



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA EFICIENCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
CITROFLAVONOIDES EN PLASMA DE ROEDOR

TESIS

PRESENTADA POR

JULIO ENRIQUE ONEY MONTALVO

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA EFICIENCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
CITROFLAVONOIDES EN PLASMA DE ROEDOR**

TESIS

PRESENTADA POR

JULIO ENRIQUE ONEY MONTALVO

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018



UADY

Mérida, Yuc., 20 de diciembre de 2017
Oficio Num.: PICQB/417/2017

Asunto: Autorización de impresión

La tesis "Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la cuantificación de citroflavonoides en plasma de roedor", presentada por el C. Julio Enrique Oney Montalvo, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la impresión de los ejemplares correspondientes.

Directores de la tesis


Dr. Rolffy Rubén Ortíz Andrade


Dra. Zulema Osiris Cantillo Ciau



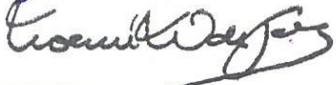
Sinodales:

Firmas

M. en C. Durcy Verence Rufz Ciau

M. en C. Pablo Acereto Escoffié

Dra. Noemí Herminia Waksman Minsky

ATENTAMENTE
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"


DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS



POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS
Y BIOQUÍMICAS

c.c. Archivo
MRSC

Página Web: <http://www.picqb.uady.mx>
E-mail: picqb@correo.uady.mx

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Facultad de Química, por las facilidades otorgadas para desarrollar este proyecto, así como el financiamiento para la realización de una estancia en la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

Al Dr. Julio cesar Rivera Leyva, por aceptarme para realizar una estancia de investigación en el Laboratorio 4 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del estado de Morelos (UAEM).

Al M. en C. Jesús Alfredo Araujo León, por el asesoramiento técnico en el análisis cromatográfico, así como en el análisis de los datos. De igual forma, a mi compañero de laboratorio el pQ. José Antonio Ciau Mendoza, por su apoyo y sobre todo por su amistad.

A todo el personal del Área de Farmacología Experimental del Laboratorio de Farmacología, especialmente a la Dra. Amanda Sánchez Recillas y al QFB Víctor Yáñez Pérez, por su valioso apoyo técnico durante la realización del ensayo farmacocinético.

Al comité revisor conformado por la Dra. Durcy Verenice Ruiz Ciau, la Dra. Noemí Waksman Minsky y el M. en C. Pablo Oscar Acereto Escoffié, por sus valiosas aportaciones y sugerencias para el enriquecimiento de este trabajo. Muchas gracias por el tiempo invertido a lo largo de este proceso.

Un agradecimiento especial al Dr. Rolffy Rubén Ortiz Andrade y a la Dra. Zulema Osiris Cantillo Ciau, directores de tesis, por todas las facilidades otorgadas para culminar la tesis, por su apoyo, consejos e innumerables enseñanzas. Muchas gracias por la confianza depositada en mí.

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de Cromatografía y Farmacología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Rolffy Rubén Ortiz Andrade y la Dra. Zulema Osiris Cantillo Ciau, y forma parte del proyecto “Estudio preclínico de una forma farmacéutica sólida de citroflavonoides con propiedades hipoglucemiantes e hipotensores” (Registro SISTPROY No. FQUI-2017-0001), financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Convocatoria Atención a Problemas Nacionales 2015), y con el apoyo de una beca para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo el desarrollo y validación de un método por CLAE para la cuantificación simultánea de cinco flavonoides (naringina, naringenina, hesperidina, rutina y quercetina) en plasma de roedor, esto con la finalidad de establecer los parámetros farmacocinéticos de dichos metabolitos y comprender los procesos metabólicos que proceden a su absorción.

Para el desarrollo del método cromatográfico se utilizó un equipo CLAE marca Agilent Technologies 1200 Series (San José, CA, EUA) equipado con detector de arreglo de diodos e inyector automático. Se utilizó como fase estacionaria una columna Phase Sep Spherisorb de C₁₈, con dimensiones de 250 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 µm; la fase móvil consistió en H₃PO₄ al 1% (A), metanol (B) y Acetonitrilo (C); con un flujo de 1.3 mL/min; además, se empleó un sistema de disolventes en condiciones de gradiente. El volumen de inyección fue de 10 µL, y la temperatura del termostato fue de 30 °C, con un tiempo de post corrida de 5 minutos. Para llevar a cabo la detección de los flavonoides se seleccionaron 3 longitudes de onda, 256, 284 y 370 nm.

Para la optimización del método de extracción en fase sólida, se utilizó un diseño de Box-Behnken con el que se determinó que el pH del buffer empleado juega un papel importante en el proceso de extracción, siendo el pH de 3.19 el óptimo para llevar a cabo este proceso.

La validación del método analítico se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos de la AOAC, resultando un coeficiente de correlación lineal mayor a 0.99 en un rango de trabajo entre 0.5 a 7.5 µg/mL. Los LD y LC del método fueron hallados entre 0.02 a 0.10 µg/mL y entre 0.04 a 0.19 µg/mL respectivamente. El porcentaje de recuperación total del método fue de 95.78 ± 1.55 %, mientras que la precisión intradía de éste fue de 2.28 ± 1.34 %, lo que demostró que el método analítico desarrollado en el presente trabajo es exacto y preciso.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Citroflavonoides	3
Clasificación de los citroflavonoides	3
Naringina	4
Naringenina	5
Quercetina	5
Rutina	5
Hesperidina	6
Importancia de la determinación de citroflavonoides	6
Métodos desarrollados para la determinación de citroflavonoides por CLAE	7
Métodos de extracción para la determinación de citroflavonoides	8
Optimización	9
Validación de métodos analíticos	10
Estudios farmacocinéticos	12
Farmacocinética de los flavonoides	13
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Materiales y reactivos	17
Método cromatográfico	17
Extracción del plasma de murino	18
Comparación de metodologías de extracción	18
Extracción en fase sólida	19
Precipitación de proteínas	19
Extracción líquido – líquido	19

Selección de las variables para la optimización de la EFS	20
Optimización del método de EFS	21
Validación analítica	22
Linealidad	22
Repetibilidad instrumental	22
Repetibilidad del método	22
Exactitud con la prueba de añadido recuperado	22
Límite de detección y cuantificación	23
Robustez	23
Estudio farmacocinético	24
RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
Sistema de elución	27
Comparación de metodologías de extracción	28
Selección de las variables para la optimización de la EFS	30
Optimización del método de EFS	31
Linealidad instrumental	33
Límite de detección y cuantificación	34
Precisión y exactitud	35
Robustez	37
Estudio farmacocinético	39
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	45
ANEXOS	49
Anexo 1. Comparación de las diferentes técnicas de extracción.	49
Anexo 2. Diagramas de Pareto (resultados de robustez).	50
Anexo 3. Lista de Tablas.	52

INTRODUCCIÓN

En 1930, Rusznyak y Szent-Gyorgy lograron aislar nuevos metabolitos secundarios a partir de la naranja dulce (*Citrus sinensis*), a los cuales nombraron como vitamina P. Actualmente, dichas sustancias se conocen como flavonoides, y se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, encontrándose en frutas, verduras, semillas y flores, así como en productos como la cerveza, vino, té verde y té negro.^{1,2}

En los últimos años el interés en estos compuestos ha ido en aumento, debido a que varios estudios acerca de los flavonoides reportan una amplia gama de actividades farmacológicas (efectos hipoglucemiantes, antihiper glucémicos, antioxidantes, y cardiovasculares). Esto ha provocado, que estos metabolitos secundarios sean tomados en cuenta como una alternativa terapéutica para la regulación de padecimientos del tipo crónico degenerativos, como la diabetes, la hipertensión y el cáncer.³

A pesar de que la actividad farmacológica de los flavonoides ya ha sido ampliamente comprobada, aún no se ha logrado esclarecer la farmacocinética de estos metabolitos secundarios, siendo aún los procesos metabólicos que proceden a su absorción objeto de estudio y debate. Es por ello, que en los últimos años se han desarrollado metodologías analíticas mediante la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para la determinación de citroflavonoides en fluidos biológicos. Sin embargo, no se ha establecido una metodología validada que permita la determinación simultánea de estos.^{4,5}

La naringina, naringenina, hesperidina, rutina y quercetina son los flavonoides más abundantes en los cítricos, además de ser los más estudiados y de mayor interés debido a sus propiedades farmacológicas (hipoglucemiantes, antihiper glucemiantes y antidiabética). Debido a esto, en el presente estudio se llevó a cabo el desarrollo y validación de un método CLAE para la cuantificación simultánea de los flavonoides mencionados anteriormente en plasma de roedor, esto permitirá en un futuro, establecer los parámetros farmacocinéticos de dichos metabolitos y comprender los procesos metabólicos que preceden a su absorción.

ANTECEDENTES

Citroflavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Actualmente, hay más de 5000 compuestos que pertenecen al grupo de los flavonoides, todos están conformados por 2 anillos de benceno (anillo A y B) y un anillo de pirano (anillo C), con una estructura base de 15 átomos de carbono y un esqueleto C6-C3-C6, tal como se muestra en la Figura 1.^{6,7}

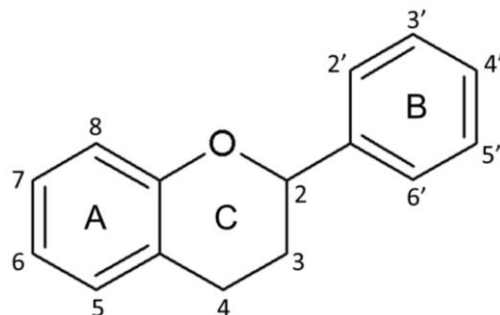


Figura 1. Estructura base de los flavonoides.

En los cítricos, los flavonoides más abundantes son aquellos pertenecientes a los grupos de las flavonas y flavanoles, motivo por el cual, dichos compuestos son nombrados como citroflavonoides.⁸

En los últimos años los citroflavonoides han sido objeto de diversos estudios biológicos debido a las evidencias de su gran potencial farmacológico, principalmente mostrando efectos hipoglucemiantes, así como beneficios a nivel cardiovascular.³

Clasificación de los flavonoides

La clasificación de los flavonoides se debe a las variaciones estructurales que este grupo de compuestos posee en el anillo de pirano (anillo C). En la Tabla 1 se observa dicha clasificación. Los flavonoides con los que se trabajará en el presente estudio pertenecen a los grupos de flavonas y flavanoles.⁹

Tabla 1. Clasificación de los flavonoides de acuerdo a su estructura química

Nombre	Descripción	Ejemplos
Antocianidinas	Poseen un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C, además de un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.	Antocianidina
Flavanos	Poseen un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.	Catequina
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.	Diosmetina Hesperidina Naringina
Flavanoles	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.	Quercetina Rutina Miricetina

Las flavonas utilizadas en el presente trabajo fueron la *hesperidina*, *naringina* y *naringenina*, y los flavanoles fueron la *quercetina* y *rutina*. La selección de estos compuestos se basó en su abundancia en los cítricos, además de ser los más estudiados en cuanto a sus propiedades farmacológicas. A continuación se describen algunas de sus características:⁹

Naringina

Es una flavona glicosilada (Figura 2) que se extrae de la cáscara de algunos cítricos, y es la responsable del sabor amargo que estos poseen. Sin embargo, también pueden encontrarse en la pulpa de los frutos, hojas, flores y semillas de algunas plantas.¹⁰

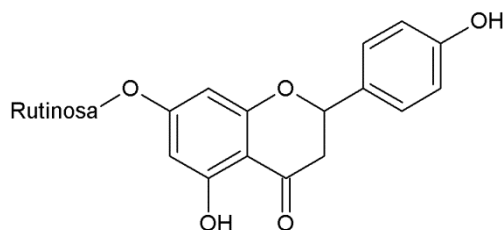


Figura 2. Estructura química de la naringina.

Estudios realizados por Pari y Suman¹¹, han demostrado que la naringina ejerce efectos antihyperglucemiantes en ratas con diabetes inducida. Además, posee la capacidad de disminuir el estrés oxidativo al aumentar las concentraciones de vitamina C, vitamina E y glutatión en ratas diabéticas.

Naringenina

La naringenina (Figura 3) es una flavona no glicosilada que se extrae de la cáscara de algunos cítricos. En estudios realizados por Zygmunt y col.¹² se describe su potencial para incrementar la captación de glucosa por las células del músculo esquelético. Este efecto farmacológico, es similar al que presenta la insulina, por lo cual se deduce que los mecanismos de acción de la naringenina e insulina son similares.

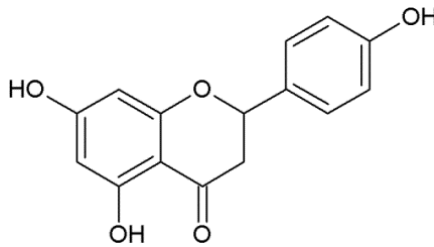


Figura 3. Estructura química de la naringenina.

Quercetina

La quercetina (Figura 4) es el flavonoide más abundante y ampliamente distribuido en el reino vegetal. Debido a esto, es uno de los citroflavonoides más estudiados, describiéndose en la literatura como una molécula con múltiples actividades biológicas o farmacológicas, principalmente como antioxidante, protegiendo a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación y evitando el daño ocasionado por los radicales.^{13, 14}

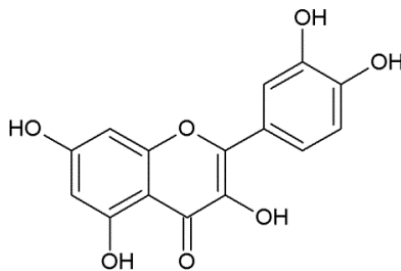


Figura 4. Estructura química de la quercetina.

