

UCH FE  
DOC-Q  
J947  
C.1

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUIMICA



**ESTUDIO DE COMPUESTOS DE INCLUSION DE  
CICLODEXTRINAS CON FLAVONOIDES.  
EFECTO SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

Tesis presentada a la Universidad de Chile en cumplimiento de los requisitos para optar al  
Grado académico de Doctor en Química

POR

**CAROLINA JULLIAN MATTHAEI**



Directores de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

Dr. Fernando Mendizábal Emaldía

Santiago, Noviembre 2007

1107  
2011  
Donacion D.C. Orlando Moreno

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

INFORME DE APROBACION DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

**CAROLINA JULLIAN MATTHAEI**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día  
...5 de Noviembre de 2007.....

**Directores de Tesis:**

Dr. Claudio Olea Azar

Dr. Fernando Mendizábal Emaldia

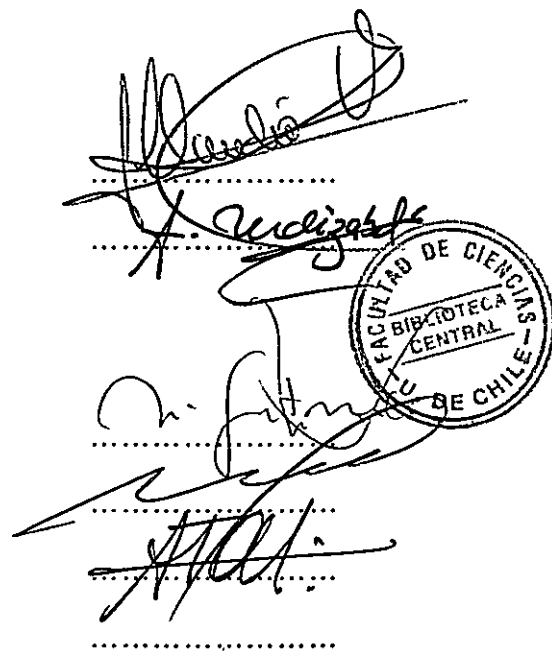
**Comisión de Evaluación de Tesis:**

Dr. Nicolás Yutronic

Dr. Orlando Muñoz

Dr. Alejandro Toro

Dr. Joel Alderete

  
The right side of the document features three handwritten signatures, each followed by a dotted line. A circular stamp is positioned over the middle signature. The stamp contains the text 'FACULTAD DE CIENCIAS - BIBLIOTECA CENTRAL - UNIVERSIDAD DE CHILE' around its perimeter.



*A mis amores, Sergio, Cata y Vicente*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecerles a mis directores de Tesis, Claudio y Fernando. En quienes he encontrado un lazo mas profundo que solo una dirección de tesis. Claudio por su visión y fe en mí y Fernando por su guía oportuna.

A los miembros de la comisión, Nicolás, Orlando, Joel y Alejandro por sus interesantes aportes.

A mi familia, por el tiempo que les he robado y la paciencia que me han tenido.

A Claudio, Julio, Ramiro y Hernán quienes siempre me han acompañado y alentado.

A Sole, Claudia y Rosemary, en quienes he encontrado unas buenas amigas y por supuesto por esos momentos de relajo en nuestras entretenidas salidas.

A Gerald, por la amistad que me ha brindado.

A los chicos de laboratorio, Germán, Christian, Mary, Sebastián, Raúl por sus comentarios siempre hilarantes.

A nuestros Tesistas, por estar siempre preocupados y al día de cómo me va.

A todo el personal del Cepedeq, especialmente a Cecilia, por su ayuda siempre incondicional.

Al Departamento de Postgrado y Postítulo por la Beca de término de Tesis PG/57/2005

Al CEPEDEQ, por el uso del equipo de RMN y EPR.

Por último, quisiera agradecer especialmente a Sergio Lavandero, por haberme alentado a ingresar al doctorado y cumplir una meta que se encontraba postergada.

## PUBLICACIONES

Carolina Jullian, Sebastián Miranda, Gerald Zapata-Torres, Fernando Mendizábal and Claudio Olea-Azar.

Studies of Inclusion Complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and Molecular Modeling,

Bioorg. Med. Chem. 15, 3217-3224, 2007

Carolina Jullian, Lorena Moyano, Claudia Yañez and Claudio Olea-Azar.

Complexation of Quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study.

*Spectrochimica Acta Part A*. 67, 230-234, 2007

Carolina Jullian, Teresita Orosteguis, Fernanda Pérez-Cruz, Paulina Sánchez, Fernando Mendizábal and Claudio Olea-Azar.

Complexation of morin with three kinds of cyclodextrin. A thermodynamic and reactivity study.

Enviado: *Spectrochimica Acta Part A*



## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO 1</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hipótesis</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Objetivos Generales</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Objetivos Especificos</b>	<b>15</b>
<b>CAPITULO 2</b>	<b>16</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Reactivos</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Metodologías</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1 Preparación de los complejos</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2 Determinación de la estequiometria de complejo</b>	<b>17</b>
<b>2.2.3 Determinación de la constante de asociación</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3.1 Difussion Ordered Spectroscopy DOSY</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3.2 Metodología de Solubilidad de Fase</b>	<b>22</b>
<b>2.2.4 Determinación de la Geometría de Inclusión</b>	<b>25</b>

<b>2.3 Determinación de la Actividad Antioxidante</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1 Resonancia Espin Electronico REE</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2 ORAC<sub>FL</sub></b>	<b>28</b>
<b>2.4 Cálculos Teóricos</b>	<b>30</b>
<b>2.4.1 Autodock</b>	<b>30</b>
<b>CAPITULO 3</b>	<b>32</b>
<b>Resultados y Discusión</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Complejos quercetina-ciclodextrinas</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Complejos morina-ciclodextrinas</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Complejos catequina-ciclodextrinas</b>	<b>70</b>
<b>3.4 Complejos galangina-ciclodextrinas</b>	<b>91</b>
<b>CAPITULO 4</b>	<b>99</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>99</b>

## INDICE DE TABLAS

		Página
<b>Tabla 3.1.1</b>	Valores de las $K_a$ determinadas por el método de solubilidad de fase y por $^1\text{H-RMN}$ utilizando la metodología DOSY en mezclas mixtas MeOD- $\text{D}_2\text{O}$ 2:1.	38
<b>Tabla 3.1.2</b>	Valores de las pendientes obtenidas de las graficas ABC v/s concentración con sus valores de $r^2$ y los $T_{\text{eq}}$ para la quercetina y los complejos formados.	44
<b>Tabla 3.2.1</b>	Valores de $K_a$ obtenidos por método de solubilidad de fase.	49
<b>Tabla 3.2.2</b>	Valores de las $K_a$ determinadas por RMN utilizando la metodología DOSY en $\text{D}_2\text{O}$ con un 6% MeOD.	50
<b>Tabla 3.2.3</b>	Valores de las pendientes obtenidas de las graficas ABC v/s concentración con sus valores de $r^2$ y los $T_{\text{eq}}$ para la morina y los complejos formados.	63
<b>Tabla 3.2.4</b>	Constantes de asociación $K_a$ para los complejos de inclusión de morina con $\beta\text{CD}$ , $\text{DM}\beta\text{CD}$ e $\text{HP}\beta\text{CD}$ a diferentes temperaturas.	66
<b>Tabla 3.3.1</b>	Desplazamiento químico (Hz) de los protones de la catequina al formar complejos con las diferentes ciclodextrinas.	71



<b>Tabla 3.3.2</b>	Valores obtenidos de los espectros DOSY registrados a 298K en D <sub>2</sub> O y sus valores de constante de asociación, K <sub>a</sub> .	<b>80</b>
<b>Tabla 3.3.3</b>	Valores de las pendientes obtenidas de las graficas ABC v/s concentración con sus valores de r <sup>2</sup> y los T <sub>eq</sub> para la catequina y los complejos formados.	<b>89</b>
<b>Tabla 3.4.1</b>	Valores de K <sub>a</sub> obtenidos por método de solubilidad de fase.	<b>93</b>
<b>Tabla 3.4.2</b>	Valores de las pendientes obtenidas de las gráficas ABC v/s concentración con sus valores r <sup>2</sup> y los T <sub>eq</sub> para la galangina y el complejo G-DMβCD.	<b>97</b>

## INDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1.1	$\beta$ -ciclodextrina.	2
Figura 1.2	Estructura $\alpha$ -tocoferol.	4
Figura 1.3	Variaciones estructurales de los flavonoides <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonoles (quercetina, kaempferol) con el 3 hidroxilo piran-4-ona.</li> <li>• Flavonas (luteolin, apigenin, crisin ) carente del hidroxilo en posición 3</li> <li>• Flavanoles ( catequina) carente del doble enlace en 2-3 y de 4-ona.</li> <li>• Isoflavonas (genisteina) el anillo B se encuentra en la posición 3</li> </ul>	7
Figura 1.4	quercetina (QUE), morina (M), galangina (G) y catequina (CA).	14
Figura 2.1	Diagrama de gradientes de campo aplicados a una muestra.	19
Figura 2.2	Gráfica de $-\ln(A/A_0)$ v/s B.	20
Figura 2.3	Programa de pulso <i>ledbpgp2s</i> para realizar espectro DOSY.	22
Figura 2.4	Diagrama de solubilidad de fase.	23
Figura 2.5	Diagrama de espectro ROESY de una molécula que tiene los hidrógenos $H_a$ y $H_b$ cercanos espacialmente a $H_c$	26
Figura 3.1.1	Espectro $^1H$ -RMN de QUE en solución mixta MeOD:D <sub>2</sub> O 2:1.	32
Figura 3.1.2	Espectros de las ciclodextrinas libres y de sus respectivos complejos con quercetina en soluciones órgano-acuosas, MeOD:D <sub>2</sub> O 2:1.	33
Figura 3.1.3	Gráfica de concentración de ciclodextrina, ( $\beta$ CD, HP $\beta$ CD y SBE $\beta$ CD) en función de quercetina disuelta.	35

Figura 3.1.4	Espectros DOSY de los complejos de QUE- $\beta$ CD, QUE-HP $\beta$ CD y QUE-SBE $\beta$ CD en mezclas órgano-acuosas MeOD-D <sub>2</sub> O 2:1, a 298K..	37
Figura 3.1.5	Espectro ROESY del complejo QUE-SBE- $\beta$ -CD, [QUE] = 2.65mM y [SBE] = 3.36 mM, en mezcla MeOD:D <sub>2</sub> O 2:1.	39
Figura 3.1.6	Espectro HSQC de SBE $\beta$ CD y del complejo QUE-SBE $\beta$ CD en soluciones mixtas MeOD-D <sub>2</sub> O 2:1.	40
Figura 3.1.7	Esquema de inclusión de quercetina en SBE $\beta$ CD (A) y geometría de inclusión de quercetina en $\beta$ CD por Yan et al. (B)	40
Figura 3.1.8	Espectro REE de galvinoxyl (A); galvinoxyl en presencia de $\beta$ CD (B); QUE (C); QUE- $\beta$ CD (D); QUE-HP- $\beta$ CD (E) y QUE-SBE- $\beta$ CD (F).	41
Figura 3.1.9	Reactividad del radical DPPH/Galvinoxyl frente a QUE libre y a los complejos formados. La concentración de DPPH/Galvinoxyl fue de 2mM.	42
Figura 3.1.10	Decaimiento de la fluorescencia de fluoresceína del complejo QUE- $\beta$ CD a diferentes concentraciones (1 $\mu$ M-5 $\mu$ M).	44
Figura 3.1.11	Variación de la intensidad de la señal del radical DPPH cuando se encuentra en presencia de quercetina y de sus complejos de inclusión.	45
Figura 3.2.1	Espectro <sup>1</sup> H-RMN de morina en MeOD	46
Figura 3.2.2	Espectros <sup>1</sup> H-RMN de las ciclodextrinas libres y de sus respectivos complejos.	47
Figura 3.2.3	Espectros de absorción de morina (A) y de los complejos de inclusión M-SBE $\beta$ CD a diferentes concentraciones. (B)Gráfica de solubilidad de fase, [M] v/s [SBE $\beta$ CD].	48
Figura 3.2.4	Espectro DOSY del complejo M-SBE $\beta$ CD en D <sub>2</sub> O con 6% MeOD.	49
Figura 3.2.5	Espectros <sup>1</sup> H-RMN de morina y de los complejos 1:1 con las diferentes ciclodextrinas en D <sub>2</sub> O con un 6% MeOD.	51

Figura 3.2.6	Espectro COSY de morina en D <sub>2</sub> O + 6% MeOD.	52
Figura 3.2.7	Espectro COSY del complejo M-HPβCD en D <sub>2</sub> O con un 6% MeOD.	53
Figura 3.2.8	Espectro <sup>1</sup> H-RMN de morina y complejos de morina a diferentes razones Morina : HP β-CD, en D <sub>2</sub> O con un 6% MeOD.	55
Figura 3.2.9	Espectros <sup>1</sup> H-RMN de morina 0.5 mM en el tiempo.	56
Figura 3.2.10	Espectros <sup>1</sup> H-RMN del complejo M-HPβCD 1:1 0.5mM en el tiempo.	57
Figura 3.2.11	Espectros <sup>1</sup> H-RMN del complejo M-HPβCD 1:20 en el tiempo [M] = 0.5mM	57
Figura 3.2.12	Sección del espectro ROESY del complejo M-βCD.	58
Figura 3.2.13	Esquema de inclusión de morina en (A) β-ciclodextrina, HPβCD y (B) DMβCD.	59
Figura 3.2.14	Sección del espectro ROESY del complejo M-HPβCD.	59
Figura 3.2.15	Sección del espectro ROESY del complejo M-DMβCD	60
Figura 3.2.16	Complejo de inclusión de M-βCD a partir de estudios de docking.	61
Figura 3.2.17	Decaimiento de fluoresceína del complejo M-SBEβCD a diferentes concentraciones (1μM-5μM).	63
Figura 3.2.18	Trox equivalente de morina y sus complejos con las diferentes ciclodextrinas.	64
Figura 3.2.19	Espectro REE del spin aducto entre radical DPPH y (A) morina; (B) M-βCD; (C) M-HPβCD; (D) M-DMβCD; y (E) blanco.	65
Figura 3.2.20	Capacidad atrapadora del radical DPPH para la morina y sus complejos de inclusión en todos los casos la concentración de morina es 0.5mM.	65

Figura 3.2.21	Gráficos de van't Hoff ( $\ln K$ v/s $1/T$ ) de los complejos de morina con $\beta$ CD, DM $\beta$ CD e HP $\beta$ CD.	67
Figura 3.2.22	Energía libre ( $\Delta G^\circ$ ), entalpía ( $\Delta H^\circ$ ) y entropía ( $-T\Delta S^\circ$ ) para los complejos de inclusión de morina con $\beta$ CD, DM $\beta$ CD e HP $\beta$ CD a 25°C.	69
Figura 3.3.1	Espectro $^1\text{H}$ -RMN de catequina en $\text{D}_2\text{O}$ .	70
Figura 3.3.2	Espectro $^1\text{H}$ -RMN de la parte aromática de CA, CA- $\beta$ CD, CA-HP $\beta$ CD, CA-DM $\beta$ CD y CA-SBE $\beta$ CD.	72
Figura 3.3.3	Espectro $^1\text{H}$ -RMN del complejo CA- $\beta$ CD y de $\beta$ CD.	73
Figura 3.3.4	Espectro $^1\text{H}$ -RMN de HP $\beta$ CD y del complejo CA-HP $\beta$ CD.	74
Figura 3.3.5	Espectro HSQC para la HP $\beta$ CD, y para el complejo CA-HP $\beta$ CD en $\text{D}_2\text{O}$ a 298 K.	75
Figura 3.3.6	Espectro $^1\text{H}$ -RMN de DM $\beta$ CD y del complejo CA-DM $\beta$ CD.	75
Figura 3.3.7	Espectro HSQC de DM $\beta$ CD y del complejo CA-DM $\beta$ CD en $\text{D}_2\text{O}$ a 298 K.	76
Figura 3.3.8	Región alifática del espectro $^1\text{H}$ -RMN de SBE $\beta$ CD y del complejo CA- SBE $\beta$ CD.	77
Figura 3.3.9	Gráfico de Job obtenido a partir de los desplazamientos de los protones de la catequina (A) y de los protones de la ciclodextrina (B).	78
Figura 3.3.10	Gráfico de Job obtenido a partir de los desplazamientos de los protones de la catequina del complejo CA-HP $\beta$ CD (A) y del complejo CA- SBE $\beta$ CD (B)	78
Figura 3.3.11	Gráfico de Job obtenido a partir de los desplazamientos de los protones de la catequina al formar el complejo con DM $\beta$ CD.	79
Figura 3.3.12	Región del espectro ROESY del complejo CA- $\beta$ CD.	81
Figura 3.3.13	Esquema de inclusión de catequina en (A) $\beta$ CD y (B) HP $\beta$ CD, DM $\beta$ CD.	82

Figura 3.3.14	Región del espectro ROESY del complejo CA-HP $\beta$ CD	83
Figura 3.3.15	Región del espectro ROESY del complejo CA-DM $\beta$ CD	84
Figura 3.3.16	Región del espectro ROESY del complejo CA-SBE $\beta$ CD	84
Figura 3.3.17	Complejos de inclusión de CA con (A) $\beta$ CD y con (B) DM $\beta$ CD a partir de estudios de docking.	85
Figura 3.3.18	Plano formado por los oxígenos glicosídicos de la $\beta$ -ciclodextrina.	86
Figura 3.3.19	Disminución de la señal REE correspondiente al DPPH de la catequina libre y acomplejada con las diferentes CDs.	87
Figura 3.3.20	$T_{eq}$ de catequina y sus complejos con las diferentes ciclodextrinas.	90
Figura 3.4.1	Espectro $^1\text{H}$ -RMN de galangina en MeOD	91
Figura 3.4.2	Espectros de absorción de galangina a diferentes concentraciones de $\beta$ CD.	92
Figura 3.4.3	Gráfico de concentración de ciclodextrina ( $\beta$ CD, HP $\beta$ CD, SBE $\beta$ CD y DM $\beta$ CD) en función de galangina disuelta.	93
Figura 3.4.4	Sección del espectro ROESY del complejo G-DM $\beta$ CD.	94
Figura 3.4.5	Esquema de inclusión de galangina en (A) DM $\beta$ CD y (B) en HP $\beta$ CD.	95
Figura 3.4.6	Sección del espectro ROESY del complejo G-HP $\beta$ CD y espectro HSQC del complejo G-HP $\beta$ CD.	95
Figura 3.4.7	Complejo de inclusión de G- $\beta$ CD a partir de estudios de docking	96

## RESUMEN

En esta tesis se estudiaron las características fisicoquímicas de los complejos de inclusión de cuatro flavonoides, quercetina, morina, catequina y galangina con diferentes ciclodextrinas, ( $\beta$ ciclodextrina, 2-hidroxipropil- $\beta$ ciclodextrina, sulfobutileter- $\beta$ ciclodextrina y 2,6-dimetil- $\beta$ ciclodextrina.) Dicho estudio mostró que la formación de los complejos de inclusión aumentó la solubilidad de los flavonoides en solución acuosa.

Se determinaron las constantes de asociación  $K_a$  por la metodología de Solubilidad de Fase y por RMN, DOSY, existiendo una concordancia entre ambas metodologías.

Los espectros ROESY, obtenidos para casi todos los complejos estudiados nos permitieron estimar su geometría de inclusión. Estas geometrías obtenidas experimentalmente, nos demostraron que la inclusión para cada uno de los flavonoides con las diferentes ciclodextrinas se comporta como un caso especial. La inclusión de la morina en la  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, es con el anillo B sobresaliendo del lado angosto de la ciclodextrina, mientras que para la DM $\beta$ CD el anillo B se encuentra por el lado de los hidroxilos secundarios. Diferente es lo observado para la catequina, pues ésta se encuentra incluida en la  $\beta$ CD con el anillo B sobresaliendo por el lado de los hidroxilos primarios, mientras que para la HP $\beta$ CD y DM $\beta$ CD, el anillo B se encuentra orientado hacia el lado ancho de la ciclodextrina. Finalmente la galangina, siempre se incluye por el anillo B, dejando a la cromona expuesta. Pero, en un caso se encuentra incluida por el lado ancho de la ciclodextrina, es el caso de la DM $\beta$ CD, y en el otro, por el lado angosto de la ciclodextrina, que es el caso de la HP $\beta$ CD.

Las geometrías de inclusión obtenidas por modelación molecular son totalmente concordantes con los resultados experimentales. Sin embargo, no se observa relación alguna entre geometría de inclusión y constante de asociación de los complejos formados.

Finalmente, los complejos mantuvieron o aumentaron su capacidad antioxidante, esto, junto con el aumento considerable de solubilidad, tienen especial importancia en la biodisponibilidad de los antioxidantes, lo cual lo hace un blanco novedoso para el desarrollo de nuevos antioxidantes naturales con mejores propiedades para el uso comercial de estos.



## SUMMARY

This thesis studied the physicochemical properties of inclusion complexes of four flavonoids named quercetin, morin, catechin and galangin, with different cyclodextrins, ( $\beta$ -cyclodextrin, 2 hydroxipropil- $\beta$ -cyclodextrin, sulfobuthylether- $\beta$ -cyclodextrin and 2,6 dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin).

The study showed that the formation of the inclusion complexes incremented the solubility of the flavonoids.

The stability constants obtained by phase solubility methods and by NMR (DOSY experiments) agreed between both methodologies.

The ROESY spectra obtained for almost all the inclusion complexes, allowed us to estimate the inclusion geometry. The experimental results demonstrated that each flavonoid has a own special inclusion geometry with the different cyclodextrins. Morin is included in the  $\beta$ CD and HP $\beta$ CD cavity with the B-ring oriented to the primary hydroxyl, while with DM $\beta$ CD, the B-ring are oriented to the secondary hydroxyl. Catechin has somehow different inclusion geometry only for  $\beta$ CD, the B-ring is oriented toward the primary rim, while HP $\beta$ CD and DM $\beta$ CD, the B-ring is oriented to the secondary rim, resulting in a complex where CA is located in opposite direction with respect to the previous CA- $\beta$ CD complex. Finally, galangin always is included by the B-ring and the A and C-ring are exposed to the outside. However, for DM $\beta$ CD is included by the secondary rim and for HP $\beta$ CD is included by the primary rim.

The inclusion geometries obtained by molecular modeling are in agreement with the experimental results. Nevertheless, there is no relation between inclusion geometry and association constant.

Finally, the inclusion complexes remain or increase their antioxidant activity besides they considerable increase of solubility. This has special importance in the bioavailability of the flavonoid, which it does a target for the development of new natural antioxidant with better properties for commercial use.

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

Uno de los avances dentro de la industria química ha sido el empleo de ciclodextrinas como agentes encapsulantes, para transportar todo tipo de ingredientes activos como fármacos<sup>1</sup>, cosméticos, saborizantes, vitaminas<sup>2</sup>; así también como desechos industriales<sup>3</sup> y compuestos tóxicos<sup>4,5,6</sup> entre otras muchas aplicaciones, ya que las ciclodextrinas pueden formar mezclas o complejos de gran estabilidad química con mayor solubilidad en el agua. Las ciclodextrinas sirven también para liberar en forma controlada ingredientes activos de medicamentos. El principal propósito del sistema de liberación controlada de fármacos es dosificar la cantidad de fármaco necesaria en el lugar específico durante un periodo de tiempo controlado de forma precisa y efectiva. Para diseñar medicamentos de alto rendimiento, se utilizan portadores compatibles con los fármacos para enmascarar las propiedades no deseables del fármaco, por lo que se ha buscado desarrollar varios tipos de biomateriales de alto rendimiento que se puedan mezclar con los fármacos y liberarlos en forma controlada<sup>7</sup>. Las ciclodextrinas son candidatos potenciales para este rol debido a su habilidad de alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas de la molécula huésped a través de la formación del complejo de inclusión. Los factores principales que están involucrados en la formación del complejo son las fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y efectos estéricos. La constante de asociación es el resultado de todas estas

---

<sup>1</sup> Nagai, T.; Ueda, H., *Comprehensive Supramolecular Chemistry: Cyclodextrins*, 1996, 3, 441-449, Szejtli, J.; Osa, T., Atwood, L.; Davies, D.; Macnicol, D.; Vögtle, F., Lehn, J.-M., Ed. Pergamon Press, New York.

<sup>2</sup> Hedges, A.R. 1998, *Chem. Rev.*, 98, 2035-2044.

<sup>3</sup> Olah, J.; Cserháti, T.; Szejtli, J., 1988, *Wat. Res.* 22, 1345-1351.

<sup>4</sup> Pospisil, L.; Colombini, M.P., 1993, *J. Incl. Phenom. Molec. Rec. Chem.*, 16, 255-266.

<sup>5</sup> Leyva, E.; Moctezuma, E.; Monreal, E.; Beltrán, J., 2002, *Educ. Quím.* 13, 2, 82-84.

<sup>6</sup> Leyva, E.; Moctezuma E.; Strouse, J.; García-Garibay, M., 2001, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* 39, 41-46.

<sup>7</sup> Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T., 1998, *Chem. Rev.*, 98, 2045-2076.

interacciones<sup>8,9,10,11,12</sup>. Las ciclodextrinas (figura 1.1) son oligómeros cíclicos que contienen varias unidades de glucosa unidas por medio de enlaces  $\alpha(1-4)$  conformando un anillo<sup>13,14</sup>. Las ciclodextrinas se forman por la acción de ciertas enzimas sobre la molécula del almidón. Las moléculas de ciclodextrina tienen un extremo que contiene grupos hidroxilo primarios, en el otro extremo grupos hidroxilos secundarios y en el interior de la cavidad los grupos CH y oxígenos glicosídicos. El extremo con los grupos hidroxilo primarios tiene un diámetro reducido comparado al extremo en donde se encuentran los grupos hidroxilo secundarios. Estos extremos de la ciclodextrina que contienen los grupos hidroxilo son bastante polares, mientras que su interior es relativamente no polar.

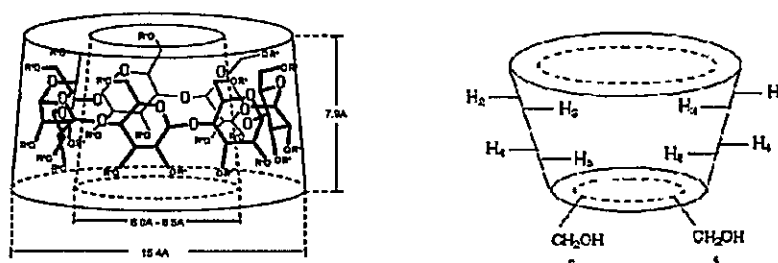


Figura 1.1  
 $\beta$ -ciclodextrina

La solubilidad de los fármacos al complejarse con las CD cambia debido a que los grupos hidrofóbicos de éste, ya no se encuentran en contacto con el solvente sino con los átomos de la cavidad de la CD y por su parte, la superficie externa de las CD es la que interactúa con el solvente. Como resultado, la superficie externa de las CD contribuye a la solubilidad del complejo y no el fármaco en sí. En muchos casos la contribución de la superficie externa de la CD no es suficiente para obtener la solubilidad deseada, por lo

<sup>8</sup> Inoue, Y.; Rekharsky, V.; Mikhail, V. 1998, *Chem. Rev.*, *98*, 1875-1917.

<sup>9</sup> Hirose, K., 2001, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, *39*, 193-209.

<sup>10</sup> Ou-Yang, H.D., Lau, W.; Islam, M.F.; Meyer, E.E. 2000, *Langmuir*, *16*, 5519-5522.

<sup>11</sup> Rekharsky, M.V.; Goldberg, R.N.; Schwartz, F.P.; Tewari, Y.B.; Ross P.D.; Yamashoji Y.; Inoue Y., 1995, *J. Am. Chem. Soc.*, *117*, 8830-8840.

<sup>12</sup> Park, J.H.; Nah, T.H., 1994, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1359-1362.

<sup>13</sup> Szejtli, J., 1998, *Chem. Rev.*, *98*, 1743-1753.

<sup>14</sup> Connors K.A., 1997, *Chem. Rev.*, *97*, 1325-1357.

cual, si se modifican los grupos hidroxilos de la superficie externa de la CD, se puede aumentar la solubilidad en forma drástica. Sustituyendo con grupos neutros, como hidroxipropilo (HP) o un grupo iónico, como carboximetil (CM), aumenta la solubilidad de las CD modificadas en un 60% o mayor en agua<sup>15,16</sup>

Una de las técnicas más utilizadas para el estudio de los complejos ciclodextrina-sustrato en fase líquida ha sido la Resonancia Magnética Nuclear<sup>17</sup>, RMN, ya que permite observar simultáneamente cambios en las señales de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN y/o <sup>13</sup>C-RMN, tanto de la ciclodextrina como del sustrato en estudio. El rango en que aparecen las señales de la ciclodextrina es limitado, evitando así la superposición de las señales y permitir el estudio de ambos compuestos al mismo tiempo. En la estructura de la β-ciclodextrina, sólo los protones 3 y 5 están localizados dentro de la cavidad. El protón 3 forma un anillo cerca de la abertura mayor de la ciclodextrina, mientras que el protón 5 está cerca de la abertura menor. Los protones 6 están situados en la superficie superior y los protones 1,2 y 4 están en el exterior, figura 1.1.

Una vez que el complejo de inclusión se ha formado, se observa un corrimiento de las señales de <sup>1</sup>H-RMN tanto para la ciclodextrina como para el sustrato. En solución acuosa, la cavidad apolar de la ciclodextrina es ocupada por moléculas de agua las cuales están energéticamente desfavorecidas, por tanto, pueden ser fácilmente sustituidas por moléculas menos polares. El complejo de inclusión formado, está en equilibrio con la especie no asociada, lo que se puede describir en términos de la constante de asociación,  $K_a$ , que está dado por las siguientes ecuaciones:



$$K_a = \frac{[C]}{[CD]^a [S]^b} \quad 1.2$$

<sup>15</sup> Hedges A.R. 1998, Chem. Rev. 98, 2035-2044

<sup>16</sup> Lofsson T., Masson M., 2001, Int. J. Pharm. 225, 15-30

<sup>17</sup> Chankvetadze et al., 1998, J. Chromatogr. A, 798, 315-323

Con CD = ciclodextrina, S = sustrato, C = complejo formado y  $a,b$  la estequiometría del complejo.

Como consecuencia de la inclusión, el microentorno de los átomos de hidrógeno de la ciclodextrina dentro de la cavidad se modifica, produciendo una variación en el desplazamiento químico observado en el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de la ciclodextrina, permitiendo la estimación de la constante de asociación  $K_a$ <sup>18,19</sup> Existen innumerables estudios de diversas especies que se han incluido en ciclodextrinas, donde las interacciones de los complejos son estudiados por RMN<sup>20,21</sup>. Entre ellos, Iaconinoto et al.<sup>22</sup>, buscando un método alternativo para aumentar la estabilidad de  $\alpha$ -tocoferoles, los incluyó en diferentes ciclodextrinas,  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta\text{CD}$ ), hidroxipropil- $\beta\text{CD}$  (HP- $\beta\text{CD}$ ) e hidroxipropil- $\gamma\text{CD}$  (HP- $\gamma\text{CD}$ ), esperando mayor estabilidad frente a la fotodegradación.

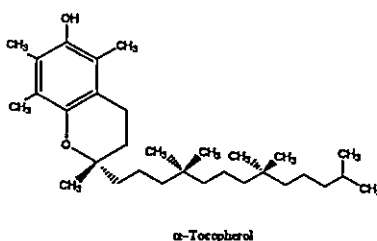


Figura 1.2  
Estructura  $\alpha$ -tocoferol

Además se estudió la actividad antioxidante de los complejos de inclusión utilizando el sistema enzimático xantina/xantina oxidasa, y se concluyó que los complejos de inclusión con  $\alpha$ -tocoferol son una buena estrategia para mejorar las características fisicoquímicas. Sin embargo, la actividad atrapadora de radicales libres no sufrió

<sup>18</sup> Loukas Y., 1997, J. Pharm. Pharmacol. 49, 944-948.

<sup>19</sup> Fielding, L., 2000, Tetrahedron, 56, 6151-6179.

<sup>20</sup> Cameron K.S., Fletcher D., Fielding L. 2002, Magn. Reson. Chem. 40, 251-260.

<sup>21</sup> Echezarreta-Lopez M.M., Perdomo-López I., Estrada E., Vila-Jato J.L. Torres-Labadeira J.J., 2002, J. Pharm. Sci. 91, 1536-1547.

<sup>22</sup> Iaconinoto A., Chicca M., Pinamonti S., Casolari A., Bianchi A., Scalia S., 2004, Pharmazie 59, 30-33.

grandes cambios. Por su parte, Polyakov et al.<sup>23</sup>, estudiaron los complejos de inclusión de ciclodextrina-carotenoide, por <sup>1</sup>H-RMN, espectroscopia de absorción UV-visible e investigaron la reactividad de los complejos de inclusión ante los radicales peroxilos por Resonancia de Espín Electrónico (REE). Cao et al.<sup>24</sup>, estudiaron la inclusión de estireno y  $\alpha$ -Me-estireno en ciclodextrinas nativas, utilizando <sup>1</sup>H-RMN. Además estudiaron el proceso de inclusión por métodos semiempíricos PM3. Obtuvieron gráficos de Energía Potencial (kJ/mol) v/s posición del sustrato en el proceso de inclusión, con lo cual obtuvieron el mínimo de energía para el complejo de inclusión. Con ambos métodos, <sup>1</sup>H-RMN y cálculos mecano-cuánticos, demostraron la penetración del sustrato en la cavidad de la ciclodextrina y que la estabilidad de los complejos es mayor para  $\alpha$ CD >  $\beta$ CD >  $\gamma$ CD. Estos resultados refuerzan la necesidad de seguir estudiando la inclusión de antioxidantes naturales o sintéticos en ciclodextrinas.

Como un ejemplo, los antioxidantes presentes en la manzana son básicamente polifenoles, los cuales incluyen entre otros, ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales se encuentran distribuidos en toda la fruta. 100 gr de manzana fresca tiene una actividad antioxidante equivalente a 1500 mg de vitamina C, junto con esto, los extractos fenólicos de la manzana inhiben la proliferación de cáncer celular, lo que la hace muy importante en nuestra dieta. Además hay datos que indican que el riesgo de ataques al corazón ha disminuido en un 49% en hombres que consumen 110 gr o más de manzana diaria en comparación con aquellos que consumen menos (18gr)<sup>25</sup>. En el último tiempo, el aumento de información respecto a que muchas de las enfermedades relacionadas con la edad, como ser afecciones al corazón, cáncer, artritis, disminución del sistema inmune, disfunción cerebral etc., son el resultado del daño celular debido a radicales libres. Aquí es donde los antioxidantes en nuestra dieta juegan un rol preponderante en la prevención de estas afecciones. Dentro de la familia de los polifenoles, los

<sup>23</sup> Polyakov N.E., Leshina T.V., Konovalova T.A., Hand E.O., Kispert L.D., 2004, Free Radic. Biol. Med. 36, 872-880.

<sup>24</sup> Cao Y., Xiao X., Lu R., Guo Q. 2003, J. Mol. Struct., 660, 73 – 80.

<sup>25</sup> Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., & Kromhout, D. 1993, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. Lancet, 342, 1007±1011.

flavonoides, constituyen una de las clases de antioxidantes ubicados en plantas y contienen varios grupos hidroxilos unidos a sus anillos designados por A, C de la cromona y B del grupo fenilo. (figura 1.3)

Lamentablemente, el consumo de las manzanas, se ve disminuido debido a que una vez pelada la manzana, estas se tornan de color café debido a la oxidación de los polifenoles a quinonas y a una subsiguiente polimerización en productos de color café. Lo cual disminuye el valor comercial y nutricional de los productos relacionados con la manzana. Por lo cual se ha buscado agentes que controlen la oxidación enzimática, como ser derivados de ácido ascórbico, 4-hexilresorcinol y ciclodextrinas entre otros. En base a esto, Álvarez-Parrilla et al.<sup>26</sup>. formaron complejos de algunos polifenoles presentes en la manzana, como ser ácido clorogénico (AC), quercetina (QUE) y rutina (RU = quercetina glicosilada en la posición 3 con glu-rha en posición 3) con  $\beta$ -ciclodextrina. Determinaron sus  $K_a$  por fluorescencia, donde la tendencia es la siguiente:  $K_{QUE-\beta CD} > K_{AC-\beta CD} > K_{RU-\beta CD}$ . Además determinaron la capacidad antioxidante de los polifenoles libres y formando complejo con la ciclodextrina. Esto lo hicieron con la metodología FRAP (ferric reducing antioxidant power), que mide la capacidad reductora del compuesto antioxidante frente a los iones hierro. La habilidad de reducir a los polifenoles sigue la siguiente tendencia:  $QUE > RU > AC$ . Al comparar estas características con la de los complejos formados, se observa un pequeño incremento en la actividad antioxidante especialmente para rutina y ácido clorogénico (alrededor de un 18%). Con lo cual, la formación de complejos además de aumentar la solubilidad y estabilizar los polifenoles, también aumenta su capacidad antioxidante.

---

<sup>26</sup> Álvarez-Parrilla E., De la Rosa L.A., Torres-Rivas F., Rodrigo-García J., González-Aguilar G.A. 2005, J. Incl. Phenom. Macro. Chem. 53, 121-129.



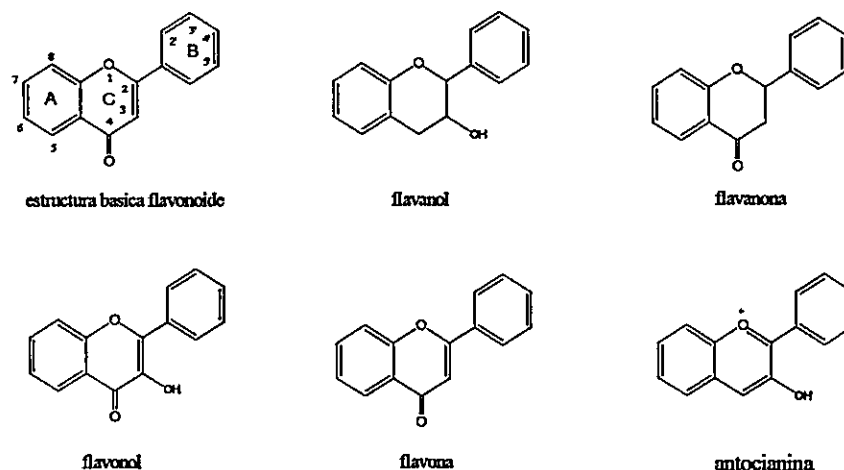


Figura 1.3

Variaciones estructurales de los flavonoides

- Flavonoles (quercetina, kaempferol) con el 3 hidroxy piran-4-ona.
- Flavonas (luteolin, apigenin, crisin ) carente del hidroxilo en posición 3
- Flavanoles ( catequina) carente del doble enlace en 2-3 y de 4-ona.
- Isoflavonas (genisteina) el anillo B se encuentra en la posición 3

El grupo compuesto por Calabrò, Tommasini y Ficarra<sup>27,28,29,30,31,32</sup>, estudiaron los complejos de inclusión de diferentes flavonoles, flavanonas y flavanonas glicosiladas con ciclodextrinas. Para ello utilizaron diferentes técnicas como ser RMN, FT-IR, DSC y rayos X. Los complejos formados fueron en estado sólido y en estado líquido. En todos los casos estudiados, la estequiometría era de 1:1. También estimaron las constantes de asociación  $K_a$  en agua, por el método de solubilidad de fase a diferentes temperaturas, con lo cual determinaron parámetros termodinámicos, indicando que el

<sup>27</sup> Calabrò, M.L., Tommasini, S., Donato P., Raneri D., Stancanelli R., Ficarra P., Ficarra R., Costa C., Catania S., Rustichelli C., Gamberini G. 2004, J. Pharm. Biomed. Anal. 35, 365-377.

