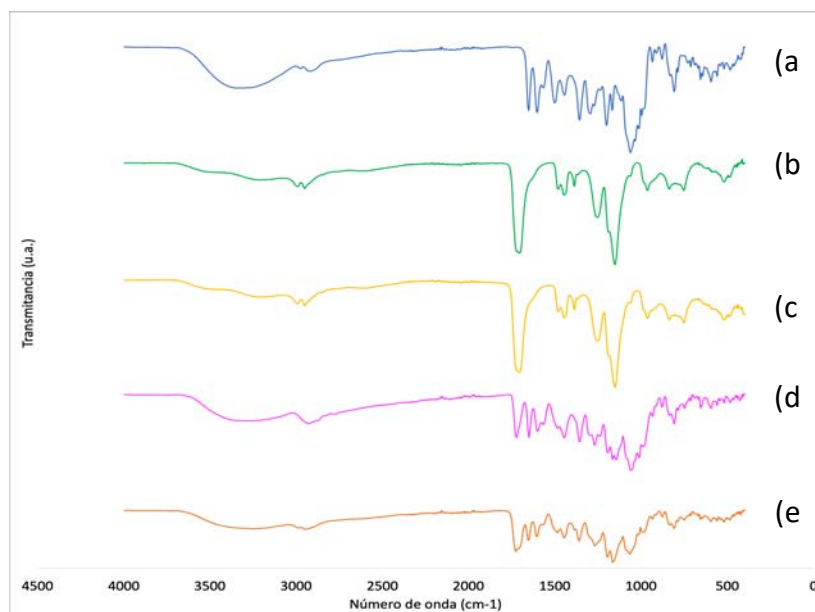


Figura 19. Espectros FT-IR de (a) rutina procesada por SAS, (b) Eudragit® E100 comercial, (c) Eudragit® L100 comercial, (d) rutina encapsulada en Eudragit® E100 mediante SAS, (e) rutina encapsulada en Eudragit® L100 mediante SAS. Para mayor claridad, todos los diagramas han sido desplazados verticalmente en cantidades arbitrarias.





Capítulo 5. Conclusiones y trabajo futuro





5. Conclusiones y trabajo futuro

5.1. Conclusiones

Los polifenoles se encuentran entre los compuestos activos más potentes sintetizados por las plantas y muestran una combinación única de actividades químicas, biológicas y fisiológicas. Sin embargo, su estabilidad y solubilidad limitadas, combinadas con su escasa biodisponibilidad, deben ser resueltas para que estos compuestos sean capaces de responder a las crecientes demandas en las industrias alimentaria y farmacéutica [73].

Para seleccionar el proceso de encapsulación y el material de recubrimiento más adecuados, es necesario establecer las funciones que aporta la encapsulación al producto final. Las diferentes condiciones de procesamiento por las que pasará el producto antes de su liberación se consideran esenciales para la actividad final. Además, las propiedades de las partículas pueden modificarse variando los parámetros del proceso, con el fin de adaptarse a aplicaciones específicas [73]. Por ello, ha sido seleccionado el método SAS como técnica de encapsulación.

En este trabajo se ha demostrado que es posible coprecipitar un flavonoide poco soluble en agua (la rutina) mediante la técnica SAS con Eudragit® como portador polimérico. Los resultados obtenidos en términos de morfología de este flavonoide ensayado mediante la técnica SAS son muy prometedores. Además, la encapsulación proporciona una dispersión homogénea de la rutina en una matriz polimérica amorfa de Eudragit®, contribuyendo a aumentar la vida útil de este compuesto activo.

Por otra parte, no se observó una degradación del producto, y los compuestos procesados con la técnica SAS mostraron mayores actividades antioxidantes que los compuestos sin procesar, debido a la eliminación del agua de hidratación y a la purificación del compuesto [48].

Mediante la caracterización de las partículas obtenidas, utilizando la microscopía electrónica de barrido y la difracción de rayos X, se demostró que es posible controlar el tamaño, la morfología y la estructura cristalina de las partículas y, comparando estos resultados con los revisados en la bibliografía, se pueden asociar a mejoras en la biodisponibilidad y en la solubilidad del compuesto polifenólico, que habría que evaluar en trabajos futuros.

