

Tesis Doctoral

Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de complejos de inclusión de β -ciclodextrinas y sus derivados

Ponce Cevallos, Peggy Alejandra

2013-08-07

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 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. (2013-08-07). Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de complejos de inclusión de β -ciclodextrinas y sus derivados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ponce Cevallos, Peggy Alejandra. "Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de complejos de inclusión de β -ciclodextrinas y sus derivados". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-08-07.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

**Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de
complejos de inclusión de β -ciclodextrinas y sus
derivados.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Química Industrial

Peggy Alejandra Ponce Cevallos

Directora de tesis: Dra. Beatriz Emilia Elizalde

Consejera de estudios: Dra. Stella Maris Alzamora

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2013

RESUMEN

Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de complejos de inclusión de β -ciclodextrinas y sus derivados.

Un paso muy importante en el desarrollo de ingredientes funcionales activos es el diseño de formulaciones que permitan la estabilización, solubilización y liberación controlada de componentes activos en los productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos, a los cuales son añadidos. Esto puede ser logrado por la encapsulación en matrices amorfas de carbohidratos o polímeros obtenidos por congelación y deshidratación (vitrificación) o mediante sistemas novedosos de encapsulación a través de la formación de nanopartículas, mediante la utilización de ciclodextrinas, debido a la propiedad de las mismas de formar complejos de inclusión por un mecanismo totalmente diferente al de encapsulación en una matriz amorfa.

Se analizarán los mecanismos físico-químicos involucrados en la efectividad de una ciclodextrina natural, la β -ciclodextrina, y de dos ciclodextrinas modificadas en la estabilización de biomoléculas lábiles de distintas características. La información derivada de este estudio y, paralelamente, el conocimiento de las reacciones de deterioro más frecuentes sufridos por los compuestos de interés analizará proporcionará distintas estrategias para perfeccionar y ampliar la efectividad de los agentes protectores. Se analizará además, el efecto de las variables tradicionales temperatura y contenido acuoso para establecer la incidencia en la conservabilidad de los productos.

Los resultados de este estudio pueden contribuir al conocimiento de las interacciones moleculares y factores fisicoquímicos que afectan la conservabilidad de moléculas lábiles incluidas en ciclodextrinas o matrices continuas. Además puede ser útil para seleccionar las condiciones óptimas de almacenamiento, permitir la liberación controlada o predecir la vida útil de productos funcionales formulados con compuestos encapsulados en matrices continuas o en ciclodextrinas.

Palabras claves: ciclodextrinas, complejos de inclusión, biomoléculas lábiles, timol, cinamaldehído, interacciones agua-sólido, estabilidad.

ABSTRACT

Stability and physical chemical properties of inclusion complexes of β -cyclodextrins and derivatives.

An important step in the development of functional ingredients is the design of formulation procedures for the stabilization, solubilization and delivery of the active components in food, cosmetic and pharmaceutical products in which they are added. This can be achieved by the encapsulation in amorphous matrices of carbohydrates, gums obtained by dehydrate and frozen processes (vitrification) or by novel encapsulation systems through the formation of nanoparticles using amphiphilic cyclodextrin molecules (CD), because of their ability to form inclusion complexes with active compounds by a mechanism totally different to the encapsulation in a continuous matrix.

The physicochemical mechanism involved in the efficiency of a natural cyclodextrin, the β -cyclodextrina, and two modified cyclodextrins on the stabilization of the labile biomolecules encapsulated, have been analyzed. The effect of traditional variables (moisture content and temperature) has been analyzed to establish the best conditions to protect the labile molecule.

The information obtained from this study and in parallel, the knowledge of deterioration chemical reactions experimented by the labile biomolecule encapsulated could be helpful to increase the performance and the effectiveness of the protection agents.

The efficiency of encapsulation by the continuous matrix or the formation of inclusion complexes are a function of physical and chemical properties of matrix and cyclodextrins as also of the nature of the encapsulated compounds. Expected results may contribute to the knowledge of molecular interactions and physical factors that affect the kinetics of retention of labile biomolecules encapsulated in amorphous matrices or cyclodextrins. Moreover, results could be useful to establish the best conditions to protect labile molecules, increase solubility of lypophilic compounds and for release-control of drugs.

Key words: cyclodextrins, encapsulation, labile biomolecules, thymol, cinnamaldehyde, water-solid interactions, stability.

Agradecimientos

A la Argentina, sobre todo a Buenos Aires, por recibirme como a una porteña más.

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al Departamento de Industrias por brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo de Tesis de Doctorado. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al CONICET por las becas otorgadas.

A mi directora, la Dra. Beatriz Elizalde por su invaluable aporte durante el trabajo de investigación y escritura de mi tesis. Por su guía, apoyo, comprensión, calidez y por las largas charlas políticas compartidas.

A la Dra. Pilar Buera, directora del Laboratorio de Propiedades y Conservación de Biomoléculas, por permitirme trabajar en su grupo de trabajo, por la confianza brindada, y por su gran conocimiento, que permitió nutrir de sobremana este trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio y departamento de Industrias: Nati, Marce, Sole, Analí, Vero, Jaime, Juli, Victor, Paula, Silvi, Mario, Abel, Flor, Pato, Mariela, Cristina, Christian, Caro, y Lidia, por todo el apoyo y ayuda brindados y/o lindos e inolvidables momentos compartidos. A Caro y Lidia, por escucharme y por darme aquellos "empujones" a veces necesarios para continuar mi camino.

A aquellos que han sido mi familia acá: Fabi, María, Analí, Sole, Nati, Marce, Vero, Jorge, Susi, Lu, Eliza. Gracias por quererme y estar junto a mí, en las buenas y sobre todo en las malas.

A Roberto, Alejandro, Carlos, Norma, Jorge, María del Carmen, Norberto y Alberto, mis compañeros de ideas y de estudios en la UPMPM. Gracias por las reuniones, pizza, vino y largas conversaciones, de las que aprendí tanto y me permitieron clarificar ideas y engrosar argumentos.

A la Cámpora y a mis cumpas, por "adoctrinar a esta joven incauta" y por mostrarme la necesidad de acción y que las cosas no tienen que quedarse sólo en discursos.

A mi Ecuador del alma, que a pesar de que no estaba programado que te deje tanto tiempo, me sigues esperando con los brazos abiertos.

A mis papis (Miguel y Peggy) y hermanos (Gabriella y Miguel), por su infinito amor y comprensión. Por darme su apoyo en mis elecciones de vida y hacerme sentir tan orgullosa de la familia que tengo. A mis sobrinos (Isabella y Liam), por hacerme sentir de una forma tan tierna, su admiración, e incentivar a ir por más. A mis abuelitos que no están, sobre todo a Papa Luchito y Mama Guillita. Esto que soy, comenzó con Uds. A María, por cuidarnos tantos años y ser una más de nuestra familia.

A mis panas de la vida: Fanny, Gaby, Gaby V, Flor, Marce P, Sebastián, Alberto, Camilo. Nos burlamos de las distancias, eh?

A Pedro, por la compañía de estos años y, bien o mal, mostrarme la intensidad de la vida.

A mi Chad, por rediseñar en mi cabeza y corazón, el concepto de amor. You are the one, baby.

A Dios y a la vida, que me han dado y me dan tanto.

A mi abuelita, mama Guillita

I.	INTRODUCCION.....	10
I.1.	Consideraciones generales sobre componentes de aceites esenciales como ingredientes funcionales.....	11
I.1.1	Flavor y aceites esenciales.....	12
I.1.2.	Timol.....	13
I.1.3.	Cinamaldehído.....	16
I.2.	Encapsulación de biomoléculas.....	19
I.2.1.	Métodos generales de encapsulación	20
I.2.1.1.	Métodos físicos	20
I.2.1.2.	Métodos químicos	21
I.2.1.3.	Métodos fisicoquímicos.....	21
I.3.	Materiales para encapsulación	24
I.4.	Encapsulación de sabores.....	26
I.4.1	Ciclodextrinas.....	29
I.4.1.1	Breve Historia.....	30
I.4.1.2.	Estructura y propiedades de las ciclodextrinas	31
I.4.1.3.	Derivados de las ciclodextrinas.....	38
I.4.2.	Formación del complejo de inclusión huésped-ciclodextrina.....	40
I.4.2.1.	Mecanismo de encapsulación	42
I.4.2.2.	Evaluación del proceso de inclusión: constantes de estabilidad, relación molar y loading del complejo.....	47
I.4.2.3	Relación entre las constantes de equilibrio (K_e), las propiedades del complejo y su estabilidad.	50
I.5.	Métodos de obtención de los complejos de inclusión sólidos. Consideraciones generales.	52
I.5.1.	Métodos de preparación de los complejos de inclusión	54
I.5.2.	Secado de los complejos. Consideraciones generales.....	57
I.6.	Métodos de análisis para determinar la formación de los complejos de inclusión	58
I.6.1.	Métodos para analizar la formación de complejos en estado sólido	60
I.6.1.1.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	60
I.6.1.2.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)	60
I.6.1.3.	Difractometría de rayos X	62
I.6.1.4.	Espectroscopía infrarroja	62
I.6.1.5.	Espectroscopía Raman	64
I.6.1.6.	Microscopía electrónica de barrido	64
I.6.2.	Métodos de detección de complejos en solución	65
I.6.2.1.	Método de solubilidad de fases.....	65
I.6.2.2.	Espectroscopía Visible y UV.....	66
I.6.2.3.	Dicroísmo circular	66
I.6.2.4.	Espectroscopía de Fluorescencia.....	67
I.6.2.5.	Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear (NMR)	67
I.6.2.6.	Cromatografía	68

