



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

Formulación de rutina para la mejora de su biodisponibilidad

Autor:

Pahino Villardón, Sara.

Tutor:

**Martín Martínez, Ángel
Grupo Alta Presión, Dpto. IQTMA**

Valladolid, Julio 2023.





Resumen

El presente Trabajo de Fin de Grado con título “Formulación de rutina para la mejora de su biodisponibilidad” nace con el objetivo de desarrollar una formulación capaz de mejorar potencialmente la hidrosolubilidad y biodisponibilidad de la rutina para poder aplicar sus posibles beneficios en la industria y la salud humana.

Para alcanzar dicho objetivo, en primer lugar, se precipitó rutina con la técnica SAS (Supercritical Antisolvent), también se coprecipitó rutina con distintos polímeros de Eudragit® como material portador mediante encapsulación con la misma técnica.

Posteriormente, se caracterizó la morfología y estructura de las partículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos X. Los resultados indicaron una reducción significativa del tamaño y cristalinidad de las partículas.

Por último, se realizaron pruebas de disolución en fluido intestinal simulado cuyos resultados evidenciaron una mejora del comportamiento de disolución de la rutina respecto del compuesto sin tratar.

Palabras clave

Rutina, Eudragit®, SAS, encapsulación, biodisponibilidad.

Abstract

The present Final Degree Project entitled "Formulation of rutin to improve its bioavailability" was conceived with the aim of developing a formulation capable of potentially improving the water solubility and bioavailability of rutin in order to apply its potential benefits in industry and human health.

To achieve this objective, first, rutin was precipitated with the SAS (Supercritical Antisolvent) technique, rutin was also coprecipitated with different polymers of Eudragit® as carrier material by encapsulation with the same technique.

Subsequently, the morphology and structure of the particles were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction. The results indicated a significant reduction in particle size and crystallinity.

Finally, dissolution tests were carried out in simulated intestinal fluid, whose results showed an improvement in the dissolution behavior of the rutin with respect to the untreated compound.

Keywords

Rutin, Eudragit®, SAS, encapsulation, bioavailability.





Índice

Listado de figuras	7
1. Introducción y objetivos	9
1.1. Introducción	9
1.2. Objetivo.....	11
2. Marco teórico.....	13
2.1. Polifenoles.....	13
2.1.1. Clasificación de los polifenoles	14
2.1.2. Propiedades físicas	15
2.1.3. Flavonoides.....	15
2.1.4. Biodisponibilidad de los flavonoides.....	17
2.1.5. Rutina	18
2.2. Técnicas de mejora de la biodisponibilidad.....	23
2.2.1. Reducción del tamaño de las partículas.....	23
2.2.2. Fluidos supercríticos, SC-CO ₂	24
2.2.3. Procesos con fluidos supercríticos.....	25
2.2.4. Procesos antisolvente (GASR, GASP, SAS, PCA, SEDS...)	26
2.2.5. Proceso supercrítico antisolvente (SAS)	27
2.2.6. Encapsulación.....	28
2.2.7. Formulación	29
2.2.8. Trabajo previo	30
3. Instalación de la planta y equipos.....	33
3.1. Descripción del proceso	33
3.2. Planta.....	34
3.3. Equipos de la planta	35
4. Método experimental	39
4.1. Materiales utilizados.....	39
4.2. Experimentos para la formación de partículas.....	39
4.2.1. Procedimiento.....	40
4.2.2. Experiencias realizadas.....	40
4.3. Experimentos de disolución in vitro.....	41
4.3.1. Procedimiento.....	41
4.3.2. Experiencias realizadas.....	42
4.4. Análisis de muestras	42



4.5. Caracterización de las muestras	45
5. Resultados y discusión.....	47
5.1. Micronización de la rutina pura	47
5.2. Caracterización estructural del producto de rutina procesada por SAS.....	48
5.3. Coprecipitación de rutina y Eudragit® (L-100, L-100-55 Y E-100).....	48
5.4. Caracterización estructural de Coprecipitados de rutina-Eudragit® procesados con SAS.....	50
5.5. Pruebas de liberación in vitro	51
6. Conclusiones y trabajo futuro	55
6.1. Conclusiones	55
6.2. Trabajo futuro.....	56
7. Bibliografía	57
8. Anexos	63
ANEXO I: Resultados de los diferentes experimentos en las pruebas de disolución in vitro.....	63

Listado de figuras

Figura 1: Diferentes clases de los compuestos fenólicos (Voss et al.,2022)	14
Figura 2: Estructura básica de los flavonoides (A) y sus subclases (B) (Harati et al., 2023).....	16
Figura 3: Estructura básica de los tipos de flavonoides y un ejemplo representativo (Bié et al., 2023).....	17
Figura 4: Estructura química de la rutina (Remanan & Zhu, 2023).....	18
Figura 5: Esquema de las diferentes actividades de la rutina (Semwal et al., 2021)	20
Figura 6: Representación esquemática de la producción de partículas mediante procesos antisolventes (Machado et al., 2022).....	26
Figura 7: Diagrama de flujo de un proceso antisolvente supercrítico (SAS) (Rodríguez-Rojo et al., 2022).....	28
Figura 8: Varios tipos de formulaciones: (a) microcápsulas, (b) microcomposites (Rodríguez-Rojo et al., 2022).....	30
Figura 9: Esquema del proceso SAS	33
Figura 10: Planta de operación SAS	34
Figura 11: Precipitador.....	35
Figura 12: Filtro situado en la parte inferior del precipitador: (A) Filtro montado (B) Componentes del filtro (C) filtro metálico de partículas.	35
Figura 13: Segundo filtro: (A) Filtro montado (B) Parte de filtro y filtro de acero inoxidable	36
Figura 14: Válvula de descompresión de la planta SAS	36
Figura 15: Bomba cromatográfica.....	37
Figura 16: Bomba de membrana	37
Figura 17: Separador flash utilizado al final del proceso	38
Figura 18: (A) Equipo utilizado para las pruebas de liberación in vitro (B) Detalle de la cesta que contiene la rutina durante la prueba.....	41
Figura 19: Representación esquemática de un espectrofotómetro de doble haz (Akash & Rehman, 2020)	44
Figura 20: Espectrofotómetro usado en el laboratorio para el análisis de muestras	44
Figura 21: Imágenes del SEM de: (a) rutina pura sin procesar y (b) rutina procesada mediante el método SAS. La relación de aumento de las imágenes de izquierda a derecha es de 1000x, 4000x, 16000x y su escala de 100 μm , 30 μm y 5 μm , respectivamente (Giraldes Fernández 2022).	47
Figura 22: Difractograma de rayos X de la rutina procesada por SAS	48
Figura 23: Imágenes del SEM de: (a) rutina y Eudragit® E-100 coprecipitados con SAS y (b) rutina y Eudragit® L-100 coprecipitados con SAS. La relación de aumento de las imágenes de izquierda a derecha es de 1000x, 4000x, 16000x y su escala de 100 μm , 30 μm y 5 μm	49
Figura 24: Difractograma de rayos X de las distintas muestras procesadas por SAS	50
Figura 25: Recta de calibrado para la rutina.....	51



Figura 26: Resultados de las pruebas de liberación de fármacos en líquido intestinal simulado52

1. Introducción y objetivos

1.1. Introducción

Los polifenoles son compuestos naturales que se encuentran en las plantas, por lo que están presentes en numerosos alimentos y bebidas de origen vegetal como frutas, verduras, frutos secos, cereales, té, café, aceite de oliva, vino, entre otros. Destacan por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias, además de su capacidad para reducir los riesgos de trastornos metabólicos, enfermedades cardiovasculares, diabetes de tipo 2 y algunos tipos de cáncer. Su poder antioxidante los hace unos excelentes candidatos para proteger y prevenir al organismo del estrés oxidativo (Nazzaro et al., 2022). Esto se debe a que los compuestos fenólicos y polifenólicos son capaces de eliminar las especies reactivas del oxígeno (ERO) que se generan por las diferentes reacciones biológicas y fuentes exógenas (Bhuyan & Handique, 2022).

Las distintas fuentes alimentarias de polifenoles contribuyen a su ingesta diaria, se sugiere consumir diariamente alrededor de 1 g/día de polifenoles, lo que representa aproximadamente 10 veces más que la cantidad de vitamina C recomendada. La pera, la manzana, la cereza y varias bayas son algunas de las frutas que contienen hasta 200-300 mg de polifenoles por cada 100 g de peso fresco. Asimismo, una taza de té, un vaso de vino tinto o una taza de café también pueden contener alrededor de 100 mg de polifenoles (Voss et al., 2022).

La cantidad, variedad y concentración de polifenoles que se ingieren dependen de los hábitos alimentarios de la población. Por ejemplo, debido al alto consumo de café y té en los países del norte de Europa, las personas que viven allí presentan una mayor ingesta de ácidos fenólicos y catequinas, que son propios de estos productos. En cambio, en los países del sur de Europa y la zona mediterránea, la dieta se caracteriza por ser rica en frutas, verduras, aceite de oliva, cereales y legumbres, lo que se traduce en una mayor ingesta de algunos flavonoides y tirosoles por parte de la población (Nazzaro et al., 2022). Los flavonoides forman parte de los polifenoles y son metabolitos secundarios de las plantas que poseen diversos beneficios como valores nutricionales y efectos terapéuticos. Entre los flavonoides presentes en las plantas, la rutina (quercetin-3-rutinósido) provoca un especial interés debido a su potencial farmacológico (Mel et al., 2020).

La presencia de alimentos de calidad ricos en polifenoles en la dieta ha suscitado un gran interés por los consumidores, debido a la relación directa que existe entre la dieta, la buena salud y la prevención de enfermedades (Nazzaro et al., 2022).

Sin embargo, se ha establecido que, aunque los compuestos polifenólicos están disponibles en muchas dietas, los beneficios para la salud no sólo dependen de la naturaleza y cantidad de los polifenoles ingeridos, sino también de su biodisponibilidad y bioaccesibilidad. La limitada biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos presentes en los alimentos de frutas y verduras, viene definida por su escasa bioaccesibilidad en el intestino delgado, a causa de las interacciones físicas y químicas de los compuestos polifenólicos con los polisacáridos indigeribles de las paredes celulares (Bié et al., 2023). Se estima que solo se absorben en el intestino delgado del 5% al 10% de los polifenoles totales ingeridos (Nazzaro et al., 2022).

La versatilidad de las propiedades de los polifenoles representa una gran oportunidad para las industrias, con el fin de que amplíen su oferta de productos utilizando tecnologías innovadoras. De este modo, la influencia positiva de los polifenoles en el bienestar permite formular nuevos procesos tecnológicos o nuevos productos funcionales. En especial, las industrias farmacéutica y alimentaria han estudiado y desarrollado metodologías que puedan mejorar las propiedades de los polifenoles como su solubilidad en agua y por tanto su biodisponibilidad (Nazzaro et al., 2022).

Cuando la biodisponibilidad está limitada por la solubilidad del compuesto, el control del tamaño de partícula y distribución del tamaño de partículas son claves para mejorarla (se requieren tamaños de partículas inferiores a 1 μm) (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Con el propósito de mejorar su solubilidad en agua se han desarrollado diferentes técnicas como nanopartículas, microemulsiones, añadir solubilizantes y co-solventes y producir complejos de inclusión de fármacos, ajustar el pH, liposomas y dispersiones sólidas. Estas técnicas se han desarrollado ya que, generalmente, los sistemas de liberación de fármacos poseen funciones de liberación controlada, como la respuesta al pH o la temperatura y la electrosensibilidad (Wang et al., 2023).

El siglo XXI es considerado el siglo de la nanotecnología debido a su gran revolución y desarrollo en diversos campos científicos como el agrícola, el químico, el médico, el alimentario y el farmacéutico. En aplicaciones farmacéuticas y médicas, la nanotecnología tiene una gran cantidad de ventajas debido a su tamaño ultrafino y a su mayor superficie, lo que permite la liberación controlada y dirigida de fármacos. Por ello, numerosos científicos han aplicado esta técnica para encapsular nutrientes como vitaminas y flavonoides, conocidos como nutraceuticos (Mel et al., 2020).

La encapsulación se basa en la coprecipitación del compuesto activo (como los flavonoides) con un polímero adecuado. Así, el compuesto activo puede quedar atrapado, impregnado en una matriz polimérica o encapsulado por un recubrimiento polimérico (Ozkan et al., 2019). La encapsulación contribuye a proteger el material del núcleo de agentes externos que lo degraden, como la luz, la humedad y el oxígeno, lo que aumenta la vida útil del producto y favorece una liberación controlada del encapsulado (Mel et al., 2020).

La obtención de partículas coprecipitadas mediante las técnicas convencionales de micronización presentan limitaciones debido a que, no resulta fácil controlar la distribución y el tamaño de las partículas, además de que el producto puede degradarse y perder su actividad biológica por las altas temperaturas y la gran cantidad de disolvente residual. Como alternativa para superar estas limitaciones se han propuesto los procesos con fluidos supercríticos (especialmente con dióxido de carbono supercrítico) (Ozkan et al., 2019).

Entre las técnicas basadas en el dióxido de carbono supercrítico se encuentra el proceso supercrítico antisolvente (SAS) en el que el dióxido de carbono actúa como antisolvente para el producto que se va a micronizar o coprecipitar (Ozkan et al., 2019). Se trata de una forma eficiente de producir micro o nanopartículas, dado que

reducir el tamaño de las partículas o cambiar la estructura cristalina de un fármaco puede aportar valores farmacéuticos beneficiosos (Yan et al., 2022).

El proceso SAS es una técnica versátil capaz de producir sistemas particulados, con diferentes aplicaciones a escala industrial y muy útil en los sistemas naturales de liberación de bioactivos con funcionalidad fisiológica (Machado et al., 2022).

En resumen, la formulación de sustancias naturales con un material portador biocompatible o biodegradable para formar compuestos o encapsulados tiene una gran importancia en distintas industrias, como la farmacéutica, la cosmética y la alimentaria. Diversos métodos de precipitación con fluidos supercríticos pueden ser implementados con éxito para producir estos materiales, entre los que destaca el proceso SAS (Cocero et al., 2009).

1.2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es desarrollar una formulación de la rutina, con el fin de mejorar sus propiedades como la solubilidad en agua. Para ello, se ha estudiado su precipitación y su encapsulación en Eudragit® mediante la técnica SAS, para obtener una coprecipitación eficaz que potencie su velocidad de disolución y, por consiguiente, mejore su biodisponibilidad y bioaccesibilidad.

En particular, se ha trabajado con las condiciones óptimas referentes a la presión de operación, tipo de disolvente, concentración total y relación polímero/rutina para la formación de micropartículas. Además, se presenta una caracterización morfológica y estructural del producto.

En este trabajo también se presenta una descripción de la naturaleza y la presencia de los polifenoles, la bioaccesibilidad y biodisponibilidad, y su impacto en la salud.



2. Marco teórico

2.1. Polifenoles

Los compuestos polifenólicos (PC) constituyen unos de los metabolitos secundarios más abundantes de la naturaleza, ya que se pueden encontrar en frutas, cereales, té, café y bebidas (Bié et al., 2023).

El término polifenol se usa para referirse tanto a flavonoides, taninos y ácidos fenólicos como a sus derivados. Los polifenoles están formados al menos por un anillo aromático y un grupo hidroxilo, unidos a otros componentes de estos mismos elementos, lo que hace que los polifenoles constituyan un gran conjunto de estructuras complejas (Voss et al., 2022). Su estructura puede variar en función del número de anillos fenólicos, así como de la fracción estructural que los une, dando lugar a una amplia variedad de estructuras que puede ir desde moléculas simples hasta moléculas complejas de alto peso molecular. Se han identificado más de 9000 estructuras fenólicas, lo que les hace formar uno de los grupos más numerosos en el reino vegetal, siendo constituyentes de una gran parte de alimentos de origen vegetal (Bié et al., 2023; Voss et al., 2022).

Los compuestos polifenólicos se pueden obtener de dos vías metabólicas: de la del ácido shikímico, por la que se forman la mayoría y en la que se forman principalmente fenilpropanoides, (se genera el esqueleto fenilpropanoide (C6-C3)), y la vía del ácido acético, en la que se forman fenoles simples. La combinación de ambas vías lleva a la formación de flavonoides. Por lo tanto, los polifenoles se pueden definir como metabolitos secundarios de las plantas desarrollados a partir de las vías de los fenilpropanoides y/o los policétidos derivados del shikimato, que contienen más de una fracción fenólica y carecen de grupos funcionales nitrogenados en su estructura básica (Bié et al., 2023; Harati et al., 2023).

Además, los compuestos polifenólicos pueden encontrarse en forma de glucósidos cuando presentan unidades de azúcares asociadas en las distintas posiciones del esqueleto polifenólico o asociados a ácidos orgánicos, o ambas cosas (Bié et al., 2023).

Los polifenoles son un grupo de sustancias que tienen alto poder antioxidante, lo que complementa a las vitaminas y enzimas antioxidantes que sirven como defensa contra el estrés oxidativo. Se les puede considerar antioxidantes ya que, gracias a sus grupos fenólicos donadores de electrones presentes en su estructura, son sustancias que neutralizan los radicales libres tóxicos y las especies reactivas que se generan en el organismo, lo que reduce la tasa de oxidación. Esta función les hace capaces de proteger los constituyentes celulares frente al daño oxidativo y, por tanto, limitar el riesgo de diversas enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo. Sus propiedades antioxidantes dependen de las diferencias estructurales de los distintos tipos y de la glicosilación (Bhuyan & Handique, 2022; Bié et al., 2023).

Potencialmente, los compuestos polifenólicos tienen capacidad para mejorar la salud humana, por ello, numerosos estudios han comenzado a centrarse en ellos. Los compuestos polifenólicos poseen funciones positivas para la salud y se sugiere

que su consumo a largo plazo protege contra algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, osteoporosis, pancreatitis, problemas gastrointestinales, daño pulmonar y enfermedades neurodegenerativas, entre otros (Bhuyan & Handique, 2022; Voss et al., 2022).

A pesar de ser el objeto de numerosas investigaciones, el uso de los polifenoles se ve limitado por tener una baja solubilidad y estabilidad (Bhuyan & Handique, 2022). Además, su biodisponibilidad es bastante escasa comparada con la de las vitaminas antioxidantes e hidrosolubles, ya que varía en función de las dimensiones de la molécula, el nivel de polimerización, la presencia y el tipo de azúcar en la molécula, y de la hidrofobicidad del compuesto (Bié et al., 2023).

Los polifenoles presentan diversos beneficios para la salud, lo que ha animado a estudiar su accesibilidad en la ingesta diaria de alimentos de las personas. Desarrollar una mejora en las propiedades de dichas sustancias como pueden ser la estabilidad y la solubilidad, ha supuesto un gran desafío hasta la fecha, ya que supone una tarea difícil no comprometer su actividad biológica (Bhuyan & Handique, 2022).