Rutina

La rutina (Figura 5) es el glicósido de la quercetina, y es reconocido por su capacidad de disminuir la permeabilidad capilar. Además, estudios en ratas diabetizadas demostraron que la administración subaguda de dicho flavonoide ejerce una disminución en los niveles de glucosa plasmática y hemoglobina glucosilada.^{15, 16}

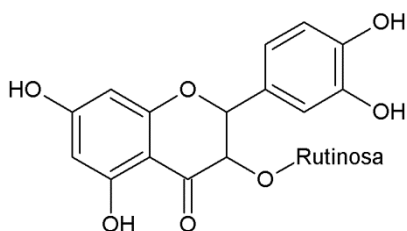


Figura 5. Estructura química de la rutina.

Hesperidina

Es una flavona glicosilada, la cual estructuralmente presenta el anillo de pirano saturado, y está unido en el oxígeno del carbono 7 al disacárido rutinosa, tal como se observa en la Figura 6.¹⁷

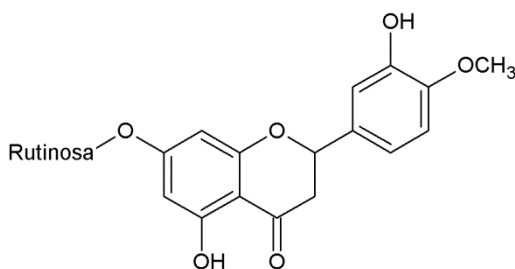


Figura 6. Estructura química de la hesperidina.

Estudios anteriores, como los realizados por Euhara y colaboradores en el 2010, han demostrado que esta flavona reduce los niveles de glucosa plasmática, mediante la modulación de las enzimas reguladoras de glucosa (glucosa quinasa y glucosa-6-fosfatasa).¹⁸

Importancia de la determinación de citroflavonoides

En la actualidad, el estudio de la biodisponibilidad y farmacocinética de los citroflavonoides ha tomado gran importancia, debido al desarrollo de la industria de los fitomedicamentos basada en extractos estandarizados. Desafortunadamente, no ha sido posible esclarecer la farmacocinética de estos metabolitos secundarios, por lo que los procesos metabólicos que proceden a su absorción aún son objeto de estudio y debate.^{4, 5}

Es por ello, que en los últimos años se están desarrollando metodologías que permitan la determinación de los citroflavonoides en fluidos biológicos, siendo la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), la técnica analítica más utilizada para este tipo de análisis, debido a las características fisicoquímicas de los citroflavonoides. Además, esta técnica permite el análisis simultáneo de dichos metabolitos secundarios, lo que representa una ventaja analítica.^{5, 19}

Métodos desarrollados para la determinación de citroflavonoides por CLAE

En la literatura científica se han descrito diferentes métodos analíticos por cromatografía de líquidos (CLAE) para la cuantificación de citroflavonoides; en la Tabla 2 se describen las características analíticas y cromatográficas de los principales métodos reportados. Se observa que la fase estacionaria utilizada en este tipo de estudios es la fase reversa, siendo en su mayoría de octadecil (C₁₈). Esto es debido a que este tipo de columnas cromatográficas son adecuadas para la separación de compuestos moderadamente polares (citraflavonoides) hasta compuestos apolares. Por otro lado, la mayoría de los métodos descritos utilizan como fase móvil sistemas isocráticos con disolventes orgánicos, en combinación con fases acuosas acidificadas con ácido acético (AcOH) principalmente, lo que favorece que los citroflavonoides eluyan con buena resolución.²⁰⁻²⁷

Tabla 2. Métodos analíticos desarrollados para la determinación de citroflavonoides por CLAE.

Flavonoides	Columna	Fase móvil	Referencia
Quercetina	Synergy C ₁₈ con dimensiones de 150 x 4.6 mm y partícula de 4 µm	MeCN:AcOH 0.6% (90:10)	González, S. A. ²⁰
Naringenina	Chiralcel OD-RH con dimensiones 150 x 4.6 mm y partícula 5 µm	MeCN:H ₂ O:H ₃ PO ₄ (30:70:0.04)	Yañez, J. A. y col. ²¹
Hesperidina Naringina	Beckman Ultrasphere C ₈ con dimensiones de 250 x 4.6 mm y partícula de 5 µm	H ₂ O:MeCN:THF:AcOH 80:16:3:1	Cabañas, W. A. ²²
Rutina Quercetina	Merck LiChrospher 100RP con dimensiones 250 x 4.0 mm y partícula de 5 µm	A) H ₂ O (pH 3) B) MeOH:MeCN (45:55)	Fang, F. y col. ²³
Quercetina	Lichrospher RP-18 con dimensiones de 120 x 4 mm y partícula de 5 µm	A) H ₂ O: Ac. Fórmico (450:23) B) MeOH	Muñoz, O. y col. ²⁴
Quercetina	Eclipse XDR-C ₁₈ con dimensiones de 150 x 4.6 mm y partícula de 5 µm	A) H ₂ O:AcOH (97:3) B) MeOH	Chen, H. y col. ²⁵

Tabla 2. Métodos analíticos desarrollados para la determinación de citroflavonoides por CLAE (Continuación).

Flavonoides	Columna	Fase móvil	Referencia
Hesperidina	Capital C ₁₈ con dimensiones de 250 x 4.6 mm y partícula de 5 µm.	H ₂ O:MeCN:AcOH 78:19:3	Saeidi, I. y col. ²⁶
Rutina Quercetina	Kromasil C ₁₈ con dimensiones de 250 x 4.6 mm y partícula de 5 µm.	A) Metanol. B) A. fórmico (0.1 %)	Tang, D. y col. ²⁷

Por otro lado, se puede observar que en los métodos descritos, solo se lleva a cabo la determinación de uno o dos citroflavonoides en un mismo análisis, por lo que el método desarrollado en el presente trabajo tiene la ventaja de determinar simultáneamente cinco citroflavonoides (naringina, naringenina, quercetina, rutina y hesperidina).²⁰⁻²⁷

A pesar de que se cuenta con métodos analíticos desarrollados para la cuantificación de citroflavonoides (Tabla 2), la gran mayoría de ellos no han sido sujeto de un proceso de validación, el cual permita dar certeza de sus resultados. La validación de estas metodologías analíticas es de gran importancia, ya que permite su aplicación en diferentes áreas, por ejemplo, en el entendimiento del tránsito de fármacos en el organismo, en la determinación de la biodisponibilidad de moléculas bioactivas o el estudio de la bioequivalencia de medicamentos, permitiendo garantizar su reproducibilidad.²⁰⁻²⁷

Métodos de extracción para la determinación de citroflavonoides

La extracción de los citroflavonoides depende en gran medida de la matriz de la cual se desea extraer dichos compuestos. Por ejemplo, cuando se trabaja con una matriz sólida se realiza una extracción mediante un equipo Soxhlet con metanol, para extraer los citroflavonoides presentes y posteriormente concentrarlos en un rotavapor hasta sequedad; mientras que para las muestras líquidas (plasma y/o suero humano o de roedor) se lleva a cabo mediante una extracción en fase sólida (EFS), la cual además de permitir concentrar los analitos de interés, permite eliminar las interferencias que están presentes en la matriz. En la Tabla 3 se presentan algunas características de métodos de extracción reportados en la literatura científica.²⁰⁻²⁸

Tabla 3. Métodos de extracción para citroflavonoides reportados en la literatura científica.

Flavonoides	Matriz	Método de extracción	Referencia
Quercetina	Plasma de roedor	EFS	González, S. A. ²⁰
Naringenina	Orina	Líquido – líquido	Yañez, J. A. y col. ²¹
Hesperidina Naringina	Cáscara de naranja	Soxhlet	Cabañas, W. A. ²²
Rutina Quercetina	Vino	Líquido - líquido	Fang, F. y col. ²³
Quercetina	Jugo de arándano	EFS	Chen, H. y col. ²⁵
Hesperidina	Jugo de lima	EFS	Saeidi, I. y col. ²⁶
Rutina Quercetina	Plasma de roedor	Líquido – líquido	Tang, D. y col. ²⁷
Quercetina Naringenina	Plasma humano	Hidrólisis enzimática y EFS	Prasain, J.K. y col. ²⁸

Optimización

En los últimos años, la quimiometría ha sido frecuentemente aplicada en la optimización de métodos analíticos, esto debido a que presenta varias ventajas, tales como la reducción del número de experimentos que necesitan ser ejecutados, resultando en una menor cantidad de reactivos consumidos y una disminución considerable del trabajo de laboratorio.²⁹

El diseño de Box-Behnken es un diseño de superficie de respuesta que no posee un diseño factorial o factorial incrustado. Este diseño tiene combinaciones de tratamiento que están en los puntos medios de los bordes del espacio experimental por lo que requiere al menos tres factores continuos.²⁹

Una de las ventajas del diseño Box-Behnken (DBB) es que suele tener menos puntos de diseño, lo que lo convierte en un diseño menos costoso de realizar, a comparación de los diseños centrales compuestos (DCC) con el mismo número de factores. Además, permite una estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden. En la Tabla 4 se presenta una comparación entre el DBB y el DCC,

donde podemos observar que para un mismo número de factores, el DBB requiere un menor número de experimentos, además de poseer una eficiencia superior al DCC.²⁹

Tabla 4. Comparación del Diseño Box-Behnken contra el diseño central compuesto.

Factores (K)	Número de experimentos		Eficiencia	
	DCC	DBB	DCC	DBB
2	9	-	0.67	-
3	15	13	0.67	0.77
4	25	25	0.60	0.60
5	43	41	0.49	0.61
6	77	61	0.36	0.46
7	143	85	0.25	0.42
8	273	113	0.16	0.40

En la literatura podemos encontrar trabajos como los realizados por Silvana, G. y col. en el que utilizan un DBB para la optimización de un método de extracción que permite la extracción simultánea de cinco flavonoides para su posterior análisis por CLAE, en dicho trabajo se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio mayor al 80 % y una DER menor al 6 %. Esto, demuestra la eficiencia del DBB y su aplicabilidad para la optimización de metodologías analíticas, mostrando además una ventaja estadística a comparación de los DCC.³⁰

Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico se define como el proceso mediante el cual se pretende demostrar, con evidencia experimental documentada, que dicho método cumple con el propósito para el que fue diseñado. Cualquier método analítico, antes de ser utilizado, debe ser validado, principalmente aquellos que se aplican a la cuantificación de fármacos o metabolitos en fluidos biológicos. En la Tabla 5 se representan los parámetros que son considerados cuando se pretende llevar a cabo el proceso de validación, según indica la Association of Official Analytical Chemists (AOAC).^{31, 32}

Tabla 5. Parámetros evaluados en la validación de un método analítico.³¹

Parámetro	Definición
Selectividad	Capacidad de un método para cuantificar exactamente un analito en presencia de una o más interferencias.
Linealidad	Habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

Tabla 5. Parámetros evaluados en la validación de un método analítico (Continuación).³¹

Parámetro	Definición
Límite de detección	Menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas del método.
Límite de cuantificación	Concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad, y veracidad bajo las condiciones establecidas del método.
Precisión	Grado de concordancia entre resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto bajo condiciones específicas.
Exactitud	Proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.
Robustez	Capacidad del método para mantenerse sin cambios ante pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método.

Para el estudio farmacológico de las moléculas o medicamentos, es indispensable contar con métodos analíticos validados que permitan llevar a cabo estudios de biodisponibilidad y farmacocinética, ya que a partir de estos estudios se toman decisiones importantes a la hora de la fabricación o en el desarrollo de nuevos fármacos. Un claro ejemplo de la importancia de contar con métodos analíticos validados es el estudio de los citroflavonoides (naringenina, naringina, quercetina, rutina y hesperidina), ya que dichos compuestos han demostrado poseer actividades farmacológicas relevantes principalmente en estudios relacionados con la diabetes e hipertensión; sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado en la literatura una metodología analítica que permita la cuantificación simultánea de estos compuestos en plasma de murino para establecer los parámetros farmacocinéticos (biodisponibilidad, vida media biológica, volumen de distribución, etc.) de dichos compuestos.^{33, 34}

En la tabla 6, se observan algunos métodos cromatográficos reportados en la literatura que han sido desarrollados y validados para la determinación de flavonoides en muestras biológicas (sangre, suero y orina). A diferencia de estos, el método cromatográfico desarrollado en el presente trabajo determinará cinco flavonoides de manera simultánea, además de poseer una adecuada linealidad, precisión y exactitud de acuerdo a los lineamientos de la AOAC.^{27, 35 – 37}

Tabla 6. Resultados de la validación de métodos analíticos utilizados para estudios farmacocinéticos.

Flavonoide	Linealidad (µg/mL)	Precisión (DER)	Exactitud (%)	LC (µg/mL)	Referencia
Rutina	1.2 – 20.2	2.1	81.1	0.4	Tang, D. y col. ²⁷
Quercetina	1.2 – 20.2	4.5	80.1	0.02	
Naringina	2 – 50	9.3	91.2	0.007	Xiuling, L. y col. ³⁵
Hesperidina	2 – 50	13.7	93.0	0.007	
Hesperidina	50 – 1200	3.2	98.6	0.005	Feras, I. K. y col. ³⁶
Naringenina	50 – 1200	3.3	98.1	0.005	
Naringina	0.017 – 0.203	3.8	93.2	0.0169	Kazuo, I. y col. ³⁷
Naringenina	0.034 – 0.168	4.3	97.8	0.0334	

Estudios farmacocinéticos

La farmacocinética estudia los procesos fisiológicos que determinan la cantidad de fármaco presente en el organismo que es necesaria para desencadenar una respuesta farmacológica. Para ello se requiere un análisis de las concentraciones de fármacos y la distribución de sus metabolitos en fluidos biológicos. La farmacocinética se divide en cinco etapas, mismas que permiten el estudio sistemático del tránsito del fármaco en el organismo, las cuales se explican en la Tabla 7.^{38, 39}

Tabla 7. Etapas del proceso farmacocinético.

Etapa	Definición
Liberación	Es el proceso por el cual el medicamento ingresa al organismo.
Adsorción	Comprende la entrada de los fármacos en el organismo, desde el sitio de administración hasta que este puede acceder a la circulación.
Distribución	Es el proceso mediante el cual los fármacos acceden a los órganos diana y aquellos encargados de su excreción.
Biotransformación	Son las transformaciones químicas que sufrirá el principio activo del fármaco para facilitar su eliminación.
Excreción	Es el proceso en el que el fármaco es eliminado del organismo por diferentes vías.

