

Tesis de Maestría

Formación de complejos de inclusión de β -ciclodextrina con componentes de aceites esenciales de canela y tomillo (cinamaldehído y timol). Determinación de sus propiedades fisicoquímicas y estabilidad

Ponce Cevallos, Peggy Alejandra

2008

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología de la industrialización de los alimentos de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ponce Cevallos, Peggy Alejandra. (2008). Formación de complejos de inclusión de β -ciclodextrina con componentes de aceites esenciales de canela y tomillo (cinamaldehído y timol). Determinación de sus propiedades fisicoquímicas y estabilidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4804_PonceCevallos
Ponce Cevallos, Peggy Alejandra. "Formación de complejos de inclusión de β -ciclodextrina con componentes de aceites esenciales de canela y tomillo (cinamaldehído y timol). Determinación de sus propiedades fisicoquímicas y estabilidad". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4804_PonceCevallos

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias



***“Formación de complejos de inclusión de β -ciclodextrina
con componentes de aceites esenciales de canela y
tomillo (cinamaldehído y timol). Determinación de sus
propiedades fisicoquímicas y estabilidad”***

Autora: Ing. Peggy Alejandra Ponce Cevallos

80610

*Tesis para optar al título de Magíster en “Bromatología y Tecnología
de la Industrialización de los Alimentos”*

Directora: Dra. Beatriz Elizalde

480.564/2004.

2008

01/12/ 2008

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Dra. Beatriz Elizalde, por su apoyo científico y humano, su constante dedicación y compromiso que hicieron posible la elaboración de esta Tesis.

A la Dra. María del Pilar Buera, por su confianza, profesionalismo y aportes valiosos, indispensables para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, que con su incondicional apoyo y afecto han hecho y hacen del laboratorio un lugar cálido y por demás agradable.

A toda la gente del Pabellón de Industrias, que conforma un grupo estimulante y afectuoso.

A la Argentina y a mi Buenos Aires querido, con todas las personas, lugares, momentos que encierras, por haberme cobijado y seguir haciéndolo, haciéndome sentir como en casa.

A mi lindo Ecuador, por esperarme siempre con los brazos abiertos, a pesar del tiempo.

A mis papis, mis ñaños y mi abuelita

INDICE

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. ENCAPSULACIÓN DE BIOMATERIALES	3
I.1.A. MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN	5
I.1.A.1. MÉTODOS FÍSICOS	7
I.1.A.2. MÉTODOS QUÍMICOS	7
I.1.A.3. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS	7
I.1.B. MATERIALES DE ENCAPSULACIÓN	8
I.2. CICLODEXTRINAS	11
I.2.A. BREVE HISTORIA	12
I.2.B. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS CICLODEXTRINAS	13
I.2.C. MECANISMO DE ENCAPSULACIÓN	18
I.3. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	24
I.3.A. PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS	25
I.3.B. SECADO DE LOS COMPLEJOS	28
I.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS	30
I.4.A. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	30
I.4.B. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR)	32
I.4.C. DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X	34
I.4.D. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	34
I.4.E. ESPECTROSCOPIA RAMAN	35
I.4.F. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	36
I.5. APLICACIONES DE LAS CICLODEXTRINAS	36
I.5.A. APLICACIONES GENERALES	37
I.5.A.1. Control de la solubilidad	37
I.5.A.2. Auxiliar tecnológico	38
I.5.A.3. Estabilizador	39
I.5.A.4. Enmascarar efecto	39
I.5.A.5. Reducción de la volatilidad	40
I.5.A.6. Control de Fluorescencia y absorción de luz	40
I.5.B. ENCAPSULACIÓN DE FLAVORES	40
I.6. PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN	43
II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN	48
III. OBJETIVO	50
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	51
IV.1. ELECCIÓN DE LA CICLODEXTRINA Y DE LOS COMPUESTOS A ENCAPSULAR	51
IV.2. MATERIALES	58
IV.3. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS	58
IV.4. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LOS SISTEMAS (METODOLOGÍA UTILIZADA)	60
IV.4.A. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA DE LA β -CICLODEXTRINA Y DE LOS COMPLEJOS	61
IV.4.A.1. Determinación de la Isoterma de sorción	61
IV.4.A.2. Determinación del contenido de agua	62
IV.4.A.3. Caracterización de la isoterma	63
IV.4.B. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES TÉRMICAS DE LOS COMPLEJOS	66
IV.4.B.1. Determinación de la formación de complejos de Inclusión	67
IV.4.B.2. Determinación del ligando libre y estabilidad de los complejos	68

IV.4.C.	TRATAMIENTO DE DATOS	68
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
V.	CAPÍTULO 1. ESTUDIOS DE LAS PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA DE LA β-CICLODEXTRINA Y SUS COMPLEJOS	69
V.1.A.	CINÉTICA DE ABSORCIÓN DE AGUA	69
V.1.B.	ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA DE LA β -CICLODEXTRINA Y LOS COMPLEJOS	72
V.1.C.	CARACTERIZACIÓN DE LA ISOTERMA	78
V.	CAPÍTULO 2. PROPIEDADES TERMOFÍSICAS DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN 83	
V.2.A.	CONFIRMACIÓN DE LA FORMACIÓN LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	83
V.2.B.	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD	88
V.2.C.	RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA DE LOS COMPLEJOS Y SU ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO	96
VI.	INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES GENERALES	100
VIA.	PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA	100
VIB.	ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO: CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL HUÉSPED	102
VIC.	CONCLUSIONES GENERALES	102
VII.	BIBLIOGRAFÍA	104

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La preservación de alimentos y los componentes que los constituyen en estado congelado o deshidratado, presentan un interés importante en el campo de la investigación y en sus aplicaciones tecnológicas. La exposición de biomoléculas lábiles (pigmentos, vitaminas, aceites esenciales, aromas) a condiciones extremas de humedad y temperatura da lugar a la degradación de las mismas. Es así como la tecnología de la encapsulación se ha desarrollado notablemente en los últimos años y es aplicada en la industria de los alimentos, farmacéutica, cosmética y química con el fin de aumentar la estabilidad y retención de dichos compuestos (Sanguansri y Augustin, 2006; Heinzen, 2002; Madene y col, 2006).

I.1. ENCAPSULACIÓN DE BIOMATERIALES

La encapsulación, en un sentido amplio, puede ser definida como una técnica por el cual un material o mezcla de materiales es cubierto o atrapado por otro material. Al material "atrapado" se lo denomina ingrediente activo, núcleo, fase interna o relleno; y al material encapsulante se denomina cáscara, recubrimiento o material de pared y puede variar tanto en espesor como en el número de capas. La forma de las cápsulas formadas es generalmente esférica, pero se ven fuertemente influenciadas por la estructura del material original no encapsulado (Dziezak, 1988).

De un modo particular, en la industria alimentaria, esta tecnología consiste en cubrir pequeñas partículas de ingredientes (lípidos, ácidos orgánicos, sales, enzimas) o ingredientes enteros (pasas, nueces) a través de técnicas de microencapsulación y de cobertura, respectivamente (Figura 1.1), permitiendo la obtención de productos con mejores características sensoriales y nutricionales (Fereidon y Xiao-Qing, 1993; Madene y col., 2006).

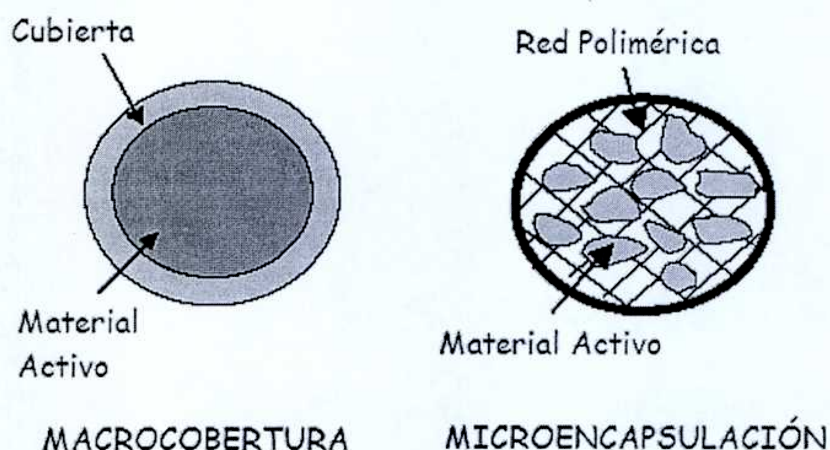


Figura 1.1. Tipos de encapsulación de alimentos: macrocobertura y microencapsulación (adaptado de Madene y col, 2006).

MICROENCAPSULACIÓN

Se ha definido a la microencapsulación como la tecnología de almacenar sólidos, líquidos o gases en cápsulas diminutas y selladas que puedan liberar su contenido bajo condiciones específicas (pH, temperatura, acidez) al tiempo deseado y velocidad requerida (Gouin, 2004).

La microencapsulación de ingredientes es aplicada por la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética por varias razones:

- 1) Protege el material activo del medio externo (luz, oxígeno y humedad).

- 2) Disminuye la velocidad de evaporación o transferencia del material activo hacia el medio al cual es incorporado.
- 3) Facilita la manipulación del ingrediente activo para:
 - o evitar aterronamiento (polvo leudante)
 - o facilitar la mezcla del ingrediente activo y lograr una distribución uniforme (colorantes, especies, etc.)
 - o convertir un líquido en un sólido (aceites esenciales)
- 4) Controla la liberación del material activo retardándola hasta que se produzca el estímulo adecuado (temperatura, pH, agua, etc.)
- 5) Enmascara un flavor indeseado (vitamina A y B12)
- 6) Diluye el material activo cuando es usado en ppm (partes por millón) pero logrando una distribución uniforme del material.

I.1.A. MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN

Se han desarrollado numerosas técnicas para la encapsulación de ingredientes alimenticios. La tecnología general para la formación de las microcápsulas se divide en tres grupos de acuerdo a la naturaleza del método utilizado:

- físicos,
- químicos
- físico-químicos.

En la Figura I.2 se muestra un esquema del proceso de encapsulación y liberación de un ingrediente lábil. En el mismo, se detallan los distintos métodos y factores que afectan las distintas etapas de dicho proceso.

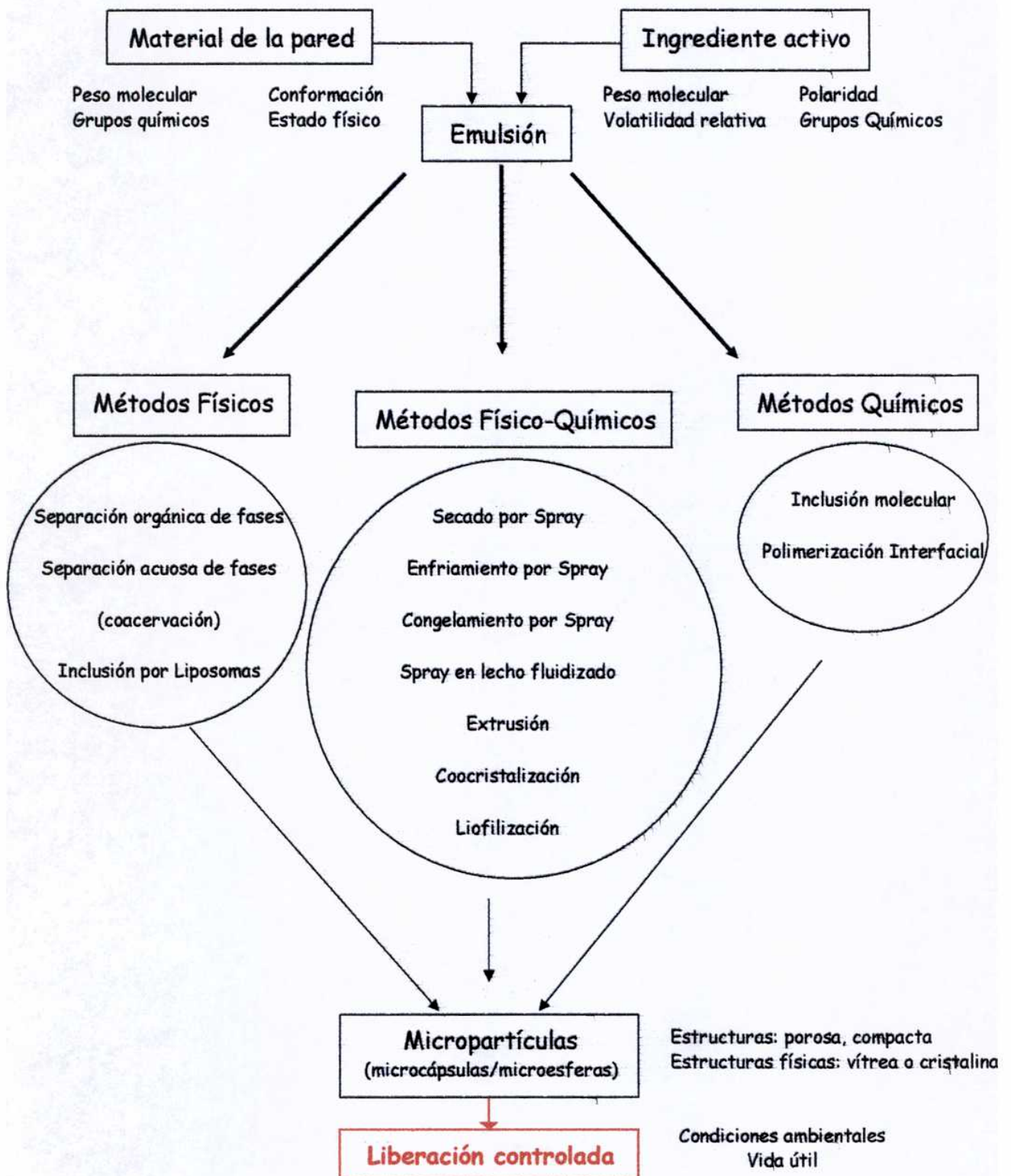


Figura 1.2. Esquema detallando los distintos métodos posibles para la obtención de micropartículas (Adaptado de Madene y col, 2006).

I.1.A.1. MÉTODOS FÍSICOS

Los procesos físicos para la formación de microcápsulas son aquellos que consisten en la mezcla mecánica del componente activo y el componente hospedador para formar una emulsión y la posterior evaporación del solvente. Entre estos métodos se pueden mencionar:

- Secado Spray
- Enfriamiento Spray
- Congelamiento por Spray
- Spray en lecho fluidizado
- Extrusión
- Cocrystalización
- Secado por congelación

I.1.A.2. MÉTODOS QUÍMICOS

Los procesos químicos son menos numerosos en cantidad que los físicos, pero son necesarios por su efectividad para la encapsulación de líquidos e ingredientes en cantidades mínimas. Con estos métodos, es posible encapsular sabores y aromas hasta una cantidad de 10 µl. Los procesos químicos de encapsulación comprenden:

- Inclusión molecular
- Polimerización Interfacial

I.1.A.3. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

Los métodos de encapsulación físico-químicos son aquellos que consisten en una combinación de los métodos físicos y químicos. Son de gran

importancia sobre todo para la industria farmacéutica y cosmética. Dichos métodos comprenden:

- Separación orgánica de fases
- Coacervación (Separación acuosa de fases)
- Inclusión por liposomas

No existe un único método de encapsulación que puede considerarse como el más eficiente ya que su selección depende de varios factores a saber: la sensibilidad de la molécula huésped, tamaño de la micro cápsula deseada, propiedades físico-químicas (del huésped y del agente encapsulante), aplicaciones deseadas para el ingrediente, mecanismos de liberación y también, de su viabilidad económica (Fereidon y Xiao-Qing), 1993).

I.1.B. MATERIALES DE ENCAPSULACIÓN

Cuando se decide encapsular un ingrediente activo se debe en primer término seleccionar el material o matriz de encapsulación.

Existe una gran variedad de polímeros naturales o sintéticos que pueden ser utilizados como matriz de encapsulación, y su elección va a depender del material a encapsular y de las características morfológicas y fisicoquímicas deseadas en la microcápsula final. La composición de la cubierta es entonces el factor principal que determina las propiedades funcionales de la microcápsula y también la elección del método de encapsulación más

adecuado para obtener la mejor performance de un ingrediente particular (Fereidon y Xiao-Qing, 1993, Del Valle, 2004).

Una matriz ideal de encapsulación debería reunir las siguientes propiedades:

- A altas concentraciones, debe poseer buenas propiedades reológicas y facilidad de manipulación durante el proceso de encapsulación.
- Habilidad de dispersar y emulsificar al compuesto huésped, así como estabilizar la emulsión resultante.
- Ser inerte respecto al material a encapsular, ya sea durante el proceso de encapsulación o durante el almacenamiento.
- Capacidad al sellar y retener el ingrediente activo dentro de su estructura durante el procesamiento y almacenamiento.
- Permitir la eliminación completa del solvente u otros materiales utilizados durante el proceso de encapsulación, por secado u otras técnicas.
- Habilidad para producir máxima protección del material activo frente a las condiciones ambientales (luz, calor y humedad).
- Solubilidad en solventes permitidos en la industria alimenticia, como agua y etanol.
- Viabilidad económica.

Para poder cumplir con la mayor parte de los requerimientos detallados precedentemente, el material de encapsulación suele usarse en combinación con otros materiales y/o agentes modificadores como antioxidantes, agentes quelantes y surfactantes.

Los materiales de encapsulación más utilizados en la industria alimenticia son:

- Gomas:

Las gomas y espesantes generalmente no tienen sabor, pero sin embargo pueden producir un efecto en el mismo y en el flavor de los alimentos. Una muestra de esto se da en el caso de los hidrocoloides que reducen la dulzura (Madene y col., 2006). Entre las gomas más utilizadas están: carragenato, alginato de sodio, agar.

- Lípidos:

Algunos ejemplos de lípidos utilizados para el proceso de microencapsulación son: ceras, parafina, mono y di glicéridos, aceites, grasas.

- Proteínas:

Se suelen utilizar materiales como gluten, caseína, gelatina, hemoglobina y péptidos. Debido a su estructura química posee propiedades anfífilas, habilidad de asociarse entre sí y de interactuar con diferentes tipos de sustancias. Esto le confiere propiedades funcionales excelentes tales como solubilidad, viscosidad, emulsificación y de formación de películas (Madene y col., 2006).

- Carbohidratos:

Son usados extensamente en la encapsulación de ingredientes alimenticios por medio de secado spray, debido a sus propiedades. Forman parte del material de cubierta u hospedador (Reineccius, 1991). Estos materiales poseen baja viscosidad a altas concentraciones de sólidos y alta solubilidad en agua. Entre los materiales más utilizados están:

ciclodextrinas, almidón, maltodextrinas, sacarosa; algunas celulosas como la carboxi-metil celulosa, metil celulosa y etilcelulosa.

Entre los hidratos de carbono se encuentran las ciclodextrinas, que debido a sus características particulares, poseen numerosas ventajas respecto a los demás carbohidratos, y su estudio por lo tanto, merece una atención particular.

I.2. CICLODEXTRINAS

Los principales productos de la fotosíntesis son dos polímeros de la glucosa: la celulosa y el almidón. Estos representan una parte importante de las fuentes de energía renovable de la Tierra. Sin embargo, mientras la celulosa es un componente celular resistente y formador de estructuras, el almidón es un depósito de energía móvil y convertible. Cuando el almidón es parcialmente hidrolizado, se producen dextrinas, que bajo la acción de la enzima ciclomaltodextrin glucano transferasa (CGT), dan lugar a la formación de dextrinas cíclicas (Figura I.3).

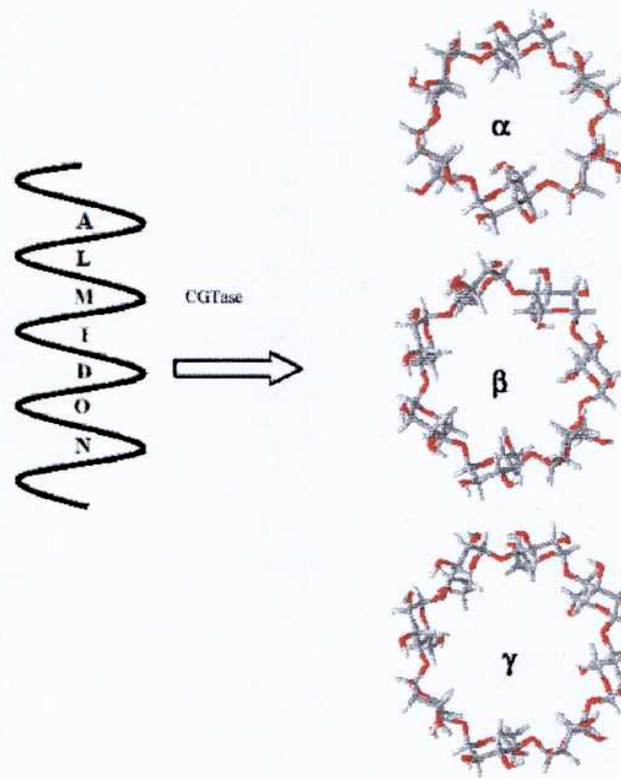


Figura 1.3. Representación gráfica de la formación de ciclodextrinas a partir del almidón (adaptada de Bonnet, 2001).

Las ciclodextrinas son entonces, oligosacáridos cíclicos obtenidos industrialmente por degradación enzimática del almidón (particularmente de su forma lineal, la amilosa), catalizada por la enzima ciclomaltodextrin glucano transferasa.

1.2.A. BREVE HISTORIA

Las ciclodextrinas fueron aisladas por primera vez por A. Villiers en 1891. A partir de la digestión de almidón por parte del *Bacillus amilobacter*, Villiers notó la obtención de una pequeña cantidad de material cristalino, además de dextrinas reductoras. Así, él puso en evidencia a dos productos (probablemente la β y la α -ciclodextrina), que tenían propiedades físico-

químicas similares a la celulosa, y los llamó "celulosina" (Del Valle, 2004). Ya en 1903, las ciclodextrinas fueron caracterizadas por F. Schardinger como oligosacáridos cíclicos, por lo que en las primeras publicaciones de ciclodextrinas, éstas fueron denominadas "dextrinas de Schardinger". En 1938, estudios presentados por K. Freudenberg mostraron que las ciclodextrinas están construidas a partir de unidades de D-glucosa unidas entre ellas por enlaces glucosídicos $\alpha(1 \rightarrow 4)$ (Bonnet, 2001). Además se descubrió que las ciclodextrinas eran capaces de formar complejos de inclusión, cuando empezó a utilizarse la cristalografía de Rayos X para la determinación de estructuras (Del Valle, 2004). A partir de este momento, el estudio de ciclodextrinas tomó un impulso considerable, ya que se empezaron a fabricar industrialmente, se sintetizaron ciclodextrinas modificadas y además se obtuvieron diferentes complejos de inclusión (Bonnet, 2001).

I.2.B. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS CICLODEXTRINAS

A las ciclodextrinas se les asigna un prefijo (una letra griega) que indica el número de residuos de glucosa en el anillo. Los tres tipos de ciclodextrinas más comunes, α -, β -, y γ - (con 6, 7 y 8 residuos de glucosa, respectivamente) tienen una estructura similar (como la longitud de sus uniones y su orientación) pero difieren en el tamaño del anillo y en su solubilidad (Figuras I.4 y I.5).

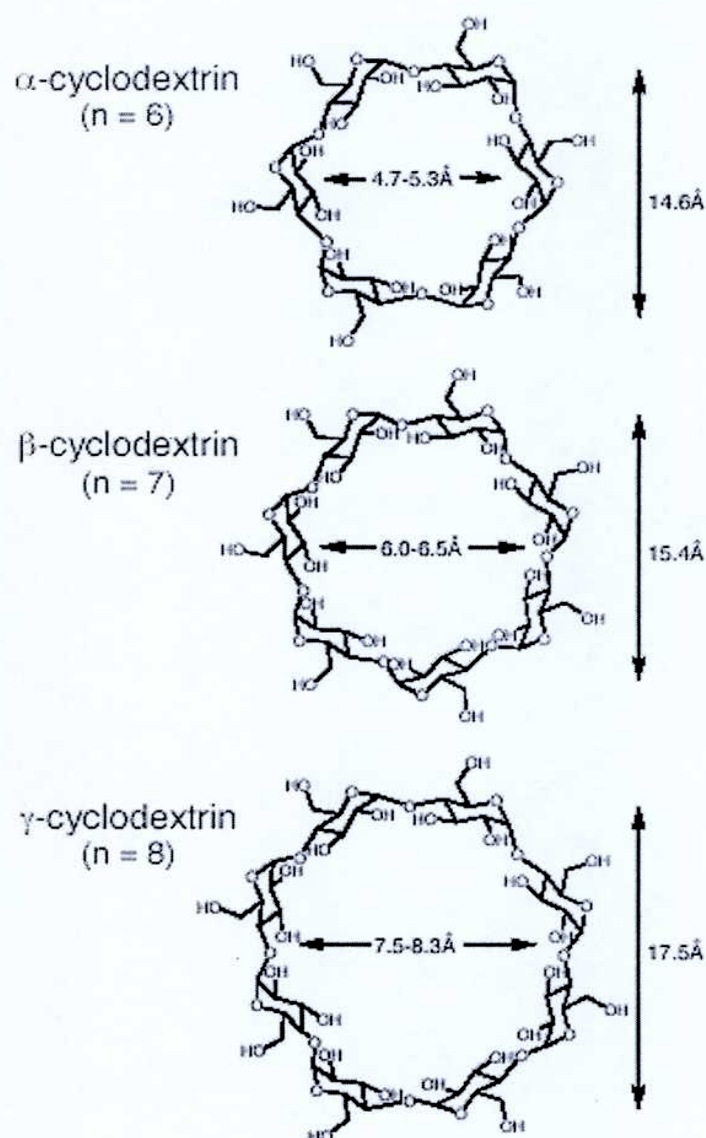


Figura I.4. Estructura general de las ciclodextrinas naturales (vista superior).

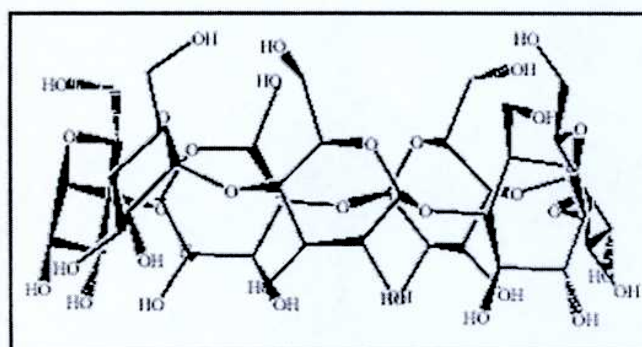


Figura I.5. Estructura general de la β -ciclodextrina (vista lateral).

Estas formas naturales de las ciclodextrinas son cristalinas, no higroscópicas y homogéneas. Presentan la forma espacial de un cono truncado (Figura 1.6). Los grupos hidroxilo secundarios del carbono 2 y 3 están ubicados en la parte más ancha. El grupo hidroxilo primario del carbono 6 está ubicado en la zona más angosta del cono. Las cavidades formadas tienen diferentes diámetros, dependiendo del número de unidades de glucosa. Además, la profundidad es la misma en los tres tipos de ciclodextrina, midiendo aproximadamente 0.8 nm.