2.1.1. Clasificación de los polifenoles

Los polifenoles se dividen en distintas clases en función de la disposición y el número de anillos fenólicos y de los grupos funcionales que se unen a estos. Por ello, se pueden diferenciar dos grandes grupos: los flavonoides y no flavonoides. A su vez, los flavonoides se dividen en seis subclases: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles. Mientras que, las principales subclases de los no flavonoides son los lignanos, los estilbenos y los ácidos fenólicos (Bhuyan & Handique, 2022; Bié et al., 2023).

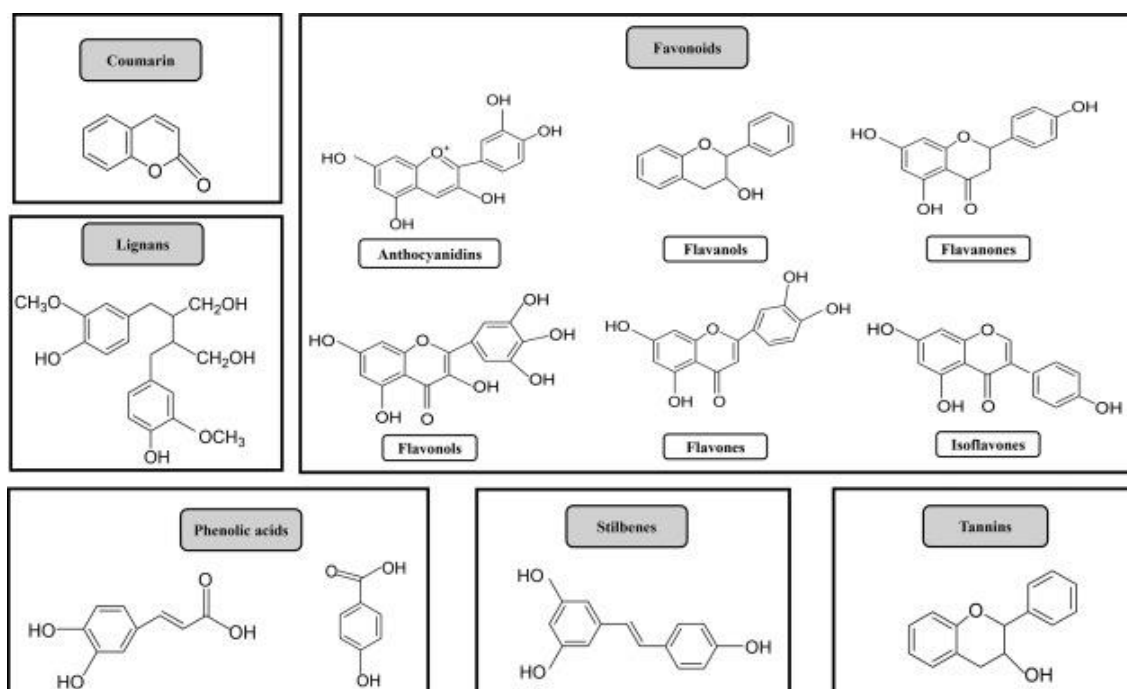


Figura 1: Diferentes clases de los compuestos fenólicos (Voss et al., 2022)

2.1.2. Propiedades físicas

Las propiedades de los compuestos polifenólicos dependen de su estructura. Algunos de ellos se pueden utilizar para conseguir diferentes pigmentos, por ejemplo, las flavonas y flavonoles se utilizan para el amarillo, las flavanonas para el naranja y las antocianicas para el rojo, azul y púrpura. En función del tipo, absorben la radiación en la región ultravioleta y los compuestos coloreados absorben en la región visible del espectro. También se relacionan con los sabores y olores de los alimentos (Bié et al., 2023).

En cuanto a su solubilidad, los compuestos polifenólicos generalmente son solubles en disolventes orgánicos polares y algunos pueden ser solubles en agua. Además, son sensibles a la temperatura, lo que puede provocar reacciones no deseadas o su degradación (Bié et al., 2023).

2.1.3. Flavonoides

Etimológicamente el término flavonoide deriva del latín "flavus", que significa "amarillo" (Bié et al., 2023).

Los flavonoides son uno de los compuestos fenólicos vegetales más abundantes y están presentes en una gran variedad de alimentos y bebidas de origen vegetal. (Harati et al., 2023)

Además de sus funciones fisiológicas en las plantas, los flavonoides tienen un papel relevante en la dieta humana, siendo la clase de polifenoles más abundante. Estos son compuestos de bajo peso molecular, que pueden encontrarse en frutas y verduras, como cebollas, alcachofas, bayas, cerezas, cítricos, uvas, perejil, soja, té y vino (Bié et al., 2023).

Químicamente, los flavonoides están formados por un esqueleto de 15 carbonos (C6-C3-C6), cuentan con dos anillos aromáticos A y B que se unen covalentemente por tres átomos de carbono creando un anillo heterociclo oxigenado C (anillo de pirona heterocíclica). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 2 (A)) (Bié et al., 2023; Harati et al., 2023; Martínez-Flórez et al., 2002).

Los seis subgrupos principales de los flavonoides se dividen en función de la conexión entre los anillos B y C, y su grado de oxidación y sustitución (Bié et al., 2023; Harati et al., 2023; Maleki et al., 2019).

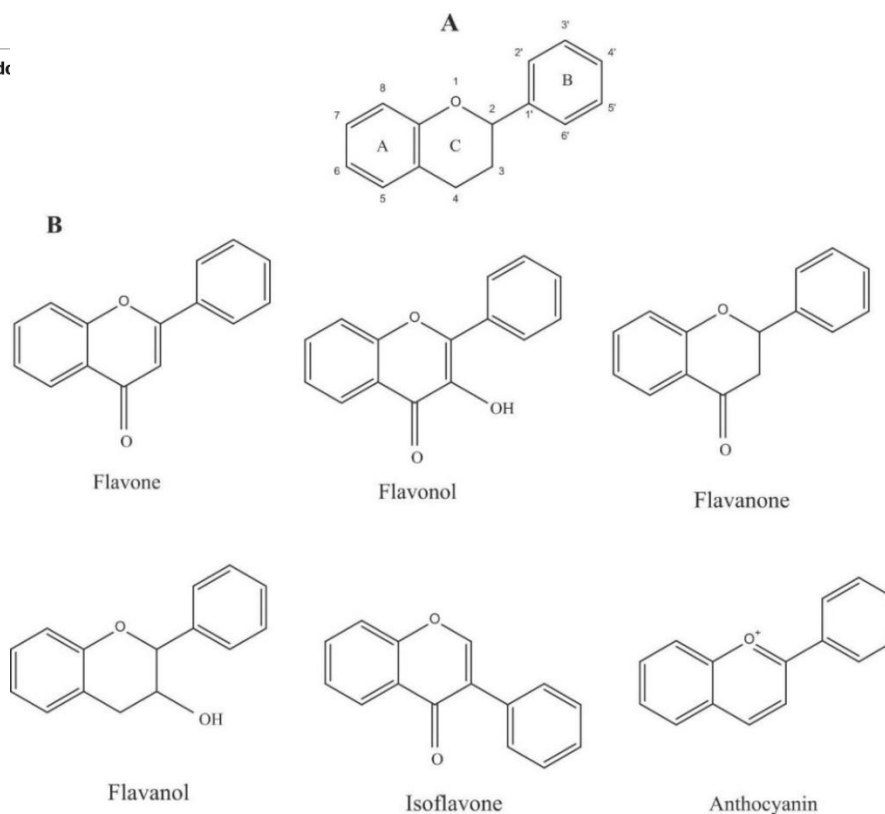


Figura 2: Estructura básica de los flavonoides (A) y sus subclases (B) (Harati et al., 2023)

Los flavonoides tienen una gran predisposición a presentarse de forma natural como sus derivados glicosilados. Mayoritariamente, a los flavonoles y las flavonas se les unen azúcares, por lo que se hallan como O-glicósidos. Se denomina aglicona la parte de la molécula que no contiene azúcares. Se sustituyen uno o más grupos hidroxilo y, en comparación con la posición C7, el sitio preferido de glicosilación es la posición C3 de la molécula flavonoide. Los azúcares más comunes que suelen formar parte de estas moléculas son la D-glucosa seguida de la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa y la D-xilosa (Bhuyan & Handique, 2022; Harati et al., 2023; Martínez-Flórez et al., 2002).

Las flavonas, flavonoles y flavanonas son las clases más comunes en el reino vegetal. Los flavonoles, que son los derivados 3-hidroxi de las flavonas porque poseen un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C, constituyen una de las subclases más numerosas (Bié et al., 2023; Martínez-Flórez et al., 2002).

Un ejemplo representativo de los flavonoles es la quercetina (se puede observar en la Figura 3), que se encuentra de forma natural en las plantas formando agliconas o conjugados de carbohidratos y es un potente antioxidante (Harati et al., 2023).

Por lo general los flavonoides, se presentan como glucósidos de naturaleza hidrófila, lo que conlleva a que no se absorban bien en el intestino y su biodisponibilidad sea bastante baja. Por ello, su uso como fármacos o productos nutracéuticos está muy limitado, además de su inestabilidad, la degradación oxidativa y la transformación metabólica que disminuyen su bioactividad (Bié et al., 2023).

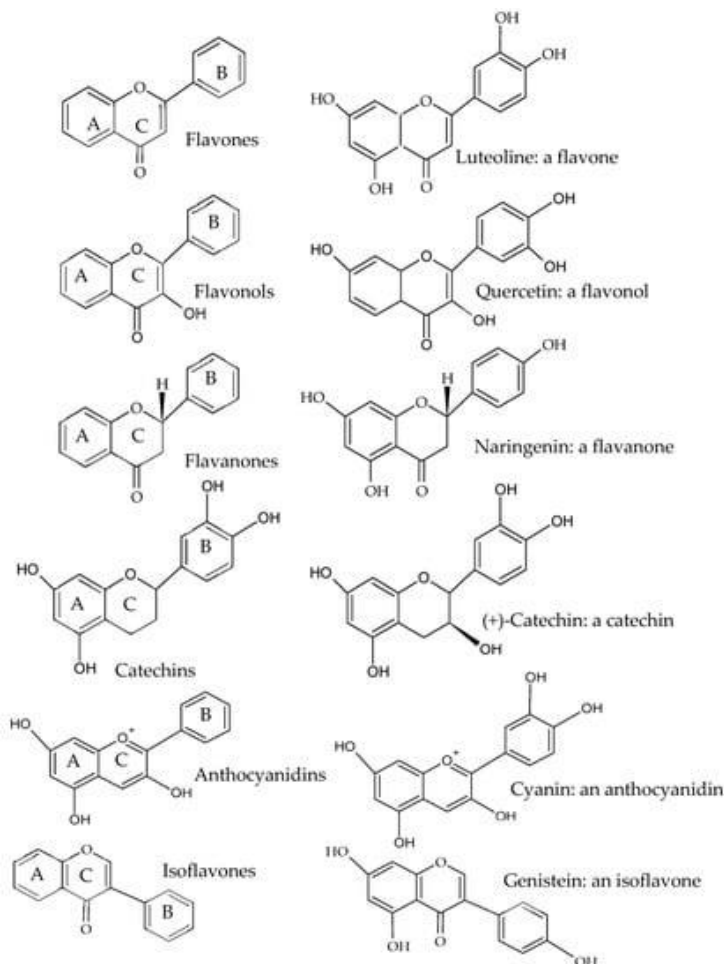


Figura 3: Estructura básica de los tipos de flavonoides y un ejemplo representativo (Bié et al., 2023)

2.1.4. Biodisponibilidad de los flavonoides

La bioaccesibilidad consiste en la liberación de los componentes presentes en los alimentos, con el fin de que estos queden disponibles para su absorción en el tracto gastrointestinal, lo que se puede considerar como un primer paso para que un componente sea biodisponible. La biodisponibilidad incluye la digestión gastrointestinal, la absorción, la distribución en el torrente sanguíneo y en los tejidos y la bioactividad (Grgić et al., 2020).

La biodisponibilidad se define como la fracción de un nutriente ingerido a partir de los alimentos, que queda disponible para su absorción en el intestino y el procesamiento metabólico y almacenamiento (Jackson, 1997, Citado en Hedrén et al., 2002).

La transformación en el organismo de los compuestos polifenólicos en el tracto gastrointestinal depende principalmente de dos factores: su estructura química y las especies de la microbiota intestinal (Bié et al., 2023).

Debido a sus diferentes estructuras se presenta el problema de no poder aprovechar plenamente los efectos positivos de los compuestos fenólicos, que además de la complejidad de las diferentes matrices alimentarias en las que se encuentran, reduce notablemente la biodisponibilidad de estos compuestos (Grgić et al., 2020). Las diferencias estructurales entre los distintos compuestos afectan a su biodisponibilidad (Bié et al., 2023).

Asimismo, un alto contenido de compuestos polifenólicos en los alimentos no implica una elevada biodisponibilidad porque también influyen factores como la absorción y el metabolismo (Bié et al., 2023).

Debido a este problema y a las propiedades positivas que se han estudiado sobre este tipo de sustancias, se está investigando sobre la mejora de la biodisponibilidad de los flavonoides utilizando diferentes técnicas entre las que destacan: técnicas de microencapsulación, nanosistemas de administración y microemulsiones (Bié et al., 2023).

2.1.5. Rutina

La rutina (3', 4', 5, 7-tetrahidroxi-flavona-3 β -D-rutinósido) es un polifenol que pertenece al grupo de los flavonoides y dentro de estos se encuentra en los flavonoles siendo la forma glicosilada de la quercetina (Moravkar et al., 2023; Remanan & Zhu, 2023).

Su fórmula molecular es C₂₇H₃₀O₁₆. Como su nomenclatura indica, es un rutinósido formado por quercetina (aglicón) al que se une un disacárido de rutinosa (glucosa y ramnosa) en la posición 3 del anillo C (como sustituyente al grupo hidroxilo C3) (Moravkar et al., 2023; Remanan & Zhu, 2023).

En su estado sólido, es un polvo de color amarillento y que tiene una masa molar de 610,521 g/mol. Es fácilmente soluble en piridina, pero poco soluble en agua, posee un valor de pKa de 6,17 y se funde a 125 °C (Semwal et al., 2021).

Por lo tanto, la rutina o quercetina-3-O-rutinósido, es un glucósido de flavonol, que además puede ser conocido como Vitamina P (Frutos et al., 2019). La rutina está compuesta por la parte fenólica básica unida a la molécula de azúcar lo que reduce su actividad biológica, pero hace que sea más soluble en disolventes polares (Patel & Patel, 2019). La parte hidrófila de la molécula se trata de la parte fenólica unida al azúcar, que es la que le hace aumentar su solubilidad en agua. La rutina suele aparecer junto a la quercetina como consecuencia de la hidrólisis de la rutina, que ocurre gracias a la acción de la glucosidasa, dando lugar a quercetina con rutinosa (Frutos et al., 2019).

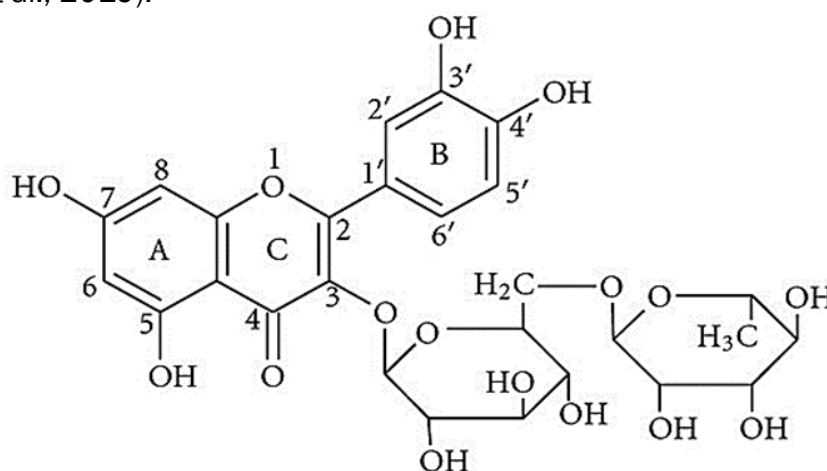


Figura 4: Estructura química de la rutina (Remanan & Zhu, 2023)

La característica principal de la rutina y de la mayoría de los flavonoides, es su actividad antioxidante, ya que, actúa eliminando radicales libres. Su poder antioxidante se asocia a los grupos hidroxilo presentes en sus anillos aromáticos. Además, posee propiedades quelantes de metales lo que le permite inhibir las peroxidaciones inducidas por iones metálicos (Frutos et al., 2019).

La rutina se puede encontrar en varias plantas, especialmente en frutas y verduras. Sus principales fuentes entre estos son las uvas y el trigo sarraceno, aunque también puede estar presente en las cebollas, alcaparras, espárragos verdes, cítricos, manzanas, tomates y albaricoques, entre otros (Frutos et al., 2019; Remanan & Zhu, 2023). La planta *Ruta graveolens*, que también contiene rutina, es el origen de su nombre (Wani et al., 2023).

La rutina presenta una baja solubilidad en agua, siendo esta de 0,125 g/L (Frutos et al., 2019), lo que limita su incorporación en alimentos y complementos alimenticios. Además, se ha de tener en cuenta su estabilidad para las condiciones de procesado y las posibles interacciones que pueda tener con otros componentes. Por ello, se presenta como un problema la aplicación de la rutina al desarrollo de alimentos funcionales, lo que afecta a su biodisponibilidad y absorción (Frutos et al., 2019).

Gracias a los efectos beneficiosos de los flavonoides que se han ido demostrando últimamente, se ha conseguido que tengan un papel importante como potenciales moléculas terapéuticas. En concreto, la rutina, debido a sus potentes actividades antioxidante y antiinflamatoria, presenta excelentes propiedades para prevenir trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otros (Frutos et al., 2019).

La rutina está presente en distintas frutas y verduras y es uno de los flavonoides que más se consumen regularmente por los seres humanos (Patel & Patel, 2019), por lo general su ingesta diaria está entre 1,5 y 70 mg/kg dependiendo de los hábitos nutricionales de la persona. En consecuencia, a su baja biodisponibilidad, la rutina apenas es absorbida, lo que afecta también a sus beneficios para la salud (Frutos et al., 2019).

Típicamente la rutina también es apreciada por tener actividad antibacteriana, antifúngica, antivírica, anticancerígena y antialérgica (Moravkar et al., 2023; Wani et al., 2023).

2.1.5.1. Usos generales de la rutina

En cuanto a los usos generales de la rutina, sus principales aplicaciones se centran en la industria farmacéutica, la medicina, la alimentación animal, la cosmética y la industria química. Dentro de estas, se suele utilizar como antioxidante y colorante, conservante alimentario, estabilizador y absorbente de rayos UV. La rutina también está presente en varias hierbas medicinales y preparados multivitamínicos que se encuentran en el mercado (Patel & Patel, 2019).