El estudio de la farmacocinética de los flavonoides es un asunto de interés debido a que permitirá entender su influencia sobre las actividades farmacológicas. El proceso que sufren los flavonoides después de entrar al organismo se ha entendido de manera parcial, sin embargo, debido a la diversidad estructural de estos, así como sus diversas características químicas, la farmacocinética de los flavonoides no se encuentra totalmente esclarecida, por lo que los procesos metabólicos que proceden a su absorción aún son objeto de estudio y debate.⁴⁰

Farmacocinética de los flavonoides

En la Tabla 8 se mencionan los parámetros farmacocinéticos de algunos flavonoides descritos en la literatura, donde es posible observar diferencias para los mismos tipos de compuestos. Esta variabilidad, es algo común en los estudios farmacocinéticos, debido a que existen una gran cantidad de factores que no pueden ser controlados a la hora de llevar a cabo el estudio, y que al final terminan perjudicando en los resultados obtenidos. Debido a esto, el contar con una metodología analítica validada y que posea una adecuada precisión y exactitud es de gran importancia, ya que esto permitirá no adicionar una mayor variabilidad durante los estudios farmacocinéticos.^{43 - 47}

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos de los flavonoides reportados en la literatura, después de una administración oral de estos.

Flavonoide	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	ABC (ng*h/mL)	T _{1/2} (h)	K _e (h ⁻¹)	Referencia
Quercetina	314.8	4.2	2131	8.4	-	Bin, D. y col. ⁴¹
Naringina	279.1	0.28	745.4	9.45	0.079	Tong, L. y col. ⁴²
Hesperidina	17.04	0.25	23.41	3.17	0.245	
Naringenina	1088	0.42	7597	4.43	0.159	
Rutina	51.65	0.26	85.34	1.19	0.77	He, J. y col. ⁴³
Quercetina	132.58	0.18	755.03	6.09	0.12	
Rutina	397.66	60	30.84	34.44	0.0201	Chang, L. y col. ⁴⁴
Quercetina	342.1	600	426.38	448.17	0.0016	
Naringenina	46.0	0.24	89.4	2.07	-	Yu, X. y col. ⁴⁵

Nota: C_{max} = Concentración máxima, t_{max} = tiempo en el que se alcanza la concentración máxima, ABC = área bajo la curva, t_{1/2} = tiempo de vida media, K_e = constante de eliminación.

Todos los datos obtenidos de la Tabla 8 corresponden a estudios farmacocinéticos realizados después de llevar a cabo la administración de los flavonoides por vía oral, lo que demuestra que los flavonoides glicosilados (Naringina, Hesperidina y Rutina) no serán hidrolizados completamente al estar en contacto con el ácido estomacal, ya que una fracción de estos será absorbido inalteradamente.⁴³⁻⁴⁷

Por otro lado, según lo descrito por Tong, L. y col.⁴², los flavonoides glicosilados (Naringina y Hesperidina), tuvieron una menor área bajo la curva (ABC) que el flavonoide no glicosilado (Naringenina), por lo cual se puede deducir que los flavonoides glicosilados presentan una menor biodisponibilidad oral a comparación de los flavonoides no glicosilados.⁴⁴

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar y validar una metodología analítica que permita la extracción y cuantificación simultánea de cinco citroflavonoides (naringina, naringenina, quercetina, rutina y hesperidina) en plasma de murino utilizando CLAE.

Objetivos particulares

1. Diseñar un método analítico por CLAE que permita la elución y separación de los cinco flavonoides de interés.
2. Desarrollar un método para la extracción simultánea de los cinco flavonoides de interés.
3. Optimizar el método de extracción desarrollado.
4. Validar el método analítico desarrollado de acuerdo a los lineamientos establecidos por la AOAC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Los reactivos empleados fueron Metanol (MeOH) y Acetonitrilo (ACN) grado HPLC (J. T. Baker, EUA), agua desionizada tipo I (18 M Ω -cm) obtenida por un sistema de filtración E-pure (Thermo Scientific, EUA). Los estándares de flavonoides utilizados eran de la marca Sigma Aldrich (México), de pureza grado estándar analítico, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de pureza de los estándares utilizados.

Flavonoide	Porcentaje de pureza (%)
Naringina	95
Naringenina	95
Rutina	90
Hesperidina	80
Quercetina	95

Método cromatográfico

Se utilizó un equipo CLAE marca Agilent Technologies 1200 Series (San José, CA, EUA) equipado con detector de arreglo de diodos e inyector automático. Se empleó como fase estacionaria, una columna Phase Sep Spherisorb de C₁₈, con dimensiones de 250 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 μ m.

La fase móvil consistió en H₃PO₄ al 1% (A), metanol (B) y Acetonitrilo (C); con un flujo de 1.3 mL/min. Se utilizó un sistema de disolventes en condiciones de gradiente, el cual se presenta en la Figura 7 y la Tabla 10. El volumen de inyección fue de 10 μ L, y la temperatura del termostato fue de 30 °C, con un tiempo de post corrida de 5 minutos. Para llevar a cabo la detección de los flavonoides se trabajó a 256, 284 y 370 nm, debido a que a dichas longitudes de onda estos compuestos presentan una mayor absorbancia, lo que permite mejorar la sensibilidad del método analítico, así como mejores límites de detección y cuantificación.

Tabla 10. Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de los flavonoides.

Minuto	% A	% B	% C
0	85	12	3
8	55	40	5
18	34	60	6
20	0	90	10

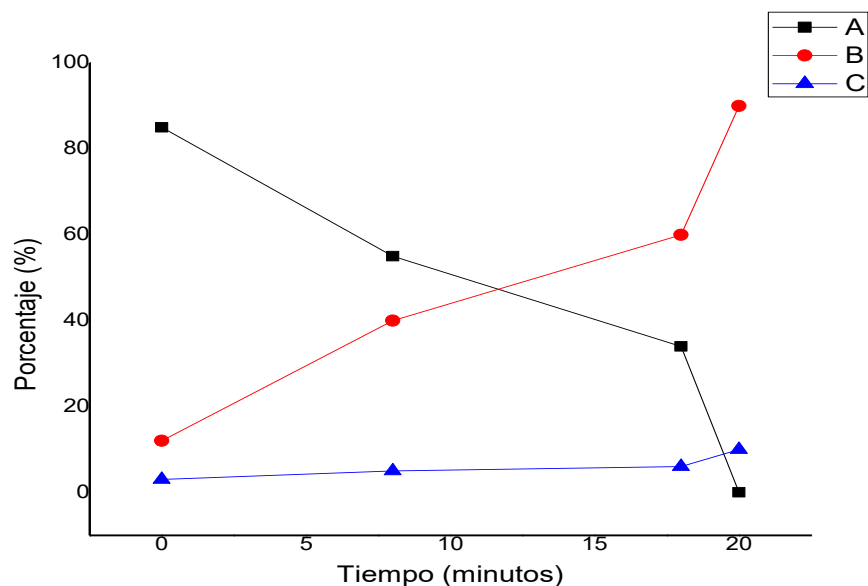


Figura 7. Gradiente utilizado para la separación de los flavonoides.

Extracción del plasma de murino

Para la obtención de plasma se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 200 – 250 g, las cuales fueron criadas en bioterio, mantenidas en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad; fueron alimentadas con Zeigler Rodent® y agua potable a libre acceso.

Los roedores fueron anestesiados con pentobarbital, utilizando una jeringa para insulina de 1mL. Posteriormente, mediante punción cardiaca, se obtuvieron las muestras de sangre, las cuales se almacenaron en ultracongelación (-80 °C) hasta su uso. La manipulación, almacenamiento y manejo de los animales de experimentación se llevó acorde a las normas descritas en la Ley de Regulación Federal para el Manejo y Experimentación de Animales, emitida por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) según la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Finalmente para la obtención del plasma, las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3200 r.p.m. durante 15 min.

Comparación de metodologías de extracción

Se compararon tres metodologías de extracción para determinar cuál obtenía los mejores porcentajes de recobro, la selección de las técnicas evaluadas se llevó a

cabo de acuerdo a lo reportado en la literatura para trabajos similares al desarrollado en el presente trabajo. Las metodologías implementadas fueron las siguientes:

- Extracción en fase sólida.
- Precipitación de proteínas.
- Extracción líquido – líquido.

La comparación de los porcentajes de recobro obtenidos de cada metodología se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 %. A continuación, se describen cada una de estas metodologías.

Extracción en fase sólida (EFS)

Se utilizaron cartuchos de C₁₈ (con 1000 mg de fase estacionaria y volumen de 6 mL) y un sistema de vacío múltiple con control de presión. El proceso de EFS consistió en la activación y acondicionamiento de la fase estacionaria, posteriormente la adición de la muestra, lavado para la eliminación de interferencias de la matriz y finalmente la elución de los citroflavonoides (Tabla 11). Para el desarrollo del método de extracción, se utilizó plasma de murino fortificado con los flavonoides para tener una concentración final de 20 µg/mL en un volumen de 5 mL.

Tabla 11. Condiciones para la extracción en fase sólida de los flavonoides en plasma de murino.

Procedimiento	Metodología de extracción
Activación	5 mL de MeOH
Acondicionamiento	5 mL de buffer de fosfatos (pH 7)
Adición de la muestra	500 µL de plasma de murino
Lavado	1 mL de buffer de fosfatos (pH 7)
Elución	4 mL de MeOH/DMSO (9:1)

Precipitación de proteínas (PP)

En un tubo cónico de 15 mL para centrifuga, se colocaron 500 µL de plasma de murino, los cuales fueron fortificados con flavonoides para obtener una concentración final de 20 µg/mL en un volumen de 5 mL. Posteriormente se adicionaron 4 mL de MeOH/DMSO (9:1) y se agitó vigorosamente la mezcla obtenida durante un minuto con el empleo de un vortex; finalmente la muestra se centrifugó a 4500 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un matraz aforado de 5 mL, y se completó el aforo con MeOH/DMSO (9:1), para finalmente realizar el análisis por CLAE.

Extracción líquido – líquido (ELL)

En un tubo cónico de 15 mL se colocaron 500 µL de plasma de murino el cual fue fortificado con los flavonoides para obtener una concentración final de 20 µg/mL en un volumen de 5 mL. Posteriormente se adicionaron 5 mL de buffer de fosfato a pH 7, y

se realizó la extracción líquido – líquido con 8 mL de acetato de etilo. Se transfirió la fase orgánica a un matraz balón y se evaporó totalmente con ayuda de un rotavapor; la muestra se reconstituyó con 5 mL de MeOH/DMSO (9:1) para finalmente realizar el análisis por CLAE.

Selección de variables para la optimización de la EFS

La selección de las variables que se utilizaron para la optimización del método de extracción se realizó con la ayuda de un diseño Plackett y Burman, en la Tabla 12 se muestran las variables evaluadas y sus respectivos valores. En la Tabla 13, se muestra el diseño Plackett y Burman utilizado.

Tabla 12. Variables empleadas en el diseño Plackett y Burman utilizadas para la selección de las variables que se emplearon en la optimización de la EFS.

Variable	- 1	+ 1
pH	3	7
% DMSO	0 %	20 %
Volumen de buffer	3 mL	7 mL
Volumen de elución	3 mL	5 mL
Volumen de lavado	1 mL	5 mL
Cartucho	200 mg	1000 mg

Tabla 13. Diseño Plackett y Burman utilizado en la selección de las variables que se emplearon para la optimización de la EFS.

pH	% DMSO	Volumen de buffer	Volumen de elución	Volumen de lavado	Cartucho
1	-1	1	1	-1	1
-1	1	1	-1	1	-1
1	-1	1	-1	-1	-1
1	1	1	-1	1	1
-1	-1	-1	1	1	1
1	-1	-1	-1	1	1
-1	1	-1	-1	-1	1
-1	-1	1	1	1	-1
-1	-1	-1	-1	-1	-1
1	1	-1	1	-1	-1
1	1	-1	1	1	-1
-1	1	1	1	-1	1

Optimización del método de extracción en fase sólida (EFS)

La optimización del método de extracción, se realizó con plasma de roedor fortificado a una concentración de 1 µg/mL, debido a que dicha concentración representa la concentración real que se utilizará en los estudios farmacocinéticos. Para llevar a cabo la optimización, se decidió aplicar un diseño de superficie de respuesta: Box – Behnken, en el cual se evaluaron las variables mostradas en la Tabla 14.

Tabla 14. Variables empleadas en el diseño Box – Behnken para la optimización del método de EFS.

Factores	- 1	0	1
pH	3	5	7
Volumen del buffer	3 mL	5 mL	7 mL
Cartucho	200 mg	500 mg	1000 mg

En la Tabla 15, se representa el diseño Box – Behnken utilizado para la optimización del método de extracción por extracción en fase sólida. Cada uno de los experimentos se llevó a cabo por triplicado.

Tabla 15. Diseño Box – Behnken utilizado para la optimización del método de EFS.

pH	Volumen de buffer	Cartucho
-1	0	-1
0	1	1
1	0	-1
0	1	-1
1	1	0
-1	0	1
0	-1	-1
1	-1	0
-1	-1	0
0	-1	1
-1	1	0
1	0	1
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Validación analítica

La validación del método analítico desarrollado en el presente trabajo se realizó utilizando como base los lineamientos establecidos por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

Linealidad instrumental

Se prepararon tres curvas de calibración en MeOH/DMSO (9:1) a cinco niveles (0.5, 1.5, 3, 5 y 7.5 $\mu\text{g/mL}$) las cuales se inyectaron al CLAE en tres tiempos diferentes (en la mañana, al medio día y en la noche). Este procedimiento se repitió durante tres días diferentes para obtener las variaciones interdía. Con los resultados obtenidos, se estableció la linealidad mediante un modelo lineal de primer orden, expresando la ecuación de la recta, así como el coeficiente de determinación lineal (R^2).