I.7.	Aplicaciones de las ciclodextrinas y sus complejos de inclusión	69
I.7.1.	Cosmética y aseo personal.....	69
I.7.2.	Industria alimentaria.....	70
I.7.2.1.	Ciclodextrinas como agentes atrapadores de sabores	71
I.7.2.2.	Ciclodextrinas como agentes protectores frente a la oxidación por oxígeno.	71
I.7.2.3.	Ciclodextrinas como agentes protectores frente a la luz	72
I.7.2.4.	Ciclodextrinas como agentes protectores frente a la temperatura	72
I.7.2.5.	Ciclodextrinas para aumentar la vida útil de los alimentos.....	72
I.7.2.6.	Aplicaciones de las ciclodextrinas vacías.....	73
I.7.2.7.	Aplicaciones especiales de las ciclodextrinas en alimentos.....	75
I.7.3.	Industria farmacéutica.....	75
I.7.4.	Agricultura e industria química	76
I.8.	Propiedades de Hidratación.....	77
I.8.1.	Actividad de agua e isotermas de sorción de agua.....	77
I.8.2.	Propiedades de hidratación de las ciclodextrinas	80
I.8.3.	Estado vítreo y estabilidad	81
I.8.3.1.	Relación entre los cambios físicos de la matriz, la actividad de agua y la transición vítrea	85
I.8.3.2.	Estabilidad del aroma encapsulado durante el almacenamiento	87
II.	OBJETIVOS	89
II.1.	Objetivo general	90
II.2.	Objetivos específicos.....	91
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
III.1.	Elección de los sistemas	94
III.2.	Preparación de los sistemas.....	95
III.2.1.	Preparación de los complejos de inclusión	95
III.2.1.1.	Preparación de los complejos de inclusión con β -ciclodextrina	96
III.2.1.2.	Preparación de los complejos de inclusión con la metil- β -ciclodextrina y la hidroxipropil- β -ciclodextrina	96
III.2.1.3.	Preparación de las mezclas físicas de las ciclodextrinas con los flavors	97
III.2.1.4.	Preparación de las matrices continuas conteniendo timol	97
III.2.1.5.	Preparación de las emulsiones conteniendo timol	98
III.2.2.	Secado de los sistemas preparados.....	98
III.2.2.1.	Liofilización	98
III.2.2.2.	Secado Spray	99
III.2.3.	Almacenamiento.....	100
III.2.3.1.	Preparación de sistemas con diferente contenido de agua.....	100
III.2.3.2.	Determinación del contenido de agua en sistemas estudiados	101
III.2.3.3.	Características físicas de las muestras equilibradas.....	102
III.2.3.4.	Caracterización de las isotermas de sorción de agua.....	102
III.2.4.	Determinación de propiedades térmicas de los sistemas estudiados	105
III.2.4.1.	Procedimiento	107
III.2.4.2.	Determinación de la formación de los complejos,	

	ligando libre y estabilidad de los complejos	108
III.2.4.3.	Determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g).....	110
III.2.5.	Estudio de solubilidad de fases.....	111
III.2.5.1.	Determinación de las constantes de equilibrio de los complejos.....	111
III.2.5.2.	Determinación de los parámetros termodinámicos energía libre (ΔG^*), entalpía (ΔH^*) y entropía (ΔS^*) de formación de los complejos.....	114
III.2.6.	Cinética de liberación del timol en la matriz de almidón HiCap100.....	115
III.2.6.1.	Determinación del timol superficial	115
III.2.6.2.	Determinación del timol encapsulado inicial	116
III.2.6.3.	Determinación del timol encapsulado durante el almacenamiento	116
III.2.7.	Caracterización de los sistemas sólidos.....	117
III.2.7.1.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	117
III.2.7.2.	Difractometría de rayos X en polvo	118
III.2.7.3.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	121
III.2.7.3.1.	Reflectancia total atenuada (ATR).....	122
III.2.8.	Tratamiento matemático de los datos	124
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	125
IV.1.	Estudio de los complejos en solución	126
IV.1.1.	Solubilidad de fases	126
IV.1.1.1.	Determinación de las constantes de equilibrio de los complejos.....	126
IV.1.1.2.	Termodinámica del proceso de inclusión	133
IV.1.1.3.	Efecto compensación entropía-entalpía	137
IV.2.	Estudio de los sistemas sólidos.....	138
IV.2.1.	Determinación de las propiedades térmicas de los sistemas estudiados.....	138
IV.2.1.A.	Determinación de las propiedades térmicas de las ciclodextrinas y los complejos de inclusión.....	139
IV.2.1.A.1.	Confirmación de la formación de los complejos de inclusión de la BCD, MBCD y la HPBCD	139
IV.2.1.A.2.	Determinación de la liberación de flavor de los complejos de inclusión durante el almacenamiento.....	143
IV.2.1.A.3.	Determinación de las temperaturas de transición vítrea de la MBCD, HPBCD y sus complejos de inclusión con timol y cinamaldehído	150
IV.2.1.B.	Determinación de las propiedades térmicas del almidón HiCap 100 y del timol encapsulado en una matriz de almidón HiCap 100	154
IV.2.2.	Estudio de las propiedades de sorción de agua de las ciclodextrinas y sus complejos.....	157
IV.2.2.1.	Cinética de adsorción de agua.....	157
IV.2.2.2.	Características físicas de las muestras equilibradas.....	159
IV.2.2.3.	Isotermas de sorción de agua	162
IV.2.2.3.1.	Isotermas de sorción de agua de la β -ciclodextrina y sus complejos	162
IV.2.2.3.2.	Isotermas de sorción de agua de la metil- β -ciclodextrina	

	(MBCD) y sus complejos	165
IV.2.2.3.3.	Isotermas de sorción de agua de la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD) y sus complejos.....	168
IV.2.3	Estudio de las propiedades de sorción de agua del almidón HiCap 100 y del timol encapsulado en una matriz de HiCap 100.....	170
IV.2.3.1.	Cinética de adsorción de agua.....	170
IV.2.3.2.	Características físicas de las muestras equilibradas.....	172
IV.2.3.3.	Isotermas de sorción de agua de los sistemas Hicap 100 y timol-HiCap 100	173
IV.2.4.	Caracterización de los sistemas en estado sólido	175
IV.2.4.1.	Difractometría de rayos X	176
IV.2.4.2.	Microscopía electrónica de barrido	185
IV.2.4.3.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	191
IV.2.5.	Estabilidad de los sistemas estudiados	204
IV.2.5.1	Estabilidad de los complejos de ciclodextrinas: cinética de liberación del timol y del cinamaldehído de las ciclodextrinas.....	205
IV.2.5.1.1.	Cinética de liberación del timol.....	205
IV.2.5.1.2.	Cinética de liberación del cinamaldehído	208
IV.2.5.2.	Estabilidad del timol encapsulado en la matriz de HiCap 100. Determinación de la cinética de liberación del timol	211
IV.2.5.2.1.	Retención del timol durante el almacenamiento	211
IV.2.5.5.	Comparación de la cinética de liberación del timol encapsulado en un sistema confinado (ciclodextrinas) y en una matriz continua.	216
V.	RESUMEN E INTEGRACIÓN DE RESULTADOS	220
V.1.	Estudio de los sistemas en solución	221
V.1.1.	Solubilidad de fases	221
V.1.2.	Termodinámica del proceso de inclusión	222
V.2.	Estudio de los sistemas sólidos.....	223
V.2.1.	Propiedades térmicas de los sistemas estudiados	223
V.2.2.	Propiedades de sorción de agua de las ciclodextrinas y sus complejos.....	224
V.2.3.	Propiedades de sorción de agua de la matriz continua	225
V.3.	Caracterización de los sistemas en estado sólido	225
V.4.	Estabilidad de los sistemas estudiados	226
V.4.1.	Cinética de liberación del huésped de los complejos de ciclodextrina... ..	226
V.4.2.	Estabilidad del timol encapsulado en la matriz del HiCap 100	227
V.4.3.	Comparación de la cinética de liberación del timol encapsulado en un sistema confinado (ciclodextrinas) y en una matriz continua.....	228
V.4.4.	Relación entre propiedades termodinámicas (K_e) de los complejos en solución y la estabilidad (cinética de liberación del ligando) de los mismos en estado sólido.....	228
VI.	CONCLUSIONES	231
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	236

BCD:	β -ciclodextrina
MBCD:	Metil- β -ciclodextrina
HPBCD:	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
CINAM:	Cinamaldehído
CD:	Ciclodextrina
CDs:	Ciclodextrinas
HiCap100:	Almidón modificado HiCap 100.
ΔG^*:	Energía libre de formación de los complejos
ΔH^*:	Entalpía libre de formación de los complejos
ΔS^*:	Entropía libre de formación de los complejos.
K_e:	Constantes de equilibrio de los complejos
So:	Solubilidad intrínseca: Solubilidad del huésped en agua pura.
FTIR:	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.
DRX:	Difractometría de Rayos X.
SEM:	Microscopía Electrónica De Barrido.
HR:	Humedad relativa.
DSC:	Calorimetría diferencial de barrido.
T_g:	Transición vítrea.
% L:	Porcentaje de compuesto o ligando liberado del complejo.
ΔH_t:	Calor de fusión del timol o del cinamaldehído en complejos a tiempo t.
ΔH_0:	Calor de fusión del timol o del cinamaldehído en los complejos recién preparados.
R_0:	% de retención de timol a tiempo cero
R_∞:	% de retención de timol en el equilibrio
k_R:	constante cinética de retención

I.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES COMO INGREDIENTES FUNCIONALES

Los alimentos o ingredientes funcionales son aquellos que proporcionan beneficios fisiológicos no-nutricionales que pueden mejorar la salud. Existen varias acepciones para designar alimentos que reúnen dichas propiedades, tales como nutracéuticos, alimentos de diseño, alicamentos y farmalimentos, de las cuales se emplea más la primera. Este concepto ha sido importante para las industrias de alimentos desde finales de la década de los 90, y responde además a demandas de los consumidores hacia productos naturales y saludables.

Muchos componentes de aceites esenciales cumplen con la definición de ingredientes funcionales. Un paso importante para la aplicación de dichos ingredientes es el diseño de formulaciones y procesos para lograr su estabilización y liberación adecuada.

En este trabajo se seleccionaron el timol y el cinamaldehído como modelo de componentes funcionales hidrofóbicos para estudiar su encapsulación en ciclodextrinas o en una matriz continua. Además de su importante impacto en el aroma de los alimentos, estos compuestos proporcionan beneficios que se describen en las secciones I.1.2 y I.1.3. De manera que su relevancia se debe a ambas características: su impacto en las propiedades organolépticas y en la funcionalidad que imparten a los alimentos.

I.1.1 FLAVOR Y ACEITES ESENCIALES.

Flavor o sabores se refiere al conjunto de sensaciones gustativas y olfativas que genera un producto dispuesto en la boca y son uno de los ingredientes de mayor impacto en la calidad total de una formulación ya que es uno de los factores que influyen y pueden determinar la aceptación del consumidor de un dado producto alimenticio, farmacéutico o cosmético. Si bien en general son usados en cantidades mínimas, las sustancias aromáticas tienen un costo alto y como en general son muy sensibles a los agentes externos (humedad, temperatura, luz, etc.) y volátiles es necesario preservarlos. Esto ha llevado a las industrias alimenticia farmacéutica y cosmética ha desarrollar diferentes técnicas para lograr dicho objetivo mediante la utilización de la encapsulación (sección I.4).

Los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos, de acuerdo a la forma en que son obtenidos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores y debido a su bajo rendimiento son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia en uno o varios de sus componentes, en cambio, los aceites esenciales sintéticos son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales obtenidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.). Sin embargo existe en la actualidad una tendencia en la industria alimentaria a remplazar ingredientes sintéticos por compuestos naturales ya que son percibidos por los consumidores como más saludables (Teixeira et al., 2004) y

así el uso de aceites esenciales naturales se ha incrementado notablemente en los últimos años. Además, algunos componentes aislados de aceites esenciales, o sus derivados, han encontrado aplicación en productos tales como medicamentos, repelentes o atrayentes de insectos (Yúfera, 2007).