Las condiciones operativas se eligieron para obtener micropartículas bien separadas mediante una selección precisa del tipo de disolvente, de la presión operativa y de la relación rutina/Eudragit®. Como indican los resultados, se obtuvieron micropartículas amorfas utilizando concentraciones de soluto de 0,33 g/mL y una relación 1:1 y 1:2 flavonoide/polímero. Además, se lograron altas eficiencias de atrapamiento, de hasta el 49,56 %, para las partículas coprecipitadas de rutina en Eudragit® E100 y del 48,31 %, para las partículas coprecipitadas de rutina en Eudragit® L100, utilizando etanol como disolvente en el proceso SAS. En consecuencia, las características de los polvos y las altas eficiencias de encapsulación de los sistemas rutina/Eudragit® obtenidas por SAS podrían permitir la producción de suplementos con beneficios antioxidantes y anticancerígenos



para aplicaciones farmacéuticas y nutracéuticas, en las que los compuestos flavonoides tienen una alta estabilidad y biodisponibilidad [74].

5.2. Trabajo futuro

En investigaciones anteriores del Grupo de Procesos de Alta Presión se realizó un estudio similar al desarrollado en este proyecto, utilizando quercetina en lugar de rutina como compuesto activo. A mayores, se realizaron pruebas de liberación in vitro en fluidos gástricos e intestinales simulados. Los fluidos gastrointestinales simulados se prepararon siguiendo dos procedimientos: en el caso del fluido gástrico, se disolvieron 2 g de NaCl en un litro de agua desionizada y se ajustó el pH a 1,2 añadiendo HCl. En el caso del líquido intestinal, se disolvieron 6,8 g de fosfato de potasio en un litro de agua desionizada y se ajustó el pH a 6,8 añadiendo NaOH [48].

A estos fluidos simulados se le añadieron partículas de quercetina pura o coprecipitados de quercetina/Pluronic para evaluar su solubilidad en el tracto gastrointestinal. Las concentraciones de quercetina en las muestras se midieron por el método UV-Vis [48], del mismo modo que se ha descrito en este trabajo.

La quercetina pura procesada por SAS mostró una disolución más rápida en el medio gástrico que el producto sin procesar, así como una mayor solubilidad final. Por otro lado, las muestras formuladas mediante una homogeneización física de la quercetina con Pluronic presentaron una disolución más rápida y una solubilidad mayor que las muestras de quercetina pura [48]. En futuros TFMs podría realizarse este mismo análisis utilizando, en este caso, rutina y Eudragit® en lugar de quercetina y Pluronic.

Este mismo departamento en colaboración con el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, realizó otra investigación con quercetina y Pluronic aplicada a ratas para comprobar la biodisponibilidad y la eficacia nefroprotectora de una formulación micelar del compuesto activo encapsulado en un polímero, con hidrosolubilidad mejorada [75].

Sus resultados mostraron que una formulación micelar de quercetina con Pluronic F127, con propiedades biofarmacéuticas mejoradas, aumentó la biodisponibilidad de este flavonoide antioxidante y conservó o incluso mejoró ligeramente sus propiedades nefroprotectoras generales en comparación con la quercetina natural. Este flavonoide se postuló como un candidato prometedor para proteger al organismo contra el daño renal causado por algunos fármacos y toxinas en el tratamiento del cáncer [75].

El cáncer es un procedimiento que incluye varias etapas en las que se pueden producir variaciones moleculares y celulares, únicamente de origen genético. Los suplementos a base de hierbas contienen muchos fitoquímicos al igual que los flavonoides que pueden ayudar a prevenir o mejorar esta enfermedad [76].

Los polifenoles son contradictorios con el inicio, la promoción y la progresión del cáncer, por lo que actúan como materiales quimiopreventivos. En cierto modo, son mediadores



anticancerígenos debido a su efecto inhibidor del crecimiento celular y de la proliferación, la metástasis, mostrando efectos antioxidantes y antiinflamatorios [76].

Recientemente, numerosos informes han indicado que la rutina posee una eficaz actividad quimiopreventiva [76]. En investigaciones futuras podría utilizarse la rutina pura o encapsulada en Eudragit® para el tratamiento de esta enfermedad o los efectos secundarios de la misma con el fin de seguir contribuyendo a mejorar la calidad de vida del ser humano.