2.1.5.2. Actividades farmacológicas de la rutina

La rutina presenta diferentes actividades farmacológicas como las expuestas en el siguiente esquema:

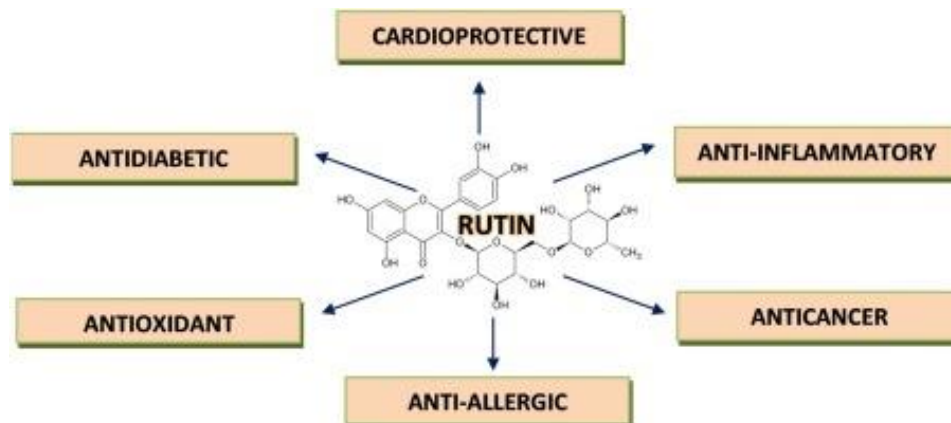


Figura 5: Esquema de las diferentes actividades de la rutina (Semwal et al., 2021)

- **Actividad cardiovascular:** estudios recientes han demostrado que la rutina tiene un gran potencial para su uso contra diferentes enfermedades cardíacas actuando a través de diversos mecanismos (Semwal et al., 2021).
- **Actividad anticancerígena:** según la OMS el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, es por ello por lo que el estudio en su tratamiento ha suscitado un gran interés entre los investigadores. Los estudios realizados con rutina mostraron que tiene actividad antitumoral contra ciertas células implicadas en el cáncer de colon y cáncer de mama.

Basándose en un amplio estudio se puede establecer una relación inversa entre la ingesta total de flavonoides y la incidencia de cáncer. La rutina ejerce un efecto quimiopreventivo sobre las células cancerosas además de presentar efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Asfour & Mohsen, 2018).

- **Actividad del SNC:** los trastornos del sistema nervioso central afectan principalmente al cerebro y la médula espinal. A causa de las funciones antioxidantes de la rutina y del creciente aumento de los trastornos y patologías neurológicas, se ha estudiado el efecto neuroprotector de la rutina. El cerebro está muy expuesto al daño oxidativo y sus bajos niveles de protección antioxidante convierten a la rutina en un potencial agente farmacológico para su prevención. Algunos estudios han demostrado la influencia de la rutina en la muerte neuronal, que viene con las lesiones cerebrales y en la última etapa de los trastornos neurodegenerativos (Frutos et al., 2019).

En concreto, según diversas investigaciones la rutina tiene un papel protector contra la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer, la ansiedad y el glioma, entre otros trastornos cerebrales (Semwal et al., 2021).

- **Actividad antiinflamatoria:** la rutina puede tratar la inflamación vascular. El tratamiento con rutina también puede ser útil en enfermedades inflamatorias alérgicas.
- **Actividad antidiabética:** también se estudió el efecto antidiabético de la rutina en diferentes modelos experimentales.
- **Actividad contra la obesidad:** la obesidad se relaciona con la acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo que causa complicaciones metabólicas. Para tratarla el objetivo es la inhibición de la diferenciación de adipocitos. En un estudio tras el tratamiento con rutina se registró una inhibición de la diferenciación de los adipocitos en un tipo de células relacionadas, disminuyendo además otros niveles relacionados con la obesidad.
- **Actividad antihiperlipidémica:** múltiples problemas de salud están causados por niveles anormales de lípidos en sangre. Se ha mostrado una mejora del perfil lipídico en diferentes modelos experimentales usando rutina, además reduce los efectos adversos de la dieta hipercalórica y el consumo de alcohol, que suele provocar dificultades cardíacas y hepáticas.
- **Actividad antioxidante:** la oxidación celular se produce en presencia de radicales libres lo que provoca daño celular, además se origina estrés oxidativo, que da lugar a múltiples problemas de salud, como enfermedades cardíacas, cáncer y envejecimiento. Por ello, se pueden encontrar en el mercado productos con alto contenido en polifenoles y flavonoides, que eliminan los radicales libres y pueden proteger al organismo de la oxidación. La rutina se considera uno de los antioxidantes más potentes y eficaces y se suele usar como patrón para conocer el efecto antioxidante de una muestra.
- **Actividad antiosteoporótica:** se ha estudiado la actividad antiosteoporótica de la rutina y se ha descubierto que en los trastornos relacionados con los huesos (como la osteoporosis) la rutina tiene un papel importante.
- **Actividad anticatarata:** las cataratas están relacionadas con la modificación de las proteínas y el daño oxidativo en el cristalino del ojo, por lo que la rutina puede proteger de la catarata.
- **Actividades antimicrobianas:** la rutina puede tener también actividades antimicrobianas contra ciertas infecciones y antivirulentas.
- **Actividad antitiroidea:** en cuanto a su actividad antitiroidea, la rutina mostró una inhibición de ciertas funciones tiroideas mediante la eliminación de radicales libres.
- **Otras actividades:** además de las actividades citadas anteriormente también se han estudiado la actividad antileishmania y la actividad anti-SARS-CoV-2 de la rutina.

Es necesario realizar estudios sobre la toxicidad de una sustancia que se quiere usar como fármaco para garantizar su seguridad. Basándose en diversos estudios previos se puede concluir que la rutina es segura para su uso clínico (Semwal et al., 2021).

Por lo tanto, la rutina tiene un excelente poder terapéutico, pero a pesar de estos beneficios, presenta limitaciones como su escasa solubilidad en agua, su baja biodisponibilidad y su mala absorción. Debido a estos inconvenientes que presenta la rutina, se investigan diferentes técnicas como la encapsulación que es una estrategia que puede superar estas limitaciones (Frutos et al., 2019; Remanan & Zhu, 2023).

Mediante las diferentes técnicas de encapsulación, se ha estudiado que las partículas nanométricas de rutina influyen notablemente en la solubilidad y absorción. Por este motivo, se ha despertado cierto interés en la administración de moléculas naturales a través de nanoformulaciones, que proporcionan una administración eficaz de distintos fármacos en puntos específicos (Moravkar et al., 2023).

Se habla de nanopartículas para referirse a partículas coloidales sólidas con tamaños desde 1 a 1000 nm. El término nanopartículas poliméricas se utiliza generalmente para cualquier tipo de nanopartículas poliméricas, especialmente nanoesferas y nanocápsulas (Asfour & Mohsen, 2018).

La finalidad principal de la formulación de nanopartículas como sistema de administración, es controlar las propiedades de la superficie, el tamaño de las partículas y la liberación del fármaco para lograr su actuación en un sitio específico y un régimen de dosificación óptimos (Asfour & Mohsen, 2018).

Generalmente, para la formulación de nanopartículas que contengan fármacos o principios activos, se suelen utilizar polímeros. En función de la naturaleza de los polímeros, la carga superficial y sus propiedades son capaces de controlar diferentes parámetros de la formulación como la liberación y la estabilidad del fármaco (Asfour & Mohsen, 2018).

Uno de los métodos más comunes para producir nanopartículas es la nanoprecipitación. En esta técnica se requieren dos disolventes miscibles; el fármaco y el polímero deben disolverse en uno de ellos (disolvente) pero no en el otro (antisolvente). Cuando la solución del polímero se añade al antisolvente se produce una rápida desolvatación y precipitación de este, atrapando al fármaco inmediatamente.

Gracias a la miscibilidad del disolvente y antisolvente, se trata de una técnica apropiada para fármacos hidrófobos o con baja solubilidad en agua. Los polímeros de Eudragit (polímeros de polimetacrilato) suelen ser muy utilizados para preparar estas nanopartículas poliméricas (Asfour & Mohsen, 2018).

2.2. Técnicas de mejora de la biodisponibilidad

Estas limitaciones no son propias únicamente de la rutina. Una gran cantidad de alimentos de origen vegetal contienen compuestos bioactivos, que destacan por tener efectos beneficiosos para la salud. Estos nutrientes han sido objeto de estudio centrándose en su aplicación en productos industriales para la salud humana. No obstante, la eficacia de estos compuestos naturales depende de la cantidad ingerida y de su posterior absorción, que por lo general suele ser bastante pobre, lo que conlleva a que su biodisponibilidad sea bastante escasa (Machado et al., 2022).

Estos compuestos bioactivos como pueden ser los flavonoides, en los que se encuentra la rutina, tienen gran valor clínico debido a sus amplias actividades farmacológicas y biológicas cuyas aplicaciones se ven muy limitadas por su baja solubilidad en agua y escasa biodisponibilidad (Wang et al., 2023).

La biodisponibilidad depende principalmente de dos propiedades: la solubilidad acuosa y la permeabilidad intestinal. Por consiguiente, según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), de 1995, se pueden diferenciar estos compuestos en cuatro clases (Charalabidis et al., 2019; Rodríguez-Rojo et al., 2022):

- Clase I: Alta solubilidad y alta permeabilidad
- Clase II: Baja solubilidad y alta permeabilidad
- Clase III: Alta solubilidad y baja permeabilidad
- Clase IV: Baja solubilidad y baja permeabilidad.

Para mejorar la biodisponibilidad de estas moléculas, además de facilitar la dosificación del producto y reducir sus necesidades de volumen de almacenamiento, se busca crear partículas de tamaño y morfología específicos. Reducir el tamaño de las partículas tiene como consecuencia un aumento de la velocidad de disolución, ya que, la relación entre el área superficial y el volumen de las partículas aumenta. En concreto, para un tamaño crítico de las partículas menor que 1 o 2 μm , aumenta la solubilidad de saturación del compuesto (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Aparte de la reducción del tamaño, los compuestos amorfos presentan una mayor solubilidad que los cristalinos. Siguiendo con lo expuesto anteriormente, una mayor solubilidad de saturación se consigue con el tamaño nanométrico de las partículas y el estado amorfo. No siempre es fácil mantener el estado amorfo durante la vida útil del compuesto por lo que se suele coprecipitar con un polímero amorfo (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

2.2.1. Reducción del tamaño de las partículas

En la producción de nanopartículas se encuentran dos métodos diferentes:

- El MÉTODO TOP-DOWN que consiste en reducir mecánicamente el tamaño de las partículas micrométricas obtenidas por métodos convencionales hasta el dominio nanométrico. Dentro de estos métodos, existen dos tecnologías principales: la molienda de perlas (o de bolas) y la homogeneización a alta presión, o una combinación de ambas.

- En el MÉTODO BOTTOM-UP, se parte desde el tamaño nanométrico del producto en una solución coloidal o similar, tras la eliminación del disolvente. En los métodos bottom-up, las partículas pueden producirse mediante técnicas de cristalización/precipitación y evaporación de disolventes, como: cristalización a partir de una solución, secado por spray, procesos de secado con atomización mejorada, procesos de micronización con fluidos supercríticos (Rodríguez-Rojo et al., 2022). En este trabajo se profundizará en la micronización con fluidos supercríticos.

Las diferentes técnicas y procesos que incluyen fluidos subcríticos y supercríticos, como la formulación de materiales con características especiales y las técnicas de formación de partículas son actualmente un campo esencial en la investigación (Knez et al., 2014).

Existen métodos convencionales para la reducción del tamaño de las partículas como la trituración, la molienda, la criomolienda, la sublimación y la recristalización, pero resulta muy difícil controlar la forma, el tamaño y la distribución de tamaños de las partículas, ya que, no se ven influidas por la variación de los parámetros del proceso (Knez et al., 2014). En los métodos convencionales se suelen producir micropartículas que rondan de los 10 a 100 μm , pero para mejorar los problemas de solubilidad, son necesarios tamaños inferiores a 1 μm (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Además, el uso de disolventes en estas técnicas está limitado por Directiva 88/344/CEE del Consejo de la UE, principalmente cuando están destinadas a aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. Las diferentes desventajas que presentan los métodos convencionales han originado el desarrollo de nuevas técnicas en las que se usan fluidos subcríticos y supercríticos (Knez et al., 2014).

2.2.2. Fluidos supercríticos, SC-CO₂

Los fluidos supercríticos son aquellos con temperaturas y presiones superiores a su punto crítico. En condiciones supercríticas, los fluidos presentan propiedades intermedias entre los gases y los líquidos (lo que facilita la extracción de compuestos) (Essien et al., 2020; Okolie et al., 2022).

El agua, el CO₂, el benceno, el tolueno, el etano y el etanol son algunos de los muchos productos químicos que pueden utilizarse como disolventes supercríticos (Farooq et al., 2023). Pero los más estudiados son el agua supercrítica (SCW) y el CO₂ supercrítico (SC-CO₂) para su uso en procesos químicos sin disolventes y en la remediación medioambiental (Okolie et al., 2022).

El SC-CO₂ se refiere al CO₂ cuando se encuentra por encima de su temperatura y presión críticas de 31,1°C y 73,8 bar respectivamente, en estas condiciones sus propiedades varían entre las de gas y líquido. A temperatura ambiente el CO₂ presenta propiedades gaseosas y cuando se presuriza o se enfría se encuentra como sólido (hielo seco) (Okolie et al., 2022). El SC-CO₂ presenta propiedades únicas que hacen que sea el fluido más utilizado en aplicaciones como la extracción de alimentos, las aplicaciones farmacéuticas, los procesos de extrusión y la mejora del

petróleo crudo y el biopetróleo en la industria energética (Farooq et al., 2023; Okolie et al., 2022).

Debido a su creciente concentración en la atmósfera por las actividades industriales masivas el CO_2 se encuentra en abundancia, por lo que es un fluido de bajo coste. El CO_2 es uno de los principales gases de efecto invernadero, por ello, su utilización en otras aplicaciones industriales resulta beneficiosa desde un punto de vista sostenible (Machado et al., 2022; Okolie et al., 2022).

La extracción con fluidos supercríticos se trata de una tecnología verde, es decir, es un método respetuoso con el medio ambiente, además de ser rápido y eficiente. Esta técnica se utiliza generalmente para recuperar compuestos bioactivos de productos naturales (Okolie et al., 2022). En términos operativos, el SC-CO_2 es el más utilizado debido a sus bajos valores de tensión superficial, lo que refleja altas tasas de transferencia de masa (Machado et al., 2022). Su baja temperatura crítica es apta para preservar la estructura de los compuestos bioactivos del extracto. Además, el CO_2 es un gas a temperatura ambiente, por lo que su eliminación después de la extracción es sencilla (Okolie et al., 2022).

El SC-CO_2 también se considera ambientalmente seguro, debido a que no es inflamable ni tóxico (Machado et al., 2022).

Actualmente, el SC-CO_2 se utiliza en procesos de encapsulación y formación de partículas (Machado et al., 2022).

2.2.3. Procesos con fluidos supercríticos

Los procesos de formación de partículas que emplean fluidos supercríticos se pueden diferenciar en tres grupos (Knez et al., 2014):

- Cristalización a partir de solución supercrítica (CSS), expansión rápida de solución supercrítica (RESS) que utilizan el fluido supercrítico como disolvente.
- Formación de partículas por proceso antisolvente (SAS, GAS, SEDS...)
- Formación de partículas a partir de, soluciones saturadas de gas (PGSS™@...) con el fluido supercrítico como soluto (Knez et al., 2014; Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Las tecnologías que utilizan fluidos supercríticos presentan diversas ventajas a la hora de procesar compuestos naturales. En concreto, se han desarrollado técnicas de precipitación y encapsulación basadas en dióxido de carbono supercrítico como disolvente, antisolvente o soluto. Estas técnicas presentan unas condiciones de operación moderadas (presiones de 80 a 200 bar y temperaturas entre 35 y 60°C), lo que permite procesar materiales sensibles en un entorno inerte, evitando la contaminación y degradación de los compuestos. El uso de disolventes orgánicos tóxicos se ve muy reducido e, incluso, eliminado en estas técnicas y, además, se evitan los pasos de postprocesado, filtrado y secado (Fraile et al., 2014; Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Los procesos de precipitación y cristalización por fluidos supercríticos se basan en reducir el poder disolvente del disolvente, variando las condiciones de operación (presión y temperatura), por adición de un antidisolvente, por evaporación o por extracción de disolvente (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

2.2.4. Procesos antisolvente (GASR, GASP, SAS, PCA, SEDS...)

Existen distintos procesos antisolvente como la recristalización antisolvente gaseosa (GASR), precipitación antisolvente gaseosa (GASP), fraccionamiento antisolvente supercrítico (SAS), precipitación con un fluido comprimido antisolvente (PCA) y dispersión de sólidos mejorada por solución (SEDS). Estos procesos difieren en el contacto entre la solución y el antisolvente, que puede ser pulverizando la solución en un gas supercrítico o pulverizando el gas en la solución líquida (Knez et al., 2014).

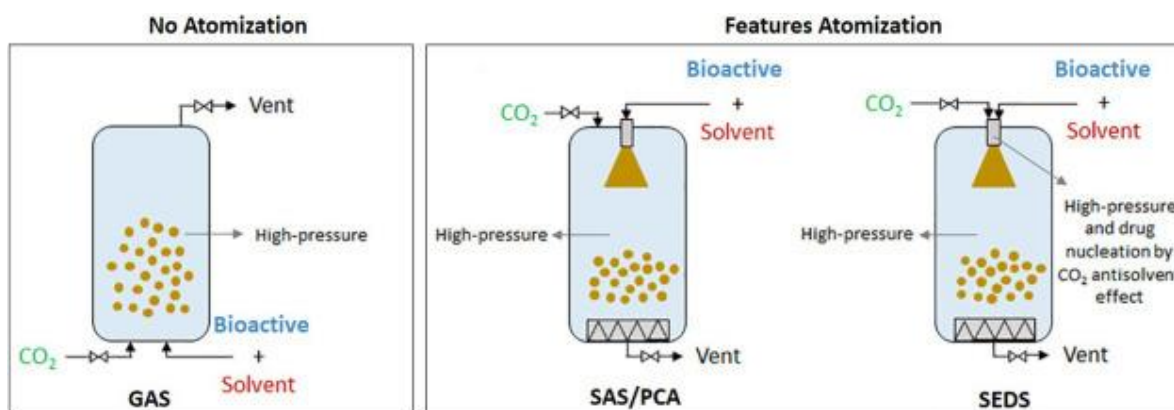


Figura 6: Representación esquemática de la producción de partículas mediante procesos antisolventes (Machado et al., 2022)

El mecanismo en el que se basan estas técnicas es, en reducir el poder disolvente de los disolventes (en los que los fluidos supercríticos se disuelven muy bien) y debido a esto se puede alcanzar una sobresaturación muy alta que hace que las partículas sólidas del soluto precipiten. El tamaño de las partículas, su forma y distribución de tamaño, varían en función de los parámetros del proceso que influyen directamente en la sobresaturación y la velocidad de nucleación (Knez et al., 2014).