El timol y el cinamaldehído, componentes principales del aceite de esencial de orégano y del aceite de canela respectivamente, presentan gran interés por sus potenciales aplicaciones no solo en el campo de los alimentos sino también en las industrias farmacéutica y cosmética.

I.1.2. TIMOL

El timol, 5-isopropil-5 metil fenol, es uno de los terpenoides fenólicos 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 que junto con el carvacrol y p-cimeno constituyen los componentes mayoritarios de los aceites de tomillo y orégano. Puede obtenerse directamente de dichos aceites, por destilación con vapor de agua, debido a que es volátil, aunque también puede ser producido sintéticamente por reacción del m-cresol con el propeno a alta presión y temperatura (Figura I.1):

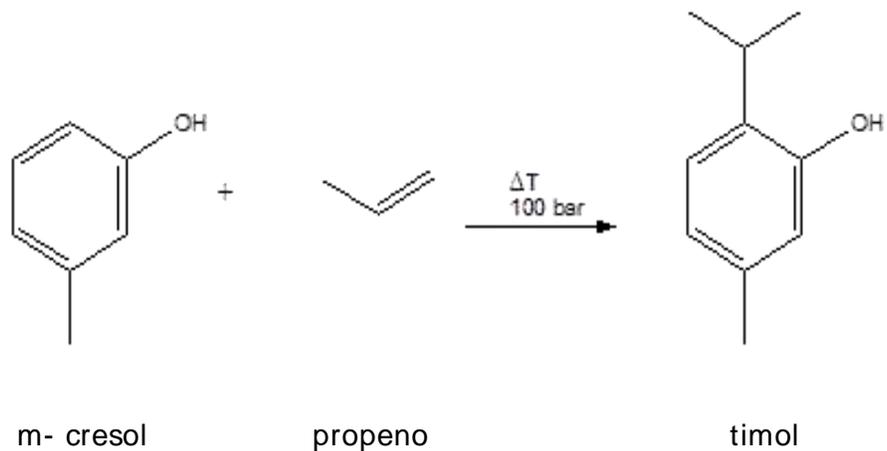


Figura I.1. Síntesis química del timol

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

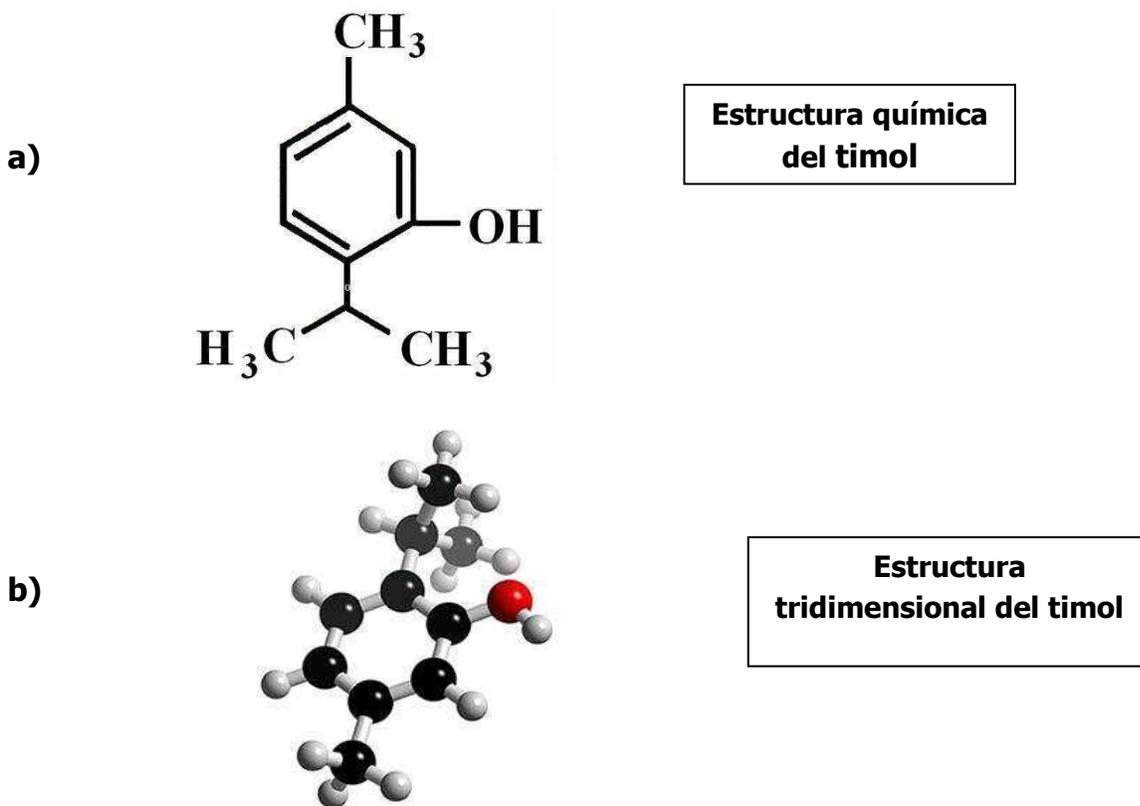


Figura I.2. Estructura del timol: a) química y b) tridimensional

Tabla I.1 Propiedades fisicoquímicas del Timol

Propiedades del Timol	
Nombre Químico	5-isopropil-5 metil fenol
Fórmula Química	C ₁₀ H ₁₄ O
Masa Molecular	150,22 g/mol
Densidad	0,96 g/cm ³
Punto de Fusión	48 – 52° C
Punto de Ebullición	232° C
Solubilidad en Agua	0,08 g/100ml a 25° C
Solubilidad en Alcohol	1,0 g/L a 25° C

Es soluble en alcohol, grasas y aceites, pero poco soluble en agua. En la Tabla I.1 se detallan las propiedades fisicoquímicas del timol.

Ha sido utilizado 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 odontólogos para tratar infecciones orales. (Botelho y col., 2007).

En una investigación sobre aceites esenciales de una variedad de tomillo en Sardinia, Italia, Cosentino y col. (1999) determinaron su actividad antimicrobiana frente a un panel de cepas de referencia y cepas provenientes de alimentos deteriorados, además de bacterias patógenas. Dicha investigación determinó que entre los componentes presentes en el aceite esencial del tomillo, el timol fue uno de los más eficientes frente

a las cepas mencionadas. Entonces se evidenció la posibilidad de utilizar los aceites esenciales del tomillo o de algunos de sus componentes para prevenir el crecimiento de bacterias provenientes de las materias primas usadas y así extender la vida útil de alimentos procesados.

Se ha verificado la capacidad del timol de inhibir el crecimiento de ácaros *varroa* en colonias de abejas (Imdorf y col., 1994). Debido a que los cristales de timol destruyen las esporas fúngicas, se utilizan en la encuadernación para impedir el ataque de mohos en libros (Kordali y col., 2008).

Además de su actividad antimicrobiana, el aceite esencial de tomillo posee propiedades antioxidantes: reduce la actividad del radical estable DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y de los radicales del oxígeno (peróxidos de lípidos, superóxidos, y radicales hidroxilo (Vardar-Ünlü y col., 2003). Por otro lado, una suplementación en la dieta de ratas con aceite de tomillo ayudó a mantener niveles altos de ácidos grasos poliinsaturados en membranas celulares en varios tejidos (Youdim y Deans, 1999).

Finalmente, se ha verificado que posee capacidad antigenotóxica ya que tiene la capacidad de incrementar la actividad de la enzima detoxificante glutatión S-transferasa (GST) cuando se administra oralmente, lo cual sugiere un potencial anti carcinogénico (Arcila-Lozano y col., 2004).

I.1.3. CINAMALDEHÍDO

El cinamaldehído (3-fenil-2-propenal) es un compuesto orgánico responsable del sabor y del olor característico de la canela. Se trata de un líquido amarillo pálido y viscoso que

se presenta de forma natural en la corteza del árbol de la canela y otras especies del género *Cinnamomum*. El aceite esencial de la canela se compone en un 90% de cinamaldehído.

El cinamaldehído fue aislado del aceite esencial de canela en 1834 por Dumas y Peligot, siendo sintetizado en laboratorio veinte años más tarde por Chiozza. De forma natural, existe solo en forma de trans-cinamaldehído.

En la Figura I.3 se muestra la estructura química desarrollada y la tridimensional del cinamaldehído y en la Tabla I.2 se detallan las propiedades fisicoquímicas del cinamaldehído.

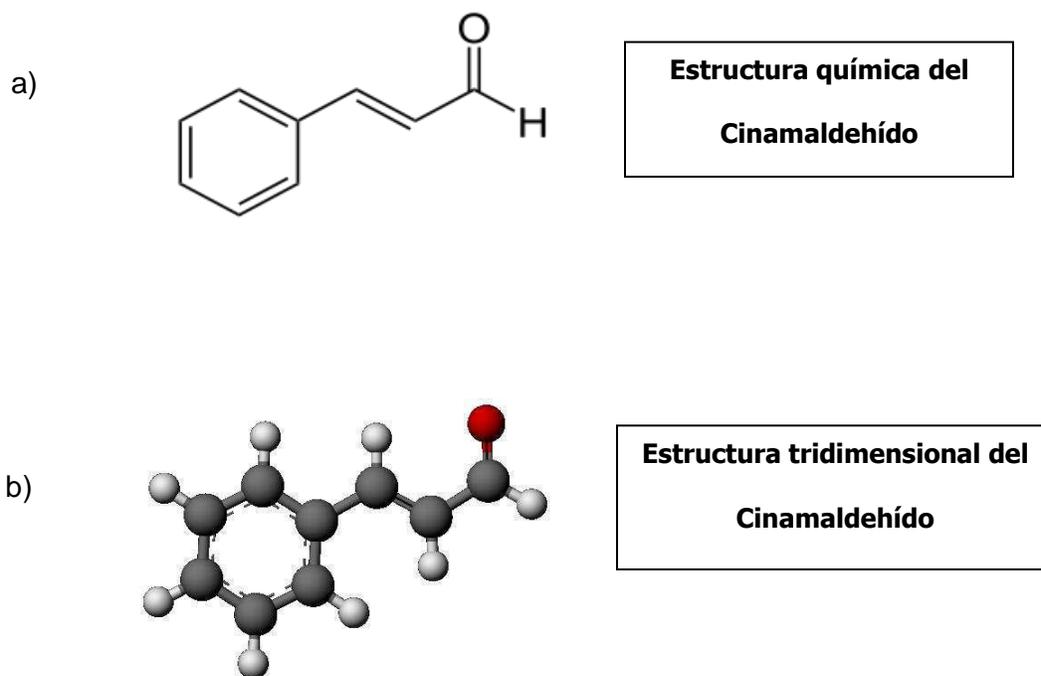


Figura I.3. Estructura del Cinamaldehído: a) química b) tridimensional.