Capítulo 6. Referencias bibliográficas



6. Referencias bibliográficas

- [1] Graf, B. A.; Milbury, P. E.; Blumberg, J. B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. In *Journal of Medicinal Food*, 8 (3), 281–90.
- [2] Fletcher, R. J. (2003). Food sources of phyto-oestrogens and their precursors in Europe. In *British Journal of Nutrition*, 89(1), S39–43.
- [3] Slavin, J. (2003). Why whole grains are protective: biological mechanisms. In *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 129–34.
- [4] Aggarwal, B. B.; Sundaram, C.; Malani, N.; Ichikawa, H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. In *Advances in Experimental Medicine and Biology: The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease (Vol. 595)*, 1–75.
- [5] Hu, M. (2007). Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. In *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 803–806.
- [6] Seifried, H. E.; Anderson, D. E.; Fisher, E. I.; Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. In *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 567–79.
- [7] Thomasset, S. C.; Berry, D. P.; Garcea, G.; Marczylo, T.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. (2007). Dietary polyphenolic phytochemicals- promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. In *International Journal of Cancer*, 120(3), 451–8.
- [8] Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. In *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 125–132.
- [9] Jan, S., & Khan, M. R. (2016). Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory effects of *Kickxia ramosissima*. In *Journal of Ethnopharmacology*, 182, 90–100.
- [10] Abou-Ellella, F., & Mourad, R. (2015). Anticancer and Anti-oxidant Potentials of Ethanolic Extracts of *Phoenix dactylifera*, *Musa acuminata* and *Cucurbita maxima*. In *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1), 710–720.
- [11] Govea-Salas, M., Rivas-Estilla, A. M., Rodríguez-Herrera, R., Lozano-Sepúlveda, S. A., Aguilar-Gonzalez, C. N., Zugasti-Cruz, A., Salas-Villalobos, T. B., & Morlett-Chávez, J. A. (2016). Gallic acid decreases hepatitis C virus expression through its antioxidant capacity. In *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(2), 619–624.



- [12] Rashad, M. M., Mahmoud, A. E., Ali, M. M., Nooman, M. U., & Al-Kashef, A. S. (2015). Antioxidant and Anticancer Agents Produced from Pineapple Waste by Solid State Fermentation. In *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 7(6), 287–296.
- [13] Klettenhammer, S., Ferrentino, G., Morozova, K., & Scampicchio, M. (2020). Novel technologies based on supercritical fluids for the encapsulation of food grade bioactive compounds. In *Foods* (Vol. 9, Issue 10). MDPI AG.
- [14] Aherne, S. A., Daly, T., Jiwan, M. A., O'Sullivan, L., & O'Brien, N. M. (2010). Bioavailability of β -carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. In *Food Research International*, 43(5), 1449–1454.
- [15] Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 5). MDPI AG.
- [16] Cid-Ortega, S., & Monroy-Rivera, J. A. (2018). Extraction of kaempferol and its glycosides using supercritical fluids from plant sources: A review. In *Food Technology and Biotechnology*, 56(4), 480–493.
- [17] Dhiman, A., & Prabhakar, P. K. (2021). Micronization in food processing: A comprehensive review of mechanistic approach, physicochemical, functional properties and self-stability of micronized food materials. In *Journal of Food Engineering* (Vol. 292). Elsevier Ltd.
- [18] Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2013). Micronization and encapsulation of functional pigments using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Process Engineering*, 36(1), 36–49.
- [19] Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. In *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (Vol. 50).
- [20] Temelli, F. (2018). Perspectives on the use of supercritical particle formation technologies for food ingredients. In *Journal of Supercritical Fluids*, 134, 244–251.
- [21] Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2014). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 7, Issue 4, pp. 452–490). Springer New York LLC.

[22] Keven Silva, E., & Angela A. Meireles, M. (2014). Encapsulation of Food Compounds Using Supercritical Technologies: Applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent. In *Food and Public Health*, 4(5), 247–258.

[23] Weidner, E. (2009). High pressure micronization for food applications. In *Journal of Supercritical Fluids* (Vol. 47, Issue 3, pp. 556–565).

[24] Kalani, M., & Yunus, R. (2011). Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review. In *International journal of nanomedicine* (Vol. 6, pp. 1429–1442).

[25] Cocero, M. J., Martín, Á., Mattea, F., & Varona, S. (2009). Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. In *Journal of Supercritical Fluids* (Vol. 47, Issue 3, pp. 546–555).

[26] Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., & Jesús Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. In *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271–278.

[27] Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., & Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1–36). MDPI.

[28] Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. In *Journal of Nutritional Science* (Vol. 5). Cambridge University Press.