Los procesos antisolvente presentan las siguientes ventajas:

- Control del tamaño, la forma y distribución de tamaños de las partículas producidas gracias a los parámetros del proceso.
- Condiciones de presión y temperatura de operación moderadas

Y las siguientes desventajas:

- Procesos por lotes
- Uso de disolventes orgánicos convencionales
- Es necesaria la separación del disolvente de los gases (Knez et al., 2014).

2.2.5. Proceso supercrítico antisolvente (SAS)

La tecnología de antisolventes supercríticos posee numerosas ventajas en comparación con los inconvenientes que presentan las técnicas convencionales como la molienda, los ultrasonidos, el secado por atomización y la liofilización, las cuales conllevan un alto gasto de energía, elevados costes y largos ciclos de funcionamiento (Wang et al., 2023).

El fácil control de las condiciones de operación, la reducción de disolventes orgánicos y el respeto por el medio ambiente son las principales ventajas que posee esta técnica. La micronización de partículas mediante SAS produce polvos finos con tamaños de partícula pequeños, una distribución de tamaños reducida y una morfología uniforme, lo que ayuda a no comprometer la bioactividad del fármaco (Wang et al., 2023).

La técnica SAS se puede utilizar para la preparación y formación de gránulos de producto farmacéuticos, generando partículas ultrafinas y microcápsulas (Wang et al., 2023).

Normalmente, se utiliza dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) como antisolvente en SAS, ya que tiene un punto crítico relativamente bajo (31,26°C y 73,8 bar), además de que es económico y no es tóxico (Wang et al., 2023).

La técnica SAS aprovecha la baja solubilidad de las moléculas orgánicas sólidas y los compuestos bioactivos en el dióxido de carbono supercrítico y la alta o completa miscibilidad de la mayoría de los disolventes en SC-CO₂. Para obtener un buen producto final, el disolvente orgánico debe ser completamente miscible con el CO₂ en las condiciones de operación. Las condiciones de presión y temperatura típicas se encuentran en el rango de 80-150 bar y 35-50°C respectivamente (Fraile et al., 2014; Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Durante el proceso el soluto de interés (fármacos, compuestos bioactivos naturales, carbohidratos, proteínas, vitaminas, polímeros...) es disuelto en un disolvente orgánico formando una disolución que se presuriza y se mezcla con CO₂. El fluido antisolvente (SC-CO₂) sobresatura esta disolución expandiéndola e induciendo así la precipitación o coprecipitación/encapsulación del soluto en forma de micro o nanopartículas secas. Esta precipitación se debe a la extracción simultánea del disolvente al SC-CO₂ y a la saturación del disolvente con SC-CO₂ (Machado et al., 2022; Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Una vez se produce la precipitación, se procede a realizar un ciclo de secado haciendo pasar un flujo mayor de SC-CO₂ (el doble o triple del volumen del precipitador) con el fin de eliminar los posibles restos de disolvente. Finalmente, las partículas sólidas se recogen en los correspondientes filtros o en el fondo del recipiente de precipitación (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

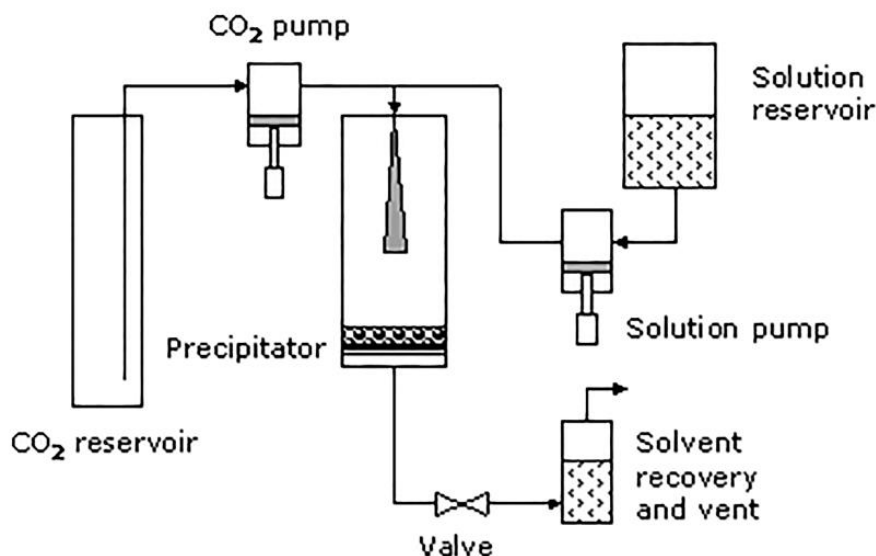


Figura 7: Diagrama de flujo de un proceso antisolvente supercrítico (SAS) (Rodríguez-Rojo et al., 2022)

La presión y la temperatura son los factores principales de los que depende la formación de partículas, ya que, influyen en las propiedades termodinámicas y el estado físico del antisolvente-solvente-soluto. El punto crítico de la mezcla antisolvente-solvente-soluto, puede alterar en mecanismo de producción de partículas, debido a las resistencias de transferencia de masa. También interfieren el tipo de disolvente orgánico, la concentración de las disoluciones, los flujos de SC-CO₂ y de la disolución, y el diámetro de la boquilla con la que se pulveriza la solución orgánica (Machado et al., 2022).

Para superar una de las limitaciones de esta técnica, que es el uso de disolventes orgánicos, se propone evitarlo o limitarse al uso de etanol, que se trata de un disolvente no tóxico apto para aplicaciones en productos alimenticios y farmacéuticos (Machado et al., 2022).

2.2.6. Encapsulación

El proceso SAS también puede ser empleado para la coprecipitación o precipitación conjunta de un compuesto activo con un material soporte (Fraile et al., 2014). Cuando el proceso de precipitación ocurre con un solo soluto se forman micro y nanopartículas con gran superficie específica aumentando así su biodisponibilidad. Sin embargo, la precipitación de sistemas compuestos (o coprecipitación) da lugar a microcápsulas que poseen la capacidad de ser empleadas en la administración controlada de bioactivos (Machado et al., 2022).

Para la encapsulación de partículas mediante el proceso SAS se sigue el mismo proceso descrito anteriormente. En este caso, la disolución contiene tanto al fármaco o compuesto activo como al polímero o material portador, que deben disolverse en el disolvente. Por otro lado, el antisolvente sigue siendo el fluido supercrítico (que suele ser SC-CO₂) y también tiene que ser miscible con el disolvente.

La nanoprecipitación se produce por una rápida desolvatación del polímero cuando la disolución se añade al antidisolvente, dando lugar a la precipitación del polímero, con atrapamiento inmediato del fármaco (Asfour & Mohsen, 2018).

Entre los materiales de recubrimiento que se pueden utilizar para el proceso de encapsulación, se encuentran algunos carbohidratos (polisacáridos como quitosano, maltodextrina, celulosa modificada...), proteínas (soja, suero de leche...), lípidos y polímeros comercializados, entre otros (Machado et al., 2022; Remanan & Zhu, 2023).

Asimismo, los materiales portadores son capaces de proporcionar ciertas cualidades adicionales al producto, entre las que destacan: la liberación sensible a estímulos (pH, temperatura...), liberación intracelular, funcionalidad de trazador, etc. (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

El desarrollo de los compuestos encapsulados está influenciado por las características físicas y químicas de las micro/nanocápsulas, como su superficie, tamaño de carga, estructura cristalina y morfología de la partícula, y el rendimiento (protección, liberación...). En función de estos aspectos se pueden mejorar la eficacia y disponibilidad biológica (Machado et al., 2022).

Otro parámetro para tener en cuenta en las coprecipitaciones es la concentración del material portador y su proporción con el compuesto activo. Esta relación puede ser clave para determinar si el material portador se solidifica antes o después del compuesto activo, pasando así de morfologías de microcomposites a morfologías de microcápsula (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

La encapsulación se puede llevar a cabo mediante las técnicas convencionales (molienda, evaporación de disolventes, secado por pulverización, precipitación, liofilización, etc.) Sin embargo, estas técnicas presentan numerosas limitaciones y desventajas frente a los procesos de encapsulación con fluidos supercríticos. Estas desventajas consisten en una baja estabilidad del material procesado, lo que dificulta el control en la morfología de las partículas, una posible degradación de los compuestos bioactivos por altas temperaturas, un alto consumo energético y de tiempo, una limitación en los materiales de recubrimiento que pueden soportar el proceso y la aparición de residuos tóxicos de disolventes orgánicos (Machado et al., 2022).

2.2.7. Formulación

La formulación de compuestos bioactivos puede potenciar y mejorar sus propiedades. Una formulación que emplee materiales portadores adecuados para estas sustancias busca generalmente, cumplir los siguientes objetivos: protección del compuesto activo, mejora de la dosificación y la biodisponibilidad, y funcionalización del producto (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

En cuanto a las formulaciones secas, se han desarrollado las microcápsulas que consisten en una capa o recubrimiento de un material portador, rodeando a un compuesto activo. Por otro lado, se encuentran los microcomposites en los que el

compuesto activo se encuentra disperso en el núcleo. Ambos se pueden observar en la Figura 8.

La técnica SAS descrita anteriormente, se utiliza para formular distintos compuestos activos con una amplia variedad de materiales portadores. A pesar de, poder controlar la morfología del producto variando los parámetros del proceso expuestos previamente, es posible que se obtengan microcomposites en vez de microcápsulas (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

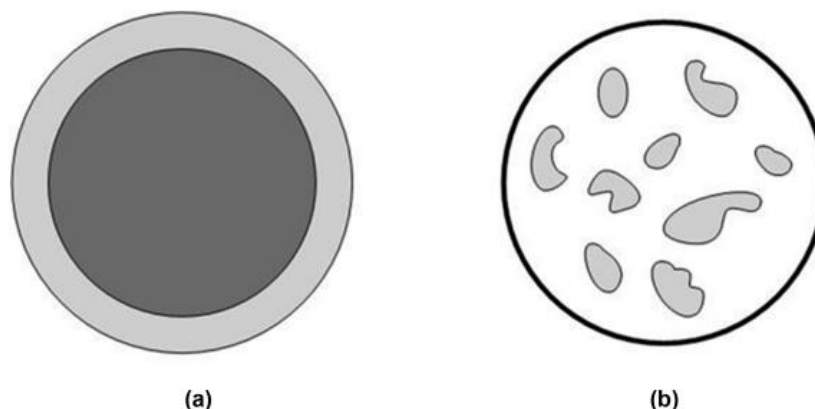


Figura 8: Varios tipos de formulaciones: (a) microcápsulas, (b) microcomposites (Rodríguez-Rojo et al., 2022)

Se han desarrollado múltiples formulaciones de productos farmacéuticos, cosméticos y naturales, consistentes en composites o encapsulados utilizando soportes micro o nanoparticulados (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Los composites se forman por una precipitación simultánea del compuesto activo (material del núcleo) y el de recubrimiento. En los composites se encuentran las partículas del material dispersas en el núcleo en una matriz de material de recubrimiento. Por otra parte, en los compuestos encapsulados, el material de recubrimiento precipita como una capa fina sobre la partícula del compuesto activo formada.

Con estas formulaciones se puede lograr una administración controlada de los principios activos en su medio de destino, además, si se trata de una sustancia sensible el recubrimiento puede actuar como una capa protectora frente a agentes agresivos. También cabe destacar que los composites y encapsulados resultan más fáciles de manipular y dosificar que las partículas del compuesto puro (Cocero et al., 2009).

2.2.8. Trabajo previo

La técnica SAS se ha usado para la precipitación de antioxidantes a partir de diferentes matrices naturales. Se han empleado distintos soportes y tecnologías para aumentar la solubilidad en agua y la estabilidad de la quercetina con el fin de mejorar su biodisponibilidad y su actividad antioxidante (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

En estudios anteriores se ha desarrollado una formulación sólida de quercetina mediante la encapsulación con un polímero tensioactivo con la capacidad de formar micelas en medios acuosos, lo que mejora la disolución de la quercetina en agua y su asimilación en el organismo. En concreto, se encapsuló quercetina en poloxámeros Pluronic F127 mediante la técnica del antisolvente supercrítico (Fraile et al., 2014).

En los experimentos previos realizados se coprecipitaron partículas de quercetina y de quercetina con Pluronic F127, utilizando como disolvente acetona y con un proceso semicontinuo de SAS. Los resultados de los estudios morfológicos y caracterización de las partículas indicaron que con esta técnica se consiguió una reducción significativa del tamaño de las partículas y una dispersión homogénea de la quercetina en una matriz polimérica amorfa. Se estudió la disolución de estas partículas en fluidos gástricos e intestinales y las nuevas formulaciones de quercetina revelaron una mayor solubilidad y disolución más rápida que la quercetina sin procesar o las mezclas físicas de quercetina con Pluronic. Esta mejora del comportamiento de la disolución de la quercetina se debe a los cambios estructurales y morfológicos obtenidos gracias al procesado con SAS (Fraile et al., 2014).

En otra investigación, se desarrolló una formulación sólida también de quercetina con Pluronic F127, a partir de soluciones de acetona con la técnica SAS. De nuevo, los ensayos de liberación del fármaco en fluidos gástricos e intestinales mostraron una solubilidad mejorada. Además, con estas formulaciones se observó un perfil de liberación controlada ya que la concentración final tardó más en alcanzarse (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

También, esta formulación micelar de quercetina con Pluronic F127 tiene un papel muy prometedor en aplicaciones y tratamientos médicos. Por ello, se administró la quercetina formulada en ratas para prevenir la nefrotoxicidad farmacológica que está causada por un agente antitumoral. Como resultado aumentó la concentración plasmática y la biodisponibilidad de la quercetina en comparación con el compuesto no formulado. Además, se mantuvieron las propiedades nefroprotectoras y, en algunos casos, mejoraron ligeramente (Rodríguez-Rojo et al., 2022).



3. Instalación de la planta y equipos

3.1. Descripción del proceso

En la primera parte de este trabajo, se estudió la precipitación de rutina y la encapsulación de esta en Eudragit® mediante la técnica SAS (supercritical antisolvent) con CO₂ supercrítico, para desarrollar una formulación que mejore tanto la biodisponibilidad de la rutina como su solubilidad en disolventes y sustancias polares como el agua.

En la Figura 9 se muestra un esquema del proceso SAS que se ha utilizado para la parte experimental de este trabajo. Como se puede observar, el precipitador tiene dos entradas: la del CO₂ y la de la disolución con el disolvente. El CO₂ se extrae de una botella o bombona de gas y pasa por un proceso de enfriamiento, utilizando etilenglicol como refrigerante para mantenerlo en estado líquido. Seguidamente, se comprime, gracias a una bomba de membrana y se precalienta para llegar a la temperatura de operación establecida. Por otra parte, se tiene la disolución líquida (en este caso de rutina con etanol como disolvente) que se bombea con una bomba cromatográfica al interior del precipitador. El precipitador contiene un filtro de partículas en su parte inferior, para retener el sólido precipitado, seguido de un segundo filtro para terminar de eliminar los restos sólidos del disolvente. A continuación, se despresuriza el efluente del precipitador para recoger en un separador flash el disolvente orgánico condensado y separarlo del CO₂ gaseoso.

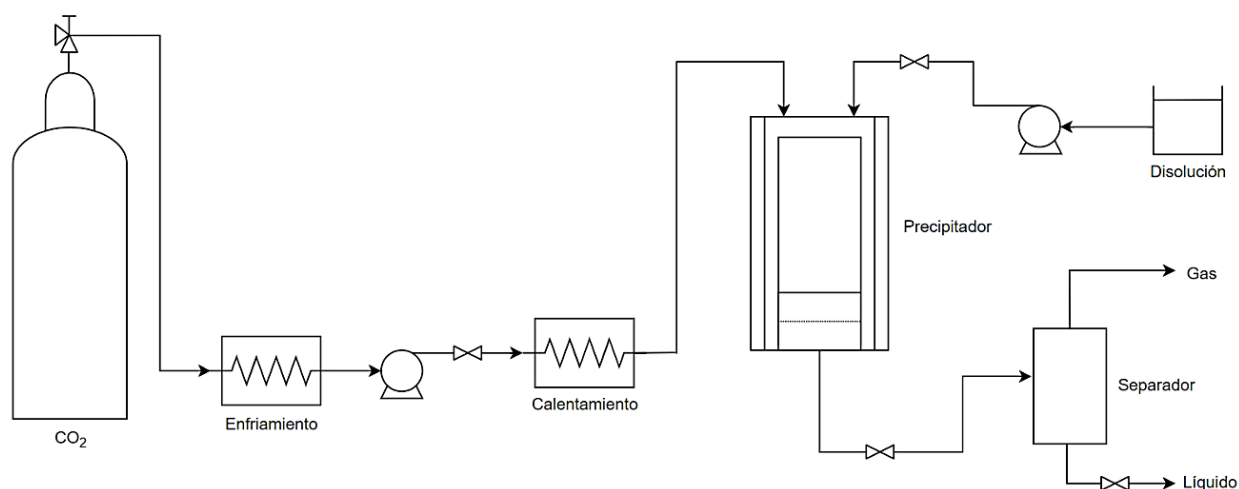


Figura 9: Esquema del proceso SAS

3.2. Planta

En la Figura 10 se puede observar la planta en la que se ha trabajado para llevar a cabo el proceso SAS.