Repetibilidad instrumental

A partir de los valores obtenidos de las tres curvas de calibración a los cinco niveles (0.5, 1.5, 3, 5 y 7.5 $\mu\text{g/mL}$), se determinó la desviación estándar residual (DER) del método cromatográfico desarrollado. Este proceso fue repetido durante tres días diferentes con la finalidad de determinar la repetibilidad instrumental intradía.

Repetibilidad del Método

Se fortificó el plasma a tres concentraciones diferentes (1, 4 y 7 $\mu\text{g/mL}$) a partir de una solución madre de 100 ppm que contenía los flavonoides de interés. Posteriormente se realizó el proceso de extracción de la muestra, y se inyectó al cromatógrafo de líquidos. Se calculó la DER intradía e interdía y se determinó el porcentaje de desviación con respecto a la media para cada ensayo.

Exactitud con la prueba de añadido recuperado

Se prepararon tres curvas de calibración a cinco niveles, y se fortificaron tres muestras de plasma a tres concentraciones diferentes (1, 4 y 7 $\mu\text{g/mL}$), todas ellas a partir de una solución madre de 100 $\mu\text{g/mL}$ que contenía los flavonoides. Se integró el área de los puntos de la curva de calibración, y se comparó con los del plasma fortificado, para finalmente calcular el porcentaje de recuperación del plasma fortificado.

Límite de detección y cuantificación

El límite de detección y cuantificación se evaluó preparando tres curvas de calibrado de cinco niveles (0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5 µg/mL). Con estos datos se determinó el valor promedio del blanco por extrapolación, así como la desviación estándar de la señal del blanco, esto con la finalidad de determinar el límite de detección y cuantificación experimentales, basándonos en las siguientes ecuaciones:

Ecuación para el límite de detección (LD)

$$LD = X_{BI} + 3S_{BI}$$

Ecuación para el límite de cuantificación (LC)

$$LC = X_{BI} + 10S_{BI}$$

Dónde:

X_{BI} = Valor promedio del blanco.

S_{BI} = Desviación estándar de la señal del blanco.

Robustez del método cromatográfico

Para la determinación de la robustez del método cromatográfico se utilizó el diseño experimental de Plackett y Burman. Las variables que se estudiaron se encuentran representadas en la Tabla 16, así como los respectivos valores de cada variable. Por otro lado, en la Tabla 17 se representa el diseño de Plackett y Burman utilizado para la determinación de la robustez.

Tabla 16. Variables empleadas en el diseño de Plackett y Burman para la evaluación de la robustez del método cromatográfico.

Variables	- 1	+ 1
H ₃ PO ₄	0.5 %	1.5 %
Temperatura	25 °C	35 °C
Flujo	1.1 mL	1.5 mL
Vol. Inyección	9.5 µL	10.5 µL
Longitud de onda	- 5 nm	+ 5 nm
DMSO	0 %	20 %

Nota: El DMSO (Dimetilsulfoxido) es utilizado para disolver los estándares en el metanol.

Tabla 17. Diseño Placket y Burman utilizado para evaluar la robustez del método cromatográfico.

H ₃ PO ₄	Temperatura	Flujo	Vol. Inyección	Longitud de onda	DMSO
1	-1	1	1	-1	1
-1	1	1	-1	1	-1
1	-1	1	-1	-1	-1
1	1	1	-1	1	1
-1	-1	-1	1	1	1
1	-1	-1	-1	1	1
-1	1	-1	-1	-1	1
-1	-1	1	1	1	-1
-1	-1	-1	-1	-1	-1
1	1	-1	1	-1	-1
1	1	-1	1	1	-1
-1	1	1	1	-1	1

Estudio farmacocinético

Con la finalidad de demostrar la aplicabilidad del método cromatográfico se determinó la biodisponibilidad oral de los citroflavonoides hesperidina y naringenina.

Para ello se emplearon ratas normoglucémicas de la cepa Wistar, con un ayuno de 16 horas a las cuales se les administró por vía intragástrica (IG), una dosis de 75 mg/kg de hesperidina y naringenina (4:3) disuelta en 1.5 mL de solución salina fisiológica (SSF), utilizando para ello un catéter urinario marca Kendall DOVER® ROB-NEL® tamaño FR 8 y longitud de 16". Es importante aclarar que durante el presente trabajo se empleó el término "biodisponibilidad oral" aun cuando la administración fue por vía IG, esto es debido a las características de la administración oral, la cual conlleva amplios errores en la dosificación homogénea del grupo experimental.

Todas las muestras sanguíneas se tomaron por punción cardíaca. Los tiempos de recolección de muestras fueron 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 240, 360, 420 y 480 min post-administración. Se utilizaron tres ratas por tiempo, para hacer un total de 45 ratas para el grupo experimental. Estos tiempos se seleccionaron acorde a un estudio previo realizado en el Laboratorio de Farmacología (FQ-UADY).

Para la obtención del plasma, las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3200 r.p.m. durante 15 min. A partir de estas muestras se cuantificó la hesperidina y la naringenina libre por el método desarrollado en el presente trabajo.

Una vez obtenidos los resultados del estudio farmacocinético, los datos se analizaron con la ayuda del programa WinNonlin 2.0[®], esto con la finalidad de obtener los parámetros farmacocinéticos de estos dos flavonoides. Los parámetros que se determinaron los siguientes:

- Constante de eliminación (K_e).
- Constante de absorción (K_a).
- Concentración máxima (C_{max}).
- Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (t_{max}).
- Vida media ($t_{1/2}$).
- Area bajo la curva ($ABC_{0 \rightarrow t}$).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Sistema de elución

El sistema de elución cromatográfico inició con un gradiente de elución con elevada proporción de la fase acuosa, con la intención de aumentar el factor de capacidad (k') de los analitos, y finalizó con 90 % de fase orgánica, lo que permitió la elución de los analitos menos polares. En la Tabla 18 puede observarse la existencia de una relación directamente proporcional del número de platos teóricos con k' , dicha relación determina el orden de elución de los citroflavonoides, donde eluyeron, en primera instancia, los compuestos glicosilados (naringina, hesperidina y rutina), y finalmente los no glicosilados (naringenina y quercetina).

En la Tabla 18 se enlistan los tiempos de retención para cada uno de los flavonoides. Además se puede observar que todos los picos correspondientes a los flavonoides poseen buena simetría, ya que presentaron valores por encima de 0.8. Adicionalmente, pudo obtenerse una retención relativa (α) de 1.04 para la naringina y la hesperidina, y una resolución (R_s) de 1.53, hecho que indica la existencia de una adecuada separación entre estos dos componentes.

Tabla 18. Parámetros cromatográficos de los flavonoides.

Flavonoide	T_R (Minutos)	N	K'	Simetría
Naringina	10.97	61839	5.67	0.909
Hesperidina	11.40	79635	5.94	0.861
Rutina	12.34	75878	6.48	0.837
Naringenina	14.09	78457	8.08	0.809
Quercetina	16.16	87715	8.87	0.812

El método cromatográfico desarrollado, a comparación de los que se reportan en la literatura (Tabla 2), posee la ventaja de lograr la elución y separación de los cinco flavonoides (Figura 8). Además, se logró reducir el tiempo de corrida en un tercio, ya que los métodos previamente descritos requieren tiempos más prolongados (30 a 50 minutos) para lograr la elución y separación de una menor cantidad de flavonoides. Esto se logró, gracias al sistema de elución en gradiente que permitió la separación, así como una resolución y simetría en los picos igual o superior a los métodos previamente descritos en la literatura.

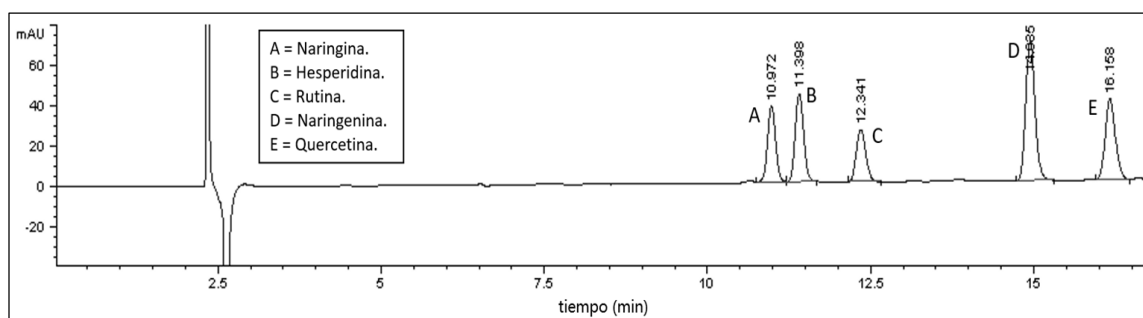


Figura 8. Cromatograma de la elución de la mezcla de estándares disueltos en MeOH/DMSO (9:1).

Comparación de metodologías de extracción

Para la evaluación de las diferentes metodologías de extracción (Tabla 19), se determinó con un 95 % de confianza la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada una de las medias, observando que la EFS presenta el mejor porcentaje de recobro promedio con un 82.85 % y la ELL, la de menor porcentaje de recobro promedio, con un 41.94 %. De acuerdo con el error estándar, la EFS demostró tener mejor precisión y reproducibilidad a diferencia de la ELL, la cual presentó un intervalo de valores entre 17.88 y 80.58 % de recuperación. El gráfico de mínima diferencia significativa (Figura 9), corrobora la existencia de diferencia significativa entre la EFS y la ELL.

Tabla 19. Resultados obtenidos de la comparación del porcentaje de recuperación de las diferentes metodologías de extracción.

Flavonoide	EFS %	ELL %	PP %
Naringina	88.47	17.88	83.60
Hesperidina	90.82	19.76	79.15
Rutina	77.97	22.46	68.43
Naringenina	85.44	80.58	74.84
Quercetina	71.54	69.01	59.71
Promedio	82.85	41.94	73.15
DE	0.0796	0.3032	0.0937

Nota: EFS = Extracción en fase solida; ELL = Extracción liquido – liquido; PP = Precipitación de proteínas.

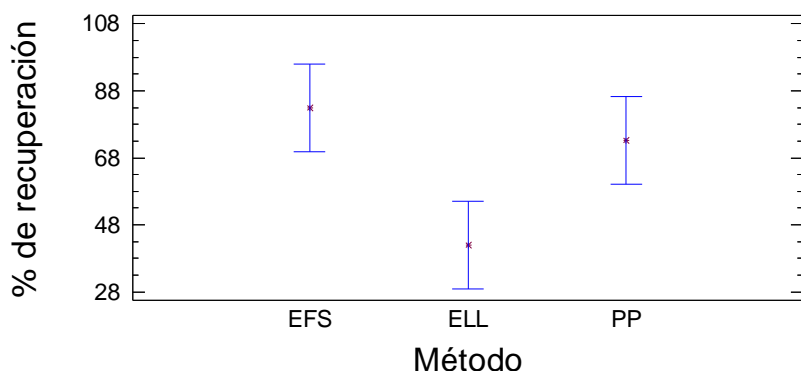


Figura 9. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción.

La ELL presentó menor precisión y exactitud de los tres métodos comparados, debido a que los flavonoides glicosilados, como la naringina, hesperidina y rutina, presentaron porcentajes de recobro menores al 23%, mientras que los no glicosilados presentaron valores mayores al 65%. Esto, puede observarse en la gráfica de mínima diferencia significativa de la hesperidina y de la naringenina (Figura 10 y 11 respectivamente).

Este comportamiento, es debido a que los flavonoides glicosilados (como la hesperidina), al tener en su estructura molecular al disacárido rutinosa, éste le confiere una mayor polaridad, a comparación de los flavonoides no glicosilados (como la naringenina); motivo por el cual se presenta esta variabilidad en los resultados obtenidos por el método desarrollado. Otros trabajos, como el descrito por Zhang, K. y Col.⁴⁶, presentaron un recobro promedio del 79.3% utilizando la ELL, sin embargo esto debido a que fueron utilizados únicamente flavonoides no glicosilados.

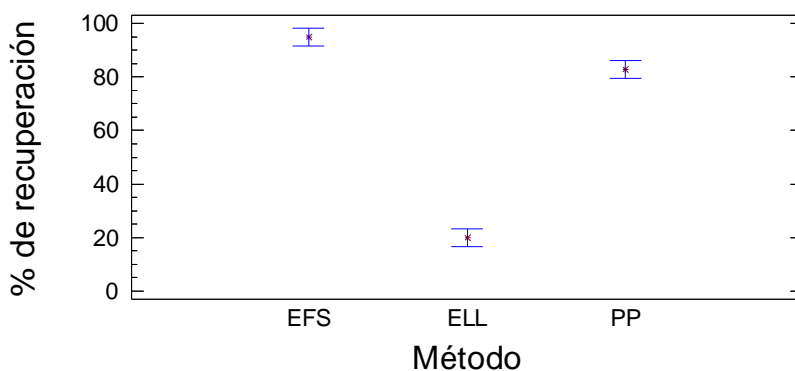


Figura 10. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la hesperidina.

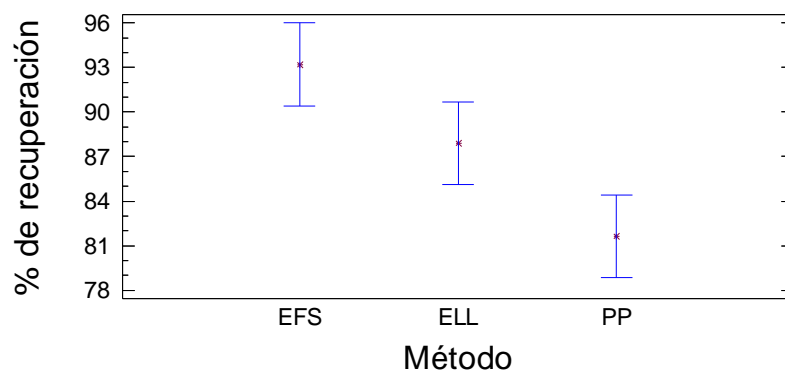


Figura 11. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la naringenina.