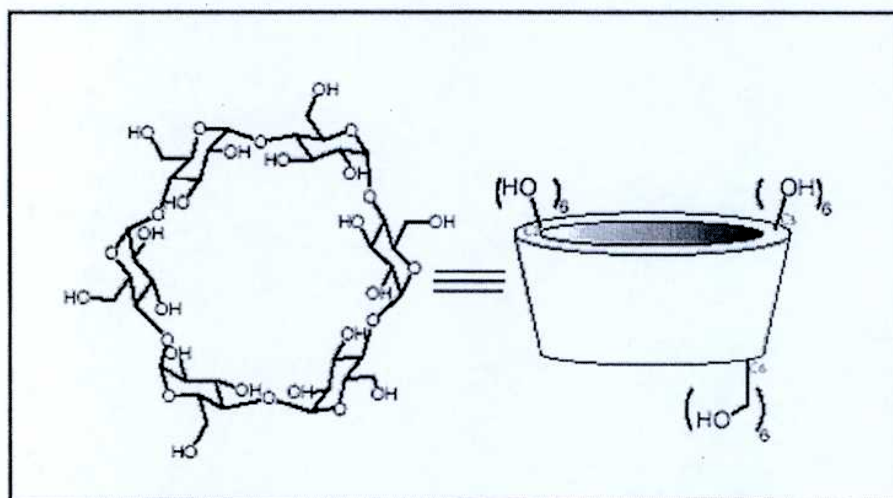


Figura 1.6. Estructura tridimensional de la ciclodextrina, mostrando su forma de cono truncado (adaptado de Szejtli, 2004).

En la Tabla I.1 se detallan propiedades físicas y químicas de los distintos tipos de ciclodextrinas no modificadas.

Tabla 1.1. *Propiedades Físicas y Químicas de las ciclodextrinas naturales: α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina (adaptado de Connors, 1997).*

	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Diámetro interno (nm)	0.47–0.53	0.60–0.65	0.75–0.83
Profundidad de cavidad (nm)	0.79	0.79	0.79
pK _a valor	12.3	12.2	12.1
Solubilidad en agua *	145	18.5	232
PM (DA)	972	1135	1297
Volumen de cavidad (aprox.) **	174	262	427
Agua cristalina (%w/w)	10.2	13.2–4.5	8.13–17.7
Interacción hidrofóbica	CD- cavidad	CD- cavidad	CD- cavidad
Puente de Hidrógeno	glucosa-OH	glucosa-OH	glucosa-OH
ΔH° (solution), kcal/mol	7.67	8.31	7.73
ΔS° (solution), cal/(mol K)	13.8	11.7	14.7

* (mg mml⁻¹, 25 °C); ** (10⁶ pm³).

Debido a su estructura circular y la posición particular de los grupos hidroxilos, la ciclodextrina es anfifílica, y tiene por ende, dos zonas con propiedades distintas:

- una parte interior hidrofóbica y,
- una exterior, hidrofílica.

Esta naturaleza anfifílica es justamente la que brinda a las ciclodextrinas su propiedad más interesante: formar complejos supramoleculares en solución acuosa con una molécula que se aloja dentro de su cavidad.

Los átomos de hidrógeno y oxígeno glicosídico están orientados hacia el interior de la molécula circular, formando una cavidad con una alta densidad electrónica y de naturaleza hidrofóbica. Esto es justamente lo que va a permitir que puedan interactuar con moléculas orgánicas y puedan formar una asociación o complejo estable. En cambio, los grupos hidroxil polares de los monómeros de glucosa están orientados hacia el exterior de la molécula

de ciclodextrina y estos van a ser responsables de las propiedades de solubilidad acuosa de la ciclodextrina y sus complejos.

Las fuerzas de unión o asociaciones involucradas en la formación de los complejos son débiles, tales como fuerzas de Van der Waals, dipolo-dipolo, o puentes de hidrógeno. Sin embargo, estas asociaciones son lo suficientemente fuertes para permitir que el complejo mantenga íntegra su estructura.

Químicamente, las ciclodextrinas son compuestos estables. Al no tener un grupo reductor final, no existe la posibilidad de que puedan producirse reacciones de azúcares reductores, a menos que ocurra una hidrólisis de la ciclodextrina. Si bien los ácidos fuertes como el ácido clorhídrico o sulfúrico, pueden hidrolizar la ciclodextrina en un cierto porcentaje, dependiendo de la concentración y de la temperatura, los ácidos débiles como el ácido acético no tienen ningún efecto. Es importante también destacar que a los valores de pH que normalmente se encuentran en los alimentos, las ciclodextrinas no pueden hidrolizarse.

En síntesis podemos decir que las ciclodextrinas:

1. Son productos semi naturales producidos a partir del almidón, material natural renovable, por una conversión enzimática simple.
2. Son producidos en cantidades de miles de toneladas por año a través de tecnologías no dañinas para el medio ambiente.
3. A pesar de que en un inicio salieron a la venta a un alto precio, éste ha bajado al punto de ser aceptable para la mayoría de procesos industriales.

4. Debido a su habilidad para formar complejos de inclusión, se pueden cambiar dramáticamente las propiedades de la molécula huésped (Polyakov y col., 2004 (b)).
5. Se pueden eliminar posibles efectos tóxicos del huésped si se escoge correctamente el tipo de ciclodextrina y su proceso de encapsulación.
6. Debido a que puede eliminar posibles efectos tóxicos del huésped, las ciclodextrinas pueden ser consumidas por el ser humano como ingredientes en alimentos, drogas o cosméticos (Szejtli, 1998).

1.2.C. MECANISMO DE ENCAPSULACIÓN

Tal como se mencionó en la sección anterior, la característica más notable de las ciclodextrinas es su habilidad para formar complejos de inclusión sólidos (por encapsulación molecular) con una amplia variedad de compuestos sólidos, líquidos y gaseosos (Figura 1.7).

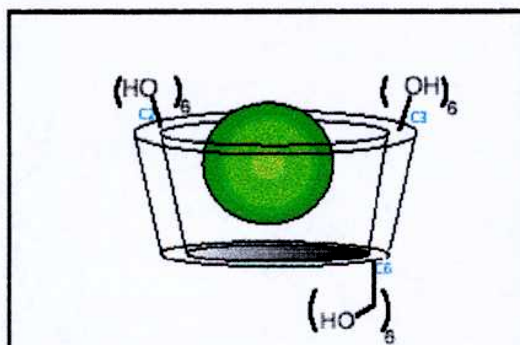
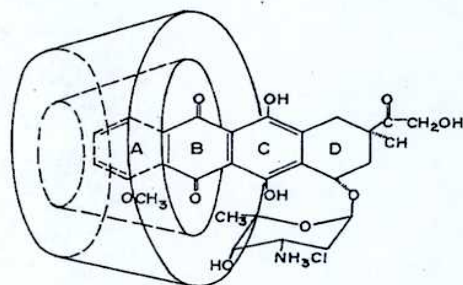
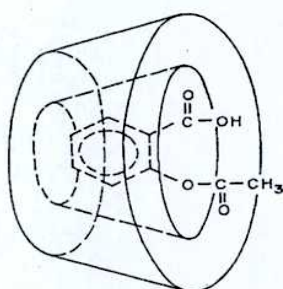


Figura 1.7. Esquema mostrando la encapsulación molecular que se produce entre una molécula huésped y la ciclodextrina.

En la figura 1.8 se pueden ver esquemáticamente dos ejemplos de complejos formados con β -ciclodextrina.



Complejo
Doxo Rubicán/ β -ciclodextrina
(Inclusión Parcial)



Complejo
Aspirina/ β -ciclodextrina
(Inclusión Completa)

Figura 1.8. Ejemplos de complejos de inclusión con β -ciclodextrina: complejo Doxo Rubicán- β -ciclodextrina y complejo Aspirina- β -ciclodextrina (Tomado de Loftsson, 2003).

En soluciones acuosas, la cavidad ligeramente apolar es ocupada por moléculas de agua. Esta estructura no es energéticamente favorable (interacciones polar-apolar), y puede entonces, ser rápidamente reemplazadas por moléculas huéspedes menos polares que el agua.

Durante la formación de complejos de inclusión, la fuerza impulsora es el desplazamiento de las moléculas de agua situadas en la cavidad de las ciclodextrinas en posiciones energéticamente desfavorables (polar-apolar), por parte del sustrato. Esto va a provocar un aumento de la entropía del sistema que favorece el proceso de formación del complejo de inclusión (Figura 1.9).

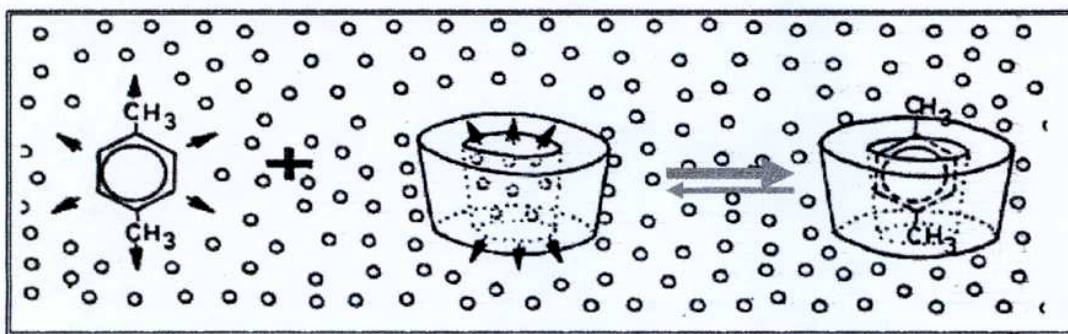


Figura I.9. Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión (Tomado de Frömming y Szejtli, 1994).

El caso más frecuente y simple en la formación de los complejos es aquel con una estequiometría ciclodextrina-huésped de 1:1. Sin embargo, también se dan estequiometrías 1:2, 2:1, 2:2, e incluso otras asociaciones más complicadas (Figura I.10).

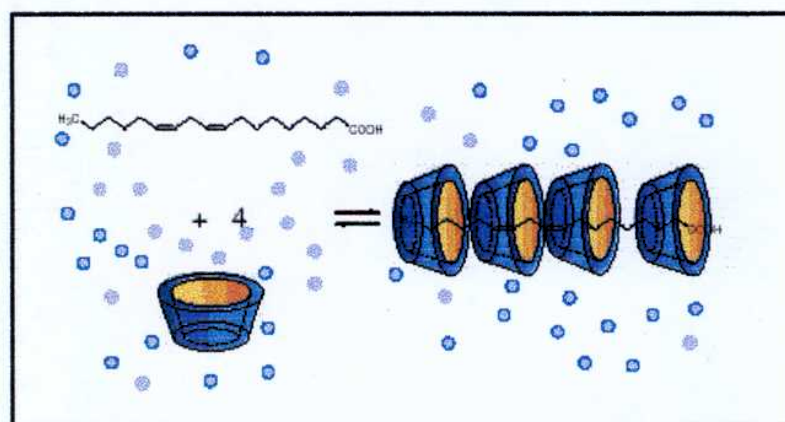


Figura I.10. Ácido linoleico formando un complejo de inclusión con α -ciclodextrina en una relación molar de 1:4 (Tomado de Regiert, 2007).

La habilidad de las ciclodextrinas de solubilizar un dado compuesto se evalúa, por medio del método de solubilidad de fases. Este método,

desarrollado por Higuchi y Connors (1965), permite determinar la cantidad de molécula huésped solubilizada en función de la concentración de ciclodextrina (Figura 1.11). La forma que adopte dicho diagrama, permitirá determinar el tipo de complejo de inclusión que se forma.

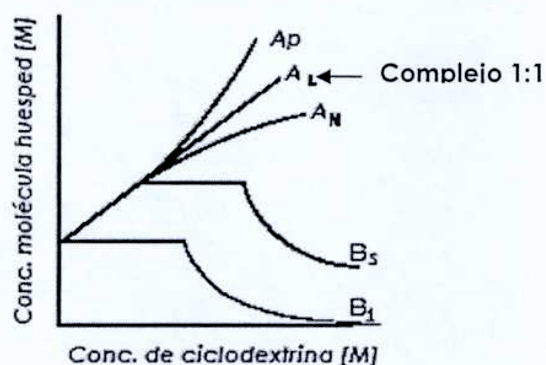


Figura 1.11. Diagrama de tipos de solubilidad de fase de Higuchi y Connors (1965). (Adaptado de Uekama y col, 1998).

Los complejos de inclusión formados pueden ser aislados como sustancias cristalinas estables. Al disolver estos complejos, un equilibrio se establece entre las moléculas encapsuladas y libres, y esto se expresa por medio de la constante de estabilidad del complejo $K_{1:1}$ (Szejtli, 1998).

La formación del complejo entre la molécula huésped A y la ciclodextrina (CD) es regida entonces por un equilibrio termodinámico:



Donde:

K_f : constante de formación del complejo

K_d : constante de disociación del complejo

A partir de este equilibrio y utilizando el diagrama de solubilidad de fases (Figura 1.11) se pueden obtener las constantes de formación y de disociación del complejo, muy importantes para evaluar la estabilidad del complejo:

$$K_{1:1} = \frac{[CD \cdot A]}{[CD][A]} \quad (1.2)$$

La formación y estabilidad de los complejos de inclusión con estequiometría superior a 1:1 va a depender de varios factores:

- Compatibilidad geométrica: Dependiendo del tamaño y forma geométrica del sustrato con respecto a las dimensiones de la cavidad de las ciclodextrinas.
- Polaridad del sustrato: En función del carácter hidrófobo del sustrato.
- Las propiedades del solvente: polaridad, pH.

Las principales consecuencias de la interacción entre un huésped poco soluble y una ciclodextrina en solución acuosa son:

- El poder de reacción de la molécula huésped va a disminuir considerablemente, es decir, que es estabilizada. En otras ocasiones, por el contrario, las ciclodextrinas se comportan como una enzima artificial, acelerando ciertas reacciones.
- La difusión y volatilidad de la molécula incluida en la cavidad son reducidas notablemente.
- La molécula huésped, inicialmente hidrofóbica, empieza a comportarse como hidrofílica una vez que se forma el complejo.

En estado sólido, en cambio, las consecuencias son:

- La sustancia encapsulada está molecularmente aislada en la matriz, formando un polvo microcristalino o amorfo, aún con moléculas huéspedes en estado gaseoso.
- El huésped permanece protegido contra todo tipo de reacciones, salvo aquellas relacionadas con los grupos hidroxil de la ciclodextrina.
- La sublimación y la volatilidad de la molécula huésped están reducidas a valores poco significativos.
- El complejo es hidrofílico, rápidamente soluble y de fácil mojabilidad.

En el caso que el sustrato posea grupos polares capaces de formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo, las interacciones serán más fuertes y por ende, la estructura más estable.

Las interacciones hidrofóbicas sustrato-receptor son predominantes en la formación de los compuestos de inclusión, aunque las contribuciones de éstas van a depender de la naturaleza del sustrato incluido.

El mecanismo de "atrapamiento" o encapsulación de la ciclodextrina es diferente que en otros materiales comúnmente utilizados para encapsular como almidón, azúcares y goma arábiga (Hedges y McBride, 1999). La encapsulación en estos materiales, al formarse una matriz continua, es estable mientras que la cápsula se mantenga en condiciones de sequedad. En cambio, cuando el complejo de ciclodextrina se humedece, se va a establecer un equilibrio entre el huésped encapsulado, el no encapsulado y la ciclodextrina, manteniéndose intacta la molécula de la misma (Figura 1.9).

La cantidad de huésped liberado dependerá de la naturaleza del ingrediente encapsulado, pues cada ingrediente tiene su propia constante de

asociación-disociación (ver sección 1.2.C, formula 1.2), y también de la cantidad de agua disponible para solubilizar el complejo. Una mayor cantidad de agua favorecerá la liberación de mayores cantidades del huésped encapsulado. Cuando el agua sea eliminada, el complejo se reconstituirá.

En otros materiales, las asociaciones que mantienen unida a la matriz continua se rompen al ser humedecidas, causando la liberación del huésped. Sin embargo, la matriz no puede reconstituirse a pesar de removerse el agua, haciendo que el ingrediente no se encuentre ya encapsulado y que no pueda darse protección alguna. Entonces, la habilidad de la ciclodextrina para reconstituir el complejo le va a permitir ser utilizada en aquellos procesos donde intervienen calor y humedad y que pueden dar lugar a la ruptura de otras matrices poliméricas.

1.3. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Los complejos pueden ser obtenidos por diferentes métodos que van a depender de las siguientes variables:

- Las propiedades fisicoquímicas del material activo,
- La cinética de equilibrio del complejo,
- Los ingredientes utilizados en la formulación y el proceso de obtención.

I.3.A. PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS

Los métodos más utilizados para la preparación de los complejos de inclusión son:

- Coprecipitación
- De mezcla espesa
- De pasta
- Métodos de mezclado en seco.

Estos métodos son similares; la diferencia está en la cantidad de agua utilizada para su preparación.

Como ya se ha mencionado, el agua es importante para la formación de los complejos (ver sección I.2.C). Además de ser la fuerza impulsora para la interacción hidrofóbica del compuesto a incluir en la cavidad de la ciclodextrina, el agua es el medio de disolución tanto de la ciclodextrina como del huésped.

En algunos casos, el agua también es necesaria para mantener la integridad del complejo. Está presente en los cristales de hidratación del complejo y además puede formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las moléculas de ciclodextrinas adyacentes para formar una jaula que ayuda a "atrapar" el compuesto huésped en el complejo.

1. Método de Coprecipitación

A una solución de ciclodextrina en agua se le añade el compuesto a encapsular, con agitación. Se eligen las condiciones necesarias de temperatura y concentración para que el complejo precipite y pueda ser recuperado por filtración o centrifugación.

Teniendo en cuenta que la β -ciclodextrina es la menos soluble de las ciclodextrinas, antes de añadir el ingrediente a encapsular, la solución se calienta hasta 60° C para disolver la β -ciclodextrina. Se deja enfriar la solución con agitación mientras se agrega el compuesto. A continuación, la solución obtenida se deja en reposo. Como el complejo es menos soluble que la ciclodextrina, precipita y se lo separa por filtración.

Este método es el más utilizado en el laboratorio. Tiene la ventaja que se puede verificar fácilmente la formación del complejo y que el ingrediente activo se haya incorporado al complejo.

El método de coprecipitación no es utilizado para la formación de complejos a escala industrial, debido a la gran cantidad de agua que se necesita. En general, este método es utilizado para analizar la factibilidad de la formación de complejos con algún compuesto en particular, para caracterizar el complejo y determinar sus propiedades antes de utilizar un método a escala industrial.

2. Método "Slurry" o de Mezcla Espesa

En este método la ciclodextrina es suspendida en agua hasta una concentración de 40 a 45% w/w. Como el huésped puede tener un efecto sobre la viscosidad de la mezcla, las concentraciones deben ser ajustadas para permitir la combinación de las ciclodextrinas con el compuesto. Además, como las ciclodextrinas necesitan disolverse por completo para formar complejos, a medida que va formándose el complejo y precipita, mayor cantidad de ciclodextrina se disuelve para formar más complejo.

Se puede utilizar calentamiento, según el tipo de compuesto que se vaya a encapsular. El tiempo necesario para la encapsulación va a depender del tipo de compuesto utilizado y de cuán vigorosa sea la agitación. El complejo generalmente se separa por filtración y luego se seca si es necesario.

3. Método de Pasta

Este método utiliza una mínima cantidad de agua, 20 a 30% w/w. Tanto la ciclodextrina, como el agua y el huésped a encapsular son añadidos a una mezcladora. Debido a la alta viscosidad de la mezcla, no puede ser realizado en el laboratorio. El tiempo de mezclado va a variar según el compuesto a encapsular, cantidad de agua y magnitud de la agitación. El instrumento de mezclado con mayor fuerza de cizalla generalmente forma el complejo más rápidamente. En la mayoría de casos el tiempo de mezclado es alrededor de 30 minutos. El complejo así obtenido luego es secado utilizando cualquiera de los métodos descritos en la sección I.3.B.

4. Método de Mezclado en Seco

Este método no requiere de agua en el mezclado de la ciclodextrina con el componente a encapsular. No es un método eficiente de formación de complejos, pues el tiempo de mezclado puede tomar horas o incluso días. Una excepción es el aceite de limón, pues la encapsulación tarda solamente algunos minutos. En estos casos, el compuesto encapsulado estaría sirviendo también de solvente para la ciclodextrina.

Según Hedges y McBride (1999), para una producción a gran escala, es más conveniente utilizar el método "slurry" o el de pasta, debido a que no se necesita remover tanta agua durante el secado.

I.3.B. SECADO DE LOS COMPLEJOS

El secado de los complejos requiere la remoción de agua tan rápido como sea posible, especialmente cuando se encapsula un compuesto volátil.

La presencia de agua, aún en muy pequeñas cantidades en la torta filtrada o pasta, permite que exista un equilibrio entre el complejo soluble y el insoluble. Una pequeña parte del complejo se va a disociar, haciendo que se libere parte del huésped. Con compuestos volátiles esto lleva a una pérdida por evaporación, así que el tiempo del secado y reducción de la cantidad de agua que permite la solubilización del huésped debe ser lo más corto posible.

Puede utilizarse cualquier tipo de secador, tal como secador spray, secador de lecho fluidizado, liofilizador o secador al vacío. Los secadores de placas pueden llegar a producir ciertas áreas calientes no controladas, que pueden producir la disociación del complejo. El uso de estufas con circulación de aire caliente evitan los problemas que se producen al utilizar secaderos de placas. El aire circulante ayuda también a remover el vapor de agua a una velocidad mayor que la difusión del agua en el material. Algo que debe considerarse es que aunque se mantiene intacto el complejo, mientras se produce la migración del agua desde el interior hasta la superficie de éste, puede producirse la pérdida de la estabilidad del complejo. Por esto, se suelen utilizar secadores que puedan mezclar físicamente al complejo durante el secado.

Las propiedades fisicoquímicas del complejo deben también tenerse en cuenta para la elección del método de secado a utilizar. Los complejos solubles se secan frecuentemente con un secador spray.

Las temperaturas de secado en estufa se encuentran generalmente alrededor de 100° C, es decir, la temperatura de ebullición del agua. Entonces, para aquellos compuestos a encapsular que sean volátiles puede ser necesario aplicar ciertos ajustes en la temperatura. Si la temperatura de ebullición del compuesto es excedida, éste se va a evaporar. Para un compuesto volátil, una temperatura que se encuentre 3 a 5° C por debajo de su temperatura de ebullición sería suficiente. Si la temperatura es muy baja, debido al tiempo necesario para el secado, también se puede perder el compuesto encapsulado debido a su liberación, resultado del equilibrio establecido por el complejo con el agua presente (sección 1.2.C).

No existe un único método o proceso para obtener los complejos. Para cada compuesto que se vaya a encapsular con la ciclodextrina, se debe desarrollar un proceso. Generalmente, la selección del equipo a utilizar se basa en el uso del equipo existente en un laboratorio y luego el proceso se desarrolla alrededor de su uso. Ciertos factores como temperatura, cantidad de agua, tiempo de mezclado y condiciones de secado deben ser establecidos para el equipo disponible y para la ciclodextrina y su complejo de inclusión en cada caso. Sin embargo, a escala de laboratorio, el método más frecuentemente utilizado es la liofilización.

I.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS

Para analizar los complejos ciclodextrinas-huésped, pueden utilizarse diferentes técnicas a saber:

- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termo gravimétrico (TGA),
- Resonancia Magnética Nuclear (NMR),
- Difractometría de Rayos X,
- Microscopía electrónica de barrido,
- Espectroscopía infrarroja y Raman, etc.

La selección de la técnica a utilizar depende más de la disponibilidad de los equipos y de las propiedades fisicoquímicos del huésped, que determinará cuál es la técnica seleccionada sea más sensible o confiable para el complejo en particular (Hedges, 1998).

I.4.A. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Es una técnica térmica en que se miden las diferencias en la cantidad de calor aportado a una sustancia y a una referencia en función de la temperatura de la muestra, utilizando un programa de temperatura controlado.

Como una consideración preliminar, cabe señalar que los métodos térmicos (sobre todo DSC y/o TGA) representan una herramienta analítica muy utilizada para la caracterización de sistemas de multicomponentes, tales como los complejos de inclusión en estado sólido (Giordano y col., 2001, Chang y col., 1990).

En los termogramas, las cristalizaciones aparecen como picos exotérmicos y las fusiones, como picos endotérmicos. Un ejemplo de termograma se observa en la Figura I.12 correspondiente al perfil termoanalítico de un sistema huésped- β -ciclodextrina.

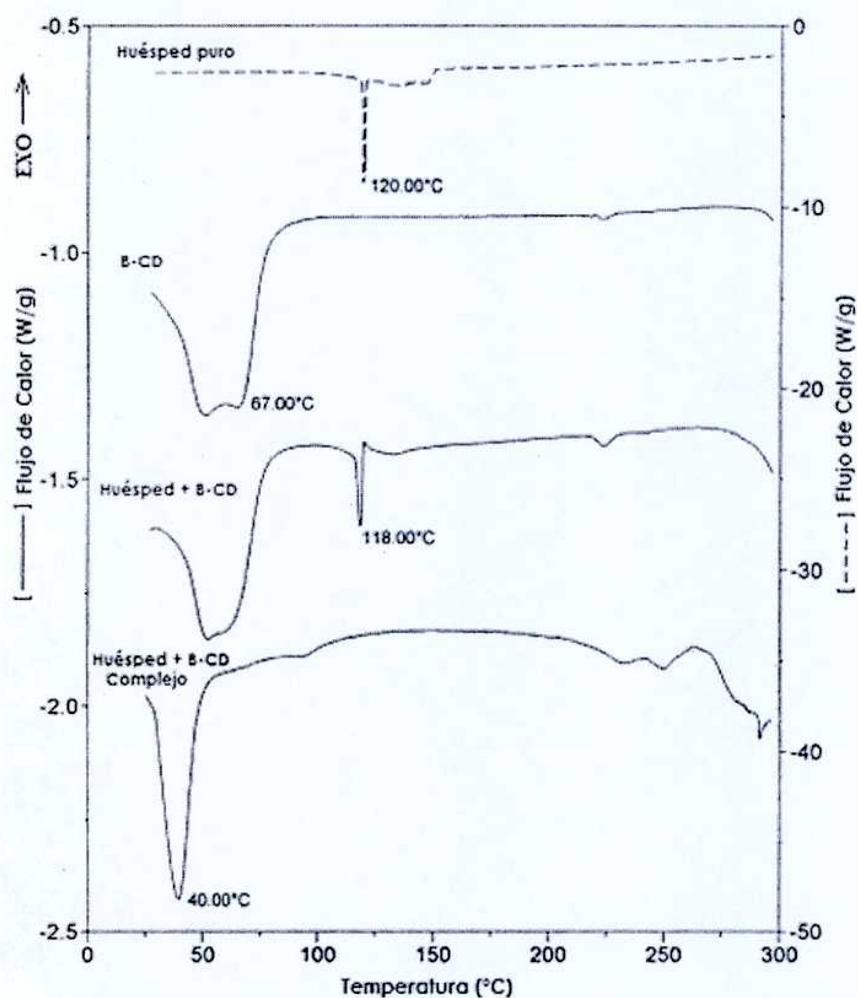


Figura I.12. Perfil termoanalítico de un sistema Huésped- β -ciclodextrina realizado por DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido). (Adaptado de Giordano y col., 2001).