<sup>28</sup> Ficarra R., Tommasini S., Raneri D., Calabrò M.L., Di Bella M.R., Rustichelli C., Gamberini M.C., Ficarra P. 2002, J. Pharm. Biomed. Anal. 29, 1005-1014.

<sup>29</sup> Tommasini S., Raneri D., Ficarra R., Calabrò M.L., Stancanelli R., Ficarra P., 2004, J. Pharm. Biomed. Anal. 35, 379-387.

<sup>30</sup> Tommasini S., Calabrò M.L., Raneri D., Ficarra P. Ficarra R., 2004, J. Pharm. Biomed. Anal., 36, 327-333.

<sup>31</sup> Calabrò M.L., Tommasini S., Donato P., Stancanelli R., Raneri D., Catania S., Costa C., Villari V., Ficarra P., y Ficarra R. 2005, J. Pharm. Biomed. Anal., 36, 1019-1027.

<sup>32</sup> Tommasini S., Calabrò M.L., Stancanelli R., Donato P., Costa C., Catania S., Villari V., Ficarra P., y Ficarra R. 2005, J. Pharm. Biomed. Anal., 39, 572-580.

proceso de asociación flavonoide-ciclodextrina es un proceso espontáneo y exotérmico. El efecto de la encapsulación de los diferentes flavonoides dentro de la CD fue estudiado por diferentes ensayos biológicos (test de batofenantrolina, peroxidación lipídica). Concluyeron que la formación de complejos con CD aumenta la actividad antioxidante de los flavonoides utilizados, debido al aumento de su solubilidad en el ambiente biológico.

Pralhad et al.<sup>33</sup> estudiaron la QUE en  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, tanto en estado sólido como en solución. Determinaron una estequiometría de 1:1 para ambos complejos. Las  $K_a$  obtenidas por el método de solubilidad de fase son de  $402 \text{ M}^{-1}$  y  $532 \text{ M}^{-1}$  para  $\beta$ -CD e HP $\beta$ CD respectivamente. Observaron que la formación de los complejos con ciclodextrina aumenta más de 10 veces la solubilidad de la QUE, siendo aun mayor para el complejo con HP $\beta$ CD.

Zheng et al.<sup>34</sup>, estudiaron los complejos de QUE con diferentes ciclodextrinas ( $\beta$ -, HP $\beta$ - y SBE $\beta$ CD). Determinaron sus  $K_a$  por la metodología de solubilidad de fase a pH 3 y a diferentes temperaturas, obteniendo de esta forma datos termodinámicos. Observaron también un aumento de la solubilidad de la quercetina a medida que la ciclodextrina aumenta la cadena sustituida. Siguiendo la misma tendencia que la observada por Pralhad et al.<sup>33</sup> en las  $K_a$  : SBE $\beta$ CD > HP $\beta$ CD >  $\beta$ CD. Indicando que las CD sustituidas con grupos butilos y propilos proveen mayor superficie de interacción, lo que provoca una mayor afinidad por estas que por la CD nativa. En los estudios hechos por RMN, concluyeron que la inclusión de la quercetina es por el anillo B, debido a que el protón H-6 del anillo A es el que tiene menor desplazamiento químico en comparación con los otros. Las  $K_a$  obtenidas por esta metodología siguen la misma tendencia que la obtenida por solubilidad de fase, pero al utilizar DMSO como co-solvente para solubilizar la quercetina, los valores obtenidos de las  $K_a$  son prácticamente 20 veces menor. Respecto a estudios de Dinámica Molecular, los resultados indican que la inclusión de quercetina

<sup>33</sup> Parlhad T., Rajendrakumar K., 2004 J. Pharm. Biomed. Anal., 34, 333-339.

<sup>34</sup> Zheng Y., Haworth I.S., Zuo Z., Chow M.S.S., Chow A.H.L., 2005, J. Pharm. Sci., 94, 1079-1089.

sería por el anillo B ubicándose en el centro de la ciclodextrina. En este estudio se desplazó el anillo B de la quercetina, por el eje x y se buscó el mínimo de energía. Los resultados estuvieron de acuerdo por lo encontrado por RMN, donde sólo el anillo B se encuentra inserto en la cavidad de la  $\beta$ CD, mientras que todos los hidroxilos del flavonoide se encuentran fuera de la cavidad hidrofóbica. Tomando éstos resultados, Yan et al<sup>35</sup>, hicieron un estudio mecánico-cuántico del complejo QUE- $\beta$ CD, en base a los resultados experimentales obtenidos por Zheng<sup>34</sup>. Incluyeron el anillo B de la quercetina tanto por el extremo de los hidroxilos primarios como secundarios. El centro del eje cartesiano lo ubicaron en el plano formado por los oxígenos glicosídicos. Desplazaron a la quercetina por el eje z cada 1 Å, y optimizaron el complejo por PM3 sin restricciones. La energía de estabilización  $\Delta E$  del complejo entre la quercetina y la CD la calcularon para el mínimo de energía de acuerdo a:

$$\Delta E = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{sustrato}} + E_{\beta\text{-CD}})$$

donde  $E_{\text{complejo}}$ ,  $E_{\text{sustrato}}$  y  $E_{\beta\text{-CD}}$  representan las energías HF del complejo, sustrato libre y de la  $\beta$ -CD.

Al incluir la quercetina por el sitio primario de los hidroxilos, ésta entra totalmente en la cavidad de la CD de modo que el grupo OH de la quercetina de la posición 7 (anillo A) se encuentra cercano al OH 6 de la CD (hidroxilos primarios) de modo que la interacción por puente de hidrogeno estabiliza al complejo. Este tipo de interacción no se observa cuando se incluye la quercetina por los hidroxilos secundarios. Lo cual concuerda con RMN y Dinámica Molecular, que el anillo B de la quercetina se encuentra cercano al los hidroxilos secundarios de la  $\beta$ CD.

Wang et al.<sup>36</sup> estudiaron los complejos de quercetina y morina con seis diferentes CDs, las naturales  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ CD y además HP, ME y CM $\beta$ CD por cromatografía reversa en capa fina en buffer  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{NH}_4\text{Cl}$  pH 9.7. No observaron inclusión con la  $\alpha$ CD ni

<sup>35</sup> Yan C., Li X., Xiu Z., Hao C. 2006, J. Mol. Struct. Theo., 764, 95 -100.

<sup>36</sup> Wang X., Pan J., Shuang S. 2001, Anal. Lett., 34, 239-245

con la CM $\beta$ CD, mientras que las constantes de formación de los otros complejos determinados con esta técnica, tanto para la quercetina como la morina tienen la siguiente tendencia:  $K_{HP\beta CD} > K_{ME\beta CD} > K_{\beta CD} > K_{\gamma CD}$ . A pesar que la cavidad de la  $\gamma$ CD es mayor que la de la  $\beta$ CD, esta última tiene una constante de formación mayor indicando que las interacciones son más fuertes. Las constantes de formación de los complejos de inclusión de la quercetina con las diferentes ciclodextrinas son mucho mayores que las de la morina. Con lo cual concluyeron que el anillo B es el que se incluye dentro de la ciclodextrina ya que la única diferencia que tienen ambos flavonoides es que uno tiene al grupo catecol mientras que el otro tiene un grupo resorcinol.

Otra técnica utilizada en los estudios de complejos de inclusión, es la espectrometría de masa, Guo et al.<sup>37</sup> utilizando espectrometría de masa con ionización de electrospray, ESI-MS, estudiaron los complejos de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ CD con quercetina y rutina. Utilizando diagramas de solubilidad de fase, confirman el aumento de solubilidad del flavonoide con el aumento de la concentración de la CD, determinan la estequiometría 1:1 a 25°C en la porción lineal del diagrama y obtienen las constantes de asociación para cada una de las ciclodextrinas. Con los espectros obtenidos por ESI-MS, concluyen que la rutina se incluye a la CD por el flavonol, ya que hay un fragmento que indica la presencia de la quercetina, indicando entonces la inclusión por esa parte a la CD. Por otra parte, es interesante recalcar que el complejo de inclusión se mantuvo durante la transferencia de solución a vacío, sugiriendo que las fuerzas de unión entre el sustrato y CD están dadas entonces por interacciones van der Waals y enlaces de hidrógeno, ya que las interacciones hidrofóbicas desaparecen en el vacío.

Por su parte, Shuang et al.<sup>38</sup> estudiaron rutina con tres diferentes ciclodextrinas,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD y además con HP $\beta$ CD por fluorescencia. Claramente observan una mejor inclusión de la rutina en HP $\beta$ CD con respecto a las ciclodextrinas nativas.

<sup>37</sup> Guo M., Song F., Liu Z., Liu S. 2004, J. Mass Spectrom., 39, 594-599

<sup>38</sup> Shuang S.M., Pan J.H., Guo S.Y., Cai M.Y., Liu C.S. 1997, Anal. Lett., 30, 2261-2270

Haiyun et al.<sup>39</sup> prepararon complejos de inclusión de  $\beta$ -ciclodextrina con rutina por el método de coprecipitación. Confirmaron la inclusión por diferentes métodos, entre ellos fluorescencia, IR, DSC. La constante de asociación  $K_a$  la determinaron por fluorescencia estacionaria obteniendo un valor de  $265 \text{ M}^{-1}$ . La configuración espacial del complejo fue propuesta en base a los espectros de RMN y modelación molecular. Observaron un desplazamiento significativo a campo alto del protón H5 de la CD, mientras que el desplazamiento del H3 es bastante menor. Los hidrógenos H2' y H6' que corresponden al anillo B de la rutina son los que presentan un mayor desplazamiento respecto a los de la rutina sin incluir, y el NOESY indica correlación espacial entre los hidrógenos H2' y H6' con el H5 de la ciclodextrina. Lo que indica que la inclusión de la rutina es por el lado angosto de la CD. Los estudios de modelación molecular se hicieron con CS Chem3D Pro7 de Cambridge Soft Corporation. Se hicieron cuatro estudios incluyendo el anillo B de la rutina por el lado angosto de la CD, el anillo B por el lado ancho de la CD, la cromona por el lado angosto de la CD y la cromona por el lado ancho de la CD. Observaron que la menor energía corresponde a la de la inclusión del anillo B por el lado angosto de la CD que está totalmente de acuerdo con los estudios hechos con 2D-RMN.

La flavanona naringin, que corresponde a la naringenina glicosilada, es uno de los mayores constituyentes de los jugos de uva, encontrándose también en ciertos tipos de naranjas. El sabor amargo que presentan estos jugos, se le atribuye al alto nivel de flavanona. Con lo cual, a los jugos, se les ha agregado ciclodextrinas que forman complejos de inclusión con la naringin, reduciendo el amargor. En base a esto, Colquhoun et al.<sup>40</sup> estudiaron la inclusión de naringin y naringenina con  $\beta$ -ciclodextrina por  $^1\text{H}$ -RMN. Como la  $\beta$ CD es una molécula quiral, al incluir diasterómeros, los complejos formados tendrán diferentes  $K_a$ . Esto, es la base que permite separar enantiomeros o diasterómeros por cromatografía utilizando las CD en la fase móvil o

<sup>39</sup> Haiyun D., Jianbin C., Guomei Z., Shaomin S. and Jinhao P. 2003, Spectrochim. Acta Part A, 59, 3421-3429.

<sup>40</sup> Colquhoun IJ., Goodfellow B.J. 1994, J Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 8, 1803-1807.

estacionaria. En este estudio, se observó que uno de los diastereoisómeros de la naringin se incluyó con una constante de asociación casi 2 veces más que la otra. La inclusión ocurre por el anillo B, siendo el disacárido un factor importante en el reconocimiento quiral de esta flavanona, pues el desplazamiento no equivalente de la naringenina-glicosilada es mayor que el de la aglicona.

La catequina (CA) pertenece a la familia de las flavanonas. Esta es más soluble que los flavanoles, pero la catequina también es amarga y fácilmente oxidable. Esto le dificulta su uso como aditivo natural en las comidas o sencillamente en su uso medicinal. Por ello, Smith et al.<sup>41</sup> incluyeron CA en ciclodextrinas nativas, obteniendo mejores resultados con la  $\beta$ -ciclodextrina. Los estudios los hicieron por UV-Vis, RMN y Dicroísmo Circular. Los resultados por UV-Vis indicaron que para la  $\alpha$ - y  $\gamma$ CD la disminución y/o desplazamiento del máximo al agregar ciclodextrina no es concluyente para confirmar inclusión. Mientras que por dicroísmo circular, solo se obtuvo la  $K_a$  para la  $\beta$ -ciclodextrina ( $8700M^{-1}$ ), pues para la  $\alpha$ - y  $\gamma$ CD aparentemente la estequiometría no eran de 1:1 no permitiendo calcular la  $K_a$  por esta metodología. Por lo tanto, solo se estudió el complejo CA- $\beta$ CD por RMN, determinando que el anillo A de la CA es el que se incluye haciéndolo por los hidroxilos secundarios de la  $\beta$ -ciclodextrina. Por otra parte, Ishizu et al.<sup>42</sup> estudiaron el complejo de los isómeros, CA y epicatequina (EPI) con  $\beta$ -ciclodextrina por RMN. En el espectro  $^1H$ -RMN de ambos isómeros, se observa que cuando se encuentra la CA incluida, las señales se ensanchan debido a una mayor rigidez de la CA en el interior de la CD. Mientras que para la EPI, las señales solo se desplazan por efecto de la inclusión, manteniendo la EPI una menor rigidez en el interior. Las  $K_a$  de ambos isómeros se estimaron siguiendo el H-8 del flavanol, obteniendo valores de  $2209 M^{-1}$  para CA y  $1212 M^{-1}$  para EPI. Como observaron señales de correlación en el ROESY correspondientes a la interacción entre los H-2', H-5' y H-6' de la CA con el H-5 de la ciclodextrina, infieren que el anillo B de la CA se encuentra incluida por el lado secundario de la CD. Lo cual está totalmente de acuerdo a

<sup>41</sup> Smith VK., Ndou TT., Warner IM. 1994, J. Phys. Chem. 98, 8627-8631.

<sup>42</sup> Ishizu T., Kintsu K., Yamamoto H. 1999, J. Phys. Chem. B, 103, 8992-8997.

los desplazamientos observados a campo alto tanto de la CD como de los protones aromáticos del anillo B. Por otra parte, la EPI presenta interacciones dipolares prácticamente para todos sus hidrógenos con el H-5 de la CD. Indicando dos posibles geometrías, una cuando el anillo B se encuentra incluido cercano al H-5, y la otra cuando el anillo A se encuentra cercano al H-5. Debido a las ambigüedades obtenidas con respecto a la inclusión de CA en  $\beta$ CD, Križ et al.<sup>43</sup> determinaron las  $K_a$  tanto por RMN como por microcalorimetría, obteniendo un total acuerdo entre ambas técnicas como también en los resultados de Smith et al.<sup>41</sup> por dicroísmo circular. Respecto a la geometría de la CA, observaron interacción dipolar en los t-ROESY entre los protones del anillo B y algunos de los protones del anillo C con los H-3 y H-5 de la CD, no observándose interacción con el anillo A, lo que respalda la conclusión de que el anillo B se encuentra insertado en la cavidad hidrofóbica de la CD. Los datos experimentales obtenidos por RMN, tienen una concordancia con las diferentes orientaciones obtenidas por docking; el anillo B se encuentra en la cavidad de la CD, mientras que el anillo A tiene solo un pequeño contacto con el exterior de la CD.

De acuerdo a los antecedentes descritos anteriormente, los estudios de inclusión de flavonoides en ciclodextrinas son pocos y las técnicas utilizadas han sido muy variadas. De acuerdo a esto, se propone en esta tesis, confirmar la inclusión de los flavonoides, quercetina, morina, galangina y catequina (figura 1.4) en diferentes ciclodextrinas, determinar sus constantes de asociación  $K_a$ , y su geometría de inclusión. Se determinará además la capacidad antioxidante de los complejos formados. Se estudiarán también las interacciones de los flavonoides en la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina a nivel *ab-initio* B3LYP, lo que permitirá describir la naturaleza de las interacciones presentes.

---

<sup>43</sup> Križ Z., Koča J., Imberty A., Charlot A., Auzély-Velty R. 2003, Org. Biomol. Chem. 1, 2590-2595.

## 1.1 HIPOTESIS

De acuerdo a los antecedentes presentados se plantea como hipótesis:

El uso terapéutico de los flavonoides está limitado por su baja solubilidad en solución acuosa. Debido al carácter apolar de estos compuestos y de la presencia de anillos aromáticos en su estructura, estos constituirían un buen sustrato para la encapsulación en las ciclodextrinas, mejorando sus propiedades fisicoquímicas y solubilidad.

De esta forma un aumento de la solubilidad podría eventualmente provocar una mejora en la capacidad antioxidante.

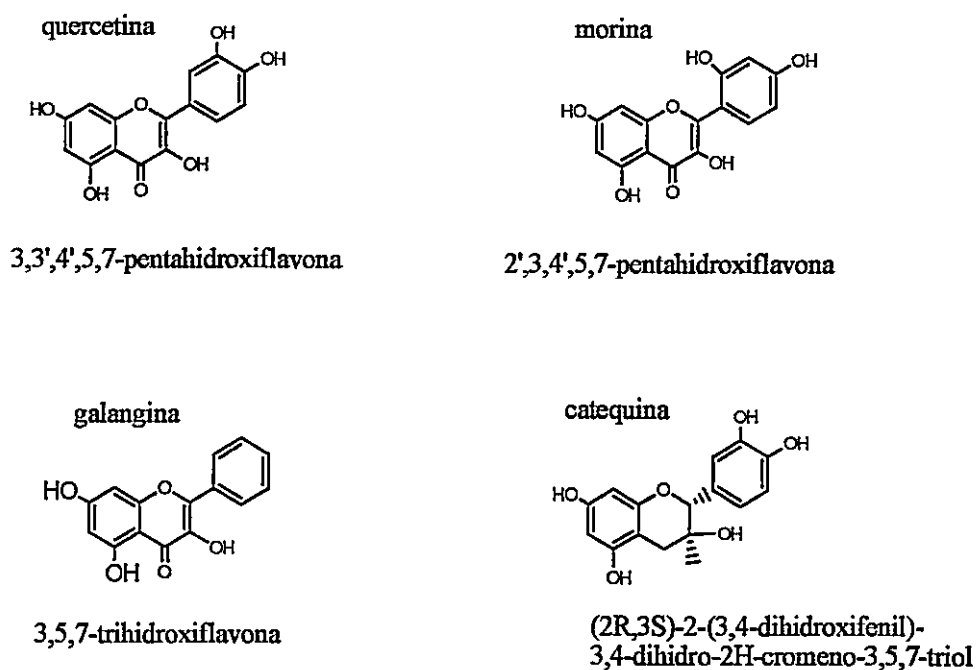


Figura 1.4  
quercetina (QUE), morina (M), galangina (G) y catequina (CA)



## **1.2 OBJETIVOS GENERALES**

- Formación y evaluación de los complejos de inclusión de los flavonoides con las diferentes ciclodextrinas
- Relacionar la geometría de inclusión con la actividad antioxidante de los complejos formados

## **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

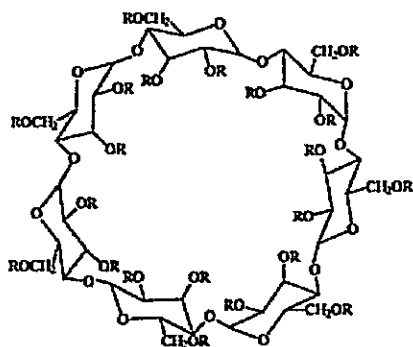
- Generar los complejos de inclusión con las diferentes ciclodextrinas.
- Determinar la constante de asociación de los complejos formados a través de diferentes metodologías.
- Determinar la geometría de inclusión utilizando la espectroscopia de RMN
- Determinar la capacidad antioxidante de los complejos formados y de los flavonoides libres a través de las técnica ORAC y REE.
- Racionalizar los resultados experimentales con los resultados obtenidos por Dinámica Molecular.

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 REACTIVOS

Los reactivos quercetina (QUE) (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona), morina (M) (3, 2', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona), catequina (CA) ((2R,3S)-2-(3,4-dihydroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-triol), galangina (G) (3, 5, 7-trihidroxi flavona),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), 2-hidroxi propil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD [M.S. (average molar degree of substitution) = 1.0]), Heptakis(2,6-Di-*O*-Methyl)- $\beta$ -ciclodextrin (DM $\beta$ CD), DPPH (2,2-Di(4-*tert*-octilfenil)-1-picrilhidrazil), Galvinoxyl (2,6-Di-*tert*-butyl- $\alpha$ -(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-*p*-toloxo), fluoresceína (FL), (acido 2-(3-hidroxi-6-oxo-6H-xanten-9-il)benzoico), TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ABAP (2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)), agua deuterada D<sub>2</sub>O, metanol deuterado MeOD, fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich. SBE- $\beta$ CD [T.D.S. (total degree of substitution) = 6-7; Captisol<sup>®</sup>] fue adquirido de CyDex Inc. El resto de los solventes utilizados son p.A.



$\beta$ -ciclodextrina, R = H

2-Hidroxi propil  $\beta$ -ciclodextrina, R = CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>3</sub> or H

Heptakis (2,6 *O* di metil)  $\beta$ -ciclodextrina, R<sub>2,6</sub> = CH<sub>3</sub> R<sub>3</sub> = H

Sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina, R = CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na or H

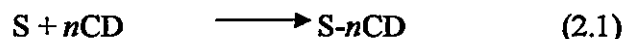
## 2.2 METODOLOGÍAS

### 2.2.1.-PREPARACION DE LOS COMPLEJOS

Se prepararon los complejos con razones molares de 1:1, en agua deuterada ( $D_2O$ ). Se agitaron durante 24 hrs. a temperatura controlada,  $30^\circ C$ . Se filtraron con filtros Millex-GV con membrana Durapore de  $0.45\mu m$  y se les registraron los espectros correspondientes. Los espectros de RMN fueron registrados en un equipo Bruker AVANCE DRX300 que opera a 300.13 MHz para protones y de 75.43 MHz para carbono.

### 2.2.2.-DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA DEL COMPLEJO

La formación del complejo de inclusión entre el sustrato y ciclodextrina se confirma con la diferencia de desplazamientos químicos antes y después de la inclusión. La formación del complejo de inclusión para un sustrato S con ciclodextrina en particular queda descrita por la siguiente ecuación:



La estequiometría de los complejos se determinó por el método de variación continua, Job plot<sup>1</sup>. Se prepararon los complejos con razones molares,  $r$ , desde 0,1 a 0,9 y manteniendo la concentración total constante, 3mM.

A partir de los corrimientos de las señales en los espectros de protones, ya sea de los flavonoides o de la ciclodextrina, se obtienen las gráficas de  $\Delta\delta_{obs} \times [M]$  v/s  $r$ , donde M corresponde a la concentración del flavonoide o la ciclodextrina y la estequiometría del complejo ( $n$ ), estará dada para el valor máximo de  $r$ , con  $r = (n + 1)^{-1}$ .

<sup>1</sup> Job P., 1928, Ann Chim., 9, 113

## 2.2.3.-DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN

### 2.2.3.1.- Diffusion Ordered Spectroscopy<sup>2</sup>, DOSY

Una de las aplicaciones de RMN, es la determinación de sus constantes de asociación  $K_a$  para complejos de inclusión utilizando los desplazamientos químicos.<sup>3</sup> Últimamente ha habido mucho interés en el uso de métodos de gradientes de pulso que provee información sobre  $K_a$  vía coeficientes de difusión molecular.<sup>4,5</sup> Se sabe que el coeficiente de difusión ( $D$ ) depende del tamaño de la molécula:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (2.2)$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad y  $r$  es el radio de la molécula.

Los factores que afectan el coeficiente de difusión son:

- Forma molecular
- Tamaño molecular
- Viscosidad del solvente
- Propiedades de solución, como concentración salina, pH, temperatura...

La espectroscopia de RMN con gradientes de campo, puede ser utilizada para medir la difusión traslacional de moléculas refiriéndose como a una imagen espacial. Para ello se aplican gradientes de campo, los cuales codifican la posición de cada espín nuclear. Esta distribución espacial puede ser decodificada después de un pequeño lapso de tiempo al aplicar nuevamente un segundo gradiente de campo. Si el tiempo de espera es muy

<sup>2</sup> Mayzel O. Y Cohen Y., 1994, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1901-1902.

<sup>3</sup> Fielding L., 2000, Tetrahedron, 56, 6151.

<sup>4</sup> Cameron K., Fielding L., 2001, J Org. Chem. 66, 6891.

<sup>5</sup> Laverde Jr. A., da Conceição G.J.A., Queiroz S.C.N., Fujiwara F. Y., Marsaioli A.J., 2002, Magn. Res. Chem. 40, 433.

pequeño, los espines no cambiarán de posición y la magnetización se reenfocherà sin un cambio neto de fase. Sin embargo, si los espines se han desplazado durante el tiempo de espera entre codificar y decodificar, habrá un cambio de neto de fase. La sumatoria de las fases acumuladas en toda la muestra, se traducirá a una disminución de la magnetización, por ende a una atenuación de la señal de RMN. Esta disminución de la señal de RMN es dependiente de la fuerza del gradiente, del tiempo entre gradientes (tiempo de difusión), y del coeficiente de difusión de las moléculas en estudio.

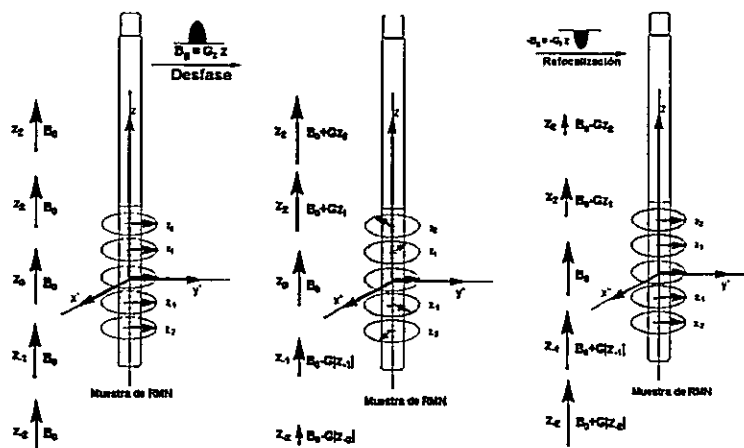


Figura 2.1  
Diagrama de gradientes de campo aplicados a una muestra

El cambio de intensidad de las señales está descrito por:

$$A = A_0 \exp(-D g^2 \gamma^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)) \quad (2.3)$$

donde:

A es la intensidad del pico

$A_0$  es el pico de mayor intensidad, el inicial.

D es el coeficiente de difusión traslacional ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

$\gamma$  es la razón magnetogirica ( $2.675197 \cdot 10^4 \text{G}^{-1} \text{s}^{-1}$  para  $^1\text{H}$ )

$\delta$  es la duración del gradiente

$\Delta$  es el tiempo de difusión (tiempo entre gradientes)

g es la fuerza del gradiente ( $\text{G}/\text{cm}$ ) ( $G = 53,5 \text{G}/\text{cm}$  100%)

El coeficiente de difusión  $D$  es medido registrando una serie de espectros de RMN en donde la fuerza del gradiente  $g$  es progresivamente incrementada en cada experimento.

Los datos son graficados de acuerdo a:

$$-\ln(A/A_0) = g^2 \gamma^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D \quad (2.4)$$

Se grafica  $-\ln(A/A_0)$  en función de  $B$ , donde  $B = g^2 \gamma^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$  y la pendiente de la línea recta corresponde al valor del coeficiente de difusión,  $D$ .

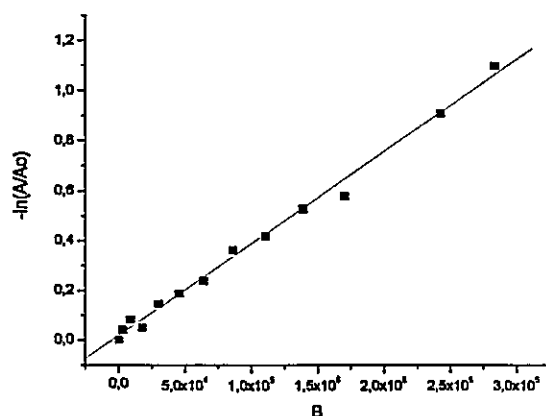
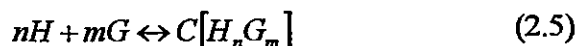


Figura 2.2  
Gráfica de  $-\ln(A/A_0)$  v/s  $B$ .

La determinación de la  $K_a$  por la técnica de Difusión, entrega un método adicional de RMN y una alternativa al clásico método de titulación basado en los desplazamientos químicos, especialmente conveniente para evidenciar la unión entre especies de diferentes tamaños.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> Cameron K., Fielding L., 2002, Magn. Res. Chem. 40, S106.

Un complejo con  $n$  moléculas de hospedero ( $H$ ) y  $m$  moléculas de sustrato ( $G$ )



la  $K_a$  puede ser deducida de la ecuación (2.5):

$$K_a = \frac{[C]}{[H]^n [G]^m} = \frac{[C]}{([H]_0 - n[C])^n ([G]_0 - m[C])^m} \quad (2.6)$$

Donde  $[G]_0$  y  $[H]_0$  son las concentraciones totales de sustrato y hospedero respectivamente;  $[G]$ ,  $[H]$  y  $[C]$  corresponden a las concentraciones en el equilibrio de sustrato libre, hospedero libre y el complejo. Para este tipo de análisis los valores de  $n$  y  $m$  son determinados previamente por el método de Job. Con lo cual, la constante de asociación se determina utilizando la ecuación 2.7 previa determinación de la fracción molar  $X_b$  de la especie unida.

$$K_a = \frac{X_b}{(1 - X_b)([H]_0 - X_b [G]_0)} \quad (2.7)$$

Para ello, el coeficiente de difusión observado ( $D_{obs}$ ) en el experimento de RMN, en una condición de intercambio rápido, corresponde a la fracción del coeficiente de difusión de la especie unida ( $D_{unido}$ ) y libre ( $D_{libre}$ )

$$D_{obs} = \chi D_{unido} + (1 - \chi) D_{libre} \quad (2.8)$$

Entonces la fracción correspondiente a la fracción unida es determinada por:

$$\chi = \frac{D_{libre} - D_{obs}}{D_{libre} - D_{unido}} \quad (2.9)$$

Con lo cual, se determina directamente la fracción molar del sustrato unido empleando la ecuación 2.9 y luego utilizando la ecuación 2.7, se obtiene la  $K_a$  por determinación de un solo punto.

Los experimentos DOSY fueron registrados utilizando la secuencia de pulso estándar de la Bruker para este tipo de experimentos, *ledbpgp2s*. Que utiliza gradientes de pulso bipolares, BPPLED (Bipolar Pulsed Field Gradient Longitudinal Eddy Delay)<sup>7</sup>. La duración del gradiente es de 3ms y el retardo de la corriente parásita (*d21*) es de 5ms, mientras que el gradiente de pulso (*p19*) fue de 1270  $\mu$ s y con una razón de gradiente *gp6:gp7:gp8* de 100:-17.13:-13.17. El gradiente de pulso es incrementado de 2 a 95% en una rampa lineal. Bajo estas condiciones, se registraron los espectros DOSY a temperatura controlada de 298K de los flavonoides puros ( $D_{libre}$ ), de las ciclodextrinas ( $D_{unido}$ ) y de los complejos formados, ( $D_{obs}$ ).

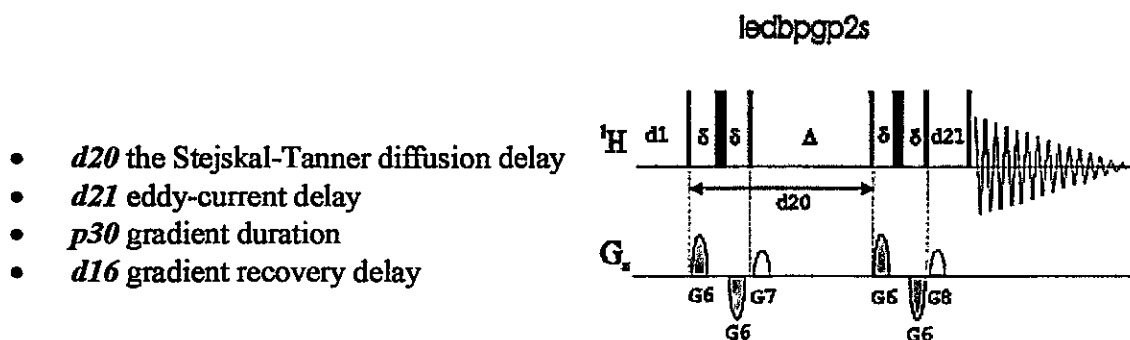


Figura 2.3  
Programa de pulso *ledbpgp2s* para realizar espectro DOSY

### 2.2.3.2- METODOLOGÍA SOLUBILIDAD DE FASE<sup>8</sup>

La solubilidad de una sustancia química en un solvente dado, a una temperatura y presión determinada, es una característica de la sustancia y se puede utilizar como criterio de identidad y pureza. Si un sustrato presenta una solubilidad mayor que la pura, evidentemente, el aumento de la solubilidad del sustrato es debido a la presencia de un

<sup>7</sup> Wu D., Chen A., Johnson C.S., 1995, J. Magn. Res. A 115, 260-264.

<sup>8</sup> Higuchi, T., Connors K.A., Adv. Anal. Chem. Instrum., 1965, 4, 117-212.



segundo componente. Esta técnica se conoce como análisis de solubilidad de fase. La metodología consiste en adicionar un exceso conocido del sustrato poco soluble en soluciones de concentraciones crecientes del segundo componente a volumen constante. Se deja en agitación a temperatura controlada por un tiempo prolongado. Luego se filtran las soluciones para no tener compuestos sólidos y se determina la concentración del sustrato en solución. Se grafica concentración del sustrato versus concentración del segundo componente.

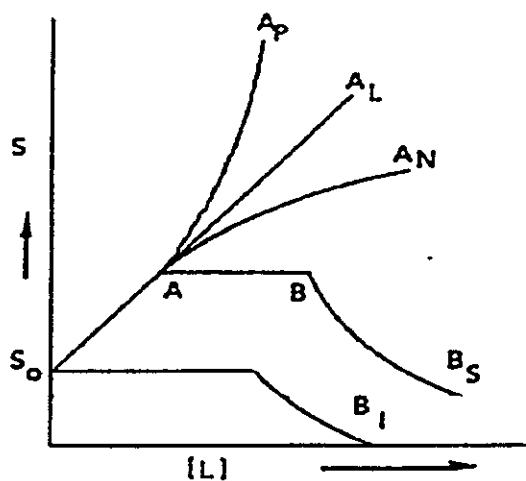


Figura 2.4  
Diagrama de solubilidad de fase

En la figura 2.4, se muestra la grafica típica de estos experimentos. El símbolo  $S$  representa la concentración molar del sustrato disuelto.  $L$ , representa la concentración del ligante.  $S_0$  es la solubilidad en el equilibrio del sustrato en ausencia del ligante. Un aumento lineal de la solubilidad es representado por la línea  $A_L$ , mientras que una curvatura positiva y negativa es indicada por  $A_P$  y  $A_N$  respectivamente. Diagramas tipo A indican la formación de complejos solubles entre el sustrato y el ligante. Con lo cual, si el complejo formado es un diagrama tipo  $A_L$ , el complejo formado corresponde a un complejo de primer orden respecto al ligante. Si es de orden superior a uno respecto a  $L$ ,

entonces el diagrama corresponderá a un diagrama tipo  $A_p$ . En cambio, si corresponde a un diagrama del tipo  $A_N$ , puede corresponder a una alteración en la naturaleza del solvente en la presencia de altas concentraciones de  $L$ , o sencillamente que el ligante se asocie consigo mismo a concentraciones altas.

El desarrollo para la determinación de la  $K_a$  por esta metodología es el siguiente, donde la constante de formación del complejo o de estabilidad estará dada por:

$$K = \frac{(S_m L_n)}{(S)^m (L)^n} \quad (2.10)$$

Las concentraciones pueden ser expresadas en términos de cantidades conocidas:

$$(S) = S_o$$

$$(S_m L_n) = \frac{S_t - S_o}{m} \quad (2.11)$$

$$(L) = L_t - n(S_m L_n) \quad (2.12)$$

Donde  $S_o$  es la solubilidad en el equilibrio en ausencia de  $L$ ,  $S_t$  es la concentración total de  $S$  disuelta y  $L_t$  es la cantidad total de  $L$  agregada. Con las ecuaciones anteriores se puede obtener una expresión para  $K$  en términos de concentraciones conocidas y los valores de  $m$  y  $n$ . Un caso especial es cuando  $n = 1$  se obtiene lo siguiente:

$$S_t = \frac{mKS_o^m L_t}{1 + KS_o^m} + S_o \quad (2.13)$$

Una grafica de  $S_t$  v/s  $L_t$ , por la formación de un complejo soluble  $S_m L$  deberá de dar una línea recta (diagrama  $A_I$ ) el intercepto corresponde a  $S_o$  y la pendiente esta dada por:

$$\text{pendiente} = \frac{mKS_o^m}{1 + KS_o^m} \quad (2.14)$$

Para el caso que  $m$  es conocido, esta ecuación provee la base para el cálculo de  $K$  de la pendiente de un diagrama  $A_L$ . Para el caso que  $m = 1$ , la ecuación quedaría:

$$K_{11} = \frac{\text{pendiente}}{S_o(1 - \text{pendiente})} \quad (2.15)$$

Un exceso de flavonoide (5mg) es adicionado a 5 mL de agua desionizada o soluciones de CDs (1mM – 10 mM), en frascos ámbar para evitar descomposición de los flavonoides con la luz. Estas soluciones se mantienen en agitación a temperatura constante de 30 °C, en un baño con agitación mecánica, SUDELAB. Después de 24 hrs de agitación, se filtran en filtros Millex 0.45  $\mu\text{m}$  y se les determina la concentración de flavonoide disuelto por UV-Vis. Las mediciones espectrofotométricas fueron hechas en un UV<sub>2</sub> UNICAM utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm. Se grafica concentración de flavonoide disuelto versus concentración de ciclodextrina y se determina la constante de asociación de acuerdo a la ecuación 2.15.

#### 2.2.4.-DETERMINACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE INCLUSIÓN

Los experimentos ROESY al igual que los NOESY proporcionan información sobre proximidad espacial entre protones. Los experimentos ROESY son especialmente recomendables sobre los NOESY para moléculas con peso molecular entre 1000-2000 Dalton. El experimento 2D-ROESY proporciona un espectro 2D de correlación entre las señales de protones próximas en el espacio. El espectro 2D-ROESY contiene picos diagonales y picos de cruce simétricos. Los picos de la diagonal son los picos correspondientes al espectro de protón (picos  $H_a$ ,  $H_b$  y  $H_c$  en figura 2.5). Además de estos picos, pueden aparecer otros picos fuera de la diagonal que se denominan picos de cruce. Para un pico de cruce podemos encontrar su correspondiente pareja de protones en la diagonal (si nos movemos en el eje vertical y en el horizontal). En principio un pico de cruce puede aparecer en el espectro cuando los dos protones correlacionados

estén situados en la molécula a una distancia menor de 4.5 Å. Por otro lado, la intensidad del pico de cruce ha de ser tanto mayor cuanto más cerca estén los dos protones en la molécula (depende de la distancia  $r^{-6}$ ). Los picos de cruce en 2D-ROESY aparecen en fase, y, si no son artefactos, deben ser de distinto signo que los picos diagonales (independientemente del tamaño molecular).

Los espectros ROESY de los complejos formados, fueron registrados de acuerdo a los programas estándares de la Bruker. Se utilizó el programa roesyph sensible a la fase, con un ancho espectral de 3000 Hz, y de tamaño 16K/8K. El tiempo de mezcla utilizado fue de 400ms, el tiempo de relajación fue de 2 segundos y en cada caso se hicieron 32 repeticiones.