[29] Griesbach, R. (2005). Biochemistry and genetics of flower color. In *Plant Breed Rev* 25, 89–114.

[30] Álvarez Castroa, E., & Orallo Cambeiroa, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. In *Offarm*, 22, 130–140.

[31] Santos E, Maia B, Ferriani A, Teixeira S. (2017). Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* (Chapter 1).

[32] Aisling Aherne, S., & O'brien, N. M. (2002). Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. In *Nutrition*, 18, 75–81.

[33] Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive



compounds from fruits and vegetables: A review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171.

[34] Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. D. B., & Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 13, pp. 31–37). Elsevier Ltd.

[35] Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 25, Issue 2, pp. 149–164). Elsevier B.V.

[36] Patel, K., & Patel, D. K. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* (pp. 457–479). Elsevier.

[37] Calabrò, M. L., Tommasini, S., Donato, P., Stancanelli, R., Raneri, D., Catania, S., Costa, C., Villari, V., Ficarra, P., & Ficarra, R. (2005). The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: Spectroscopic studies and biological assays. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(5), 1019–1027.

[38] Lakkis, J. M. (Ed.). (2016). Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems (Second edition). *John Wiley & Sons Ltd.*

[39] Nikam, V.K., Kotade K. B., Gaware, V. M., Dolas, R. T., et al. (2011). Eudragit a versatile polymer: a review. In *Pharmacologyonline*, 1, 152–164.

[40] Franco, P., & de Marco, I. (2020). Eudragit: A novel carrier for controlled drug delivery in supercritical antisolvent coprecipitation. In *Polymers*, 12(1).

[41] Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 67, pp. 220–235). Elsevier.

[42] Jung, J., & Perrut, M. (2001). Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. In *Journal of Supercritical Fluids* (Vol. 20).

[43] Martín, A., & Cocero, M. J. (2008). *Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Patents Review*. In *Recent Patents on Engineering*, 2, 9-20.



[44] Shariati, A., & Peters, C. J. (2003). Recent developments in particle design using supercritical fluids. In *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4–5), 371–383.

[45] Martín, A., & Cocero, M. J. (2008). Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 60, Issue 3, pp. 339–350).

[46] Guha, R., Vinjamur, M., & Mukhopadhyay, M. (2011). Demonstration of mechanisms for coprecipitation and encapsulation by supercritical antisolvent process. In *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 50(2), 1079–1088.

[47] Wu, T. H., Yen, F. L., Lin, L. T., Tsai, T. R., Lin, C. C., & Cham, T. M. (2008). Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. In *International Journal of Pharmaceutics*, 346(1–2), 160–168.

[48] Fraile, M., Buratto, R., Gómez, B., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2014). Enhanced delivery of quercetin by encapsulation in poloxamers by supercritical antisolvent process. In *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(11), 4318–4327.

[49] Rostagno, M. A., Prado, J. M. (Ed.) (2013). Natural Product Extraction: Principles and Applications. *Royal Society of Chemistry, Green Chemistry Series*.

[50] FDA Guidance for Industry (1997). Q3C Impurities: Residual Solvents, U.S. *Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration*.

[51] FDA Guidance for Industry (2012). Q3C - Tables and list, U.S. *Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration*.

[52] European Commission (2009). DIRECTIVE 2009/32/EC on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients (Recast).

[53] Jiménez-Gonzalez, C., Curzons, A. D., Constable, D. J. C., & Cunningham, V. L. (2004). Expanding GSK's Solvent Selection Guide - Application of life cycle assessment to enhance solvent selections. In *Clean Technologies and Environmental Policy*, 7(1), 42–50.

[54] Franco, P., & Marco, I. de. (2020). Supercritical antisolvent process for pharmaceutical applications: A review. In *Processes*, 8(8).

[55] Giraldez, I. N. (2020). Biosensores basados en nanohilos de plata para la detección de compuestos de interés en la Industria alimentaria. *Universidad de Valladolid. Escuela*



de Ingenierías Industriales. Disponible en: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/41142>.
Fecha de última consulta: 25-04-22.