La PP, a pesar de arrojar mejores resultados con respecto a la ELL y no mostrar diferencias significativas con la EFS (Figura 9), presentó menor precisión y exactitud promedio. Esto se puede deber a que una fracción de los flavonoides se precipitó con las proteínas al momento de centrifugar las muestras. El más claro ejemplo de este fenómeno puede observarse en el gráfico de mínima diferencia significativa de la quercetina (Figura A1, anexo 1), el cual fue el flavonoide que presentó el menor porcentaje de recuperación al utilizar la PP como método de extracción, obteniendo incluso un mayor porcentaje de recuperación al utilizar la ELL.

La EFS presentó los mejores resultados entre las metodologías comparadas, debido a que antes de adicionar la muestra al cartucho de C_{18} , esta se diluyó en 5 mL de buffer de fosfato a pH 7, lo que permitió que el factor de capacidad de los flavonoides aumente, favoreciendo que éstos se retengan en la fase estacionaria. En la literatura, este es el método de extracción mayormente utilizado; trabajos como los de Xiuling L. y col.³³ y Kazuo I. y col.³⁵ reportan porcentajes de recobro promedio de 91.2% y 95.5% respectivamente, lo que corrobora a dicha técnica como la más indicada de las tres que se evaluaron.

Selección de las variables para la optimización

En la Figura 12 se representan los resultados obtenidos del diseño Plackett y Burman utilizado para determinar las variables del método de extracción que se utilizaron para la optimización de este, seleccionando las 3 variables que tuvieron mayor efecto significativo sobre el porcentaje de recuperación promedio de los flavonoides. En la Figura 12, podemos observar que el pH y la cantidad de fase estacionaria que contiene el cartucho, son los factores que afectan significativamente el porcentaje de recuperación.

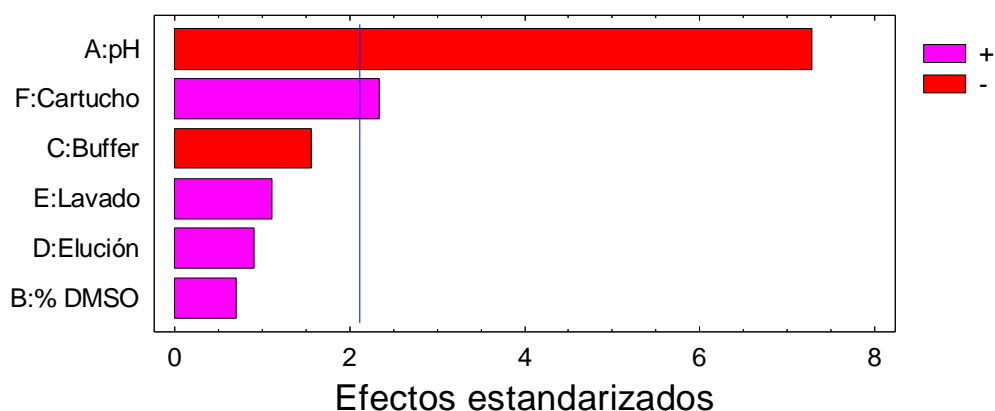


Figura 12. Diagrama de Pareto obtenido del diseño Plackett y Burman de la selección de las variables para la optimización del método de EFS.

Con base a lo mencionado anteriormente y a lo observado en la Figura 12, se decidió que los factores determinantes para optimizar la EFS son: 1) el pH del buffer en el que se lleva a cabo la dilución de la muestra y el acondicionamiento de la fase estacionaria, 2) la cantidad de fase estacionaria y, 3) el volumen de buffer necesario para diluir la muestra.

Optimización del método de extracción en fase sólida (EFS)

En la Figura 13, se representa el diagrama de Pareto, obtenido de la optimización del método de extracción mediante el diseño Box – Behnken. En este podemos observar que el factor que tiene mayor efecto significativo sobre el porcentaje de recuperación de los flavonoides es el pH del buffer. También, podemos observar que el pH afecta de forma negativa nuestra respuesta, lo que indica que mientras más aumentemos el pH, el porcentaje de recuperación de los flavonoides será menor, y por el contrario, si trabajamos a un pH menor a 5 (nuestro punto central), el porcentaje de recuperación será mayor.

El efecto mencionado anteriormente se debe a que si trabajamos a un pH mayor de 5, los flavonoides presentan desprotonación de sus grupos $-OH$, lo que da lugar a la formación de especies con carga negativa. Dicha carga hará que las moléculas aumenten su solubilidad en el agua, impidiendo que esta se retenga en el cartucho de C_{18} . Caso contrario ocurre a un pH menor de 5, en el que los flavonoides no presentan carga en su estructura, lo que contribuye a una mayor retención en el cartucho, y por consecuencia, un mayor porcentaje de recuperación.

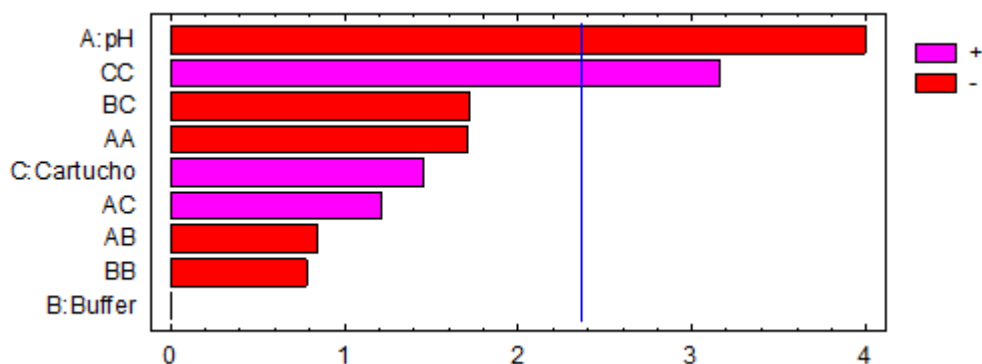


Figura 13. Diagrama de Pareto obtenido de la optimización del método de EFS.

De la optimización del método también se obtuvo el gráfico de superficie de respuesta (Figura 14), en el cual podemos observar como el porcentaje de recuperación aumenta conforme el pH del buffer de fosfatos disminuye. De igual forma, es posible observar un máximo de recuperación (del 90 – 91.5 %) a un pH cercano a 3 (-1) y a un volumen de buffer de fosfatos cercano a 5 mL (0). Para poder determinar las condiciones de extracción exactas que dan lugar al máximo porcentaje de recuperación, es necesario analizar la ecuación de la regresión que se ajusta a los datos.

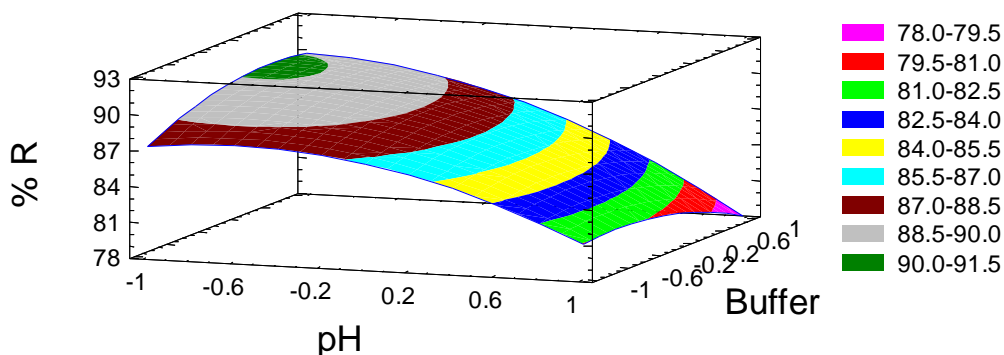


Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta de la optimización del método de EFS.

La ecuación 1 describe el comportamiento de la respuesta conforme cambia el valor de cada una de las variables evaluadas. Donde, X_1 representa el pH, X_2 la cantidad de buffer de fosfato utilizado, y X_3 la cantidad de fase sólida del cartucho.

$$\% R = 87.9358 - 4.5136X_1 - 0.00324698X_2 + 1.63721X_3 - 2.64922X_1^2 - 1.34997X_1X_2 + 1.92685 X_1X_3 - 1.21294X_2^2 - 2.75091X_2X_3 + 4.92494X_3^2$$

Con la finalidad de encontrar los valores que corresponden al punto óptimo de la extracción, se llevó a cabo las derivadas parciales para cada una de las variables estudiadas, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dy}{dx_1} = -4.5136 - 5.29844x_1 - 1.34997x_2 + 1.92685x_3$$

$$\frac{dy}{dx_2} = -0.00324698 - 1.34997x_1 - 2.42588x_2 - 2.75091x_3$$

$$\frac{dy}{dx_3} = 1.63721 + 1.92685x_1 - 2.75091x_2 + 9.84988x_3$$

Posteriormente, se resolvió el sistema de ecuaciones lineales de 3 incógnitas con la finalidad de obtener los puntos óptimos teóricos. En la Tabla 20 se representan los resultados obtenidos al resolver el sistema de ecuaciones, si comparamos los resultados obtenidos en la Tabla 20 con la Figura 14, podemos observar que los puntos óptimos corresponden al máximo del gráfico de superficie de respuesta.

Tabla 20. Puntos óptimos obtenidos a partir de la resolución del sistema de ecuaciones.

Factor	Variable codificada	Variable natural
pH	-0.90496	3.19
Volumen de buffer	0.37214	5.74
Cartucho	0.11475	557.37

Linealidad instrumental

La linealidad se evaluó para cada analito mediante un modelo lineal de primer orden ($y = mx + b$) por suma de mínimos cuadrados, para expresar la ecuación de la recta, así como el coeficiente de determinación (R^2). A simple vista (Figura 15) se observa un incremento proporcional a la concentración, que de acuerdo con la ecuación de la recta y R^2 (Tabla 21), se determinó que los valores se aproximan a un modelo de primer orden mayor a un 99%, por lo que se deduce que el método es lineal para los 5 flavonoides, según los parámetros de validación de la AOAC, con un intervalo dinámico para cada flavonoide entre 0.5 a 7.5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 21. Resultados de los estudios de linealidad del método cromatográfico.

Flavonoide	Ecuación de la recta	R^2
Naringina	$Y = 11.893X - 0.6756$	0.9983
Hesperidina	$Y = 16.2X - 0.4822$	0.9966
Rutina	$Y = 11.867X - 1.3267$	0.9983
Naringenina	$Y = 54.76X - 0.8822$	0.9988
Quercetina	$Y = 19.244X - 0.3756$	0.9984

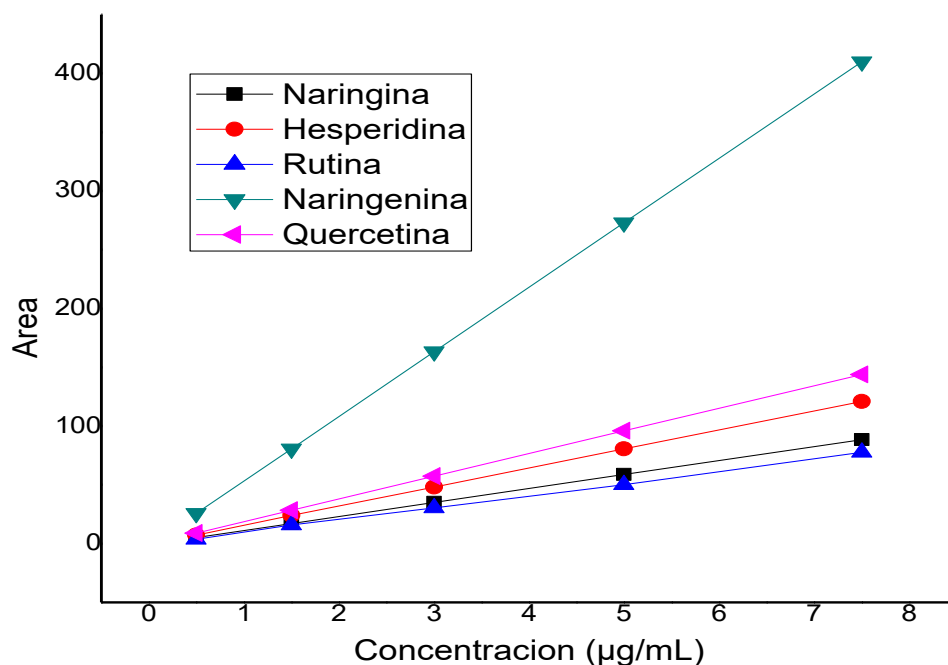


Figura 15. Curvas de calibración de los flavonoides.

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Los LD y LC fueron calculados para cada flavonoide con base a la desviación estándar residual de la recta y la pendiente (Tabla 22), encontrándose entre 0.02 a 0.10 µg/mL y 0.04 a 0.19 µg/mL, respectivamente.

Tabla 22. Resultados obtenidos de los estudios del límite de detección y cuantificación.

Flavonoide	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
Naringina	0.06	0.13
Hesperidina	0.06	0.15
Rutina	0.10	0.19
Naringenina	0.02	0.04
Quercetina	0.02	0.05

Si comparamos los LD y LC obtenidos con los reportados en la literatura (Tabla 23), podemos observar que estos se encuentran dentro del mismo rango de valores, ya que los LD reportados van de 0.01 a 0.20 µg/mL, mientras que los LC de 0.02 a 0.67 µg/mL. Además, el método desarrollado en el presente trabajo posee la ventaja analítica de poder determinar una mayor cantidad de flavonoides en un solo análisis.

Tabla 23. Límites de detección y cuantificación para flavonoides en trabajos previos utilizando DAD.