Los experimentos HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) y HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), son experimentos de 2 dimensiones, que correlacionan  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  directamente unidos. Las coordenadas de cada señal en el gráfico de contorno corresponden a los desplazamientos químicos tanto de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$ . El espectro HSQC corresponde a un tipo de HMQC editado, donde aparecen las señales correspondientes a los grupos metilenos ( $\text{CH}_2$ ) con fase invertida. Para estos espectros se utilizaron los programas estándares de la Bruker, inviedgpph, con un ancho espectral de 4000 Hz para protones y 50000 Hz para carbono.

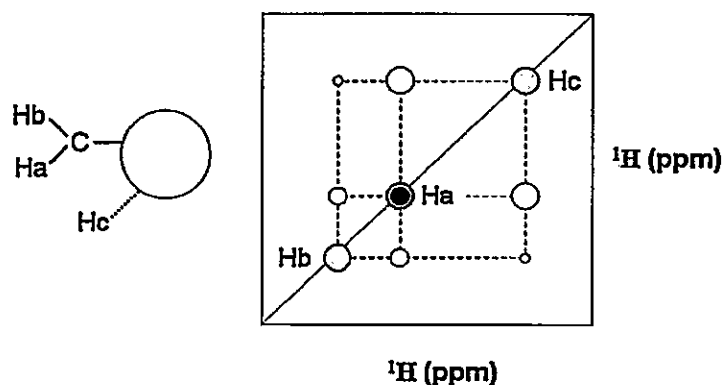


Figura 2.5

Diagrama de espectro ROESY, de una molécula que tiene los hidrógenos  $\text{H}_a$  y  $\text{H}_b$  cercanos espacialmente a  $\text{H}_c$ .

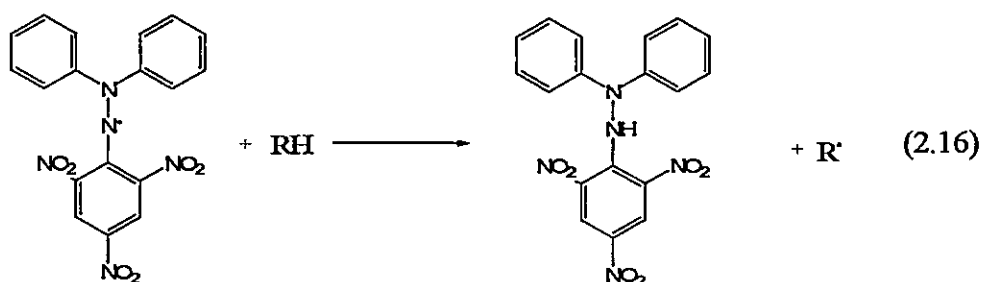
## 2.3.-DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

### 2.3.1-RESONANCIA DE ESPÍN ELECTRÓNICO

Los espectros de Resonancia de Espín Electrónica, REE fueron registrados en banda X (9.85 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo.

#### DPPH<sup>9</sup>

Un método sencillo para medir la capacidad antioxidante es utilizando el radical DPPH. El radical DPPH reacciona con el antioxidante reduciéndose para dar DPPH-H y lo que observamos es la disminución de la señal del radical DPPH al reaccionar con el flavonoide. Inicialmente se utiliza un blanco, agua o metanol, y luego se agrega la cantidad de flavonoide en estudio. La actividad antioxidante es evaluada en base a la disminución de la señal REE correspondiente al DPPH cuando este se encuentra en ausencia y en presencia del flavonoide.



<sup>9</sup> Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake N., Kohno H., Osawa T. 2003, J. Agric. Food Chem., 51, 3309-3312

Este radical también es usado comúnmente en ensayos de determinación de capacidad antioxidante por UV-Vis<sup>10</sup>, ya que el radical de color púrpura ( $\lambda = 517\text{nm}$ ) se reduce a la difenil picrilhidrazina de color amarillo al sustraer un hidrógeno de otra molécula.

### Metodología

- El blanco es preparado con 180 $\mu\text{L}$  de DPPH 0.5 mM en etanol mas 50 $\mu\text{L}$  de agua desionizada o metanol dependiendo del caso.
- La mezcla es agitada vigorosamente durante 10 segundos.
- La mezcla es transferida a un capilar y se introduce en la cavidad del espectrómetro de REE.
- Para la medición de los flavonoides y de sus respectivos complejos se sigue el mismo procedimiento, pero esta vez de se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de la muestra.

### 2.3.2.- ORAC<sub>FL</sub>

Para evaluar la capacidad antioxidante de los flavonoides y sus complejos con las CDs, se trabajó con la técnica denominada "ORAC", Oxygen Radical Absorbance Capacity, técnica que se centra principalmente en medir el efecto de un antioxidante sobre las especies reactivas de oxígeno (EROs). La metodología utilizada corresponde al método de Ou et al.<sup>11</sup> modificado, en el cual, la termólisis del ABAP provoca una serie de oxidaciones sobre la fluoresceína (FL), la cual se oxida a una especie no fluorescente.



<sup>10</sup> Kirby A.J., Schmidt R.J., 1997, *J of Ethnopharmacology*, 56, 103-108.

<sup>11</sup> Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., 2001, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619.

Se mide el aumento del área bajo la curva, ya que al agregar un compuesto antioxidante, éste compite por los radicales peroxilos cedidos por ABAP. Entonces, la fluorescencia de la fluoresceína se mantiene por más tiempo y una vez consumido todo el antioxidante, la reacción de oxidación de la fluoresceína se lleva a cabo. Una forma de presentar la actividad antioxidante de un compuesto determinado, es referenciándola a un estándar. Normalmente se utiliza el ácido (S)-(-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-carboxílico, más conocido como Trolox. Entonces, se registran los cambios de fluorescencia de los flavonoides libres y acomplejados con las diferentes ciclodextrinas.

De las soluciones stock preparadas de los flavonoides (1mM) o de los complejos de inclusión formados (FLAV:CD 1:10), se tomaron alícuotas para dar concentraciones finales de 1- 5 $\mu$ M. Estas alícuotas se homogeneizaron en las mismas cubetas de cuarzo para fluorescencia, con 215  $\mu$ L de fluoresceína (concentración final 70 nM), con 240  $\mu$ L de ABAP 0.15 mM (generador de radicales peroxilo) completándose a un volumen final de 3000  $\mu$ L con buffer fosfato 75 nM (pH 7.4). Una vez agregado todos los reactivos, se introduce la cubeta en el espectrofluorímetro LS 50B (PerkinElmer, Boston, MA, USA), el cual se encontraba a 60°C. Se registra la fluorescencia cada 50 seg. por aproximadamente 17 minutos, excitando a 490 nm con slit de 2nm y la emisión fue registrada a 515nm con slit de 4nm. Se utilizó una solución de Trolox como patrón de referencia.

Los datos de las mediciones fueron exportados al programa OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para realizar los cálculos correspondientes. A partir de las cinéticas obtenidas se procedió a normalizar los valores de intensidad utilizando la expresión  $F/F_0$ . Una vez normalizados los valores de intensidad, se calculó el área bajo la curva de cada uno de los ensayos efectuados para cada compuesto. Una vez obtenido el valor de las áreas bajo la curva, se procedió a la construcción de los gráficos de área bajo la curva versus concentración. De este gráfico, se ajustó la mejor recta calculándose las pendientes.

El cálculo de los valores de ORAC en relación a los valores de Trolox se determinan de acuerdo a la siguiente formula:

$$ORAC = \frac{(ABC)}{(ABC)_{Trolox}} * \frac{C_{Trolox}}{C} \quad (2.18)$$

Donde:

(ABC): corresponde a la pendiente de la curva obtenida al graficar el área bajo la curva en presencia del antioxidante versus concentración del antioxidante.

(ABC)<sub>Trolox</sub> : corresponde a la pendiente de la curva obtenida al graficar el área bajo la curva de Trolox versus concentración de Trolox.

C<sub>Trolox</sub> : Concentración de Trolox.

C : Concentración del antioxidante.

El valor de ORAC se expresa en equivalentes de Trolox y es independiente de la concentración de antioxidante. El valor del cociente se denomina también Trolox equivalentes (T<sub>EQ</sub>). Los T<sub>EQ</sub> nos indican la capacidad antioxidante de los diferentes flavonoides en relación a Trolox que posee un valor de 1,0 T<sub>EQ</sub>.

## 2.4.-CALCULOS TEORICOS

### 2.4.1.-AUTODOCK

Para la construcción *in silico* de la βCD, DMβCD y HPβCD se utilizó el modulo builder del InsightII, donde se le adicionó a la βCD 14 grupos metilos, en las posiciones 2 y 6 para formar la DMβCD y 7 grupos hidroxipropilos para formar la HPβCD. Estos fueron optimizados con 300 pasos del método gradientes conjugados. La catequina fue



construida usando gaussian98 cuya geometría fue optimizada usando el método semiempírico PM3.

Para generar los complejos de partida se utilizó Autodock3.0.5. Los parámetros definidos para la búsqueda global fueron una población inicial de 50 individuos, un número máximo de evaluaciones de energía de 1500000, un número máximo de generaciones de 50000, número de individuos con mejor perfil energético que sobreviven a la próxima generación sin modificaciones igual a 1, probabilidad de mutación y crossover de 0.02 y 0.08 respectivamente.

Autodock con el fin de definir el espacio de búsqueda, cuenta con un método de grillas las cuales determinan el espacio conformacional de posibles soluciones. Para testear la capacidad de Autodock de converger en soluciones que se encuentren dentro de la ciclodextrina, la grilla fue seteada de tal manera que cubriera tanto la cara externa como la superficie interna de la ciclodextrina con un tamaño de grilla de 80 Å por lado, con un espaciado entre los puntos de 0.3 Å. El siguiente procedimiento fue empleado para las tres ciclodextrinas, el número de corridas fue de 250 por ciclodextrina.

Al término de cada corrida las soluciones fueron separadas en cluster de acuerdo a su RMSD mínimo y el mejor store, el cual está basado en un parámetro energético definido por una función empírica de energía libre. Luego fueron seleccionados aquellos cluster cuya energía promedio no era menor a 1 kcal/mol respecto a la mejor energía obtenida en la corrida total. De estos cluster fue tomada una solución representativa de ellos y se comparó con los datos experimentales de RMN, seleccionando aquella que sea capaz de representarlos de manera más exacta. El complejo seleccionado finalmente fue optimizado utilizando métodos semiempíricos PM3 como un refinamiento utilizando Gaussian98.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 COMPLEJOS QUERCETINA-CICLODEXTRINAS

Dentro de la familia de los flavonoides, la quercetina (QUE) pertenece al grupo de los flavonoles. Estos, además de presentar un par de hidroxilos en posición *orto* en el anillo B, presentan un doble enlace entre C2 y C3 conjugado con el grupo ceto del C4, el cual es responsable de la deslocalización de los electrones del anillo B, donde se ve reforzada la capacidad atrapadora del radical libre<sup>1</sup> y la presencia del hidroxilo en la posición 3 del heterociclo también aumenta la actividad atrapadora del radical.

Pero la quercetina es muy poco soluble en solución acuosa, lo cual lo limita en el uso farmacológico. Por lo cual, para sobrellevar este problema, se prepararon complejos de quercetina con diferentes ciclodextrinas, con el objeto de determinar una posible inclusión y obtener la constante de asociación  $K_a$ , y determinar en lo posible su geometría de inclusión.

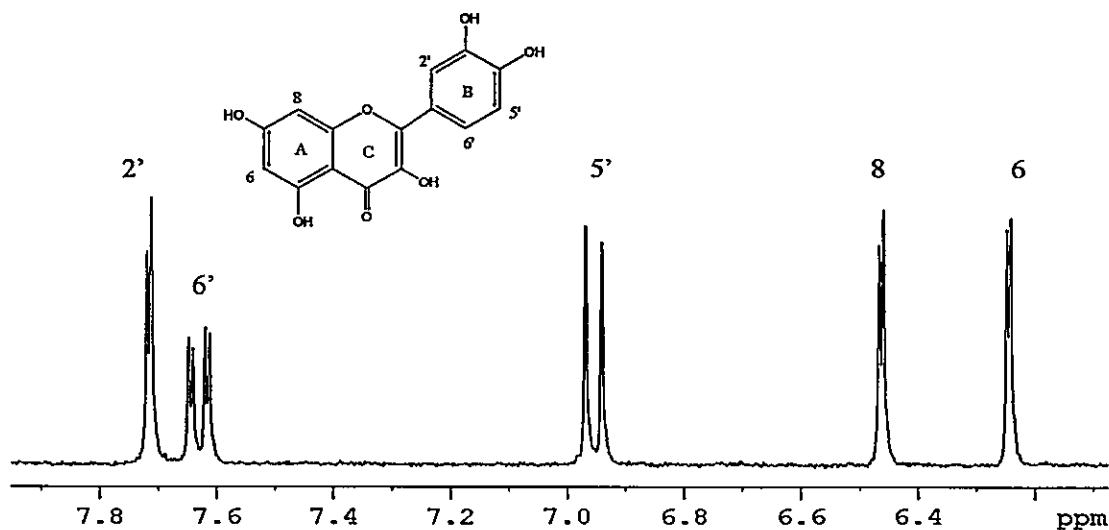


Figura 3.1.1

Espectro <sup>1</sup>H-RMN de QUE en solución mixta MeOD:D<sub>2</sub>O 2:1

<sup>1</sup> Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996, Free Radic. Biol. Med. 20, 933-956.

Para cumplir con lo anterior, como primer punto, es necesario caracterizar los protones de la quercetina, por lo cual, se registró el espectro de la QUE en una solución mixta MeOD:D<sub>2</sub>O 2:1, debido a la baja solubilidad del flavonoide en solución acuosa.

En la figura 3.1.1, se observa a campo alto dos dobletes con  $J = 2.0$  Hz, que corresponden a los protones aromáticos del anillo A, que se encuentran en posición meta. Luego a campo bajo, se observa un sistema de 3 espines propios del anillo B de la quercetina. Un doblete con  $J = 8.5$  Hz que corresponde al H-5', un doble de doblete (dd) perteneciente a H-6' con  $J = 2.0$  y  $J = 8.5$  Hz y finalmente un doblete con  $J = 2.0$  Hz debido al H-2'. Estas asignaciones están de acuerdo a lo reportado previamente<sup>2</sup>.

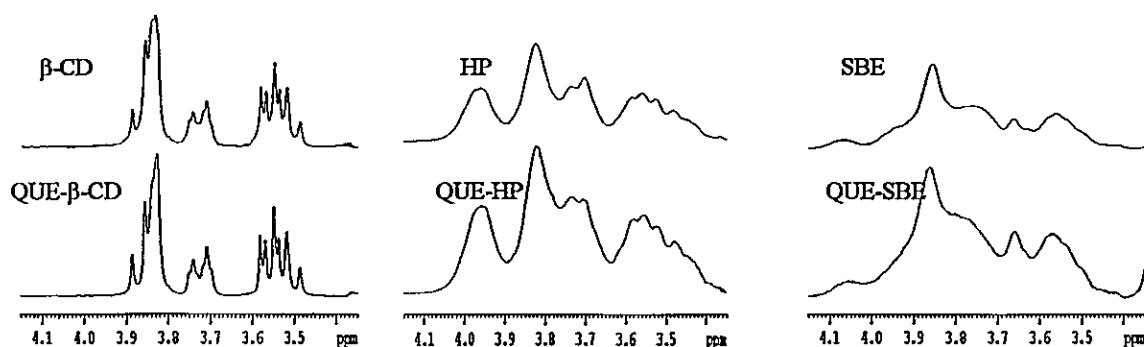


Figura 3.1.2

Espectros de las ciclodextrinas libres y de sus respectivos complejos con quercetina en soluciones órgano-acuosas, MeOD:D<sub>2</sub>O 2:1.

La confirmación de la formación de los complejos de inclusión, está dada por los desplazamientos químicos, ya sea de los protones aromáticos de la QUE o de los protones internos de la ciclodextrina (H-3, H-5 y H-6). Para este caso particular, las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos, prácticamente no presentan

<sup>2</sup> Zheng Y., Haworth I.S., Zuo Z., Chow M.S.S., Chow A.H.L., 2005, J. Pharm. Sci. 94, 1079-1089.

desplazamiento por efecto de la inclusión, a diferencia de los protones de las ciclodextrinas que tienen pequeños desplazamientos a campo alto, figura 3.1.2. Esto podría ser indicio de una leve interacción de la QUE con las ciclodextrinas. Para confirmar la inclusión, se realizó el experimento de solubilidad de fase. De acuerdo a Higuchi y Connors<sup>3</sup>, la gráfica correspondiente a un sustrato solubilizado en función de la concentración del ligante, nos indica el aumento de la solubilidad del sustrato en función de éste. En la figura 3.1.3, observamos el aumento de la solubilidad de la quercetina en función de las diferentes ciclodextrinas utilizadas,  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD y SBE $\beta$ CD. La cual corresponde a una gráfica lineal, con pendiente menor que 1, que de acuerdo a Higuchi y Connors es considerado un diagrama tipo  $A_1$ , donde la formación del complejo correspondería a un complejo 1:1. En la Tabla 3.1.1, están los valores de las  $K_a$  determinadas utilizando la ecuación 2.15 del Capítulo de Materiales y Métodos. Se puede observar un aumento en los valores de las  $K_a$  los cuales podrían estar relacionados con los sustituyentes presentes en la ciclodextrina nativa. Al estar sustituida por grupos hidroxipropilos o sulfobutilos, la ciclodextrina aumenta el tamaño de la cavidad permitiendo así más interacciones con el flavonoide, reflejándose en el valor de la constante de asociación.

Pralhad y Rajendrakumar<sup>4</sup>, también estudiaron por solubilidad de fase los complejos de quercetina con  $\beta$ -ciclodextrina y con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. A pesar de que los valores obtenidos por ellos son menores, 402 y 532  $M^{-1}$  respectivamente, podemos observar, que mantienen la tendencia, es decir, el valor obtenido para el complejo con la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina es mayor que para la  $\beta$ -ciclodextrina.

<sup>3</sup> Higuchi, T., Connors K.A., 1965, Adv. Anal. Chem. Instrum., 4, 117-212.

<sup>4</sup> Pralhad T., Rajendrakumar K., 2004, J. Pharm. Biomed. Anal. 34, 333-339.

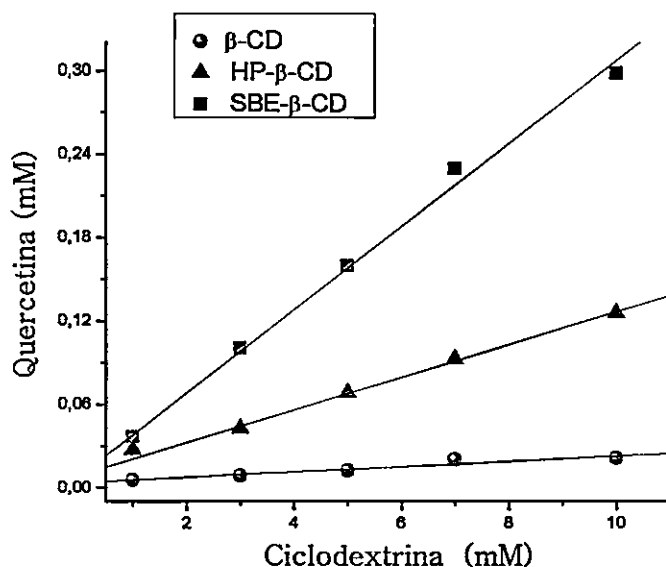


Figura 3.1.3

Gráfica de concentración de ciclodextrina, ( $\beta$ CD, HP $\beta$ CD y SBE $\beta$ CD) en función de quercetina disuelta.

Además de determinar las  $K_a$  por Uv-Vis, también se determinaron las  $K_a$  por  $^1\text{H}$ -RMN, específicamente por la técnica de Difusión. Para ello se registraron espectros DOSY, tanto de las ciclodextrinas libres, quercetina libre, como de los complejos formados, según está descrito en Materiales y Métodos.

Debido a la baja solubilidad de la quercetina, los complejos formados en agua deuterada no presentaban una concentración adecuada para ser detectada por RMN, por lo que fue necesario preparar los complejos en solventes mixtos, metanol deuterado y agua deuterada. Para obtener una concentración adecuada de quercetina sin que esta precipite, la mezcla final utilizada fue de una relación dos de metanol por una de agua. Por lo tanto, se registraron los espectros DOSY para todos los casos en mezclas órgano-acuosas 2:1. Se registraron los espectros DOSY para la quercetina, las ciclodextrinas y los complejos formados, para obtener los valores de  $D_{\text{libre}}$ ,  $D_{\text{unido}}$  y  $D_{\text{obs}}$  respectivamente.

En la figura 3.1.4, observamos los espectros DOSY para los tres complejos formados, QUE- $\beta$ CD, QUE-HP $\beta$ CD y QUE-SBE $\beta$ CD. En el eje x tenemos lo que correspondería al espectro de protones del complejo. En la zona aromática, se tienen las señales correspondientes a la quercetina, mientras que en la zona alifática tenemos lo que corresponde a las señales de las diferentes ciclodextrinas. El eje y, corresponde a  $\log D$ , donde D corresponde al coeficiente de difusión ( $m^2/s$ ). Entonces, en base al tamaño, podremos decir que cualitativamente la ciclodextrina es la que difunde más lento y el agua deuterada que corresponde a la señal que se observa a 4.7 ppm, difunde más rápido. Muy cercana al agua se observa el metanol presente a 3.3 ppm y luego se observa las señales correspondientes a la quercetina.

Del espectro DOSY del complejo, es de donde obtenemos el  $D_{obs}$ , que corresponde a la fracción unida a la ciclodextrina y la que se encuentra libre, ecuación 2.8 del capítulo de Materiales y Métodos. Utilizando las ecuaciones 2.9 y 2.7 obtenemos los valores de las constantes de asociación  $K_a$  para los complejos formados. Los valores de las constantes obtenidas en comparación a las obtenidas por UV son bastante menores, (Tabla 3.1.1) pero siguen la misma tendencia. Lo que está de acuerdo con los estudios hechos por Connors et al<sup>5</sup>. quienes estudiaron las constantes de equilibrio de naranja de metilo con  $\alpha$ -ciclodextrina en solventes mixtos. La presencia de solventes orgánicos disminuye los valores de las  $K_a$ , debido a que el sustrato prefiere encontrarse en el solvente orgánico que en la cavidad de la ciclodextrina. A diferencia de que cuando hay solo agua, el sustrato prefiere la cavidad apolar de la CD que el medio acuoso.

---

<sup>5</sup> Connors A.K., Mulski M.J., Paulson A., 1992, J. Org. Chem. 57, 1794-1798.

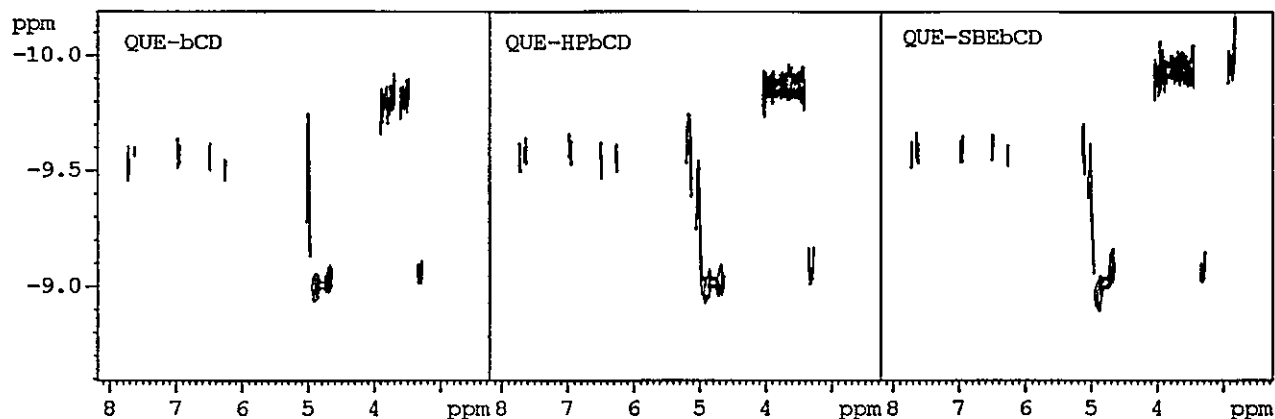


Figura 3.1.4

Espectros DOSY de los complejos de QUE- $\beta$ CD, QUE-HP $\beta$ CD y QUE-SBE $\beta$ CD en mezclas órgano-acuosas MeOD-D<sub>2</sub>O 2:1, a 298K.

La tendencia observada de las  $K_a$ , SBE $\beta$ CD > HP $\beta$ CD >  $\beta$ CD, es la misma que la presentada por Zheng et al.<sup>2</sup>, donde se observa una mayor interacción con la SBE $\beta$ CD que con la HP $\beta$ CD y esto es debido probablemente a los contactos adicionales de la quercetina con los sustituyentes propil y butil respecto a la ciclodextrina nativa. Entonces, las ciclodextrinas derivatizadas proveen mayor área de interacción, lo cual permite una interacción más fuerte de la quercetina con las ciclodextrinas. Junto con esto, las interacciones por puente de hidrogeno entre los grupos hidroxilos de la quercetina y los sustituyentes de la ciclodextrina también estabilizan el complejo formado. A pesar que se utilizó la misma técnica para la determinación de las  $K_a$ , método de solubilidad de fase, los valores obtenidos por el, son mayores, debido posiblemente a que los experimentos fueron realizados a pH 3, mientras que los hechos en este estudio son en agua desionizada (pH neutro).

Tabla 3.1.1

Valores de las  $K_a$  determinadas por el método de solubilidad de fase y por  $^1\text{H-RMN}$  utilizando la metodología DOSY en mezclas mixtas MeOD- $\text{D}_2\text{O}$  2:1.

complejo	$K_a$ ( $\text{M}^{-1}$ ) (UV)	$K_a$ ( $\text{M}^{-1}$ ) $^1\text{H-RMN}$
Que- $\beta\text{CD}$	602	138
Que-HP $\beta\text{CD}$	1419	249
Que-SBE $\beta\text{CD}$	4032	303

Con respecto a la caracterización de los complejos de inclusión, desde el punto de vista conformacional, se registraron espectros 2D ROESY a los tres complejos formados. Para los complejos con  $\beta\text{CD}$  e HP $\beta\text{CD}$ , no se observaron picos de cruce entre los hidrógenos aromáticos de la quercetina con los hidrógenos internos de la ciclodextrina. Por su parte, el complejo de quercetina con SBE $\beta\text{CD}$ , si se observan interacciones dipolares. En la figura 3.1.5, vemos una sección del ROESY del complejo QUE-SBE $\beta\text{CD}$ , la cual corresponde a la zona aromática de la QUE y a la zona alifática de la ciclodextrina. Debido a que la sustitución de la ciclodextrina con los grupos sulfobutiles es aleatoria, se hace muy difícil asignar los protones internos de la ciclodextrina. Por ello se registraron espectros de correlación C-H, HSQC, para asignar los protones internos, H-3 y H-5 de la SBE $\beta\text{CD}$ , figura 3.1.6. Con esta asignación, el estudio del ROESY es más detallado y se observa interacción clara de los hidrógenos H-6 y H-8 del anillo A de la quercetina con los H-5 y H-3 de la ciclodextrina. Además se observa con menor intensidad, interacción del H-2' del anillo B con el H-3 de la ciclodextrina. Se desprende de estos resultados, que el complejo de inclusión de QUE con SBE $\beta\text{CD}$ , el anillo A es el que se encuentra incluido dentro de la cavidad de la ciclodextrina.



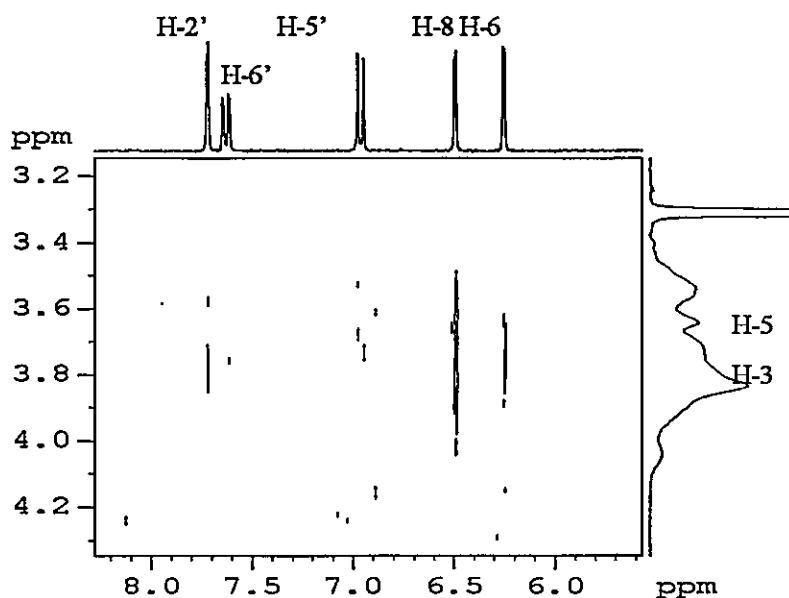


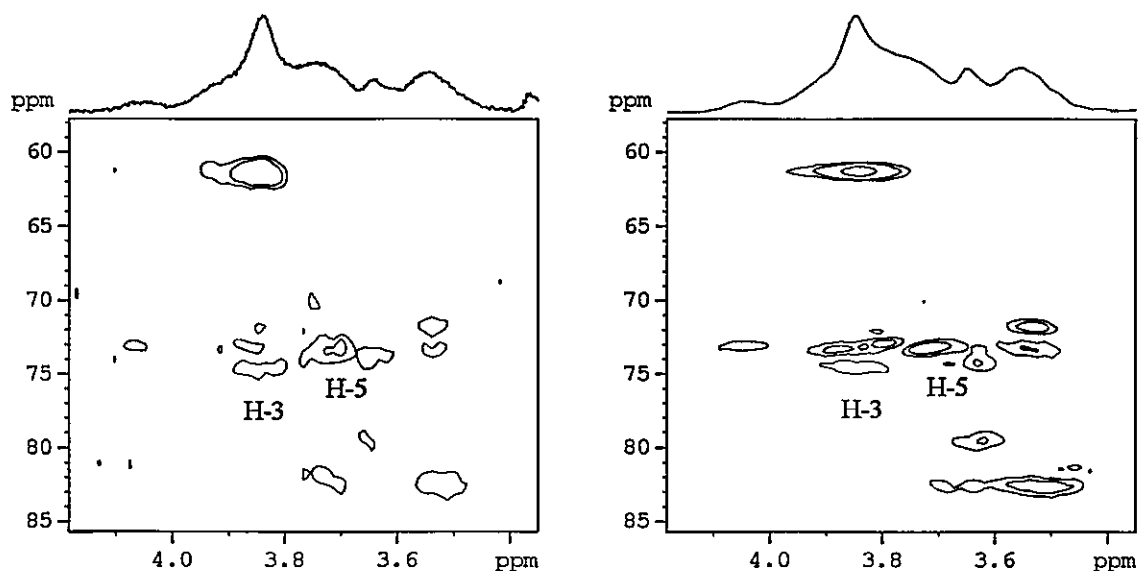
Figura 3.1.5

Espectro ROESY del complejo QUE-SBE- $\beta$ -CD, [QUE] = 2.65mM y [SBE] = 3.36 mM, en mezcla MeOD:D<sub>2</sub>O 2:1

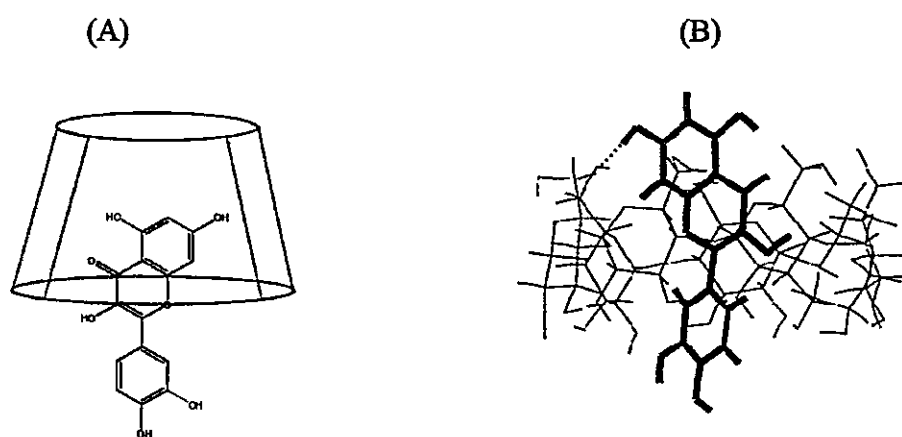
En los espectros ROESY de los complejos formados con  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD no se observaron interacciones dipolares entre la quercetina y las ciclodextrinas, lo cual podría deberse a los pequeños valores de las  $K_a$  obtenidas, ya que la fracción de quercetina libre es mucho mayor que la fracción de la quercetina incluida en la ciclodextrina. Esta dificultad experimental no nos permite estimar la geometría de inclusión de la quercetina en estas dos ciclodextrinas. Sin embargo, los estudios mecánico-cuánticos hechos por Yan et al.<sup>6</sup> de la quercetina con  $\beta$ -CD, indican que el hidroxilo 7 de la quercetina interacciona por puente de hidrógeno con el hidroxilo ubicado en la posición 6 de la  $\beta$ -CD estabilizando el complejo QUE- $\beta$ CD, figura 3.1.7 (A). Esto concuerda con la geometría de inclusión obtenida para el complejo QUE-SBE $\beta$ CD, es decir, el anillo B del flavonoide se encuentra ubicado hacia el lado ancho de la ciclodextrina mientras que

<sup>6</sup> Yan C., Li X., Xiu Z., Hao C., 2006, J. Mol. Struct. Theo., 764, 95 -100.

el anillo A se encuentra por el lado angosto de la SBE $\beta$ CD, figura 3.1.7 (A). Pero la diferencia estaría en que tan profundo se encuentra el anillo A en la ciclodextrina.



**Figura 3.1.6**  
Espectro HSQC de SBE $\beta$ CD y del complejo QUE-SBE $\beta$ CD en soluciones mixtas MeOD-D<sub>2</sub>O 2:1.



**Figura 3.1.7**  
Esquema de inclusión de quercetina en SBE $\beta$ CD (A) y geometría de inclusión de quercetina en  $\beta$ CD por Yan et al.<sup>6</sup>(B).

Según los estudios de Yan et al.<sup>6</sup>, el anillo A de la quercetina estaría sobresaliendo por el lado primario de los hidroxilos, figura 3.1.7 (B), mientras que en la SBE $\beta$ CD, la cromona se encuentra incluida en la cavidad de la ciclodextrina, pero no lo suficiente como para que el anillo A interaccione con los hidroxilos primarios. En cambio, el anillo B no se encontraría incluido dentro de la cavidad. Esto podría ser debido a que los grupos sulfobutilos ejercen un efecto estérico evitando una inclusión mayor. Por otra parte, los grupos sulfobutilos presentan más posibilidades de interacción con la quercetina, lo que se ve reflejado en el aumento de la  $K_a$  con respecto a la ciclodextrina sin derivatizar.

Para determinar si la quercetina sigue manteniendo sus propiedades antioxidantes, se estudió la reactividad de los complejos formados en presencia de los radicales DPPH $\cdot$  y Galvinoxyl por REE. Para ello se estudiaron los complejos de inclusión formados en los experimentos de solubilidad de fase y de la quercetina libre. Para lo cual, se tomaron las alícuotas correspondientes a la concentración de 3mM de cada una de los complejos formados. Se llevaron a una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (20:80) con DPPH $\cdot$  /Galvinoxyl 2mM. Las mediciones del decaimiento de la señal de REE fueron hechas 10 minutos después de iniciarse la reacción.

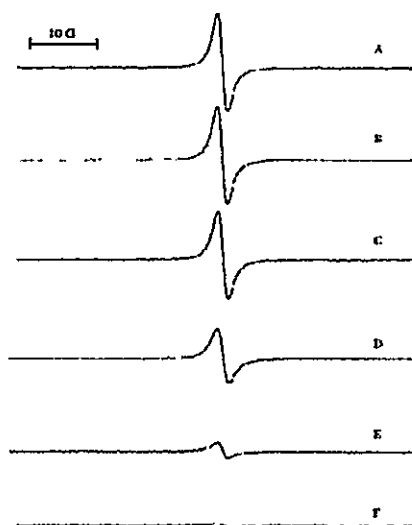


Figura 3.1.8

Espectro REE de galvinoxyl (A); galvinoxyl en presencia de  $\beta$ CD (B); QUE (C); QUE- $\beta$ CD (D); QUE-HP- $\beta$ CD (E) y QUE-SBE- $\beta$ CD (F).

En la figura 3.1.8, se observa la disminución de la intensidad del radical galvinoxyl por REE frente a la QUE libre y complejada con las diferentes CDs. Este mismo comportamiento se observa con el radical DPPH, figura 3.1.9. Aquí se confirma el aumento de la concentración de QUE en solución acuosa por la presencia de CD. Con lo cual, podremos decir, que al formar los complejos de inclusión, se aumenta la biodisponibilidad de la QUE en solución acuosa y no se observa pérdida de la actividad antioxidante del flavonoide.

Para evaluar la capacidad antioxidante de la QUE y sus complejos con las diferentes CDs, se utilizó la técnica  $ORAC_{FL}$ , técnica que se centra en medir el efecto del antioxidante sobre las especies reactivas de oxígeno, en este caso, producidas por la termólisis del ABAP. En la figura 3.1.10, se observa el decaimiento de la fluorescencia de la fluoresceína en el tiempo, a diferentes concentraciones del complejo formado.

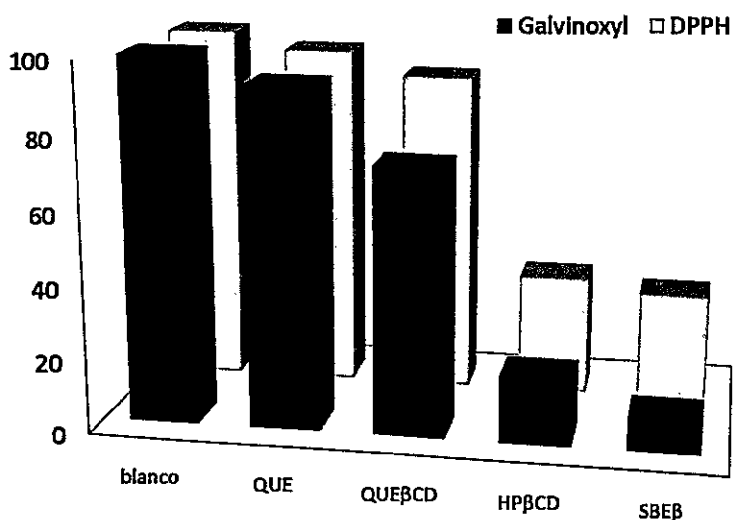


Figura 3.1.9

Reactividad del radical DPPH/Galvinoxyl frente a QUE libre y a los complejos formados. La concentración de DPPH/Galvinoxyl fue de 2mM.

La pendiente entre el área bajo la curva (ABC) y la concentración de cada uno de los complejos fue determinada para calcular el Trolox equivalente ( $T_{eq}$ ) de cada uno de los complejos. Los valores estadísticos para cada uno de los gráficos obtenidos excedió el valor de  $r^2 = 0.99176$ . En la Tabla 3.1.2 se observa el Trolox equivalente para QUE libre y QUE formando complejos con las diferentes ciclodextrinas. En esta tabla, observamos que la quercetina al formar complejos con las ciclodextrinas, disminuye su actividad antioxidante respecto a la quercetina libre entre un 5 a 12% dependiendo de la ciclodextrina utilizada. Mientras que con la SBE $\beta$ CD, la actividad antioxidante se podría decir que se mantiene. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la geometría de inclusión de la quercetina dentro de la ciclodextrina. La actividad de la quercetina depende del anillo B, específicamente al grupo catecol, y la capacidad atrapadora de radicales libres se ve potenciado además por presentar un doble enlace entre C2 y C3 el cual se encuentra conjugado con el grupo ceto del C4, el cual es responsable de la deslocalización de los electrones del anillo B<sup>7</sup>. El hecho que el complejo con la SBE $\beta$ CD mantenga su actividad, estaría de acuerdo con los resultados obtenidos, acerca de que el anillo B del flavonoide se encuentra más expuesto al solvente con respecto a las otras ciclodextrinas. De acuerdo a lo presentado por Álvarez-Parrilla<sup>8</sup>, quien hizo un estudio de reactividad para la quercetina, rutina y sus complejos de inclusión con  $\beta$ CD. El observó que la reactividad para el complejo QUE- $\beta$ CD se veía aumentada en un 10% respecto a la quercetina libre. Mientras que para la rutina el aumento fue de un 18% respecto a la rutina libre. Estos estudios los realizó utilizando la metodología FRAP (Ferric reducing antioxidant power) y el aumento de la reactividad lo atribuyó a que como el grupo catecol es el que se incluye en la cavidad hidrofóbica provoca modificaciones en el comportamiento redox del flavonoide.