1. Precipitador
2. Válvula descompresión
3. Disolución
4. Bomba disolución
5. Bomba de CO₂
6. Baño térmico
7. Separador
8. Extracción

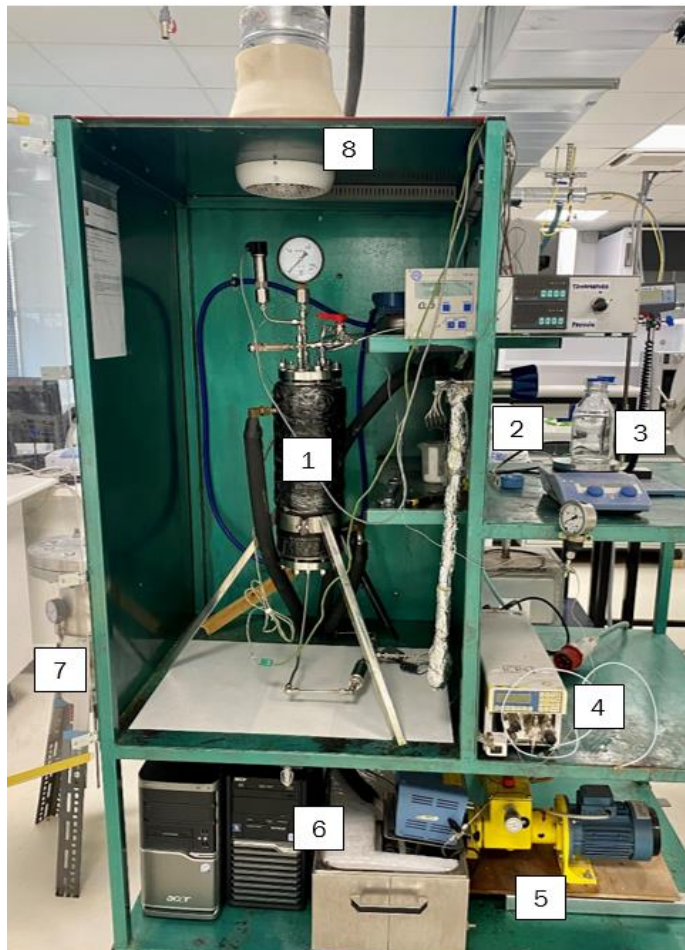


Figura 10: Planta de operación SAS

3.3. Equipos de la planta

A continuación, se presenta la relación de equipos utilizados durante el proceso.

- **Precipitador o cámara de precipitación:** recipiente encamisado con una capacidad de 2,5L. Tiene una presión máxima de operación de 150 bar y dos medidas de presión (digital y analógica). En su interior, en la parte inferior, se encuentra un filtro de partículas.



Figura 11: Precipitador

- **Primer filtro:** se encuentra en el fondo de la cámara de precipitación, consiste en un disco poroso metálico utilizado para soportar un filtro polimérico con un tamaño de poro de $0,1 \mu\text{m}$. En este filtro se recoge el producto sólido de la muestra.

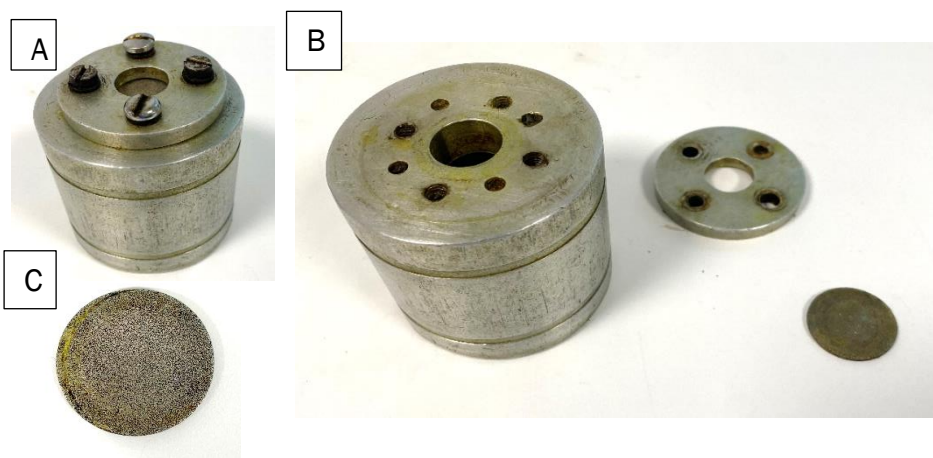


Figura 12: Filtro situado en la parte inferior del precipitador: (A) Filtro montado (B) Componentes del filtro (C) filtro metálico de partículas.

- **Segundo filtro:** se trata de un filtro de Classic filters, modelo SL 127.401, cuyo elemento filtrante es de acero inoxidable, compuesto por cinco capas de malla 316 sinterizadas entre sí para formar un elemento poroso integrado. La malla central al ser de un calibre muy fino determina la velocidad de filtración, junto con las cinco capas más gruesas, interiores y exteriores, que le dan soporte y protección, soportando así presiones máximas de 350 bar (*Stainless Steel Filter Elements | Classic Filters, 2023*). La función de un segundo filtro es retener el resto de las partículas que pasan a través del primer filtro, para acabar de separarlas del disolvente.

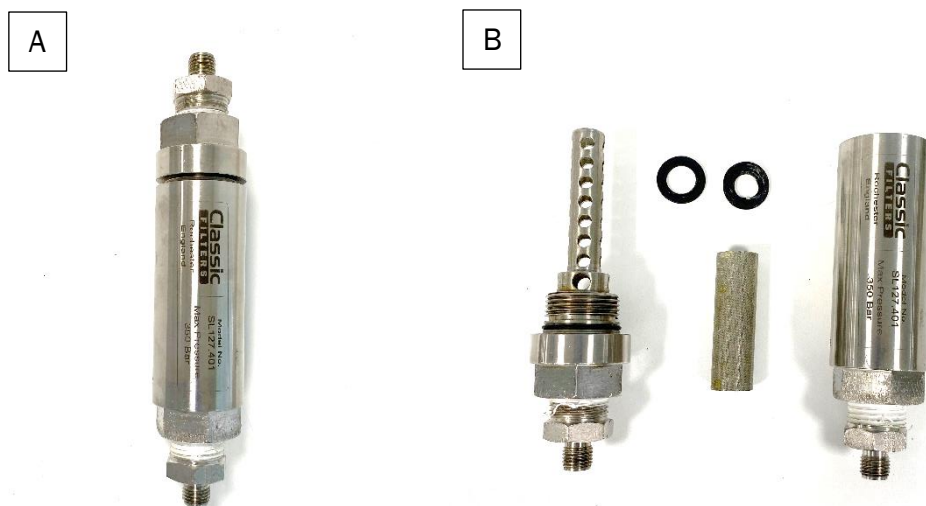


Figura 13: Segundo filtro: (A) Filtro montado (B) Parte de filtro y filtro de acero inoxidable

- **Válvula descompresión:** válvula GO regulations, modelo BP66, Spartanburg, SC 293303. Esta válvula se utiliza para despresurizar el efluente del precipitador.



Figura 14: Válvula de descompresión de la planta SAS

- **Bomba disolución:** se trata de una bomba cromatográfica modelo PU-2080, Jasco, Italia, que se usa para bombear la disolución con el compuesto activo y el encapsulante al interior del precipitador.



Figura 15: Bomba cromatográfica

- **Bomba de CO₂:** bomba de membrana, modelo Milroyal® 140.S, DOSAPRO MILTON ROY, tarada a 140 bar con alivio hidráulico y sistema antirretorno, cuya función es bombear el dióxido de carbono.



Figura 16: Bomba de membrana

- **Baño térmico:** P SELECTA DIGITERM 100, que sirve para precalentar el dióxido de carbono a la temperatura de operación deseada y para termostatar el precipitador.
- **Separador:** separador flash para recoger el disolvente orgánico condensado y ventilar el CO₂ gaseoso al final del proceso.

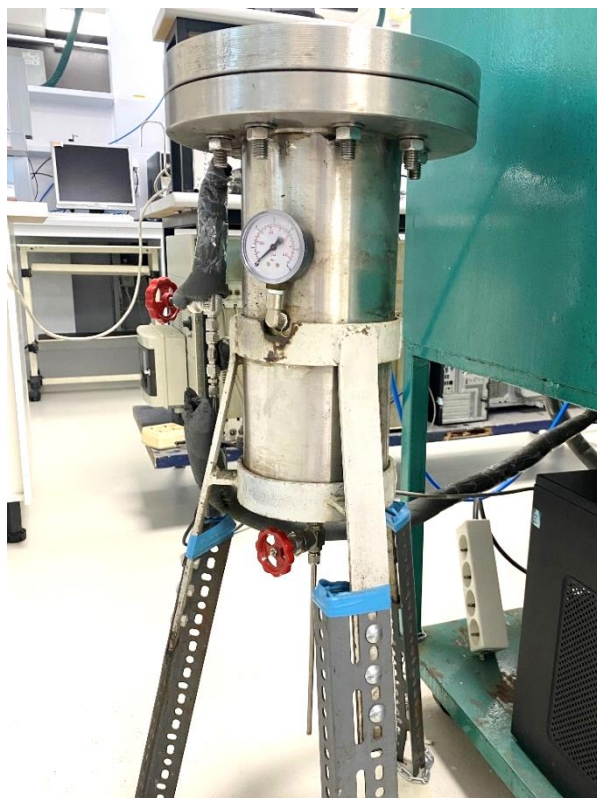


Figura 17: Separador flash utilizado al final del proceso

4. Método experimental

El método experimental se puede diferenciar en dos partes. La primera, consistiendo en los experimentos con el proceso SAS para la precipitación y encapsulación de rutina y la segunda, utilizando el producto obtenido para realizar pruebas de disolución in vitro.

4.1. Materiales utilizados

En las experiencias con SAS:

- Hidrato de rutina, ≥ 94 % (HPLC), en polvo, proporcionado por Sigma-Aldrich. CAS: 207671-50-9), ($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot x H_2O$). Masa molecular en base anhidra 610,52g/mol.
- Eudragit® L100, copolímero de ácido metacrílico y metilmetacrilato en proporción 1:1, en polvo, comercializado por Evonik Industries AG.
- Eudragit® L100-55, copolímero de ácido metacrílico y acrilato de etilo en proporción 1:1, en polvo, comercializado por Evonik Industries AG.
- Eudragit® E100, copolímero básico de metacrilato de butilo, en gránulos. Comercializado por Evonik Industries AG.
- Alcohol etílico deshidratado absoluto, UN 1170, CH_3CH_2OH , 99,9 % vol. CAS: 64-17-5. Suministrado por Dávila Villalobos.

Para las pruebas de disolución in vitro:

- Fosfato de potasio monobásico, KH_2PO_4 , para HPLC, 99,5-101,0 %, CAS: 7778-77-0, proporcionado por Sigma Aldrich (España).
- Hidróxido de sodio sólido en pellets, para análisis, ACS, ISO. CAS-No.:1310-73-2. Panreac Química SLU.
- Agua ultrapura, tipo I (agua MiliQ).

4.2. Experimentos para la formación de partículas

Para la producción de micropartículas de rutina pura y de rutina con Eudragit® L-100 y Eudragit® E-100, se utilizó la técnica de precipitación con antisolvente supercrítico (SAS), utilizando CO_2 supercrítico y etanol como disolvente orgánico.

Experimentalmente se trabajó con el proceso SAS en régimen semicontinuo, estableciendo unas condiciones de operación, para el CO_2 de presión y temperatura de 100 bar y 40°C. (el CO_2 se calienta y comprime más allá de su punto crítico para operar en la región monofásica del sistema disolvente/ CO_2) (Hsieh & Vrabec, 2015).

Tomando como referencia el trabajo realizado por Giraldes Fernández I. (2022) se establecieron las condiciones y flujos del proceso, además se pudo conocer la proporción óptima de polímero y rutina. El flujo de CO_2 se fijó en 2 kg/h. Por otra parte, el caudal de la disolución era de 5 mL/min, siendo su concentración de 1 g de rutina en 300 mL de etanol para los experimentos con rutina pura. Para los experimentos con Eudragit® se preparó una disolución con una proporción en masa

de 1:1 (1 g de rutina por 1 g de Eudragit®) en 300 mL de etanol (Giraldes Fernández, 2022).

4.2.1. Procedimiento

En primer lugar, se debe encender el baño térmico para llegar a los 40°C deseados y abrir el flujo de etilenglicol, que se usa como refrigerante durante el proceso. Una vez que se tiene la disolución preparada y los instrumentos encendidos, se abre la extracción y con la válvula de descompresión cerrada, se procede a abrir la botella de CO₂. Esta se encuentra fuera del edificio por motivos de seguridad. Cuando el flujo llega a cero (lo que indica que el sistema se ha equilibrado con la presión de la botella) se puede encender la bomba de CO₂ para introducir el CO₂ supercrítico en el precipitador y se fija su flujo (2 kg/h). A continuación, se espera a que la presión llegue a 100 bar para abrir, poco a poco, la válvula de descompresión y conseguir una presión constante.

Una vez estabilizadas las condiciones de operación deseadas, se enciende la bomba de disolución fijando el caudal en 5 mL/min. Ambas soluciones se inyectan continuamente en el precipitador a través de una boquilla de tubo concéntrico, consistente en un tubo interior de 1/16 pulgadas, utilizado para inyectar la solución y un tubo exterior de 1/4 pulgadas utilizado para introducir el CO₂ (Fraile et al., 2014).

Por último, cuando ya se ha consumido toda la disolución de alimentación, se mantiene constante el flujo de fluido supercrítico durante al menos treinta minutos (hasta que no salga más efluente líquido en el separador flash), para asegurar la eliminación del disolvente orgánico residual de las partículas y poder recoger el producto seco.

Pasado el tiempo de secado con el fluido supercrítico, se procede descomprimir el sistema con la válvula de descompresión, para posteriormente, recoger las partículas sólidas secas retenidas tanto en las paredes del precipitador como las retenidas en ambos filtros.

4.2.2. Experiencias realizadas

A continuación, se resumen las diferentes experiencias realizadas para poder obtener suficiente producto de cara a la siguiente parte del método experimental.

- Dos experiencias utilizando 1 g de rutina pura en 300 mL de disolvente con las condiciones de presión y temperatura de 100 bar y 40°C.
- Tres experiencias con 1 g de rutina y 1 g de Eudragit® L-100 en 300 mL de disolvente en las condiciones anteriormente mencionadas.
- Una experiencia con 1 g de rutina y 1 g de Eudragit® L-100-55 en 300 mL de disolvente y con las mismas condiciones de operación.
- Una experiencia con 2 g de rutina y 2 g de Eudragit® E-100 en 600 mL de disolvente y con las mismas condiciones de operación.

4.3. Experimentos de disolución in vitro

En esta segunda parte, se realizaron ensayos de liberación in vitro simulando fluidos intestinales y utilizando los productos de rutina obtenidos en la precipitación y encapsulación con SAS previamente realizadas.

4.3.1. Procedimiento

Para empezar, se debe preparar la disolución que simula el fluido intestinal. Para ello, se pesan 6,8 g de fosfato potásico y se disuelven en 1L de agua destilada ultrapura (miliQ). A continuación, se ajusta el pH hasta el valor deseado, en este caso 6,8, añadiendo NaOH de una disolución previamente preparada.

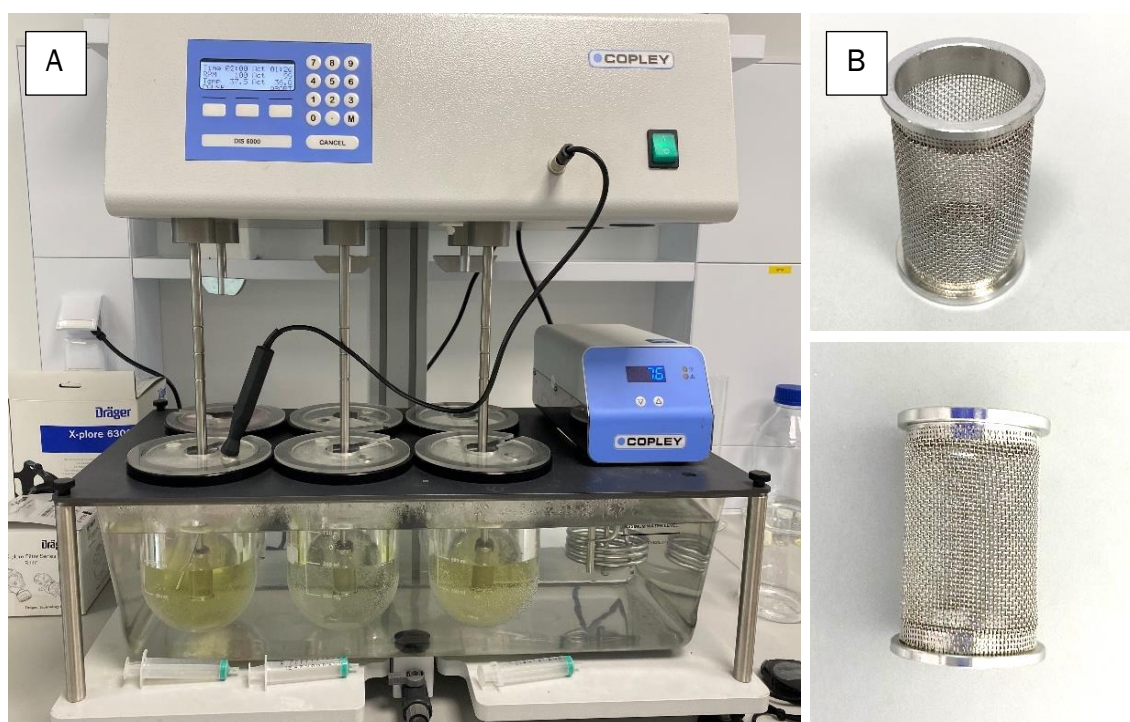


Figura 18: (A) Equipo utilizado para las pruebas de liberación in vitro (B) Detalle de la cesta que contiene la rutina durante la prueba

El producto de rutina se introduce en una cesta que va sumergida en la disolución de líquido intestinal que se mantiene a temperatura y agitación constantes. Los experimentos se realizaron con un volumen de fluido intestinal de 475 mL, a una temperatura de 37°C y a una velocidad de 100 rpm.

Durante el experimento, se extraen muestras de 3 mL en varios puntos temporales y se añade un volumen equivalente de fluido intestinal fresco. Los períodos definidos de extracción de muestra son de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 min.

Para eliminar las partículas no disueltas de las muestras, se filtran usando filtros de jeringa de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,22 μm . De este modo, quedan preparadas para su posterior análisis en el espectrofotómetro.

4.3.2. Experiencias realizadas

Para las pruebas de disolución in vitro se realizaron varios experimentos con diferentes productos para poder comparar los resultados. Es importante añadir una cantidad en exceso de producto, para asegurarse de que queda producto sin disolver. Por lo tanto, siguiendo el procedimiento descrito previamente, se realizaron las siguientes experiencias:

- Tres experiencias con 0,5 g de rutina pura en 475 ml de disolución (fluido intestinal)
- Tres experiencias con 0,5 g de rutina pura y 0,5 g de Eudragit® L-100 en 475 ml de disolución.
- Tres experiencias con 0,5 g de rutina pura y 0,5 g de Eudragit® E-100 en 475 ml de disolución.
- Dos experiencias con 0,5 g de rutina pura precipitada mediante la técnica SAS en 475 ml de disolución.
- Tres experiencias con 0,2 g de rutina más Eudragit® L-100, producto obtenido de la precipitación con la técnica SAS en 475 ml de disolución.
- Tres experiencias con 0,2 g de rutina más Eudragit® E-100 obtenido de la precipitación con SAS, en 475 ml de disolución.