Flavonoide	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LC ($\mu\text{g/mL}$)	Referencia
Quercetina	0.15	0.50	Gonzales, S. A. ²⁰
Rutina	0.10	0.40	Tang, D. y col. ²⁷
Quercetina	0.01	0.02	
Rutina	0.20	0.67	Chen, S. y col. ⁴⁷
Quercetina	0.03	0.11	
Hesperidina	0.03	0.10	Behruz, B. y col. ⁴⁸
Naringina	0.02	0.08	
Naringenina	0.04	0.12	

Tomando como referencia el trabajo realizado por González, S. A.²⁰ en 2014, podemos decir que el método desarrollado posee LD y LC adecuados para realizar estudios farmacocinéticos, ya que a pesar de reportar LD y LC semejantes, fue posible estudiar la biodisponibilidad de la quercetina en ratas normoglucémicas y en ratas con diabetes inducida.

Precisión y exactitud

La precisión y la exactitud se determinaron fortificando el suero con los estándares de los flavonoides en tres niveles diferentes (1, 4 y 7 $\mu\text{g/mL}$), de acuerdo a las recomendaciones de la AOAC. En la Tabla 24 se representan los resultados de la evaluación de la precisión del método desarrollado, en esta se puede observar que todos los flavonoides tuvieron una DER intradía promedio menor a 6 %, lo que indica que el método analítico es preciso de acuerdo a los lineamientos establecidos por la AOAC.

Tabla 24. Resultados intradía obtenidos del análisis de precisión del método analítico.

Flavonoide	1 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	7 $\mu\text{g/mL}$	Promedio
Naringina	0.91	0.75	0.44	0.70
Hesperidina	4.18	3.63	1.50	3.10
Rutina	3.24	2.43	1.36	2.34
Naringenina	2.46	2.14	0.86	1.82
Quercetina	4.64	4.09	1.53	3.42

La DER interdía (Tabla 25) dio valores promedio menores al 6 % para todos los flavonoides, esto nos indica que no hay diferencia significativa entre los días para la naringina, hesperidina, rutina, naringenina y quercetina.

Tabla 25. Resultados interdía obtenidos del análisis de precisión del método analítico.

Flavonoide	1 µg/mL	4 µg/mL	7 µg/mL	Promedio
Naringina	1.32	1.25	1.01	1.19
Hesperidina	4.67	3.95	2.71	3.78
Rutina	6.20	5.93	4.05	5.39
Naringenina	3.21	3.19	3.09	3.16
Quercetina	6.41	5.56	3.71	5.23

Si comparamos los resultados de precisión obtenidos en el presente trabajo con trabajos similares reportados en la literatura (Tabla 5), se puede concluir que el método analítico desarrollado es más preciso que el reportado por Xiuling L. y col.³³ ya que obtuvieron DER de 9.3 % para la naringina y 13.7 para la hesperidina.

En la Tabla 26 se representan los resultados de la evaluación de la exactitud del método desarrollado, en donde se puede observar que todos los flavonoides tuvieron porcentajes de recuperación mayores al 90 %, lo que indica que el método analítico es exacto, acorde a los lineamientos establecidos por la AOAC (entre 80 y 110 %).

Tabla 26. Resultados obtenidos del análisis de exactitud del método analítico.

Flavonoide	1 µg/mL (%)	4 µg/mL (%)	7 µg/mL (%)	Promedio (%)
Naringina	96.1	97.4	98.8	97.4
Hesperidina	95.1	96.6	99.3	97.0
Rutina	92.9	94.3	96.5	94.6
Naringenina	95.5	97.8	98.3	97.2
Quercetina	93.1	95.9	97.1	95.4

Por comparación de los resultados obtenidos con los reportados en la literatura (tabla 6), podemos concluir que el método analítico desarrollado arrojó mejores porcentajes de recuperación, ya que mientras Tang D. y col.²⁷ reportaron recuperaciones del 81.1 % para la rutina y 80.0 % para la quercetina. En el presente trabajo se obtuvieron recuperaciones del 96.6 % y del 95.4 % respectivamente para los mismo flavonoides.

Robustez del método cromatográfico

Mediante la aplicación diseño de Plackett y Burman, se observó que las variables que afectan significativamente la respuesta del método cromatográfico son el flujo de la fase móvil, el volumen de inyección y la longitud de onda, tal y como podemos observar en las Figuras A4, A5, A6 y A7 del anexo 2.

El flujo de la fase móvil fue el factor que presentó mayor efecto significativo ($p < 0.05$) en la respuesta de flavonoides como la naringina y la naringenina (Figura 16 y Figura A7 del anexo 2), esto es debido que al disminuir el flujo de la fase móvil hubo un aumento significativo en la respuesta de los flavonoides, esto pudo deberse a que la disminución del flujo propicia el aumento de la difusión longitudinal, lo que provoca que los picos se ensanchen y a su vez den un área mayor.

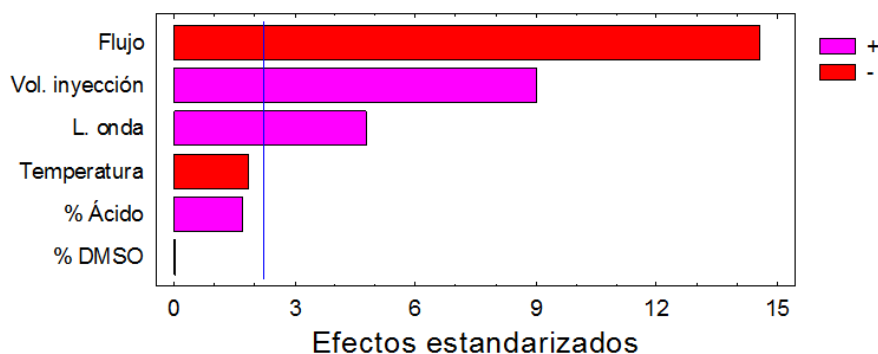


Figura 16. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la naringina.

La longitud de onda fue el factor que afectó de manera significativa ($p < 0.05$) la respuesta de la hesperidina, rutina y quercetina (figura A4, A5 y A7), esto es debido a que los flavonoides presentaron variación significativa en su absorbancia al llevar a cabo pequeñas modificaciones en la longitud de onda del DAD. En la Figura 17 se muestra el espectro de UV de la hesperidina, en donde se observa que dicho flavonoide tiene un máximo de absorbancia a los 284 nm, motivo por el cual se seleccionó dicha longitud de onda para trabajar, al hacer pequeñas variaciones a dicha longitud de onda, se puede observar una disminución de la absorbancia de la hesperidina (Figura 17), provocando que la respuesta del detector hacia dicho flavonoide sea menor. Este fenómeno se repite en los demás flavonoides, debido a que sus espectros de UV son similares entre sí.

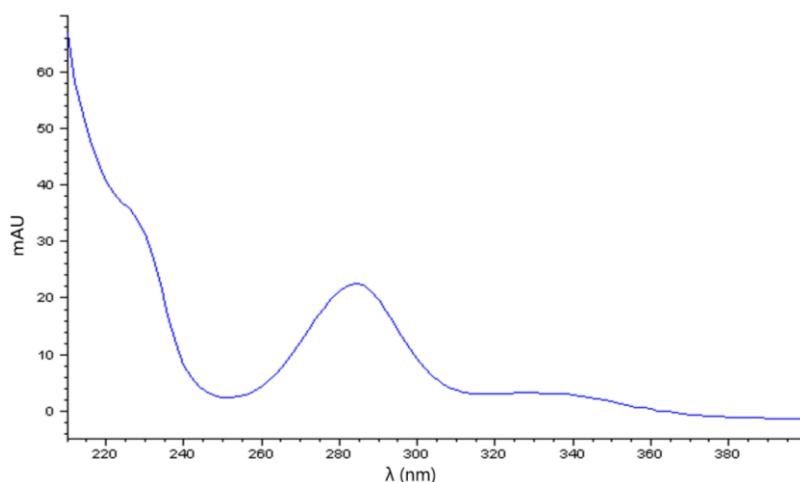


Figura 17. Espectro de UV de la hesperidina.

Otro de los factores que afectaron significativamente la respuesta de los flavonoides fue el volumen de inyección, esto ocasionado por que al aumentar el volumen de muestra inyectado, hay un incremento proporcional de la cantidad de analito que es introducido a la columna, propiciado un aumento en el área de los picos. Además de que al aumentar dicho volumen de inyección, se introduce también una mayor cantidad de disolvente en el que se encuentran disueltos los analitos, afectando la retención de estos, y propiciado que los picos se ensanchen, resultando también en un incremento de sus áreas.

Se puede señalar que es de gran importancia tomar en cuenta los tres factores mencionados anteriormente al momento de realizar un análisis con el método desarrollado en el presente trabajo, ya que de esto dependerá que los resultados obtenidos sean reproducibles.

Estudio farmacocinético

En la Tabla 27 se representan los resultados obtenidos del estudio de biodisponibilidad, después de llevar a cabo la administración oral de una dosis de 75 mg/kg de hesperidina y naringenina (4:3) disuelta en 1.5 mL de solución salina fisiológica (SSF). En esta podemos observar, que la hesperidina comenzó a dar una señal cuantificable a partir de los 10 minutos de ser administrada,

En el caso de la naringenina, a pesar que se logró detectar dicho flavonoide en algunas muestras de plasma (a los 120 minutos), la señal no fue suficiente para llevar a cabo la cuantificación de este flavonoide. Esto pudo deberse a la baja solubilidad que este compuesto presentaba en la solución salina fisiológica (SSF), contribuyendo a que la cantidad de naringenina administrada no sea la suficiente para ser detectada de forma confiable por el método analítico desarrollado en el presente trabajo.

Tabla 27. Resultados obtenidos del estudio farmacocinético de la hesperidina.

Tiempo (minutos)	Rata 1 (µg/mL)	Rata 2 (µg/mL)	Rata 3 (µg/mL)	Promedio (µg/mL)	DE
0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
10	0.3608	0	0	0.1203	0.208
15	0.5753	0.4801	0.1955	0.4170	0.198
30	0.5200	1.0287	0.8720	0.8069	0.261
45	0.9662	0.8316	0.7567	0.8515	0.106
60	0.7334	1.0692	0.9001	0.9009	0.168
75	1.0023	0.6966	2.3838	1.3609	0.899
90	11.8475	2.3141	3.1874	5.7830	5.270
105	2.1713	4.8452	15.8467	7.6211	7.248
120	4.0043	5.4660	6.4993	5.3232	1.254
240	1.5937	1.2446	1.2800	1.3727	0.192
360	0	1.2609	0.8858	0.7156	0.647
420	0	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0

Nota: DE = Desviación estándar.

En la figura 18 se representa un cromatograma obtenido del análisis cromatográfico de una muestra de plasma de roedor, después de 90 minutos de la administración oral de una dosis de 75 mg/kg de hesperidina y naringenina (4:3). En este se puede visualizar la señal correspondiente a la hesperidina, con un tiempo de elución de 11.58 minutos.

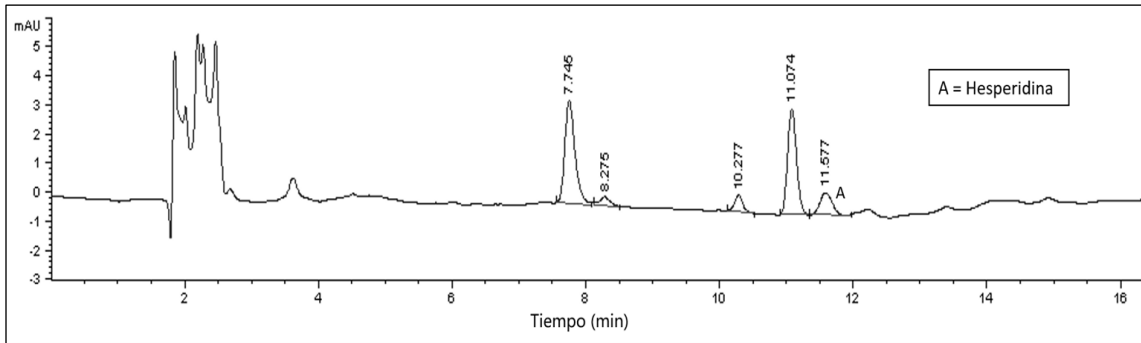


Figura 18. Cromatograma de una muestra de plasma de roedor después de la administración oral de 75 mg/kg de hesperidina y naringenina (4:3).

En la Figura 19, se representa la curva de concentración plasmática vs. tiempo de la hesperidina después de su administración oral. En esta podemos observar como a partir del minuto 10, la concentración de hesperidina en el plasma va aumentando hasta el minuto 105, en el cual se alcanza la concentración plasmática máxima (C_{max}), esta etapa del proceso farmacocinético es considerada el proceso de absorción del fármaco, en el cual la velocidad de absorción es mayor que la velocidad de eliminación. Del minuto 105 al 420 la concentración plasmática de hesperidina comienza a disminuir, en dicha etapa se lleva a cabo el proceso de eliminación de la hesperidina del organismo, en el cual la velocidad de eliminación es mayor que la velocidad de absorción del fármaco.

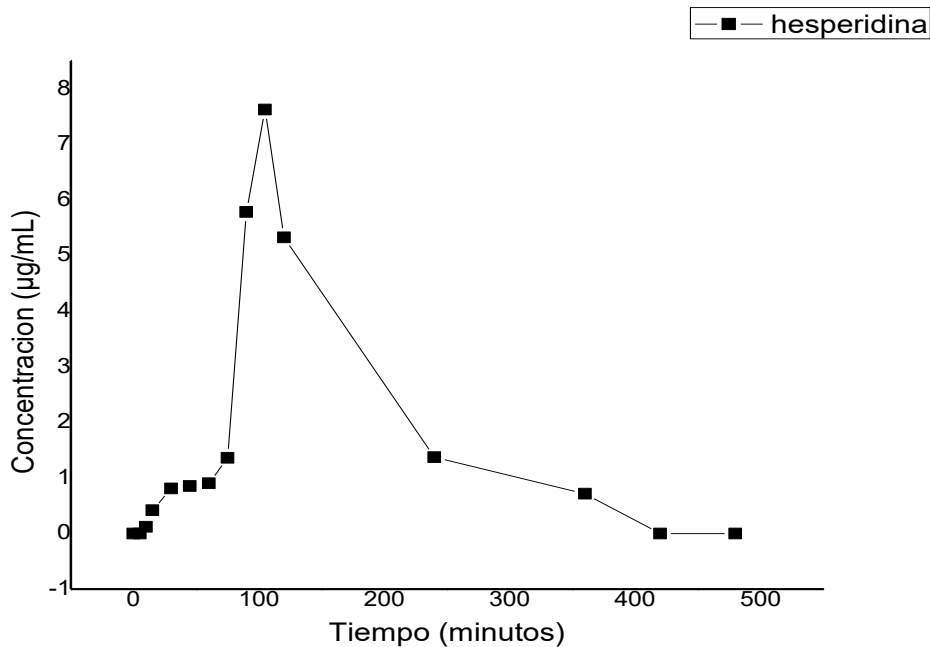


Figura 19. Curva de concentración plasmática vs. tiempo de la hesperidina después de su administración oral.