Las aplicaciones más importantes de este compuesto se encuentran en la industria de aromas para productos alimenticios o cosméticos.

Tabla I.2. Propiedades fisicoquímicas del cinamaldehído

Propiedades del cinamaldehído	
Nombre Químico	3-fenil-2-propenal
Fórmula Química	C ₉ H ₈ O
Masa Molecular	132,162 g/mol
Densidad	1,05 g/mL
Punto de Fusión	- 7,05° C
Punto de Ebullición	251° C
Solubilidad en Agua	0,14 g/100 mL

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 relacionar la influencia de los aromas en el comportamiento (Wang y Chen, 2005).

El cinamaldehído también es utilizado, aunque en menor grado, como fungicida en la agricultura. Se ha verificado su efectividad en casi 40 tipos de cultivos, y se aplica generalmente a 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. Por ejemplo, en un trabajo de Roller y Seedhar (2002) se utilizó al cinamaldehído para ver su efecto reductor en la flora bacteriana natural de la fruta de kiwi, observándose su alta efectividad. Además, Di Pasqua y col., (2007) mostraron la actividad antimicrobiana del cinamaldehído contra *E. coli*, *Salmonella* y *S. Aureus*.

I.2. ENCAPSULACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.

Con el objetivo de impedir la pérdida de ciertas sustancias bioactivas presentes de los alimentos, tales como sabores, vitaminas, pigmentos o aceites esenciales, se recurre a técnicas de encapsulación. Mediante estas técnicas se evita que dichos componentes lábiles interactúen con otros compuestos presentes en el alimento o que sufran reacciones de deterioro debido a la acción de agentes externos, tales como luz, oxígeno o humedad. La encapsulación es un proceso mediante el cual se introducen en una matriz o se encierran en una pared (Figura I.4). Una ventaja adicional es que el compuesto encapsulado se puede liberar gradualmente y en el momento deseado del sistema que lo ha englobado o atrapado permitiendo así la liberación controlada de sabores, colores, aromas, drogas, etc. (Popplewell y col., 1995). Además, la encapsulación de ciertos compuestos permite obtener productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales (Dziezak, 1988; Jackson y Lee, 1991; Reineccius, 1991; Popplewell y col., 1995).

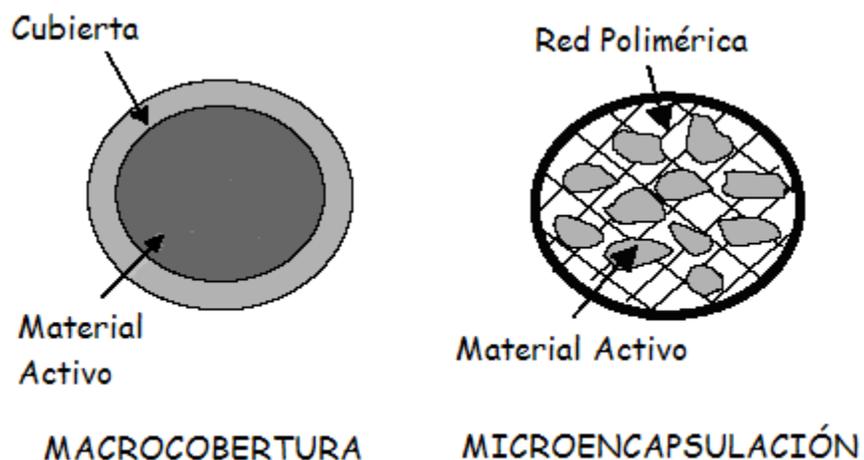


Figura I.4. Tipos de encapsulación de alimentos: macrocobertura y microencapsulación. (Adaptado de Madene y col, 2006).

Las microcápsulas también funcionan como barreras contra malos olores o sabores y ayudan a que los materiales frágiles resistan condiciones de procesamiento y empaque mejorando el sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de los mismos. Mediante la encapsulación de aromas, se reduce su volatilidad o se previenen reacciones indeseables en el alimento aun cuando se almacenen por un periodo prolongado.

I.2.1. MÉTODOS GENERALES DE ENCAPSULACIÓN

Se han desarrollado numerosas técnicas para la encapsulación de ingredientes funcionales. 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.

I.2.1.1. 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 siguiente evaporación del solvente. Entre estos métodos se pueden mencionar:

- Secado por aspersión (*spray*)
- Enfriamiento por aspersión
- Congelamiento por aspersión
- Aspersión en lecho fluidizado
- Extrusión
- Cocrystalización
- Secado por congelación

I.2.1.2. 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 µg. Los procesos químicos de encapsulación comprenden:

- Inclusión molecular
- Polimerización Interfacial

I.2.1.3. 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, y éstos comprenden:

- Separación orgánica de fases
- Coacervación (separación acuosa de fases)

● Inclusión en liposomas

Al momento de seleccionar un proceso de encapsulación deben considerarse factores tales como el tamaño de partícula requerido, propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, aplicaciones para el material microencapsulado, mecanismo de liberación deseado y el costo (Fereidon y y Xiao-Qing, H, 1993; Madene y col., 2006; Onwulata, 2011). En la Figura 1.5 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 cada proceso.

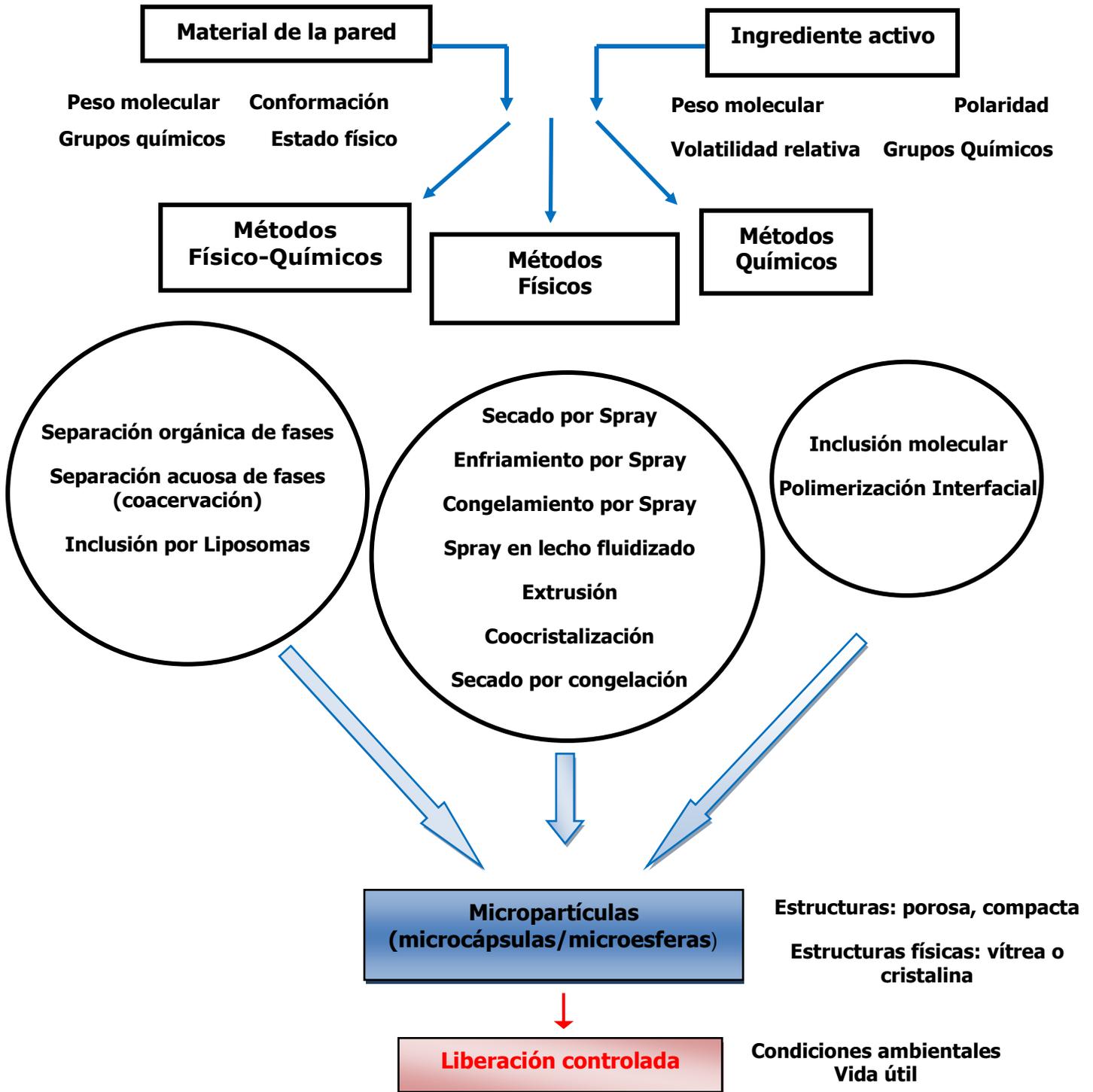


Figura 1.5 Esquema detallando los distintos métodos de encapsulación de ingredientes funcionales. (Adaptado de Madene y col, 2006).

I.3. MATERIALES PARA 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, de las características morfológicas y fisicoquímicas deseadas en la microcápsula final y del método utilizado. 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.

Una matriz ideal para encapsulación debería reunir las siguientes propiedades:

- A altas concentraciones, debe poseer buenas propiedades reológicas y facilidad de manipulación durante el proceso de encapsulación.
- Capacidad 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.
- Poder de sellar y retener el ingrediente activo dentro de su estructura durante el procesamiento y almacenamiento.
- Capacidad de proporcionar la 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 (Fereidon y Xiao-Qing, 1993, Martin del Valle, 2004).

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 comúnmente más utilizados en la industria alimenticia son:

- **Gomas:** Las gomas y espesantes generalmente no tienen sabor, pero sin embargo por interacción pueden producir un efecto en éste 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, goma arábica.

- **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 anfifílicas, 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 película (Madene y col., 2006).

● **Carbohidratos:** Son usados extensamente en la encapsulación de ingredientes alimenticios usados extensamente en la encapsulación de ingredientes por medio de secado spray o liofilización, debido a sus propiedades y forman parte del material de cubierta u hospedador (Reineccius, 1991). Estos materiales son solubles en agua y dependiendo de la concentración, poseen una viscosidad entre baja y alta. Entre los carbohidratos más utilizados están: almidon natural y modificado, maltodextrinas, sacarosa; algunas celulosas como la carboxi-metil celulosa, metil celulosa y etilcelulosa y las CDs, etc.