<sup>7</sup> Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997, Trends in Plant Science. 2, 152-159.

<sup>8</sup> Alvarez-Parrilla E., De la Rosa L.A., Torres-Rivas F., Rodrigo-Garcia J., Gonzalez-Aguilar G.A., 2005, J. Incl. Phenom. Macro. Chem. 53, 121-129.

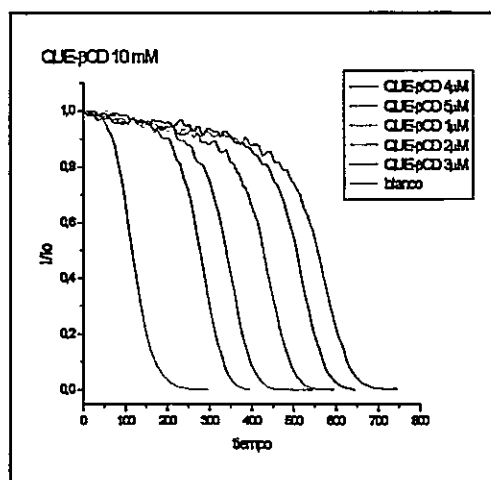


Figura 3.1.10  
Decaimiento de fluorescencia de la fluoresceína del complejo QUE- $\beta$ CD a diferentes concentraciones (1 $\mu$ M-5 $\mu$ M)

Tabla 3.1.2  
Valores de las pendientes obtenidas de las graficas ABC v/s concentración con sus valores de  $r^2$  y los  $T_{eq}$  para la quercetina y los complejos formados

Compuesto	Pendiente	$r^2$	Trolox Equivalente
Trolox	$1.013 \cdot 10^7$	0.99176	1.0
Quercetina	$8.822 \cdot 10^7$	0.99621	8.7
QUE- $\beta$ CD	$7.767 \cdot 10^7$	0.99994	7.7
QUE-DM $\beta$ CD	$7.931 \cdot 10^7$	0.99764	7.8
QUE-SBE $\beta$ CD	$8.957 \cdot 10^7$	0.99215	8.8
QUE-HP $\beta$ CD	$8.319 \cdot 10^7$	0.99441	8.2

También se estudió la reactividad de la quercetina utilizando el radical DPPH por REE, pero esta vez, la concentración de quercetina en todos los complejos formados fue la misma, de modo de poder relacionar la actividad del flavonoide dependiendo de la ciclodextrina utilizada. El radical DPPH existe de manera estable como radical, por lo que se prepararon soluciones de DPPH de concentración conocida. La determinación de la reactividad de este radical con la quercetina es directa, puesto que se mide la disminución de la intensidad de la señal a un tiempo determinado, reproducido de forma igual para todos los complejos formados. En la figura 3.1.11, se observa el área bajo la curva en porcentaje respecto al blanco utilizado. Vemos que la intensidad del radical disminuye una vez que se encuentra en presencia de quercetina. Al adicionar los complejos con quercetina, se observa una mayor disminución de la señal del radical DPPH, que se relaciona con una actividad mayor respecto a la quercetina libre. Esto estaría indicando un aumento de la actividad antioxidante para todos los complejos formados. Este aumento de actividad de los complejos varía entre el 20 y 30% respecto a la quercetina libre dependiendo de la ciclodextrina utilizada. Caso contrario a lo observado en los estudios con ORAC, en donde la reactividad disminuía al formarse los complejos de inclusión.

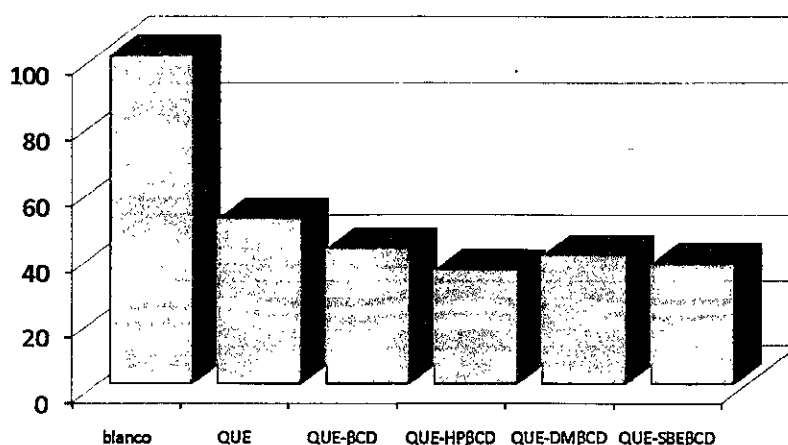


Figura 3.1.11

Variación de la intensidad de la señal del radical DPPH cuando se encuentra en presencia de quercetina y de sus complejos de inclusión

### 3.2 COMPLEJOS MORINA-CICLODEXTRINAS

Otro flavonoide utilizado en este estudio es la morina, un isómero de la quercetina. La diferencia que tienen es que los hidroxilos del anillo B ya no se encuentran en posición *orto* sino que ahora están en posición *meta*. Lo que hace que disminuya su actividad antioxidante, debido a que la estabilidad del radical no se ve tan favorecida como es el caso de la quercetina, por la presencia del catecol.

Se registraron los espectros  $^1\text{H-RMN}$  y COSY en MeOD, para hacer las asignaciones de cada uno de los hidrógenos. En la figura 3.2.1, está representado el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de la morina en MeOD, donde a campo alto se observan dos dobletes. Estos corresponden a los protones aromáticos del anillo A, que se encuentran en posición *meta*, con  $J = 2.1$  Hz, donde el doblete que se encuentra a campo bajo corresponde al H-8 y el doblete que se encuentra a campo alto a H-6. Luego, a campo más bajo, se observa otro doblete con  $J = 2.3$ , y un doblodoblete con  $J = 2.3$  y  $J = 8.6$  Hz, que son debidos a H-3' y H-5' respectivamente del anillo B. Mientras que el H-6' se encuentra desplazado a campo bajo con una constante de acoplamiento de  $J = 8.6$  Hz.

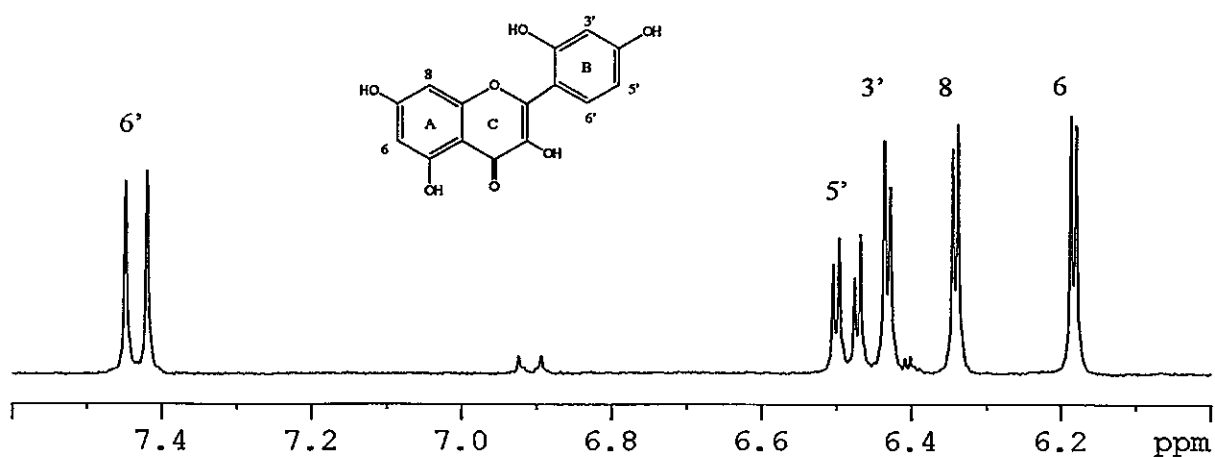


Figura 3.2.1  
Espectro  $^1\text{H-RMN}$  de morina en MeOD.



La formación de los complejos de inclusión sigue el mismo procedimiento de la quercetina, excepto que como la morina es más soluble en agua que la quercetina, se prepararon los complejos con un bajo porcentaje de MeOD en el medio, lo suficiente para no tener problemas de solubilidad, lo que corresponde a un 6% MeOD. Los complejos son preparados 1:1 en concentraciones de 0.5mM para evitar la precipitación de la morina.

Si observamos los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de la parte alifáticas de los complejos con ciclodextrinas, figura 3.2.2, el complejo M- $\beta$ CD presenta desplazamientos de los H-3, H-5 y H-6 de la  $\beta$ -ciclodextrina a campo alto. La inclusión de la morina queda claramente establecida por el efecto anisotrópico de los anillos aromáticos que desplazan a campo alto los hidrógenos internos de la ciclodextrina.

Para el caso de la HP $\beta$ CD y SBE $\beta$ CD, se observa desplazamiento de los protones de las ciclodextrinas, pero debido a la sustitución aleatoria que tienen estas ciclodextrinas y a la baja concentración a la cual se trabajó, no se pudo determinar los desplazamientos de los protones internos de la ciclodextrina por los espectros HSQC. Pero como la confirmación de la formación de los complejos está dada por los cambios en los espectros de la figura 3.2.2, se realizaron los experimentos de solubilidad de fase.

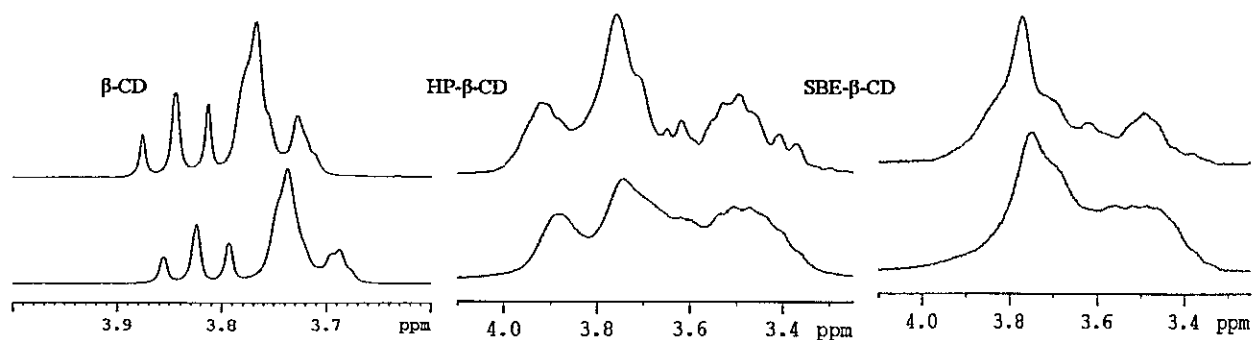


Figura 3.2.2  
Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las ciclodextrinas libres y de sus respectivos complejos

En la figura 3.2.3, vemos como aumenta la concentración de la morina por la presencia de la SBE $\beta$ CD. De acuerdo a Higuchi y Connors<sup>1</sup>, al graficar concentración de morina disuelta en función de concentración de ciclodextrina, se observa claramente una linealidad con el aumento de concentración de ciclodextrina. Indicando que sigue un diagrama del tipo A<sub>L</sub>, donde el complejo formado corresponde a un complejo de primer orden, es decir, la estequiometría corresponde a 1:1. Las otras ciclodextrinas utilizadas siguen este mismo comportamiento. Los valores de las K<sub>a</sub> obtenidas por esta metodología, se encuentran en la Tabla 3.2.1, donde se observa claramente un aumento de las constantes de asociación a medida que aumenta el grupo derivatizado en la ciclodextrina, lo cual se relaciona directamente con el aumento de las interacciones debidas a los grupos presentes.

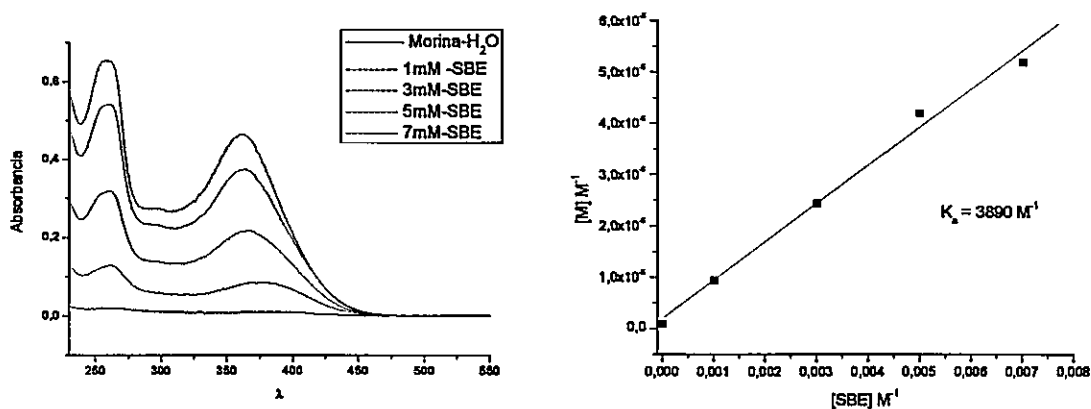


Figura 3.2.3

Espectros de absorción de (A) morina y de los complejos de inclusión M-SBE $\beta$ CD a diferentes concentraciones. (B) Gráfica de solubilidad de fase, [M] v/s [SBE $\beta$ CD]

<sup>1</sup> Higuchi, T., Connors K.A., 1965, Adv. Anal. Chem. Instrum., 4, 117-212

Tabla 3.2.1  
Valores de  $K_a$  obtenidos por método de solubilidad de fase

complejo	$K_a$ ( $M^{-1}$ ) (UV)
M- $\beta$ CD	500
M-HP $\beta$ CD	1830
M-SBE $\beta$ CD	3890
M-DM $\beta$ CD	1400

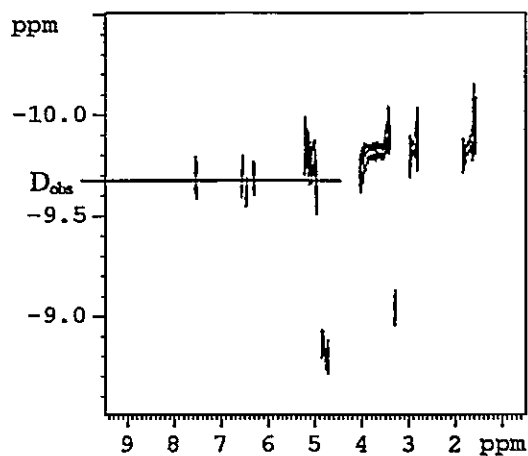


Figura 3.2.4  
Espectro DOSY del complejo M-SBE $\beta$ CD en  $D_2O$  con 6% MeOD

Como se corroboró la formación de los complejos y que estos tienen una estequiometría de 1:1, se procedió a registrar los espectros DOSY. En la figura 3.2.4, se observa la difusión que presenta la morina y la SBE $\beta$ CD en el complejo formado. Donde la difusión observada de la morina corresponde a  $D_{obs}$  y es la fracción correspondiente a la difusión de morina libre y unida. Además, se registraron los espectros DOSY de la

morina,  $D_{\text{libre}}$ , y de cada una de las ciclodextrinas libres,  $D_{\text{unido}}$ . El valor determinado para la morina unida a la ciclodextrina se toma en base a que la morina es lo suficientemente pequeña con respecto a la ciclodextrina y por ende no produce variación en el coeficiente de difusión de la ciclodextrina, tomándose entonces el coeficiente de difusión de  $D_{\text{unido}}$  como el de la ciclodextrina libre<sup>2</sup>. En la Tabla 3.2.2 se observan los coeficientes de Difusión obtenidos para las diferentes ciclodextrinas, morina libre y morina unida a la ciclodextrina. Por medio de la ecuación 2.9, descrita en el Capítulo de Materiales y Métodos, se determinó la fracción unida del flavonoide a la ciclodextrina y utilizando la ecuación 2.7 se calculó la constante de asociación.

Tabla 3.2.2

Valores de las  $K_a$  determinadas por RMN utilizando la metodología DOSY en  $D_2O$  con un 6% MeOD.

	$D_{\text{obs}}$ ( $m^2/s$ )	$D_{\text{unido}}$ ( $m^2/s$ )	$D_{\text{libre}}$ ( $m^2/s$ )	$f_{\text{unido}}$	$K_a$ ( $M^{-1}$ )
<b>M-<math>\beta</math>CD</b>	$2.87 \cdot 10^{-10}$	$2.34 \cdot 10^{-10}$	$3.89 \cdot 10^{-10}$	0.654	3140
<b>M-HP-<math>\beta</math>CD</b>	$2.37 \cdot 10^{-10}$	$2.08 \cdot 10^{-10}$	$3.89 \cdot 10^{-10}$	0.835	18900
<b>M-SBE-<math>\beta</math>CD</b>	$2.16 \cdot 10^{-10}$	$1.61 \cdot 10^{-10}$	$3.89 \cdot 10^{-10}$	0.755	9970

<sup>2</sup> Wimmer, R.; Aachmann, F. L.; Larsen, K. L.; Petersen, S. B., 2002, Carbohydr. Res., 337, 841.

Los valores obtenidos de las  $K_a$  por esta metodología son bastante mayores que los obtenidos por solubilidad de fase. Esta discrepancia observada mediante la técnica de solubilidad de fase y por RMN no es inusual, ya que se ha observado<sup>3</sup> que para sustratos poco solubles, los valores obtenidos de las  $K_a$  en ciclodextrinas por solubilidad de fase son menores al compararlas con los valores obtenidos por métodos espectroscópicos.

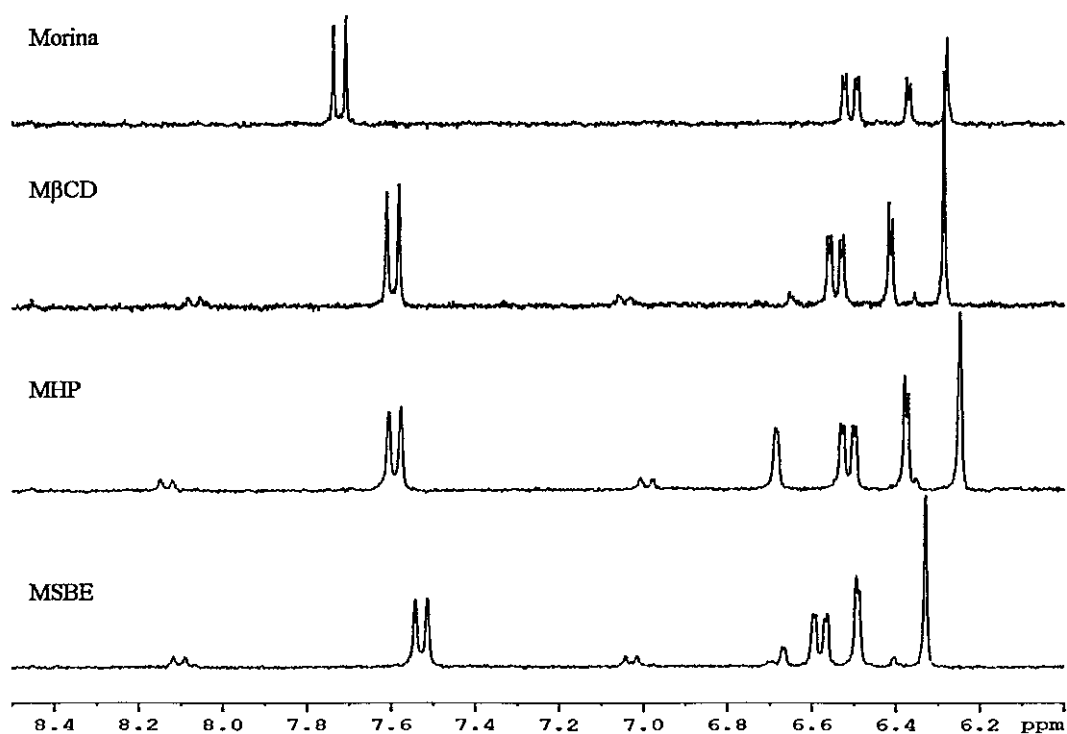


Figura 3.2.5

Espectros <sup>1</sup>H-RMN de morina y de los complejos 1:1 con las diferentes ciclodextrinas en D<sub>2</sub>O con un 6% MeOD.

<sup>3</sup> Alvarez-Parrilla E., De la Rosa L.A., Torres-Rivas F., Rodrigo-García J., González-Aguilar G.A. 2005, J. Incl. Phenom. Macro. Chem. 53, 121-129.

En la figura 3.2.5 se observan los protones aromáticos de la morina cuando está libre e incluida en las diferentes ciclodextrinas. Algunos de estos protones presentan desplazamiento a campo alto al incluirse y otros a campo bajo, pero lo que más llama la atención es que aparentemente se observan 4 hidrógenos aromáticos en vez de los cinco hidrógenos que componen la morina (figura 3.2.1). Este comportamiento anómalo se observó en los cuatro complejos formados y también en la morina libre, por lo tanto, no es debido a la formación del complejo que sucede esta característica. A lo mas, en algunas casos se alcanza a observar una quinta señal que pudiera deberse a el hidrogeno faltante, pero la integración es bastante menor que el resto de las señales. Como se mantiene en agitación durante 24 hrs para la formación del complejo, incluyendo también la morina sola, se procedió a preparar una muestra de morina en D<sub>2</sub>O con un 6% MeOD registrándosele espectros en el momento, a los 15 minutos y a las 4 horas, observándose claramente cómo va disminuyendo una de sus señales, para después de 4 horas sencillamente desaparecer.

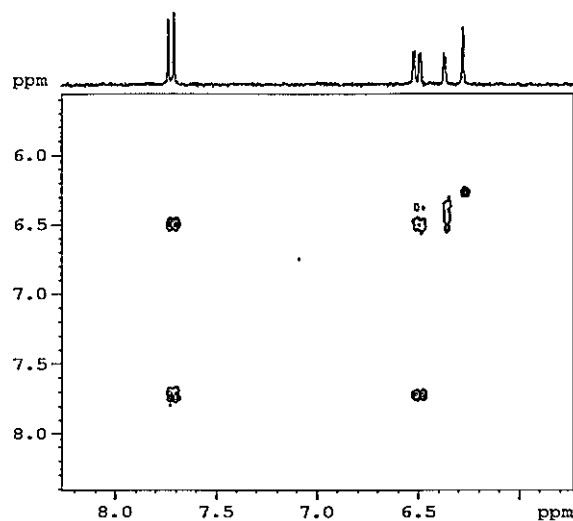


Figura 3.2.6  
Espectro COSY de morina en D<sub>2</sub>O + 6% MeOD

En la figura 3.2.6, se observa el espectro COSY registrado a la morina después de un par de horas de preparar la muestra. Aquí se ve claramente que solo se encuentra presente el sistema de 3 espines que corresponde a los hidrógenos aromáticos correspondientes al anillo B, mientras que el otro sistema que correspondería al anillo A solo hay un protón. De acuerdo a los resultados presentados, claramente desaparece en el tiempo un hidrógeno. La explicación más razonable a este hecho, es que ése hidrógeno se intercambie con deuterios del medio, haciéndolo no detectable. En resumen, podemos concluir que la morina en solución deuterada acuosa intercambia un protón aromático en el tiempo. La señal que se observa a campo alto corresponde al protón H-6 del anillo A. En este caso, es un singulete debido a que el protón adyacente el H-8 que se encontraba a campo bajo respecto a él, se ha intercambiado por los átomos de deuterio, razón por la cual ya no acoplan entre sí.

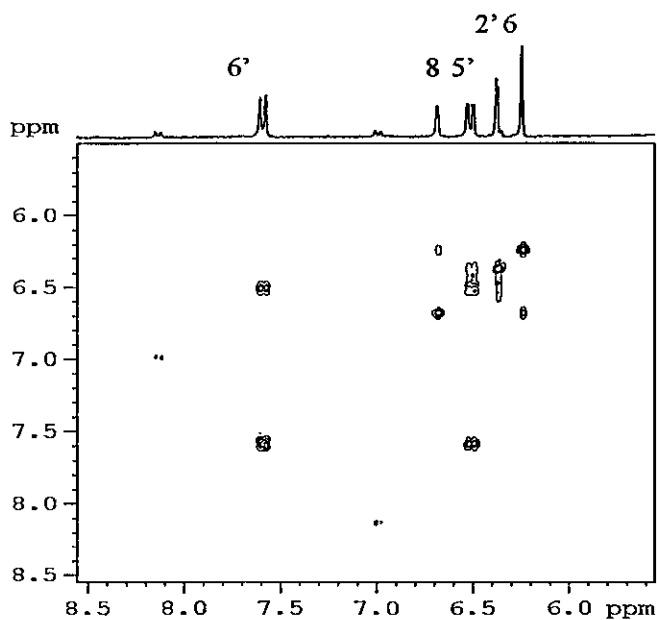


Figura 3.2.7  
Espectro COSY del complejo M-HP $\beta$ CD en D<sub>2</sub>O con un 6% MeOD.

Para confirmar que el H-8 es el hidrógeno faltante, se registró un COSY al complejo de M-HP $\beta$ CD, figura 3.2.7, donde se observa con mayor claridad los cinco hidrógenos aromáticos. A pesar de presentar una integración menor que el resto de los protones, se observa un acoplamiento entre el hidrogeno que se nos intercambia con el H-6, por ende la señal que desaparece correspondería al H-8 del anillo A. Este intercambio hidrógeno - deuterio, también ha sido observado como un intercambio inusual de hidrógenos aromáticos por Hadjipavlou et al.<sup>4</sup>, donde la señal correspondiente al hidrogeno H-2 del heterociclo 1-etil-1H-3nitrobenzopirano[4,3,2-cd]isoindol, desaparecía en el tiempo en mezclas CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>. Este efecto excepcional fue atribuido a un rápido intercambio H-D del protón aromático H-2.

Para hacer un estudio mas acabado respecto al protón faltante, se prepararon complejos de inclusión de morina con la HP $\beta$ CD, desde razones molares 1:1 hasta 1:20. Los resultados son claros, figura 3.2.8, ya que cuando hay un exceso de ciclodextrina, se observan todos los hidrógenos. Estos resultados nos dan luces de lo que podría estar sucediendo. El H-8 se intercambia con los deuterios del medio cuando se encuentra en solución, pero al estar incluido en la CD y más aun, cuando está en exceso la CD, la morina se encuentra incluida en la cavidad hidrofóbica de la CD, no permitiendo así un intercambio con el solvente. Esto nos estaría indicando que el anillo A, que contiene al hidrogeno H-8, se encuentra profundamente incluido en la ciclodextrina evitando todo tipo de interacción con el solvente.

Para confirmar esto, se prepararon 3 muestras estudiándose en el tiempo. Morina, complejo M-HP $\beta$ CD 1:1 y complejo M-HP $\beta$ CD 1:20. La concentración de morina se mantuvo constante en todos los casos en 0.5 mM.

---

<sup>4</sup> Hadjipavlou C., Kostakis I.K., Pouli N., Marakos., Micros E., 2006, Tetrahedron Lett. 47, 3681-3684.



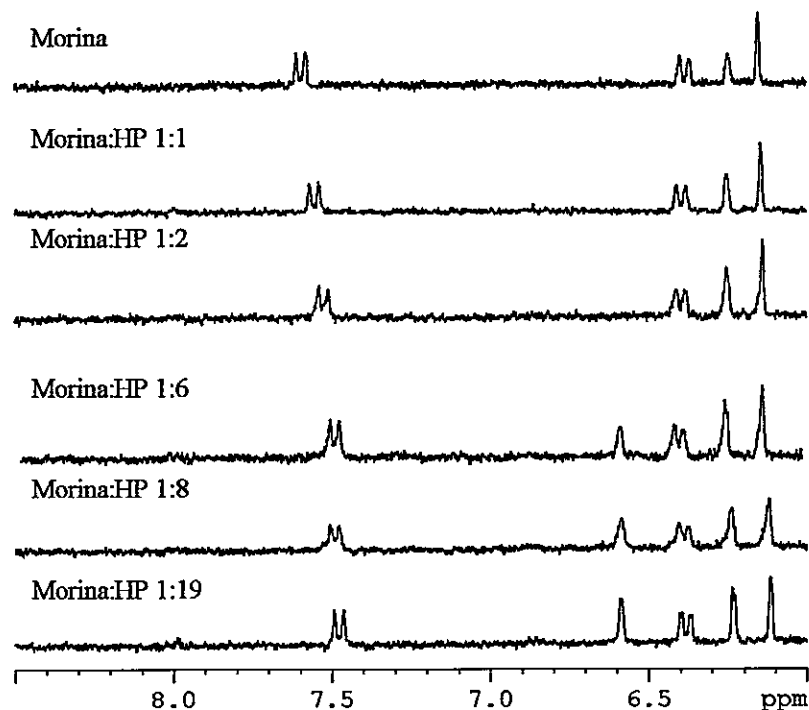


Figura 3.2.8

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de morina y complejos de morina a diferentes razones Morina : HP  $\beta$ -CD, en  $\text{D}_2\text{O}$  con un 6% MeOD.

El seguimiento fue durante 144 horas. Para el flavonoide libre, en el transcurso de las primeras 24 horas, la señal H-8 de la morina ya no se observaba, figura 3.2.9. Mientras que para el complejo 1:1, la señal del H-8 se tarda más en desaparecer (ya a las 48 horas casi no se observa la señal, y a las 68 horas sencillamente no está), figura 3.2.10. En cambio, para el complejo donde hay un exceso de ciclodextrina, figura 3.2.11, prácticamente no se observa disminución de la señal después de 140 horas. Esto nos confirma nuevamente que la inclusión es por el anillo A, y que el protón H-8 se encuentra lo suficientemente inserto en la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina como para no intercambiarse con el solvente.

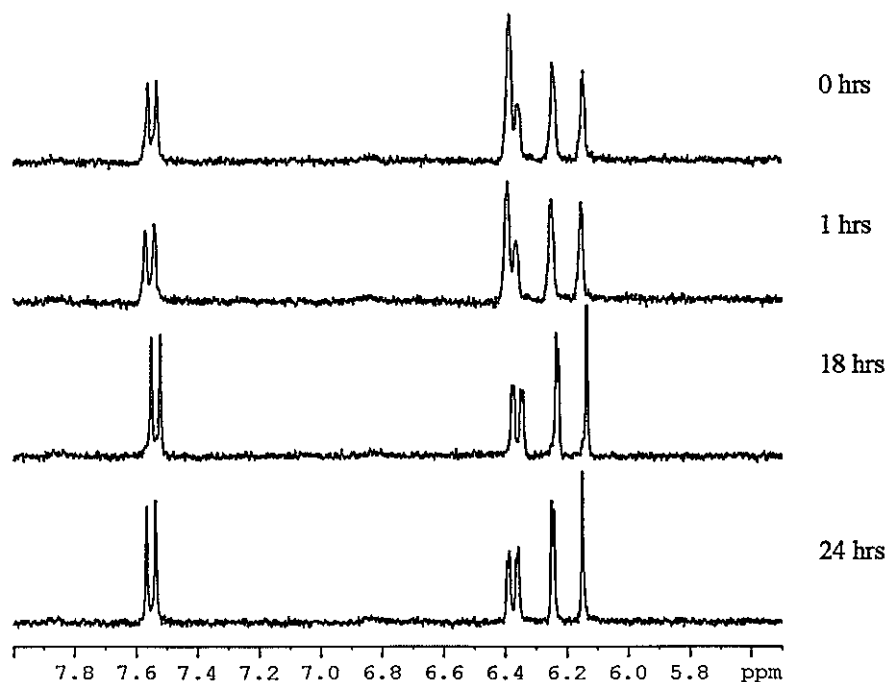


Figura 3.2.9  
Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de morina 0.5 mM en el tiempo.

De acuerdo a la tabla 3.2.2, la morina presenta mayor interacción con la HP $\beta$ CD que con la  $\beta$ CD y la SBE $\beta$ CD. Lo cual indicaría que el grupo hidroxipropil cumple un papel preponderante en la interacción con el flavonoide. Lo que estaría de acuerdo a lo visto en la Figura 3.2.5, donde en el complejo M-HP $\beta$ CD es donde se observa el H-8 indicando una mayor permanencia del flavonoide en la cavidad lo que se traduce entonces a un valor de la  $K_a$  mayor que para las otras ciclodextrinas. La tendencia observada para los valores de las  $K_a$  obtenida por UV y por RMN no es la misma. Una posible explicación de esta diferencia, podría ser debida al intercambio isotópico observado, obviamente sería diferente la difusión de la morina en el caso que tenga protones o que tenga deuterios, ya que por esta metodología el peso molecular, la viscosidad del solvente y la temperatura juegan un rol preponderante.

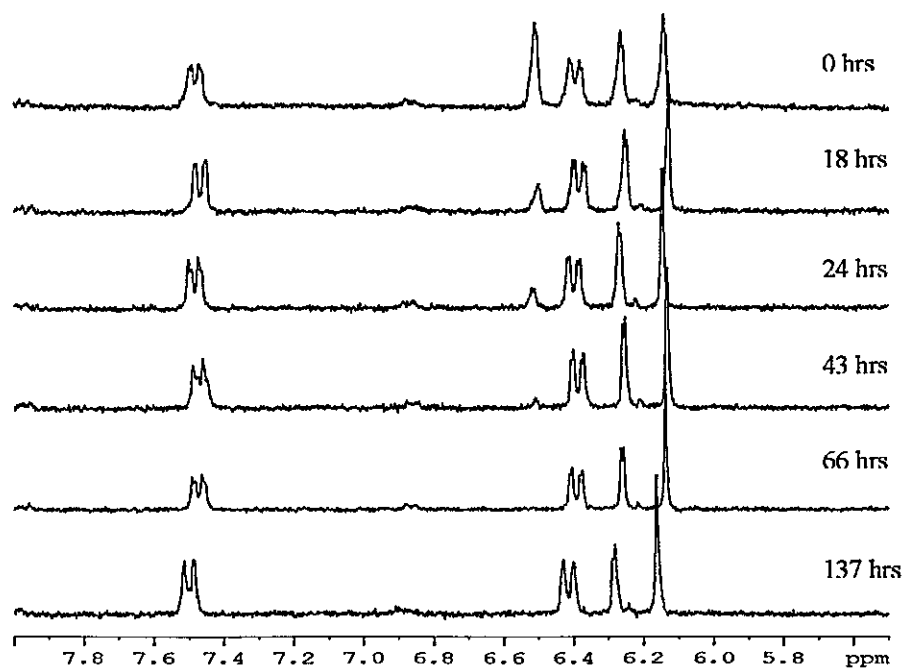


Figura 3.2.10  
Espectros <sup>1</sup>H-RMN del complejo M-HPβCD 1:1 0.5mM en el tiempo.

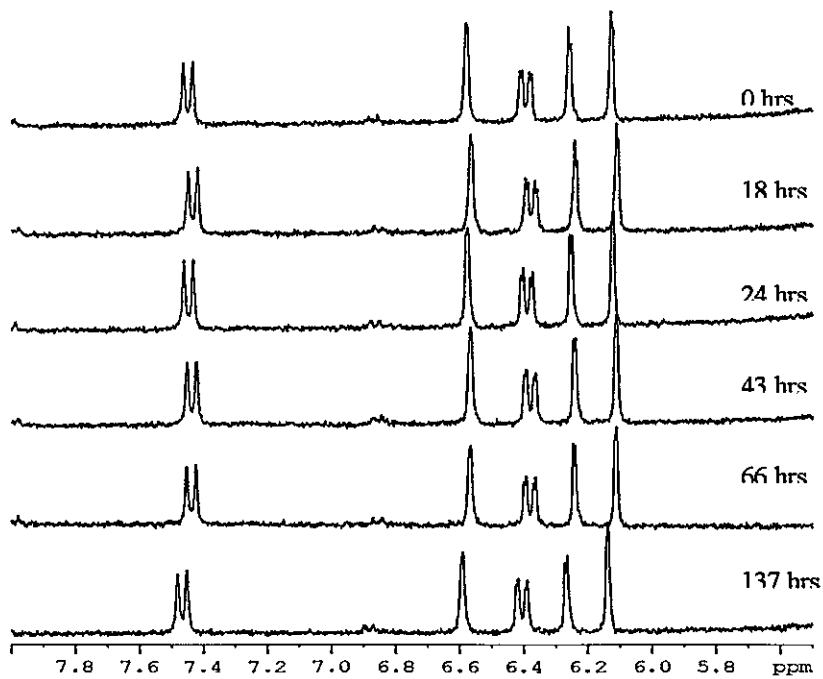


Figura 3.2.1|  
Espectros <sup>1</sup>H-RMN del complejo M-HPβCD 1:20 en el tiempo [M] = 0.5mM.

Con respecto a la caracterización de los complejos desde el punto de vista conformacional, se registraron los espectros ROESY de los complejos. En algunos casos, como ser con la HP $\beta$ CD y la DM $\beta$ CD, fue necesario registrar los espectros HSQC para hacer la asignación correcta de cada uno de los hidrógenos involucrados en la inclusión. En la figura 3.2.12, que corresponde a una sección del espectro ROESY del complejo formado por morina y  $\beta$ -ciclodextrina, se observan interacciones dipolares entre el hidrogeno H-6' del anillo B de la morina con los H-6 de la ciclodextrina, además de interacciones dipolares entre el H-8 del anillo A de lo morina con el H-5 de la  $\beta$ CD. Esto indica que la cromona se encuentra incluida en la cavidad de la ciclodextrina orientada hacia el lado de los hidroxilos secundarios, mientras que el anillo B se encuentra prácticamente al exterior orientado hacia el lado angosto de la ciclodextrina, figura 3.2.13 (A).

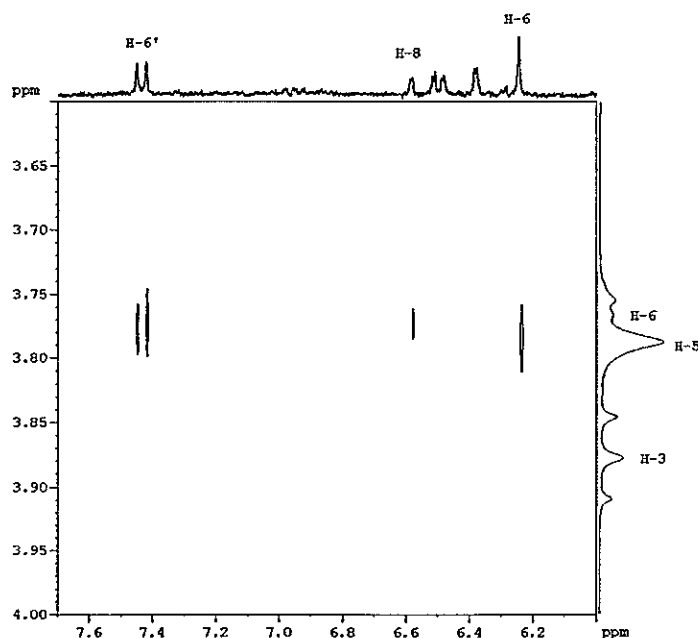


Figura 3.2.12  
Sección del espectro ROESY del complejo M- $\beta$ CD.

