

Descontaminación mediante radiación gamma del flavonoide rutina para aplicaciones médicas

Emma Castro^{1,*}, Marco Linares², Anita Robles³, Johnny Vargas², Mónica Vivanco²

¹ Laboratorio de Irradiación de Productos Médicos (LIPM), Dirección de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

² Laboratorio de Irradiación (LI), Dirección de Servicios Radiológicos. Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

³ Planta de Producción de Radioisótopos. Dirección de Producción. Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

Resumen

La rutina es un flavonoide que se puede obtener de diversas fuentes vegetales. Se considera posee propiedades antioxidantes y capacidad para mejorar la permeabilidad e integridad de las paredes capilares, entre otras. Por ello se le incluye en suplementos alimenticios o formulaciones farmacéuticas. La rutina como materia prima debe cumplir con las especificaciones del producto, siendo posible que debido al proceso de obtención requiera someterse a un método de descontaminación. El presente trabajo tiene como propósito descontaminar el producto, rutina, mediante radiación gamma. Las dosis aplicadas fueron de 8, 12 y 25 kGy. Para la irradiación del producto se llevaron a cabo pruebas dosimétricas. El resultado de las irradiaciones en el producto se verificó mediante la realización de pruebas microbiológicas, físico-químicas y organolépticas.

Abstract

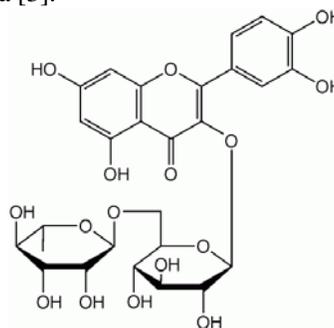
Rutin is a flavonoid that can be obtained from various plant sources. It is considered that has antioxidant and pharmacological properties for improving capillary permeability and integrity, among others. For this, it is included in nutraceuticals as well as in pharmaceutical formulations. Rutin as raw material must comply with product specifications. During the obtaining process, rutin possibly can suffer microbial contamination. The aim of this work is to decontaminate the product rutin using gamma radiation, for commercial purposes. Dosimetric tests were held and irradiation doses applied were 8, 12 and 25 kGy. Results were verified through microbiological, physico-chemical and organoleptic assays.

1. Introducción

Algunas especies de plantas además de poseer componentes nutricionales, también contienen compuestos fenólicos, denominados flavonoides. Estas sustancias que también se pueden encontrar en flores, frutas o vegetales constituyen la parte no energética de la dieta humana [1]. Los flavonoides pertenecen a un grupo de compuestos naturales, arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo. Pueden encontrarse como aglicona o en forma de glucósidos con una o tres unidades de azúcar, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa [2]. Sus propiedades antioxidantes y farmacológicas los hacen atractivos para la industria médico-farmacéutica.

Uno de los flavonoides destacados, es la rutina que, específicamente, es un flavonol

glicósido. Está conformado por quercetina y un disacárido rutinoso (ramnosa y glucosa). Posee la siguiente fórmula global y estructura química [3].



Se puede obtener de fuentes vegetales tales como la ruda (*Ruta graveolens*), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), hojas del

* Correspondencia autor: ecastro@ipen.gob.pe

eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), sófora (*Sophora japonica*), sauco (*Sambucus nigra* L), diversas variedades de moras (*Rubus ssp*), así como, de la mandarina, limón, naranja, toronja, frutos pertenecientes al género *Citrus*. Se le conoce también como rutósido, Vitamina P o Quercetin-3.

Si bien el conocimiento sobre el rol que desempeña en el mantenimiento de la salud humana es limitado y aun está en estudio, existen trabajos sobre las propiedades farmacológicas de la rutina, como antiinflamatorio [4], antioxidante [5,6], considerándose que pudiera desempeñar algún rol para inhibir ciertos tipos de cáncer. Por otro lado, se encuentra en formulaciones farmacéuticas a manera de suplemento alimenticio con vitaminas y minerales, así como en otras, para mejorar la permeabilidad e integridad de las paredes capilares [7, 8].

La forma de recolección del producto, así como el procesamiento para convertirlo en materia prima, puede dar como resultado que el producto no cumpla con los criterios microbiológicos establecidos en las especificaciones del producto. Por ello, para ser utilizado comercialmente, se requiere que sea sometido a un método de descontaminación que puede ser la radiación gamma, proveniente del Cobalto-60. Este método es eficaz para controlar el crecimiento microbiano y una de sus ventajas frente a otros métodos es su gran capacidad de penetración que permite tratar el producto en su empaque final. Por otro lado, el insignificante aumento de la temperatura durante el proceso, hacen que la radiación gamma sea un agente muy adecuado para tratar productos sensibles al calor como son los flavonoides y específicamente la rutina [9,10].