Las ciclodextrinas (CDs) debido a sus características estructurales y propiedades fisicoquímicas presentan numerosas ventajas respecto a los demás carbohidratos en particular para la encapsulación de compuestos liposolubles como los sabores y aceites esenciales. Por lo tanto, su estudio merece una atención particular que será desarrollada en la sección I.4.1.

I.4. ENCAPSULACIÓN DE FLAVORES

El sabor juega un papel importante en la satisfacción del consumidor y afecta las propiedades organolépticas del producto final como ya se ha señalado en sección I.1. Sin embargo, el uso directo de las mismas ocasiona una serie de inconvenientes:

- Las materias primas no tienen una composición constante. El contenido de sabor 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.

Sin embargo, a pesar de ello aún se presentan dificultades debido a la baja solubilidad que presentan los sabores y aceites esenciales debido a que la gran mayoría de esos son liposolubles, por lo cual se necesita la presencia de vehículos de liberación capaces de aumentar su solubilidad en medio acuoso y consecuentemente mejoren su biodisponibilidad tales como los liposomas o CDs.

La encapsulación de componentes de aceites esenciales se puede dividir en dos grandes grupos de acuerdo a la función principal elegida: 1) la protección del componente durante el almacenamiento (microencapsulación) y 2) la liberación controlada de éste durante el procesamiento del alimento, en la matriz alimentaria y durante el consumo del producto (macrocápsula) (ver Figura I.4). En la Tablas I.3 se presentan diferentes métodos de encapsulación de aromas y los tamaños de partículas que se pueden obtener mientras que en la Tabla I.4 se muestran las aplicaciones de distintos métodos de encapsulación de aromas más utilizados en la industria alimentaria. Los dos procesos industriales que más se usan son: el secado spray y la

extrusión seguidos de las técnicas de inclusión molecular, coacervación y adsorción (Beristain y col., 1996; Goubet y col., 1998).

Métodos de encapsulación de aromas		Tamaño partícula (μm)
Químicos	Coacervación simple	20-200
	Coacervación compleja	5-200
	Inclusión molecular	5-50
Físicos	Secado Spray	1-50
	Extrusión	200-2000
	Lecho fluidizado	> 100

Tamaños de partícula obtenidos por algunos métodos de encapsulación de aromas.

Tabla I.4. Métodos de encapsulación de aromas y su aplicación a diferentes productos.

Métodos	Productos obtenidos	Área de aplicación
Coacervación	Pasta/polvo/cápsula	Goma de mascar, alimentos horneados
Inclusión molecular	Polvo	Bebidas instantáneas, snacks
Secado spray	Polvo	Productos de confitería, leche en polvo, postres instantáneos, aromas, bebidas instantáneas
Extrusión	Polvo/granulado	Bebidas instantáneas
Lecho fluidizado	Polvo/granulado	Productos de confitería
Liofilización	Polvo	Sopas instantáneas, café, postres, etc.

I.4.1.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 se hidroliza parcialmente, se producen dextrinas, que bajo la acción de la enzima ciclomaltodextrin-glucano-transferasa (CGT), se producen dextrinas cíclicas (Figura I.6)

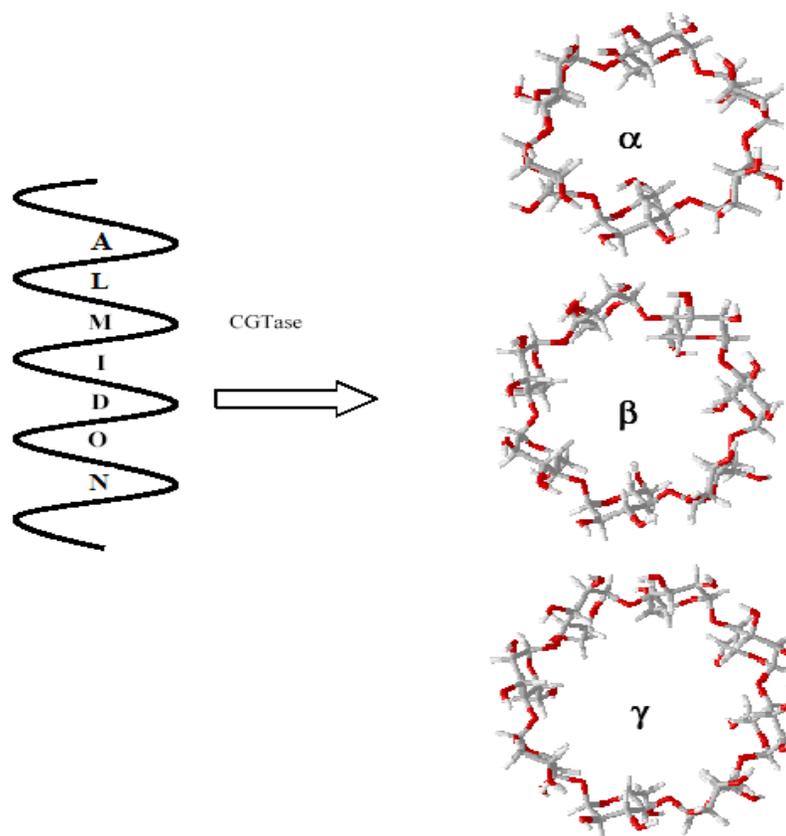


Figura I.6. Representación gráfica de la formación de CDs a partir del almidón adaptada de Bonnet, 2001.

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

I.4.1.1. Breve Historia

Las ciclodextrinas (CDs) 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” (Martin del Valle, 2004). Ya en 1903, las CDs fueron caracterizadas por F. Schardinger como oligosacáridos cíclicos, por lo que en las primeras publicaciones de CDs, éstas fueron denominadas “dextrinas de Schardinger”. En 1938, estudios presentados por K. Freudenberg mostraron que las CDs están construidas a partir de unidades de D-glucosa unidas entre ellas por enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 4) (Bonnet, 2001). La estructura química de las CDs fue también discutida en detalle por Bender y Komiyama (1978) y Saenger y col. (1998). Además se descubrió que las CDs eran capaces de formar complejos de inclusión, cuando empezó a utilizarse la cristalografía de Rayos X para la determinación de estructuras (Martin del Valle, 2004). A partir de ese momento, el estudio de las CDs tomó un impulso considerable, ya que se empezaron a fabricar industrialmente, se sintetizaron CDs modificadas y además se obtuvieron diferentes complejos de inclusión (Bonnet, 2001; Cabral-Marques, 2010).

Recientemente, Dodziuk (2006) editó un libro que ofrece un amplio panorama de los últimos avances obtenidos sobre la estructura, propiedades fisicoquímicas, métodos analíticos de análisis y aplicaciones de las CDs y sus complejos.

I.4.1.2. Estructura y propiedades de las ciclodextrinas.

A las CDs naturales se les asigna un prefijo (una letra griega) que indica el número de residuos de glucosa en el anillo. Los tres tipos de CDs naturales 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 (Figuras I.7 y I.8) y en sus propiedades fisicoquímicas (Tabla I.5). Estas formas naturales de las CDs son cristalinas, no higroscópicas y homogéneas.

Tabla I.5 Propiedades Físicas y Químicas de las CDs 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).

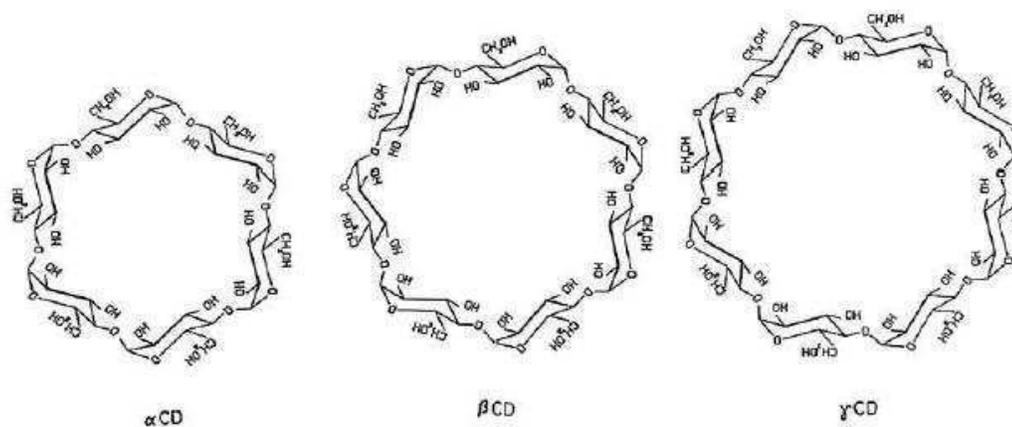


Figura I.7. Estructura y dimensiones de α , β y γ ciclodextrinas (plana)

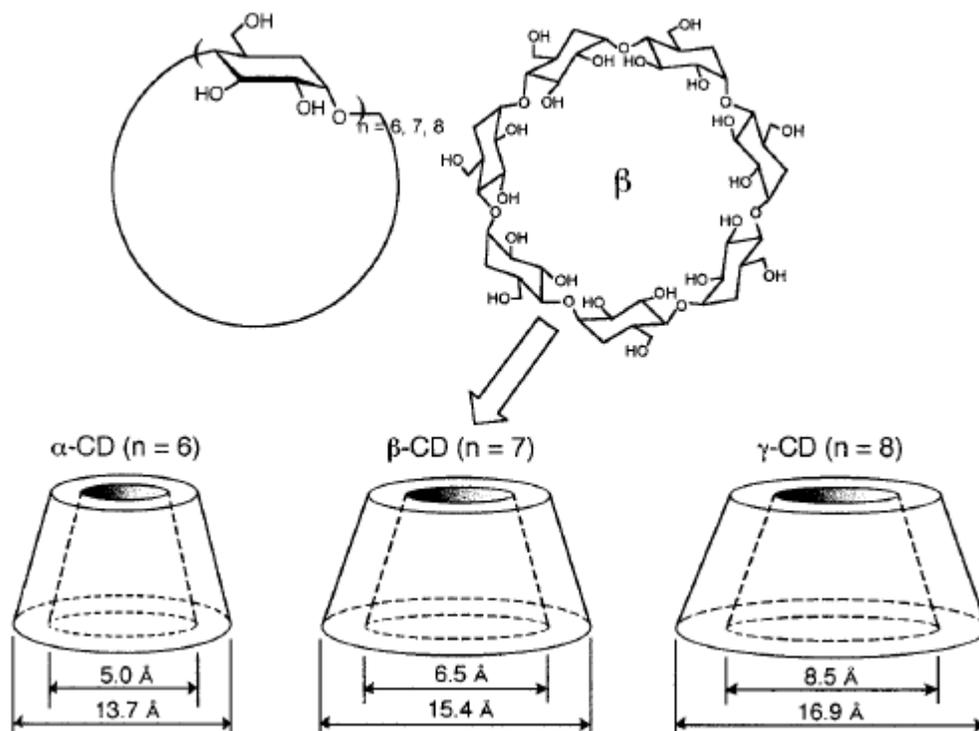


Figura I.8. Estructura y dimensiones de α , β y γ ciclodextrinas (tridimensional)