En la Tabla 28, se representan los parámetros farmacocinéticos calculados con ayuda del software WinNonlin 2.0 ®, en esta podemos observar que el valor de la constante de eliminación (K_e) fue de 0.0092 min^{-1} , mientras que el valor de la constante de absorción fue de 0.0206 min^{-1} , esto nos indica que la hesperidina se absorberá a una velocidad mayor a la que esta es eliminada del cuerpo, esto es algo que podemos observar gráficamente en la Figura 18, en la que la pendiente formada en el proceso absorción es mayor a la pendiente que se forma en el proceso de eliminación del fármaco.

De igual forma, se obtuvo el valor de C_{max} y t_{max} , que corresponden a la concentración plasmática máxima que se cuantificó de la hesperidina, y a que tiempo se determinó dicha concentración, dando un valor de C_{max} promedio de $7.62 \mu\text{g/mL}$ y un t_{max} de 105 minutos. La vida media ($t_{1/2}$) de la hesperidina fue de 180.4 minutos, indicándonos que a ese tiempo se habrá eliminado la mitad de flavonoide que fue absorbido.

Tabla 28. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del estudio farmacocinético de la hesperidina.

Parámetro farmacocinético	Valor
Constante de eliminación (K_e)	0.0092 min^{-1}
Constante de absorción (K_a)	0.0206 min^{-1}
Concentración máxima (C_{max})	$7.62 \mu\text{g/mL}$
Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (t_{max})	105 minutos
Vida media ($t_{1/2}$)	180.4 minutos
Área bajo la curva ($ABC_{0 \rightarrow t}$)	$831.61 \mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$

Si comparamos los parámetros farmacocinéticos obtenidos en el presente trabajo (Tabla 26), con los reportados en la literatura, por ejemplo, lo reportado por Tong, L. y col.⁴² (Tabla 8), podemos observar una variación en los resultados obtenidos, esto se puede deber a que Tong, L. y col.⁴² administraron la hesperidina simultáneamente con dos flavonoides más (Naringina y Naringenina), mientras que en este estudio, la hesperidina fue coadministrada con naringenina únicamente, pudiendo contribuir a que el proceso de absorción y eliminación del flavonoide se llevara a cabo de forma diferente, así como la biodisponibilidad de este. Además de lo mencionado anteriormente, pueden presentarse otros factores que pudieron afectar los parámetros farmacocinéticos, como el estrés que sufrió el animal durante el análisis, el régimen alimenticio al que fue sometido y la genética del roedor.

CONCLUSIONES

Se logró el desarrollo de un método por CLAE para la determinación simultánea de 5 flavonoides (naringina, hesperidina, rutina, naringenina y quercetina), el cual expone la complejidad y diferencia de los parámetros físico – químicos entre cada uno de los flavonoides.

Se determinó que de las tres técnicas que se evaluaron en el presente trabajo, la que proporcionó los mejores porcentajes de extracción de los flavonoides del plasma de murino fue la extracción en fase sólida, además de demostrar una mejor repetibilidad.

Se llevó a cabo la optimización del método de extracción en fase sólida con la ayuda de un diseño Box – Benhken, en la que se obtuvo que el pH óptimo para diluir la muestra y acondicionar la fase sólida fue de 3.19, el cual permitió un porcentaje de recobro promedio de 95.78 ± 1.55 %. Esto debido, a que ha dicho pH los flavonoides no poseen carga en su estructura molecular, contribuyendo a su retención en el cartucho de C_{18} .

La validación del método analítico dio como resultado un coeficiente de correlación lineal mayor a 0.99 en un rango de trabajo entre 0.5 a 7.5 $\mu\text{g/mL}$. Los LD y LC del método se encontraron entre 0.02 a 0.10 $\mu\text{g/mL}$ y entre 0.04 a 0.19 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. El porcentaje de recuperación total del método fue de 95.78 ± 1.55 %, mientras que la precisión intradía de este fue de 2.28 ± 1.34 %, lo que de acuerdo a los parámetros establecidos por la AOAC, dichos valores se encuentran dentro del intervalo que establece, por lo cual se concluye que el método analítico desarrollado es exacto y preciso.

Con el método analítico desarrollado se logró realizar el estudio farmacocinético de la hesperidina, después de administrar en forma oral a roedores macho de la cepa Wistar; se observó que bajo nuestras condiciones experimentales la hesperidina alcanzó una concentración máxima (C_{max}) promedio de 7.62 ± 4.18 $\mu\text{g/mL}$ a los 105 minutos posteriores a su administración. Con los resultados obtenidos se pudieron determinar los parámetros farmacocinéticos, mismos que se encuentran reportados en el presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Rusznyak, S.; Szent-Gyrgyi, A. Vitamin P: Flavonols as Vitamins. *Nature*. **1936**, 27, 138.
2. Aherne, S.A.; O'Brien, N.M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. **2002**; 18, 75 – 81.
3. González, S.A.; Cabañas, W.A.; Arana, A.V.; Hernández, N.E.; Ortiz, A.R. Citroflavonoides como posible alternativa en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **2011**, 42, 17 – 26.
4. Chem, X.; Yin, Q.P.; Zuo, Z. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm. Res*. **2005**, 6, 892 – 901.
5. Azza, M.; Mather, M. Improved LC methods for the determination of diosmin or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *JPBA*. **2003**, 33 243 – 249.
6. Kochar, A.; Nagi, M. Effect of supplementation of traditional medicinal plants on blood glucose in non-insulin-dependent diabetics: A Pilot Study. *J. Med. Food*. **2005**, 8, 545 – 549.
7. Zibula Smx, Ojewole JAO. Hypoglycemic effects of *Hypoxis hemerocallidea* Corm “African potato” methanolic extract in rats. *Medical Journal I.A.S.* **2002**, 13, 75 – 78.
8. Quiñones, M.J. (2015). Caracterización fisicoquímica y determinación de la estabilidad del complejo de inclusión hesperidina/ α -ciclodextrina (tesis de licenciatura). Mérida, Yucatán, México.
9. Martínez, F.S.; González, G.J.; Culebras J.M.; Tuñón M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*. **2002**, 17, 271 – 278.
10. Alim M.; Abd El Kader M. The influence of naringin on the oxidative state of rats with streptozotocin-induced acta hyperglycaemia. *Z. Naturforsch*. **2004**, 59, 726 – 733.
11. Pari, L.; Suman, S. Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of flavonoid naringin in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Int. J. Bio. Med. Res*. **2010**, 4, 206 – 210.
12. Zygmunt, K.; Faubert, B.; MacNeil, J.; Tsiani, E. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochem Biophys Res Commun*. **2010**, 398, 178 – 183.
13. Lakhanpal, P.; Kumar, D. Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet J. Med. Update*. **2007**, 2, 20 – 35.
14. Atef, E.; Abd, A. Quercetin protective action on oxidative stress, sorbitol, insulin resistance and cells function in experimental diabetic rats. *IJPSR*. **2011**, 2, 11 – 18.

15. Rauter, P.; Martins, A.; Borges, C.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R.; Sepodes, B.; Justino, J. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, S133 – S138.
16. Kamalakkannan N.; Prince P.S. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic Clin. Pharmacol Toxicol.* **2006**, *98*, 97 – 103.
17. Garg, A.; Garg, S.; Zaneveld, L.; Singla, A. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 655 – 669.
18. Jung, U.; Lee, M.; Jeong K.; Choi, M. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *J. Nutr.* **2004**, *22* – 29.
19. Imad, F.; Gabrieli, C.; Kokkalou, E. Simultaneous reversed-phase-performance liquid chromatographic method for determination of diosmin, hesperidin, and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *JPBA.* **2003**, *33*, 243 – 294.
20. González, S.A. (2014). Comparación de la biodisponibilidad enteral e intravenosa de la quercetina y la relación con su efecto hipoglucemiante (Tesis de maestría). Mérida, Yucatán, México.
21. Yañez, J. A.; Neal, M. D. Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of naringenina in urine. *J. Pharm. and Biomedical Analysis.* **2005**, *39*, 164 – 169.
22. Cabañas, W.A. (2013). Evaluación del efecto hipoglucemiante y/o antihiperoglucemiante de los flavonoides obtenidos de las cáscaras de naranja dulce (*Citrus sinensis Osbeck*) var. Nacional en ratas normoglucémicas y diabéticas (Tesis de licenciatura). Mérida, Yucatán, México.
23. Fang, F.; Jing, M. L.; Qiu, H. P.; Wei, D. H. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *J. Food Chem.* **2007**, *101*, 428 – 433.
24. Muñoz, O.; Copaja, S.; Speisky, H.; Peña, R.; Montenegro, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Quim. Nova.* **2007**, *30*, 4, 848 – 851.
25. Chen, H.; Zuo, Y.; Deng, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **2001**, *913*, 387 – 395.
26. Saeidi, M.; Hadjmohammadi, M. R.; Peyrovi M.; Iranshahi, M.; Barfi, B.; Babaei, A. B.; Dust, A. M. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. *J. Pharm. and Biomedical Analysis.* **2011**, *56*, 419 – 422.

27. Tang, D.; Yin, X.; Zhang, Z.; Gao, Y.; Wei, Y.; Chen, Y.; Ha, L. Comparative study on the pharmacokinetics of *Ginkgo biloba* extract between normal and diabetic rats by HPLC-DAD. *Lat. Am. J. Pharm.* 2009, 28, 400 – 408.
28. Prasain, J.K.; Wang, C.C.; Barnes, S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology y Medicine*. **2004**, 37, 9, 1324 – 1350.
29. Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Ferreira, G.D.; Matos, J.M.; David, J.M.; Da Silva, E.G.P.; Portugal, L. A.; Dos Reis, P.S.; Souza, A.S.; dos Santos, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*. **2007**, 597, 179 – 186.
30. Gomes, V.F.; Portugal, L.A.; dos Anjos, J.P.; de Jesús, O.N.; Oliveira, E.J.; Juceni, P.D.; David, J.M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *pasiflora species*. *Microchemical Journal*. **2017**, 132, 28 – 35.
31. Harris, D. C. Análisis químico cuantitativo, 3ª ed. Reverté, Barcelona, España: 2007; pp 273.
32. AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals, **2002**.
33. Gattuso, G.; Becerra, D.; Gargiulli, C.; Leuzzi, U.; Caristi, C. Flavonoids composition of citrus juice: Review. *Molecules*. **2007**, 12, 1641 – 1663.
34. Yang, Y.; Hsui, S.L.; Wen, K.C.; Lin, S.P.; Tsai, S.Y. Bioavailability and metabolic pharmacokinetics of rutin and quercetin in Rats. *J. Food Drug Ana.* **2005**, 13, 3, 244 – 250.
35. Xiuling L.; Hongbin X.; Liang X.; Shi, D.; Liu, J. LC-MS/MS determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in rat serum after orally administrating the decoction of *Bulpleurum falcatum L.* and *Fractus aurantii*. *JPBA*. **2004**, 34, 159 – 166.
36. Feras, I. K.; Kokkalou, E.; Georgarakis, M.; Niopas, I. Validated solid – phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin in urine. *JPBA*. **2004**, 36, 175 – 181.
37. Kazuo, I.; Furuta, T.; Kasuya, Y. Determination of naringin and naringenin in human plasma by high – performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B*. **1996**, 683, 225 – 229.
38. Flores, J. Farmacologia Humana, 3ª ed.; Masson: España. 1997; pp 50 – 65.
39. Malgor, LA. Valsecia, ME. Farmacología Médica, 1ª ed.; Editorial de Universidad Nacional del Norodeste: Argentina, 2000; Vol. 1 pp 13 – 30.

40. Erlund, I. Review of flavonoids quercetin, hesperitin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* 2004, 24, 851 – 87.
41. Dai, B.; Hu, Z.; Li, H.; Yan, C.; Zhang, L. Simultaneous determination of six flavonoids from *Paulownia tormentosa* flower extract in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B.* **2015**, 979, 54 – 61.
42. Tong, L.; Zhou, D.; Gao, J.; Zhu, Y.; Sun, H.; Bi, K. Simultaneous determination of naringin, hesperidin, neohesperidin, naringenin and hesperetin of *Fractus aurantii* extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. and Biomedical Analysis.* **2012**, 58, 58 – 64.
43. He, J.; Feng, Y.; Ouyang, H.Z.; Yu, B.; Chang, Y.X.; Pan, G.X.; Dong, G.Y.; Wang, T.; Gao, X.M. A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves. *J. Pharm. and Biomedical Analysis.* **2013**, 84, 189 – 195.
44. Chang, L.; Ren, Y.; Cao, L.; Sun, Y.; Sun, Q. Sheng, N.; Yuan, L.; Zhi, X. Zhang, L. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of six flavonoids from *Fructus sophore* extract in rat plasma by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B.* **2012**, 904, 59 – 64.
45. Yu, X.Y.; Azietaku, J.T.; Li, J.; Cao, J.; An, M.; He, J.; Gao, X.M.; Chang, Y.X. Simultaneous determination of eight flavonoids in plasma using LC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study after oral administration of *Pollen typhae* extract to rats. *Journal of Chromatography B.* **2017**, 1045, 158 – 165.
46. Zhang, K.; Zuo, Y. GC – MS Determination of Flavonoids and Phenolic and Benzoic Acids in Human Plasma after Consumption of Cranberry Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 55, 222 – 227.
47. Chen, S.; Wu, B.; Fang, J.; Liu, Y.; Zhang, H.; Fang, L.; Guan, L.; Li, S. Analysis of flavonoids from lotus leaves using high performance liquid chromatography/photodiode array detector tandem electrospray ionization mass spectrometry and an extraction method optimized by orthogonal design. *J. of Chromatography A.* **2012**, 1227, 145 – 153.
48. Behruz, B.; Asghari, A.; Maryam, R.; Azadeh, B.; Iman, S. Simplified miniaturized ultrasound – assisted matrix solid phase dispersion extraction and high performance liquid chromatographic determination of seven flavonoids in citrus fruit juice and human fluid samples: Hesperetin and Naringenin as biomarkers. *J. of Chromatography A.* **2013**, 1311, 30 – 40.