Todos los experimentos se realizaron más de una vez con el fin de estudiar y comprobar su reproducibilidad.

4.4. Análisis de muestras

Para realizar un estudio a nivel bioquímico de cualquier molécula se precisa del uso de distintas técnicas analíticas para su determinación cualitativa y cuantitativa, al igual que su caracterización fisicoquímica y biológica. En general, uno de los métodos más simples, accesibles, útiles y ampliamente utilizados es la espectroscopía ultravioleta-visible (Abril Díaz et al., 2000).

La espectrofotometría UV-Vis se trata de una técnica analítica, ampliamente empleada, que permite determinar la concentración de un compuesto presente en una solución (Abril Díaz et al., 2000). La mayor parte de los compuestos orgánicos biológicos son capaces de absorber la radiación electromagnética en la región UV-Vis (Akash & Rehman, 2020).

El fundamento de esta técnica consiste en la capacidad que tienen ciertas moléculas de absorber las radiaciones electromagnéticas, entre ellas las radiaciones que corresponden al espectro UV-visible. Se puede relacionar linealmente la cantidad de luz absorbida con la concentración del analito (Abril Díaz et al., 2000; Carlos Brunatti & Ana María Martín, 2010).

Las longitudes de onda de las radiaciones que absorbe una molécula y su eficiencia dependen de la estructura atómica de la molécula y de las condiciones del medio (Abril Díaz et al., 2000).

Cuando un haz de luz incide sobre una molécula, esta lo absorbe originando un salto desde un estado energético de menor energía a uno de mayor energía o estado excitado. La absorción que presenta una molécula para distintas longitudes de onda constituye su espectro de absorción que es único de cada molécula, ya que, cada molécula posee una serie de estados excitados o bandas (Abril Díaz et al., 2000; Carlos Brunatti & Ana María Martín, 2010).

Para la espectrofotometría de absorbancia se trabaja en las regiones del ultravioleta de 195 a 400 nm y el visible de 400 a 780 nm.

La absorbancia (A) expresa la cantidad de luz absorbida por la muestra, matemáticamente se define como el logaritmo de $1/T$, siendo la transmitancia (T) la relación entre la cantidad de luz transmitida (la que llega cuando ha atravesado la muestra) y la cantidad de luz incidente. De este modo:

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T = -\log \frac{I_T}{I_0}$$

La ley de Lambert-Beer relaciona de forma directamente proporcional la absorbancia de la luz con una longitud de onda fija y la concentración del analito en la solución, siendo:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Ley de Lambert – Beer}$$

Donde ε es el coeficiente de extinción que es constante para cada sustancia a una determinada longitud de onda, c es la concentración de la muestra y l la longitud de paso de la cubeta (Abril Díaz et al., 2000).

Para medir la absorbancia de una muestra se emplea un espectrofotómetro, este aparato permite seleccionar una longitud de onda determinada del haz de luz que pasa por la solución de la muestra y de la cantidad de luz absorbida por la misma (Abril Díaz et al., 2000).

Existen espectrofotómetros de haz simple o de doble haz. En el espectrofotómetro de doble haz se compara la intensidad luminosa entre dos trayectorias de luz, uno pasa a través de la referencia y el otro por la muestra (Akash & Rehman, 2020).

Este tipo de espectrofotómetro ofrece una mejor detección que el de haz simple. Además, la medición de la luz no se ve afectada por perturbaciones como los factores de inestabilidad, la deriva de la lámpara, las fluctuaciones de tensión y la luz parásita (Akash & Rehman, 2020).

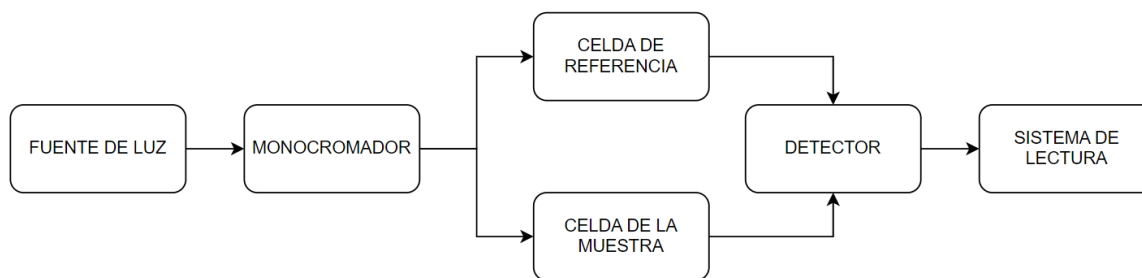


Figura 19: Representación esquemática de un espectrofotómetro de doble haz (Akash & Rehma, 2020)

Para su funcionamiento, previamente se debe seleccionar la longitud de onda a la que se va a hacer la medida. En este caso se trabajará con un espectrofotómetro de doble haz que dispone de dos celdillas para dos cubetas, uno para la muestra y otra para el blanco. Primero se colocan en las celdillas las dos cubetas con el blanco para medir su absorbancia, de este modo, al blanco se le asigna el valor de absorbancia cero, haciendo que la intensidad incidente y la transmitida sean iguales (Abril Díaz et al., 2000).

Una vez medido el blanco, se deja en una de las celdillas y en la otra se coloca la cubeta con la muestra para proceder a medir su absorbancia. Siguiendo la Ley de Lambert-Beer, se podrá determinar la concentración de analito en las muestras.

La concentración de rutina existente en las muestras resultantes de las pruebas de disolución se determinó mediante análisis espectrofotométrico a 418 nm utilizando en el laboratorio, un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz siendo el modelo UV-2550 de SHIMADZU.

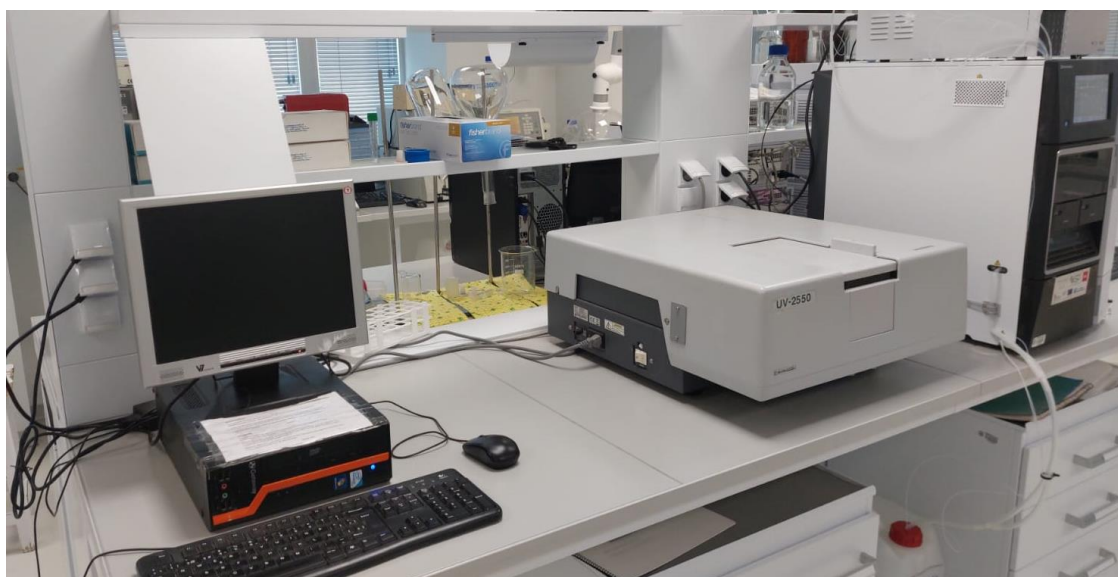


Figura 20: Espectrofotómetro usado en el laboratorio para el análisis de muestras

4.5. Caracterización de las muestras

Para poder caracterizar las partículas formadas (de rutina y los distintos polímeros) con la técnica SAS, se analizó su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido ESEM modelo QUANTA 200 FEG gracias al servicio de Microscopía Electrónica que se encontraba en el laboratorio de técnicas instrumentales de la Universidad de Valladolid (Edificio I+D Uvainnova).

La microscopía electrónica se trata de una técnica ampliamente utilizada para obtener imágenes de la superficie de una muestra, puesto que se basa en la interacción entre los electrones y la muestra, lo que consigue generar imágenes topológicas de la misma. Esta técnica presenta un mayor aumento que el microscopio óptico. El SEM utiliza un haz focalizado de electrones que reaccionan con la muestra produciendo una imagen topológica y una composición relativa. Cuando el haz de electrones entra en contacto con la muestra, produce electrones secundarios (SE), electrones retrodispersados y rayos X característicos, que son captados gracias a los distintos detectores y posteriormente visualizados en el monitor (Abd Mutalib et al., 2017).

El SEM se utiliza para realizar análisis microelementales, que permite conocer los químicos presentes en la muestra, además de ver su distribución sobre esta. Entre los materiales que pueden ser analizados mediante esta técnica, se encuentran cerámicos, metálicos, semiconductores, polímeros, biológicos, histológicos, etc. (*Microscopio Electrónico de Barrido ESEM (QUANTA 200 FEG)*, 2023).

Además, las mismas muestras llevadas al SEM se analizaron por difracción de rayos X (XRD). El análisis por rayos X es capaz de determinar la estructura (orden de largo alcance) de los materiales cristalinos y el orden de corto alcance de los no cristalinos. De acuerdo con lo anterior, también se pueden deducir las constantes de red y las fases, el tamaño medio de grano, el grado de cristalinidad y los defectos cristalinos (Khan et al., 2020).

El fenómeno de difracción se produce cuando la luz es dispersada por una matriz periódica con orden de largo alcance, lo que da lugar a interferencias constructivas en ángulos específicos. En un cristal los átomos están dispuestos periódicamente, por lo que se produce difracción, además la longitud de onda de los rayos X es comparable a la distancia entre átomos. Las técnicas de XRD son capaces de determinar la naturaleza cristalina (disposición atómica) de los materiales, basándose en que la dispersión de los rayos X de los átomos genera un patrón de difracción (Chauhan & Chauhan, 2014). En cuanto al patrón, las intensidades de los picos y líneas de difracción y su posición (ángulo de Bragg θ o espaciado interplanar) se corresponden con una estructura específica (Khan et al., 2020).

Sin embargo, los materiales amorfos como puede ser el vidrio no son capaces de producir ningún pico significativo en el patrón de difracción ya que, no poseen una disposición periódica (Chauhan & Chauhan, 2014).

En esta técnica la radiación procedente de un tubo de rayos X con longitud de onda λ , incide sobre la muestra que tiene un espaciado interplanar d . Siguiendo la ley de Bragg, este haz es reflejado con un ángulo θ . El detector se mueve, lo que produce una variación del ángulo que forma con la muestra, registrando así el haz reflejado. El resultado de intensidad en función del ángulo proporciona información sobre la estructura cristalina de la muestra (*Difractometría de Rayos X (Polvo)*, 2023).

$$\text{sen } \theta = \frac{n\lambda}{2d} \quad \text{Ley de Bragg}$$

Por consiguiente, esta ley es capaz de establecer la relación entre la longitud de onda de los rayos X incidentes, el ángulo de incidencia del haz y la separación entre los planos de la red cristalina de los átomos. Se produce una interferencia constructiva cuando la diferencia de caminos ópticos entre los rayos X incidentes es igual a un múltiplo entero de la longitud de onda (Chauhan & Chauhan, 2014).

Para este análisis se utilizó un Equipo de Difracción de Rayos X (DRX) Bruker Discover D8, ubicado también en el laboratorio de técnicas instrumentales de la Universidad de Valladolid (Edificio I+D Uvainnova).

5. Resultados y discusión

5.1. Micronización de la rutina pura

Como se ha indicado en el método experimental, se realizaron experimentos para la precipitación y micronización de rutina pura (inicialmente disuelta en etanol). Para ello, se utilizó la técnica SAS descrita anteriormente con unas condiciones de operación constantes de presión y temperatura de 40°C y 100 bar respectivamente. Todos los experimentos se realizaron con 1 g de rutina y 300 ml de etanol. El producto obtenido se estudió para poder caracterizar su morfología y estructura cristalina.

No se ha podido llevar a cabo la caracterización de la morfología de las partículas a tiempo en este trabajo, ya que el técnico responsable de la microscopía SEM estaba ausente. Por ello, se tomará como referencia el trabajo de Giraldes Fernández I. (2022) asumiendo que las muestras obtenidas en este trabajo saldrían muy similares. La Figura 21 muestra las imágenes SEM de la rutina pura sin procesar y la rutina sometida al proceso SAS. En la Figura 21 (a) se puede observar que la rutina pura presenta agregados de partículas irregulares, mientras que en la Figura (b) la rutina procesada presenta partículas muy porosas y una distribución de tamaños reducida. Lo que demuestra que las características de las partículas de rutina procesada se ven favorecidas por el proceso SAS (Giraldes Fernández, 2022).

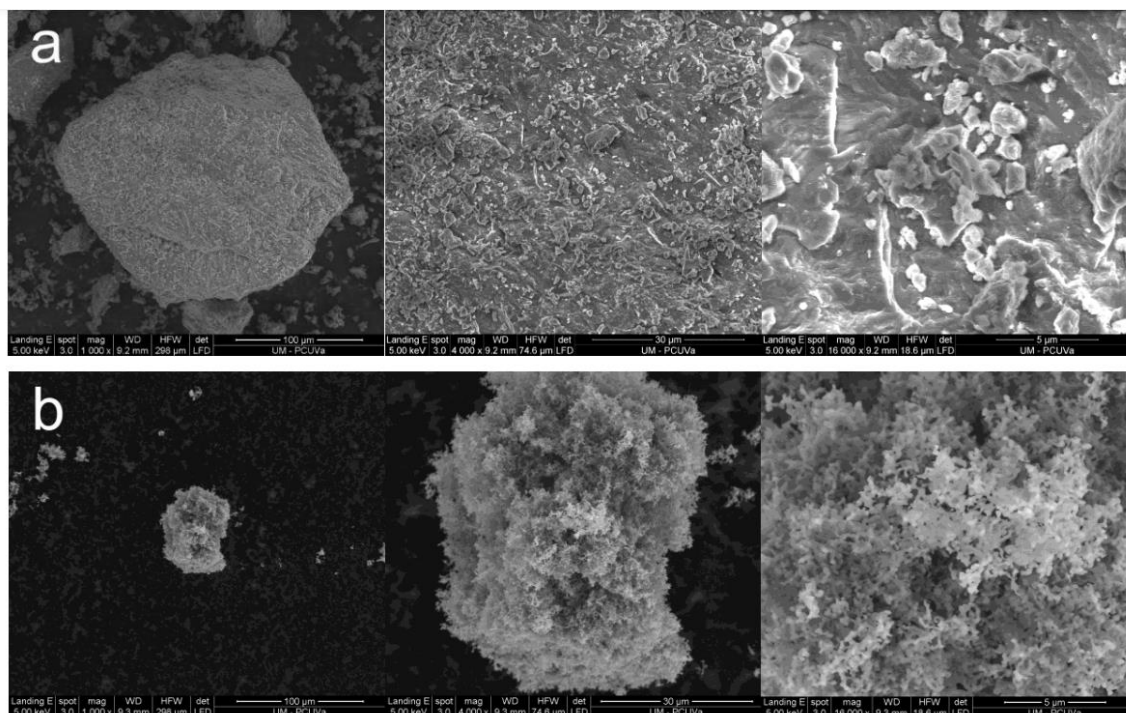


Figura 21: Imágenes del SEM de: (a) rutina pura sin procesar y (b) rutina procesada mediante el método SAS. La relación de aumento de las imágenes de izquierda a derecha es de 1000x, 4000x, 16000x y su escala de 100 μm , 30 μm y 5 μm , respectivamente (Giraldes Fernández 2022).

5.2. Caracterización estructural del producto de rutina procesada por SAS

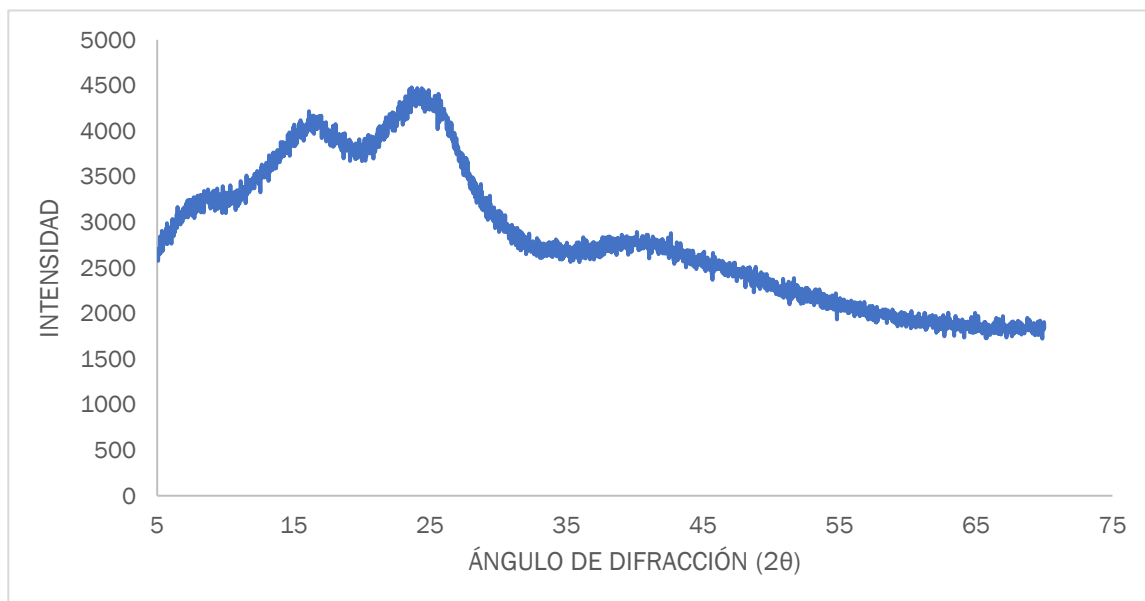


Figura 22: Diffractograma de rayos X de la rutina procesada por SAS

La Figura 22 presenta el difractograma de rayos X de la rutina procesada por la técnica SAS. Los difractogramas de la rutina pura sin procesar, encontrados en la bibliografía, coinciden en que se pueden observar numerosos picos intensos. Esos picos intensos indican que el compuesto tiene un alta cristalinidad o estructura cristalina, ya que cuando se trata de una muestra cristalina los picos corresponden a cada uno de los planos de la estructura cristalina (Giraldes Fernández, 2022; Ozkan et al., 2019).