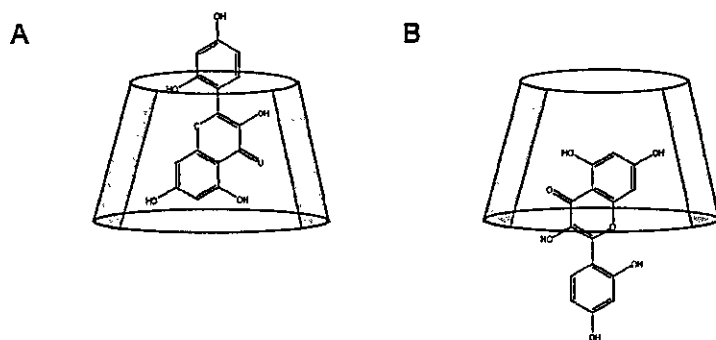


Figura 3.2.13  
Esquema de inclusión de morina en (A)  $\beta$ -ciclodextrina, HP $\beta$ CD y (B) DM $\beta$ CD.

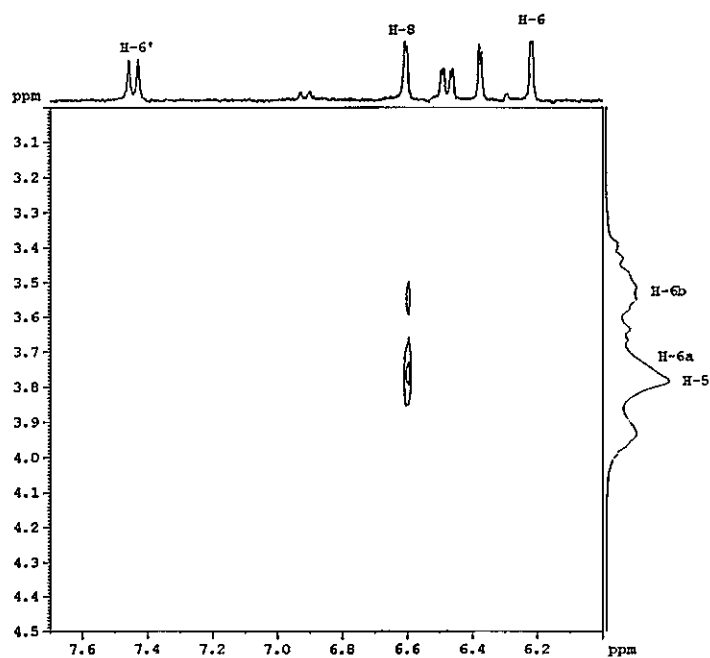


Figura 3.2.14  
Sección del espectro ROESY del complejo M-HP $\beta$ CD.

Para el caso del complejo M-HP $\beta$ CD, la sección del ROESY, figura 3.2.14, nos indica interacción del H-8 del anillo A de la morina con los hidrógenos internos de la ciclodextrina. De acuerdo a los espectros HSQC, corresponden a los hidrógenos H-5 y H-6 de la HP $\beta$ CD. La inclusión con respecto a la ciclodextrina nativa es prácticamente igual. La cromona se encuentra insertada en la cavidad apolar de la ciclodextrina, mientras que el grupo resorcinol se encuentra fuera de la cavidad por el lado angosto de la ciclodextrina. Estos datos corroboran lo concluido anteriormente por los espectros  $^1\text{H}$ -RMN, de que en el complejo con la HP $\beta$ CD, la inclusión es por el anillo A de la morina y se encuentra lo suficientemente incluido como para no intercambiar el H-8 de la morina con los deuterios del medio. Es importante recalcar que los grupos hidroxipropilos aumentan la cavidad de la ciclodextrina y este es uno de los motivos por los cuales el H-8 se encuentra más protegido a diferencia de la ciclodextrina nativa.

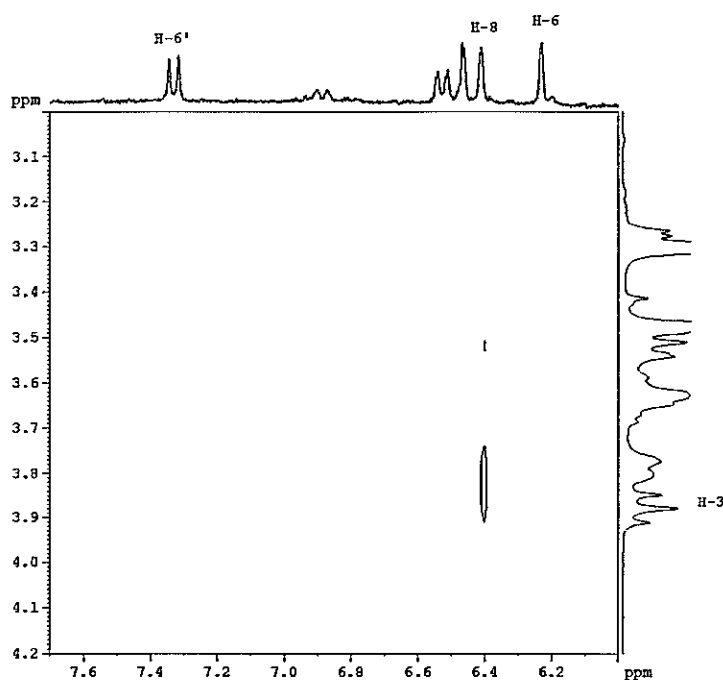


Figura 3.2.15  
Sección del espectro ROESY del complejo M-DM $\beta$ CD.

Para el caso del complejo con DM $\beta$ CD el espectro ROESY figura 3.2.15, observamos que solo el H-8 interacciona con los hidrógenos de la ciclodextrina internos, específicamente con el H-3. Indicando que el anillo B de la morina interacciona con los hidrógenos que se encuentran en el lado ancho de la DM $\beta$ CD, figura 3.2.13 (B). Esto nos estaría indicando que para la morina y las ciclodextrinas derivatizadas, hay presente dos tipos diferentes de inclusión.

Se hizo un estudio de modelación molecular del complejo de morina y  $\beta$ CD utilizando Autodock. Este estudio reveló que la orientación preferencial final encontrada está de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos por RMN. En la figura 3.2.16, observamos que el anillo B se encuentra orientado hacia el sitio de los hidroxilos primarios, mientras que los anillos A y C, se encuentran orientados hacia el lado ancho de la ciclodextrina.

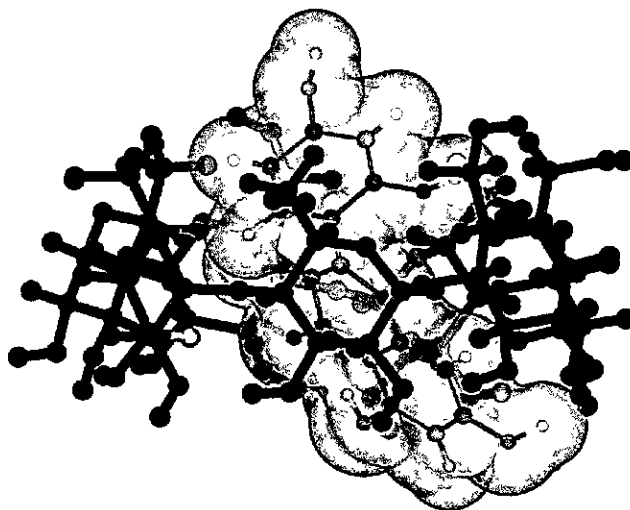


Figura 3.2.16  
Complejo de inclusión de M- $\beta$ CD a partir de estudios de docking.

También se efectuó optimización de geometría a nivel *ab initio* B3LYP obteniéndose una geometría análoga al sistema estudiado con Autodock. Se estimó la energía de interacción del sistema obteniéndose un valor de -28.7 Kcal/mol, el cual es concordante con interacciones del tipo puente de hidrógeno entre morina y  $\beta$ -ciclodextrina.

Respecto a la capacidad antioxidante de la morina y de sus complejos, los estudios hechos con  $ORAC_{FL}$  nos muestran como la morina y sus complejos retardan el decaimiento de la fluoresceína por consumir el ABAP presente, figura 3.2.17. De acuerdo a la gráfica de área bajo la curva (ABC) v/s concentración de complejo utilizado, se calcularon para cada uno de los complejos formados el  $T_{eq}$  para su posterior comparación. Estos resultados están presentados en la Tabla 3.2.3, donde se tienen los valores de las pendientes obtenidas de las graficas de decaimiento de la fluoresceína, los valores obtenidos de  $r^2$  y  $T_{EQ}$ . Como se esperaba, la morina tiene una actividad antioxidante mayor que el TROLOX, y junto con esto, presenta una actividad antioxidante menor que la quercetina, debido básicamente a que no tiene el grupo OH en la posición 3', que le da estabilidad a la forma radicalaria. Los complejos formados, presentan un aumento notable en la actividad antioxidante respecto a la morina libre, figura 3.2.18. Este aumento en la actividad antioxidante de la morina al formar complejos de inclusión con la ciclodextrina puede ser explicado en base a que el radical es estabilizado por la ciclodextrina. Alvarez-Parrilla et al.<sup>3</sup> encontraron un comportamiento similar al incluir quercetina y rutina en  $\beta$ CD. Los estudios de reactividad los hizo por la técnica FRAP y el aumento de reactividad observado es de alrededor de un 10 y 18% al formar los complejos de inclusión.



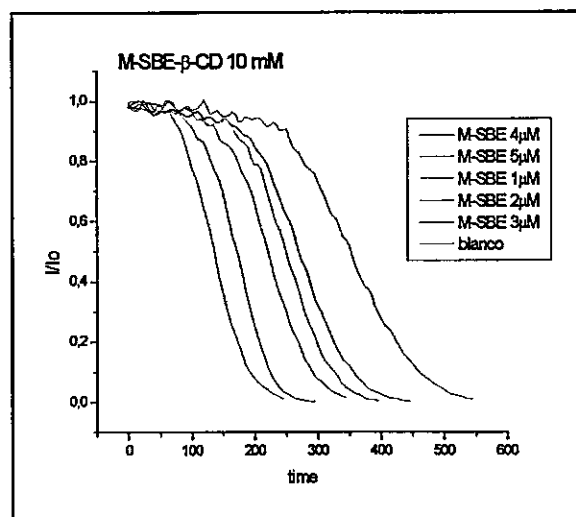


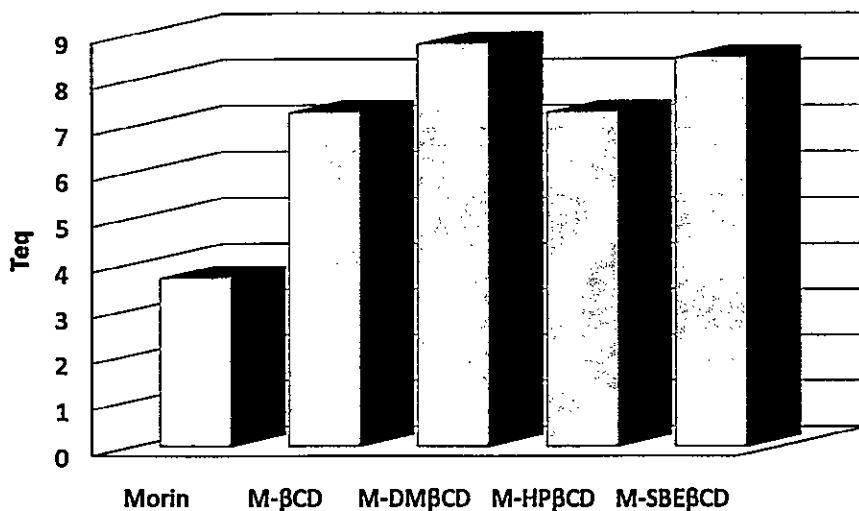
Figura 3.2.17

Decaimiento de fluoresceína del complejo M-SBEβCD a diferentes concentraciones (1μM-5μM).

Tabla 3.2.3

Valores de las pendientes obtenidas de las graficas ABC v/s concentración con sus valores de  $r^2$  y los  $T_{eq}$  para la morina y los complejos formados

Compuesto	Pendiente	$r^2$	$T_{eq}$
Trolox	$1.013 \cdot 10^7$	0.99176	1.0
Morina	$3.744 \cdot 10^7$	0.99938	3.7
M-βCD	$3.698 \cdot 10^7$	0.98881	7.3
M-HPβCD	$3.699 \cdot 10^7$	0.98883	7.3
M-DMβCD	$4.481 \cdot 10^7$	0.99348	8.8
M-SBEβCD	$4.33004 \cdot 10^7$	0.99571	8.5



**Figura 3.2.18**  
Trolox equivalente de morina y sus complejos con las diferentes ciclodextrinas.

Al determinar la actividad antioxidante por REE, (figura 3.2.19) vemos las señales características del radical DPPH. Aquí se observa como disminuye la intensidad de la señal en presencia de morina (A) en comparación a cuando se tiene el blanco (E). A diferencia de lo que se observa en presencia de los complejos de inclusión, en que la disminución de la señal del radical DPPH es menor para los complejos formados. Para mayor claridad, se grafica el área bajo la curva en porcentaje para el blanco, morina y los complejos de inclusión, figura 3.2.20. Aquí podremos decir, que la actividad antioxidante de los complejos disminuye con todas las ciclodextrinas. Como esta disminución varía de un 3 a un 10%, entonces se podría decir que la disminución de la actividad antioxidante de la morina al formar complejos es prácticamente nula y además independiente de la ciclodextrina utilizada.

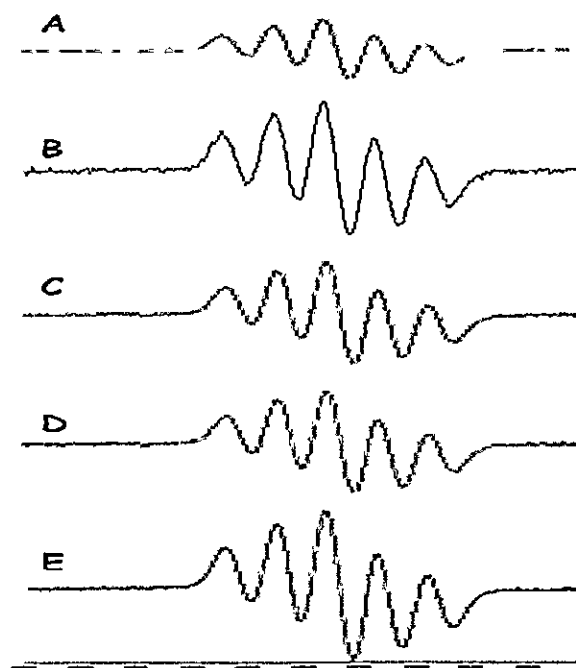


Figura 3.2.19  
Espectro REE del spin aducto entre radical DPPH y (A) morina; (B) M- $\beta$ CD; (C) M-HP $\beta$ CD; (D) M-DM $\beta$ CD; y (E) blanco.

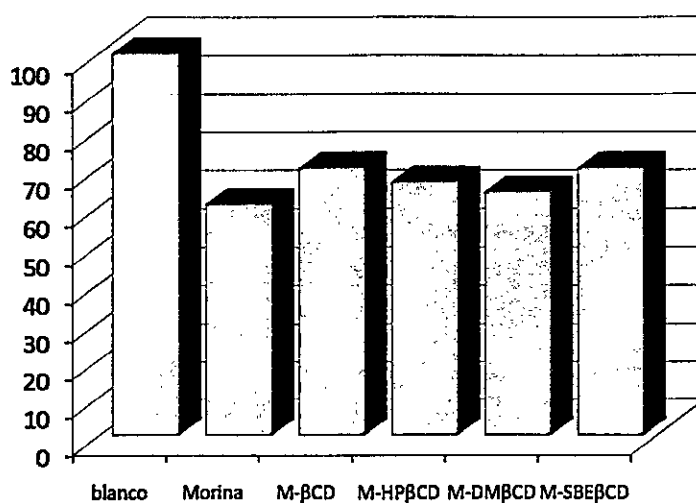


Figura 3.2.20  
Capacidad atrapadora del radical DPPH para la morina y sus complejos de inclusión. En todos los casos la concentración de morina es 0.5mM

Debido a los resultados sorprendentes de reactividad obtenidos, se procedió a hacer un estudio termodinámico de los complejos, que permitiera una racionalización y explicación de los valores experimentales. Este estudio consistió en determinar las constantes de asociación,  $K_a$ , a diferentes temperaturas por la metodología de solubilidad de fase, a cada uno de los complejos estudiados. En la Tabla 3.2.4, se tienen los valores de las constantes de asociación determinadas a 20, 25 y 30°C. Aquí se observa que para la formación del complejo de morina con DM $\beta$ CD el valor de las constantes de asociación disminuye con el aumento de la temperatura. Este mismo comportamiento ha sido reportado por Tommasini et al.<sup>5</sup> al incluir hesperetina y naringenina en  $\beta$ CD. Sin embargo, para los otros complejos formados con  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD el comportamiento es diferente.

Tabla 3.2.4

Constantes de asociación  $K_a$  para los complejos de inclusión de morina con  $\beta$ CD, DM $\beta$ CD e HP $\beta$ CD a diferentes temperaturas.

	$K_a$ [ $M^{-1}$ ] M- $\beta$ CD	$K_a$ [ $M^{-1}$ ] M-HP $\beta$ CD	$K_a$ [ $M^{-1}$ ] M-DM $\beta$ CD
20°C	200	1180	2090
25°C	396	1480	1700
30°C	500	1700	1400

<sup>5</sup> Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabró, M.L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P.; 2004, J. Pharm. Biomed. Anal., 35, 379.

Si graficamos  $\ln K_a$  v/s  $1/T$ , figura 3.2.21, para los tres complejos, de acuerdo a la ecuación integrada de van't Hoff :

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Obtenemos los valores de los cambios de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  a partir de la pendiente e intercepto respectivamente. En la gráfica se observa claramente que los valores de  $\Delta H$  obtenidos para los complejos con  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD son negativos, indicándonos que el proceso de formación de los complejos es endotérmico. Mientras que en la formación del complejo con DM $\beta$ CD, el  $\Delta H$  es positivo indicando que se trata de un proceso exotérmico.

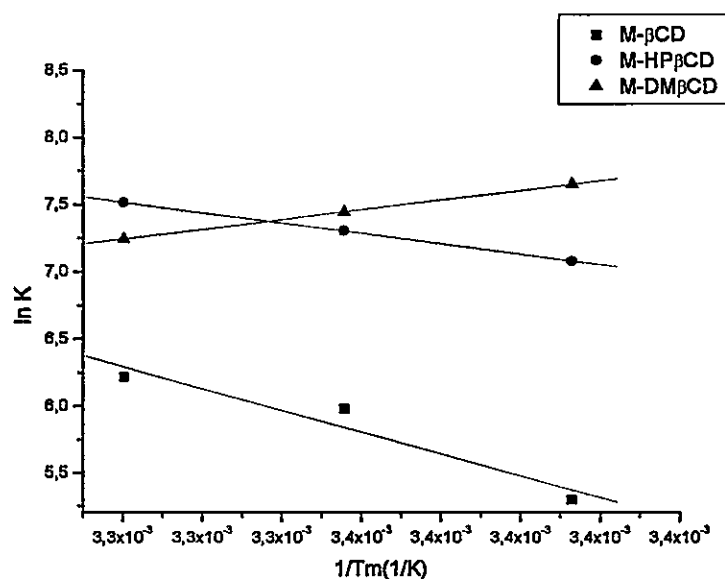


Figura 3.2.21

Gráficos de van't Hoff ( $\ln K$  v/s  $1/T$ ) de los complejos de morina con  $\beta$ CD, DM $\beta$ CD e HP $\beta$ CD.

Al determinar los valores de  $\Delta G$  para los tres complejos estudiados, se comprobó que para todos los casos es un proceso espontáneo ( $\Delta G < 0$ ).

En general, la formación de los complejos de inclusión está regido por interacciones del tipo puentes de hidrógenos con los hidroxilos exteriores de la ciclodextrina, interacciones van der Waals e interacciones hidrofóbicas. La mayoría de las veces la inclusión de una droga en la cavidad de la ciclodextrina es asociada a valores negativos de  $\Delta H$  y a valores de  $\Delta S$  negativos o levemente positivos, indicando que el proceso de inclusión no viene acompañado de un proceso de desolvatación, por lo que la reacción de inclusión es un proceso regido por la entalpía<sup>6</sup>. De acuerdo a la figura 3.2.22, solo el complejo formado con DM $\beta$ CD, tiene este comportamiento. Es decir, el término entálpico es el que prevalece en la formación del complejo de inclusión.

Sin embargo, para la morina incluida en la  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, los resultados obtenidos son diferentes. En estos casos, cuando el flavonoide se encuentra libre en solución, aparentemente presenta fuertes interacciones con el solvente. Una vez formado el complejo de inclusión, se produce un cambio desfavorable de entropía debido al rompimiento de la caja de solvatación, que se traduce a un valor positivo de  $\Delta S$ , indicando que la reacción de formación de complejos de inclusión para  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD está gobernada por el término de entropía.

---

<sup>6</sup> Martin del Valle, E.M.; 2004, *Process. Biochem.*, 39, 1033.

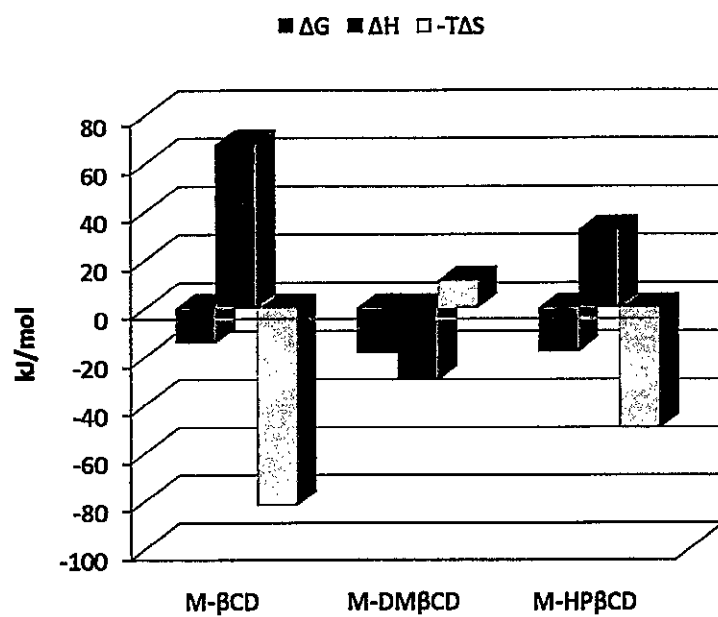


Figura 3.2.22

Energía libre ( $\Delta G^\circ$ ), entalpía ( $\Delta H^\circ$ ) y entropía ( $-T\Delta S^\circ$ ) para los complejos de inclusión de morina con  $\beta$ CD, DM $\beta$ CD e HP $\beta$ CD a 25°C.

### 3.3 COMPLEJOS CATEQUINA-CICLODEXTRINAS

Dentro de los flavonoides estudiados la Catequina corresponde a la familia de los flavanoles, los cuales no contienen el doble enlace en la posición 2-3 como tampoco tienen el grupo carbonilo en la posición 4. Se realizó la asignación completa de sus protones por medio de espectros COSY y HSQC. En la figura 3.3.1, se observan a campo alto dos dobledobletes que corresponden a los hidrógenos metilénicos que son no-equivalentes, H-4a y H-4b, con  $J = 7.8$  Hz,  $J = 5.2$  Hz y  $J = 16.0$  Hz. A campo más bajo se presenta un múltiplete que corresponde al hidrógeno H-3 de la CA, el cual acopla con ambos hidrógenos metilénicos con  $J = 7.8$  Hz,  $J = 5.2$  Hz y acopla con el hidrógeno H-2 con  $J = 5.0$  Hz, que no se observa debido a que se encuentra bajo la señal del agua, a 4.7 ppm. En la parte aromática, observamos claramente los dos sistemas de espín presentes. En 6 ppm se observan dos dobletes con una constante de acoplamiento de 2.3 Hz debidas a los hidrogenos del anillo A que se encuentran en posición *meta*. A campo más bajo, se encuentra un grupo de señales correspondientes al sistema de 3 espines del anillo B. Un dobledoblete debido al H-6' con constantes de acoplamiento de  $J = 2.0$  Hz y  $J = 8.3$  Hz. Luego el doblete con  $J = 8.3$  Hz correspondiente al H-5' y finalmente el doblete con  $J = 2.3$  Hz que corresponde al H-2'.

Estos resultados están de acuerdo a los reportados anteriormente<sup>1</sup>.

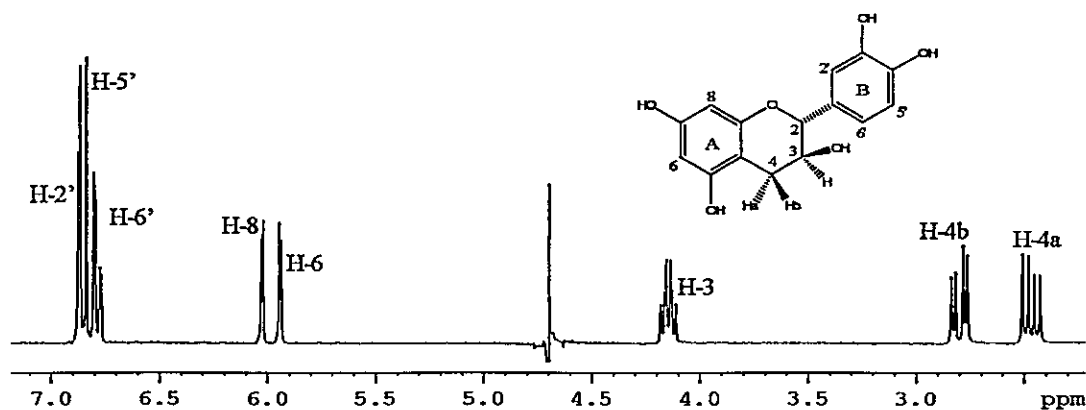


Figura 3.3.1  
Espectro <sup>1</sup>H-RMN de catequina en D<sub>2</sub>O.

<sup>1</sup> Hemingway R.W., Tobiason F.L., McGraw G.W., Steynberg J.P., 1996, Magn. Res. Chem. 34, 424-433



La preparación de los complejos siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, preparando los complejos con una relación molar 1:1. Dada la mayor solubilidad de la CA, los complejos se prepararon en D<sub>2</sub>O.

La inclusión de la CA en las diferentes ciclodextrinas está confirmada por los desplazamientos químicos de sus protones aromáticos, Tabla 3.3.1. Para los complejos CA-βCD y CA-DMβCD, se observa un mayor desplazamiento de los hidrógenos del anillo B a campo alto, producto de la inclusión. A su vez, el H-8 del complejo CA-DMβCD, presenta un notable corrimiento a campo alto respecto a los otros complejos formados, los cuales presentan el mismo desplazamiento químico con la formación del complejo. En la figura 3.3.2, se observa un ensanchamiento de las señales aromáticas de la CA al incluirse en las diferentes ciclodextrinas. Este ensanchamiento de las señales se debe a que la CA se encontraría más restringida y rígida dentro de la cavidad<sup>2,3</sup>.

Tabla 3.3.1

Desplazamiento químico (Hz) de los protones de la catequina al formar complejos con las diferentes ciclodextrinas

	CA-βCD (Hz) $\Delta\delta=(\delta_1 - \delta_{unlido})$	CA-HPβCD (Hz) $\Delta\delta=(\delta_1 - \delta_{unlido})$	CA-DMβCD (Hz) $\Delta\delta=(\delta_1 - \delta_{unlido})$	CA-SBEβCD (Hz) $\Delta\delta=(\delta_1 - \delta_{unlido})$
H-2'	36.83	24.12	42.0	22.8
H-5'	27.02	4.08	18.0	-5.34
H-6'	34.14	15.93	36.0	15.62
H-6	1.84	19.18	9.0	14.98
H-8	18.81	17.59	93.0	17.4

<sup>2</sup> Križ Z., Koča J., Imberty A., Charlot A., Auzély-Velty R. 2003, *Org. Biomol. Chem.* 1, 2590-2595.

<sup>3</sup> Ishizu T., Kintsu K., Yamamoto H., 1999, *J. Phys. Chem. B* 103, 8992-8997.

Mientras que entre 2 y 4 ppm se encuentran los protones alifáticos que corresponden a los hidrógenos del anillo C, de la catequina. Una vez incluida en la cavidad de las CDs, estos protones se ensanchan al igual que los hidrógenos aromáticos. Cabe notar que solo para el complejo de CA- $\beta$ CD se observa una disminución en el  $\Delta\delta$  entre ambos hidrógenos metilénicos, mientras que para el resto de los complejos prácticamente no se observa desplazamiento.

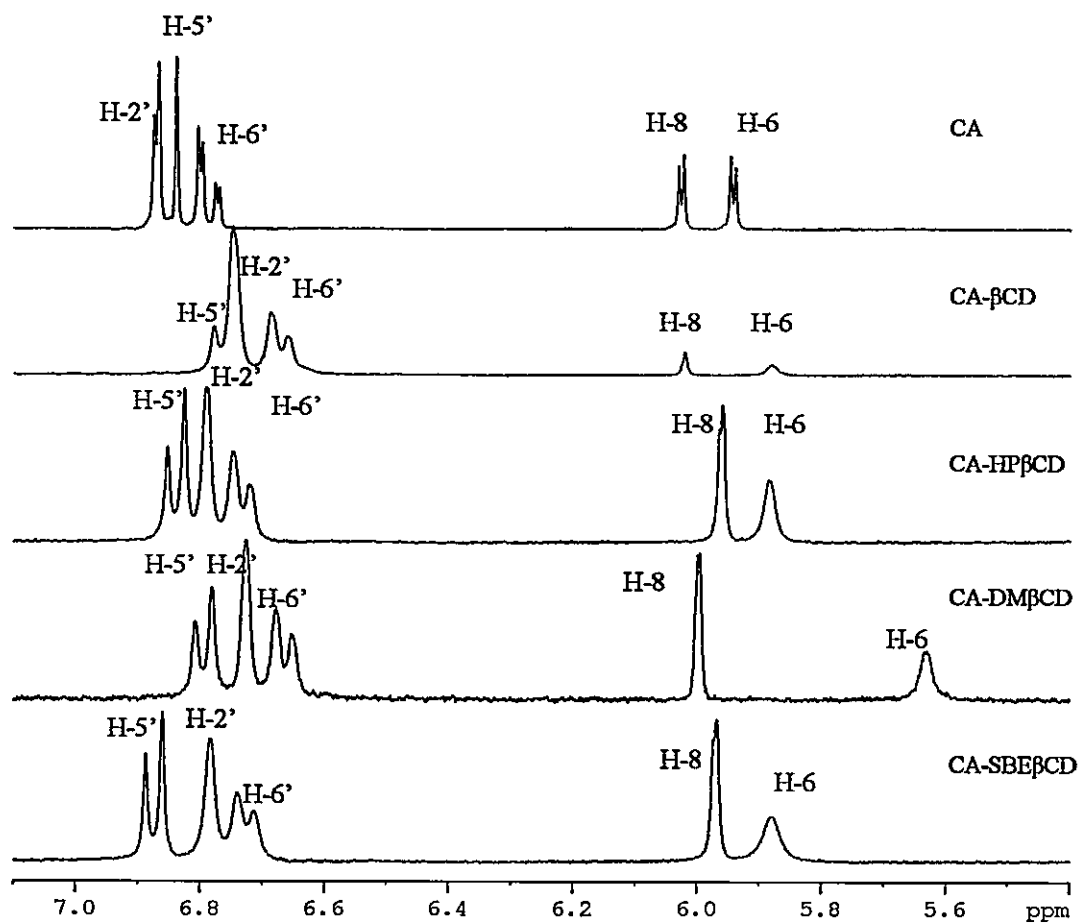


Figura 3.3.2  
Espectro <sup>1</sup>H-RMN de la parte aromática de CA, CA- $\beta$ CD, CA-HP $\beta$ CD, CA-DM $\beta$ CD y CA-SBE $\beta$ CD.

El espectro  $^1\text{H}$ -RMN de las ciclodextrinas difiere notablemente de cuando éstas se encuentran formando complejos y cuando se encuentran libres. Especialmente para el caso de la  $\beta\text{CD}$ , figura 3.3.3, donde los mayores desplazamientos se observan para los hidrógenos que se encuentran en la cavidad (H-3 y H-5). Este desplazamiento a campo alto es debido a la corriente anular de los anillos aromáticos de la catequina al encontrarse incluida en la cavidad hidrofóbica. También se observa un desplazamiento a campo alto de los H-6, que se encuentran en la zona exterior correspondientes a los hidroxilos primarios de la CD.

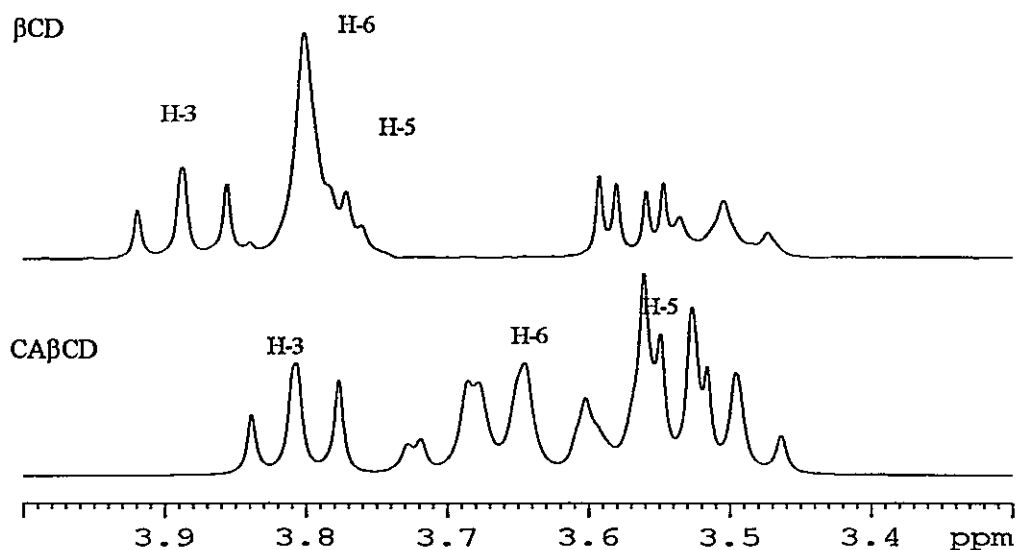


Figura 3.3.3  
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del complejo CA- $\beta\text{CD}$  y de  $\beta\text{CD}$ .

Al observar la zona del espectro que corresponde a la zona alifática para la HP $\beta\text{CD}$  y el complejo CA-HP $\beta\text{CD}$ , figura 3.3.4, se ve un cambio en el espectro por efecto de la inclusión del flavonoide. Pero, se hace difícil asignar cuales de los hidrógenos internos de la HP $\beta\text{CD}$  son desplazados por efecto de la inclusión, debido a que los 7 grupos

hidroxipropilos están sustituidos al azar en las posiciones 2,3 y 6 de la  $\beta$ CD, lo que hace difícil poder determinar los desplazamientos de los protones internos.

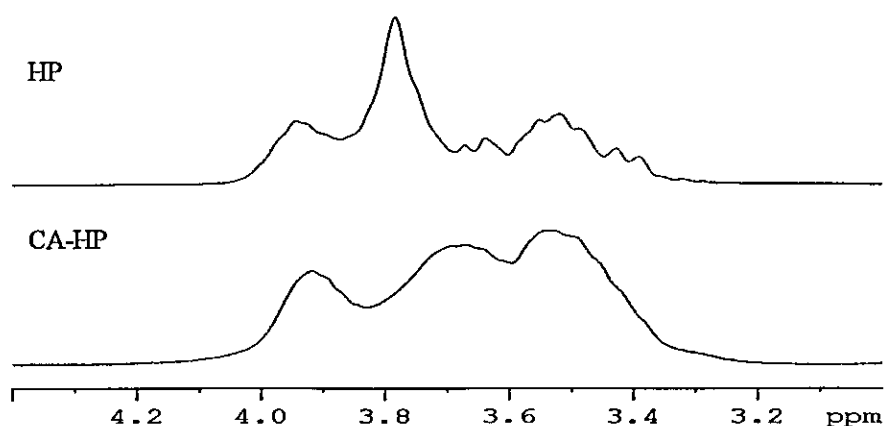


Figura 3.3.4  
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de  $\text{HP}\beta\text{CD}$  y del complejo  $\text{CA-HP}\beta\text{CD}$ .

Para elucidar cuales fueron los hidrógenos desplazados, se registraron espectros HSQC tanto para la  $\text{HP}\beta\text{CD}$  como para el complejo  $\text{CA-HP}\beta\text{CD}$ , figura 3.3.5. Claramente se observa que los H-5 de la  $\text{HP}\beta\text{CD}$  se desplazan a campo alto, mientras que para los H-3 y H-6 el desplazamiento es más leve. También se observa que los grupos metilénicos del hidroxipropil, que aparecen a 3.8 ppm para protones y 60.0 ppm en carbono, presentan un ensanchamiento al incluirse el flavonoide, lo que indicaría que estos hidrógenos estarían participando en la formación del complejo.

En la figura 3.3.6, se observa el espectro de protones de la  $\text{DM}\beta\text{CD}$  y del complejo. Se observa desplazamiento de algunas señales debidas a los hidrógenos internos por efecto de la inclusión del flavonoide. Para hacer una asignación inequívoca de los hidrógenos internos, se registraron los espectros HSQC tanto de la ciclodextrina como del complejo de inclusión.

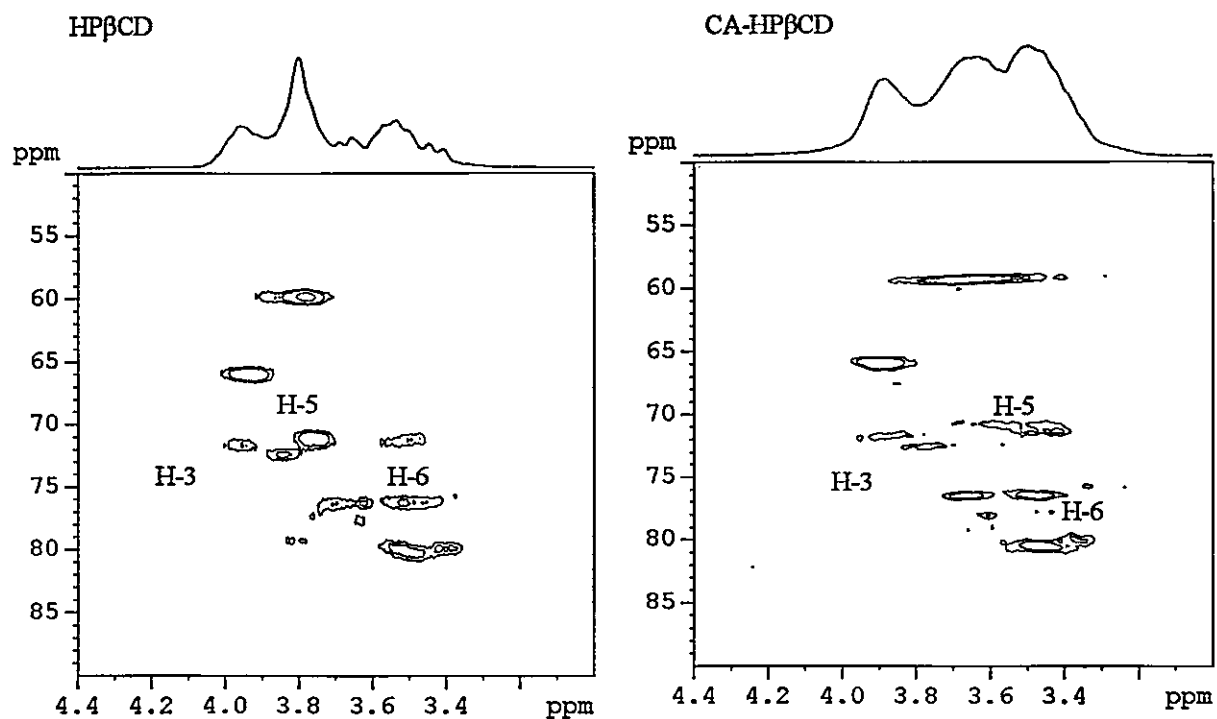


Figura 3.3.5  
Espectro HSQC para la HP $\beta$ CD, y para el complejo CA-HP $\beta$ CD en D<sub>2</sub>O a 298 K.