Por otro lado, se tienen referencias que la rutina, bajo la presentación en polvo, es tratada comercialmente, mediante radiación gamma [11].

El propósito de este trabajo es establecer los parámetros de irradiación para tratar comercialmente el producto rutina, manteniendo las propiedades establecidas por las especificaciones del producto.

2. Metodología

El estudio se realizó en el producto rutina, como materia prima, bajo la forma de presentación en polvo. El producto no

cumplía con las especificaciones microbiológicas establecidas para dicha materia prima. En este acápite se listan las pruebas, actividades, equipos, materiales y medios de cultivo utilizados en este estudio.

2.1 Fraccionamiento de la rutina

Esta actividad se llevó a cabo bajo flujo laminar con el objeto de obtener muestras de peso adecuadas para la realización de las pruebas. Estas muestras fueron triplemente empacadas en envolturas de polietileno de alta densidad.

2.2 Dosimetría e irradiación de las muestras

Las técnicas dosimétricas utilizadas para el mapeo de las dosis en la cámara de irradiación así como para medir las dosis absorbidas por el producto fueron Fricke [12], y el Etanol Clorobenceno (ECB) [13], como dosímetro de rutina. Se utilizaron en total 15 ampulas con solución dosimétrica; las cuales fueron irradiadas en 05 tiempos diferentes junto con el producto, el peso total del mismo fue de 1 270 gramos, con una densidad aparente en la cámara de irradiación de 0,359 g/cc.

Los equipos utilizados para esta prueba fueron: el irradiador, modelo Gammacell 220 Excel, de la Nordion Inc. de Canada, con fuentes de Co-60 y con una actividad de 14 083 Ci (01-09-07), donde se llevaron a cabo las irradiaciones; y el Espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo, UV VIS, Lambda 2, donde se hicieron las lecturas de la absorbancia de los dosímetros Fricke irradiados, a una longitud de onda λ de 303.00 nm. A modo de control, durante la irradiación se colocaron con la muestra, dosímetros de etanol clorobenceno cuya conductividad luego de irradiados, se midió en el Oscilótrotador/TRIEM. Las dosis de irradiación aplicadas fueron de 8, 12 y 25 kGy

2.3 Análisis microbiológicos

Los ensayos incluyen las pruebas de recuento total de aerobios mesófilos; y de hongos así la detección de patógenos (prueba realizada por la empresa proveedora de la muestra). Los equipos que se utilizaron fueron: Autoclave Raypa AES-75 Dry, Estufa Incubadora VWR Scientific, Balanza toploading Mettler 682B, Agitador magnético Stuart Scientific, Baño maría Tecam, Shaker Orbital Labline, Agitador de

tubos Fisher y Flujo Laminar Envair. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron: Caldo Casoy, Agar Casoy, Agar Sabouraud Dextrosa 4%. Los ensayos se realizaron según la US Pharmacopea [14].

2.4 Espectroscopia infrarroja (FTIR)

Se adquirieron los espectros IR de todas las muestras. Para ello se utilizó el espectrofotómetro infrarrojo marca NICOLET, modelo IMPACT 410, accesorio para refracción difusa, indicado para muestras sólidas. Los parámetros de adquisición fueron: resolución de 8 cm⁻¹, barrido de frecuencia: 4000 a 1000 cm⁻¹.

2.5 Características organolépticas

Por el método visual se observó la apariencia, color, así como el olor de todas las muestras, irradiadas y el control, para determinar variaciones en sus características físicas.

3. Resultados y Discusión

En lo referente a las pruebas dosimétricas, los resultados fueron los siguientes, en aire el valor de la tasa de dosis fue de 11,102061 ± 0,504139 kGy/h siendo el error de 1,2937% comparado con la tasa de dosis de la MDS Nordion de Canada. (Tabla 1). El mapeo de la dosis del producto en la cámara de irradiación determinó una tasa de dosis mínima de 8,0257 kGy/h y una tasa dosis máxima de 13,2670 kGy/h (Tabla 2). La uniformidad de dosis hallada fue de 1,65306 valor dentro del rango esperado para el equipo de irradiación y el peso del producto. La lectura del dosímetro de etanol clorobenceno, colocado en el sitio de dosis mínima al irradiar las muestras a 8 kGy, indicó variaciones menores al 6%.

En lo referente a las pruebas microbiológicas, la Tabla 3 muestra los resultados de los ensayos realizados.

Las especificaciones microbiológicas del producto indican que el número de microorganismos obtenido de las pruebas de recuento total de aerobios mesófilos y de hongos no deben exceder los 30 UFC/g y 10 UFC/g, respectivamente; igualmente no debe haber presencia de patógenos. La carga microbiana inicial en la muestra de rutina, no contenía patógenos pero excedía los límites indicados por las especificaciones. Al no ser la carga microbiana significativamente alta,

la dosis de 8 kGy fue suficiente para eliminar los microorganismos del producto.