A diferencia del difractograma obtenido en este trabajo de la rutina procesada con SAS, en el que se muestran picos reducidos o ausentes, lo que significa que se trata de una muestra amorfa. Como se ha expuesto anteriormente, los compuestos amorfos presentan una mayor solubilidad que los cristalinos (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

5.3. Coprecipitación de rutina y Eudragit® (L-100, L-100-55 Y E-100)

En los experimentos de coprecipitación de rutina se utilizaron distintos materiales de soporte, todos ellos polímeros de Eudragit®. La forma de operar resulta análoga a los experimentos de micronización con rutina pura, trabajando por lo tanto con las mismas condiciones constantes de presión y temperatura (40°C y 100 bar). En este caso, en el disolvente se encontraban disueltos tanto la rutina pura como el polímero de Eudragit®.

Los polímeros usados en este trabajo fueron Eudragit® L-100, Eudragit® L100-55 y Eudragit® E-100. La disolución se preparó con una proporción 1:1 de gramos de rutina/gramos de Eudragit® en todos los experimentos. La relación en masa del compuesto activo/polímero es uno de los parámetros de la técnica SAS más influyentes en la morfología de las partículas formadas. En trabajos anteriores se comprobó que con una cantidad mayor de polímero (proporción 1:2) no se obtendrían partículas finas, sino un producto plastificado (Giraldes Fernández, 2022).

En los experimentos realizados en este proyecto los productos obtenidos eran muestras de partículas en polvo finamente divididas. De nuevo, para la determinación de su morfología se analizaron mediante microcopia electrónica de barrido (SEM).

Como se explicó anteriormente, por un problema ajeno, no se pudieron obtener las imágenes del SEM de las muestras, pero los resultados esperados son muy similares a los presentes en el trabajo de Giraldes Fernández I. (2022) que se muestran a continuación. En la Figura 23 se presentan imágenes del SEM de la coprecipitación de rutina con Eudragit® E-100 (Figura 23 (a)) y rutina con Eudragit® L-100 (Figura 23 (b)). Se puede observar en las dos situaciones como el crecimiento de las partículas ha sido restringido por el polímero que recubre al núcleo de rutina, el polímero rodea la partícula introduciéndose entre los intersticios de esta, para conseguir una encapsulación completa (Giraldes Fernández, 2022).

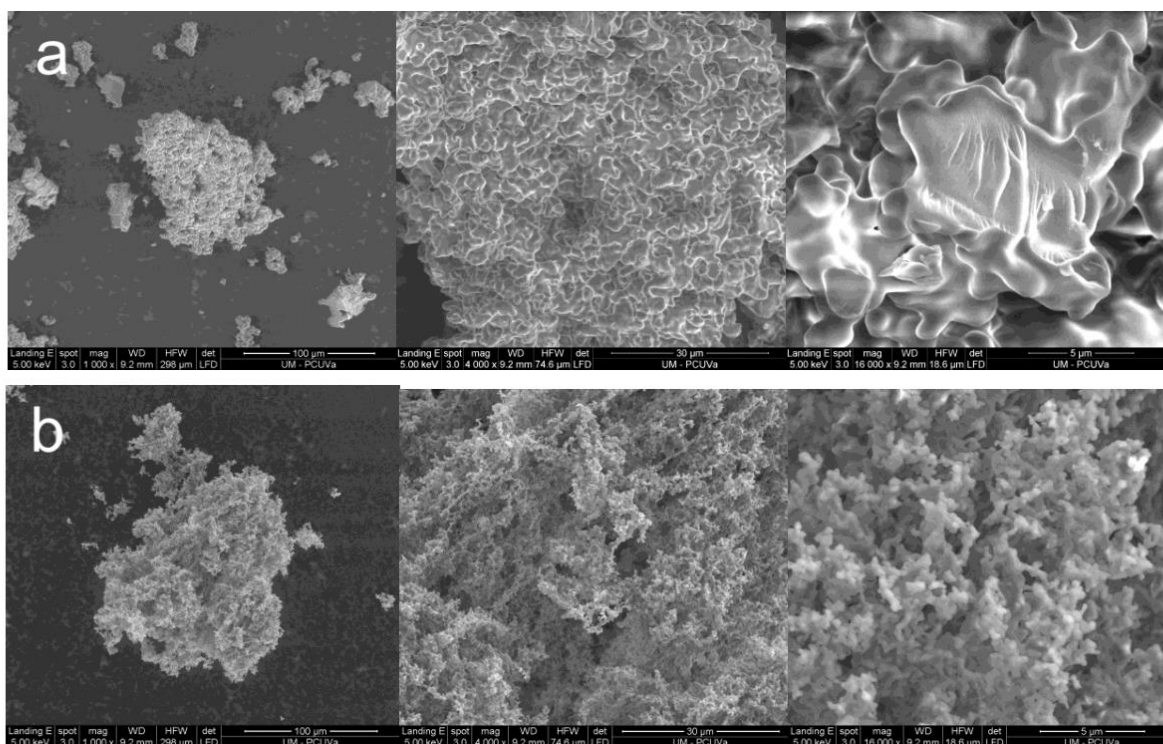


Figura 23: Imágenes del SEM de: (a) rutina y Eudragit® E-100 coprecipitados con SAS y (b) rutina y Eudragit® L-100 coprecipitados con SAS. La relación de aumento de las imágenes de izquierda a derecha es de 1000x, 4000x, 16000x y su escala de 100 μm, 30 μm y 5 μm

5.4. Caracterización estructural de Coprecipitados de rutina-Eudragit® procesados con SAS

Las muestras de rutina encapsuladas con Eudragit® mediante el proceso SAS fueron estudiadas también por difracción de rayos X. De este modo, en la Figura 24, se muestran los diagramas de difracción de rayos X de la encapsulación de rutina con Eudragit® L-100, Eudragit® L-100-55 y Eudragit® E-100, además del diagrama de rutina procesada con SAS expuesto anteriormente para poder compararlos.

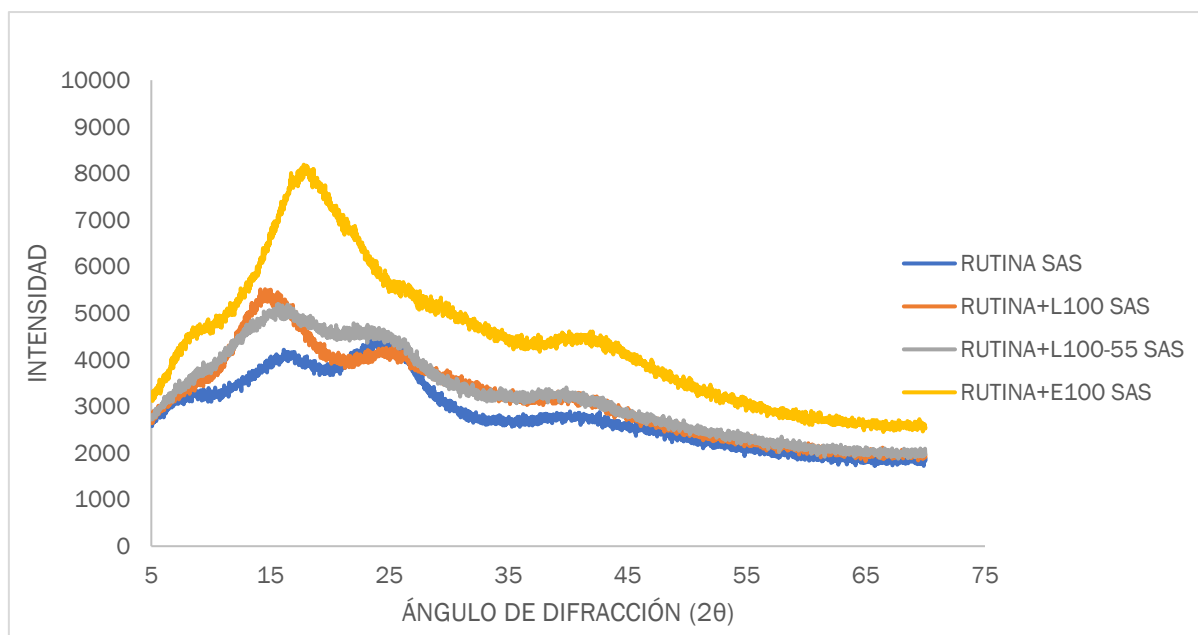


Figura 24: Difractograma de rayos X de las distintas muestras procesadas por SAS

Se sabe que la rutina pura es un compuesto con estructura cristalina por lo que se busca coprecipitarlo con un polímero amorfo, en este caso Eudragit®. Así, la rutina forma un complejo con Eudragit® que se ve reflejado en los difractogramas de la Figura 24 con una atenuación de los picos. Por lo tanto, las partículas de rutina coprecipitadas con Eudragit® son amorfas, ya que, no se observan picos estrechos, sino curvas bastante amplias.

La coprecipitación de rutina con Eudragit® produce partículas con estructura amorfa que es un requisito, a parte de la reducción del tamaño de las partículas, para mejorar la solubilidad en agua (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

5.5. Pruebas de liberación in vitro

En relación con las pruebas de liberación in vitro es necesario conocer la concentración de las diferentes muestras, para lo que se utilizó espectroscopia UV-vis. En primer lugar, se realizó una recta de calibrado empleando rutina pura y una disolución con proporción 1:1 en volumen de etanol y agua. Para la recta de calibrado se prepararon patrones del analito (rutina) con diferentes concentraciones, abarcando un intervalo de concentraciones adecuado, y se midió la señal, en este caso la absorbancia, proporcionada por los mismos. De este modo en la Figura 25 se muestra la recta de calibrado obtenida.

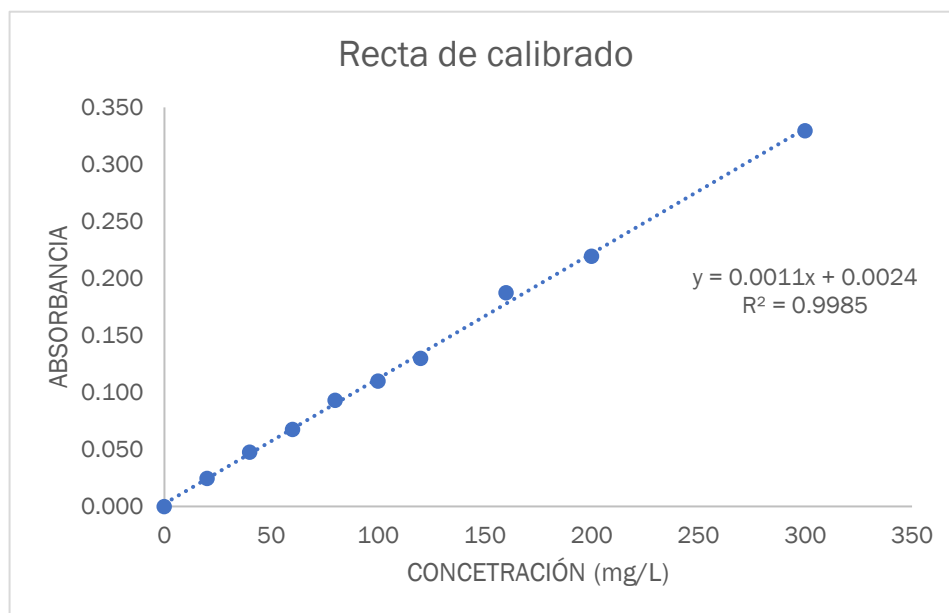


Figura 25: Recta de calibrado para la rutina

La ecuación obtenida para calcular la concentración de las muestras es la siguiente:

$$A = 0,0011 \cdot c + 0,00235$$

A continuación, se muestran los resultados de las muestras de disolución in vitro en un fluido intestinal simulado con un pH de 6,8. Se realizaron tests de disolución a muestras de rutina pura, mezclas físicas de rutina pura con Eudragit® L-100 y Eudragit® E-100, y las muestras procesadas con SAS de rutina, rutina coprecipitada con Eudragit® L-100 y rutina coprecipitada con Eudragit® E-100.

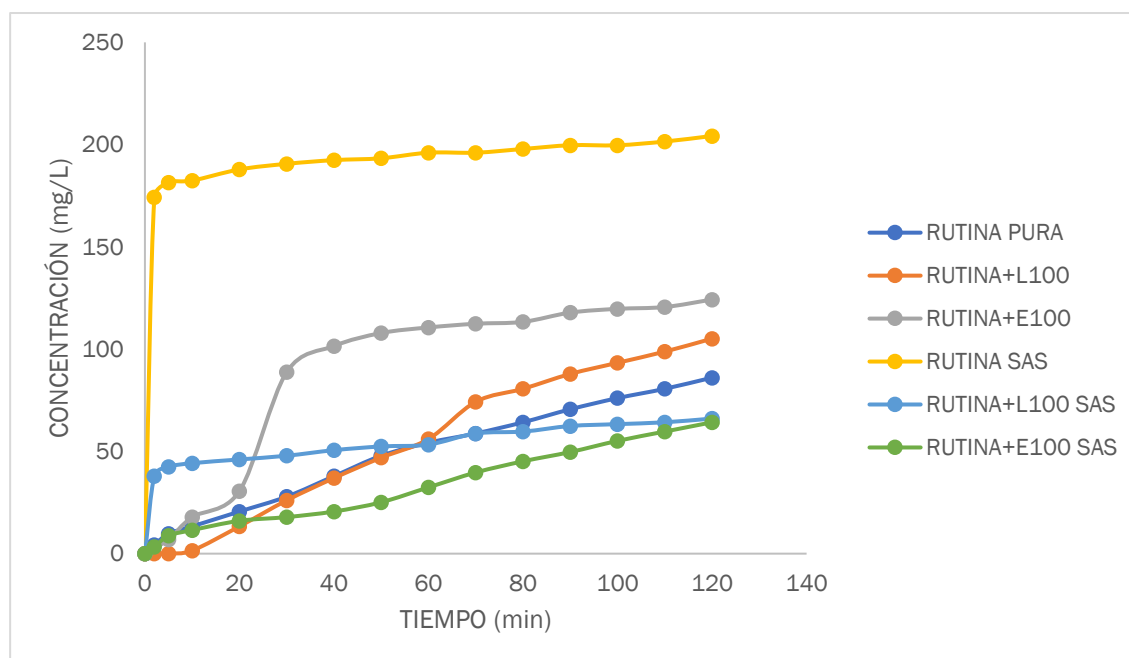


Figura 26: Resultados de las pruebas de liberación de fármacos en líquido intestinal simulado

La Figura 26 muestra los resultados de las pruebas realizadas. Como se ha descrito anteriormente, se realizaron varias repeticiones de cada uno de los experimentos, pero no se consiguió su reproducibilidad. En el [ANEXO I](#) se pueden encontrar los resultados de todas las repeticiones y las experiencias escogidas. En la cristalización de compuestos naturales resulta habitual la existencia de variaciones tanto en el producto como en los resultados que se obtienen. Por ello, los resultados de los experimentos pueden no ser reproducibles, ya que, es difícil obtener unas muestras totalmente homogéneas y reproducibles, dado que dependiendo de la porción y de las características de las muestras que se toman, los resultados pueden variar.

Observando la Figura 26, el resultado más significativo se puede ver con la rutina procesada con SAS, en la que se muestra una disolución mucho más rápida que las demás muestras, así como una solubilidad final más alta. Este comportamiento puede atribuirse tanto a la reducción del tamaño de las partículas conseguido con la micronización SAS, que aumenta su superficie disponible, como a su estado amorfo comprobado con la difracción de rayos X. Estas dos condiciones logran una mejora de la disolución y la solubilidad de las partículas.

Por otra parte, las muestras obtenidas de una homogenización física de rutina con Eudragit® con una proporción 1:1 revelaron una solubilidad mayor y disolución más rápida respecto a las muestras de rutina pura. Este aumento de solubilidad posiblemente se deba a la modificación de las propiedades de la solución con la adición de los polímeros Eudragit®, que pueden mejorar la disolución del compuesto activo.



Por último, las muestras coprecipitadas de rutina con Eudragit® muestran una liberación mucho más controlada que las correspondientes a las mezclas físicas. Al procesar estas muestras con el SAS, la rutina está recubierta del polímero lo que puede provocar una liberación y disolución mucho más lenta. Este comportamiento podría ser también favorable para la aplicación de la formulación, ya que la liberación controlada podría mejorar la estabilidad de la rutina en el tracto gastrointestinal.



6. Conclusiones y trabajo futuro

6.1. Conclusiones

La rutina es uno de los glucósidos de la quercetina más comunes que se puede encontrar en diversas fuentes vegetales. De igual forma que otros flavonoides, posee importantes propiedades antioxidantes y beneficiosas para la salud, gracias a sus estructuras químicas (Frutos et al., 2019). En virtud de su potencial farmacológico y naturaleza no tóxica se ha convertido en una molécula de gran interés. Sin embargo, su escasa estabilidad y solubilidad y por tanto su biodisponibilidad, limitan su utilización en aplicaciones clínicas (Semwal et al., 2021). Se han desarrollado diferentes estrategias y técnicas, como la encapsulación, que es capaz de mejorar la estabilización y biodisponibilidad de la rutina (Frutos et al., 2019).

En este trabajo la técnica SAS ha sido capaz de producir con éxito micropartículas de rutina. Además, se ha conseguido coprecipitar satisfactoriamente rutina con distintos polímeros de Eudragit® como material portador en la encapsulación. Ambas, a partir soluciones de etanol y con un proceso semicontinuo SAS.

El producto obtenido fueron polvos finamente divididos que como indican los resultados de los análisis de caracterización morfológica y estructural, gracias a la técnica SAS se produjo una reducción significativa tanto del tamaño de las partículas como de su estructura cristalina, lo que teóricamente favorece su solubilidad (Rodríguez-Rojo et al., 2022).

Las formulaciones de rutina desarrolladas en este trabajo mostraron una disolución más rápida y una mayor solubilidad que las muestras de rutina sin procesar o las mezclas físicas de rutina con Eudragit®, a causa de las propiedades morfológicas y estructurales conferidas por el proceso SAS. Estos resultados se pueden considerar prometedores, ya que, superan las limitaciones principales de la rutina.

Las formulaciones de rutina encapsuladas con Eudragit® mediante el proceso SAS mostraron una liberación sumamente controlada en fluidos intestinales simulados. Lo que puede resultar útil según un estudio que busca la administración de rutina intacta en el colon minimizando su absorción a través del estómago y el intestino, enfocado al tratamiento del cáncer de colon (Asfour & Mohsen, 2018).

Por consiguiente, las formulaciones desarrolladas son capaces de garantizar una liberación controlada, en el caso de las encapsulaciones de rutina y Eudragit®, y una disolución notablemente más rápida con una solubilidad mayor, en el caso de la rutina micronizada con SAS. Estos resultados indican que las propiedades del producto que se ha obtenido con el proceso SAS experimentan un efecto positivo en el comportamiento de disolución de la formulación.

A pesar de haber obtenido unos resultados satisfactorios, no ha sido posible considerar reproducibles los diferentes experimentos de velocidad de disolución

realizados. Lo que se asocia a la dificultad de obtener muestras totalmente homogéneas en procesos como la cristalización de compuestos naturales.