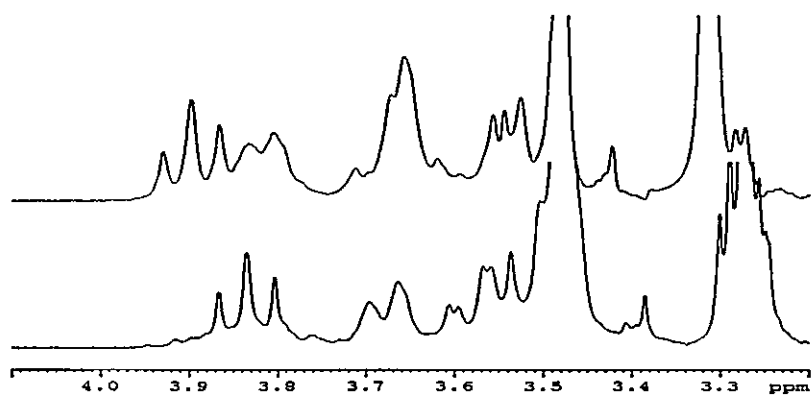


Figura 3.3.6  
Espectro <sup>1</sup>H-RMN de DM $\beta$ CD y del complejo CA-DM $\beta$ CD.

En la figura 3.3.7 se observa que por comparación, los mayores desplazamientos son para los H-5 y H-6 de la ciclodextrina. Llama la atención observar que los hidrógenos metilénicos de la ciclodextrina (H-6) prácticamente son equivalentes antes de la inclusión, mientras que al incluirse la catequina, estos hidrógenos se hacen no equivalentes, observándose que uno de ellos presenta un desplazamiento mayor a campo alto que el otro.

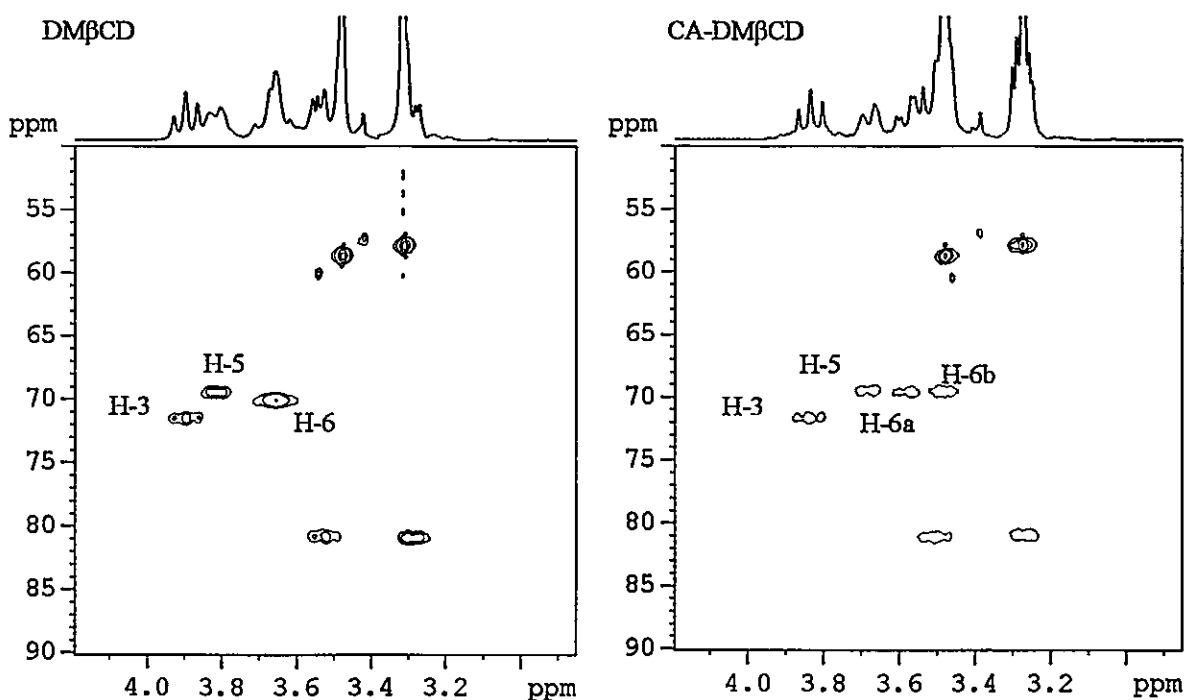


Figura 3.3.7

Espectro HSQC de DM $\beta$ CD y del complejo CA-DM $\beta$ CD en D<sub>2</sub>O a 298 K.

En la figura 3.3.8, se presenta la parte alifática tanto de la SBE $\beta$ CD como del complejo de inclusión. Se observa claramente un desplazamiento de las señales producto de la inclusión de la catequina en la cavidad apolar de la SBE $\beta$ CD. Debido a la superposición de señales debidas a los grupos sulfobutilos, no es fácil determinar cuáles son los

protones internos que sufren desplazamiento, aun con el espectro HSQC. Con lo cual no fue posible hacer una estimación de la geometría de inclusión de la catequina con esta ciclodextrina.

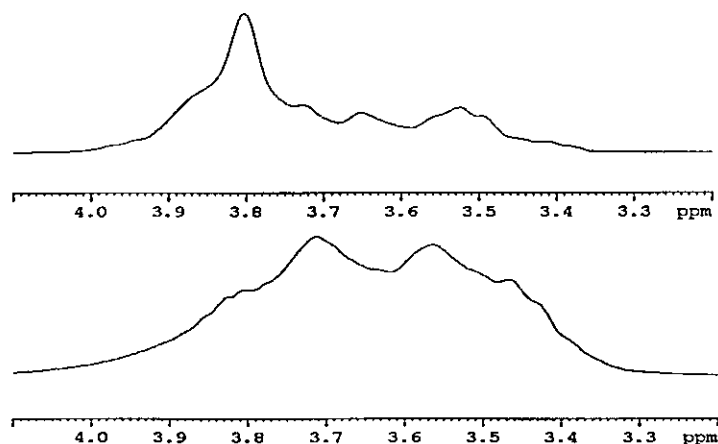


Figura 3.3.8  
Región alifática del espectro  $^1\text{H}$ -RMN de SBE $\beta$ CD y del complejo CA-SBE $\beta$ CD.

La estequiometría de los complejos de inclusión para esta familia, es determinada por el método de variación continua, Job plot<sup>4</sup>. Para el caso del complejo CA- $\beta$ CD, figura 3.3.9, se siguieron tanto los protones de la catequina, como los de la CD. Obteniéndose un máximo en ambos casos para  $r = 0.5$ , indicando claramente que la estequiometría del complejo es de 1:1. Para el resto de los complejos, solo se siguieron los desplazamientos de los protones aromáticos del anillo B (2', 5' y 6') de la catequina. Para las tres ciclodextrinas utilizadas el máximo fue de 0.5, figuras 3.3.10 - 3.3.11, indicando que para todos los complejos formados la estequiometría es de 1:1.

<sup>4</sup> Job P., 1928, Ann Chim., 9, 113

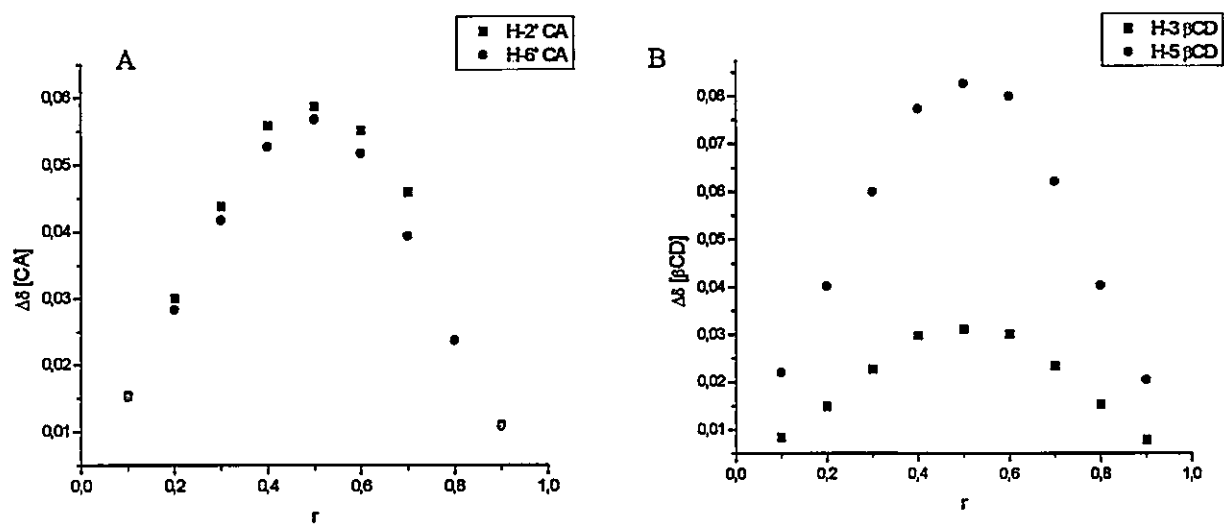


Figura 3.3.9

Gráfico de Job obtenido a partir de los desplazamientos de los protones de la catequina (A) y de los protones de la ciclodextrina (B).

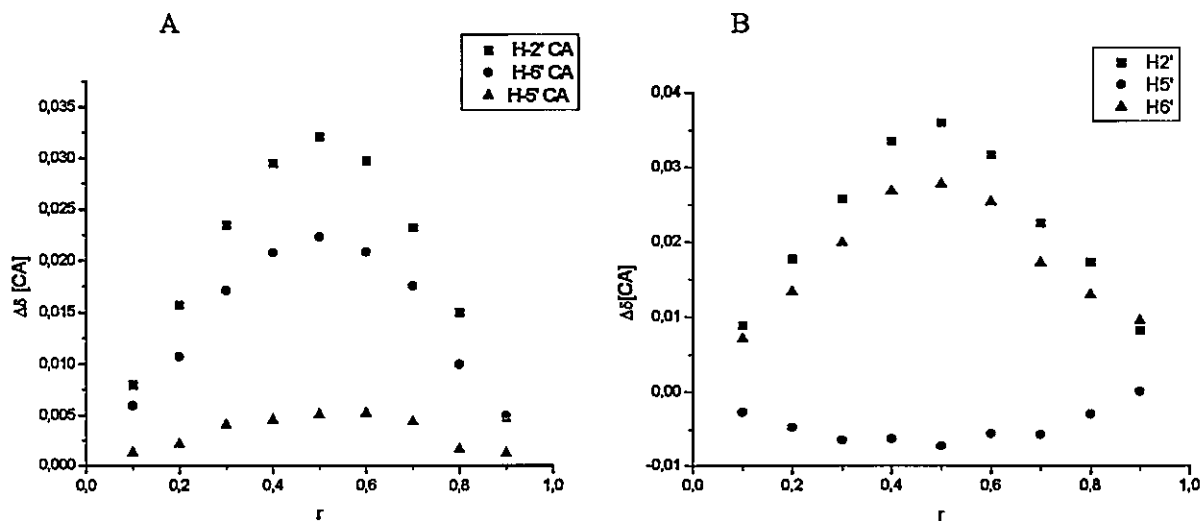


Figura 3.3.10

Gráfico de Job obtenido a partir de los desplazamientos de los protones de la catequina del complejo CA-HP $\beta$ CD (A) y del complejo CA-SBE $\beta$ CD (B)



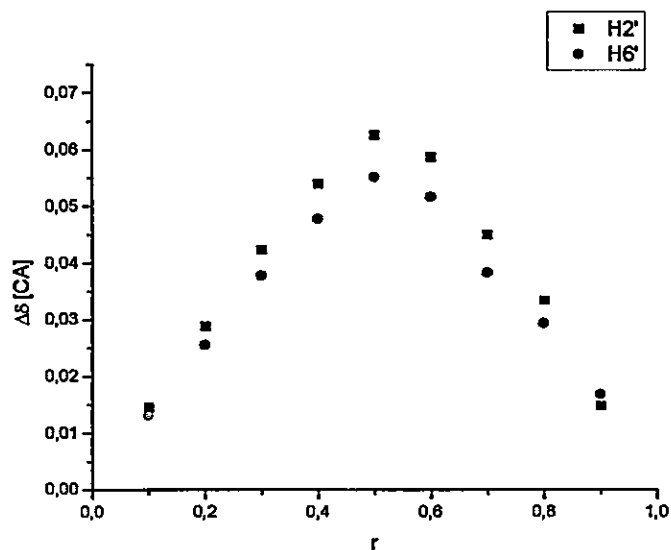


Figura 3.3.11

Gráfico de Job obtenido a partir de los desplazamientos de los protones de la catequina al formar el complejo con DM $\beta$ CD.

El cálculo de las  $K_a$  para las cuatro CDs se hizo por la metodología DOSY anteriormente descrita. Para ello se registraron espectros DOSY de las ciclodextrinas, de los complejos y de la catequina en  $D_2O$ , utilizando las ecuaciones 2.7 y 2.9 del Capítulo 2 de Materiales y Métodos, estimándose las  $K_a$  para cada uno de los complejos, Tabla 3.3.2.

Tabla 3.3.2

Valores obtenidos de los espectros DOSY registrados a 298K en D<sub>2</sub>O y sus valores de constante de asociación, K<sub>a</sub>

	$D_{\text{unido}}$ m <sup>2</sup> /s	$D_{\text{libre}}$ m <sup>2</sup> /s	$D_{\text{obs}}$ m <sup>2</sup> /s	$K_a$ M <sup>-1</sup>
CA-βCD	2.420 10 <sup>-10</sup>	4.04 10 <sup>-10</sup>	2.63 10 <sup>-10</sup>	21800
CA-HPβCD	2.125 10 <sup>-10</sup>	4.04 10 <sup>-10</sup>	2.51 10 <sup>-10</sup>	13580
CA-SBEβCD	1.729 10 <sup>-10</sup>	4.04 10 <sup>-10</sup>	2.13 10 <sup>-10</sup>	12080
CA-DMβCD	2.278 10 <sup>-10</sup>	4.04 10 <sup>-10</sup>	2.66 10 <sup>-10</sup>	3500

Un análisis de los espectros ROESY nos permite proponer una conformación para cada uno de los complejos estudiados. En el caso del complejo de catequina con βCD, figura 3.3.12, se observa claramente interacciones dipolares entre el H-2' de la catequina y el H-5 de la β-CD. Con menor intensidad se observa interacción de este mismo H-2' con el protón H-3 de la ciclodextrina. Luego, también se observa interacciones del protón H-6' de la catequina con el H-5 de la βCD y con bastante menor intensidad con el H-3 de la CD. Lo que está de acuerdo a lo observado en los espectros <sup>1</sup>H-RMN y a lo reportado por Kriz et al<sup>2</sup>, es decir el anillo B de la catequina se encuentra insertado profundamente dentro de la cavidad de la β-ciclodextrina, quedando el anillo A por el extremo de los hidroxilos secundarios, como se observa en la figura 3.3.13 A.

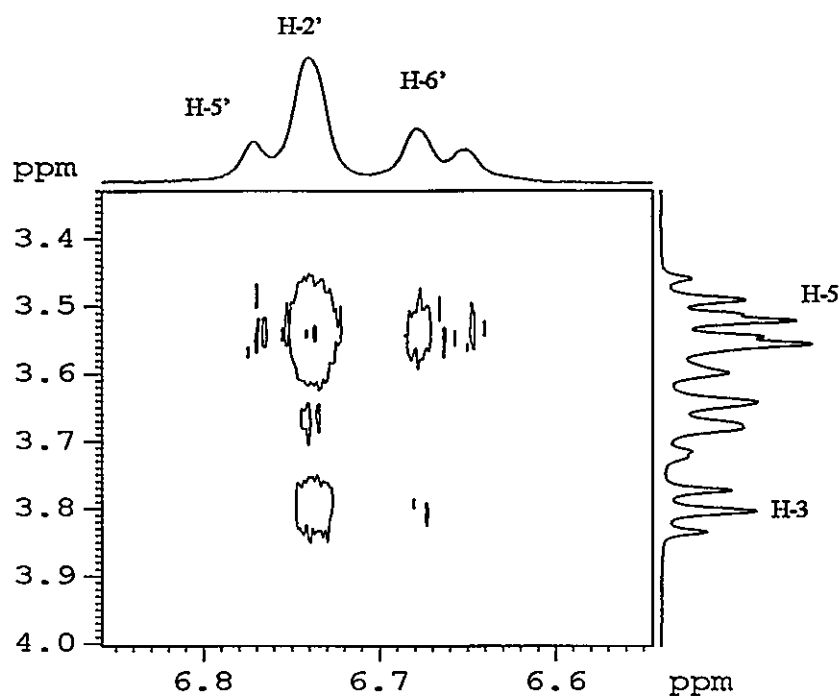
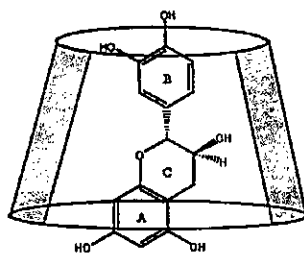


Figura 3.3.12  
Región del espectro ROESY del complejo CA- $\beta$ CD.

En el ROESY del complejo con HP $\beta$ CD, figura 3.3.14, se observan interacciones del H-2' de la catequina con hidrógenos de la HP $\beta$ CD, específicamente con el H-3 y con mucho menor intensidad con el H-5. Además, se observa interacción del anillo A, específicamente el hidrógeno H-6 de la catequina con los hidrógenos H-5 de la HP $\beta$ CD. Esto nos estaría indicando que el anillo A de la CA se encuentra cercano a los hidroxilos primarios y el anillo B se encuentra orientado en la zona de los hidroxilos secundarios, como se observa en la figura 3.3.13 (B). Podemos decir entonces que la inclusión de catequina en la ciclodextrina nativa y la sustituida toman geometrías diferentes.

Para el complejo formado con la DM $\beta$ CD, se observa en el ROESY, figura 3.3.15, básicamente que el H-2' del anillo B es prácticamente el que interacciona con casi todos los hidrógenos internos de la DM $\beta$ CD. Con mayor intensidad lo hace con los H-3 y bastante menos intenso con los H-5 y también se observa interacción con uno de los H-6 metilénicos. Esto nos indica nuevamente que el anillo B estaría preferentemente orientado hacia la zona de los hidroxilos secundarios. De acuerdo a lo visto por  $^1\text{H}$  RMN, el H-8 del anillo A, presentaba un desplazamiento inusual a campo alto, lo que se podría pensar que es debido a la cercanía que este hidrogeno tiene al encontrarse cercano a los metilos ubicados en la posición 6 de la ciclodextrina. Con lo cual se puede postular que la catequina se encuentra orientada con el anillo B hacia el lado ancho y el anillo A se encuentra hacia el lado angosto y sobresaliendo de la ciclodextrina.

(A)



(B)

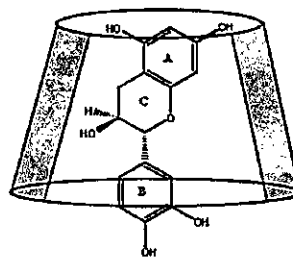


Figura 3.3.13

Esquema de inclusión de catequina en (A)  $\beta$ CD, y (B) HP $\beta$ CD, DM $\beta$ CD.

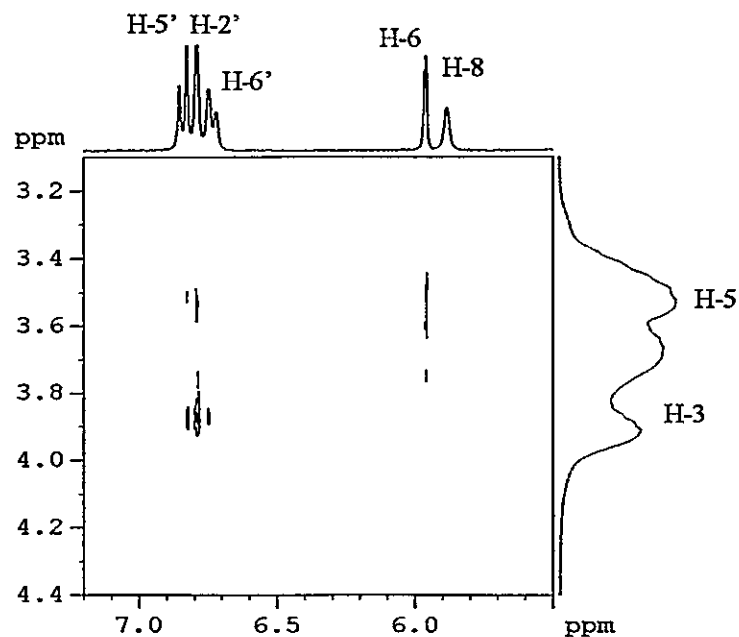


Figura 3.3.14  
Región del espectro ROESY del complejo CA-HP $\beta$ CD.

Para el caso de el complejo CA-SBE $\beta$ CD, figura 3.3.16, también se observa mayoritariamente interacción dipolar con el H-2' de la catequina con la SBE $\beta$ CD, siendo más difícil poder especificar con cual protón de la SBE interacciona.

Finalmente, podremos afirmar que para las ciclodextrinas derivatizadas, la catequina se incluye de forma diferente que con la ciclodextrina nativa. Lo cual nos estaría indicando que el hecho de sustituir la  $\beta$ -ciclodextrina ya sea con metilos, hidroxipropilos o sulfobutilos, la inclusión de la catequina en la cavidad hidrofóbica cambia respecto a cuando no hay sustituyentes, figura 3.3.13.

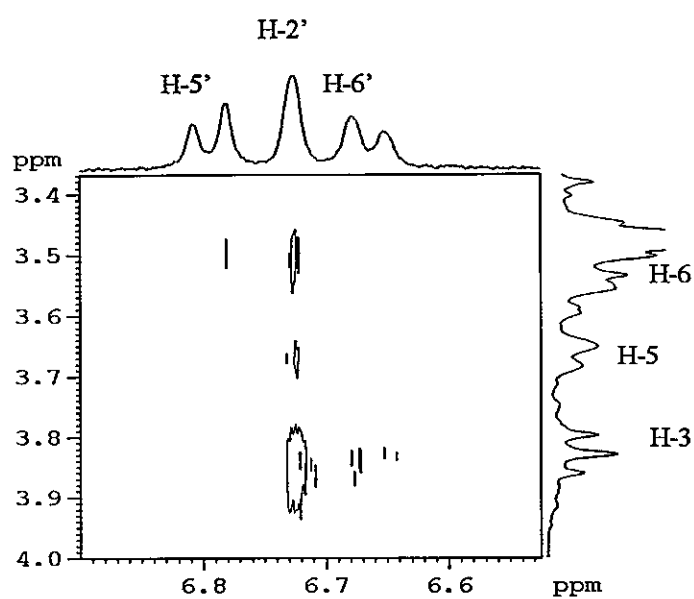


Figura 3.3.15  
Región del espectro ROESY del complejo CA-DM $\beta$ CD.

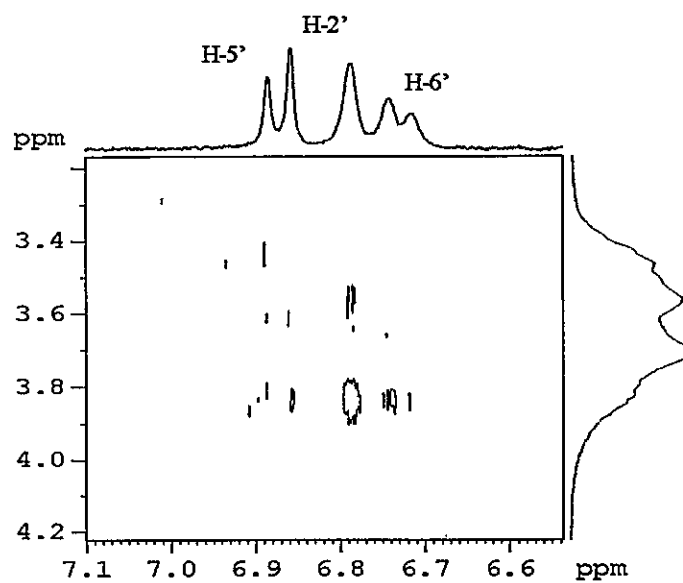


Figura 3.3.16  
Región del espectro ROESY del complejo CA-SBE $\beta$ CD.

Dado que para el caso de la catequina existe suficiente evidencia estructural, se procedió a racionalizar los datos estructurales con la modelación molecular de los complejos formados utilizando Autodock. Estos estudios revelan que para los complejos analizados es encontrada una orientación preferencial final independiente de la configuración inicial. Cabe notar que a pesar que no se fijaron distancias durante los cálculos, los resultados están totalmente de acuerdo a los obtenidos experimentalmente. A partir de los complejos obtenidos luego de la etapa de optimización es posible observar grandes diferencias entre las  $\beta$ CD sin sustituyentes y sus formas derivatizadas, principalmente en la orientación del ligando en el interior de la cavidad de la ciclodextrina. En el caso del complejo CA- $\beta$ CD, la conformación obtenida por modelación molecular esta en total acuerdo respecto a los resultados obtenidos por 2D-RMN. En la figura 3.3.17 (A) observamos que el anillo B se encuentra orientado hacia el sitio primario de los hidroxilos, mientras que el anillo A y C se encuentra orientado hacia el sitio de los hidroxilos secundarios, de forma tal, que el plano formado entre el anillo A y el plano de los oxigenos glicosidicos de la ciclodextrina es de  $45^\circ$ , figura 3.3. 18. Por otra parte, se observa que el anillo A se encuentra en gran parte fuera de la CD, dejando al hidrógeno 8 de este anillo a una distancia moderada de un hidrógeno 5 de la CD, mientras el hidrógeno 6 del anillo A, queda por completo orientado hacia fuera de la CD.

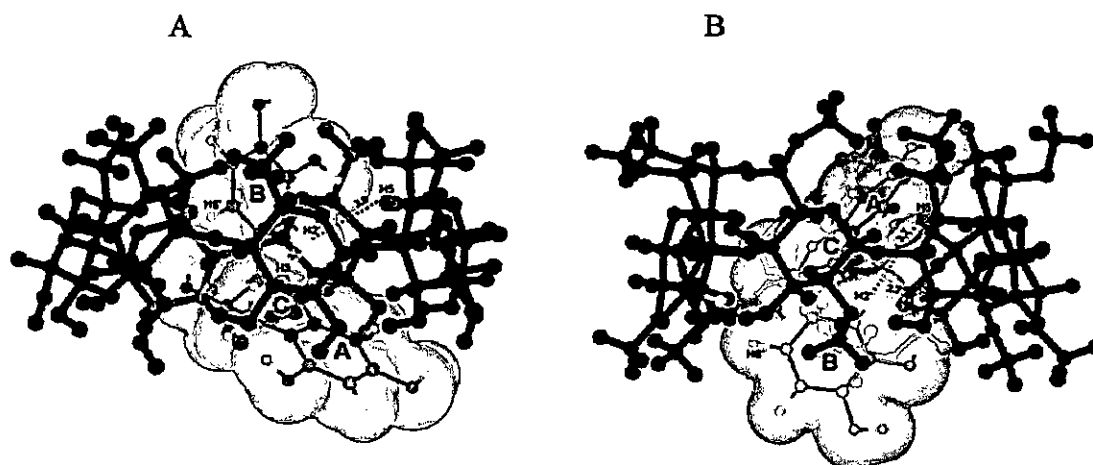


Figura 3.3.17  
Complejos de inclusión de CA con (A)  $\beta$ CD y con (B) DM $\beta$ CD a partir de estudios de docking.

De acuerdo con los resultados obtenidos de docking para el complejo con DM $\beta$ CD, figura 3.3.17 (B), observamos que el anillo B de la catequina se encuentra orientado hacia el sitio de los hidroxilos secundarios. Indicando que la catequina se encuentra inserta en la cavidad de la DM $\beta$ CD en una posición diferente que para la  $\beta$ -ciclodextrina. Del espectro ROESY, figura 3.3.15, podemos inferir que el H-2' de la CA se encuentra más próximo al H-3 que al H-5 de la DM $\beta$ CD, y por modelación molecular hemos determinado que sus distancias son 2.7 y 3.7 Å respectivamente. El anillo A de la catequina se encuentra orientado en un ángulo cercano a 45° respecto al plano formado por los oxígenos glicosídicos de las unidades de glucopiranosas. Cabe notar que los anillos A y C se encuentran totalmente incluidos en la cavidad de la ciclodextrina, mientras que el anillo B se encuentra más expuesto. Nuevamente esto está de acuerdo a lo observado experimentalmente, ya que el gran apantallamiento observado para el H-8 del anillo A, figura 3.3.2, debida a la inclusión de la catequina en la DM $\beta$ CD, puede ser debida a su proximidad con los protones metilénicos de las subunidades de glucopiranosas.

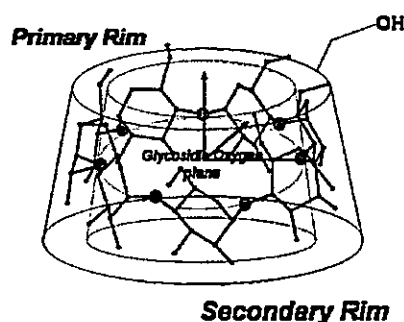


Figura 3.3.18  
Plano formado por los oxígenos glicosídicos de la  $\beta$ -ciclodextrina.

El complejo formado de la CA con la HP $\beta$ CD, tiene el mismo comportamiento que el anterior, los anillos A y C se encuentran dentro de la cavidad de la ciclodextrina dejando



los H-6 y H-8 cercanos a los H-3 y H-5 de la ciclodextrina, mientras que el anillo B se encuentra orientado hacia el exterior.

Debido a la sustitución aleatoria que tiene la SBE $\beta$ CD, no fue posible hacerle los estudios de docking, pero podremos inferir en base a los datos experimentales y a los datos teóricos que la inclusión sería de igual forma que para la DM $\beta$ CD y HP $\beta$ CD. Por lo tanto, la catequina se incluye de diferente forma a la ciclodextrina cuando esta se encuentra nativa y que cuando esta se encuentra derivatizada.

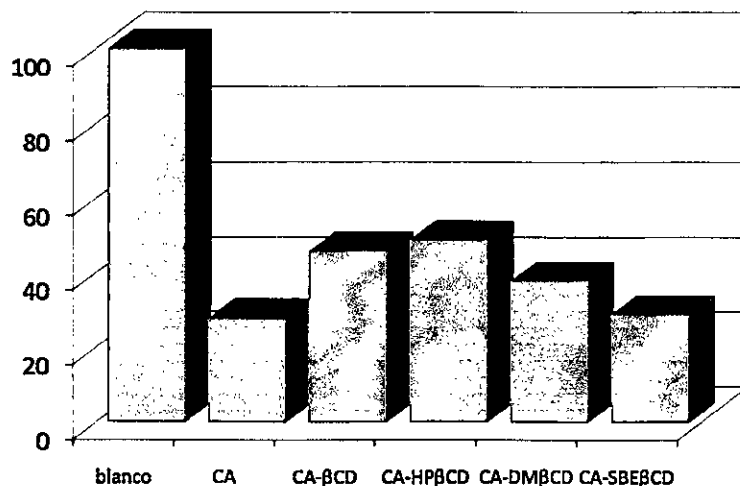


Figura 3.3.19,  
Disminución de la señal REE correspondiente al DPPH de la catequina libre y acomplejada con las diferentes CDs.

Acerca de los estudios mecánico-cuánticos, se efectuó la optimización de geometría nivel *ab initio* B3LYP/6-31G\* y HF/6-31G\* obteniéndose una geometría análoga al sistema estudiado por Autodock, donde la orientación de menor energía, corresponde al anillo A, proyectado hacia los hidroxilos secundarios, mientras que el anillo B de la catequina se encuentra orientado hacia el lado angosto de la ciclodextrina. En el transcurso de la realización de éstos cálculos, Yan et al.<sup>5</sup> publicaron los mismos estudios planificados en esta tesis. Determinaron el camino de reacción por PM3 y luego en el punto de menor energía hicieron los cálculos con B3LYP/6-31G\*. sin embargo, la estructura más estable obtenida por ellos es la misma que obtuvimos en esta tesis por RMN, Autodock y estudios mecano-cuánticos.

Con respecto a la reactividad, en la figura 3.3.19, observamos como disminuye las señales REE del radical DPPH cuando se encuentra en presencia de la catequina producto de las características antioxidantes del flavonoide. En cambio, para los complejos de inclusión, se observa una pérdida de reactividad por efecto de la inclusión. Esto podría ser explicado debido a que como el anillo B de la catequina reacciona con dos moles de DPPH<sup>6</sup> para formar una estructura de quinona, y si el gasto de DPPH es menor que con la CA libre, nos estaría indicando, que la ciclodextrina protege a la catequina ante la oxidación, indistinta la ciclodextrina utilizada en la formación del complejo. La reactividad de la catequina en los complejos no sigue ningún patrón. Pues el complejo con menor reactividad corresponde a la HP $\beta$ CD y el de mayor reactividad al de la SBE $\beta$ CD (que sería el más parecido a la CA libre). A diferencia de la  $\beta$ CD que casi tiene la misma reactividad que la HP $\beta$ CD, siendo que la geometría de inclusión es diferente. Entonces, podremos decir, como conclusión que la reactividad de los complejos con catequina por la técnica REE con DPPH disminuye respecto a la catequina libre.

<sup>5</sup> Chunli Yan, Zhilong Xiu, Xiaohui Li y Ce Hao., 2007, J. Mol. Graph. Model., 26, 420-428.

<sup>6</sup> Sawai Y., Sakata K. 1998, J. Agric. Food Chem., 46, 11-114.

Tabal 3.3.3

Valores de las pendientes obtenidas de las graficas ABC v/s concentración con sus valores de  $r^2$  y los  $T_{eq}$  para la catequina y los complejos formados

Compuesto	Pendiente	$r^2$	$T_{eq}$
Trolox	$1.013 \cdot 10^7$	0.99176	1.00
Catequina	$4.124 \cdot 10^7$	0.99394	4.1
CA- $\beta$ -CD 1:10	$3.911 \cdot 10^7$	0.99923	3.9
CA-HP- $\beta$ -CD 1:10	$4.319 \cdot 10^7$	0.99336	4.3
CA-DM- $\beta$ -CD 1:10	$4.095 \cdot 10^7$	0.98137	4.0
CA-SBE- $\beta$ -CD 1:10	$3.547 \cdot 10^7$	0.99615	3.5

Por medio de la técnica  $ORAC_{FL}$  se evaluó la capacidad antioxidante tanto de la catequina como de sus complejos. En la Tabla 3.3.3 se observa el Trolox equivalente para catequina libre y formando complejos con las diferentes ciclodextrinas. En la Figura 3.3.20 se ve claramente el comportamiento que hay respecto a la actividad antioxidante de la catequina y sus complejos. La catequina tiene una actividad mayor que Trolox, pero esta actividad se ve levemente disminuida al formar los complejos. A grandes rasgos, podríamos decir que para las cuatro ciclodextrinas estudiadas, la actividad de la catequina se mantiene o disminuye un leve porcentaje al formar los complejos de inclusión. Vemos que la geometría de inclusión tiene una dependencia con la ciclodextrina utilizada, este hecho no tiene incidencia sobre la actividad antioxidante en la catequina. El comportamiento visto con DPPH sigue la misma tendencia, disminuye la actividad y no se observa correlación con la geometría de inclusión.

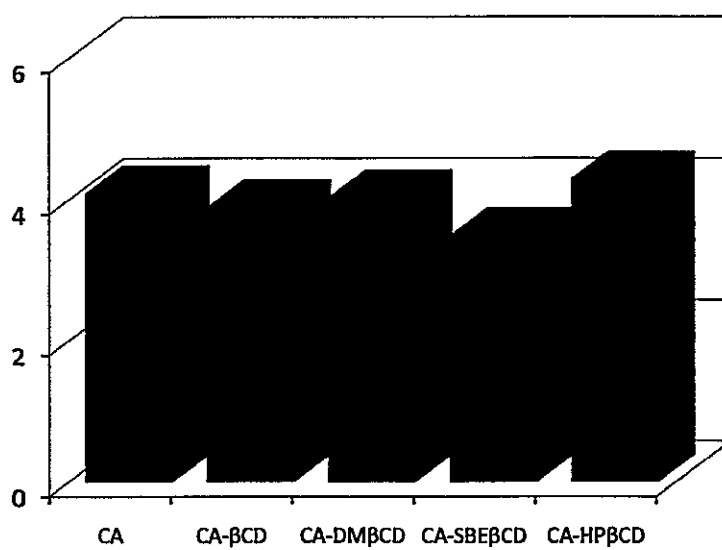


Figura 3.3.20  
 $T_{eq}$  de catequina y sus complejos con las diferentes ciclodextrinas.

### 3.4 COMPLEJOS GALANGINA-CICLODEXTRINA

Sabiendo que la presencia de los grupos hidroxilos en el anillo B potencian la actividad antioxidante de los flavonoles, se utilizó galangina, flavonol que no presenta hidroxilos en este anillo, figura 3.4.1.

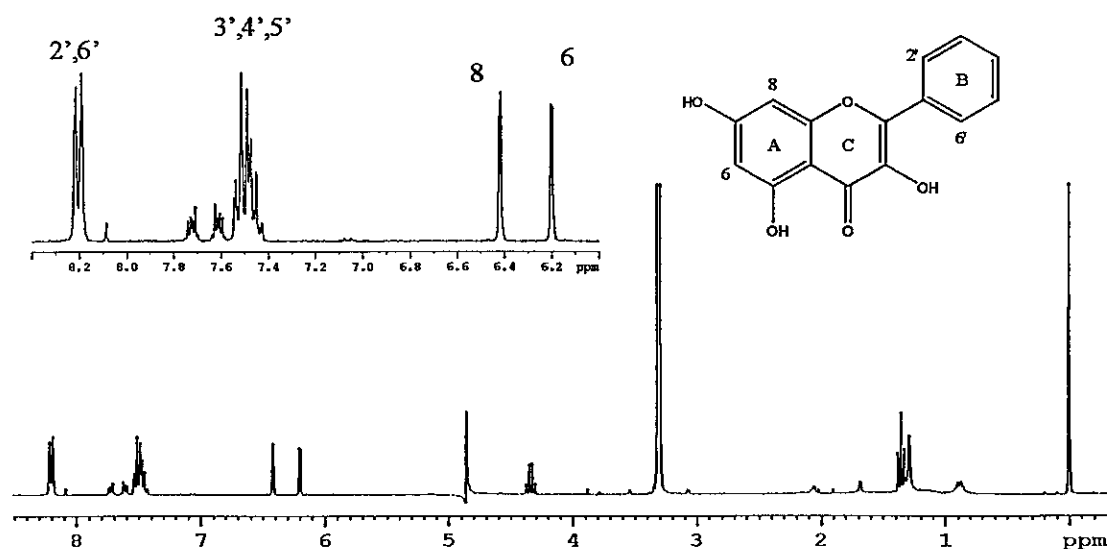


Figura 3.4.1  
Espectro <sup>1</sup>H-RMN de galangina en MeOD.

Debido a que la solubilidad de la galangina es muy baja en solución acuosa, se le registró el espectro <sup>1</sup>H-RMN en MeOD, para hacer su asignación espectroscópica, figura 3.4.1. Las constantes de acoplamiento para los protones del anillo A, son de  $J = 2.1$  Hz, mientras que para el anillo B son  $J = 8.8$  y  $J = 1.5$  Hz. Debido a la baja solubilidad de la galangina, no se observan por <sup>1</sup>H-RMN las señales correspondientes a la galangina incluida en las diferentes ciclodextrinas. Por ello, se realizaron los experimentos de solubilidad de fase para confirmar la formación de los complejos de inclusión. En la figura 3.4.2 se observa claramente como aumenta la solubilidad de la galangina en presencia de cantidades crecientes de ciclodextrina. Es más, el aumento de solubilidad

de la galangina en presencia de la  $\beta$ -ciclodextrina aumenta alrededor de 10 veces, mientras que para la DM $\beta$ CD, la solubilidad aumenta alrededor de 200 veces.