En líneas generales, el comportamiento térmico de las ciclodextrinas naturales es similar, aunque se van a encontrar diferencias en el contenido de agua y temperaturas del "onset" de la degradación térmica (Giordano y col., 2001). Al igual que en el Análisis Termo Gravimétrico (TGA), el compuesto

huésped debe tener un punto de fusión o ebullición por debajo de $\approx 300^\circ \text{C}$, que es la temperatura a la cual se descomponen las ciclodextrinas. Cuando el huésped es encapsulado no se observa energía de absorción en su punto de fusión. Esto se debe a que como el compuesto está rodeado por la ciclodextrina y no interactúa con otro compuesto de inclusión, no hay una estructura cristalina del huésped que absorba energía. Además, se va a observar un incremento en la temperatura de ebullición lo que se puede ver con ambas técnicas (DSC y TGA). En la gran mayoría de casos, las curvas resultantes muestran la desaparición del pico de fusión del huésped. En cuanto al análisis cuantitativo, se toma poco en consideración.

El análisis térmico es utilizado comúnmente como un método de rutina para una rápida investigación cualitativa (Pinto y col., 2005). En este caso, la metodología es casi siempre el mismo: una comparación del comportamiento térmico de los componentes puros, luego su mezcla física y finalmente el compuesto de inclusión formado, preparado según una variedad de procedimientos estándar. El propósito de esto es el de evidenciar la diferencia entre la mezcla física y el supuesto complejo de inclusión obtenido.

I.4.B. ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR)

La espectroscopía NMR es una rama de la espectroscopía de absorción que utiliza radiación electromagnética en el rango de radiofrecuencia para así inducir transiciones entre niveles de energía nuclear de spin, en la presencia de un fuerte campo magnético. Cuando el spin nuclear se vuelve a relajar a su estado de equilibrio, el voltaje es inducido a una señal detectada: este voltaje es el NMR (Fereidoon y Xiao-Qing, 1993).

El estudio de los complejos con ciclodextrinas por medio de esta técnica fue utilizado por primera vez por De Marco y Thakkar (1970). Estos investigadores observaron que se producía un desplazamiento en el hidrógeno correspondiente a la posición 3 y 5 de la ciclodextrina, en presencia de numerosos sustratos, concluyendo entonces que había ocurrido la inclusión en la cavidad de la ciclodextrina (Connors, 1997). Además, a través de las mediciones de los tiempos de relajación y correlación y los efectos nucleares de Overhauser, se ha contribuido al conocimiento sobre las estructuras de los complejos con ciclodextrinas.

En líneas generales, se sabe que si se presenta un desplazamiento en el hidrógeno en la posición 3, en presencia de un sustrato, se infiere que la cavidad está casi hueca, y entonces, el sustrato ha sido parcialmente incluido. Mientras, que si además se presenta un desplazamiento en el hidrógeno en la posición 5, se deduce que la penetración del sustrato ha sido profunda.

El tipo de ciclodextrina utilizada afecta también la estructura del complejo, y por ende, las señales NMR, para un mismo sustrato. Así, la penetración en la cavidad de β -ciclodextrina es más profunda que en la α -ciclodextrina.

La espectroscopía NMR (Resonancia Magnética Nuclear) permite entonces, comprobar fehacientemente que el complejo se ha formado (Polyakov y col., 2004 (a)). Otras técnicas, como la calorimetría diferencial de barrido, la espectroscopía de absorción de infrarrojo, etc., pueden establecer si la molécula huésped forma o no un complejo, pero no son capaces de confirmar el tipo de complejo formado, ni la conformación estructural de la molécula (Mulinacci y col., 1996). Sin embargo, la Resonancia Magnética

Nuclear es un método que no está fácilmente disponible, por lo que es necesario buscar alternativas para caracterizar el complejo de ciclodextrina.

I.4.C. DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X

Los rayos X son una radiación electromagnética de longitud de onda corta producida por el frenado de electrones de alta energía. La interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa, da lugar a una dispersión. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias (constructivas y destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. El resultado es la difracción (Skoog y col., 1992).

Cuando son sometidas las ciclodextrinas o el huésped cristalino a la difracción de rayos X, éstos presentan un patrón de difracción de alta intensidad, debido a su cristalinidad. Por el contrario, si el complejo de inclusión se forma, va a mostrar un patrón de tipo halo (Ribeiro y col., 2003), con picos difusos y anchos, característicos de un compuesto amorfo.

I.4.D. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es un método que se aplica para la determinación cualitativa y cuantitativa de especies moleculares de todo tipo, sobre todo orgánicas y bioquímicas, y también ha sido utilizada para el análisis de los complejos de inclusión. Estos espectrómetros presentan una relación señal/ruido muy alta, alta resolución, son exactos y rápidos.

Cuando se produce la encapsulación del compuesto huésped, ocurren cambios o saltos en los espectros del mismo. Sin embargo, algunos de los cambios son muy sutiles, lo cual requiere una interpretación cuidadosa del espectro (Hedges, 1998). Además, la aplicación de este método de infrarrojo se limita a aquellos huéspedes que tienen ciertas bandas de absorción características como los grupos carbonil (Ribeiro y col., 2003).

I.4.E. ESPECTROSCOPÍA RAMAN

Esta técnica permite trabajar con sistemas con agua evitando que se produzcan interferencias, que es lo que sucede en la espectroscopía del infrarrojo.

Cuando la luz incide sobre una molécula, el campo eléctrico oscilante de la radiación incidente provoca una oscilación de la densidad electrónica en la molécula. Este efecto viene representado por la aparición de un momento dipolar eléctrico oscilante inducido que actúa, a su vez, como fuente de radiación, originando las dispersiones (scattering) Rayleigh y Raman (Skoog y col., 1992).

A través de esta espectroscopía, se van a obtener las intensidades integradas de vibración elástica Raman de grupos conocidos como O-H o C-H. Por ejemplo, en complejos de inclusión de carvone-ciclodextrina, las diferencias existentes entre las intensidades integradas en estos grupos pueden indicar la pérdida de moléculas de agua o la liberación del carvone de la cavidad de la ciclodextrina (Moreira da Silva y col., 2002).

I.4.F. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En esta técnica se barre mediante un rastreo programado la superficie del sólido con un haz de electrones de energía elevada, y por ello se producen diversos tipos de señales en la superficie.

Cuando se realiza un barrido en una mezcla física de productos, como una ciclodextrina y un ingrediente activo, las microfotografías obtenidas van a mostrar partículas de diferente morfología y tamaño. Por el contrario, los complejos de inclusión de ciclodextrinas van a presentar grandes masas de partículas iguales (Ribeiro y col., 2003).

La microscopía electrónica da entonces una información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos, necesaria para entender el comportamiento de las superficies. Esta técnica permite determinar el tamaño promedio real de las microcápsulas y su distribución, pero no proporciona información respecto a la permeabilidad y estabilidad de la microcápsula (Fereidoon y Xiao-Qing, 1993).

Hay otras técnicas que, además de estas presentadas, han sido utilizadas para caracterizar los complejos. Sin embargo, su selección va a depender más que nada de la disponibilidad de los equipos y de las propiedades del huésped.

I.5. APLICACIONES DE LAS CICLODEXTRINAS

La habilidad de las ciclodextrinas para formar complejos de inclusión proporciona numerosos beneficios en diferentes áreas de la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

I.5.A. APLICACIONES GENERALES

I.5.A.1. Control de la solubilidad

La solubilidad de un compuesto de inclusión puede cambiar debido a la encapsulación en una ciclodextrina. Cuando el compuesto es encapsulado por una ciclodextrina, éste, dentro de la cavidad de la ciclodextrina, está prácticamente rodeado por toda la molécula de la ciclodextrina. Los grupos hidrofóbicos del huésped que podrían entrar en contacto con el solvente en estado libre, interactúan con los átomos de la cavidad de la ciclodextrina, mientras la superficie externa de la misma interactúa con el solvente. Por lo tanto, la solubilidad del compuesto encapsulado se altera.

En muchos casos, la modificación de la solubilidad obtenida no es suficiente, por lo que se ha recurrido a modificar la estructura externa de las ciclodextrinas naturales. Una forma es modificando los grupos hidroxilos de la capa externa introduciendo un grupo neutral (hidroxipropil) o un grupo iónico (carboximetil, amina terciaria o amina cuaternaria). Este tipo de modificación aumenta la solubilidad de la ciclodextrina hasta un 60% o más en agua. En cambio, una modificación con grupos alifáticos como el grupo hexilo da como resultado una solubilidad disminuida en agua, pero sí aumentada en solventes orgánicos. El compuesto interno va a tener cierto efecto en la solubilidad del complejo dado que una porción de éste va a estar expuesta en los extremos abiertos de la molécula de ciclodextrina.

Las ciclodextrinas pueden además tener un efecto en la desnaturalización y en la re naturalización de las proteínas, ya que son capaces de formar

complejos con los amino ácidos hidrofóbicos de las proteínas produciendo la solubilización.

1.5.A.2. Auxiliar tecnológico

Las ciclodextrinas pueden también ser utilizadas como auxiliares tecnológicos, donde se aprovecha la habilidad de la ciclodextrina de controlar la solubilidad por medio de la formación del complejo. Al final del proceso se retira la ciclodextrina y entonces no aparece en el producto final (Szejtli, J., 1998, Yamamoto y col., 2005). Un ejemplo de esto es la eliminación del colesterol de productos de origen animal como huevos, lácteos y ciertas grasas animales como manteca y sebo. En estos últimos casos, la ciclodextrina se agrega como una solución acuosa y es mezclada a una temperatura lo suficientemente alta para fundir la grasa, pero a la vez que no desestabilice al complejo. La ciclodextrina se mezcla con el material que contiene colesterol y va formando complejos con éste, que son insolubles en agua y en grasa. Este complejo se remueve por filtración o centrifugación.

Otro uso común de las ciclodextrinas es la remoción de ácidos grasos libres, para así mejorar las propiedades de la grasa. Los ácidos grasos libres ocasionan la formación de productos no deseados durante el freído. Esto causa la formación excesiva de humo, un pardeamiento acelerado antes de concluir la cocción y la presencia de un residuo aceitoso en la superficie del producto final.

Los jugos de frutas y vegetales pueden también ser tratados con ciclodextrinas (Torres-Rivas y col., 2004, Alvarez-Parrilla y col., 2007). Esto se hace para remover compuestos polifenólicos que causan pardeamiento

enzimático. En algunos casos, el complejo es suficientemente soluble que no forma un precipitado que necesite ser removido. El polifenol encapsulado en la cavidad de la ciclodextrina no va a estar disponible para la enzima polifenol oxidasa, ya que se encuentra rodeado por la ciclodextrina.

I.5.A.3. Estabilizador

La cavidad de la ciclodextrina, al ser un espacio finito, puede alojar una sola molécula del compuesto de inclusión, haciendo que otras moléculas presentes en el medio sean excluidas. Si bien los extremos de la cavidad están abiertos, las interacciones hidrofóbicas y fuerzas de repulsión previenen el acercamiento de otras moléculas a la parte expuesta de la molécula huésped, haciéndola menos reactiva. Esta propiedad ha sido utilizada en compuestos como penicilina, Nicarpidina, grasas insaturadas y pigmentos para tintura de cabello (Fernández y col., 2003; del Valle y col., 2004).

I.5.A.4. Enmascarar efecto

Cuando un compuesto es incluido en una molécula de ciclodextrina, se aísla y se previene que entre en contacto con las superficies del cuerpo donde puede causar efectos secundarios como irritación o un flavor indeseado. La liberación del compuesto incluido del complejo es lenta. Por esto, la cantidad del compuesto liberado va a ser menor comparado a la que ocurriría si no estuviera encapsulado. Esto permite que la cantidad del compuesto necesaria para obtener una dada respuesta fisiológica se reduzca, y entonces se enmascaren o se reduzcan los efectos no deseados de dicho compuesto (Hedges, 1998). Esta propiedad de las ciclodextrinas ha sido aprovechada en

procesos, por ejemplo para reducir o eliminar sabores residuales o indeseados en jugos de frutas como el amargor (Konno y col., 1981; Singh, 2002).

I.5.A.5. Reducción de la volatilidad

Cuando ciertos compuestos son encapsulados con ciclodextrinas se reduce su volatilidad (Szente y Szejtli, 2004). Las interacciones del compuesto con la ciclodextrina producen una barrera de alta energía que dificulta que se volatilice con facilidad. Un ejemplo de esto es el mentol, que forma un complejo inodoro con la β -ciclodextrina (Hedges, 1998).

En ciertos productos como pañales, productos de higiene femenina, toallas de papel, etc., también han sido utilizadas las ciclodextrinas con el mismo objetivo (Singh y col., 2002).

I.5.A.6. Control de Fluorescencia y absorción de luz

Ciertos compuestos presentan un aumento o una reducción de la intensidad de fluorescencia o absorción de luz, cuando son incluidos en la cavidad de la ciclodextrina. Esto es de gran beneficio en áreas de la química analítica para aumentar la sensibilidad de ciertos ensayos o para bloquear los efectos de compuestos que puedan interferir (Hedges, 1998).

I.5.B. ENCAPSULACIÓN DE FLAVORES

Los sabores de origen natural y sintético han sido utilizados ampliamente en la nutrición humana. El sabor juega un papel importante en la satisfacción del consumidor y afecta las propiedades organolépticas del producto final.

Sin embargo, el uso directo de los mismos ocasiona una serie de inconvenientes:

- Las materias primas no tienen una composición constante. El contenido de flavor o aroma depende del tiempo de cosecha, procesamiento, tamaño y tipo de producto.
- Los productos naturales pueden presentar contaminación microbiológica y en ocasiones, parásitos.
- El contenido del aroma se reduce durante el almacenamiento y puede involucrar una alteración indeseable de ciertos componentes, causando modificaciones en el sabor final.
- Su tiempo de vida útil es limitado.

Para evitar estos inconvenientes, durante más de un siglo se han utilizado concentrados, aceites esenciales y sabores obtenidos principalmente por destilación con vapor. Recientemente, se ha buscado convertir estos ingredientes en productos sólidos, utilizando almidón, dextrinas o microencapsulándolos, para de esta manera brindar un uso más higiénico y estandarizado (Szente y Szejtli, 2004).

Sin embargo, el método de inclusión o encapsulación molecular se ha utilizado frecuentemente por ser bastante eficiente sobre todo para encapsular sustancias líquidas o principios activos escasamente solubles como los sabores, haciendo posible la obtención de productos farmacéuticos o alimenticios con características mejoradas.

La encapsulación con ciclodextrinas va a permitir entonces, la conversión de aceites en sólidos que fácilmente pueden mezclarse. La

superficie hidrofílica de la ciclodextrina va a permitir el proceso de mezcla evitando la separación de las fases acuosa y grasa.

Debido a que la mayoría de los sabores son lipofílicos, se utilizan tanto grasas como aceites para solubilizarlos y dispersarlos en los productos alimenticios. La formación del complejo con ciclodextrina permite su solubilización directa y una dispersión uniforme, en la matriz acuosa del alimento.

Un ejemplo de lo anteriormente mencionado se da con los productos extruídos. En muchos de estos productos el agente saborizante aparece en la cubierta, debido a las dificultades halladas al mezclar aceites en una matriz alimenticia. Sin embargo, al formar complejos de inclusión con ciclodextrinas, el agente saborizante puede ser distribuido uniformemente durante la extrusión del producto alimenticio, eliminando las dificultades asociadas con el método de extrusión, tales como una distribución no uniforme del sabor o que éste se adhiera a la superficie.

La ciclodextrina puede ser utilizada para incrementar la solubilidad de los ingredientes en agua debido a que puede mantener su estructura cíclica y por su habilidad de formar complejos cuando es disuelta en agua. Además, la volatilidad de los ingredientes se reduce cuando se produce la encapsulación. Las asociaciones formadas son fuertes y se ha observado que incrementan el punto de ebullición al menos en 10° C (Hedges y McBride, 1999), lo que se traduce en una mayor vida útil y además previene la migración del flavor al empaque.

Si bien los complejos en solución no presentan una protección a la volatilización tan completa como en el caso de los complejos secos, si es comparado con el huésped sin encapsular, el grado de volatilización se

reduce notablemente (Hedges y McBride, 1999). Esta reducción es función de la naturaleza del huésped y de la constante de equilibrio del complejo (Ver sección I.2.C, ecuación I.1).

La alta estabilidad térmica de la estructura de la ciclodextrina (temperatura de descomposición = 280° C) permite también que pueda ser utilizada durante ciertos procesos de obtención de productos alimenticios, tales como la extrusión y el horneado (Reineccius y col., 2004). Sin embargo, la combinación de altas temperaturas y humedad puede llevar a la liberación parcial del ingrediente incluido, aunque al enfriarse pueda formarse de nuevo el complejo, una parte del flavor se habrá perdido durante el proceso.

I.6. PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN

El agua puede interaccionar con los sólidos en diferentes formas cada uno de ellas con un mecanismo particular (Zografi, 1988). Así por ejemplo, la interacción del agua con sólidos cristalinos es debido a la habilidad del agua de formar uniones puente de hidrógeno, las propiedades del agua adsorbida en la superficie de un sólido en el cual está adsorbida son diferentes de aquella presente en el seno del mismo.

En la formulación y diseño de productos farmacéuticos, cosméticos, y alimenticios, varios de esas formas están involucradas simultáneamente a saber: adsorción en la superficie como monocapa y multicapa, condensación en los microporos, formación de hidratos cristalinos, deliquesencia y absorción dentro del seno del sólido.

El contenido de agua de un sólido afecta la cristalinidad de drogas y su estabilidad química y física durante el procesamiento y posterior

almacenamiento. Entonces las condiciones de humedad y temperatura bajo las cuales se almacenan deben ser estrictamente controladas (Ahlneck y Zografi, 1990) y la misma debe ser basada en el conocimiento previo de "humedad relativa crítica." Para obtener dicha información es necesario determinar la isoterma de sorción. Esta determina la relación de equilibrio a temperatura constante entre la humedad relativa del ambiente (HR) y la humedad del producto (Figura I.13).

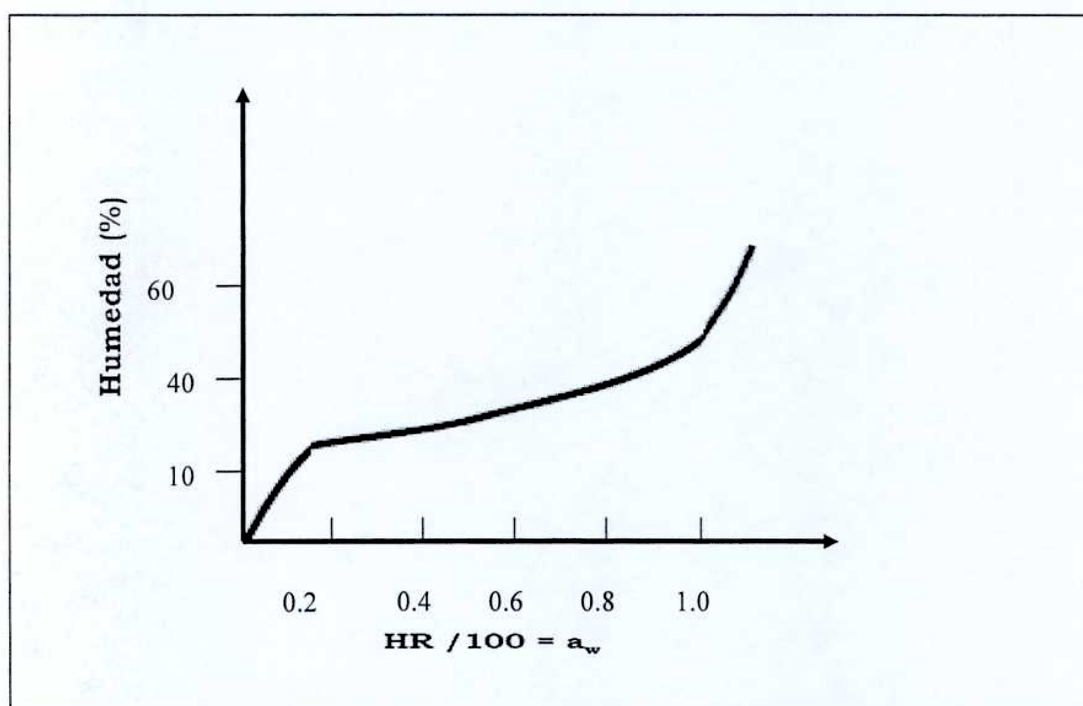


Figura I.13. Esquema de una isoterma de sorción de agua expresada como Humedad en porcentaje (%) en función de la a_w .

Las mismas son una herramienta fundamental durante la caracterización y desarrollo de drogas y excipientes nuevos.

La cantidad de agua captada depende de las condiciones ambientales (HR y temperatura) así como también, de la polaridad relativa del sólido.

Es así que de acuerdo a las propiedades químicas y estructurales de los sólidos podemos distinguir 3 tipos de isothermas (Figura 1.14).

Isoterma Tipo I: Típica de sistemas que sólo pueden adsorber una molécula de agua en cada sitio de sorción de la superficie (monocapa). Ejemplo: agentes antiapelmazantes, como el silicato de calcio.

Isoterma Tipo II: No se alcanza una saturación sino que la cantidad de agua sorbida aumenta con la concentración de adsorbato en la solución. Esto se debe a que se pueden formar varias capas de adsorbato sobre la superficie adsorbente.

Isoterma Tipo III: Los grupos polares interactúan más fuertemente entre sí en el cristal que con las moléculas de agua. En el caso de componentes solubles esto ocurre hasta alcanzar la a_w correspondiente a la de su solución saturada.

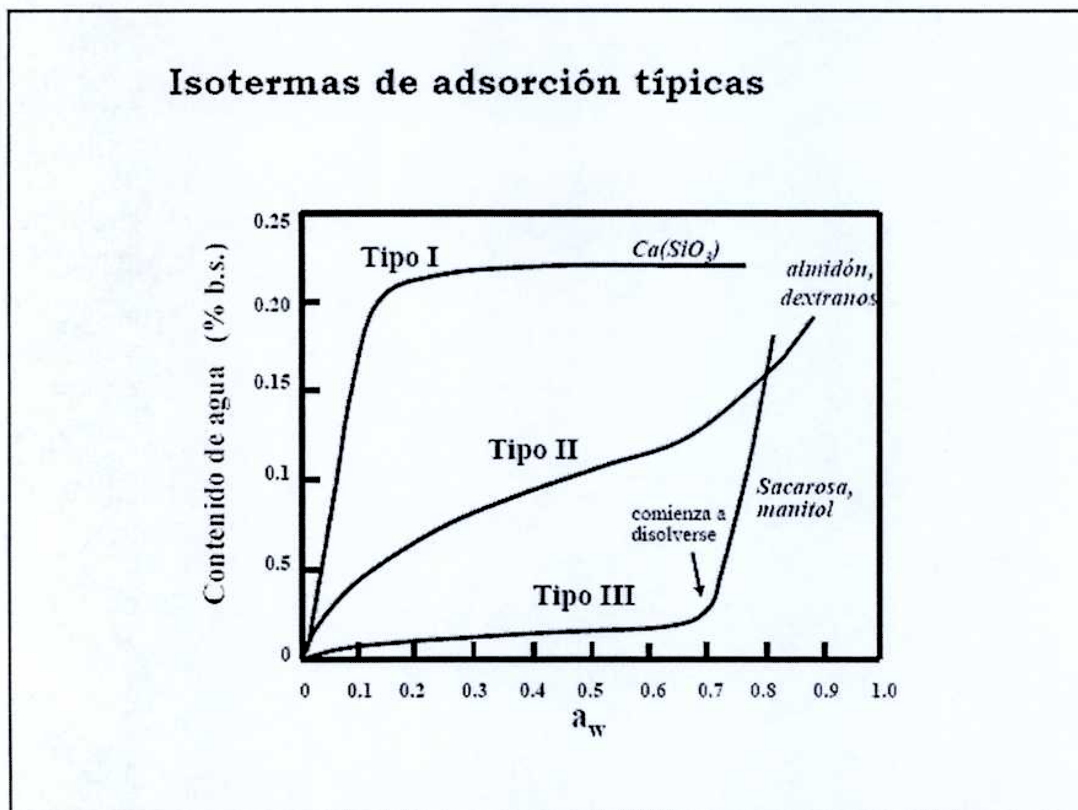


Figura 1.14. Diferentes tipos de isotermas de adsorción, expresados como Contenido de agua (% b.s.) en función de la a_w .

El conocimiento de los mecanismos que dan lugar a los diferentes tipos de isoterma puede contribuir a determinar los efectos que el agua captada puede causar en las propiedades físicas y químicas de tales sólidos. Además, las isotermas constituyen una parte esencial de la teoría del secado y proveen una información útil en el diseño de equipos de secado y en la evaluación y selección de las condiciones apropiadas de procesamiento de alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, en operaciones tales como el secado, mezclado, embalaje y almacenamiento, de forma tal de optimizar o maximizar la retención de propiedades como aroma, textura, color, nutrientes y estabilidad biológica (Tolaba y col., 2004; Sukumar y col., 2002).

Debido a que la mayoría de reacciones que involucran las ciclodextrinas ocurren en un ambiente acuoso, la interacción entre ciclodextrinas y el agua es de fundamental importancia, ya que existe una competencia entre las moléculas hidrofóbicas huéspedes y las moléculas de agua unidas a la cavidad por puentes de hidrógeno (como se ha mostrado en la sección I.2.C, Figura I.9). Entonces, las ciclodextrinas son un sistema modelo adecuado para investigar las interacciones agua-biomoléculas (Winkler y col, 2000; Moreira da Silva y col, 2002).

Las ciclodextrinas cristalizan a partir del agua como hidratos de composición variable. La α -ciclodextrina, que comúnmente se la encuentra como un hexahidrato, α -CD $\cdot$ 6H₂O, puede existir en 3 formas cristalinas diferentes. La β -ciclodextrina (β -CD) generalmente se la encuentra como el undecahidrato β -CD $\cdot$ 11 H₂O y como dodecahidrato β -CD $\cdot$ 12 H₂O, sin embargo, esas estequiometrias son idealizaciones ya que el número de moléculas de agua por unidad de fórmula depende de la humedad relativa a la cual es

expuesta (Marini y col., 1995). Por su parte la γ -ciclodextrina puede cristalizar como heptahidrato u octahidrato, aunque bajo ciertas condiciones puede cristalizar con 17 moléculas de agua.

Las ciclodextrinas se utilizan en la confección de diferentes formulaciones farmacéuticas, cosméticas y alimenticias tales como tabletas capsulas, etc. (Pande y Shangraw, 1995). Además, teniendo en cuenta que la performance de dichas formulaciones depende del contenido de humedad residual presente en el sólido final, resulta imperioso determinar la isoterma de sorción de las ciclodextrinas y de los complejos formados. Dicha evaluación es fundamental para elegir las condiciones óptimas de procesamiento y almacenamiento.

II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN

II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN

La gran mayoría de los compuestos usados como saborizantes y aromatizantes (flavores), artificiales y naturales en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética se presentan en forma líquida a temperatura ambiente. Estos concentrados líquidos, son una mezcla compleja de varias sustancias (las cuales al combinarse producen el flavor que se percibe) y los cuales son muy susceptibles a los efectos de la luz, oxígeno, humedad ambiente y temperaturas elevadas. Además estos concentrados son oleosos y liposolubles y por lo tanto insolubles en agua, por lo tanto es necesario usar un proceso para transformar dichos sabores. Este artificio ha sido logrado en la industria mediante la encapsulación en una matriz amorfa. (Reineccius, 1991; Pagington, 1985; Poplewell y col., 1995; Gouin, 2004). De este modo, un flavor líquido es incorporado a una matriz sólida transformándose en un polvo sólido con volatilidad reducida, mucho más estable a la oxidación y a otros factores externos, y fácil de manipular.