Tabla 1: Estadística de la regresión para la Dosimetría Fricke en aire.

Tiempo (s)	Dosis (kGy)
15	0.06007
25	0.09401
35	0.12387
45	0.15423
55	0.18416
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99969474
Coefficiente de determinación R ²	0.99938958
R ² ajustado	0.99918610
Error típico	0.00139151
Observaciones	5
Coefficientes	
Intercepción	0.01533194
Variable X 1	0.00308390

Tabla 2: Estadística de la regresión para la Dosimetría Fricke en el producto.

Tiempo [s]	Dosis mínima	Dosis máxima
20	0.05676	0.09229
30	0.08016	0.13238
40	0.10096	0.17007
50	0.12501	0.20409
60	0.14581	0.24070
Estadísticas de la regresión para la dosis mínima		
Coefficiente de correlación múltiple	0.999749348	
Coefficiente de determinación R ²	0.99949876	
R ² ajustado	0.99933168	
Error típico	0.000911489	
Observaciones	5	
Coefficientes		
Intercepción	0.012565879	
Variable X 1 (Min)	0.00222936	
Estadísticas de la regresión para la dosis máxima		
Coefficiente de correlación múltiple	0.99958224	
Coefficiente de determinación R ²	0.99916466	
R ² ajustado	0.99888621	
Error típico	0.00194546	
Observaciones	5	
Coefficientes		
Intercepción	0.02049538	
Variable X 2 (Max)	0.00368527	

Tabla 3: Pruebas microbiológicas en el flavonoide rutina.

Prueba	Dosis [kGy]		
	0	8	12
Recuento Total Microorganismos Aerobios Mesófilos [UFC/g]	77	< 10	< 10
Recuento Total de Hongos [UFC/g]	850	< 10	< 10
E. coli	Ausente/10 g	--	--
Salmonella sp.	Ausente/10 g	--	--
Staphylococcus aureus	Ausente/10 g	--	--
Pseudomonas aeruginosa	Ausente/10 g	--	--

En las Figuras 1, 2 y 3 se muestran los espectros FT-IR obtenidos de las muestras control (0 kGy), y de la muestra irradiada a la mayor dosis, es decir, 25 kGy.

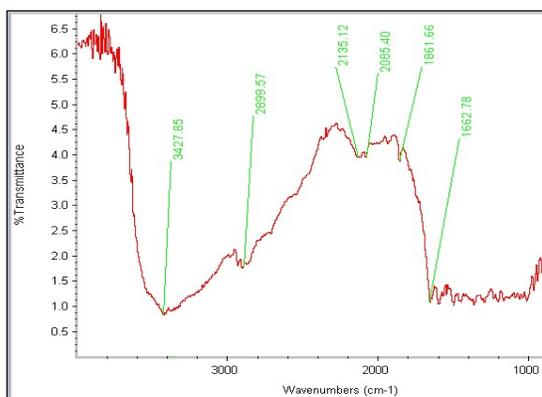


Figura 1: Espectro FT-IR Rutina, muestra control, 0 kGy. Picos de absorción 3428; 2900; 2135; 2085; 1862; 1663 cm-1.

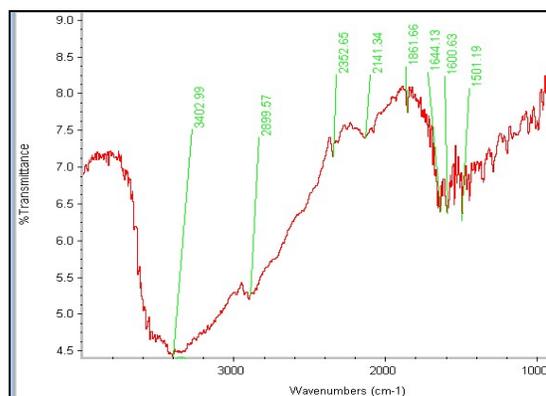


Figura 2: Espectro FT-IR Rutina, muestra irradiada a 25 kGy. Picos de Absorción Picos de absorción 3402.99; 2899.57; 2352.65; 1861.66; 1644.13; 1600; 1501.19 cm-1.

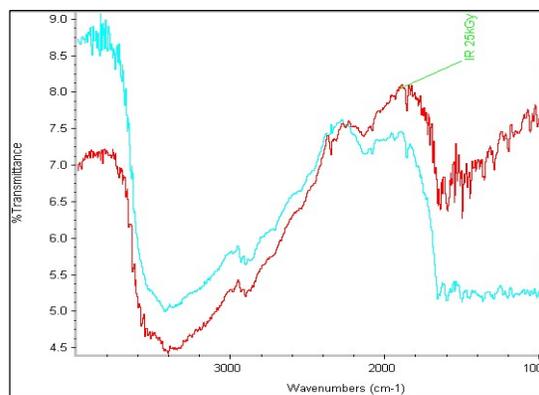


Figura 3: Comparación de los Espectros de las muestras de rutina, control 0 kGy y de la irradiada a la dosis máxima de 25 kGy.