En la grafica de galangina disuelta v/s concentración de ciclodextrina, figura 3.4.3, vemos para todos los casos estudiados, una linealidad creciente con el aumento de ciclodextrina. Lo que nos indica que corresponden a diagramas de tipo  $A_L$ , por lo que la estequiometria para todos los complejos formados corresponde a 1:1.

En la tabla 3.4.1 observamos que los valores de las  $K_a$  obtenidas por esta metodología, siguen la siguiente tendencia  $\beta$ CD < HP- $\beta$ CD < SBE- $\beta$ CD < DM- $\beta$ CD. Se observa claramente como aumenta el valor de la  $K_a$  a medida que aumenta el grupo derivatizado en la ciclodextrina, a excepción del caso de la dimetil $\beta$ ciclodextrina.

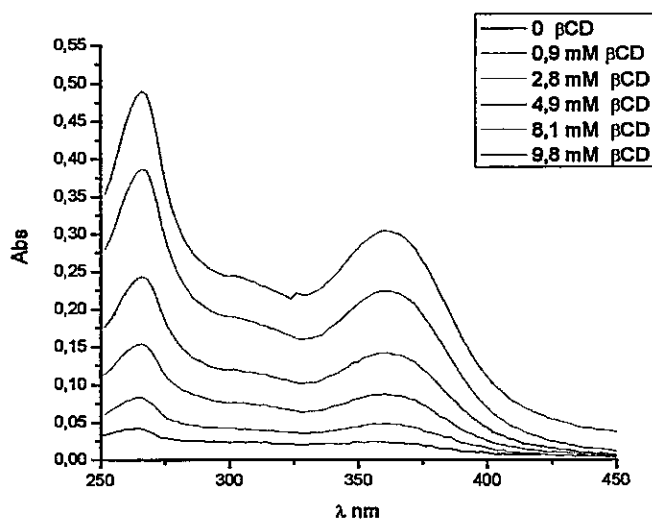


Figura 3.4.2  
Espectros de absorción de galangina a diferentes concentraciones de  $\beta$ CD

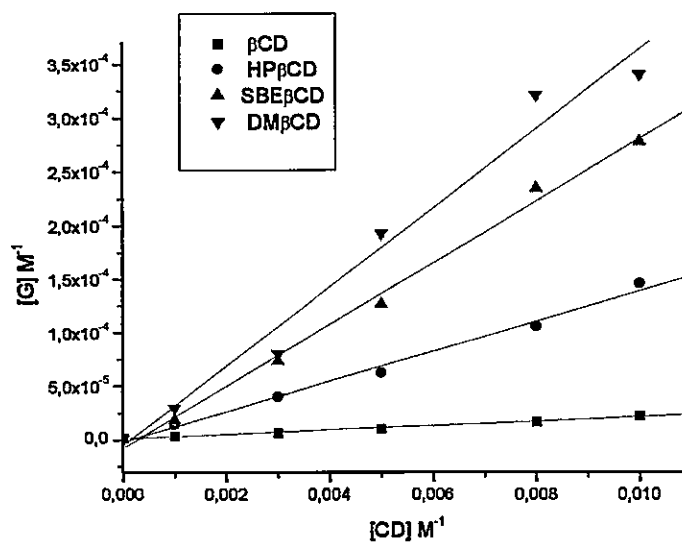


Figura 3.4.3

Grafico de concentración de ciclodextrina ( $\beta$ CD, HP $\beta$ CD, SBE  $\beta$ CD y DM  $\beta$ CD) en función de galangina disuelta.

Tabla 3.4.1

Valores de  $K_a$  obtenidos por método de solubilidad de fase.

Complejo	$K_a$ (M <sup>-1</sup> ) (UV)
G- $\beta$ CD	1770
G-HP $\beta$ CD	12680
G-SBE $\beta$ CD	26420
G-DMCD	34090

Para hacer el estudio conformacional de estos complejos, se preparó una solución de ciclodextrina 5mM en D<sub>2</sub>O y se le agregó un exceso de galangina. Se mantuvo en agitación mecánica a temperatura constante por 24 hrs. Se filtró y se le registraron los espectro 2D correspondientes. En la figura 3.4.4, vemos una sección del espectro ROESY registrado al complejo G-DM $\beta$ CD. De acuerdo a este espectro, observamos que el doblete a campo bajo, que corresponde a los hidrógenos 2' y 6' del anillo B, interaccionan con el H-3 de la DM $\beta$ CD, indicándonos que el anillo B es el que se encuentra incluido por el sitio de hidroxilos secundarios, es decir por el lado ancho de la ciclodextrina, como se observa en el esquema (A) de la figura 3.4.5. .

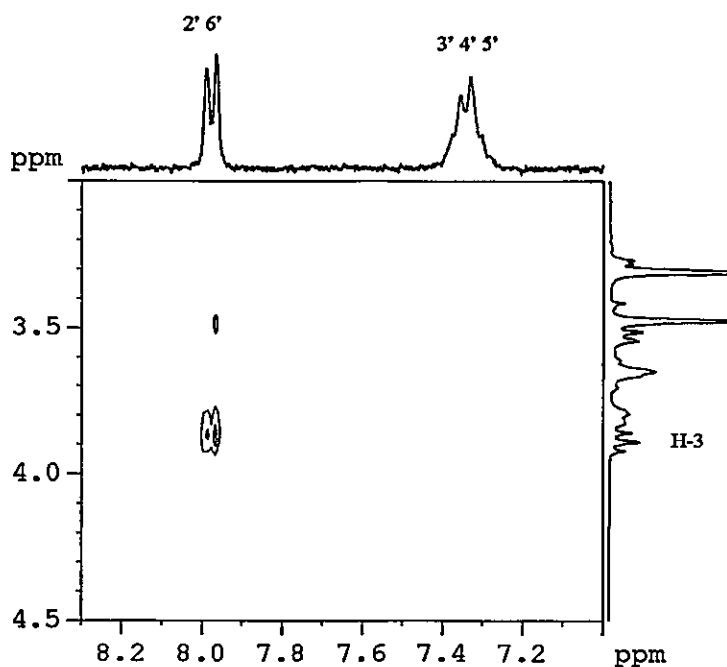


Figura 3.4.4  
Sección del espectro ROESY del complejo G-DM $\beta$ CD.



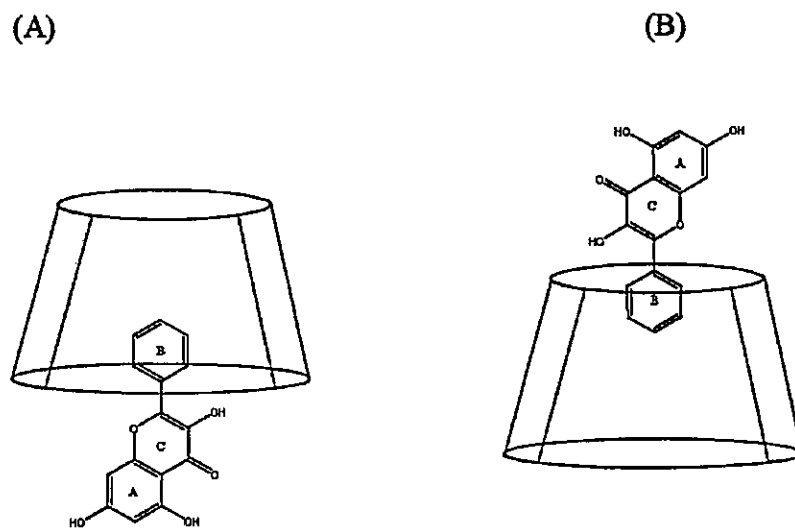


Figura 3.4.5  
Esquema de inclusión de galangina en (A) DM $\beta$ CD y (B) en HP $\beta$ CD.

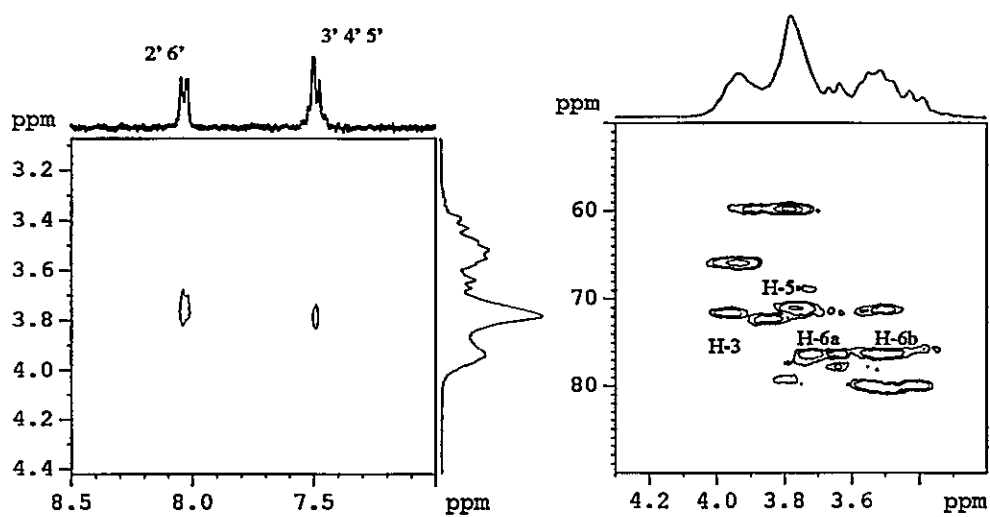


Figura 3.4.6  
Sección del espectro ROESY del complejo G-HP $\beta$ CD y espectro HSQC del complejo G-HP $\beta$ CD.

Para el caso del complejo de galangina con HP $\beta$ CD, se observa en la figura 3.4.6 interacción espacial entre todos los hidrógenos del anillo B con la ciclodextrina, más específicamente con los hidrógenos H-5/H-6a, indicándonos que la galangina se incluye por el lado contrario a la DM $\beta$ CD, es decir, el anillo B de la galangina se encuentra incluido por el lado de los hidroxilos primarios, figura 3.4.5 (B). La asignación de los hidrógenos internos de la HP $\beta$ CD fue hecho de acuerdo al espectro HSQC del complejo. Aquí nuevamente se observa un ensanchamiento de la señal del metileno de los hidroxipropilos, indicándonos su participación en la inclusión. Junto con esto, observamos además, que la señal del metileno de la ciclodextrina (H-6), ambos hidrógenos se hacen no equivalentes por la presencia de la galangina al igual que para la formación del complejo de CA-DM $\beta$ CD.

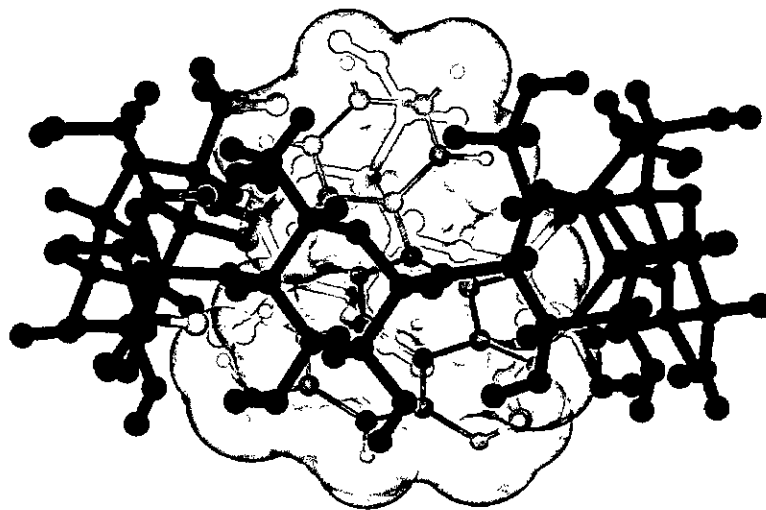


Figura 3.4.7

Complejo de inclusión de G- $\beta$ CD a partir de estudios de docking

Vemos entonces, que el anillo B de la galangina es el que se incluye en la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas, a pesar que para un caso se incluye por el lado ancho y para el otro por el lado angosto de la CD, figura 3.4.5 (A y B). Esto puede ser debido a que como el anillo B no presenta grupos hidroxilos, lo hace un mejor hospedero en la cavidad de la ciclodextrina. Debido a la baja solubilidad de la galangina y su baja constante de asociación con  $\beta$ CD, no se pudo obtener el espectro ROESY para este complejo. Por ello, se realizaron los estudios de modelación molecular, para este flavonoide con la ciclodextrina nativa, los cuales revelaron una orientación preferencial para la galangina, incluida en la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina. El anillo B se encuentra orientado hacia el lado angosto de la ciclodextrina, mientras que la cromona se encuentra hacia el lado ancho de la ciclodextrina, con los hidroxilos de la galangina de las posiciones 5 y 7, orientados hacia el exterior, figura 3.4.7. Es decir, la inclusión de la galangina en la  $\beta$ CD, sería como la de la DM $\beta$ CD.

Tabla 3.4.2

Valores de las pendientes obtenidas de las gráficas ABC v/s concentración con sus valores  $r^2$  y los  $T_{eq}$  para la galangina y el complejo G-DM $\beta$ CD.

Compuesto	Pendiente	$r^2$	$T_{eq}$
Trolox	$1.013 \cdot 10^7$	0.99176	1.0
Galangina	$4.401 \cdot 10^7$	0.98992	3.0
G-DM $\beta$ CD	$7.392 \cdot 10^7$	0.99599	7.3

En la evaluación de la capacidad antioxidante de la galangina, se procedió a preparar los complejos para el estudio de reactividad, determinando los valores de Trolox equivalente. Lamentablemente la galangina precipitaba debido a su baja solubilidad en solución acuosa, lo que no permitió el análisis  $ORAC_{FL}$  para todos los complejos. Al observar los valores obtenidos para este flavonoide, Tabla 3.4.2, vemos que la actividad de la galangina es menor en comparación a los otros flavonoides estudiados, básicamente debido a que éste no presenta los hidroxilos en el anillo B.

Al complejo formado que se le determinó su actividad antioxidante fue a la G-DM $\beta$ CD. Este complejo retardó el decaimiento de la fluoresceína más aun que para la galangina sola, indicando entonces que la galangina aumenta su reactividad al formar el complejo, al igual que para los complejos con morina. Este aumento de reactividad es más del doble, por lo tanto la inclusión de galangina en ciclodextrinas cumple un rol preponderante. Pues además de aumentar la solubilidad, y por ende la biosiponibilidad, estamos aumentando su capacidad antioxidante a más del doble, en comparación con la galangina libre en solución acuosa.

## CAPITULO 4

### CONCLUSIONES

La formación de los complejos de inclusión de los flavonoides con las ciclodextrinas, nos permitió aumentar la solubilidad en fase acuosa de los diferentes flavonoides.

Por medio de la técnica de solubilidad de fase, se observó que las ciclodextrinas derivatizadas aumentan en mayor grado la solubilidad en comparación con la ciclodextrina nativa, sin seguir un orden determinado.

El incremento de solubilidad para la morina y quercetina es aproximadamente del mismo orden, aumentando 5 veces con la  $\beta$ CD hasta 70 veces con la SBE $\beta$ CD. Mientras que para la galangina, el orden de aumento de solubilidad fue aun mayor, pues la  $\beta$ CD aumentó hasta 20 veces la solubilidad de la galangina, y 250 veces y 300 veces para la SBE $\beta$ CD y DM $\beta$ CD respectivamente. Lo que se traduce en que morina y quercetina presentan constantes de asociación en el mismo rango, sin embargo galangina presenta valores mucho mayores, lo cual se explicaría por la baja solubilidad que presenta en solución acuosa.

Las constantes de asociación obtenidas por la metodología de solubilidad de fase siguieron las mismas tendencias encontradas por la metodología DOSY.

La constante de asociación para la catequina presentó un comportamiento diferente con respecto a los otros flavonoides, siendo la mayor constante de asociación para la ciclodextrina nativa. Esto podría estar relacionado con la estructura base de la catequina, la cual no presenta mayores grados de libertad de movimiento, reflejado en una disminución en la estabilidad del complejo. Esta disminución de los grados de libertad de movimiento se ve reflejada en el ensanchamiento de las señales aromáticas de los espectros de protones.

Los espectros ROESY, obtenidos para la mayoría de los complejos estudiados nos permitieron estimar su geometría de inclusión. Estas geometrías obtenidas experimentalmente, nos demostraron que la inclusión para cada uno de los flavonoides con las diferentes ciclodextrinas se comporta como un caso especial. La inclusión de la morina en la  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, es con el anillo B sobresaliendo del lado angosto de la ciclodextrina, mientras que para la DM $\beta$ CD el anillo B se encuentra sobresaliendo por el lado de los hidroxilos secundarios. Diferente es lo observado para la catequina. La inclusión con el anillo B sobresaliendo por el lado de los hidroxilos primarios, es solo para la  $\beta$ CD. Con la HP $\beta$ CD y DM $\beta$ CD, el anillo B se encuentra sobresaliendo por el lado ancho de la ciclodextrina. Finalmente la galangina, siempre se incluye por el anillo B, dejando a la cromona expuesta. Para el complejo con DM $\beta$ CD, se observa la inclusión por el lado ancho de la ciclodextrina. Mientras que para el complejo con HP $\beta$ CD la inclusión es por el lado angosto de la ciclodextrina.

Los estudios de modelación molecular nos confirmaron los resultados obtenidos por RMN, especialmente para la catequina, donde se estudiaron dos ciclodextrinas derivatizadas además de la nativa. Los resultados fueron totalmente concordantes con los resultados experimentales.

Para el caso del complejo de morina con  $\beta$ -ciclodextrina, se encontró una orientación preferencial final que se racionaliza perfectamente con los datos obtenidos.

Los resultados obtenidos para galangina por modelación molecular reflejan en buena manera lo que ocurre con este complejo en solución acuosa, presentando una orientación preferencial, donde el anillo B de la galangina se encuentra incluido por el lado de los hidroxilos primarios, y el anillo A se encontraría por el lado de los hidroxilos secundarios. Según esto, la galangina se incluiría de la misma forma en la  $\beta$ CD y en la DM $\beta$ CD, mientras que en la HP $\beta$ CD, el anillo B se encuentra incluido, pero deja a la cromona expuesta por el lado de los hidroxilos primarios.

Los estudios de reactividad, en especial los estudiados por la técnica  $ORAC_{FL}$ , nos muestran que para los complejos preparados con quercetina y catequina, prácticamente la reactividad no varía mucho respecto a la del flavonoide libre. Diferente es el caso para morina y galangina, donde los estudios presentaron un aumento notable de su reactividad al estar formando los complejos de inclusión. Este aumento de reactividad podría estar relacionado con la estabilidad del radical dentro de la cavidad, probablemente el interior apolar de las ciclodextrinas, estabiliza las especies radicalarias de mejor manera que en solución acuosa.

La reactividad medida por la técnica REE, indicó que para la quercetina y morina prácticamente no hay diferencia. En cambio para la catequina se observa un leve aumento de la actividad antioxidante.

Las metodologías ocupadas para determinar reactividad y capacidad antioxidante de los flavonoides y sus complejos fueron concordantes. Siendo la metodología  $ORAC_{FL}$  la más adecuada dada su sensibilidad, su reproducibilidad y confiabilidad.

Los complejos con los flavonoides mantuvieron o aumentaron su capacidad antioxidante, junto con el aumento considerable de solubilidad. Estas dos propiedades tienen especial importancia en la posible biodisponibilidad de los antioxidantes, lo cual lo hace un blanco novedoso para el desarrollo de nuevos antioxidantes naturales con mejores propiedades para el uso comercial de estos.

# Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling

Carolina Jullian,<sup>a,\*</sup> Sebastián Miranda,<sup>b</sup> Gerald Zapata-Torres,<sup>b</sup> Fernando Mendizábal<sup>c</sup> and Claudio Olea-Azar<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile

<sup>b</sup>Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile

<sup>c</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

Received 15 December 2006; revised 22 January 2007; accepted 19 February 2007

Available online 22 February 2007

**Abstract**—The aim of this paper is to describe the inclusion properties and the factors affecting the complexation selectivity and stabilization of catechin (CA) into  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and two of its derivatives, namely Heptakis-2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD). Analysis of the proton shift change using the continuous variation method confirm the formation of a 1:1 stoichiometric complex for catechin and the different CDs in aqueous medium. The formations constant obtained by diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) techniques indicated the following trend upon complex formation:  $\beta$ -CD > HP- $\beta$ -CD > DM- $\beta$ -CD. The detailed spatial configuration is proposed based on 2D NMR methods. These results are further interpreted using molecular modeling studies. The latter results are in good agreement with the experimental data. The models confirm that when CA- $\beta$ -CD is formed, the catechol moiety in the complex is oriented toward the primary rim; however when CD is derivatized to HP- $\beta$ -CD and DM- $\beta$ -CD this ring is oriented toward the secondary rim.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Catechins are phenolic compounds extracted from plants and present in natural food and drinks, such as green tea<sup>1</sup> or red wine<sup>2</sup> (Fig. 1). The role of such molecules in the prevention of cancer and cardiovascular diseases has received a great deal of attention.<sup>3,4</sup> Catechins are scavengers of reactive oxygen species, and their resulting anti-oxidant properties are of great interest in dietetics and cosmetology. Furthermore, their antiviral and cancer inhibiting properties could have pharmaceutical applications.<sup>5</sup> However, catechin powders are bitter, brown, and easily get oxidized, and hence difficult to use as a natural food additive or medicine.

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides composed of glucopyranose units and can be represented as a truncated cone structure with a hydrophobic cavity. Their most popular feature is the marked difference of polarity

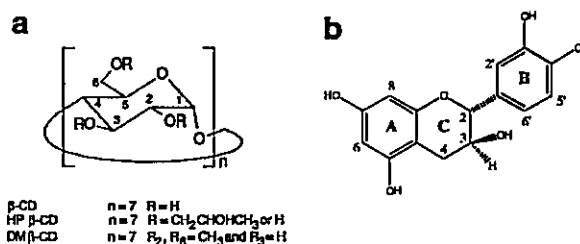


Figure 1. Molecular structures of  $\beta$ -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, and Heptakis-2,6-*O*-di-methyl- $\beta$ -cyclodextrin (a). Molecular structure of (+)catechin (b).

between the internal and external surfaces: the inner part is made apolar by the glycosidic oxygens and methine protons, whereas the external surface is polar by virtue of the presence of secondary and primary hydroxyls on the large and small rims, respectively, thus allowing their solubilization in water. These unique properties predispose them to form inclusion complexes, as the displacement of included water molecules by apolar substrates represents a thermodynamically favored

**Keywords:** (+)Catechin; Cyclodextrin; NMR; Molecular modeling.

\* Corresponding author. E-mail: cjullian@uchile.cl



process.<sup>6</sup> In the pharmaceutical, cosmetics, and food industries, cyclodextrins have been used primarily as complexing agents to increase the water solubility of various compounds, such as drugs, vitamins, and food colorants.<sup>7</sup> It was demonstrated that complexation can considerably increase the stability and bioavailability of the guest molecules. We have recently reported the enhancement in solubility of flavonoid (quercetin and morin) through phase solubility experiments in different cyclodextrins.<sup>8,9</sup>

This work describes the result obtained from nuclear magnetic resonance (NMR) studies on the inclusion properties of CA into  $\beta$ -cyclodextrin and two derivatized cyclodextrins, Heptakis-2,6-di-*O*- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD). We observed the possible factors that affect the complexation selectivity and stabilization. The formation constant are obtained by diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) techniques, while the detailed spatial configuration is proposed by 2D NMR. We also carried out molecular modeling studies to build three-dimensional models of substituted and native  $\beta$ -CD upon complexation with CA in order to provide a more detailed description of the interactions so as to rationalize the experimental results.

## 2. Results and discussion

### 2.1. <sup>1</sup>H NMR studies

<sup>1</sup>H NMR data for CA dissolved in D<sub>2</sub>O show well-resolved signals in two distinct spectral regions: two doublets corresponding to methylene protons, H-4, and a multiplet centered at 4.16 ppm due to the methine nuclei H-3, which are *J*-coupled to the adjacent methylene protons H-4 and to the methine H-2 (however the signal of the latter is not being observed because it is superimposed with the water signal at 4.7 ppm). In the high frequency region, the two-spin system and the three-spin system of ring A and B, respectively, are clearly detected (Fig. 2).

The formation of inclusion complexes can be proved from the changes of chemical shifts of CA or CDs in <sup>1</sup>H NMR spectra. Figure 3 illustrates that most of the aromatic protons of CA are influenced owing to the presence of CDs. Table 1 lists the detailed variation of the aromatic chemical shifts of CA before and after forming inclusion complexes with CDs. Upfield shifts are observed for all the aromatic protons of the A- and B-rings. However, the major induced shielding is observed for all the B-ring protons on both CA- $\beta$ -CD and CA-DM- $\beta$ -CD complexes. But it is worth to mention that the H-8 A-ring proton in the DM- $\beta$ -CD complex shows outstanding upfield chemical shifts in comparison with the other complex. The broadening of the proton signals of CA in the presence of CD suggests that the B-ring, the C-ring, and the A-ring are included in the cavity and hence the motions of these protons are restricted indicating that CA molecule fitted tightly.<sup>10</sup>

The H-3 and H-5 protons of the glucose units are facing to the interior of the CD cavity, whereas H-6 protons are located at the rim with the primary alcohols. H-2 and H-4 are at the opposite entrance of the cavity. Upfield shifts of the interior proton signals of CDs are indicative that aromatic guest molecules are located close to the protons for which a shift is observed. This displacement is due to the anisotropic magnetic effect induced by the presence of the aromatic group of the guest molecule. The analysis of the variations undergone by CDs protons as a consequence of the presence of CA strongly suggests complexation involving inclusion into the cavity of the host, as the external protons H-1, H-2, and H-4 were slightly affected, whereas the H-3, H-5, and H-6 protons were significantly shifted (data not shown).

One important NMR application is the association constant determination ( $K_a$ ) for host-guest complexes using <sup>1</sup>H chemical shift information.<sup>11</sup> Recently there has been a growing interest in the use of pulsed field gradient methods to provide information on  $K_a$  via the molecular self-diffusion coefficient.<sup>12,13</sup> The diffusion coefficient ( $D$ ) depends on the size of the molecule:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

where  $k$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature,  $\eta$  is the dynamic viscosity, and  $r$  is the radius of the molecule.

Determination of association constants using DOSY provides an additional NMR based method and an alternative of the classical chemical shifts titration method, particularly convenient for evidence of binding between differently sized species.<sup>14</sup> The association constant  $K_a$  for a complex of  $n$  molecule host and  $m$  molecule guest, for example,



Could be deduced from Eq. 2:

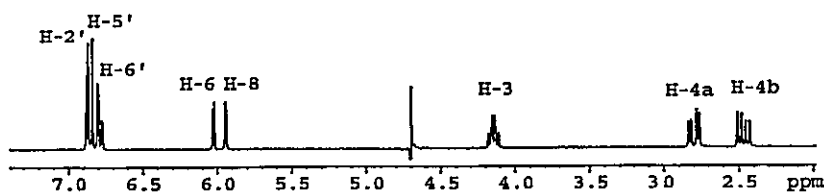
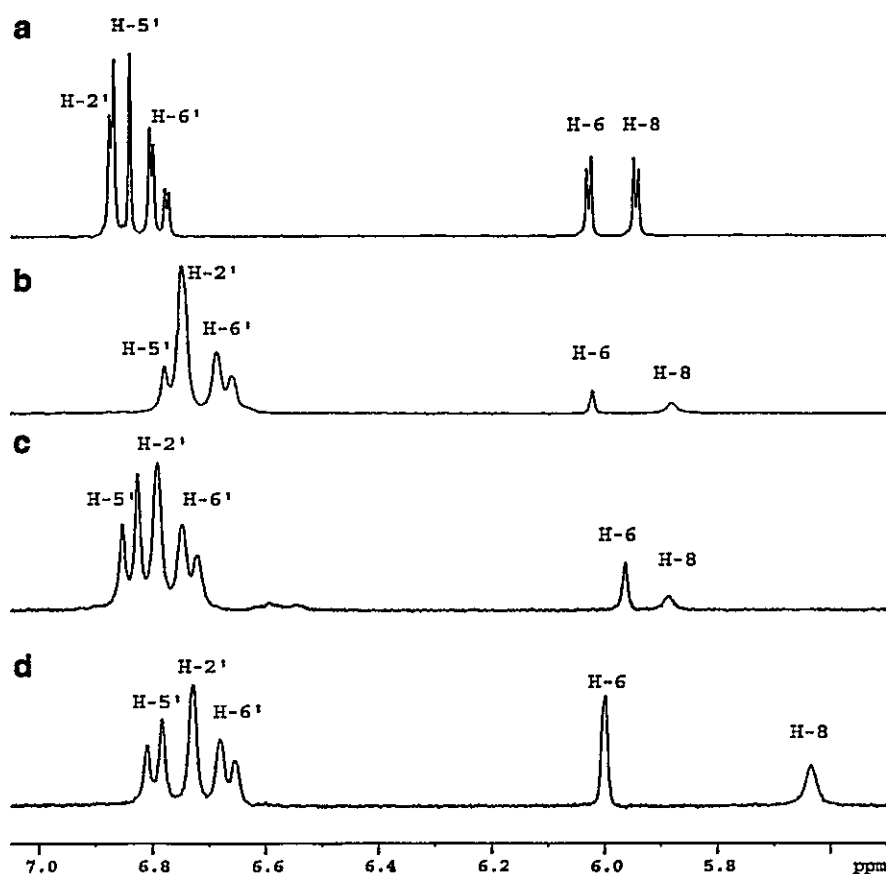
$$K_a = \frac{[C]}{[H]^n[G]^m} = \frac{[C]}{([H]_0 - n[C])^n([G]_0 - m[C])^m} \quad (3)$$

where  $[G]_0$  and  $[H]_0$  are the total concentration of the guest and host, respectively, and  $[G]$ ,  $[H]$ , and  $[C]$  the equilibrium concentrations of the free host (H), of the free guest (G), and of the complex (C). Usually the stoichiometry, that is, the values of  $n$  and  $m$ , was determined first, for example, from Job plots. The association constant is determined using Eq. 4 if the mole fraction  $\chi_b$  of the bound species is known.

$$K_a = \frac{\chi_b}{(1 - \chi_b)([H]_0 - \chi_b[G]_0)} \quad (4)$$

The diffusion coefficient observed ( $D_{obs}$ ) in the NMR experiment (fast-exchange condition) is the weighted average of the diffusion coefficient of bound ( $D_{bound}$ ) and free ( $D_{free}$ ) guest:

$$D_{obs} = \chi D_{bound} + (1 - \chi)D_{free} \quad (5)$$

Figure 2.  $^1\text{H}$  NMR spectra of (+)catechin in  $\text{D}_2\text{O}$ .Figure 3.  $^1\text{H}$  NMR spectra: (a) CA without CDs; (b–d) inclusion complexes with  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, and DM- $\beta$ -CD.Table 1. The chemical shifts ( $\delta$ ) of CA,  $\beta$ -CD-, HP- $\beta$ -CD-, and DM- $\beta$ -CD-CA complexes and their complexation shifts ( $\Delta\delta$ )

	$\delta(\text{ppm})$				
	H-2'	H-5'	H-6'	H-6	H-8
CA (free)	6.87	6.85	6.79	6.03	5.94
CA- $\beta$ -CD	6.75	6.76	6.67	6.02	5.88
$\Delta\delta^a$	0.12	0.09	0.11	0.01	0.06
CA-HP- $\beta$ -CD	6.79	6.84	6.73	5.96	5.88
$\Delta\delta^a$	0.08	0.01	0.05	0.06	0.06
CA-DM- $\beta$ -CD	6.73	6.79	6.67	5.99	5.63
$\Delta\delta^a$	0.14	0.06	0.12	0.03	0.31

<sup>a</sup>  $\Delta\delta = \delta_{(\text{free})} - \delta_{(\text{complex})}$ .

Therefore, the fraction of bound guest can be determined by

$$\chi_b = \frac{(D_{\text{free}} - D_{\text{obs}})}{(D_{\text{free}} - D_{\text{bound}})} \quad (6)$$

It is noteworthy that it is possible to obtain directly the molar fraction of the bound guest by employing Eq. 6 and, hence, by using Eq. 4, the association constant by single point determinations.

The rationale behind the extraction of the bound fraction from diffusion NMR measurements is simple. The host and guest have their own diffusion coefficients in the free state that reflect their molecular weight and

shape. Whereas the guest molecules are significantly smaller than cyclodextrin, furthermore the diffusion coefficients of the bound guests were taken to be equal to the diffusion coefficient of CD, it is assumed that, for binding of a small guest molecule to a large host molecule, the diffusion coefficient of the host is not greatly perturbed and the diffusion coefficient of the host-guest complex can be assumed to be the same as that of the non-complexed host molecule.<sup>15</sup> In the case of a weak or negligible association, the diffusion coefficients of the host and the guest will remain unchanged. For any other case, assuming fast exchange on the NMR time scale, the observed (measured) diffusion coefficients ( $D_{obs}$ ) are a weighted average of the free and bound diffusion coefficients ( $D_{free}$  and  $D_{bound}$ , respectively) and can, therefore, be used to calculate the bound fraction  $\chi_b$ , as shown in Eq. 6, in the same way that chemical shifts are used. The precise determination of the association constant implies that the stoichiometry of the interaction process is unambiguously determined. Determination of the stoichiometry of the complexes was performed using the continuous variation method (Job's method). The continuous variation analysis was applied using the H-2' proton signal of CA. The stoichiometry of the three complexes was found to be the same for all three CD utilized, as shown in Figure 4, where there is a turning point at  $r = 0.5$ , which leads to a consistent conclusion that the molar ratio between CA and the CDs utilized is 1:1.

In 2D DOSY spectra (Fig. 5) the F2 dimension shows chemical shift and F1 dimension represents self-diffusion coefficient ( $D$ ). Therefore, groups belonging to a same molecule will appear in almost the same F1 row. By using Eq. 6 and the diffusion coefficients of the free compounds reported in Table 2, we calculated a molar fraction of bound CA equal to 0.85 for the CA- $\beta$ -CD complex, which corresponded to an association constant of  $21,800 \text{ M}^{-1}$  with a complexation stoichiometry of 1:1. The same procedure applied to HP- and DM- $\beta$ -CD

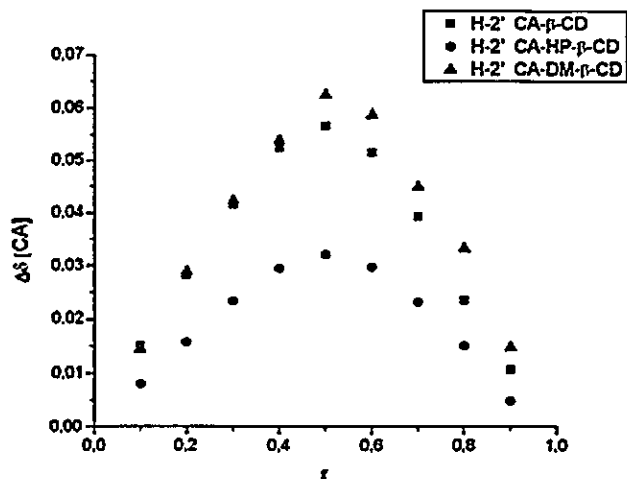


Figure 4. Continuous variation plot of CA- $\beta$ -CD, CA-HP- $\beta$ -CD, and CA-DM- $\beta$ -CD, showing the observed chemical shifts of H-2' of CA as a function of mole fraction.

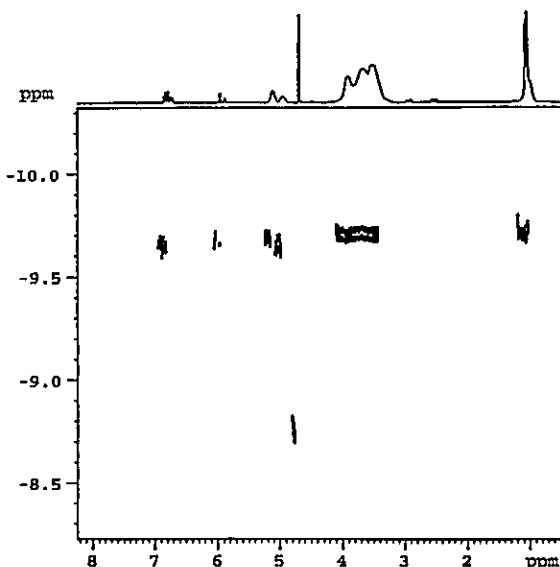


Figure 5. Representative DOSY spectra of CA-HP- $\beta$ -CD.

Table 2. Diffusion coefficients of cyclodextrins ( $D_{bound}$ ), CA in a complex form ( $D_{obs}$ ), in the free state ( $D_{free}$ ) and association constants ( $K_a$ ) at 298 K

	$D_{bound}$ ( $\text{m}^2/\text{s}$ )	$D_{free}$ ( $\text{m}^2/\text{s}$ )	$D_{obs}$ ( $\text{m}^2/\text{s}$ )	$K_a$ ( $\text{M}^{-1}$ )
CA- $\beta$ -CD	$2.420 \times 10^{-10}$	$4.04 \times 10^{-10}$	$2.63 \times 10^{-10}$	21,800
CA-HP- $\beta$ -CD	$2.125 \times 10^{-10}$	$4.04 \times 10^{-10}$	$2.51 \times 10^{-10}$	13,580
CA-DM- $\beta$ -CD	$2.278 \times 10^{-10}$	$4.04 \times 10^{-10}$	$2.66 \times 10^{-10}$	3500

gave, by single point determinations, association constants of  $13,580$  and  $3500 \text{ M}^{-1}$ , respectively (Table 2).

Further information about the inclusion mode of CA in the several CDs included in this study can be directly inferred from the 1D NMR spectra. The induced shielding of all the B-ring protons of CA suggests that this ring is inserted in the CD cavity. More direct indications concerning the geometry of the inclusion complexes can be derived from the evidence of spatial proximities between protons of CDs and CA. Figure 6 shows a partial contour plot of 2D-ROESY spectra of the inclusion complex of CA and  $\beta$ -CD. There are several intermolecular cross-peaks between H-2', H-6', and H-5' (less intense) of CA with H-5 of  $\beta$ -CD, with additional relation between H-2' of CA and H-3 of  $\beta$ -CD. However, no cross-peaks appear between the protons of the A- and C-ring and the protons of  $\beta$ -CD. This might indicate that the B-ring is deeply inserted into the cavity by the larger rim of the truncated cone. To attribute unambiguously the protons H-3, H-5, and H-6 of the cyclodextrin region, a HSQC spectrum of CA-HP- $\beta$ -CD system was performed in the same conditions as those used for the ROESY spectrum. The ROESY spectrum of the CA-HP- $\beta$ -CD complex (Fig. 7) shows correlations between H-2' of CA and H-3 and H-5 (less intense) of the CD. Also we observed an interaction between H-6 of the A-ring with H-5 of HP- $\beta$ -CD.

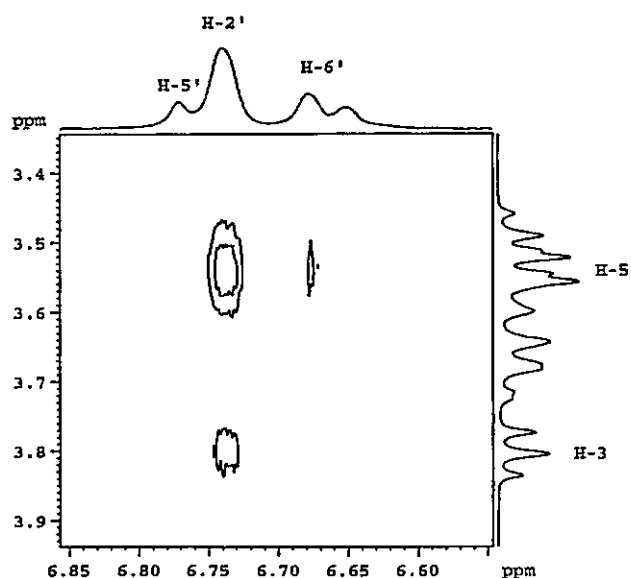


Figure 6. Partial contour plot of the two-dimensional ROESY spectrum of (+)catechin in presence of  $\beta$ -CD complex in  $D_2O$  (3 mM, 1:1 molar ratio).