Numerosas son las técnicas y materiales que pueden utilizarse para llevar a cabo la encapsulación de sabores. La elección depende fundamentalmente de la naturaleza química del flavor y de las características del sistema al que será incorporado. El método de encapsulación más comúnmente utilizado es la incorporación del flavor a una solución acuosa (20 a 30%) de un hidrato de carbono (azúcares, almidón, dextrinas, etc.) para formar una emulsión que se deshidrata por liofilización o secado spray para formar una matriz sólida amorfa.

Entre todos los hidratos de carbono, las ciclodextrinas presentan características especiales, ya descritas, por lo cual su estudio merece una atención particular.

A diferencia de los demás modos de encapsulación, esta ocurre a nivel molecular, formando complejos de inclusión con compuestos que tengan dimensiones y forma adecuada para acomodarse en el centro de la cavidad y tengan naturaleza hidrofóbica, presentando una interacción no covalente.

La reacción de formación ocurre sólo en presencia de agua. Las moléculas menos polares que el agua, entran a la cavidad y la desalojan. El complejo formado es menos soluble que las ciclodextrinas. Entonces, precipita en la solución y puede recuperarse por filtración. Las ciclodextrinas evitan la pérdida de actividad de las vitaminas liposolubles (A, D, E) por reacciones de oxidación, isomerización o fotoquímicas, permitiendo así la adición de las mismas en forma soluble a alimentos y bebidas (Del Valle, 2004, Loftsson y col., 2005). Además, ciertos pigmentos naturales tales como carotenoides y flavonoides pueden ser estabilizados por su inclusión en ciclodextrinas. Las ciclodextrinas también pueden evitar la volatilización de sabores y esencias de extractos, especies y aceites esenciales (Anandaraman y Reineccius, 1986; Hedges y McBride, 1999; Del Valle, 2004). Sin embargo, no existen estudios detallados del efecto de las variables externas (temperatura, humedad relativa, luz, etc.) en la cinética de liberación del flavor incluido en la ciclodextrina. Entonces, en la presente investigación se obtuvieron complejos de inclusión de β -ciclodextrinas con diferentes aceites esenciales, la caracterización fisicoquímica de los mismos y la determinación de su estabilidad en diferentes condiciones de humedad relativa durante el almacenamiento a 25° C.

III. OBJETIVO

III. OBJETIVO

Analizar



la eficiencia de la β -ciclodextrina para encapsular aceites esenciales por medio de la formación de complejos de inclusión



las propiedades de hidratación y térmicas de dichos complejos.



el efecto del agua en la estabilidad de los complejos

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. ELECCIÓN DE LA CICLODEXTRINA Y DE LOS COMPUESTOS A ENCAPSULAR

- **Agente encapsulante:**

Como agente encapsulante se eligió la β -ciclodextrina, pues debido a su facilidad de obtención y purificación, ha sido la ciclodextrina más estudiada. Además, debido a que ha sido aceptada como GRAS (comúnmente considerados como seguros) por la FDA (Food and Drug Administration) en el año 2001, es la más utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.

- **Ingredientes activos a encapsular:**

En líneas generales, se buscaron compuestos que son constituyentes de varios aceites esenciales de origen natural, utilizados frecuentemente como aromatizantes o conservantes en las industrias. Sin embargo, debido a su estructura química estos compuestos se degradan rápidamente. Por esta razón se seleccionaron el timol y el cinamaldehído.

- **Breve reseña sobre las propiedades de la β -ciclodextrina**

La β -ciclodextrina tiene una solubilidad en agua de 1,85% a temperatura ambiente, que comparada con la de la α -ciclodextrina y la γ -ciclodextrina es mucho menor (Ver tabla I.1, sección I.2.B). Esto podría

explicarse ya que el grupo hidroxilo 2 de una unidad de glucopiranososa forma una unión de puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo 3 de la siguiente unidad, y en el caso de la β -ciclodextrina estos puentes de hidrógeno forman un anillo secundario completo, fortaleciendo la estructura (Szejtli, 1988).

En cambio, la solubilidad de cada complejo va a depender del compuesto incluido en la cavidad de la ciclodextrina, siendo el valor de la solubilidad del complejo un valor intermedio entre la solubilidad de la ciclodextrina y la del compuesto puro. Entonces, debido a que éste es mucho menos soluble en agua que la β -ciclodextrina, la formación del complejo tiende a aumentar la solubilidad del huésped.

Además del incremento de la solubilidad, se produce una disolución más rápida o una dispersión del huésped mientras se va mezclando con el agua. Las moléculas de ciclodextrina se mantienen intactas y retienen su habilidad para formar complejos en agua.

Como las ciclodextrinas no son solubles en solventes oleosos pueden utilizarse para reemplazar al aceite ya se emplee éste como solvente o diluyente de los sabores.

Las principales ventajas de la β -ciclodextrina respecto a las demás ciclodextrinas son:

- Causa menos irritación que la α -ciclodextrina luego de una inyección intramuscular (Del Valle, 2004).
- Retiene al colesterol (Yamamoto y col., 2005).
- Luego de ser administrada oralmente, solamente pequeñas cantidades (1-2%) son absorbidas en el tracto intestinal superior y además, es metabolizada por bacterias presentes en el colon.

- Es la ciclodextrina que más se ha utilizado en formulaciones farmacéuticas,
 - Es la ciclodextrina que más ha sido estudiada en humanos (Del Valle, 2004).
 - Su bajo costo comercial
-
- **Breve reseña sobre las propiedades de los compuestos de inclusión elegidos**

Timol

El timol, 5-methyl-2-(1-methylethyl) phenol, es uno de los monoterpenos que caracterizan a algunas de las familias Lamiaceae, principalmente a los oréganos (*Origanum* spp.) y los tomillos (*Thymus* spp.). El timol es un compuesto blanco, aromático y cristalino. Se obtiene a partir del aceite del tomillo, en donde según la especie puede llegar a tener una concentración del 40%, y de otros aceites de plantas, pero también puede ser producido sintéticamente. Es soluble en alcohol, grasas y aceites, pero poco soluble en agua. Posee fuertes propiedades antisépticas (Medeiros y col., 2007).

La Figura IV.1 muestra la estructura química desarrollada y tridimensional del timol.

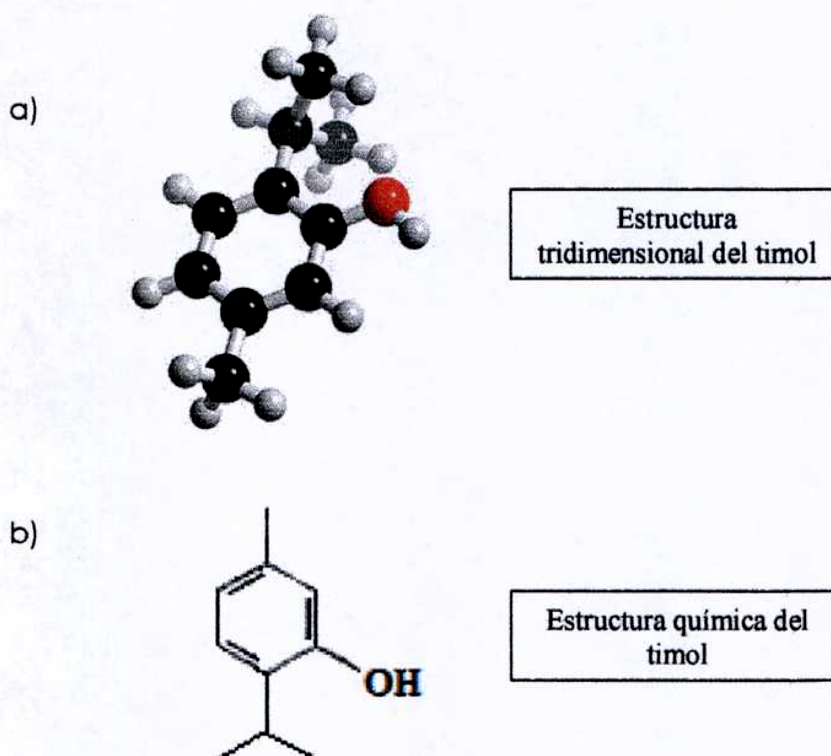


Figura IV.1. Estructura del timol: a) Estructura tridimensional y b) Estructura química.

Ha sido utilizado en industrias aromáticas, para preservar sistemas biológicos y en el área médica, se lo utiliza como fungicida o antiséptico, además de antiespasmódico y antimicrobiano. Por estas razones, es frecuentemente utilizado por dentistas para tratar infecciones orales. En ciertos casos también, se lo ha utilizado como estabilizador de ciertos agentes terapéuticos.

Cosentino y col. (1999) en una investigación sobre aceites esenciales obtenidos de una variedad de tomillo de la región de Sardinia (Italia), determinaron su actividad antimicrobiana frente a un panel de cepas de referencia y cepas múltiples provenientes de alimentos deteriorados, además de bacterias patógenas. Dicha investigación determinó que entre los aceites

esenciales presentes en el tomillo, el timol fue uno de los dos más efectivos frente a las cepas mencionadas. Los resultados de este estudio confirmaron la posibilidad de utilizar los aceites esenciales del tomillo o de algunos de sus componentes, en alimentos procesados. para prevenir el crecimiento de bacterias provenientes de las materias primas usadas y así extender la vida útil de alimentos procesados.

El timol también destruye la viabilidad de fermentos vivos y organizados. En efecto, se ha verificado la capacidad del timol de inhibir el crecimiento de ácaros varroa presentes en colonias de abejas. Debido a que los cristales de timol destruyen las esporas fúngicas, se utilizan también, en la encuadernación, para impedir el ataque de mohos en los libros.

Además de su actividad antimicrobiana, el aceite esencial de tomillo posee propiedades antioxidantes:

- Vardar-Ünlü y col., (2003) verificaron que el aceite esencial del tomillo logró reducir la actividad del radical estable DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y de los radicales del oxígeno (peróxidos de lípidos, superóxidos, y radicales hidroxil). Esta reducción fue debido sobretodo a las fracciones con mayor contenido de timol.
- Youdim y Deans (1999) verificaron que por su actividad antioxidante, la suplementación con aceite de tomillo en la dieta de ratas, permitió mantener niveles altos de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares de varios tejidos de dichos animales.

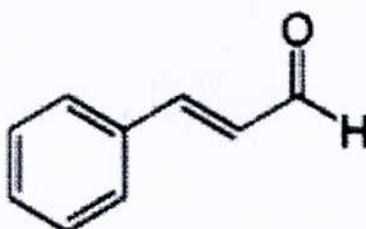
Cinamaldehído

El aldehído cinámico, 3-phenyl-2-propenal, o cinamaldehído es la única forma que es obtenida naturalmente. Se encuentra presente en el aceite de

canela (65-75%) que se obtiene de la corteza de los árboles *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae).

La Figura IV.2 muestra la estructura química desarrollada y tridimensional del timol.

a)



b)

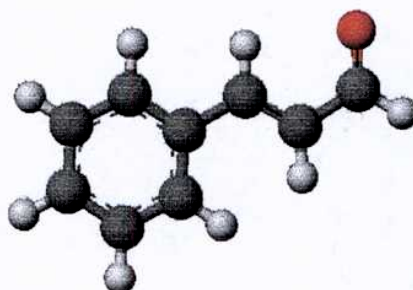


Figura IV.2. Estructura del cinamaldehído: a) Estructura química b) Estructura tridimensional.

Las aplicaciones más importantes de este compuesto se encuentran en la industria aromática y de sabores. En efecto, se utiliza como agente saborizante para productos alimenticios o como agente aromático en productos cosméticos.

El cinamaldehído es un elemento importante en la aromaterapia, y es muy utilizado por la "aromacología", ciencia que se ocupa del estudio de las interrelaciones entre la psicología y la tecnología de las fragancias, tratando de determinar las influencias de los aromas en el comportamiento (Wang y Chen, 2005). Entre sus efectos farmacéuticos se pueden mencionar:

- Calma los cólicos menstruales y espasmos musculares
- Coadyuvante de la digestión
- Ayuda a la pérdida de peso
- Analgésico
- Antidiarreico
- Cura la gripe simple

El cinamaldehído también es utilizado, aunque en menor grado, como fungicida para la agricultura o como insecticida. Se ha verificado su efectividad en casi 40 tipos de cultivos, y se aplica generalmente en las raíces de las plantas con tal fin. Los aceites esenciales de la canela tienen además propiedades antimicrobianas que permiten extender la vida útil de los alimentos. Roller y Seedhar (2002) utilizó el cinamaldehído para reducir la flora bacteriana natural del kiwi, y verificó que poseía una alta efectividad.

En la tabla (Tabla IV.1), se detallan las propiedades fisicoquímicas del timol y del cinamaldehído.

Tabla IV.1. *Propiedades Fisicoquímicas del Timol y del Cinamaldehído.*

	Timol	Cinamaldehído
Nombre Químico	5-methyl-2-(1-methylethyl)phenol	3-phenyl-2-propenal
Fórmula Química	C ₁₀ H ₁₄ O	C ₉ H ₈ O
Masa Molecular	150,22 g/mol	132,1616 g/mol
Densidad	0,96 g/cm ³	1,05 g/ml
Punto de Fusión	48 – 52° C	- 7,05 a -10° C
Punto de Ebullición	232° C	251° C
Solubilidad en Agua	0.08 g/100 ml	0.14 g/100 ml
Solubilidad en Alcohol	2.67 g/ g	

IV.2. MATERIALES

- β -ciclodextrina de Sigma Chemical Co. St Louis MO, EEUU.
- Timol (Carlo Erba Reagenti, Rodano, MI, Italia).
- Cinamaldehído (Carlo Erba Reagenti, Rodano, MI, Italia).
- Sales de Anedra (Argentina) y Mallinckrodt (EEUU)
- Agua destilada.

- Equipos:
 - Agitador Magnético con calefacción – Velp Scientifica (Italia)
 - Freezer
 - Liofilizador. Heto Ioten A/S, con una trampa de enfriamiento modelo CT 110 (Heto Lab equipment, Denmark)
 - Calorímetro diferencial de barrido – Mettler-Toledo modelo 822 (Mettler-Toledo AG, Suiza)
 - Estufa de Vacío (Mettler-Toledo)
 - Desecadores

IV.3. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS

Se prepararon complejos sólidos 1:1 de timol/ β -ciclodextrina y cinamaldehído/ β -ciclodextrina por el método de coprecipitación en medio acuoso (Hedges, 1998; Mulinacci y col., 1996). La Figura IV.3 muestra un esquema de dicho método.

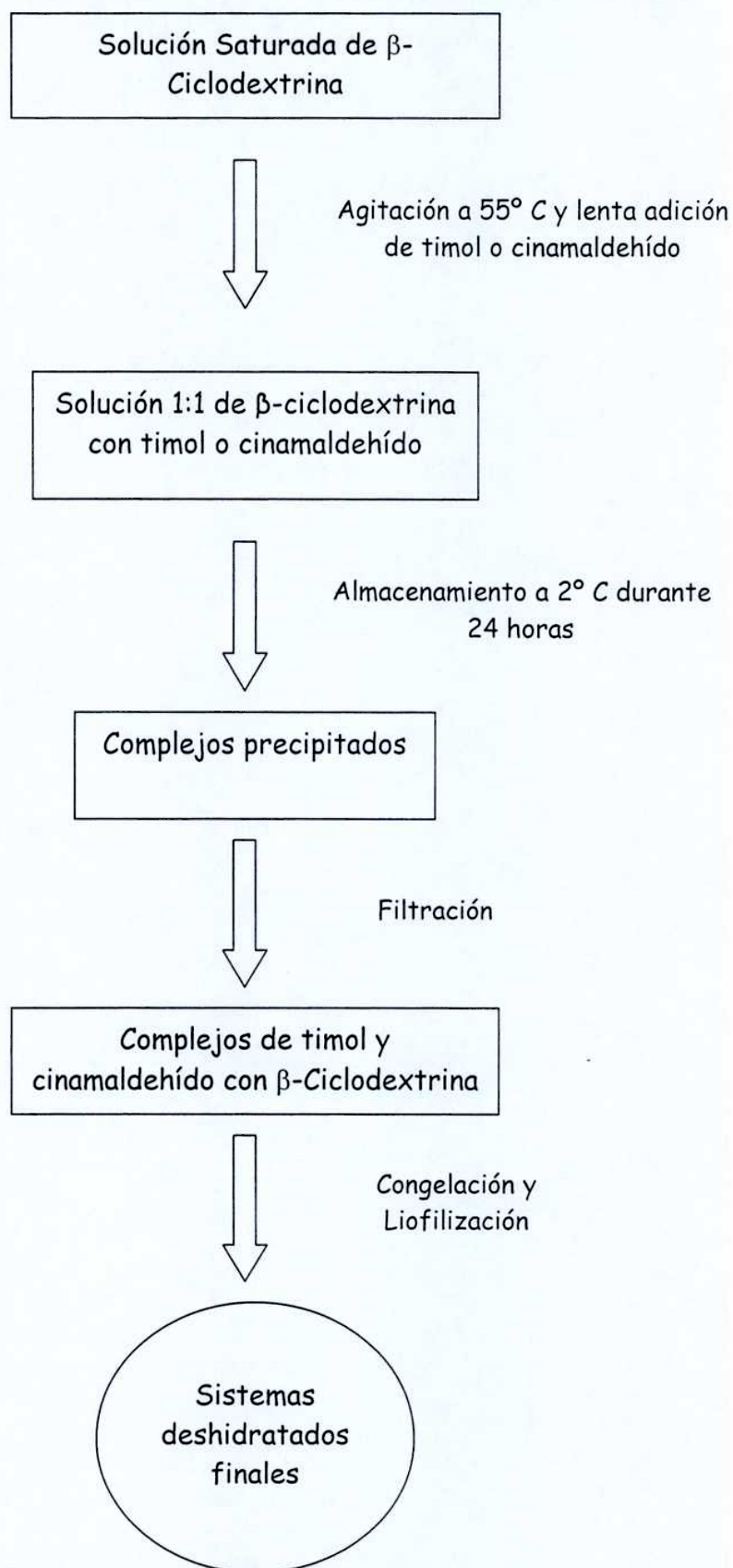


Figura IV.3. Obtención de los complejos sólidos de β -Ciclodextrina (Método de Coprecipitación).

Entonces, para la preparación de los complejos de β -ciclodextrina se procedió de la siguiente manera:

Se preparó una solución saturada de β -ciclodextrina en agua con agitación y calentamiento a 55° C hasta obtener una solución clara y transparente. A continuación, y sin suspender la agitación y el calentamiento, se agregó lentamente la cantidad de timol o cinamaldehído necesaria para obtener un complejo 1:1. Se suspendió el calentamiento, y se enfrió la solución a temperatura ambiente continuándose la agitación durante 4 horas. Inmediatamente, el recipiente conteniendo la solución turbia del complejo en suspensión se almacenó a 2° C durante 24 horas, al cabo de los cuales, el precipitado obtenido se separó de la solución por filtración. El complejo así obtenido se congeló a -26° C durante 24 horas y luego se sumergió en Nitrógeno líquido antes de la liofilización. Se liofilizó en un liofilizador Heto Lab Equipment Cooling Trap modelo CT 110 (Heto Lab Equipment, Dinamarca) que opera a -110° C en la placa condensadora y a una presión de menos de $4 \cdot 10^{-4}$ mbar en la cámara. Al cabo de 48 hs se retiraron los sistemas del liofilizador obteniéndose los sistemas deshidratados.

Los sistemas deshidratados así obtenidos, se pulverizaron con la ayuda de un mortero y se almacenaron en un desecador al vacío sobre MgClO_4 (perclorato de manganeso) hasta su uso.

IV.4. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LOS SISTEMAS (METODOLOGÍA UTILIZADA)

Los sistemas deshidratados obtenidos según la metodología detallada en la sección IV.3 fueron equilibrados a atmósferas de diferentes a_w . A

intervalos de tiempo determinados se tomaron muestras y sobre los mismos se efectuaron las siguientes análisis:

- Isoterma de sorción de agua
- Contenido de agua por gravimetría
- Propiedades térmicas por calorimetría diferencial de barrido (DCS).

En la Figura IV.4 se muestra un diagrama de la metodología usada:

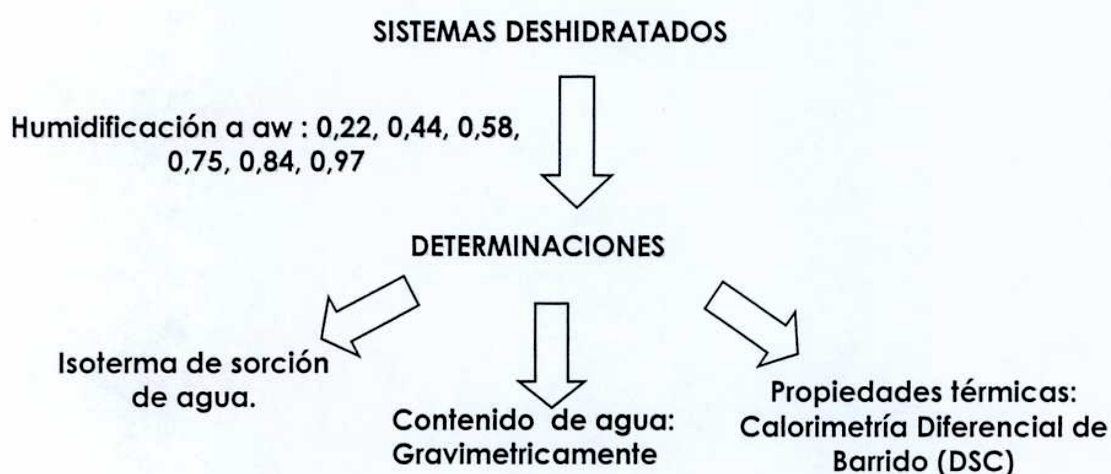


Figura IV.4. Acondicionamiento de los sistemas deshidratados y metodología usada para su análisis.

IV.4.A. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA DE LA β -CICLODEXTRINA Y DE LOS COMPLEJOS

IV.4.A.1. Determinación de la Isoterma de sorción

Las isotermas de sorción de la β -ciclodextrina y de los complejos se determinaron utilizando el método isopiéstico estándar. Para ello, alícuotas de aproximadamente 500 mg de β -ciclodextrina o de los complejos se colocaron en viales de vidrio y se expusieron a atmósferas de actividad de agua (a_w)

cóncstantes en desecadores evacuados y a una temperatura de 25° C. Estas fueron obtenidas mediante el empleo de soluciones salinas saturadas cuyas a_w a diferentes temperatura han sido determinadas (Greenspan, 1977).

En cada desecador se colocaron 100 ml. de solución saturada, con un exceso del 50% de sal para asegurar que la solución permaneciera saturada durante el tiempo de estudio. Esto último se verificó con un higrómetro (AquaLab). Las sales saturadas utilizadas permitieron cubrir el rango de a_w comprendido entre 0,22 y 0,97 y sus valores se detallan en la tabla IV.2.

Tabla IV.2. Sales utilizadas y sus correspondientes valores de actividad de agua (a_w) a 25°C.

a_w	0,22	0,44	0,58	0,75	0,84	0,97
Sal	C ₂ H ₃ KO ₂	K ₂ CO ₃	NaBr	NaCl	KCl	K ₂ SO ₄

Las muestras se pesaron periódicamente, considerándose alcanzado el equilibrio cuando se verificó constancia de peso (diferencias de peso menores a 0,0005 g). El tiempo requerido para esto varió entre 1 a 3 semanas, dependiendo de la a_w utilizada y del sistema.

IV.4.A.2. Determinación del contenido de agua

Una vez que las muestras alcanzaron el equilibrio, éstas se colocaron en una estufa de vacío (Mettler-Toledo) durante 48 horas a 96° C en presencia de perclorato de magnesio como desecante. El contenido de agua de los sistemas se determinó por diferencia de masa antes y después del secado (peso húmedo y peso seco).

Las condiciones utilizadas aseguran una determinación adecuada del contenido de agua en los sistemas bajo estudio (Cardona y col., 1997). Las determinaciones se hicieron por triplicado y el resultado final informado fue un promedio de las mismas. En todos los casos, el contenido de agua se expresó en base seca (g. de Agua/ 100 g. de base seca).

IV.4.A.3. Caracterización de la isoterma

Numerosas ecuaciones empíricas y semiempíricas han sido propuestas para correlacionar la humedad de equilibrio con la a_w de alimentos (Boquet y col., 1978, 1980; van den Berg, 1981).

Sin embargo las más utilizadas son la a la ecuación de de B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller) y la de G.A.B. (Guggenheim-Anderson-de Boer) que es una extensión de la primera para sistemas que presentan adsorción en multicapas.

La ecuación de BET (Ec. IV.1) es una ecuación a dos parámetros que ha sido ampliamente utilizada hasta 1985, en que la comisión de Coloides y Química de superficies de la UIPAC recomendó el uso de la misma para la evaluación de los datos de sorción en el rango de a_w de 0,05 - 0,4. La expresión matemática de dicha ecuación es la siguiente:

$$m = \frac{m_m C_B \cdot a_w}{[(1 - a_w)(1 + (C_B - 1)a_w)]} \quad (\text{IV.1})$$

Donde:

m: contenido de agua del sistema en (g de agua /g de masa seca).

m_m: contenido de agua del sistema adsorbido como una monocapa sobre la superficie del sólido (g de agua /g de masa seca).

C_B: constante relacionada con la energía libre neta de adsorción:

$$C_B = C' \exp \left[\frac{(H_m - H_L)}{RT} \right] \quad (IV.2)$$

Donde:

C' : Constante empírica.

R: Constante de los gases.

T: Temperatura absoluta.

Debido a que C_B pueden variar en rango amplio de valores, la ecuación de BET puede aplicarse a isothermas tipo II y III (Figura I.14, Sección I.6). En efecto, cuando mayor es la pendiente inicial mayor es el valor de C_B, más sigmoidea es la isoterma y la tendencia al comportamiento tipo II. Si bien el ajuste a los datos experimentales sólo ocurre hasta una a_w de 0,4 esto es suficiente para obtener los valores de C_B y m_m (Zhang y Zografí, 2000).

La ecuación de GAB, representa una extensión de la ecuación de BET. Es una ecuación simple que con sólo tres parámetros ha demostrado describir satisfactoriamente los datos experimentales en el rango de actividades de agua de interés práctico (0,1 - 0,9).

Esta ecuación ha sido utilizada ampliamente para describir la sorción de agua de muchos alimentos (Maroulis y col., 1988; Bizot, 1983; Weisser, 1995; Tolaba y col., 2004). Además ha sido recomendada por el European Group,

COST 90, para el estudio de las propiedades físicas de alimentos (Wolf y col., 1985).

La expresión matemática de la ecuación de GAB es:

$$m = \frac{m_m C_G \cdot k \cdot a_w}{[(1 - k a_w)(1 + k C_G - k a_w)]} \quad (\text{IV.3})$$

Donde:

m: contenido de agua del sistema en (g de agua /g de masa seca).

m_m: contenido de agua del sistema adsorbido como una monocapa sobre la superficie del sólido (equivalente a la monocapa de BET).

C_G: constante relacionada con el calor de sorción en la monocapa:

$$C_G = c \exp \left[\frac{(H_m - H_n)}{RT} \right] \quad (\text{IV.4})$$

Donde:

c: constante empírica.

H_m: Calor total de sorción en los sitios primarios de la monocapa.

H_n: Calor total de sorción de la multicapa (diferente al calor de condensación del agua pura).

k: parámetro que corrige la diferencia entre las propiedades del agua en la multicapa respecto a las del agua pura:

$$k = k' \exp \left[\frac{(H_p - H_n)}{RT} \right] \quad (\text{IV.5})$$

k': constante empírica

H_p: Calor de condensación del agua pura.