ANEXOS

Anexo 1. Comparación de las diferentes técnicas de extracción.

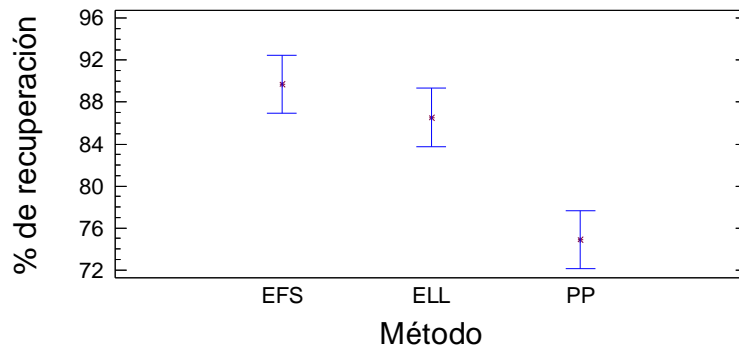


Figura A1. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la quercetina.

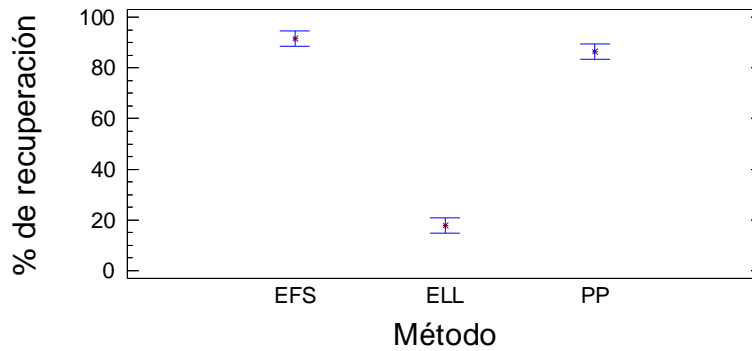


Figura A2. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la naringina.

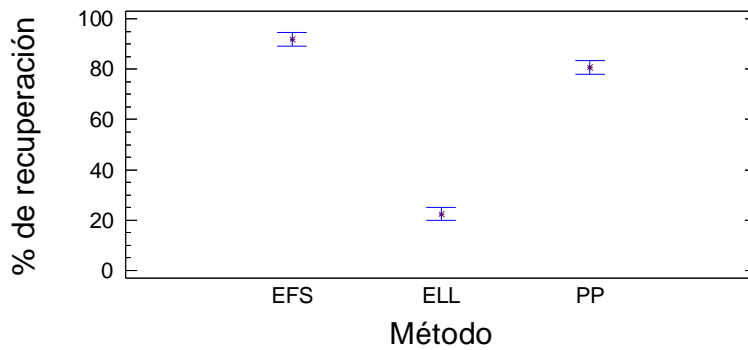


Figura A3. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la rutina.

Anexo 2. Diagramas de Pareto (resultados de robustez)

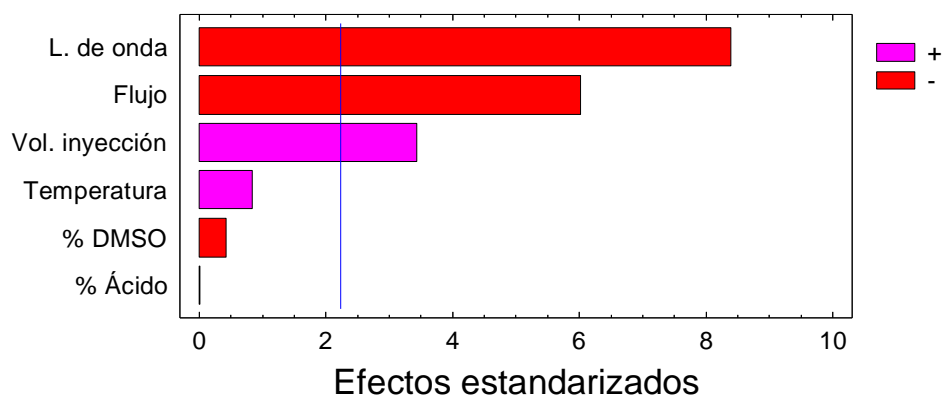


Figura A4. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la hesperidina.

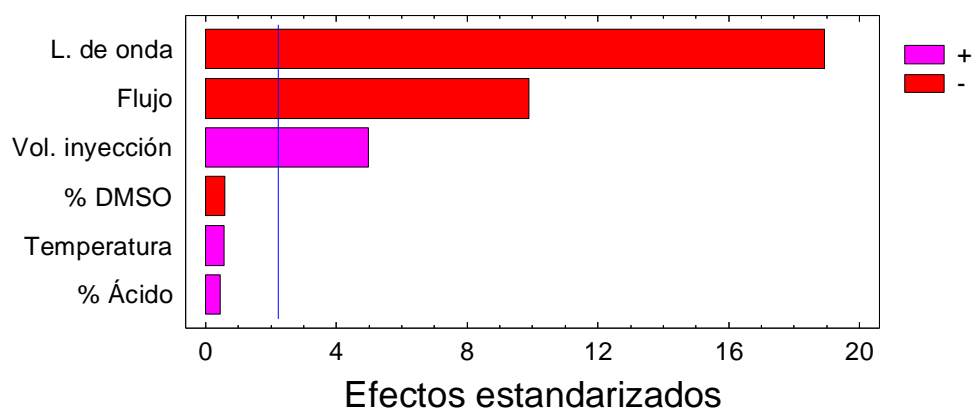


Figura A5. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la rutina.

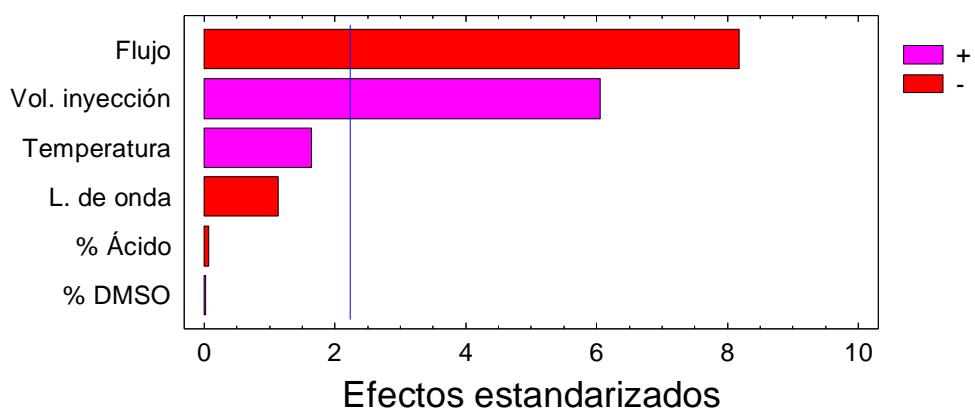


Figura A6. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la naringenina.

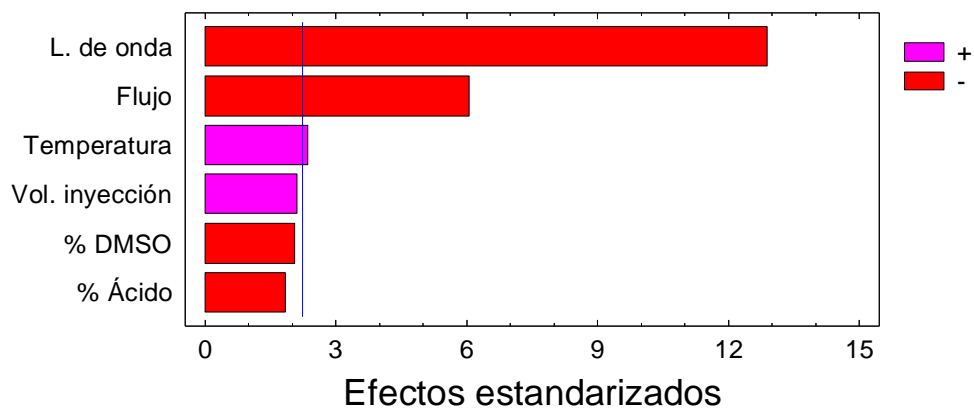


Figura A7. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la quercetina.

Anexo 3. Listado de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los flavonoides de acuerdo a su estructura química.	4
Tabla 2. Métodos analíticos desarrollados para la determinación de citroflavonoides por CLAE.	7
Tabla 3. Métodos de extracción para citroflavonoides reportados en la literatura científica.	9
Tabla 4. Comparación del Diseño Box – Behnken contra el diseño compuesto.	10
Tabla 5. Parámetros evaluados en la validación de un método analítico.	10
Tabla 6. Resultados de la validación de métodos analíticos utilizados para estudios farmacocinéticos.	12
Tabla 7. Etapas del proceso farmacocinético.	12
Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos de los flavonoides reportados en la literatura, después de la administración oral de estos.	13
Tabla 9. Porcentaje de pureza de los estándares utilizados.	17
Tabla 10. Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de los flavonoides.	17
Tabla 11. Condiciones para la extracción en fase sólida de los flavonoides en plasma de murino.	19
Tabla 12. Variables empleadas en el diseño Placket y Burman utilizadas para la selección de las variables que se emplearon en la optimización de la EFS.	20
Tabla 13. Diseño Placket y Burman utilizado en la selección de las variables que se emplearon para la optimización de la EFS.	20
Tabla 14. Variables empleadas en el diseño Box – Behnken para la optimización del método de EFS.	21

Tabla 15. Diseño Box – Behnken utilizado para la optimización del método de EFS	21
Tabla 16. Variables empleadas en el diseño de Placket y Burman para la evaluación de la robustez del método cromatográfico.	23
Tabla 17. Diseño Placket y Burman utilizado para evaluar la robustez del método cromatográfico.	24
Tabla 18. Parámetros cromatográficos de los flavonoides.	27
Tabla 19. Resultados obtenidos de la comparación del porcentaje de recuperación de las diferentes metodologías de extracción.	28
Tabla 20. Puntos óptimos obtenidos a partir de la resolución del sistema de ecuaciones.	33
Tabla 21. Resultados de los estudios de linealidad del método cromatográfico.	33
Tabla 22. Resultados obtenidos de los estudios de límite de detección y cuantificación.	34
Tabla 23. Límites de detección y cuantificación para los flavonoides en trabajos previos utilizando DAD.	35
Tabla 24. Resultados intradía obtenidos del análisis de precisión del método analítico.	35
Tabla 25. Resultados interdía obtenidos del análisis de precisión del método analítico.	36
Tabla 26. Resultados obtenidos del análisis de exactitud del método analítico.	36
Tabla 27. Resultados obtenidos del estudio farmacocinético de la hesperidina.	39
Tabla 28. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del estudio farmacocinético de la hesperidina.	41

Anexo 4. Listado de figuras

	pág.
Figura 1. Estructura base de los flavonoides.	3
Figura 2. Estructura química de la naringina.	4
Figura 3. Estructura química de la naringenina.	5
Figura 4. Estructura química de la quercetina.	5
Figura 5. Estructura química de la rutina.	6
Figura 6. Estructura química de la hesperidina.	6
Figura 7. Gradiente utilizado para la separación de los flavonoides.	18
Figura 8. Cromatograma de la elución de la mezcla de estándares disueltos en MeOH/DMSO (9:1).	28
Figura 9. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción.	29
Figura 10. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la hesperidina.	29
Figura 11. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la naringenina.	30
Figura 12. Diagrama de Pareto obtenido del diseño Placket y Burman de la selección de las variables para la optimización del método de EFS.	31
Figura 13. Diagrama de Pareto obtenido de la optimización del método de EFS.	32
Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta de la optimización del método de EFS.	32
Figura 15. Curvas de calibración de los flavonoides.	34
Figura 16. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la naringina.	37

Figura 17. Espectro de UV de la hesperidina.	38
Figura 18. Cromatograma de una muestra de plasma de roedor después de la administración oral de 75 mg/kg de hesperidina y naringenina (4:3).	40
Figura 19. Curva de concentración plasmática vs tiempo de la hesperidina después de su administración oral.	40
Figura A1. Gráfica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la quercetina.	49
Figura A2. Grafica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la naringina.	49
Figura A3. Grafica de mínima diferencia significativa, que compara las medias de los diferentes métodos de extracción para la rutina.	49
Figura A4. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la hesperidina.	50
Figura A5. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la rutina.	50
Figura A6. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la naringenina.	51
Figura A7. Diagrama de Pareto obtenido de la evaluación de la robustez del método cromatográfico para la quercetina.	51

the 1990s, the number of people with a tertiary education has increased in all countries, but the increase has been particularly rapid in the United Kingdom, where the number of tertiary graduates has increased by 100% since 1980 (OECD 2000).

There are several reasons for the increase in tertiary education. First, the demand for tertiary education has increased because of the increasing requirements for tertiary education in the labour market. Second, the increasing costs of tertiary education have led to a higher number of people attending tertiary education. Third, the increasing number of people attending tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education.

The increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education.

The increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education.

The increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education.

The increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education.

The increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education.

The increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education.

The increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education. This is because the increasing number of people with a tertiary education has led to a higher number of people with a tertiary education.