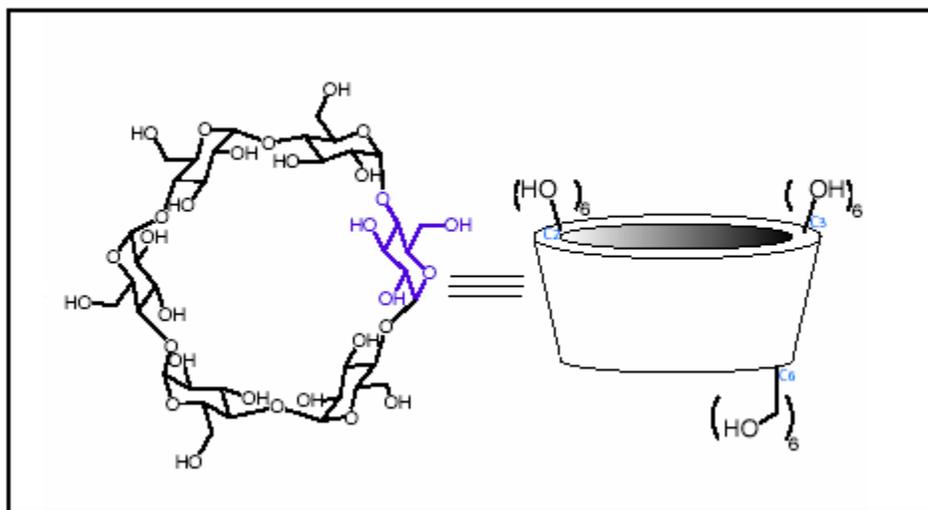


Figura I.9. Estructura tridimensional de la ciclodextrina, mostrando su forma de cono truncado (adaptado de Szente y Szejtli, 2004).

Presentan la forma espacial de un cono truncado (Figura 1.9). Los grupos oxhidrilo secundarios del carbono 2 y 3 están ubicados en la parte más ancha. El grupo oxhidroxilo primario del carbono 6 está ubicado en la zona más angosta del cono y orientado hacia afuera, excepto si la formación del complejo implica la formación de puentes de hidrógeno.

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. En cambio, los grupos oxhidrilo polares de los monómeros de glucosa están orientados hacia el exterior de la molécula de ciclodextrina y consecuentemente la faz externa de las CDs es hidrofílica. Esta distribución de los grupos polares es la que determina la solubilidad en agua de las mismas y sus complejos (Figura 1.10)

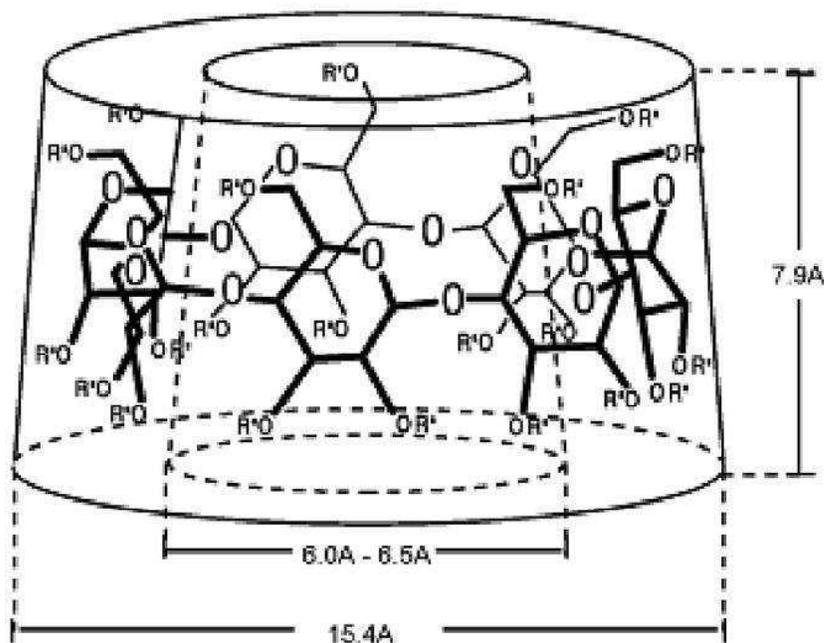


Figura I.10. Estructura tridimensional de la ciclodextrina, mostrando su la distribución de los grupos hidroxilos y glicosídicos (Cabral-Marques, 2010)

Debido a estas características, las CDs pueden ser disueltas en agua y además pueden encapsular diferentes tipos de compuestos hidrofóbicos en su cavidad, especialmente compuestos aromáticos, formando así complejos de inclusión. Entonces la molécula huésped puede ingresar en un medio hidrofílico sin cambiar su solubilidad, ya que es la ciclodextrina la que se disuelve en agua mientras que la molécula huésped está en el interior hidrofóbico de la ciclodextrina, sin tener contacto con el agua (Ponce-Cevallos y col., 2010. Cabral-Marques, 2010, Mazzobre y col, 2009, Szente y Szejtli, 2004). En síntesis las CDs son anfifílicas, y tienen por ende, dos zonas con propiedades diferentes:

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

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

Las fuerzas de unión o asociaciones involucradas en la formación de los complejos son uniones débiles, tales como fuerzas de Van der Waals, dipolo-dipolo, o puentes de hidrógeno. Sin embargo, estas asociaciones son lo suficientemente fuertes para permitir el aislamiento del complejo aún en un ambiente seco (ver sección I.4.2).

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 CD permite su solubilización directa y una dispersión uniforme en agua. Un ejemplo de lo anteriormente mencionado se da con los productos de extrusión.

Muchos de estos tienen el agente saborizante en la cubierta debido a las dificultades halladas al mezclar aceites en una matriz alimenticia. Sin embargo, al formar complejos de inclusión con CDs, 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 CD 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 Mc Bride, 1999), que se traduce en una mayor vida útil, y previene además 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 de ciclodextrina, si se compara con el huésped sin encapsular, el grado de volatilización se reduce notablemente (Hedges y Mc Bride, 1999). Esta reducción es función de la naturaleza del huésped y del equilibrio logrado (Ver sección 1.4.2).

La estabilidad térmica de la estructura de la ciclodextrina permite también que pueda ser utilizada durante ciertos procesos de productos alimenticios, 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 de inclusión, aunque al

enfriarse pueda formarse de nuevo el complejo, una parte se habrá perdido durante el proceso. Químicamente, las CDs son compuestos estables (su temperatura de descomposición es de 280° C). 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. Ciertos ácidos fuertes tal como ácido clorhídrico o sulfúrico, pueden hidrolizar la CD en un cierto porcentaje. En cambio, los ácidos débiles como el ácido acético no pueden hidrolizar la CD. Es importante también destacar que a los valores de pH que normalmente se encuentran en los alimentos, las CDs no pueden hidrolizarse. En síntesis podemos decir que las CDs:

- 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 al 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 capacidad para formar complejos de inclusión, se pueden cambiar drásticamente las propiedades de la molécula huésped (Polyakov y col., 2004a).
- 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 CDs pueden ser consumidas por el ser humano como ingredientes en alimentos, drogas o cosméticos (Szejtli, 1998).

I.4.1.3. DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS.

Cada una de las unidades de glucopiranososa que forman la CD tiene 3 grupos hidroxilos libres. La reactividad relativa de los hidroxilos en los carbonos secundarios 2 y 3 y el primario en el carbono 6 depende de las condiciones de reacción (pH, temperatura, reactivos). En la β -ciclodextrina 21 hidroxilos pueden ser modificados por sustitución de los átomos de H ó OH por una gran variedad de grupos químicos tales como alquil, hidroxialkil, carboxialquil, amino, thiol, glucosil, maltosil, etc. Así, una gran cantidad de derivados pueden ser obtenidos por reacción química o enzimática. El objetivo de tal derivación puede ser:

- Aumentar la solubilidad de la CD y sus complejos en agua.
- Mejorar la ubicación del huésped en la cavidad de la ciclodextrina y/o incrementar la asociación entre ambos y así incrementar la estabilidad, reducir la reactividad y movilidad del compuesto encapsulado.
- Agregar grupos específicos (catalíticos) al sitio activo de una enzima.
- Para formar estructuras insolubles, que contienen CDs inmovilizadas con propósitos cromatográficos.

Existe una infinita cantidad de publicaciones científicas en las cuales se describe la síntesis de gran un número y variedad de derivados de CDs y patentes al respecto. Sin embargo solo algunos pueden ser considerados para su producción a escala industrial y potencial aplicación. Reacciones complicados con múltiples etapas, usando reactivos tóxicos, caros, contaminantes y que requieren purificación por métodos

cromatográficos, son sólo posibles para la producción de derivados a escala laboratorio. Para su producción por toneladas y a precios razonables solo una docena de derivados deben ser considerados (Martin del Valle, 2004; Szejtli, 1998; Uekama y Otagiri, 1987; Yoshida y col., 1988).

Entre los derivados de la β -ciclodextrina (producidos en forma industrial estandarizada) los más importantes son las heterogéneas, amorfas y altamente solubles: 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y la metil- β -ciclodextrina, que corresponden a las evaluadas en esta tesis (Figura I.11). Estos derivados, dependiendo de la modificación realizada producen cambios en la solubilidad de CDs original y pueden modificar su volumen e hidrofobicidad y estabilizar a la molécula huésped, pudiendo provocar cambios en las propiedades físicas, biológicas y químicas de dichas moléculas. Así por ejemplo, una metil- β -ciclodextrina es más hidrofóbica que la β -ciclodextrina y forma complejos más estables pero solubles en agua, que los obtenidos con la β -ciclodextrina.

Aparte de estos derivados neutros es posible también obtener derivados iónicos como la carboximetil- β -ciclodextrina y la sulfobutiléter- β -ciclodextrina.

En la Figura I.12 se muestra un esquema de los derivados principales que es posible obtener a partir de la β -ciclodextrina (BCD).