H_n: Calor total de condensación de la multicapa.

IV.4.B. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES TÉRMICAS DE LOS COMPLEJOS

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se empleó para verificar la formación de los complejos de la β -ciclodextrina con el timol y el cinamaldehído así como para seguir la liberación de los mismos durante el almacenamiento.

La desaparición completa de los picos térmicos correspondientes a los puntos de fusión de las moléculas huéspedes, cuando son examinadas como complejos, es considerada como una prueba real de inclusión (Williams y col., 1998).

La liberación durante el almacenamiento de los compuestos incluidos, se siguió, determinando la entalpía correspondiente a los picos de fusión de los compuestos puros. En el caso del timol, éste se encuentra en el rango de 48 a 50° C y para el cinamaldehído entre -7,5° C a -10° C.

Dichas determinaciones se realizaron utilizando un equipo Mettler DSC 30 con un procesador TA 4000 y un sistema de análisis térmico TA72. El equipo fue calibrado con los puntos de fusión de Indio (156,6° C), plomo (327,5° C) y zinc (419,6° C). Se hicieron análisis por duplicado, utilizando cápsulas de aluminio (Mettler aluminum pan) de 40 μ L herméticamente sellados, conteniendo muestras de entre 5 a 10 mg. Como referencia se utilizó una cápsula vacía pinchada.

Para evitar fenómenos de distorsión observados al comienzo y final del calentamiento o enfriamiento, las determinaciones se realizaron en todos los casos comenzando el barrido por lo menos 30° C por debajo de la

temperatura esperada para el inicio de una dada transición y finalizando por lo menos a una temperatura 10° C mayor.

El rango de temperatura programado fue desde -40° C a 100° C para el complejo de timol- β -ciclodextrina y desde -100° C a 120° C para el complejo de cinamaldehído- β -ciclodextrina. En ambos casos la velocidad de calentamiento fue de 10° C/min.

IV.4.B.1. Determinación de la formación de complejos de Inclusión

La formación de complejos con algunas sustancias se verifica por la desaparición total de la señal endotérmica correspondiente a los picos de fusión de los ligandos puros (Hedges y McBride, 1999). Es así que en este trabajo se realizaron mediciones dinámicas para determinar los puntos de fusión (T_F) y calores de fusión (ΔH_m) de la β -ciclodextrina, timol, cinamaldehído y los complejos de inclusión. El valor de T_m fue tomado como el onset del pico de fusión. Las temperaturas de fusión informadas corresponden a la temperatura del pico endotérmico. Los valores de entalpía de fusión fueron obtenidos calculando el área de la transición endotérmica en relación a la masa de ligando presente en esa muestra.

Antes de medir el complejo recién formado, se determinaron en los termogramas de la β -ciclodextrina, el timol y el cinamaldehído puros. A continuación se determinaron los termogramas de los complejos deshidratados recién formados ($a_w=0$) (timol/ β -ciclodextrina y cinamaldehído/ β -ciclodextrina). La no aparición de los picos de fusión correspondiente a los compuestos puros en dichos termogramas indicaría que los complejos se han formado.

IV.4.B.2. Determinación del ligando libre y estabilidad de los complejos

Una vez que los sistemas alcanzaron el equilibrio a las diferentes a_w a intervalos de tiempo determinados, se extrajeron muestras y se determinó el termograma de las mismas.

Para determinar el porcentaje de ligando liberado (% L) de los complejos almacenadas a diferentes a_w y 25° C, se determinó la relación entre la entalpía de fusión obtenida en forma dinámica luego del almacenamiento (dentro de los complejos) y el valor de la entalpía de fusión del ligando puro medido en las mismas condiciones, utilizado como referencia.

La fórmula entonces, sería la siguiente:

$$\%LIBERADO (\%L) = \frac{\Delta H_s}{\Delta H_o} \quad (IV.6)$$

en donde,

ΔH_s : calor de fusión del timol o del cinamaldehído en los complejos

ΔH_o : calor de fusión del timol o del cinamaldehído puros.

IV.4.C. TRATAMIENTO DE DATOS

El modelado de los datos experimentales y regresiones presentados se realizó utilizando programas provistos por la biblioteca (Graph Pad Prism V4.1), a través de correlación lineal o no lineal, según los casos. Este programa minimiza el cuadrado de la diferencia entre los valores predichos y experimentales.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CAPÍTULO 1. ESTUDIOS DE LAS PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA DE LA β -CICLODEXTRINA Y SUS COMPLEJOS

V.1.A. CINÉTICA DE ABSORCIÓN DE AGUA

La figura V.1.1 muestra el contenido de de agua en función del tiempo para la β -ciclodextrina a 25° C.

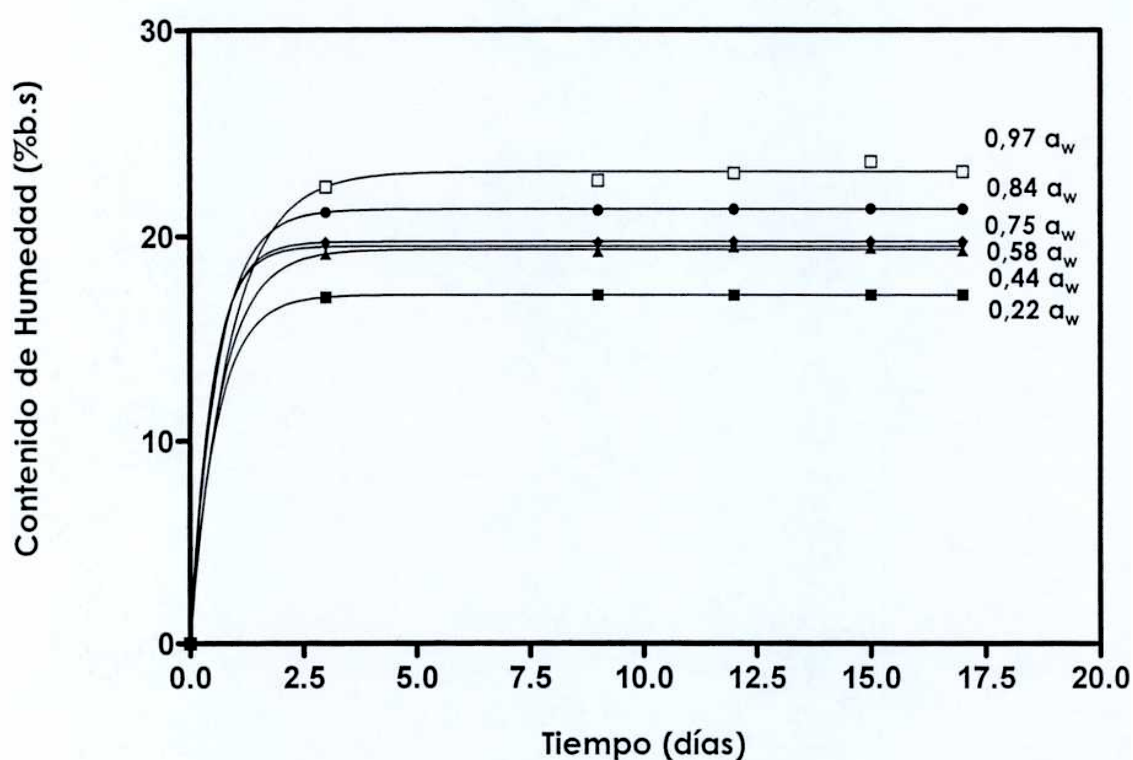


Figura V.1.1 Cinética de absorción de agua de la β -ciclodextrina a 25° C, expuesta a diferentes a_w .

El tiempo necesario para alcanzar el contenido acuoso del equilibrio fue aproximadamente 10 o 12 días para las muestras almacenadas a

actividades de agua comprendidas entre 0,22 a 0,75, mientras que para las muestras almacenadas a 0,84 y 0,97 de a_w dicho tiempo fue de 14 días. Los complejos timol- β -ciclodextrina presentaron un comportamiento similar respecto al tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, sin embargo el contenido de agua del equilibrio a 0,97 fue mucho mayor que el correspondiente a las muestras equilibradas entre 0,22 y 0,75 de a_w (Figura V.1.2).

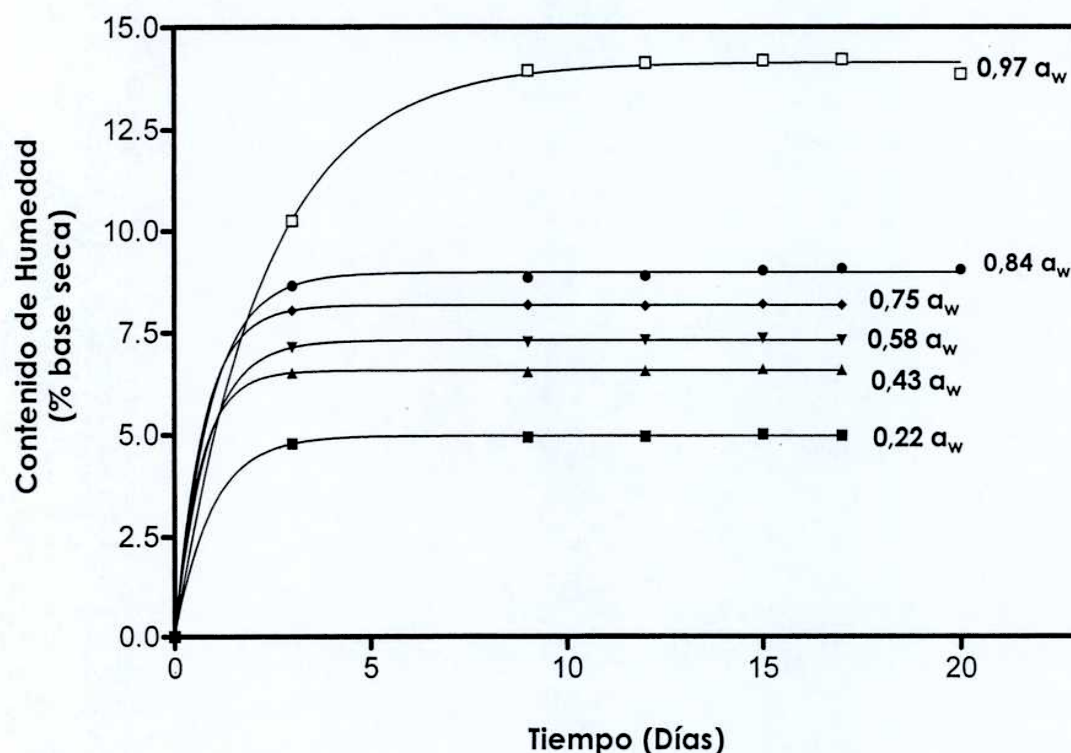


Figura V.1.2 Cinética de Absorción de agua del complejo timol- β -ciclodextrina a una temperatura de 25° C, expuestos a diferentes a_w .

Los complejos cinamaldehído- β -ciclodextrina presentaron un comportamiento totalmente diferente, necesitando mayor tiempo para llegar al equilibrio. En efecto, para las muestras expuestas a actividades de agua de 0,22, 0,44, y 0,58 el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio fue 12 días,

mientras que las muestras expuestas a actividades de agua de 0,75, 0,84 y 0,97 dicho tiempo fue de 16 días (Figura V.1.3). Además los valores del contenido de agua del equilibrio de los complejos cinamaldehído- β -ciclodextrina a cada a_w fueron menores que los correspondientes a los complejos timol- β -ciclodextrina a las mismas a_w (observar Figura V.1.2 y Figura V.1.3).

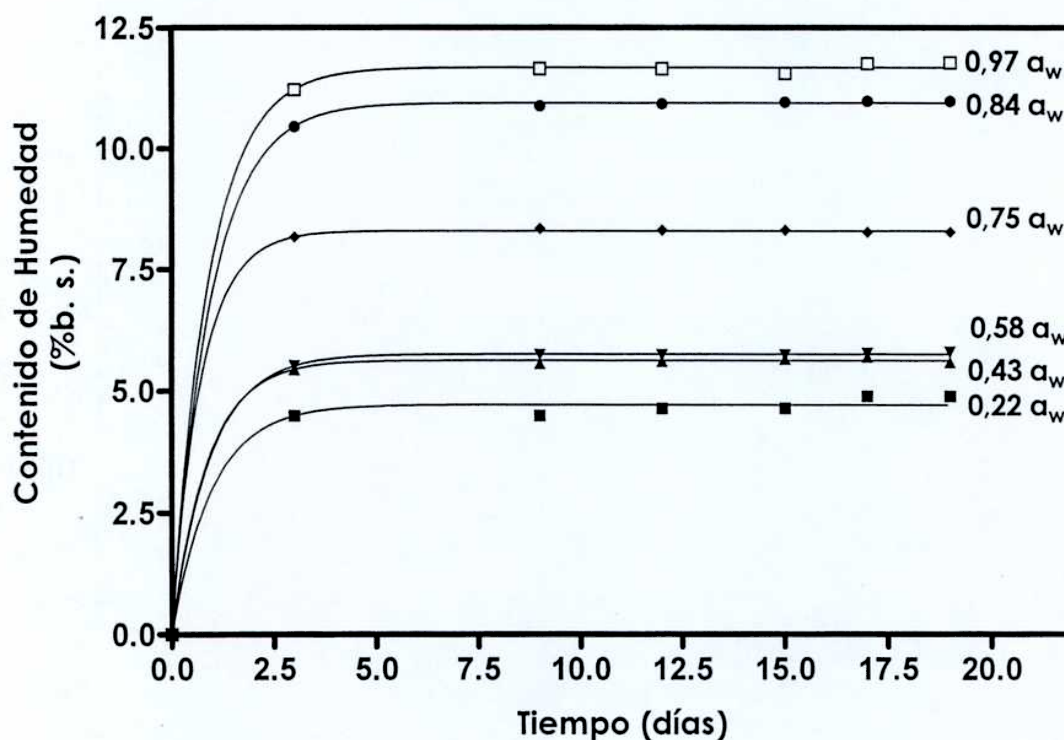


Figura V.1.3 Cinética de Absorción de agua del complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina a 25° C, expuestos a diferentes a_w .

Comparando los tres gráficos obtenidos, se observó que la cantidad de agua absorbida en el equilibrio a cada a_w por ambos complejos fue menor que la correspondiente a la β -ciclodextrina siendo el orden β -ciclodextrina > timol- β -ciclodextrina > cinamaldehído- β -ciclodextrina.

V.1.B. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA DE LA β -CICLODEXTRINA Y LOS COMPLEJOS

Se determinaron las isotermas de sorción de agua de la β -ciclodextrina, y los complejos timol- β -ciclodextrina y cinamaldehído- β -ciclodextrina a 25° C. Los valores del contenido de agua de equilibrio de la β -ciclodextrina, en función de la a_w se encuentran representados en la Figura V.1.4.

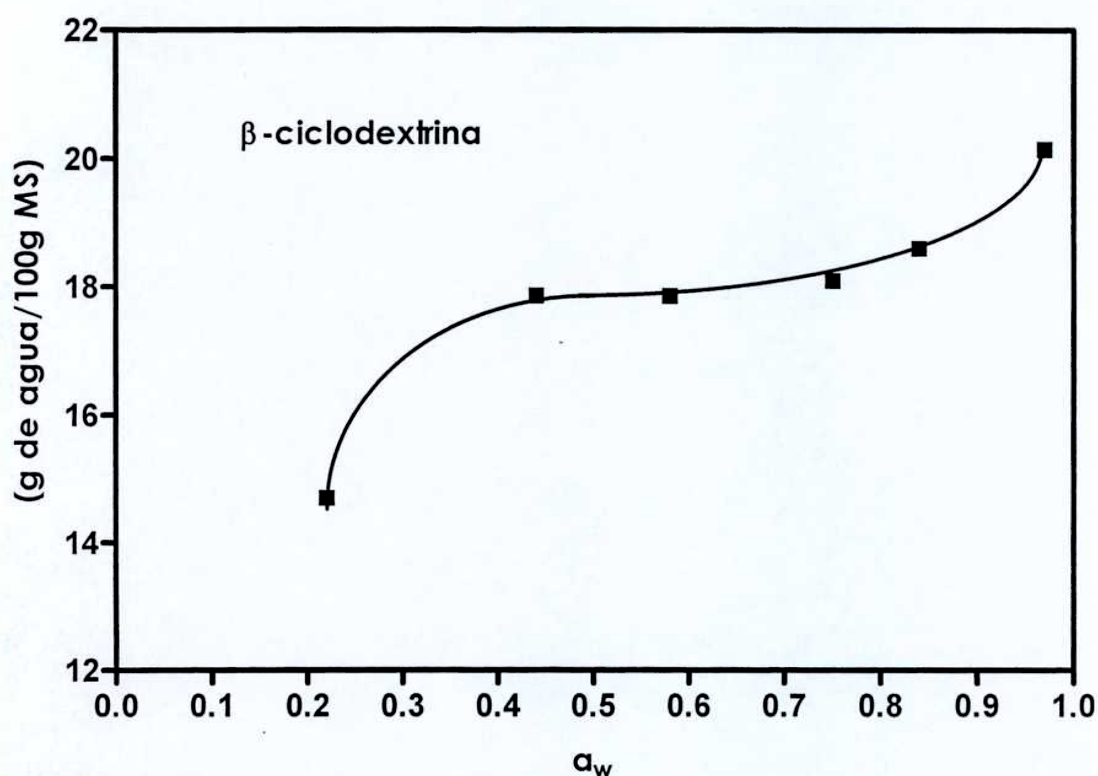


Figura V.1.4. Isoterma de sorción de agua del β -ciclodextrina a 25° C. El contenido de agua se expresó como gramos de H₂O por 100 gramos de masa seca (MS).

Como se puede observar, durante el proceso de sorción el contenido de agua se incrementó constantemente desde 0,11 hasta una a_w de 0,5, seguido de una etapa durante la cual el contenido de humedad permaneció constante hasta que la a_w llegó a 0,75. A continuación, el contenido de humedad se incrementó rápidamente hasta alcanzar un valor

de 21,5 g de agua/100g de MS. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Cserhádi y Forgács, (2003) (Figura V.1.5).

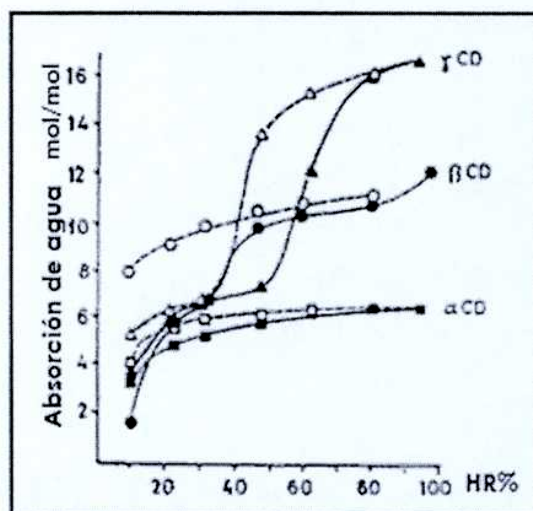


Figura V.1.5. Isotermas de sorción de vapor de agua para α -, β - y γ -ciclodextrinas a 40°C (— absorción, ----- desorción).

Una mayor información de las propiedades de hidratación de la β -ciclodextrina puede obtenerse, expresando el contenido de agua absorbido a cada a_w , como moles de agua por mol de β -ciclodextrina seca (Figura V.1.6).

En efecto, en la misma se puede apreciar que el *plateau* que se observó entre 0,5 y 0,75 de a_w corresponde a un hidrato de 10,5 moles de agua/mol de ciclodextrina y luego la captación de agua aumenta abruptamente para formar un hidrato de aproximadamente 12,5 moles de agua/mol de ciclodextrina.

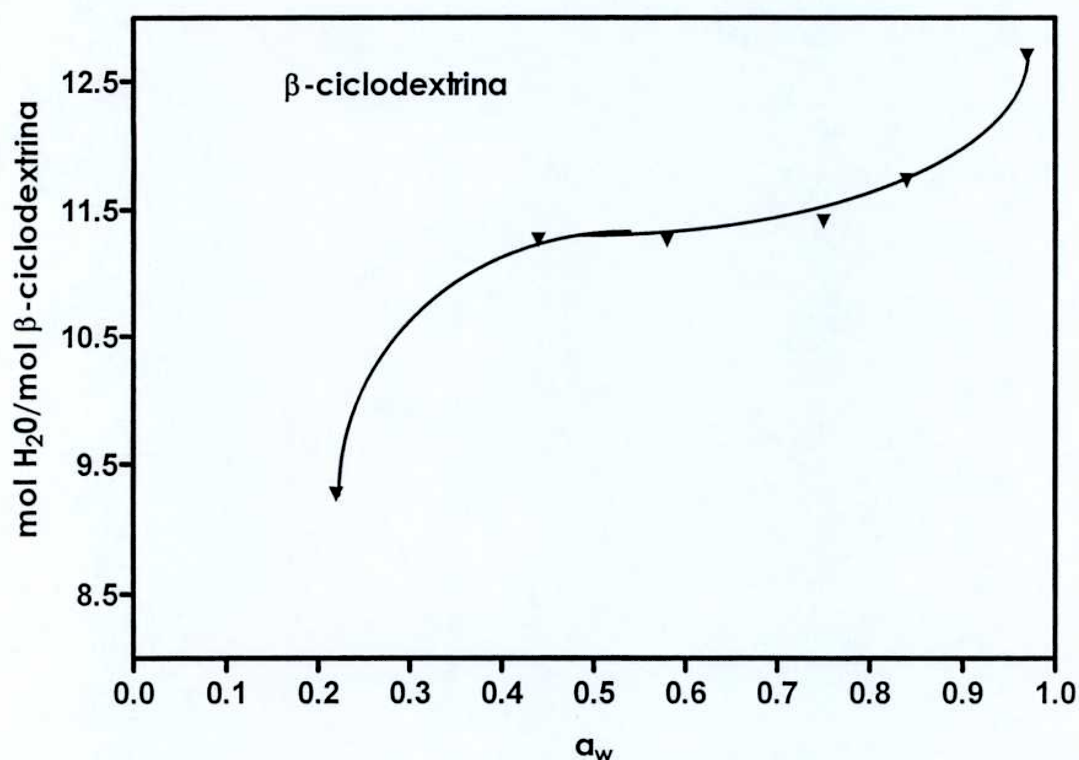


Figura V.1.6 Isotherma de sorción de agua de β -ciclodextrina a 25° C. El contenido de agua se expresó como moles H₂O por mol de β -ciclodextrina seca.

Este comportamiento fue similar al obtenido por otros investigadores. Marini y col, (1995) encontraron que la cantidad de moles de de agua absorbidos por la β -ciclodextrina cambia de una manera continua y reversible de 12,3 a 9,4 moles cuando la a_w varía de 1 a 0,15.

La estructura de los hidratos de la β -ciclodextrina en estado sólido ha sido determinada por diversos métodos. Así, Winkler y col. (2000) por simulación dinámica molecular y Lindner y Saenger (1978, 1982) por medio de estudios cristalográficos, encontraron que la β -ciclodextrina está asociada con 12 moléculas de agua para formar un dodecahidrato. Ambos autores observaron que aproximadamente la mitad de las moléculas de agua se ubican en ocho sitios específicos de la cavidad y el resto se distribuye en otros ocho sitios (entre la superficie y los intersticios de las ciclodextrinas). Es así que

6,5 moléculas de agua estarían ubicadas en estos sitios específicos dentro de la cavidad y las 5,5 moléculas restantes estarían distribuidas en la superficie de la molécula de la β -ciclodextrina (Figura V.1.7). Este tipo particular de distribución de las moléculas de agua dentro de la cavidad determina que la β -ciclodextrina presente simetría en su forma hidratada (Connors, 1997).

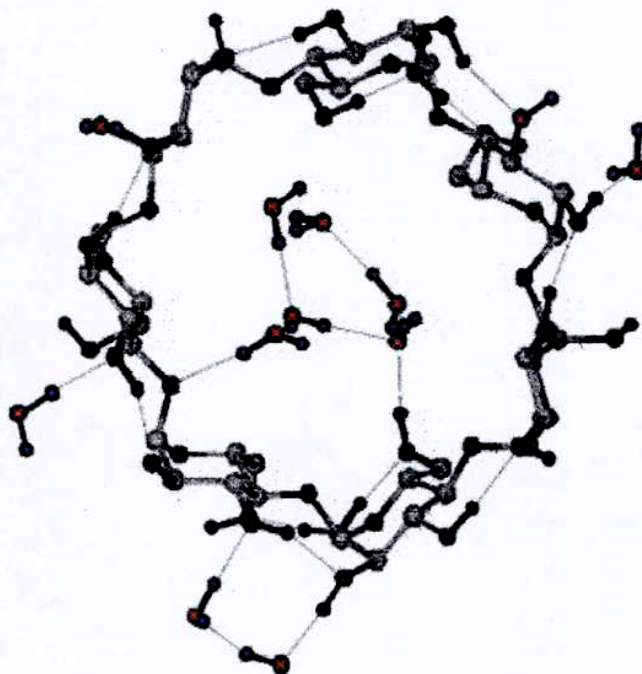


Figura V.1.7. Configuración de una β -CD+12H₂O obtenida por datos de difracción de neutrón a 120° K. Los puentes de Hidrógeno están representados por líneas punteadas (Tomado de Winkler y col, 2000).

Por otra parte, Fujiwara y col. (1983) hallaron una nueva forma de hidrato, en el cual 11 moléculas de agua se encontrarían asociadas con una molécula de β -ciclodextrina.

Como resultado de estos estudios, los autores concluyeron que las moléculas de agua dentro de la β -ciclodextrina están en estado "activo" y podrían ser fácilmente removidas por ligandos capaces de formar complejos con las ciclodextrinas (moléculas más hidrofóbicas que el agua).

Comparando estos últimos resultados con los obtenidos por Marini y col., (1995) puede concluirse que la etapa de deshidratación desde 1 a 0,15 de a_w involucra casi exclusivamente parte de las 7 moléculas de agua ubicadas dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina.

En la Figura V.1.8 se muestran las isothermas de sorción de agua de los complejos de timol- β -ciclodextrina y cinamaldehído- β -ciclodextrina. Se pueden observar que ambas isothermas presentaron un perfil de sorción similar al de la β -ciclodextrinas. Sin embargo a pesar que presentaron el mismo perfil trifásico, la cantidad total de agua absorbida fue menor.