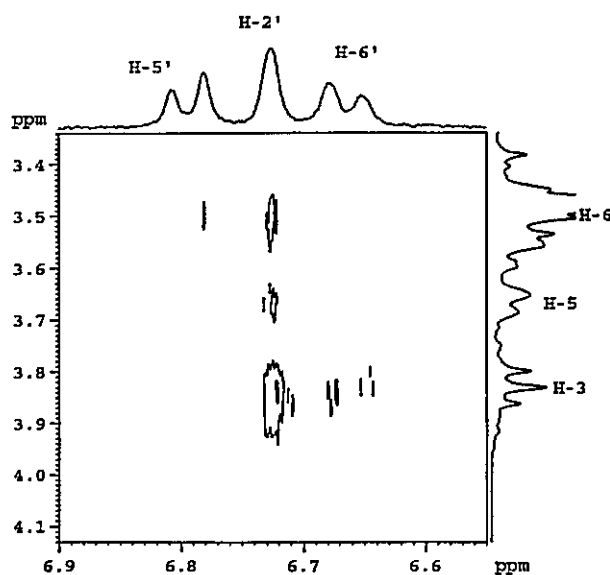


Figure 8. Partial contour plot of the two-dimensional ROESY spectrum of (+)catechin in presence of DM  $\beta$ -CD complex in  $D_2O$  (3 mM, 1:1 molar ratio).

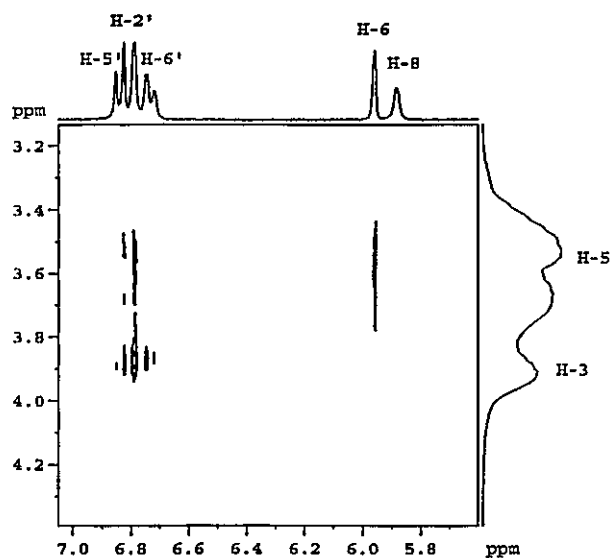


Figure 7. Partial contour plot of the two-dimensional ROESY spectrum of (+)catechin in presence of HP  $\beta$ -CD complex in  $D_2O$  (3 mM, 1:1 molar ratio).

CA-DM- $\beta$ -CD complex (Fig. 8) showed the same correlations between the internal H-3 and H-5 protons as those obtained with the HP- $\beta$ -CD. The analysis of the dipolar interactions generated by the internal protons of the three cyclodextrins not only confirmed some features already evidenced by the analysis of the complexation shifts, but also revealed some additional aspects. As a matter of fact, H-5 protons of  $\beta$ -CD produced remarkable crosspeak on catechin B-ring which could suggest that CA is deeply inserted into the cavity and the A-ring is oriented toward the secondary hydroxyl group of the  $\beta$ -CD, which is in agreement with the result

reported by Ishizu<sup>10</sup> and Kriz<sup>16</sup>. Figure 7 shows a contour plot of a section of the ROESY spectrum of CA and HP- $\beta$ -CD complexes. The bidimensional spectrum shows several intermolecular cross-peaks which clearly suggest that the protons of the B-ring are on the secondary face and the A-ring is on the primary face of HP- $\beta$ -CD. So, it seems that there are two models between CA and CDs.

In order to rationalize the NMR experimental results described above, we carried out molecular modeling studies of the complexes. These studies revealed that a preferred final relative orientation for all the complexes study occurs in spite of the different initial configurations arbitrarily imposed. The minimum energy complexes obtained for the three CDs under studied are shown in Figures 9–11. It is interesting to note that although no fixed distances were imposed during the docking calculations, the results are in very good agreement with the distances obtained by 2D ROESY spectra. All these complexes were further refined using a semiempirical methodology such as PM3. Noticeable differences between the  $\beta$ -CD and its derivatized forms can be observed, being the orientation of the ligand once inside of the host molecule the most relevant. A detailed description of the principal topological aspects of these complexes is discussed below.

In the case of CA- $\beta$ -CD complex, the conformation obtained by molecular modeling was in agreement with the ROESY results. The complex has the B-ring of CA oriented toward the primary rim, while both A and C rings remain oriented to the secondary rim, in such a way that the plane formed by the A-ring is placed in a 45° angle with respect to the plane formed by the glycosidic oxygens of the  $\beta$ -CD subunits (Fig. 12). On the other hand, it is possible to observe from Figure 9 that the A-ring of

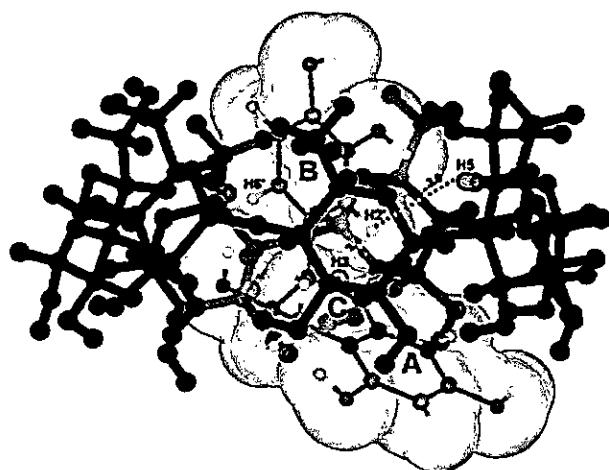


Figure 9. Inclusion complex between CA and  $\beta$ -CD obtained from molecular docking studies. The B-ring of CA is found inside the  $\beta$ -CD cavity, where the H-2' remains nearer to H-5 than H-3.

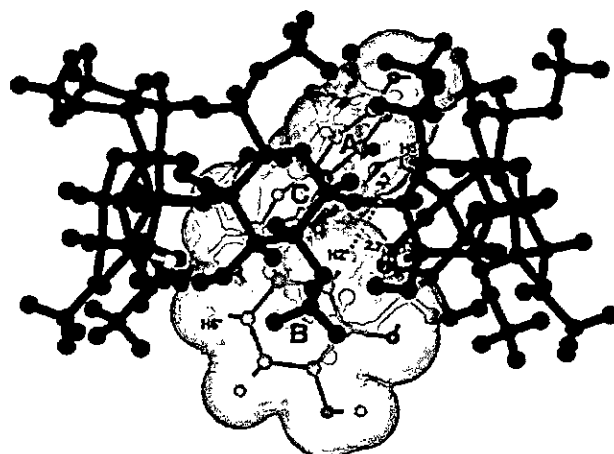


Figure 11. Inclusion complex between CA and HP- $\beta$ -CD obtained from molecular docking studies. The A- and C-rings are almost completely inserted on the interior of the CD, while the B-ring is mainly exposed to the outside.



Figure 10. Inclusion complex between CA and DM- $\beta$ -CD obtained from molecular docking studies. The A- and C-rings are almost completely inserted on the interior of the CD, while the B-ring is mainly exposed to the outside.

CA protrudes outside of the  $\beta$ -CD, leaning closer to the secondary rim, where the H-8 of this ring remains at a reasonable distance from H-3, while the H-6 points completely out of the  $\beta$ -CD.

The theoretical results obtained from the CA-DM- $\beta$ -CD complex indicate that the B-ring of CA is oriented to the secondary rim, resulting in a complex where the CA is located in opposite direction with respect to the previous CA- $\beta$ -CD complex (Fig. 10). From the ROESY spectrum of DM- $\beta$ -CD we infer that the H-2' of CA is closer to H-3 than H-5 of the DM- $\beta$ -CD and by molecular modeling the distances are 2.7 and 3.7 Å, respectively. The A-ring of the CA is oriented in an angle near to 45° (315° if we take as a 0° reference angle the same of the  $\beta$ -CD-CA complex) with respect to the plane formed by the glycoside oxygen of the glucopyranoses. It is worth to mention that in this complex, both the

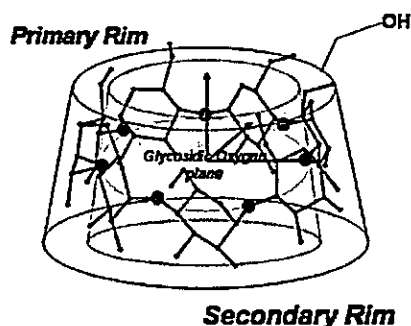


Figure 12. Plane formed by the glycosidic oxygen of the  $\beta$ -cyclodextrin unit.

A- and C-rings are almost completely inserted on the interior of the DM- $\beta$ -CD, while the B-ring is mainly exposed to the outside. This is in agreement with the observed differences in the cross peak of the 2D-ROESY spectra for H-2' of the CA with H-3 and H-5 for the  $\beta$ -CD and DM- $\beta$ -CD. This evidence could indicate that the B-ring of CA in the DM- $\beta$ -CD is not as deep as compared to  $\beta$ -CD. The large shielding observed in the  $^1\text{H}$  NMR spectra for the H-8 of the A-ring of CA-DM- $\beta$ -CD might be due to its close proximity to two methylenic protons (C-6) and to two H-5 of different glucopyranose subunits according to our model results.

When the ROESY spectrum of CA-HP- $\beta$ -CD is compared with that of CA-DM- $\beta$ -CD complex, it can be observed that the H-2' of the B-ring from the CA is closer to H-3 than to H-5 of the HP- $\beta$ -CD. The H-5' and the H-6' of B-ring of CA remain in the proximity of other H-3 of HP- $\beta$ -CD (Fig. 11). The B-ring of the CA remains oriented to the secondary rim, again with an angle of 45° (315°) with respect to the plane formed by the glycosidic oxygens of the HP- $\beta$ -CD. In this complex, just like in the previously described case, the B-ring of the CA is mainly located outside of the host. As a consequence of this, the model shows that both A- and C-

rings are completely inside of the hydrophobic core of the HP- $\beta$ -CD, leaving the H-6 and H-8 of the A-ring near to H-3 and H-5 of the subunits of HP- $\beta$ -CD.

The NMR experiment confirmed that CA formed 1:1 inclusion complexes with  $\beta$ -, DM- $\beta$ - and HP- $\beta$ -CD in aqueous medium. The formation constants obtained by diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) techniques indicated the following trend upon complex formation:  $\beta$ -CD > HP- $\beta$ -CD > DM- $\beta$ -CD; which indicates that the substituents on  $\beta$ -CD hinder the inclusion of CA into the CD cavity playing an important role in the formation of the inclusion complexes. By means of experimental and theoretical methods, the present work unambiguously determined the geometrical inclusion parameters of CA on the different CDs. Besides the ROESY experiments showed that the inclusion of CA in  $\beta$ -CD has a different trend when it is compared with HP- and DM- $\beta$ -CD. These results were corroborated by molecular modeling calculations.

### 3. Experimental

#### 3.1. Materials

The (+)catechin,  $\beta$ -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) [M.S. = 1], and Heptakis(2,6-di-*O*-methyl)  $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) were purchased from Sigma–Aldrich Inc. St. Louis, MO.

#### 3.2. Measurements

All NMR experiments have been performed on a Bruker AVANCE DRX300 spectrometer equipped with a pulse gradient unit capable of producing magnetic field pulse gradients in the *z*-direction of 53.5 G cm<sup>-1</sup>. The spectra have been acquired in an inversed probe-head at 298 K in 5 mm tubes. All chemical shifts were relative to the DOH signal at 4.70 ppm. The NMR measurements have been done with standard BRUKER pulse sequences. Intermolecular proximity has been derived from 2D ROESY experiments. The measuring conditions for the 2D spectra were: spectral width 3000 Hz; data size 16 K/8 K; relaxation delay 2 s, and 32 scans with a mixing time of 400 ms. Phase sensitive spectra were acquired using TPPI scheme. DOSY experiments have been performed using bipolar longitudinal eddy current delay (BPLED—bipolar pulsed field gradient longitudinal eddy delay) pulse sequence.<sup>17</sup> The duration of the magnetic field pulse gradients was 3 ms with 5 ms eddy current delay and spoil gradients of 1 ms with 17:13% ratio. The pulse gradients have been incremented from 2% to 95% of the maximum gradient strength in a linear ramp.

#### 3.3. Preparation of (+)catechin-CDs complex

Inclusion complexes were obtained by mixing appropriate amounts of CA and CDs in D<sub>2</sub>O with a molar ratio of 1:1. The resulting mixture was equilibrated in a Julabo thermostatic shaking water bath for 24 h at 30 °C after which the equilibrium was reached.

The Job's plots<sup>18</sup> (i.e., continuous variation method) were determined from <sup>1</sup>H NMR data obtained in unbuffered D<sub>2</sub>O. The total molar concentration (i.e., the combined concentration of CA and CDs) was kept constant (3 mM), but the mole fraction of catechin (i.e., [CA]/([CA] + [CD])) varied from 0.1 to 0.9.

#### 3.4. Molecular modeling

In silico build-up of  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD, and HP- $\beta$ -CD was carried out using the Builder module of the *InsightII* program<sup>19</sup> by adding to  $\beta$ -CD 14 methyl in position 2 and 6 (DM- $\beta$ -CD) and 7 hydroxypropyl groups (HP- $\beta$ -CD). The obtained models were subjected to optimization using a protocol of 300 steps of conjugate gradients to avoid steric hindrance and clashes that can appear in the building process. The CA was built using *Gaussview* and then it was optimized using a semiempirical method such as PM3 as implemented in *Gaussian98* package of programs.<sup>20</sup>

Autodock3.0.5<sup>21</sup> with Lamarkian Genetic Algorithm (LGA) was used to generate the starting complexes. The parameters used for the global search were an initial population of 50 individuals, with a maximal number of energy evaluations of 1,500,000 and a maximal number of generations of 50,000 as an end criterion. An elitism value of 1 was used, and a probability of mutation and crossing-over of 0.02 and 0.08 was used, respectively. From the best solutions obtained according to these parameters, some of them defined by the user as the best probabilities in our case 0.06 were further refined by a local search method such as pseudo Solis and Wets 'PSW'.

Autodock defines the conformational space implementing grids all over the space of the possible solutions. With the aim of testing the ability of Autodock to converge into solutions that are inside of the  $\beta$ -CD, a grid of 80 Å by side and 0.3 Å spacing between each point was set up in such a way that it covered both the external surface and the internal cavity of the  $\beta$ -CD.

The following procedure was employed on the  $\beta$ -CD docking simulations: 250 runs were done for each  $\beta$ -CD. At the end of each run, the solutions were separated into clusters according to their lowest RMSD and the best score value based on a free empiric energy function. Cluster solutions whose average score was not over 1 kcal mol<sup>-1</sup> with respect to the best energy obtained in the respective run were selected. Then, the solution that represents most of the complexes obtained in the run was compared with the NMR experimental data, assuring that this solution is able to represent it accurately. The selected final complexes were optimized using the semiempirical PM3 method as a refining procedure with *Gaussian98*.

#### Acknowledgments

C.J. thanks financial support of Departamento de Posgrado y Postítulo PG/57/2005 of University of Chile.

S.M. thanks Beca Memoria de Título de Pregrado, Chemical and Pharmaceutical Science Faculty, University of Chile. G.Z. thanks Proyecto Bicentenario de Inserción Académica CONICYT 2005. The authors are grateful to CEPEDQ from UCH for the use of NMR.

#### References and notes

1. Dalluge, J. J.; Nelson, B. C. *J. Chromatogr., A* **2000**, *881*, 411.
2. Carando, S.; Teissedre, P. L. *Basic Life Sci.* **1999**, *66*, 725.
3. Yang, C. S.; Wang, Z. Y. *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, *85*, 1038.
4. Stavric, B. *Clin. Biochem.* **1994**, *27*, 319.
5. Testa, B.; Perrisoud, D. In *Liver Drugs: From Experimental Pharmacology to Therapeutic Applications*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1988.
6. Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; Macnicol, D. D.; Vögtle, F.. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Pergamon Press: UK, 1996; Vol. 3.
7. Loftsson, L.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017.
8. Jullian, C.; Moyano, L.; Yañez, C.; Olea-Azar, C. *Spectrochim. Acta A* **2006**, doi:10.1016/j.saa.2006.07.006.
9. Jullian, C.; Orosteguis, T.; Olea-Azar, C. *Spectrochim. Acta A*, submitted for publication.
10. Ishizu, T.; Kintsu, K.; Yamamoto, H. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8992.
11. Fielding, L. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151.
12. Cameron, K.; Fielding, L. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6891.
13. Laverde, A., Jr.; da Conceição, G. J. A.; Queiroz, S. C. N.; Fujiwara, F. Y.; Marsaioli, A. J. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 433.
14. Cameron, K. S.; Fielding, L. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, S106.
15. Wimmer, R.; Aachmann, F. L.; Larsen, K. L.; Petersen, S. B. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 841.
16. Kriz, Z.; Koca, J.; Imberty, A.; Charlot, A.; Auzely-Velty, R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2590–2595.
17. Wu, D.; Chen, A.; Johnson, C. S. *J. Magn. Reson., Ser A* **1995**, *115*, 260.
18. Job, P. *Ann. Chim.* **1928**, *9*, 113.
19. InsightII, MSI, San Diego, California.
20. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98 (revision a.7)*, Gaussian, Inc., Pittsburg, PA, 1998.
21. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639.



## Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study

Carolina Jullian<sup>a,\*</sup>, Lorena Moyano<sup>b</sup>, Claudia Yañez<sup>a</sup>, Claudio Olea-Azar<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile

<sup>b</sup> Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile

Received 6 March 2006; received in revised form 2 July 2006; accepted 4 July 2006

### Abstract

The slightly water-soluble flavonoid quercetin (QUE) and its inclusion with either  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD), hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ CD) or sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE- $\beta$ CD) were investigated. The stoichiometric ratios and stability constants describing the extent of formation of the complexes have been determined by phase-solubility measurements; in all cases type- $A_L$  diagrams have been obtained (soluble 1:1 complexes). The results showed that the inclusion ability of  $\beta$ CD and its derivatives was the order: SBE- $\beta$ CD > HP- $\beta$ CD >  $\beta$ CD.

Kinetic studies of DPPH<sup>•</sup> with QUE and CDs complexes were done. The results obtained indicated that the QUE-SBE- $\beta$ CD complex was the most reactive form.

The scavenging capability of QUE and CDs complexes with DPPH<sup>•</sup> and galvinoxyl was studied using ESR spectroscopy. All complexes showed a higher scavenging capability with both radicals, compare quercetin in water. Beside, these results indicated that the complexes formed maintained the quercetin antioxidant activity.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Quercetin;  $\beta$ -Cyclodextrin; Inclusion complex; Antioxidant; DPPH<sup>•</sup>

### 1. Introduction

Quercetin (Fig. 1) belongs to a large group of naturally occurring flavonoid compounds found in plants, foods and beverages. Flavonoids represent a sub-group of intensely colored polyphenolic phytochemicals. They contribute to plant color, providing a spectrum of colors from red to blue in flowers, fruit and leaves [1,2]. Due to some interesting health-benefiting properties, flavonoids are widely examined in terms of chemistry as well as biological activity. The antioxidant, antitumor and antibacterial activity of flavonoids is the focus of the attention of many researchers in pharmaceutical and medicine chemistry [3]. However, quercetin is sparingly soluble in water, which may be responsible for its limited absorption upon oral administration.

In pharmaceutical product development,  $\beta$ -cyclodextrins, a category of pharmaceutical excipients, have been widely used

to improve solubility, chemical stability and bioavailability of a number of poorly soluble compounds.

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides composed of glucopyranose units and can be represented as a truncated cone structure with a hydrophobic cavity [4]. The cavity of CDs is relatively hydrophobic compared to water, while the external faces are hydrophilic [5]. The most extraordinary characteristic of a cyclodextrin is its ability to form inclusion complexes with a variety of compounds, i.e., caging foreign molecules (guest) in its cavity (host). Generally, hydrophobic molecules or some hydrophobic residues have the highest affinity with the CD's cavity in aqueous solution. It has been well established that the ability of  $\beta$ -cyclodextrin to enhance the stability and solubility of drugs is mediated through the formation of inclusion complexes [6]. Unmodified or unsubstituted  $\beta$ -cyclodextrin, that is, with no substituent on the glucopyranose unit, has poor water solubility and is parenterally unsafe due to its nephrotoxicity. Therefore, several synthetically modified and relatively safe  $\beta$ -CD have been made and used in parenteral formulations, such as hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin [7] (HP- $\beta$ CD) and sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE- $\beta$ CD) [8].

\* Corresponding author. Tel.: +56 2 9782807/2865; fax: +56 2 9782809.  
E-mail address: [cjullian@uchile.cl](mailto:cjullian@uchile.cl) (C. Jullian).



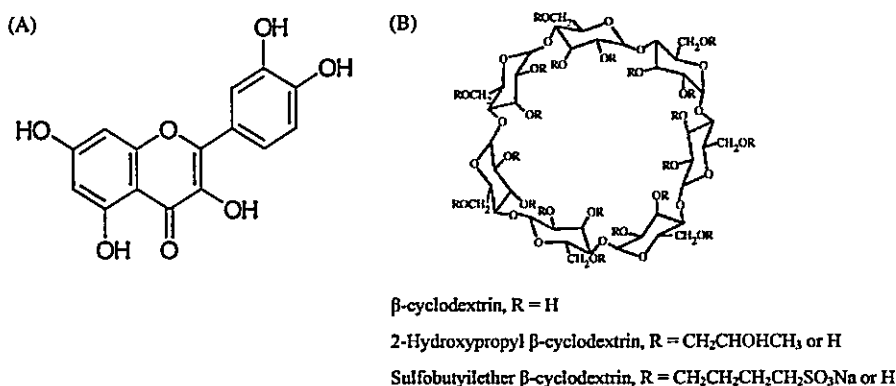


Fig. 1. (A) Molecular structures of quercetin. (B) Molecular structures of  $\beta$ -cyclodextrin, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, and sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin.

The present work was designated to study the complexation of quercetin utilizing three different cyclodextrins (HP- $\beta$ CD, SBE- $\beta$ CD and  $\beta$ CD) to improve the solubility and to determine the effect of the complexation process on their antioxidant capacity.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus

Spectrophotometric measurements were carried out with a UV<sub>2</sub> UNICAM spectrophotometer, using a 1 cm quartz cell.

ESR spectra were recorded in the X band (9.7 GHz) using a Bruker ECS 106 spectrometer with a rectangular cavity and 50 kHz field modulation.

### 2.2. Materials

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), was purchased from Sigma (USA).  $\beta$ CD and HP- $\beta$ CD [MS (average molar degree of substitution)=1.0] was purchased from Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO. SBE- $\beta$ CD [TDS (total degree of substitution)=6–7; Captisol<sup>®</sup>] was purchased from CyDex, Inc. DPPH<sup>•</sup> (2,2-di(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl), free radical and galvinoxyl (2,6-di-*tert*-butyl- $\alpha$ -(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-*p*-tolylxy) free radical, was purchased from Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO. All solvents employed in the spectrophotometric analyses were of spectroscopic reagent grade, from Merck. Other reagents were all analytical grade and double distilled water was used throughout.

### 2.3. Method

#### 2.3.1. Phase-solubility measurements

Phase-solubility measurements were carried out according to the method of Higuchi and Connors [9]. Excess amount of quercetin (5 mg) was added to 5 mL of deionized water containing increasing amounts of  $\beta$ CD, HP- $\beta$ CD and SBE- $\beta$ CD (ranging from 0 to 0.010 M). The resulting mixture was equilibrated in a Julabo thermostatic shaking water bath for 24 h at 30 °C after which the equilibrium was reached. To minimize

photochemical degradation flask were covered with aluminium foil. Then, suspensions were filtered through 0.45  $\mu$ m cellulose acetate membrane filter to remove undissolved solid. An aliquot from each vial was adequately diluted and spectrophotometrically analyzed at 375 nm.

The apparent stability constant ( $K_s$ ) of the complexes were calculated from the phase-solubility diagrams according to the following equation:

$$K_s = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})} \quad (1)$$

where  $S_0$  is the solubility of quercetin at 30 °C in absence of cyclodextrin and slope means the corresponding slope of the phase-solubility diagrams, i.e., the slope of the drug molar concentration versus CDs molar concentration graph.

#### 2.3.2. Determination of antioxidant activity by the scavenging of the stable radical DPPH<sup>•</sup>

The antioxidant activity was measured, wherein the bleaching rate of a stable free radical, DPPH<sup>•</sup> is monitored at a characteristic wavelength in the presence of the sample. In its radical form, DPPH<sup>•</sup> absorbs at 517 nm, but upon reduction by an antioxidant or a radical species its absorption decreases.

A volume of 2000  $\mu$ L of  $4.94 \times 10^{-5}$  M DPPH<sup>•</sup> was used. Furthermore, DPPH<sup>•</sup> is insoluble in aqueous solution the scavenging study was performed in mixture of methanol-water (20:80).

The reaction was started by addition of 20  $\mu$ L of QUE, QUE- $\beta$ CD, QUE-HP- $\beta$ CD and QUE-SBE- $\beta$ CD samples, which correspond to the 3 mM cyclodextrin concentration from the phase-solubility studies. The bleaching of DPPH<sup>•</sup> was followed at 517 nm.

The decrease in absorbance at 517 nm was measured against a blank of pure methanol to estimate the radical scavenging capacity of each antioxidant sample.

#### 2.3.3. Data analysis

The curve-fittings of the absorbance versus time plots were carried out on a Pentium PC using the Scientist program Origin 7.0. Curvefittings were achieved through least-squares regression and yielded optimized values for the parameters. We used

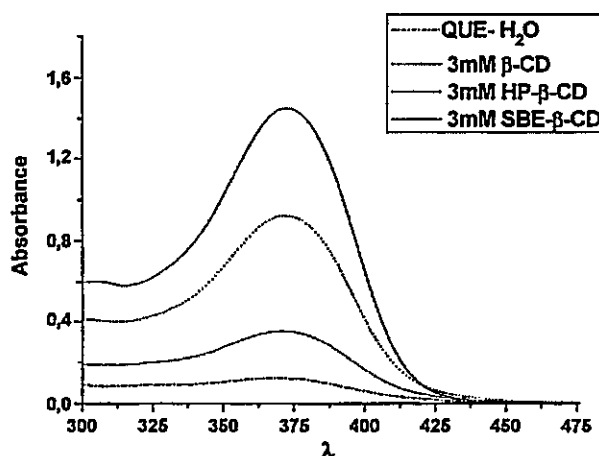


Fig. 2. Absorption spectra of quercetin in aqueous solutions with the different CD.

the slope initial rate methodology to obtain two parameters to be analyzed: consumption of DPPH<sup>•</sup> and initial rate. The curve-fitting procedures typically gave good (>0.99) to excellent (>0.999) correlation coefficients.

#### 2.3.4. ESR

Three millimolar cyclodextrin concentration from the phase-solubility study in mixture methanol/water (20:80) and DPPH<sup>•</sup> or galvinoxyl (2 mM) were deoxygenated under a stream of nitrogen gas. Aliquots (2 mL) were transferred to Hamilton gastight syringes coupled to a pneumatic ram and connected to a two-stream ESR quartz flow cell. In situ reactions at room temperature were initiated by rapidly evacuating the syringes. Spectra and decay curves were obtained on a Bruker ECS 106 spectrometer. The measurement of the decreasing ESR signal was measurement at 10 min after the start reaction.

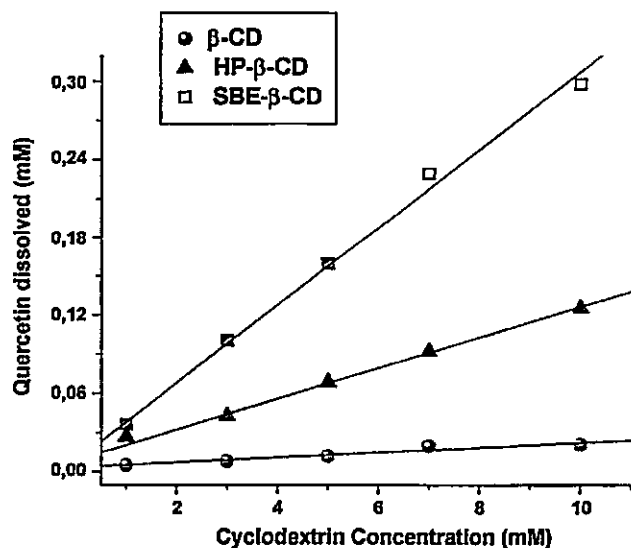


Fig. 3. Phase-solubility diagrams of QUE-β-CD, QUE-HP-β-CD and QUE-SBE-β-CD system in water at 30 °C.

Table 1

Apparent stability constant ( $K_s$ ) of quercetin inclusion complexes

QUE complex	$K_s$ ( $M^{-1}$ )
QUE-β-CD	602
QUE-HP-β-CD	1419
QUE-SBE-β-CD	4032

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Phase-solubility measurements

All three CDs enhanced the poor aqueous solubility of quercetin, thus proving a certain degree of its inclusion complexation in aqueous solutions (Fig. 2).

All phase-solubility diagrams of quercetin with β-, HP-, and SBE-β-CD within the concentration range studied displayed a typical  $A_L$  type diagram (i.e., linear increase of quercetin solubility with increasing β-CD concentration), consistent with a 1:1 molecular complex formation for all three β-CDs (Fig. 3). The result observed showed a linear behavior which is unequivocal for all CDs studied ( $r^2 = 0.996$  or better). The binding constant  $K_s$  of the complexes was calculated from the slopes of the linear phase-solubility plots according to the methodology described before. Results are summarized in Table 1. As shown in Table 1 and Fig. 3, the binding constant and solubility of quercetin determined with the three CDs followed the rank order SBE-β-CD > HP-β-CD > β-CD, reflecting an enhancement of binding and solubility with an increasing in substitution and hydrophilicity of the CDs. The same order was reported by Zheng et al. [10]. In the case of QUE-SBE-β-CD the strongly bound is expected, because the substituents groups are probably assisting in the binding.

#### 3.2. Scavenging study of DPPH<sup>•</sup> by free or complexed-quercetin

DPPH<sup>•</sup> is a stable free radical generating a deep violet solution in organic solvents. Its progressive discoloration when in

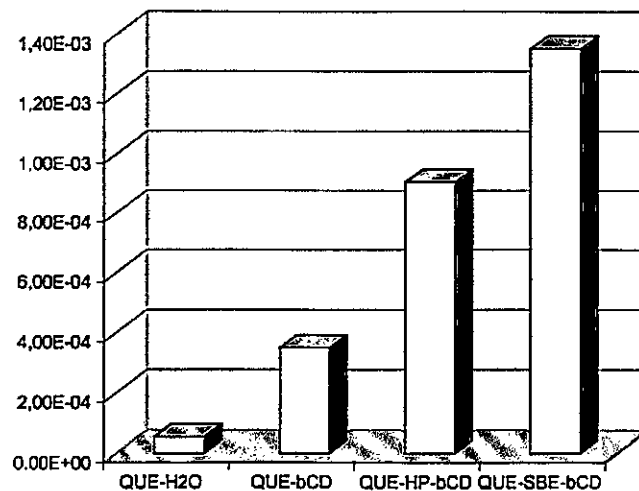


Fig. 4. Consume of DPPH<sup>•</sup> ( $mM^{-1}$ ) in presence of QUE free and complexes forms.

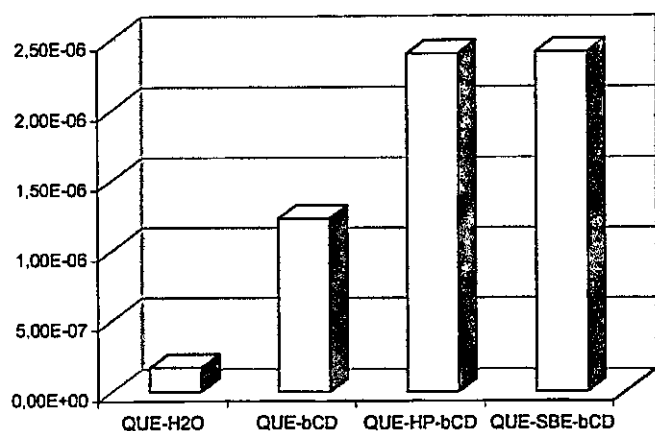


Fig. 5. Initial rate of QUE free and complexes forms.

the presence of quercetin indicated that it is acting as an antioxidant. Furthermore, since the mechanism of DPPH<sup>•</sup> reduction is known, the amount remaining of both reagents may be determined.

The rate of the DPPH<sup>•</sup>-scavenging reaction was measured by monitoring the decrease in absorbance at 517 nm due to DPPH<sup>•</sup>. The decay of the absorbance at 517 nm due to DPPH<sup>•</sup> corresponded to a second order decay. When cyclodextrin was mixture with DPPH<sup>•</sup> no decay was observed. Fig. 4 shows the consumption of DPPH<sup>•</sup> which indicates that the complexed quercetin-CDs were more effective than free quercetin, with the QUE-SBE-βCD complex being the best. The same results were found for the initial rate studies (Fig. 5).

### 3.3. ESR study of the scavenging ability of free and complexed quercetin toward DPPH<sup>•</sup> and galvinoxyl

The scavenging ability of quercetin toward DPPH<sup>•</sup> and galvinoxyl radicals in the absence and presence of CDs was also investigated. The scavenging ability was measured as a relative scavenging between DPPH<sup>•</sup> and galvinoxyl alone versus DPPH<sup>•</sup> and

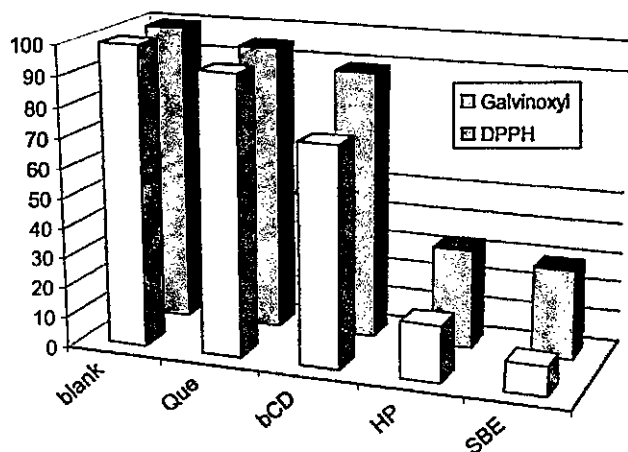


Fig. 6. Radical DPPH<sup>•</sup> and galvinoxyl scavenging activity. The initial concentration was 2 mM for DPPH<sup>•</sup>/galvinoxyl in all reaction mixtures. The data were recorded at 10 min of reaction and expressed as % DPPH<sup>•</sup>/galvinoxyl remaining.

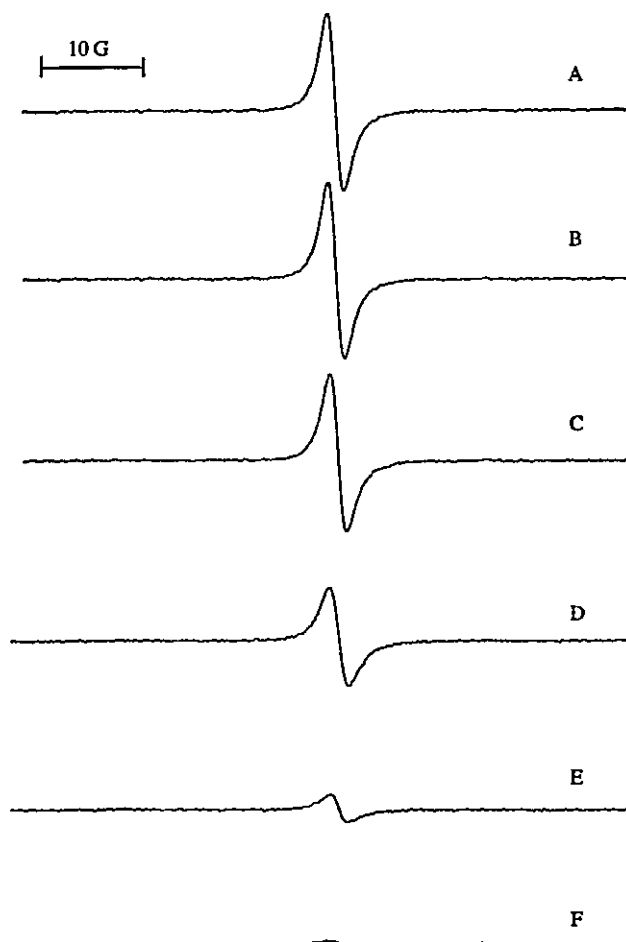


Fig. 7. ESR spectrum of (A) galvinoxyl; (B) galvinoxyl in presence of βCD (similar behavior is founded by the other cyclodextrins) (C) QUE; (D) QUE-βCD; (E) QUE-HP-βCD; (F) QUE-SBE-βCD.

galvinoxyl in presence of free or complex quercetin. We chose the 3 mM cyclodextrin concentration from the phase-solubility study to compare the scavenging ability. Not decay was observed when cyclodextrin alone was mixture with DPPH<sup>•</sup> and galvinoxyl. Fig. 6 depicts a decrease in DPPH<sup>•</sup> and galvinoxyl signal with increasing solubility obtained for the different CDs. Fig. 7 shows the ESR spectrum of galvinoxyl with QUE free and its complexes forms. Figs. 6 and 7 are in according with scavenging ability is related with enhanced solubility of quercetin. Also these results indicated that the complexes formed maintained the quercetin antioxidant activity.

## 4. Conclusions

The results from this study indicated an interaction between quercetin and CDs in water. This interaction increases the solubility of the flavonoid forming 1:1 inclusion complex with β-cyclodextrin and its derivative. The solubility of quercetin increased with increasing CD concentration in the following order βCD < HP-βCD < SBE-βCD.

Kinetic studies of DPPH<sup>•</sup> indicated that the QUE-SBE-βCD complex was the most reactive form.

ESR is a useful methodology for determining reactions involving quercetin free or complexed with radicals like DPPH<sup>•</sup> or galvinoxyl. The solution containing CDs and QUE showed a scavenging capability in both radical. This property is related with enhanced solubility of QUE. Also these results indicated that the complexes formed maintained the quercetin antioxidant activity.

#### Acknowledgments

C. Jullian thanks financial support of Departamento de Posgrado y Postitulo PG/57/2005 of University of Chile and CEPEDQ from Chemical and Pharmaceutical Science Faculty of University of Chile.

#### References

- [1] J.V. Fornica, W. Regelson, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 1061.
- [2] J.B. Harborne, H. Baxter, *The Handbook of Natural Flavonoids*, Wiley, Chichester, 1999.
- [3] C.A. Rice-Evans, L. Packer, *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- [4] J. Szejtli, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743.
- [5] S. Li, W.C. Purdy, *Chem. Rev.* 92 (1992) 1457.
- [6] J. Szejtli, *Med. Res. Rev.* 14 (1994) 353.
- [7] S.M. Shuang, J.H. Pan, S.Y. Guo, M.Y. Cai, C.S. Liu, *Anal. Lett.* 30 (1997) 2261.
- [8] V.J. Stella, R.A. Rajewski, *Pharm. Res.* 14 (1997) 556.
- [9] T. Higuchi, K.A. Connors, *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4 (1965) 117.
- [10] Y. Zheng, I.S. Haworth, Z. Zuo, M.S.S. Chow, A.H.L. Chow, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 1079.