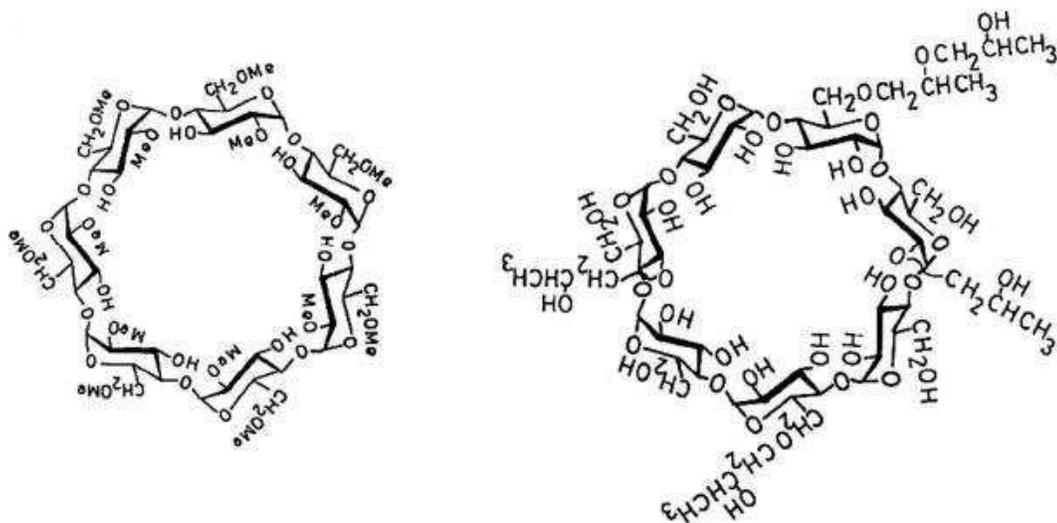


Figura I.11. Estructura de la Metil- β -ciclodextrina y de la Hidroxipropil- β -ciclodextrina

I.4.2. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN HUÉSPED: CICLODEXTRINA. GENERALIDADES

Lindner y Saenger (1978, 1982) notaron que la BCD forma un cristal con 12 moléculas de agua, en el cual la mitad de las moléculas de agua están ubicadas en sitios específicos dentro de la cavidad, y el resto está distribuido en la superficie externa y en los intersticios de las CDs. Las moléculas de agua en la cavidad están en un estado activado y pueden ser fácilmente remplazadas por ligandos capaces de formar complejos de inclusión con las ciclodextrina. Estas investigaciones son consistentes con otros trabajos que predijeron interacciones hidrofóbicas en la cavidad interna y hidrofílicas en la externa (Winkler y col., 2000, Koehler y col., 1988). El complejo de inclusión es la única estructura química en que una molécula (el huésped) es incluida dentro de otro total o parcialmente. Para que esto ocurra la molécula debe tener la forma y tamaño adecuado para ubicarse dentro de la cavidad.

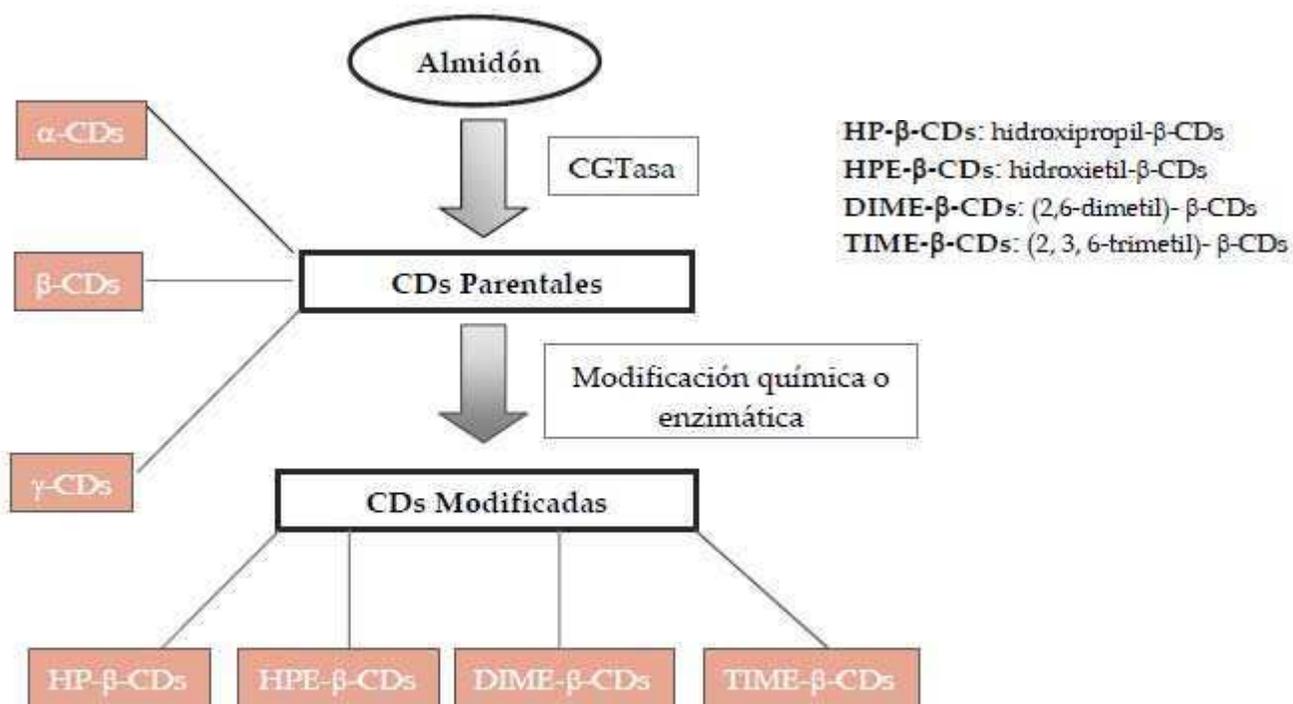
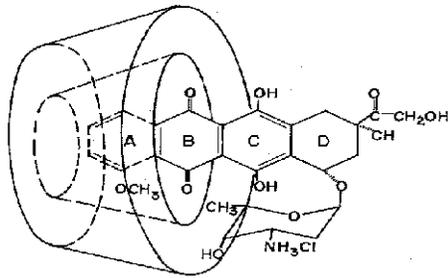
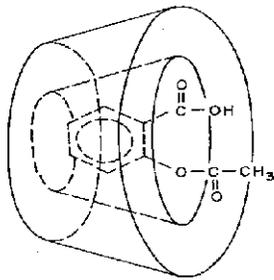


Figura I.12 Tipos de CDs modificadas (Adaptado de Hernández-Sánchez, Pilar, 2011).

La polaridad de ambos, las CDs y el huésped son los factores fundamentales que determinan si la inclusión ocurre o no y en que forma, sin embargo los requerimientos espaciales mencionados anteriormente también son importantes. En efecto, dichos requerimientos pueden determinar si el compuesto es incluido total (Figura I.13 b) o parcialmente (Figura I.13 a).



Complejo
Doxo Rubicán/ β -ciclodextrina



Complejo
Aspirina/ β -ciclodextrina

Figura I.13. Ejemplos de complejos de inclusión con β -ciclodextrina: a) complejo Doxo Rubicán- β -ciclodextrina y b) complejo Aspirina- β -ciclodextrina (Adaptado de Loftsson y Masson, 2004).

I.4.2.1. MECANISMO DE ENCAPSULACIÓN

La formación del complejo de inclusión comprende varias etapas como es ilustrado en la Figura I.14.

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 CDs 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 I.14).

El caso más frecuente y simple en la formación de los complejos es aquel con una estequiometría *ciclodextrina-huésped* de 1:1 (Figura I.15a). Sin embargo, también se dan estequiometrías 1:2, 2:1, 2:2, e incluso otras asociaciones más complicadas (ver Figura I.15b). Los complejos de inclusión formados pueden ser aislados como sustancias cristalinas estables.

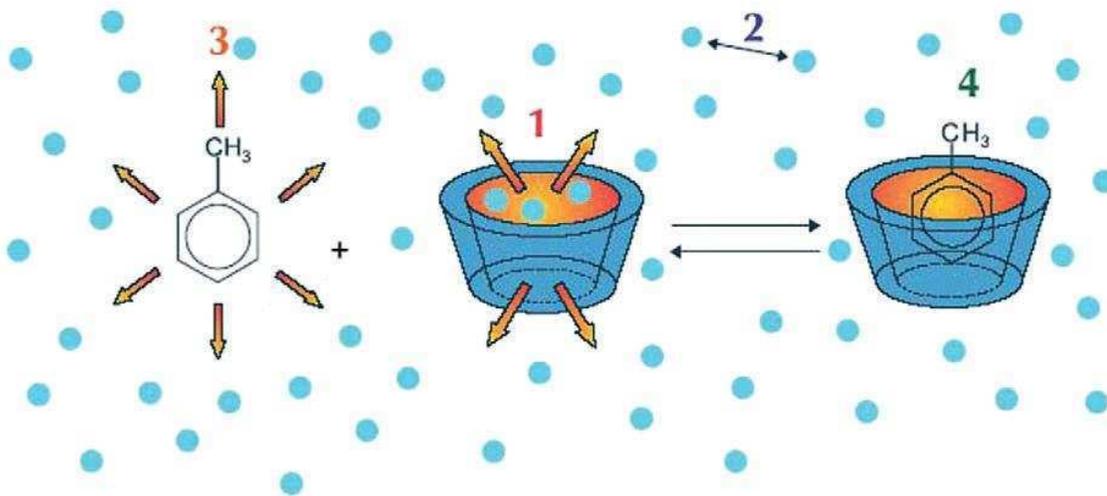


Figura I.14. Representación de la formación de un complejo de inclusión: 1 Desplazamiento de las moléculas de agua de la cavidad de la CD, 2. Formación de puentes de hidrogeno a medida que las moléculas de agua desplazadas pasan al seno de la solución, 3. Disminución de las fuerzas hidrofóbicas repulsivas entre el huésped y el medio acuoso, 4. Incremento de las interacciones hidrofóbicas a medida que el huésped ingresa en la cavidad de la CD (Adaptado del sitio web ISP, 2009).

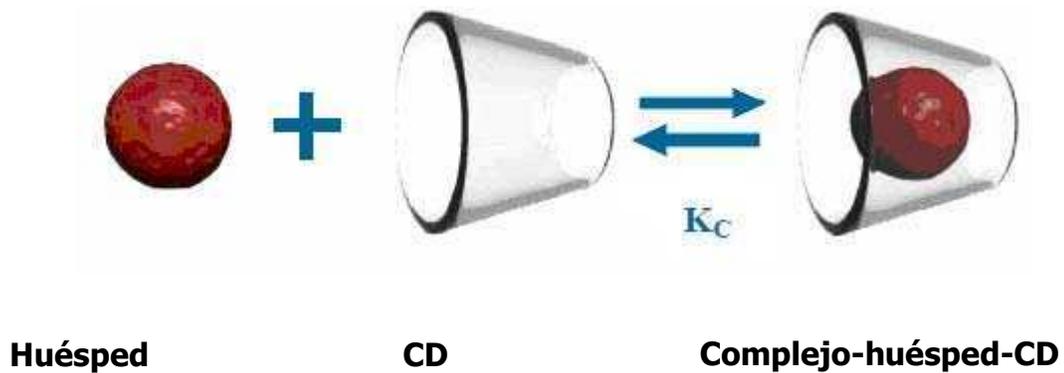


Figura I.15a. Compuesto activo formando un complejo de inclusión con una ciclodextrina en una relación molar de 1:1 (adaptada de Tesis Pilar Hernández Sánchez, 2011).