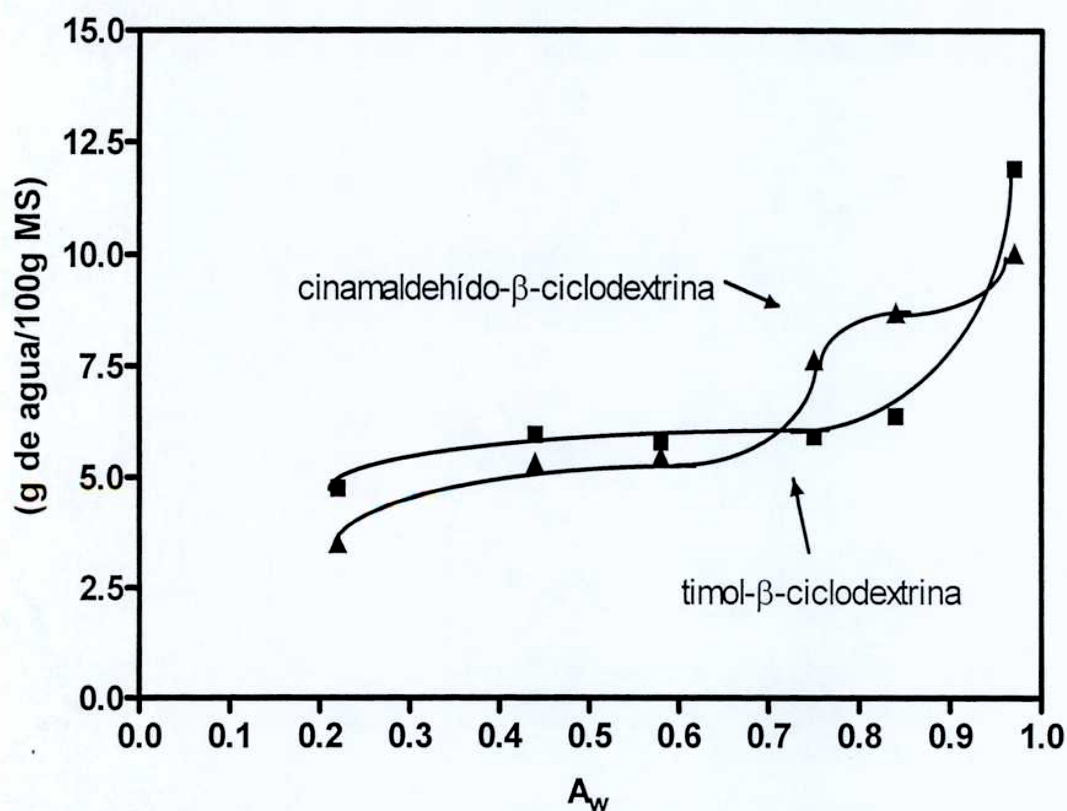


Figura V.1.8. Isothermas de sorción de agua de los complejos de timol- β -ciclodextrina y cinamaldehído- β -ciclodextrina a 25° C.

Esta diferencia se evidencia en forma más nítida, si se expresa el contenido de agua absorbido a cada a_w , como moles de agua por mol de complejo seco (Figura V.1.9).

En efecto como puede observarse en la Figura V.1.9 estos complejos formaron hidratos con 7 o 8,5 moles de agua con cinamaldehído y timol respectivamente. Estos resultados indican que el mecanismo de formación de los complejos involucra el desplazamiento de las moléculas de agua de la cavidad de la β -ciclodextrina, por el huésped que se incluye. Además, confirman, que las moléculas de agua dentro de la β -ciclodextrina están en estado "activo" y pueden ser fácilmente removidas por compuestos, con el tamaño e hidrofobicidad adecuados para ocupar la cavidad interior de la β -ciclodextrina, (tales como el timol y el cinamaldehído) y así formar complejos con las ciclodextrinas (moléculas más hidrofóbicas que el agua).

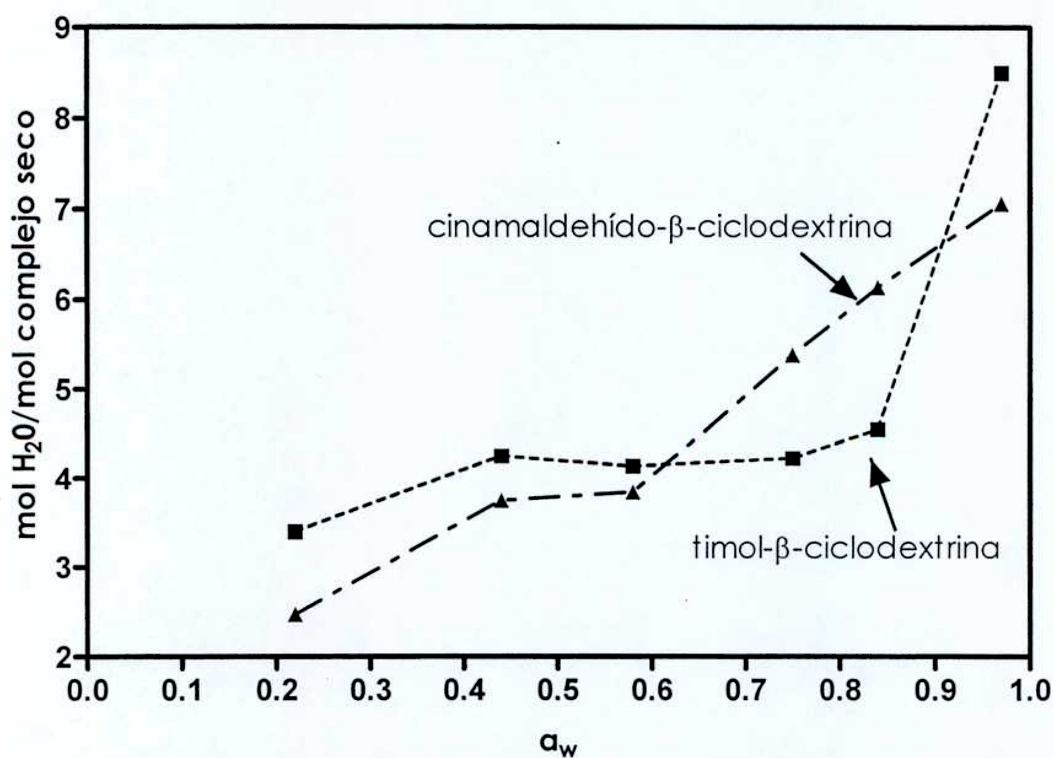


Figura V.1.9. Isotermas de sorción de agua de los complejos timol- β -ciclodextrina- y cinamaldehído- β -ciclodextrina a 25° (el contenido de agua se expresa como moles H_2O por mol de complejo seco).

V.1.C. CARACTERIZACIÓN DE LA ISOTERMA

Como fue mencionado en el capítulo anterior (Materiales y Métodos), para correlacionar el contenido de humedad de equilibrio con la actividad de agua de un alimento se han propuesto varias ecuaciones empíricas y semiempíricas. Sin embargo las más utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica, han sido las ecuaciones de BET (Brunauer-Emett-Teller) y GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer).

Debido a que la ecuación de BET sólo es aplicable hasta una a_w de 0.4 y dado que nuestro estudio cubre un rango de a_w de 0,22 a 0,97, la caracterización de las isotermas de sorción se efectuó por medio de la ecuación de GAB (ecuación IV.3 de Materiales y Métodos).

$$m = \frac{m_m C_G . k . a_w}{[(1 - k a_w)(1 + k C_G - k a_w)]} \quad (\text{IV.3})$$

Los valores de los parámetros de la ecuación de GAB (m_m , C_G y k), cuyo significado fue explicado en la sección IV.4.A.3 de Materiales y Métodos, fueron estimados aplicando a los datos experimentales, un programa de regresión no lineal (Graph Pad V4.1) que minimiza la suma residual de cuadrados.

En la Tabla V.1.1 se muestran los valores del contenido de agua de la monocapa (m_m), y las constantes C_G y k con sus correspondientes desviaciones estándar (σ) y coeficientes de correlación (R^2).

Tabla V.1.1. Valores del contenido de agua de la monocapa (m_m), las constantes C_G y k de la ecuación IV, sus correspondientes desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de correlación (R^2).

Sistema	$m_m \pm \sigma_{m_m}$ (g H ₂ O/g MS*)%	$C_G \pm \sigma_{C_G}$	$k \pm \sigma_k$	R^2
β -ciclodextrina	$15,5 \pm 0,6$	$(8,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$0,36 \pm 0,05$	0,984
Cinamaldehído- β -ciclodextrina	$4,9 \pm 1,1$	$7,5 \pm 5$	$0,65 \pm 0,11$	0,977
Timol- β -ciclodextrina	$2,9 \pm 0,2$	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$0,80 \pm 0,04$	0,909

* MS (masa seca)

Los valores de los coeficientes de correlación (R^2) y la desviación estándar (σ) indican que el modelo de GAB describió aceptablemente el contenido de humedad de equilibrio de la β -ciclodextrina y de los complejos timol- β -ciclodextrina y cinamaldehído- β -ciclodextrina. En efecto los valores de R^2 fueron en todos los casos $\geq$ a 0,90 y el error porcentual de todos los parámetros fue $\leq$ 17 % excepto para el parámetro C_G correspondiente al complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina (Tabla V.1.1). Dicha habilidad también puede corroborarse en la Figura V.1.10 donde se observa un buen ajuste entre los valores experimentales y los predichos por la ecuación de GAB.

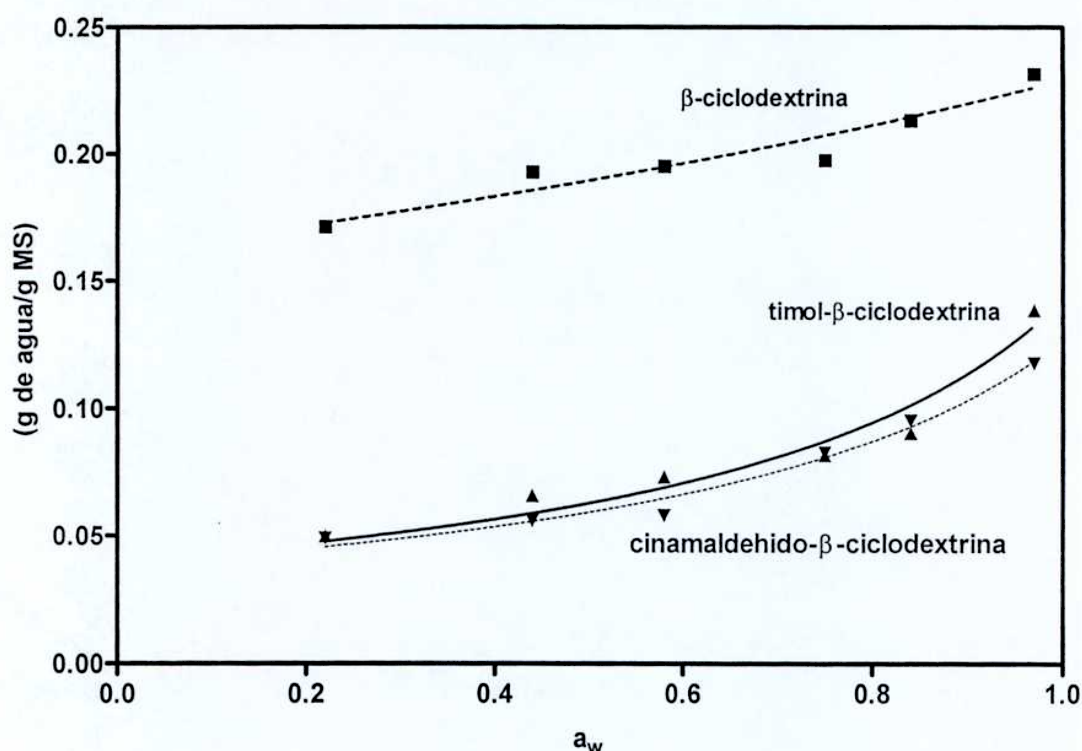


Figura V.1.10. Comparación del contenido de agua en el equilibrio predichos por la ecuación de GAB con los valores experimentales para la β -ciclodextrina y los complejos timol- β -ciclodextrina y cinamaldehído- β -ciclodextrina a 25° C. Los símbolos representan los valores experimentales y las líneas los calculados por la ecuación de GAB.

Los valores de k fueron todos < 1 tal como ocurre para muchos productos alimenticios y farmacéuticos (Weiser, 1995; Tolaba y col., 2004).

Los valores de monocapa calculados fueron en el orden: m_m de la β -ciclodextrina $> m_m$ del complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina $> m_m$ del complejo timol- β -ciclodextrina. Este orden coincide con el número de moléculas de H_2O presentes en la estructura de sus hidratos respectivos (sección V.1.B). Además, puede observarse que el valor de m_m de la β -ciclodextrina fue 3 y 5 veces mayor en magnitud que los correspondientes a los complejos de cinamaldehído y timol respectivamente. Esto sería una evidencia más que la formación del complejo implica el desplazamiento de

moléculas de agua de la cavidad de la β -ciclodextrina por el compuesto incluido.

A partir del valor de monocapa se determinaron las áreas de adsorción de la β -ciclodextrina y de los complejos. El conocimiento de este parámetro es importante ya que permite evaluar la naturaleza de las uniones involucradas en la interacción de un dado material con el agua y proporciona información sobre la microestructura del mismo. Dicha área (A) fue determinada como (Gregg y Sing, 1982):

$$A = \frac{N \cdot a_{H_2O} \cdot m_m}{M} = 3,5 \times 10^6 m_m \quad (V.1.1)$$

Donde:

N= Número de Avogadro (6×10^{26} moléculas/ k mol)

a_{H_2O} = área de una molécula de agua ($10,6 \times 10^{-30}$ m²)

M= Peso molecular del H₂O (18kg/kmol).

Los valores de A obtenidos aplicando la ecuación V.1.1 fueron: 542,5, 175,5 y 101,5 m²/g para la β -ciclodextrina, el complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina y el complejo timol- β -ciclodextrina respectivamente. Estos valores fueron del mismo orden de magnitud que los obtenidos por otros investigadores (Aguerre y col., 1989; Tolaba y col., 2004) para otro tipo de materiales, como los almidones de cereales. Además, los resultados obtenidos indican que la formación de los complejos produce una disminución significativa en la superficie total disponible para interacciones hidrofílicas respecto a la de la β -ciclodextrina y que la magnitud de la misma depende de la naturaleza del compuesto incluido.

La entalpía neta de adsorción fue estimada utilizando la ecuación IV.4 de Materiales y Métodos.

$$C_G = c \exp\left[\frac{(H_m - H_n)}{RT}\right] \quad (IV.4)$$

A partir de la misma y considerando para la constante c un valor de 1 resulta:

$$\ln(C_G) \times R.T = (H_m - H_n) \quad (V.1.2)$$

Si se reemplaza R y T por sus valores numéricos resulta:

$$\ln(C_G) \cdot 298K \cdot 8,314 \frac{J}{K.mol} = (H_m - H_n) \quad (V.1.3)$$

Los valores estimados de la entalpía neta de adsorción aplicando la ecuación V.1.3 fueron: 34, 5, 4,97 y 31 kJ/mol para la β -ciclodextrina, el complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina y el complejo timol- β -ciclodextrina respectivamente. Estos valores fueron del mismo orden de magnitud que los obtenidos por Bilal y col., (1994) que determinó, utilizando un calorímetro, el calor de disolución de muestras de β -ciclodextrina conteniendo diferente cantidad de moles de H_2O /mol de ciclodextrina.

En conclusión la ecuación de GAB describió aceptablemente las isothermas de adsorción de la β -ciclodextrina y de los complejos. A partir de la misma se estimaron los valores del contenido de agua de la monocapa (m_n), el área específica de adsorción y las entalpías netas de de adsorción. Los valores obtenidos de dichos parámetros fueron coincidentes con los hallados por otros investigadores.

V. CAPÍTULO 2. PROPIEDADES TERMOFÍSICAS DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

V.2.A. CONFIRMACIÓN DE LA FORMACIÓN LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Para verificar la formación de los complejos de inclusión del timol y el cinamaldehído con la β -ciclodextrina, obtenidos por el método de coprecipitación (sección IV.3 de Materiales y Métodos) se utilizó la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), tal como se señaló en la sección IV.4.B.1 del mismo capítulo. Este método además de ser una determinación rápida y accesible, ha sido recomendado en particular, para los complejos de inclusión de la β -ciclodextrina (Williams y col., 1998).

Es importante reiterar que en los termogramas, las cristalizaciones aparecen como picos exotérmicos y las fusiones, como picos endotérmicos por lo cual la desaparición completa de los picos térmicos correspondientes a los puntos de fusión de las moléculas huéspedes, cuando son examinadas como complejos, se considera una prueba fehaciente de la inclusión (formación del complejo)

De esta manera, se determinaron en primer lugar los termogramas de las sustancias puras:

- a) el cinamaldehído puro
- b) el timol puro
- c) la β -ciclodextrina

En la Figura V.2.1 se muestra el termograma del cinamaldehído puro. A temperatura ambiente el timol se encuentra en estado líquido y durante el proceso de enfriamiento hasta -100°C cristaliza. Entonces, luego durante el

calentamiento de -100 a 120 °C se observó en primer termino un pico de cristalización (exotérmico) a -28 °C seguido de un pico de fusión a una temperatura aproximada de -10 °C. Estos valores son similares a los hallados por otros investigadores (Carlotti y col., 2007) .

La Figura V.2.2 muestra el termograma obtenido para el timol puro. En el mismo se observó un pico endotérmico en un rango de temperatura de 48 a 52 °C. Mourtzinos y col., 2008 encontraron un valor similar en un estudio sobre la estabilidad de monoterpenos encapsulados en β -ciclodextrina y matrices de almidón.

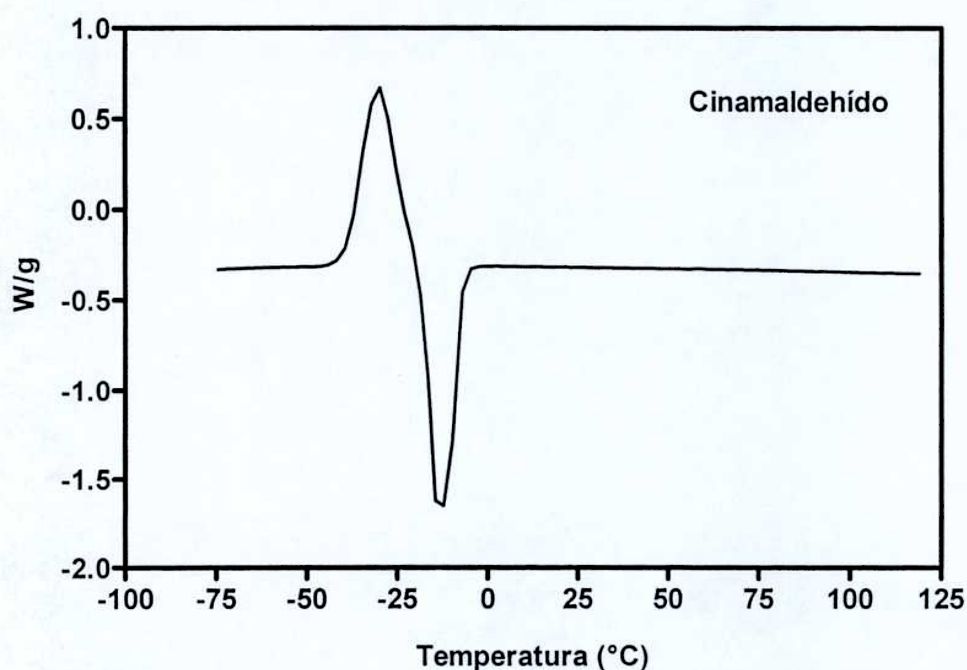


Figura V.2.1. Termograma obtenido por DSC del cinamaldehído puro.

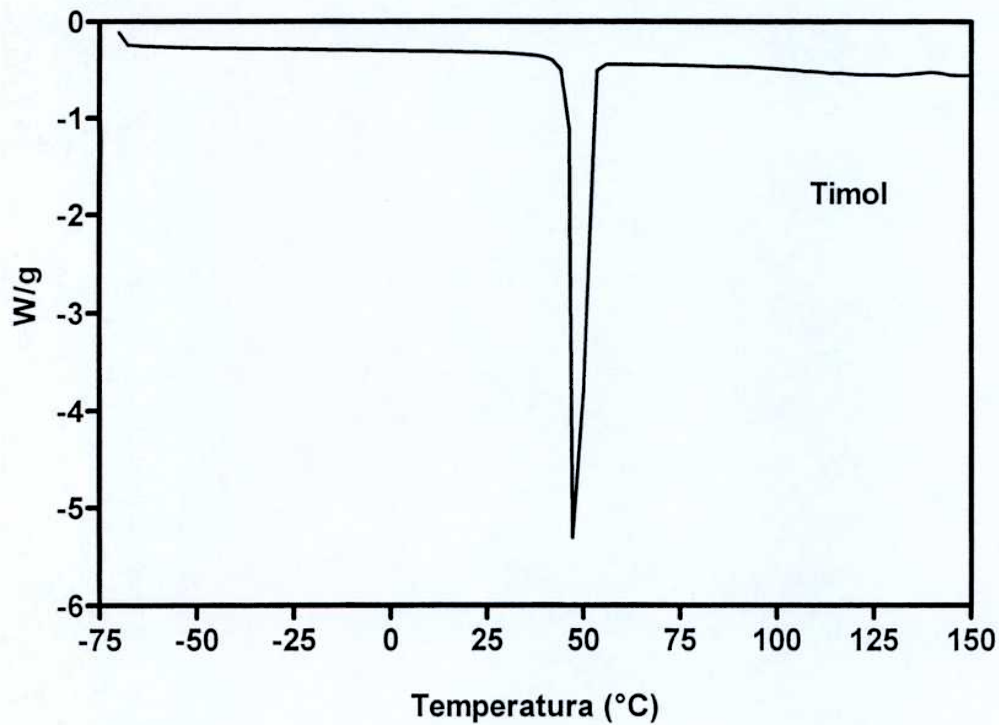


Figura V.2.2. Termograma obtenido por DSC del timol puro.

El termograma de la β -ciclodextrina pura presentó un pico endotérmico que se inicia a alrededor de 120° C debido posiblemente a la eliminación del agua de solvatación (Hedges, y McBride, 1999; Giordano y col., 2001).

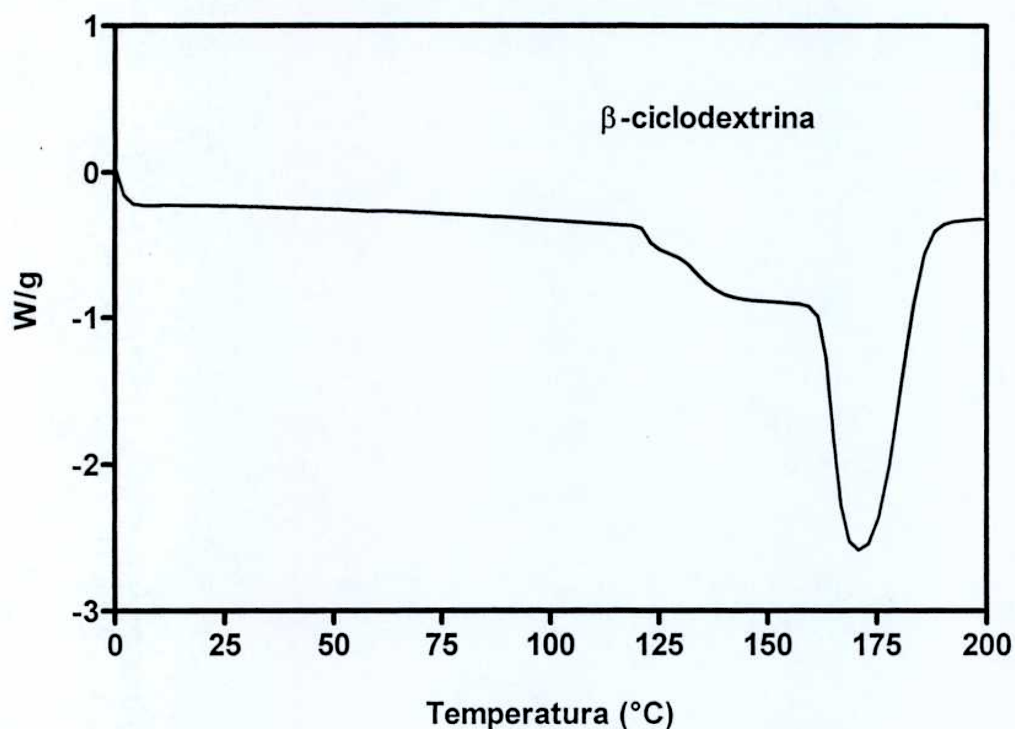


Figura V.2.3. Termograma obtenido por DSC de la β -ciclodextrina pura.

Obtenidos los termogramas de las sustancias puras, se procedió a determinar los termograma de los complejos deshidratados recién formados ($a_w=0$):

- d) el complejo de inclusión de la β -ciclodextrina con el timol
- e) el complejo de inclusión de la β -ciclodextrina con el cinamaldehído.

En las figuras V.2.4 y V.2.5 se muestran los termogramas de ambos complejos obtenidos por DSC. Al comparar dichos termogramas con los correspondientes a los de su respectivo compuesto puro (Figuras V.2.1 y V.2.2) se observó la desaparición completa de los picos de fusión característicos del timol (50 $^{\circ}\text{C}$) y del cinamaldehído a -10 $^{\circ}\text{C}$.

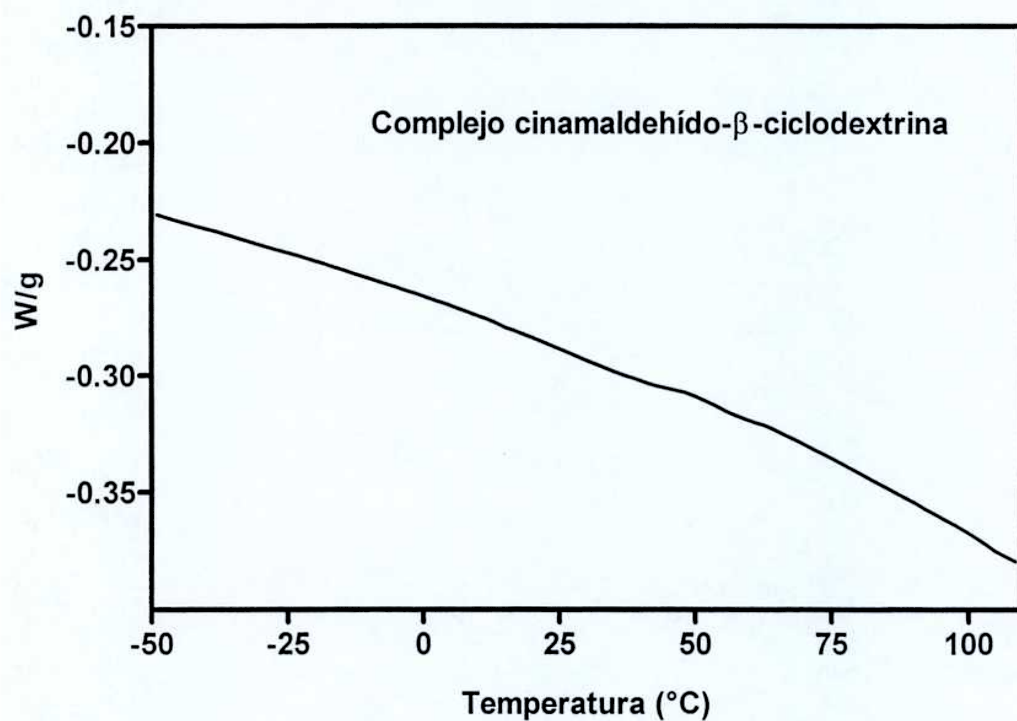


Figura V.2.4. Termograma del complejo de cinamaldehído-β-ciclodextrina deshidratado.