6.2. Trabajo futuro

El grupo de Procesos de Alta presión de la Universidad de Valladolid en colaboración con Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), llevaron a cabo una investigación en la que se estudiaban la biodisponibilidad y la eficacia nefroprotectora en ratas de una formulación de quercetina encapsulada en Pluronic F127.

Los resultados de este estudio mostraron que esta formulación con hidrosolubilidad y propiedades biofarmacéuticas mejoradas, en comparación con la quercetina natural, fue capaz de aumentar la biodisponibilidad y de mantener y de mejorar en algunos casos sus propiedades nefroprotectoras (Casanova et al., 2021).

Por ello, en futuras investigaciones podría ser posible realizar un estudio similar al descrito anteriormente con ratas, pero utilizando formulaciones de rutina y Eudragit®.

Por otra parte, se siguen investigando distintas técnicas y metodologías para mejorar la biodisponibilidad de la rutina, así como, nuevos sistemas de administración de fármacos que mejoren la farmacodinámica y la farmacocinética del compuesto bioactivo. Una nueva área de investigación para la rutina en un futuro próximo podría ser la orientación de los fármacos, puesto que, puede ser capaz de mejorar su potencial junto con la eliminación de las limitaciones asociadas a esta molécula (Semwal et al., 2021).

Además, al no haber obtenido unos resultados reproducibles en los experimentos de velocidad de disolución, otra posible línea de trabajo futuro sería repetir y realizar más ensayos de disolución in vitro en fluido intestinal simulado, con diferentes condiciones, por ejemplo, utilizando una mayor cantidad de muestra o sustituyendo el sistema de agitación de cestas por palas, con el objetivo de evaluar si se obtienen resultados más reproducibles.

7. Bibliografía

- Abd Mutalib, M., Rahman, M. A., Othman, M. H. D., Ismail, A. F., & Jaafar, J. (2017). Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy. *Membrane Characterization*, 161–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7>
- Abril Díaz, N., Antonio Bárcena Ruiz, J., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Toribio Meléndez-Valdés, F., & Túnez Fiñana, I. (2000). 8. *Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. 1–8.
- Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2020). Introduction to Spectrophotometric Techniques. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, 19–27. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_2
- Asfour, M. H., & Mohsen, A. M. (2018). Formulation and evaluation of pH-sensitive rutin nanospheres against colon carcinoma using HCT-116 cell line. *Journal of Advanced Research*, 9, 17–26. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2017.10.003>
- Bhuyan, U., & Handique, J. G. (2022). Plant polyphenols as potent antioxidants: Highlighting the mechanism of antioxidant activity and synthesis/development of some polyphenol conjugates. *Studies in Natural Products Chemistry*, 75, 243–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91250-1.00006-9>
- Bié, J., Sepodes, B., Fernandes, P. C. B., & Ribeiro, M. H. L. (2023). Polyphenols in Health and Disease: Gut Microbiota, Bioaccessibility, and Bioavailability. *Compounds 2023, Vol. 3, Pages 40-72*, 3(1), 40–72. <https://doi.org/10.3390/COMPOUNDS3010005>
- Carlos Brunatti Lic Ana María Martín, I. (2010). *Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano*.
- 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. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 729*, 22(2), 729. <https://doi.org/10.3390/IJMS22020729>
- Charalabidis, A., Sfouni, M., Bergström, C., & Macheras, P. (2019). The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *International Journal of Pharmaceutics*, 566, 264–281. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2019.05.041>

- Chauhan, A., & Chauhan, P. (2014). Powder XRD Technique and its Applications in Science and Technology. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 5(6). <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000212>
- Cocero, M. J., Martín, Á., Mattea, F., & Varona, S. (2009). Encapsulation and coprecipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 546–555. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2008.08.015>
- Difractometría de Rayos X (Polvo)*. (2023). <https://www.laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/difractometra-de-rayos-x-polvo>
- Essien, S. O., Young, B., & Baroutian, S. (2020). Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 156–169. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.01.014>
- Farooq, S., Farooq, S., Rather, S. A., & Ganaie, T. A. (2023). Supercritical CO₂ extraction of natural products. *Extraction of Natural Products from Agro-Industrial Wastes*, 79–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823349-8.00011-3>
- Fraile, M., Buratto, R., Gómezgómez, B., Ngel Martín, A., & Josécocero, M. J. (2014). Enhanced Delivery of Quercetin by Encapsulation in Poloxamers by Supercritical Antisolvent Process. <https://doi.org/10.1021/ie5001136>
- Frutos, M. J., Rincón-Frutos, L., & Valero-Cases, E. (2019). Rutin. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 111–117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00015-1>
- Giraldes Fernández, I. N. (2022). *Encapsulación de antioxidantes naturales mediante proceso Supercritical Anti Solvent (SAS)*.
- 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. <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>
- Harati, M., Tayarani-Najaran, Z., & Javadi, B. (2023). Dietary flavonoids: Promising compounds for targeting α -synucleinopathy in Parkinson's disease. *PharmaNutrition*, 24, 100334. <https://doi.org/10.1016/J.PHANU.2023.100334>
- Hedrén, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition* 2002 56:5, 56(5), 425–430. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601329>

- Hsieh, C. M., & Vrabec, J. (2015). Vapor-liquid equilibrium measurements of the binary mixtures CO₂ + acetone and CO₂ + pentanones. *Journal of Supercritical Fluids*, 100, 160–166. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.02.003>
- Khan, H., Yerramilli, A. S., D'Oliveira, A., Alford, T. L., Boffito, D. C., & Patience, G. S. (2020). Experimental methods in chemical engineering: X-ray diffraction spectroscopy—XRD. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(6), 1255–1266. <https://doi.org/10.1002/CJCE.23747>
- Knez, Z., Škerget, M., Knez Hrnčič, M., & Čuček, D. (2014). Particle Formation Using Sub- and Supercritical Fluids. *Supercritical Fluid Technology for Energy and Environmental Applications*, 31–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62696-7.00002-2>
- Machado, A. P. da F., Nascimento, R. de P. do, Moya, A. M. T. M., Baptista, R. de C., & Marostica Junior, M. R. (2022). Development of natural bioactive delivery systems through pressurized fluids-modern techniques. *Herbal Bioactive-Based Drug Delivery Systems: Challenges and Opportunities*, 331–369. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824385-5.00010-8>
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, 125124. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125124>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., & Jesús Tuñón, M. (2002a). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. *Nutr. Hosp*, 6, 271–278.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., & Jesús Tuñón, M. (2002b). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. *Nutr. Hosp*, 6, 271–278.
- Mel, M. M. R. D., Gunathilake, K. D. P. P., & Fernando, C. A. N. (2020). Formulation of microencapsulated rutin and evaluation of bioactivity and stability upon in vitro digestive and dialysis conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 316–323. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.05.085>
- Microscopio Electrónico de Barrido ESEM (QUANTA 200 FEG)*. (2023). <https://www.laboratoriotecnicasinstrumentales.es/microscopia/microscopia-electrnica/microscopio-electrnico-de-barrido-esem-quanta-200-feg>
- Moravkar, K. K., Laddha, U. D., Patil, M. D., Kale, S. S., Girase, N., Bhairav, B. A., Bhaumik, J., & Chalikwar, S. S. (2023). Extraction of rutin from tagetes erecta (Marigold) and preparation of peroral nano-suspension for effective antitussive/expectorant therapy. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5, 100320. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2023.100320>

- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Feo, V., Pimentel, T. C., Coppola, R., & Cruz, A. G. (2022). Polyphenols applications in food industry sector. *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-Products and Wastes*, 301–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85273-9.00002-8>
- Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2022). Advances in the industrial applications of supercritical carbon dioxide. *Carbon Dioxide Capture and Conversion: Advanced Materials and Processes*, 237–256. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85585-3.00008-0>
- Ozkan, G., Franco, P., Capanoglu, E., & De Marco, I. (2019). PVP/flavonoid coprecipitation by supercritical antisolvent process. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 146, 107689. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2019.107689>
- Patel, K., & Patel, D. K. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, 457–479. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00026-X>
- Remanan, M. K., & Zhu, F. (2023). Encapsulation of rutin in Pickering emulsions stabilized using octenyl succinic anhydride (OSA) modified quinoa, maize, and potato starch nanoparticles. *Food Chemistry*, 405, 134790. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.134790>
- Rodríguez-Rojo, S., Moreno, T., Gonçalves, V. S. S., Martín, Á., Navarrete, A., & Cocero, M. J. (2022). *Chapter 13. Post-extraction Processes: Improvement of Functional Characteristics of Extracts*. 591–626. <https://doi.org/10.1039/9781839165894-00591>
- Semwal, R., Joshi, S. K., Semwal, R. B., & Semwal, D. K. (2021). Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value. *Phytochemistry Letters*, 46, 119–128. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2021.10.006>
- Stainless Steel Filter Elements | Classic Filters*. (2023). <https://www.classicfilters.com/product/stainless-steel-filter-elements/?cn-reloaded=1>
- Voss, G. B., Oliveira, A. L. S., Alexandre, E. M. da C., & Pintado, M. E. (2022). Importance of polyphenols: Consumption and human health. *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-Products and Wastes*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85273-9.00008-9>
- Wang, C., Yan, T., Yan, T., & Wang, Z. (2023). Fabrication of hesperetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex nanoparticles for enhancement of bioactivity using supercritical antisolvent technology. *Journal*



of Molecular Structure, 1279, 134947.

<https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2023.134947>

Wani, M. J., Salman, K. A., Hashmi, M. A., Siddiqui, S., & Moin, S. (2023). Rutin impedes human low-density lipoprotein from non-enzymatic glycation: A mechanistic insight against diabetes-related disorders. *International Journal of Biological Macromolecules*, 238, 124151.

<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124151>

Yan, T., Wang, H., Song, X., Yan, T., Ding, Y., Luo, K., Zhen, J., He, G., Nian, L., Wang, S., & Wang, Z. (2022). Fabrication of apigenin nanoparticles using antisolvent crystallization technology: A comparison of supercritical antisolvent, ultrasonic-assisted liquid antisolvent, and high-pressure homogenization technologies. *International Journal of Pharmaceutics*, 624, 121981.

<https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.121981>



8. Anexos

ANEXO I: Resultados de los diferentes experimentos en las pruebas de disolución in vitro

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos en las experiencias de liberación in vitro. Como se ha indicado anteriormente se realizaron varias experiencias, pero no se consiguió su reproducibilidad.

Experiencias con rutina pura

1		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	10,591	0,014
5	26,955	0,032
10	44,227	0,051
20	65,136	0,074
30	82,409	0,093
40	91,500	0,103
50	102,409	0,115
60	106,045	0,119
70	109,682	0,123
80	113,318	0,127
90	116,955	0,131
100	122,409	0,137
110	125,136	0,140
120	128,773	0,144

Tabla 1: Resultados de la primera experiencia con rutina

2		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	4,227	0,007
5	9,682	0,013
10	13,318	0,017
20	20,591	0,025
30	27,864	0,033
40	37,864	0,044
50	47,864	0,055
60	54,227	0,062
70	58,773	0,067
80	64,227	0,073
90	70,591	0,080
100	80,591	0,091
110	76,045	0,086
120	86,045	0,097

Tabla 2: Resultados de la segunda experiencia con rutina

Los resultados de la Tabla 2 fueron tomados para la gráfica de la Figura 26 en 5.5

3		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	13,318	0,017
5	36,045	0,042
10	57,864	0,066
20	89,682	0,101
30	130,591	0,146
40	159,682	0,178
50	178,773	0,199
60	192,409	0,214
70	205,136	0,228
80	212,409	0,236
90	221,500	0,246
100	232,409	0,258
110	240,591	0,267
120	245,136	0,272

Tabla 3: Resultados de la tercera experiencia con rutina

Experiencias con mezcla física de rutina pura y Eudragit® L-100

1		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	0,000	0,000
5	0,000	0,000
10	0,591	0,003
20	5,136	0,008
30	36,045	0,042
40	48,773	0,056
50	55,136	0,063
60	58,773	0,067
70	63,318	0,072
80	64,227	0,073
90	70,591	0,080
100	77,864	0,088
110	78,773	0,089
120	81,500	0,092

Tabla 4: Resultados de la primera experiencia con mezcla física de rutina pura y Eudragit® L-100

2		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	0,000	0,000
5	0,000	0,002
10	0,591	0,003
20	1,500	0,004
30	2,409	0,005
40	6,045	0,009
50	12,409	0,016
60	14,227	0,018
70	19,682	0,024
80	22,409	0,027
90	27,864	0,033
100	31,500	0,037
110	36,045	0,042
120	39,682	0,046

Tabla 5: Resultados de la segunda experiencia con mezcla física de rutina pura y Eudragit® L-100

3		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	0,000	0,000
5	0,045	0,002
10	1,500	0,004
20	13,318	0,017
30	26,045	0,031
40	36,955	0,043
50	46,955	0,054
60	56,045	0,064
70	74,227	0,084
80	80,591	0,091
90	87,864	0,099
100	93,318	0,105
110	98,773	0,111
120	105,136	0,118

Tabla 6: Resultados de la tercera experiencia con mezcla física de rutina pura y Eudragit® L-100

Los resultados de la Tabla 6 fueron tomados para la gráfica de la Figura 26 en 5.5

Experiencias con mezcla física de rutina pura y Eudragit® E-100

1		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	-	-
5	6,955	0,010
10	17,864	0,022
20	30,591	0,036
30	88,773	0,100
40	101,500	0,114
50	107,864	0,121
60	110,591	0,124
70	112,409	0,126
80	113,318	0,127
90	117,864	0,132
100	119,682	0,134
110	120,591	0,135
120	124,227	0,139

Tabla 7: Resultados de la primera experiencia con mezcla física de rutina pura y Eudragit® E-100

Los resultados de la Tabla 7 fueron tomados para la gráfica de la Figura 26 en 5.5

2		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	20,591	0,025
5	36,045	0,042
10	47,864	0,055
20	59,682	0,068
30	90,591	0,102
40	101,500	0,114
50	107,864	0,121
60	114,227	0,128
70	117,864	0,132
80	122,409	0,137
90	129,682	0,145
100	135,136	0,151
110	135,136	0,151
120	137,864	0,154

Tabla 8: Resultados de la segunda experiencia con mezcla física de rutina pura y Eudragit® E-100

3		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	24,227	0,029
5	35,136	0,041
10	46,955	0,054
20	66,045	0,075
30	83,318	0,094
40	95,136	0,107
50	106,045	0,119
60	125,136	0,140
70	117,864	0,132
80	136,045	0,152
90	143,318	0,160
100	148,773	0,166
110	156,955	0,175
120	157,864	0,176

Tabla 9: Resultados de la tercera experiencia con mezcla física de rutina pura y Eudragit® E-100

Experiencias con rutina procesada por SAS

1		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	268,773	0,298
5	285,136	0,316
10	283,318	0,314
20	287,864	0,319
30	288,773	0,320
40	284,227	0,315
50	286,955	0,318
60	285,136	0,316
70	282,409	0,313
80	283,318	0,314
90	282,409	0,313
100	279,682	0,310
110	276,955	0,307
120	286,955	0,318

Tabla 10: Resultados de la primera experiencia con rutina procesada por SAS

2		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	174,227	0,194
5	181,500	0,202
10	182,409	0,203
20	187,864	0,209
30	190,591	0,212
40	192,409	0,214
50	193,318	0,215
60	196,045	0,218
70	196,045	0,218
80	197,864	0,220
90	199,682	0,222
100	199,682	0,222
110	201,500	0,224
120	204,227	0,227

Tabla 11: Resultados de la segunda experiencia con rutina procesada por SAS

Los resultados de la Tabla 11 fueron tomados para la gráfica de la Figura 26 en 5.5

Experiencias con rutina y Eudragit® L-100 procesada por SAS

1		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	37,864	0,044
5	42,409	0,049
10	44,227	0,051
20	46,045	0,053
30	47,864	0,055
40	50,591	0,058
50	52,409	0,060
60	53,318	0,061
70	58,773	0,067
80	59,682	0,068
90	62,409	0,071
100	63,318	0,072
110	64,227	0,073
120	66,045	0,075

Tabla 12: Resultados de la primera experiencia con rutina y Eudragit® L-100 procesada por SAS

Los resultados de la Tabla 12 fueron tomados para la gráfica de la Figura 26 en 5.5

2		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	0,591	0,003
5	7,864	0,011
10	21,500	0,026
20	46,045	0,053
30	67,864	0,077
40	91,500	0,103
50	106,955	0,120
60	123,318	0,138
70	137,864	0,154
80	153,318	0,171
90	158,773	0,177
100	188,773	0,210
110	192,409	0,214
120	210,591	0,234

Tabla 13: Resultados de la segunda experiencia con rutina y Eudragit® L-100 procesada por SAS

3		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	7,864	0,011
5	11,500	0,015
10	12,409	0,016
20	16,045	0,020
30	18,773	0,023
40	21,500	0,026
50	24,227	0,029
60	26,955	0,032
70	29,682	0,035
80	33,318	0,039
90	36,045	0,042
100	38,773	0,045
110	42,409	0,049
120	46,955	0,054

Tabla 14: Resultados de la tercera experiencia con rutina y Eudragit® L-100 procesada por SAS

Experiencias con rutina y Eudragit® E-100 procesada por SAS

1		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	0,000	0,000
5	0,000	0,000
10	0,591	0,003
20	6,045	0,009
30	9,682	0,013
40	14,227	0,018
50	17,864	0,022
60	23,318	0,028
70	26,955	0,032
80	29,682	0,035
90	30,591	0,036
100	31,500	0,037
110	32,409	0,038
120	33,318	0,039

Tabla 15: Resultados de la primera experiencia con rutina y Eudragit® E-100 procesada por SAS

2		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	3,318	0,006
5	8,773	0,012
10	11,500	0,015
20	16,045	0,020
30	17,864	0,022
40	20,591	0,025
50	25,136	0,030
60	32,409	0,038
70	39,682	0,046
80	45,136	0,052
90	49,682	0,057
100	55,136	0,063
110	59,682	0,068
120	64,227	0,073

Tabla 16: Resultados de la segunda experiencia con rutina y Eudragit® E-100 procesada por SAS

Los resultados de la Tabla 16 fueron tomados para la gráfica de la Figura 26 en 5.5



3		
Tiempo (min)	C (mg/L)	Abs
2	0,000	0,000
5	0,000	0,000
10	0,000	0,000
20	0,591	0,003
30	4,227	0,007
40	6,955	0,010
50	8,773	0,012
60	12,409	0,016
70	17,864	0,022
80	23,318	0,028
90	27,864	0,033
100	33,318	0,039
110	36,955	0,043
120	39,682	0,046

Tabla 17: Resultados de la tercera experiencia con rutina y Eudragit® E-100 procesada por SAS