- [56] Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2007). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*.
- [57] Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W. M., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2017). Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. In *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*.
- [58] Bergström, J. (2015). Experimental Characterization Techniques. In *Mechanics of Solid Polymers* (pp. 19–114). Elsevier.
- [59] Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA – Difractometría de Rayos X (Polvo) – Principios de la técnica. Disponible en:
<https://laboratoriotechnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/difractometra-de-rayos-x-polvo>. Fecha de última consulta: 26-04-22.
- [60] Hameed, B. S., Bhatt, C. S., Nagaraj, B., & Suresh, A. K. (2018). Chromatography as an Efficient Technique for the Separation of Diversified Nanoparticles. In *Nanomaterials in Chromatography*. Elsevier Inc.
- [61] Royal Society of Chemistry. (2009). *Spectroscopy in a Suitcase: Ultraviolet -Visible Spectroscopy (UV)*. 1–7. Disponible en:
http://www.rsc.org/learn-chemistry/content/filerepository/CMP/00/001/304/UV-Vis_Student_resource_pack_ENGLISH.pdf. Fecha de última consulta: 26-04-22.
- [62] Phillips, D. (1984). Photophysics. In *Journal of Photochemistry*, 25(1), 29–32.
- [63] Montes, A., Wehner, L., Pereyra, C., & Martínez de la Ossa, E. J. (2016). Precipitation of submicron particles of rutin using supercritical antisolvent process. In *Journal of Supercritical Fluids*, 118, 1–10.
- [64] Das, M. K., & Kalita, B. (2014). Design and evaluation of phyto-phospholipid complexes (phytosomes) of Rutin for transdermal application. In *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(10), 51–57.
- [65] Kim, J. S., Kim, M. S., Park, H. J., Jin, S. J., Lee, S., & Hwang, S. J. (2008). Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemicalcium using spray-drying and SAS process. In *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1-2), 211–219.

[66] Jiao, M., Wu, Z. L., Liu, Y., Liu, W., & Li, R. (2016). Surfactant-assisted separation of ginkgo flavonoids from Ginkgo biloba leaves using leaching and foam fractionation. In *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 11(5), 664–672.

[67] Franco, P., & de Marco, I. (2021). Formation of rutin- β -cyclodextrin inclusion complexes by supercritical antisolvent precipitation. In *Polymers*, 13(2), 1–15.

[68] Kunjiappan, S., Bhattacharjee, C., Selvaraj, K., & Chowdhury, R. (2013). Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern Azolla microphylla and evaluation of free radical scavenging activity. In *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 743-749.

[69] Haware, R. v., Chaudhari, P. D., Parakh, S. R., & Bauer-Brandl, A. (2008). Development of a melting tablet containing promethazine HCl against motion sickness. In *AAPS PharmSciTech*, 9(3), 1006–1015.

[70] Sharma, M., Sharma, V., Panda, A. K., & Majumdar, D. K. (2011). Enteric microsphere formulations of papain for oral delivery. *Yakugaku Zasshi*, 131(5), 697–709.

[71] Tyrrell, Z. L., Shen, Y., & Radosz, M. (2011). Near-critical fluid micellization for high and efficient drug loading: Encapsulation of paclitaxel into PEG-b-PCL micelles. In *Journal of Physical Chemistry C*, 115(24), 11951–11956.

[72] Linares, V., Yarce, C. J., Echeverri, J. D., Galeano, E., & Salamanca, C. H. (2019). Relationship between degree of polymeric ionisation and hydrolytic degradation of Eudragit® E polymers under extreme acid conditions. In *Polymers*, 11(6), 1010.

[73] Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. In *Pharmaceutics* (Vol. 3, Issue 4), 793–829.

[74] Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Capanoglu, E., Esatbeyoglu, T. (2022). Investigating the effects of supercritical antisolvent process and food models on antioxidant capacity, bioaccessibility and transepithelial transport of quercetin and rutin. In *Food & Function*, 13(8), 4469-4477.

[75] Casanova, A. G., Prieto, M., Colino, C. I., Gutiérrez-Millán, C., Ruszkowska-Ciastek, B., de Paz, E., Martín, Á., Morales, A. I., & López-Hernández, F. J. (2021). A micellar formulation of quercetin prevents cisplatin nephrotoxicity. In *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–14.

[76] Negahdari, R., Bohlouli, S., Sharifi, S., Maleki Dizaj, S., Rahbar Saadat, Y., Khezri, K., Jafari, S., Ahmadian, E., Gorbani Jahandizi, N., & Raeesi, S. (2021). Therapeutic benefits of



rutin and its nanoformulations. In *Phytotherapy Research* (Vol. 35, Issue 4, pp. 1719–1738). John Wiley and Sons Ltd.