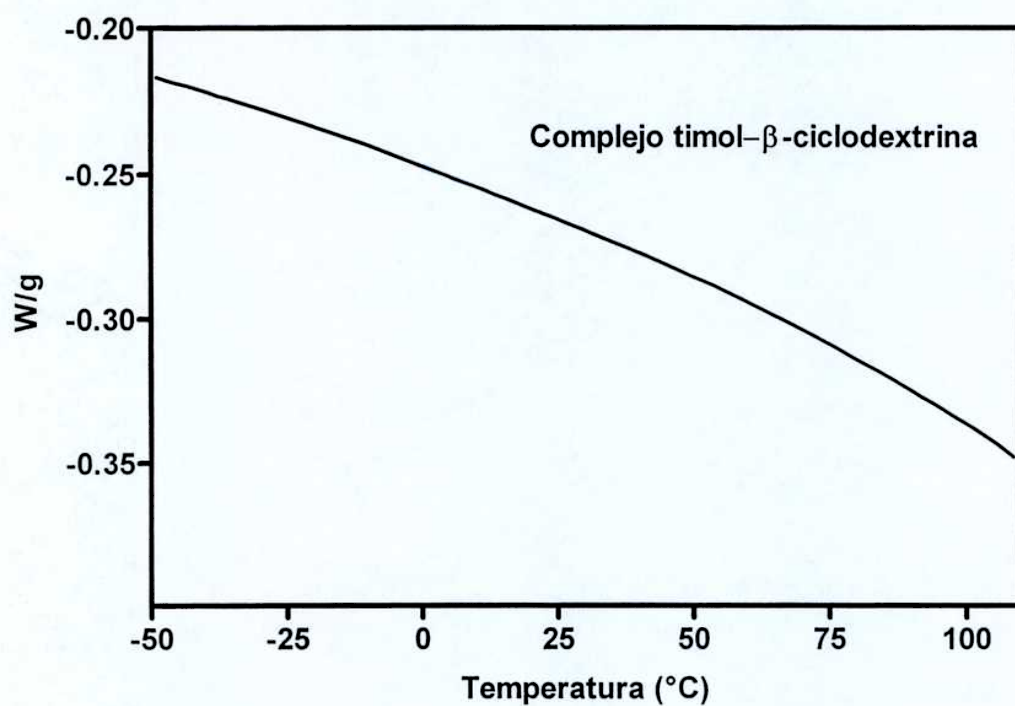


Figura V.2.5. Termograma del complejo de timol-β-ciclodextrina deshidratado.

Estos resultados son una fuerte evidencia que los complejos de inclusión se han formado. En efecto, Williams y col. (1998); Ribeiro y col. (2003) y Pinto y col. (2005) han considerado que la desaparición completa de los picos térmicos de las moléculas huéspedes, cuando son examinadas como complejos, puede ser considerada como una prueba real de inclusión y que esta técnica puede utilizarse como rutina con tal fin.

V.2.B. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD

Los sabores encapsulados son generalmente almacenados por un extenso período de tiempo antes de su incorporación a productos farmacéuticos, cosméticos o alimentos. Entonces, es importante determinar además de la eficiencia de encapsulación (cantidad inicial de la molécula huésped encapsulada en la cavidad de la β -ciclodextrina) la cantidad retenida durante el almacenamiento bajo diferentes condiciones externas (temperatura, humedad, luz, oxígeno, etc.).

Con ese objetivo los complejos deshidratados obtenidos de acuerdo a la metodología descrita en la Figura IV.3 (Materiales y Métodos) fueron equilibrados a atmósferas de diferentes a_w y 25° C. A intervalos de tiempo determinados se tomaron muestras y se determinó el termograma de los complejos por DSC (sección IV.4.B.1 de Materiales y Métodos). Dicho análisis permitió determinar si el timol y cinamaldehído continuaban encapsulados.

Dicho estudio reveló, que la cantidad de timol y de cinamaldehído liberada de sus respectivos complejos de inclusión fue función de la a_w y del tiempo de almacenamiento.

Se observó que a una $a_w < 0,84$, el timol y el cinamaldehído no fueron liberados de sus respectivos complejos de inclusión, durante 84 días de almacenamiento.

En la Figura V.2.6 y Figura V.2.7 se muestran los termogramas de complejos de timol- β -ciclodextrina y cinamaldehído- β -ciclodextrina respectivamente. En las mismas se muestran, a modo de ejemplo, los termogramas correspondientes a dichos complejos desde una a_w de 0,22 a 0,75 y luego de 90 días de almacenamiento. La no aparición, en los termogramas, de los picos de fusión característicos del timol y cinamaldehído que a $a_w < 0,84$ permite afirmar que bajo dichas condiciones de almacenamiento los complejos fueron estables.

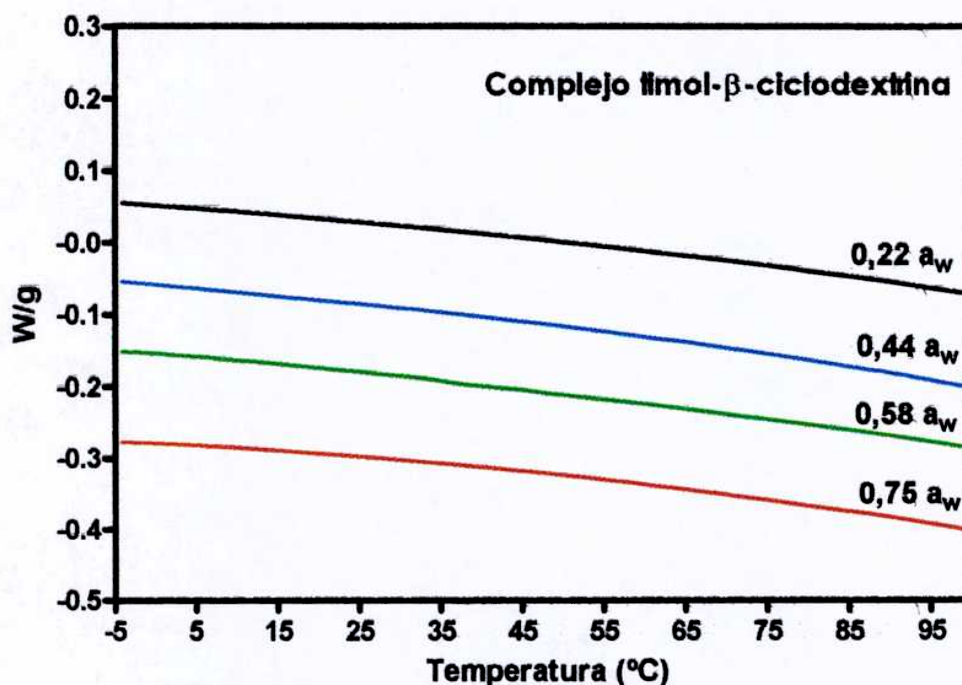


Figura V.2.6. Termogramas obtenidos por DSC del complejo timol- β -ciclodextrina a diferentes a_w y después de 90 días de almacenamiento.

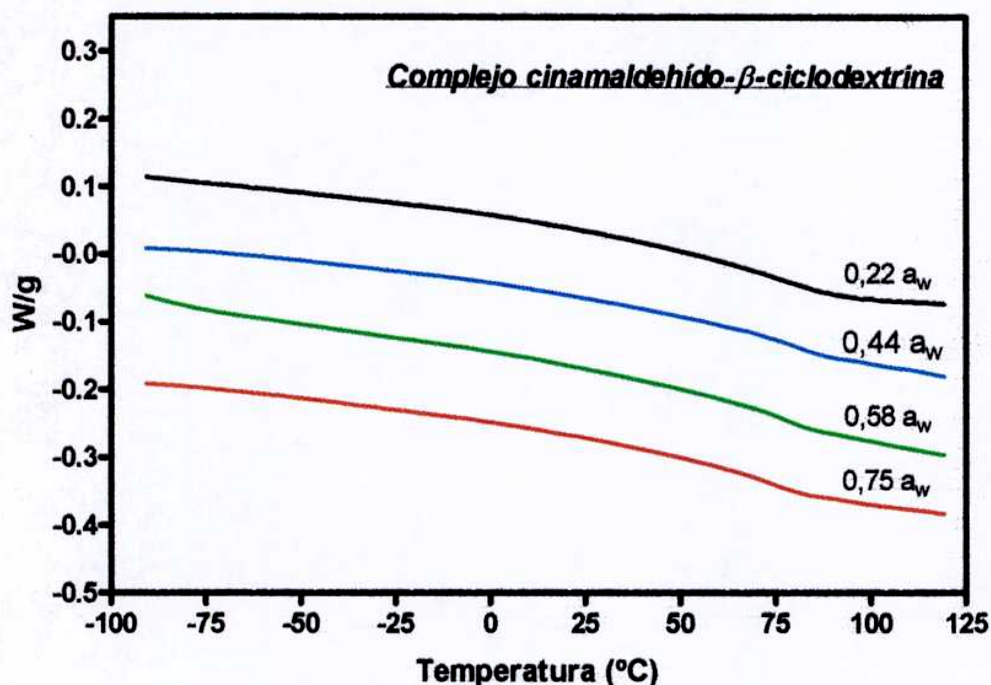


Figura V.2.7. Termogramas obtenidos por DSC del complejo cinamaldehído-β-ciclodextrina a diferentes a_w y después de 90 días de almacenamiento.

Sin embargo, a a_w de 0,84 y de 0,97 se observó una variación considerable en la estabilidad de ambos complejos.

En efecto en la las Figuras V.2.8 y V.2.9 se muestran los termogramas correspondientes al complejo timol-β-ciclodextrina a a_w de 0,84 y de 0,97 respectivamente y a distintos tiempos de almacenamiento. A 0,84 de a_w el complejo fue estable hasta los 90 días de almacenamiento en que se observó un pequeño pico de fusión a aproximadamente 15° C. A 0,97, la liberación del timol se observó ya a partir de los 23 días y se incrementó al aumentar el tiempo de almacenamiento (Figura V.2.9). Además, puedo observarse que el pico de fusión del timol se corrió a menor temperatura.

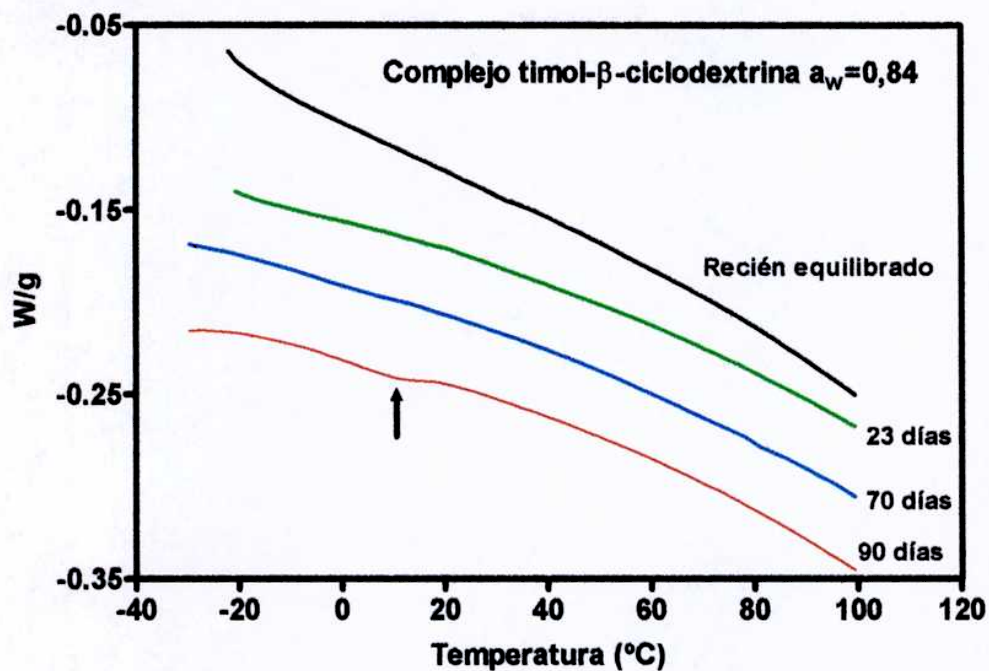


Figura V.2.8. Termogramas obtenidos por DSC del complejo timol-β-ciclodextrina a 0,84 de a_w y a distintos tiempos de almacenamiento.

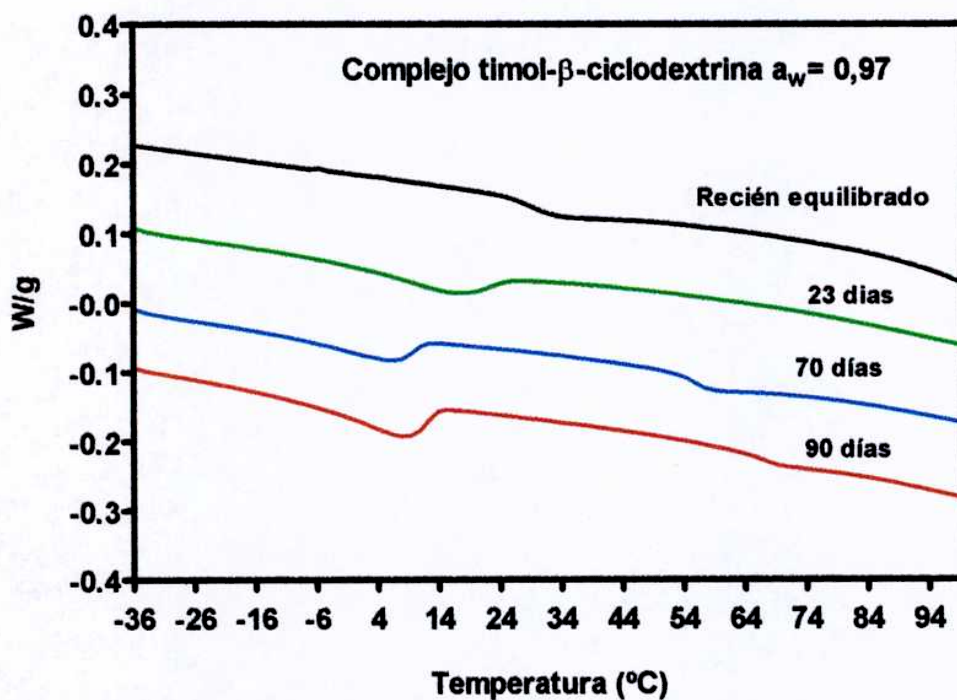


Figura V.2.9. Termogramas obtenidos por DSC del complejo timol-β-ciclodextrina a 0,97 de a_w y a distintos tiempos de almacenamiento.

El complejo de cinamaldehído- β -ciclodextrina presentó un comportamiento similar, con algunas diferencias. En las Figuras V.2.10 y V.2.11 se muestran los termogramas de dicho complejo a 0,84 y de 0,97 de a_w respectivamente.

Dicho complejo a 0,84 de a_w fue menos estable que el de timol- β -ciclodextrina, ya que la liberación del cinamaldehído se inició a los 23 días y se incrementó con el tiempo de almacenamiento (Figura V.2.10).

A 0,97 de a_w , por el contrario el complejo fue estable hasta los 90 días de almacenamiento, en el que la liberación del cinamaldehído se inicia en manera abrupta (Figura V.2.11).

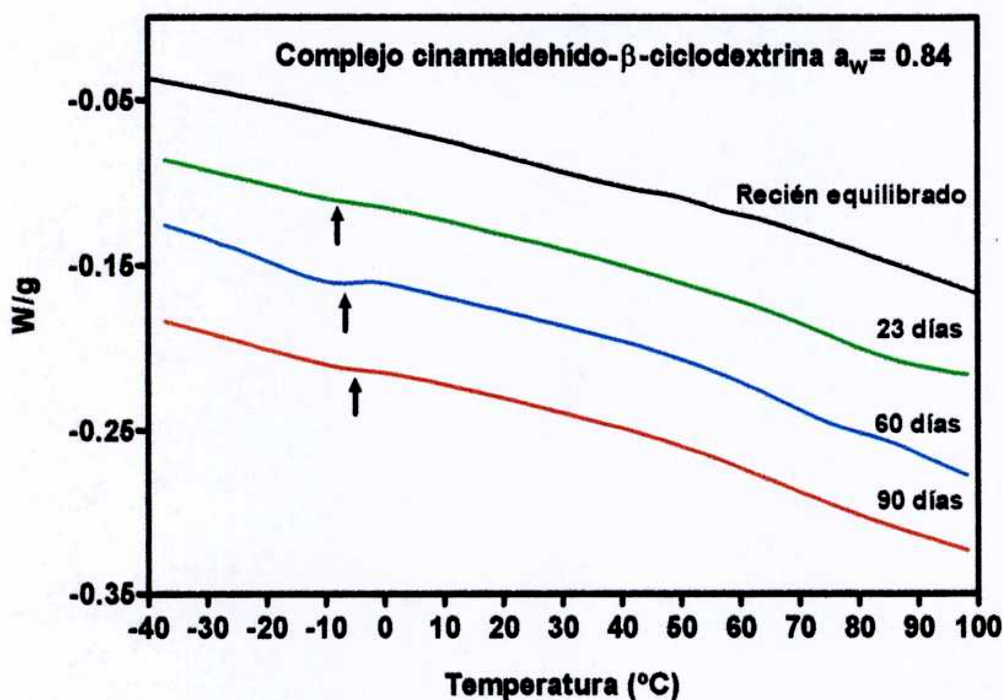


Figura V.2.10. Termogramas obtenidos por DSC del complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina a 0,84 de a_w y a distintos tiempos de almacenamiento.

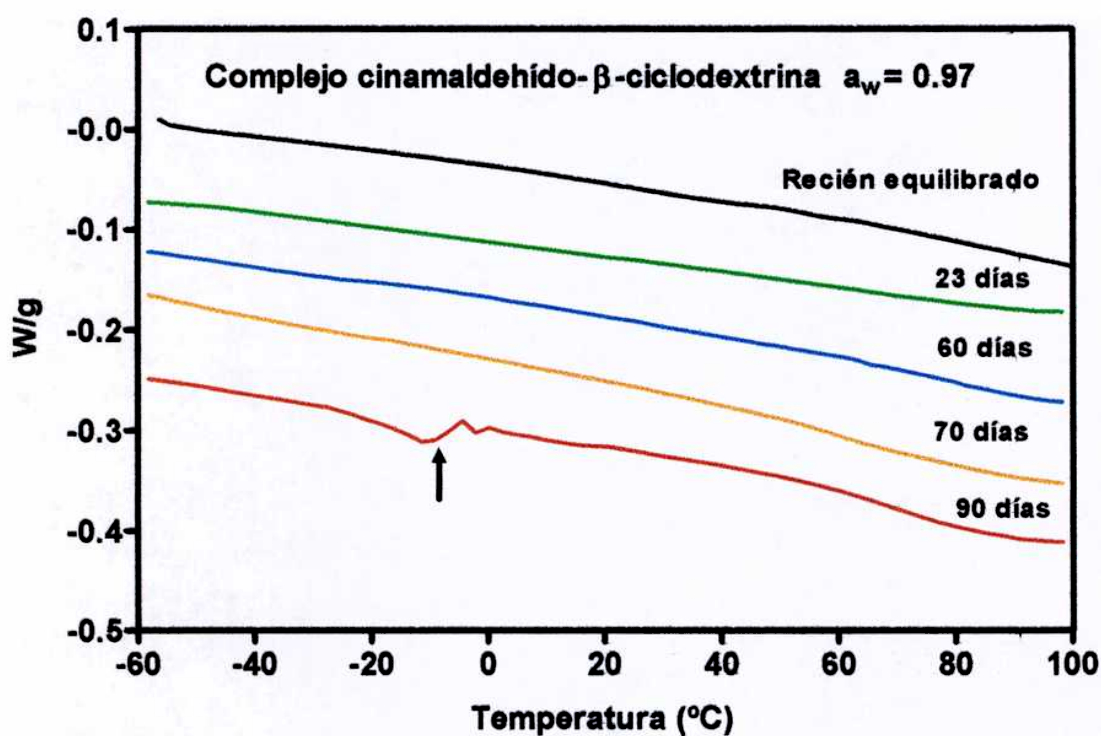


Figura V.2.11. Termogramas obtenidos por DSC del complejo cinamaldehído-β-ciclodextrina a 0,97 de a_w y a distintos tiempos de almacenamiento.

A partir de los termogramas de los complejos de inclusión, obtenidos a las diferentes a_w y tiempos de almacenamiento, se determinaron los valores de las entalpías de fusión del timol y cinamaldehído (ΔH_s). Esto permitió calcular la cantidad de dichos compuestos liberada de los complejos durante el almacenamiento. Se determinó también, el valor de la entalpía de fusión correspondiente a la cantidad inicial del ligando puro presente en el complejo (ΔH_o). Este último valor fue obtenido, a partir del termograma de dicho ligando medido en las mismas condiciones experimentales.

La relación entre ambos valores permitió determinar el porcentaje de timol o cinamaldehído liberado (% L) de acuerdo a lo explicado en la sección IV.4.B.2 (Materiales y Métodos) y utilizando la fórmula IV.6:

$$\%Liberado = (\%L) = \frac{\Delta H_s}{\Delta H_o}$$

Las figuras V.2.12 y V.2.13 muestran el porcentaje de timol y de cinamaldehído liberado (% L) de sus complejos a 0,84 y a 0,97 de a_w , en función del tiempo.

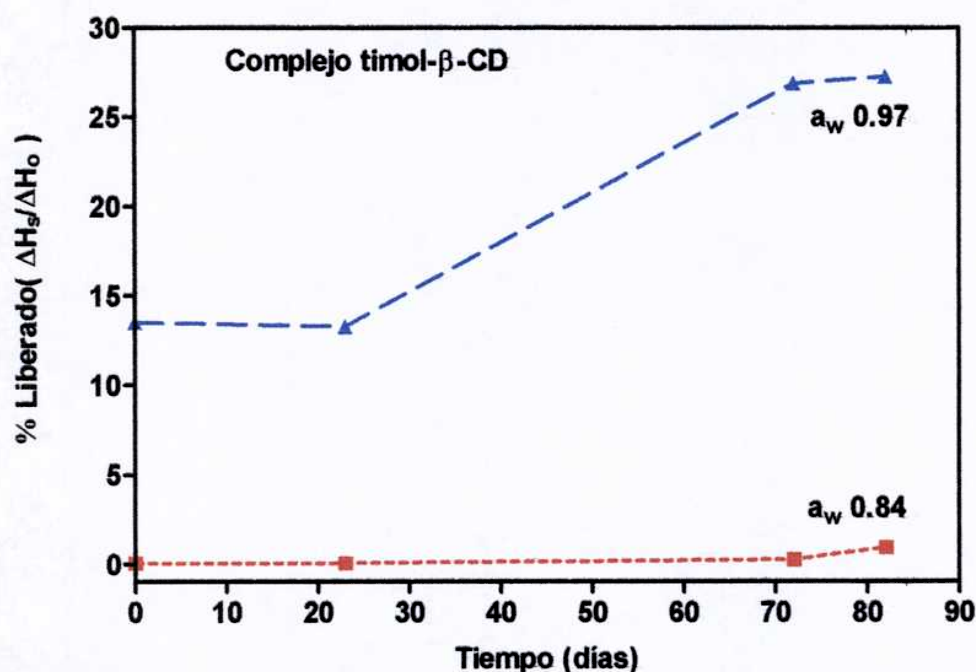


Figura V.2.12. Porcentaje de timol liberado de su complejo con β -ciclodextrina a 0,84 y 0,97 de a_w . Los resultados se muestran como % liberado en función del tiempo (días).

La cantidad de timol liberado del complejo a 0,84 de a_w , fue muy baja hasta 70 días de almacenamiento en el que aumento levemente (Figura V.2.12). Por el contrario, a 0,97 de a_w , la liberación del timol encapsulado se inició casi al comienzo del tiempo de almacenamiento y luego se incrementó linealmente con el mismo hasta los 70 días, en el que se estabilizó.

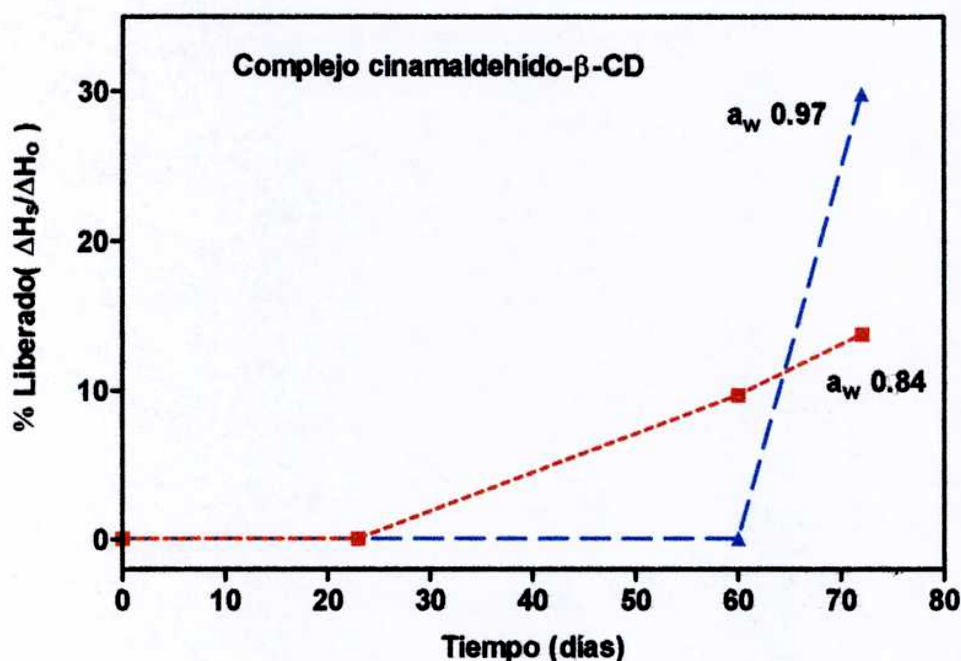


Figura V.2.13: Porcentaje de cinamaldehído liberado de su complejo con β -ciclodextrina a 0,84 y 0,97 de a_w . Los resultados se muestran como % liberado en función del tiempo (días).

Las muestras del complejo de cinamaldehído- β -ciclodextrina presentaron un comportamiento diferente. En efecto, a 0,84 de a_w la liberación del cinamaldehído empezó a los 23 días y se incrementó linealmente con el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, luego de 75 días de almacenamiento, el % de cinamaldehído liberado fue sólo de 12%.

En cambio, las muestras del complejo de cinamaldehído- β -ciclodextrina expuestas a una a_w de 0,97, mostraron un comportamiento diferente: la liberación empezó luego de 60 días de almacenamiento, tiempo a partir del cual el % L se incrementó abruptamente con el tiempo de almacenamiento.

Si se compara la estabilidad de ambos complejos, se puede apreciar que presentaron comportamientos diferentes. A 0,84 de a_w , el complejo del timol- β -ciclodextrina fue más estable que el de cinamaldehído- β -ciclodextrina.

Por el contrario, a 0,97 de a_w el complejo del cinamaldehído- β -ciclodextrina fue más estable que el de timol- β -ciclodextrina hasta los 70 días de almacenamiento, aunque el % liberado luego de 90 días de almacenamiento fue similar. Estas diferencias de comportamiento pueden ser ocasionadas por la diferente estructura química, que presentan el timol y el cinamaldehído (comparar la Figura IV.1 y la Figura IV.2).

V.2.C. RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA DE LOS COMPLEJOS Y SU ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Los resultados obtenidos en la Sección V.2.B demostraron que la liberación del timol y cinamaldehído de sus complejos con β -ciclodextrina esta determinada fundamentalmente por la a_w de la atmósfera de almacenamiento. En efecto, la liberación de ambos compuestos, se inició a partir de 0,84 de a_w . Por otro parte, en el entorno de dicha a_w se observó un notable incremento en la adsorción de agua del complejo correspondiente (isotermas de adsorción de los complejos de timol y cinamaldehído con β -ciclodextrina: Figura V.I.8). Es decir, que podría existir una vinculación entre ambos fenómenos.