Solo se consignan los espectros FT-IR de las muestras irradiadas con las dosis de 0 y 25 kGy, ya que los espectros de las muestras irradiadas a 8 y 12 kGy presentaban las mismas características de espectro FT-IR de la muestra control.

Los espectros FT-IR de la muestra control y de la muestra irradiada a 25 kGy presentan perfiles similares por lo que el producto no ha sufrido modificaciones en su estructura.

En cuanto a las características organolépticas, en la Figura 4, se presentan la muestra control y las irradiadas a las diferentes dosis.



Figura 4: Rutina irradiada a 0, 8, 12 y 25 kGy

En la Tabla 4 se describen las características físicas y organolépticas de las muestras de rutina en polvo, irradiadas y control.

Tabla 4: Características físicas del producto rutina en polvo.

Dosis	0 kGy	8 kGy	12kGy	25 kGy
Propiedades Físicas				
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Color	Amarillo verdoso	Amarillo verdoso, ligeramente más oscuro y opaco	Amarillo verdoso, ligeramente más oscuro y opaco	Amarillo verdoso, ligeramente más oscuro y opaco
Apariencia	Polvo de flujo libre	Polvo de flujo libre	Polvo de flujo libre	Polvo de flujo libre

El olor se mantuvo similar al control incluso a 25 kGy. Se aprecia que hubo un ligero cambio de color en las muestras irradiadas, el polvo, a medida que aumenta la dosis, se torna opaco y oscurece ligeramente. A todas las dosis de radiación, el polvo presentó al caer un flujo libre.

4. Conclusiones

- Las pruebas dosimétricas permitieron aplicar dosis exactas de manera precisa y segura al producto con uniformidad de dosis de 1,65306.

- A la dosis de 8 kGy se logra la descontaminación del producto.

- El color, si bien sufre variación en lo referente al matiz, se mantiene dentro de las especificaciones. El olor y la apariencia del polvo de rutina no se altera significativamente luego ser irradiado, incluso a 25 kGy.

- Los espectros FT-IR de las muestras estudiadas identifican a la muestra como rutina incluso a la dosis de 25 kGy, no sufriendo modificación la estructura de la misma.

Se recomienda realizar las pruebas de valoración del principio activo, tal como se indica en las especificaciones del producto, a las muestras irradiadas y comparar los resultados con los del control.

Finalmente, el producto flavonoide rutina, se irradió comercialmente a la dosis de 8 kGy.

5. Bibliografía

[1] Martínez-Florez S, *et al.* Revisión: Los flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2002; 17(6): 271-278.

[2] Lock Olga, *et al.* Practica VI.6 Análisis en Flavonoides en Plantas. Departamento de Ciencias, Sección de Química, Pontificia Universidad Católica del Perú. Diciembre 2006.

[3] Botanical-online SL. [home page Internet]. 2007. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalesrutina.htm>

[4] Guardia Teresita, *et al.* Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco*. 2001 Aug; 56(9): 683-687.

[5] Zhonghong Gao, *et al.* Effects of rutin supplementation on antioxidant status and iron, copper, and zinc contents in mouse liver and brain. *J. Biological Element Trace Research*. 2002 Sep; 88(3).

[6] Tiwari AK. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: multiple approach of natural antioxidants therapy. *Curr Sci*. 2001; 81: 1179-87. 2000;88:146-50.

[7] Diet and Health Net. Information on rutin. [home page Internet]. 2007. Disponible en: <http://www.diet-and-health.net/Supplements/Rutin.html>

[8] Kosmix Corporation [home page Internet]. 2007. Disponible en: <http://www.kosmix.com/health/>

[9] Zhong Geng, *et al.* Effects of heat treatment on flavonoids content and antioxidant capacity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaert*) flower ethanolic extracts. [serie en Internet]. Disponible en: <http://scholar.ilib.cn/A-zgnykx-e200309015.html>

[10] Dietych-Szostak D, *et al.* Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum Mönch*) grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999; 47(10): 4384-87.

[11] Amazon Discovery Co. [home page Internet]. 2007. Disponible en: <http://www.amazondiscovery.com/herbs-R-Z.htm>

[12] Norma ASTM E 1026-04. Using the Fricke Reference Standard Dosimetry System.

[13] Norma ASTM 51538:2002 (E). Standard Practice for Use of the Ethanol-Chlorobenzene Dosimetry System.

[14] US Pharmacopea 30 (61), 2007.