Esta relación se hace evidente en la Figura V.2.14 y Figura V.2.15, en las que se ha representado en un mismo gráfico la cantidad de agua adsorbida y el porcentaje de timol o cinamaldehído liberado en función de la a_w .

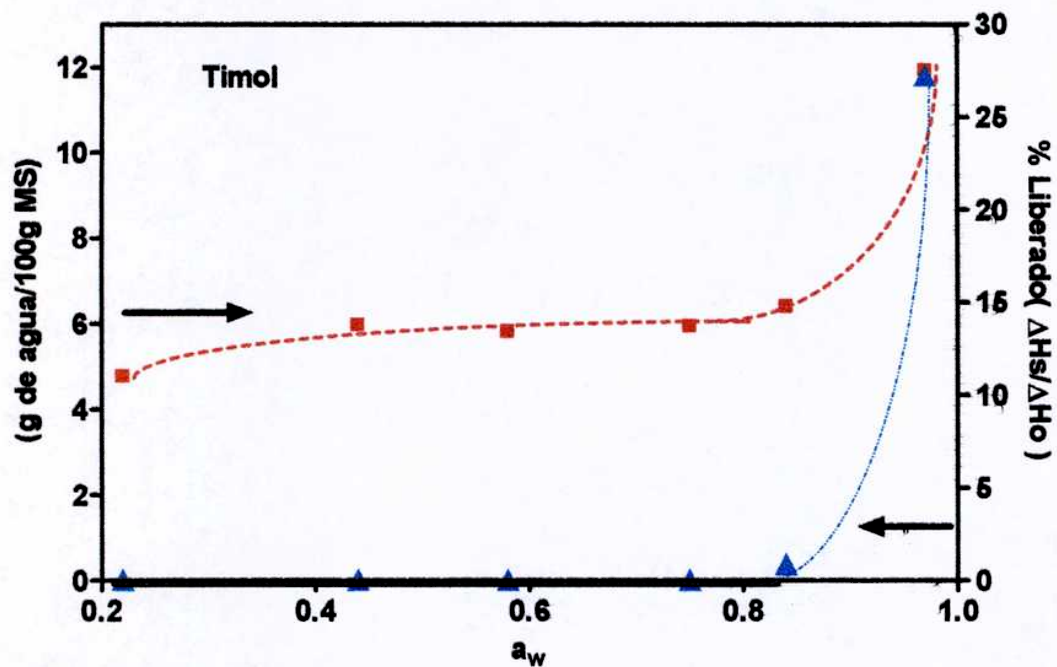


Figura V.2.14. Porcentaje de timol liberado de su complejo con β -ciclodextrina y porcentaje de agua adsorbido en función de la a_w .

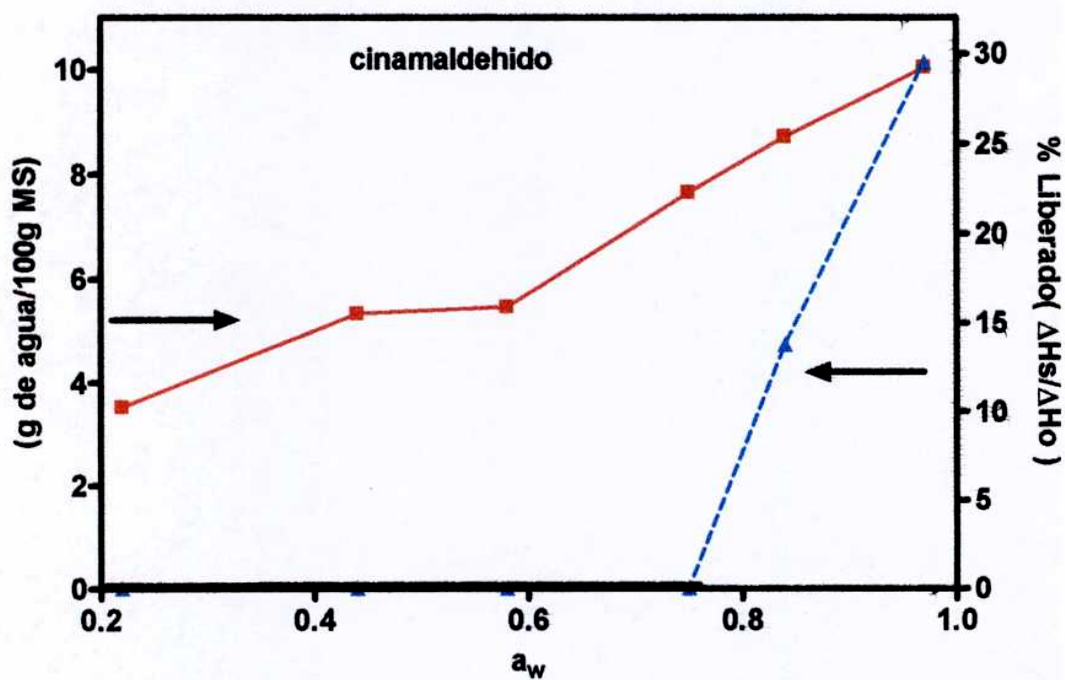


Figura V.2.15. Porcentaje de cinamaldehído liberado de su complejo con β -ciclodextrina y porcentaje de agua adsorbido en función de la a_w .

Ambas Figuras muestran que la a_w en que comienza la liberación del huésped, coincide con un incremento abrupto de la sorción de agua en la isoterma de adsorción de los complejos respectivos. Se puede afirmar entonces que la estabilidad de los complejos del timol y cinamaldehído fue gobernada por la forma de la isoterma de adsorción de agua.

La relación entre ambos fenómenos fue cuantificada por la siguiente ecuación exponencial:

$$\%Liberado = L_o . e^{[k.m]} \quad (V.2.1)$$

Donde:

L_o = % de huésped liberado a contenido de agua cero

k = constante de pérdida

m = contenido de agua (g de agua/100 g MS).

En la Tabla V.2.1 se muestran los valores de L_o , las constantes de pérdida k , sus correspondientes desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de correlación (R^2) para ambos complejos.

Tabla V.2.1. Valores de la constante de velocidad k , el parámetro L_o de la ecuación V.2.1 con sus correspondientes desviaciones estándar (σ) y coeficientes de correlación (R^2).

Complejo	$L_o \pm \sigma_{L_o}$	$k \pm \sigma_k$ (g de agua/100 g MS) ⁻¹	R^2
Timol-β-ciclodextrina	$(2 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$0,80 \pm 0,1$	0,999
Cinamaldehído -β-ciclodextrina	$(8 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$0,82 \pm 0,1$	0,957

Los valores de los coeficientes de correlación (R^2) y de la desviación estándar (σ) indican que la ecuación V.2.1 fue adecuada para predecir el % de huésped liberado del complejo en función del contenido de agua presente en el mismo. Dicha habilidad también puede corroborarse en la Figura V.2.16, donde puede observarse un buen ajuste entre los valores experimentales y los predichos por la ecuación V.2.1

Los valores de k de ambos complejos fueron no significativamente diferentes, lo que indica que la liberación del timol y cinamaldehído presentaron la misma dependencia respecto a la cantidad de agua captada por la muestra.

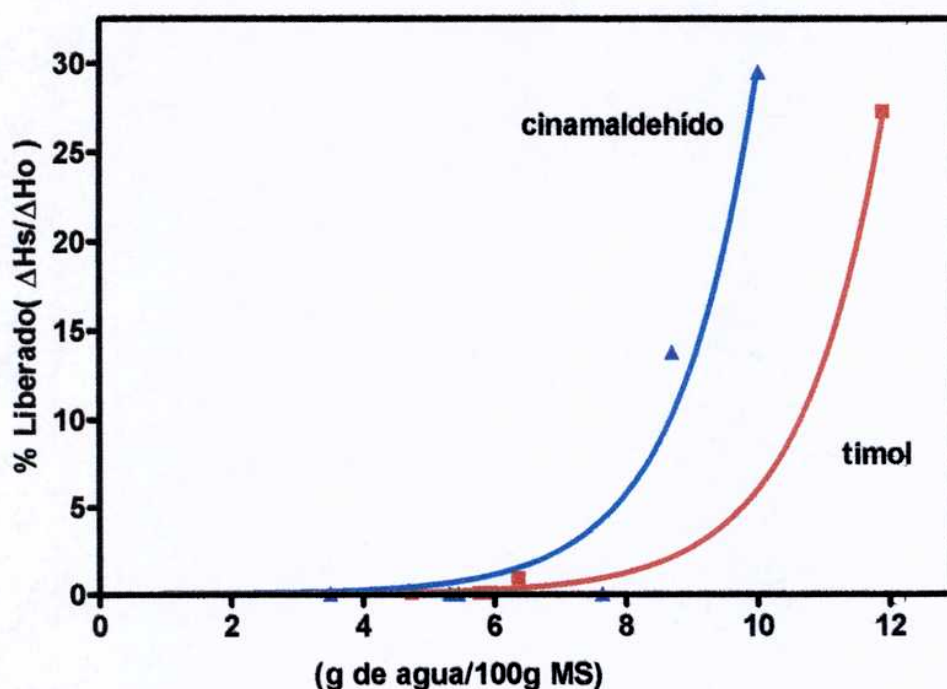


Figura V.2.16. Porcentaje de cinamaldehído o timol liberado de su complejo con β -ciclodextrina en función del porcentaje de agua adsorbido. Los símbolos representan los valores experimentales y las líneas los predichos por la ecuación V.2.1.

***VI. INTEGRACIÓN DE LOS
RESULTADOS Y
CONCLUSIONES GENERALES***

VI. INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo de esta investigación fue estudiar la aptitud de la β -ciclodextrina de formar complejos de inclusión con dos compuestos hidrofóbicos: timol y cinamaldehído, determinar sus propiedades de sorción de agua y analizar su estabilidad durante el almacenamiento en diferentes condiciones de humedad relativa.

VI.A. PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA

- ❖ Las isothermas de adsorción de agua de la β -ciclodextrina y de los complejos mostraron un perfil trifásico: el contenido de agua aumentó constantemente desde 0,22 hasta una a_w de 0,5, seguido de un "plateau" hasta que la a_w llegó a 0,75 y a continuación el contenido de agua se incrementó rápidamente. Sin embargo la cantidad máxima de agua captada fue diferente: β -ciclodextrina > complejo timol- β -ciclodextrina > cinamaldehído- β -ciclodextrina.
- ❖ Las moléculas de agua dentro de la β -ciclodextrina están en estado "activo" y pueden ser desalojadas fácilmente por compuestos con tamaño e hidrofobicidad adecuadas para ser incluidos dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina. Esto se verificó ya que la β -ciclodextrina forma hidratos con 12,5 moléculas de agua, mientras que los complejos forman hidratos con 8,5 (timol) y 7 (cinamaldehído).

- ❖ La ecuación de GAB describió aceptablemente las isotermas de sorción de la β -ciclodextrina y de los complejos, existiendo un buen ajuste entre los valores experimentales y predichos por dicha ecuación.
- ❖ A partir de dicha ecuación se obtuvieron los valores del contenido de agua de la monocapa (m_m), y los parámetros k y C_G .
- ❖ Los valores de m_m fueron en el orden: m_m de la β -ciclodextrina $>$ m_m del complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina $>$ m_m del complejo timol- β -ciclodextrina. Este orden coincide con el número de moléculas de H_2O presentes en la estructura de sus hidratos respectivos.
- ❖ El valor m_m de la β -ciclodextrina fue 3 y 5 veces mayor en magnitud que los correspondientes a los complejos de cinamaldehído y timol, respectivamente. Esto sería una evidencia más de que la formación del complejo implica el desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad de la β -ciclodextrina por el compuesto incluido.
- ❖ Los valores de las áreas de adsorción fueron: 542,5, 175,5 y 101,5 m^2/g para la β -ciclodextrina, el complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina y el complejo timol- β -ciclodextrina respectivamente.
- ❖ Los valores de la entalpía neta de adsorción estimados aplicando la ecuación V.3 fueron: 34, 5, 5 y 31 kJ/mol para la β -ciclodextrina, el complejo cinamaldehído- β -ciclodextrina y el complejo timol- β -ciclodextrina respectivamente.

VI.B. ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO: CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL HUÉSPED

- ❖ la cantidad liberada de timol y de cinamaldehído de sus respectivos complejos de inclusión fue función de la a_w y del tiempo de almacenamiento.
- ❖ Se observó que a una $a_w < 0,84$, el timol y el cinamaldehído no fueron liberados de sus respectivos complejos de inclusión, durante un tiempo de almacenamiento de 84 días.
- ❖ A 0,84 el complejo de timol- β ciclodextrina fue más estable que el complejo cinamaldehído- β ciclodextrina, mientras que a 0,97 se observó el comportamiento opuesto. Este diferente comportamiento puede ser atribuido a la diferencia en la estructura química que existe entre ambos compuestos.
- ❖ Se halló una ecuación que predice el porcentaje de timol o cinamaldehído liberado, en función del contenido de agua presente en el complejo.

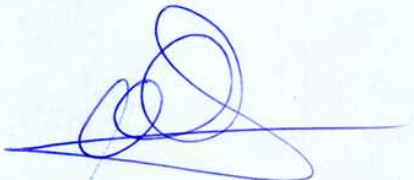
VI.C. CONCLUSIONES GENERALES

El análisis de los resultados permitió obtener las siguientes conclusiones generales:

- ❖ Se verificó que la β -ciclodextrina encapsula eficientemente al timol y el cinamaldehído, dando lugar a la formación de complejos sólidos 1:1.
- ❖ La cantidad de agua adsorbida en el equilibrio por ambos complejos fue menor que la correspondiente a la β -ciclodextrina.

- ❖ La sorción de agua afecta significativamente la estabilidad de los complejos de timol y cinamaldehído con β -ciclodextrina.
- ❖ Cualquier cambio estructural en los complejos de β -ciclodextrina modifica la solubilidad de los mismos, su relación con el agua y su estabilidad.
- ❖ Los estudios de estabilidad mostraron que los complejos de timol y cinamaldehído son estables a a_w relativamente altas (0,75) durante largos tiempos de almacenamiento. Esto sugiere que los mismos podrían ser incorporados a los alimentos como aditivos en reemplazo de los sabores libres, que son más lábiles.

Peggy Ponce Cevallos
Ing. Peggy A. Ponce Cevallos


Beatriz E. ELIZALDE

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguerre, R.J., Suárez, C. y Viollaz, P.E.** Swelling and structure in starchy materials. *Journal of Food Engineering*, 9, 71-80, 1989.
- Anandaraman, S y Reineccius, G.A.**, Stability of encapsulated orange peel oil, *Food Technologist*, 40, 88-93, 1986.
- Ahlneck, C y Zografi, G.** The molecular basis of moisture effects on the physical and chemical stability of drugs in the solid state (Review). *Int. J. Pharm.*, 62, 87-95, 1990.
- Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L., Rodrigo-García, J., Escobedo-González, R., Mercado-Mercado, G.; Moyers-Montoya, E.; Vázquez-Flores, A. y González-Aguilar, G.** Dual effect of β -cyclodextrin (β -CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ). *Food Chemistry*, 101, 1346-1356, 2007.
- Anagnostopoulou-Konsta, A., Apekis, L. y Tsoukaris, G.** Dielectric Investigation of β -Cyclodextrin Hydrates and Inclusion Complexes. *IEEE Transactions on Electrical Insulation*, 27 (4), 801-806, 1992.
- Bilal, M., de Brauer, C., Claudy, P., Germain, P. y Létoffé, J.M.** β -Cyclodextrin hydration: a calorimetric and gravimetric study. *Termochimica Acta*, 249, 63-73, 1995.
- Bizot, H.** Using the GAB model to construct sorption isotherms. In *"Physical Properties for Foods"*. Eds Jowit, R. y col. Applied Science, London, 43 – 44, 1983.
- Bonnet, Pascal.** Etude par modélisation moléculaire de dimères de cyclodextrins et de leurs complexes d'inclusion. Thèse en Cotutelle Université d'Orleans, Universidad Autònoma de Barcelona. Orleans, 2001.
- Boquet, R., Chirife, J. e Iglesias, H.A.** Equations for fitting water sorption isotherms of food. Part 2. Evaluation of various two-parameters models. *Journal Food Technology*, 13, 319-323, 1978.
- Boquet, R., Chirife, J. e Iglesias, H.A.** On the equivalence of isotherm equations. *Journal Food Technology*, 15, 344 – 348, 1980.
- Burt, Sara.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253, 2004.
- Cardona, S., Schebor, C., Buera, M., Karel, M. y Chirife, J.** Thermal Stability of Invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state and trehalose crystallization. *Journal of Food Science*, 62 (1), 105-112, 1997.

- Carlotti, M.E., Sapino, S., Cavalli, R., Trotta, M., Trotta, F. y Martina, K.** Inclusion of Cinnamaldehyde in modified γ -cyclodextrins. *Journal Inc. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 57, 445-450, 2007.
- Chang, Yueh-Ing y Reineccius, Gary,** Interaction of β -cyclodextrin with Enantiomers of Limonene and Carvone. *Journal of Food Science*, 55 (6), 1686-1688, 1990.
- Connors, Kenneth.** The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical Review*, American Chemical Society, 97, 1325-1357, 1997.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F.** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130-135, 1999.
- Cserháti, T y Forgács, E.** Cyclodextrins in Chromatography. Royal Society in Chemistry. Capítulo 1, pág. 7, 2003.
- Debnath, S., Hemavathy, J., Bhat, K.K.** Moisture Sorption Studies on onion powder. *Food Chemistry*, 78 (4), 479-482, 2002.
- Del Valle, M.** Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046, 2004.
- De Marco, P. y Thakkar, A.** Cicloheptaamylose inclusion complexes of barbiturates: Correlation between proton magnetic resonance and solubility studies. *Journal Chemical Society, Chemical Communications*, 2, 1970.
- Dziezak, J.D.** Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.*, 424, 136-151, 1988.
- Fennema, O.** Water and Ice. En: "Food Chemistry", 3rd edition, Fennema, O. (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1996.
- Fereidon, S. y Xiao-Qing, H.** Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33 (6), 501-547, 1993.
- Fernandes, C., Carvalho, R., Pereira da Costa, S y Veiga, F.** Multimodal molecular encapsulation of nicardipine hydrochloride by β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triacetyl- β -cyclodextrin in solution. Structural studies by H NMR and ROESY experiments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 285-296, 2003.
- Frömming, K. y Szejtli, J.** Cyclodextrins in Pharmacy. Kluwer academy Press, Dordrecht, 1994.
- Fujiwara, T., Yamazaki, M., Tomizu, Y., Tokuoka, R. Tomita, K., Matsuo, T., Suga, M. y Saenger, W.** The crystal structure of a new form of β -cyclodextrin water inclusion compounds and thermal properties of β -cyclodextrin complexes. *Nippon Kagaku Kaishi*, 181-187, 1983.
- Giordano, F., Novak, C., y Moyano, J.R.** Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 380, 123 – 151, 2001.

- Gouin, S.** Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330–347, 2004.
- Greenspan, L.** Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. of Res. Of the Natl. Bureau of Standards*, 81A, 89–102, 1977.
- Gregg, S.J. y Sing, K.S.W.** Adsorption, Surface Area and Porosity (2nd ed.). New York: Academic Press, 1982.
- Hedges, A.** Industrial Applications of Cyclodextrins. American Chemical Society, 98, 2035–2044, 1998.
- Hedges, A. y Mc Bride, C.** Utilization of β -Cyclodextrin in Food. *Cereal Foods World*, 44, N° 10, 1999.
- Heinzen, C.** Microencapsulation by Prilling and Coextrusion. Workshop No. 53. Nutraceuticals and probiotics. Technology Training Centre, Basil, Germany, 26–28 June (Abstract), 2002.
- Higuchi, T. y Connors, K.** Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4, 117–120, 1965.
- Konno A., Misaki, M. y Toda, J.** Bitterness reduction of citrus fruits by beta-cyclodextrin, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2341, 1981.
- Lindner, K. y Saenger, W.** β -cyclodextrin dodecahydrate: Crowding of water molecules within a hydrophobic cavity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 17, 694–695, 1978.
- Lindner, K. y Saenger, W.** Crystal and molecular structure of cyclohepta-amylose dodecahydrate. *Carbohydr. Res.*, 99, 103–115, 1982.
- Lofsson, T., Hreinsdottir, D. y Másson, M.** Evaluation of Cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 302, 18–28, 2005.
- Lofsson, T.** Cyclodextrin Complexes, power point. University of Iceland. IS-107 Reykjavik, Iceland, 2003.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. y Desobry, S.** Flavour encapsulation and controlled release. A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1–21, 2006.
- Marini, A., Berbenni, G., Bruni, V., Massarotti, P. y Mustarelli, P.** Dehydration of the cyclodextrins: A model system for the interactions of biomolecules with water. *Journal of Chemical Physics*, 103 (17), 7532, 1995.
- Maroulis, Z. B., Tsami, E., Marinos-Kouris, D. y Saravacos, G. D.** Applications of the GAB model to sorption isotherms of fruits. *Journal of Food Engineering*, 7, 63–78, 1988.
- Medeiros, K. Monteiro, J.C., Medeiros, I.A. Diniz, M.F., Silva, B y Piuvezam, M.** Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, 17 (1), 2007.

- Moreira da Silva, A., Empis, J.M, Texeira-Diaz, J.** Inclusion of carvone enantiomers in cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin): thermal behaviour and H $\rightarrow$ D and D $\rightarrow$ H exchange. *Carbohydrate Research*, 337, 2501-2504, 2002.
- Mourtzinis, I., Kalogeropoulos, N., Papadakis, S.E., Konstantinou, K., y Karathanos, V.T.** Encapsulation of Nutraceutical Monoterpenes in β -Cyclodextrin and Modified Starch. *Journal of Food Science*, 73 (1), 89-94, 2008.
- Mulinacci, N., Melani, F., Vincieri, F.F., Mazzi, G. y Romani, A.** H-NMR and molecular modelling to characterize thymol and carvacrol β -cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 128, 81-88, 1996.
- Pagington, J.S.** Molecular encapsulation with β -cyclodextrin. *Food Flavors, Ingredients, Processing and Packaging*, 7, 51-55, 1985.
- Pande, G. y Shangraw, R.** Characterization of β -cyclodextrin for direct compression tableting: II. The role of moisture in the compactibility of β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 124, 231-239, 1995.
- Pinto, Luciana M.A., Fraceto, L.F., Santana, M.H., Pertinhez, T. Oyama, S. y de Paula, E.** Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 956-963, 2005.
- Polyakov, N.E, Leshina, T.V, Hand, E.O., Petrenko, A., y Kispert, L. (a).** β -Ionine cyclodextrins inclusion complexes H NMR study and photolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 161, 261-267, 2004 (a).
- Polyakov, N.E, Leshina, T.V, Hand, E.O., y Kispert, L.D. (b).** Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: NMR, EPR, and Optical Studies. *Free Radical Bio Med*, 36, 872 – 80, 2004.
- Popplewell, M.L., Black, M.J. Norris, y Porzio, M.** Encapsulation system for flavors and colors. *Food Technology*, 49, 76-82, 1995.
- Regiert, M.** Oxidation-stable linoleic acid by inclusion in α -cyclodextrin. *Journal Inclusion Phenomenon Macrocyclic Chemistry*, 57, 471-474, 2007.
- Reineccius, G.A.** Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology*, 45, 144-147, 1991.
- Reineccius, T.A., Reineccius, G.A. y Peppard, T.L.** Utilization of β -Cyclodextrin for Improved Flavor Retention in Thermally Processed Foods. *Journal of Food Science*, 69 (1), 58-62, 2004.
- Ribeiro, L., Ferreira, D.C., Veiga, F.J.B.** Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *European Journal of Pharmaceutical sciences*, 20, 253-266, 2003.

- Roller, S. y Seedhar, P.** Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 °C and 8 °C. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 390–394, 2002.
- Sanguansri, P. y Augustin, M. A.** Nanoscale materials development: a food industry Perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 547-556, 2006.
- Singh, M., Sharma, R. y Banerjee, U.C.** Biotechnological applications of cyclodextrins. Research Review Paper. *Biotechnology Advances*, 20, 341-259, 2002.
- Skoog, Douglas; Holler, James y Nieman, Timothy.** Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Quinta edición, Madrid, 1992.
- Sukumar, D., Hemavathy, J. y Bhat, K.** Moisture sorption studies on onion powder. *Food Chemistry*, 78 (4), 479-482, 2002.
- Szejtli, József.** Cyclodextrin Technology. Kluwer Academy Press, Dordrecht, 1988.
- Szejtli, József.** Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *American Chemical Society*, 98, 1743-1753, 1998.
- Szejtli, József.** Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.*, 76 (10), 1825-1845, 2004.
- Szente, Lajos y Szejtli, Jozsef.** Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food and Science Technology*, 15, 137-142, 2004.
- Tolaba, M., Peltzer, M., Enriquez, N. y Pollio, M. L.** Grain Sorption equilibria of Quinoa Grains. *Journal of Food Engineering*, 61, 361–371, 2004.
- Torres-Rivas, F., de la Rosa, L., Rodrigo-García, J., González-Aguilar, G., Álvarez-Parrilla.** Complexation of apple antioxidant by β -cyclodextrin as an approach to reduce its browning. (Proceeding). *Food Science and Biotechnology in Developing Countries. Congreso Internacional. México, 20-23 de junio 2004.*
- Uekama, K. Hirayama, F. y Irie, T.** Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem. Rev.*, 98 (5), 2045-2076, 1998.
- van den Berg, C.** Vapour sorption equilibria and other water starch interactions: an physical-chemical approach. Doctoral Thesis. Agricultural University, Wageningen, The Netherlands (1981).
- Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sokmen, A., Dafereta, D., Polissiou, M., Sokmen, M., Donmez, E., y Tepe, B.** Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *American Chemical Society*, 51, 63-67, 2003.
- Wang, C.X. y Chen, Sh.,** Fragrance-release Property of β -Cyclodextrin Inclusion Compounds and their application in Aromatherapy. *Journal of Industria Textiles*, 34 (3), 157-166, 2005.

- Weisser, H.** Influence of temperature on sorption equilibria. In "Properties of Water in Foods", eds D. Simatis y J. L. Multon, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 95–118, 1995.
- Williams, Robert O., Mahaguna, V. y Sriwongjanya, M.** Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46, 355-360, 1998.
- Winkler, R.G., Fioravanti, S, Ciccotti, G., Margheritis, C. y Villa, M.** Hydration of β -cyclodextrin: A molecular dynamics simulation study. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 14, 659-667, 2000.
- Wolf, W., Spiess, W.E.L. y Jung, G.** Standardization of isotherms measurements (COST-Project 90 y 90 bis. In "Properties of Water of Foods", eds. Simatos, D. y Multon, J.L., Martinus Nijhoff, Dordrecht, 661-677, 1985.
- Yamamoto, S., Kurihara, H., Mutoh, T., Xing, X. y Unno, H.** Cholesterol recovery from inclusion complex of β -cyclodextrin and cholesterol by aeration at elevated temperatures. *Biochemical Engineering Journal*, 22, 197–205, 2005.
- Youdim A.K. y Deans G.S.** Beneficial effects of thyme oil on age-related changes in the phospholipids C20 and C22 polyunsaturated fatty acid composition of various rat tissues. *Biochemical Bioph Acta*, 1438, 140-146, 1999.
- Zhang, J. y Zografi G.** The Relationship between "BET" – and "Free Volume" – Derived Parameters for water vapor absorption into amorphous solids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, 1063-1072, 2000.
- Zografi, G.** States of water associated with solids. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 14, 1905-1926, 1988.