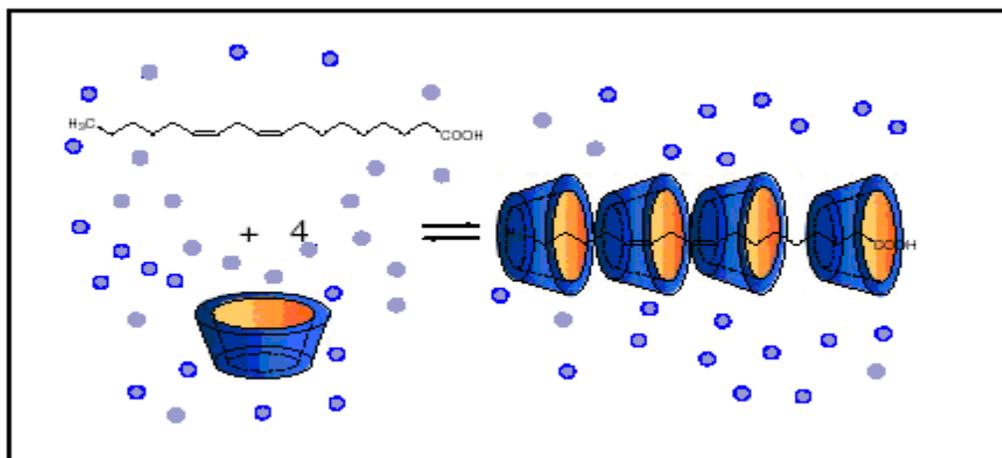


Figura I.15 b. Ácido linoleico formando un complejo de inclusión con α -ciclodextrina en una relación molar de 1:4 (Figura tomada de Regiert, 2007).

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

- La reactividad de la molécula huésped va a disminuir considerablemente, es decir, que es estabilizada. Sin embargo, en algunas ocasiones, las CDs se comportan como una enzima artificial, acelerando ciertas reacciones.
- La difusión y volatilidad de la molécula incluida en la cavidad son fuertemente reducidas.
- La molécula huésped, inicialmente hidrofóbica, empieza a comportarse como hidrofílica una vez que se encuentra en el complejo.

En estado sólido, en cambio, las consecuencias son:

- La sustancia encapsulada está molecularmente dispersa en una matriz de carbohidrato, 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 hidroxilo de la ciclodextrina.
- La sublimación y la volatilidad de la molécula huésped son reducidas notablemente.
- El complejo es hidrofílico, rápidamente soluble y de fácil mojabilidad.

Las interacciones hidrofóbicas sustrato-receptor pueden contribuir en la formación de los compuestos de inclusión. En el caso que el sustrato posea grupos polares capaces de formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la ciclodextrina, las interacciones serán más fuertes y consecuentemente, la estructura del complejo formado más estable.

El mecanismo de "atrapamiento" o encapsulación en ciclodextrinas es diferente que el que ocurre con otros materiales comúnmente utilizados para encapsular como almidón, azúcares, proteínas y gomas (Hedges y Mc Bride, 1999; Astray y col., 2009). La encapsulación en estos materiales, al formarse una matriz continua, es estable mientras que la matriz se mantenga en estado amorfo (ver sección I.8.3). En cambio, cuando el complejo de CD se humedece, se va a establecer un equilibrio entre el complejo, el huésped no encapsulado y la CD, manteniéndose intacta la molécula del complejo (ver Figura I.14).

La cantidad de huésped liberado dependerá de las propiedades fisicoquímicas del ingrediente encapsulado y de la ciclodextrina, pues cada par huésped:ciclodextrina tiene su propia constante de asociación-disociación (sección I.4.2.2) y también de la cantidad de agua disponible para disolver el complejo. Una mayor cantidad de agua favorecerá la liberación de mayores cantidades del huésped encapsulado. Sin embargo, cuando se remueva el agua, el complejo volverá a reconstituirse. Es decir el proceso es reversible.

En la encapsulación en una matriz continua, las asociaciones que mantienen unida a la misma se rompen al humedecerla, causando la liberación del huésped. Sin embargo, la matriz no puede reconstituirse al retirar el agua (como ocurre en la encapsulación molecular) haciendo que el ingrediente no se encuentre más encapsulado y por lo tanto sin protección alguna. Entonces, la existencia del equilibrio entre la ciclodextrina y el huésped y el complejo, permite la reconstrucción de este último y por lo tanto se puede

emplear en aquellos procesos donde intervienen calor y humedad y que llevan a la ruptura de otras matrices poliméricas.

I.4.2.2. Evaluación del proceso de inclusión: constantes de estabilidad y relación molar huésped:ciclodextrina.

Al disolver estos complejos en agua un equilibrio dinámico se establece entre el huésped (G), la ciclodextrina (CD) y el complejo que se expresa por la siguiente ecuación:



n = número de moles of CD

m = número de moles del huésped

A partir de este equilibrio la constante de formación (k_F) y disociación (k_D) pueden ser obtenidas. Los valores de dichas constantes son función de la estructura química, forma y tamaño del huésped y la CDs, así como de las propiedades fisicoquímicas del medio. Las constantes de estabilidad de los complejos (K_e) es uno de los más importantes parámetros del proceso de encapsulación ya que está asociada a la estabilidad de los mismos y pueden ser definidas como:

$$K_e = \frac{k_f}{k_d} \quad (1.2)$$

En solución, los parámetros fundamentales del proceso de inclusión (K_e , estequiométrica y parámetros termodinámicos) pueden ser obtenidos y el equilibrio de la reacción I.1 puede ser controlado, desplazándola en la dirección deseada por modificación de las condiciones del medio (pH, concentración de reactivos, polaridad del solvente y/o adición de moléculas competitivas) o eligiendo el tipo o derivado de ciclodextrina más adecuado (Cabral-Marques, 2010).

Higuchi y Connors (1965) estableció una clasificación de los complejos de acuerdo al perfil que presentaban en el diagrama de solubilidad de fases (Figura I.16).

Para obtener dicho diagrama, a una solución con una concentración del huésped en exceso respecto a la solubilidad, se le agregan concentraciones crecientes de la CD. Se espera que el sistema llegue al equilibrio y se determinan las concentraciones del complejo, la CD o el huésped evaluando una propiedad física o química adecuada. Diferentes métodos pueden utilizarse para alcanzar este objetivo: espectroscopia, absorptividad molar, titulación potenciométrica, corrimientos de NMR, tiempos de retención en HPLC, pK_a (Chadha y col., 2004). El tipo **A** indica la formación de complejos solubles y los tipos **B** sugiere la formación de complejos poco solubles, B_s de solubilidad limitada y B_i la formación de complejos insolubles. Los complejos tipo **A** están subdivididos en categorías, A_L lineal (la concentración del huésped se incrementa con la concentración de la CD), A_P que presentan una desviación positiva de la linealidad y A_N que presentan una desviación negativa de la linealidad.

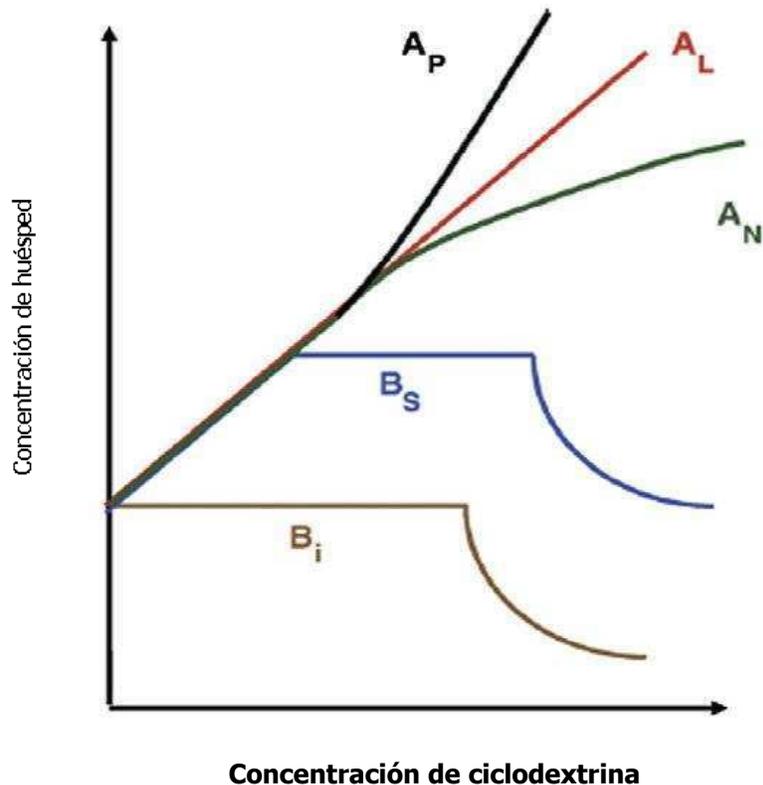


Figure I.16. Curvas de solubilidad de fases y clasificación de complejos según Higuchi y Connors (1965).

En el caso particular de los complejos CD-huésped 1:1 la constante de equilibrio (K_e) resulta:

$$K_{e1:1} = \frac{[\text{complejo}]}{[\text{CD}][\text{Huésped}]} \quad (1.3)$$

Además para este tipo de complejos la constante de equilibrio (K_e) puede obtenerse a partir del diagrama de solubilidad de fases ((Figura I.16, tipo A_L) por medio de la siguiente ecuación:

$$K_e = \frac{\text{Pendiente}}{S_o(1 - \text{pendiente})} \quad (1.4)$$

Donde S_0 es la ordenada al origen y representa la solubilidad del huésped en agua pura (en ausencia de CD en el medio) y *pendiente* es la pendiente de la parte lineal de la curva en el diagrama de solubilidad de fases.

La constante de equilibrio (K_e) puede determinarse por otros métodos, además del estudio de solubilidad de fases mencionado anteriormente. En efecto la misma puede evaluarse por conductometría, potenciometría, polarografía, dicroísmo circular, NMR, UV-visible espectroscopia, HPLC (Cabral-Marques, 1994), HPLC (Lederer y Leipzig-Pagani, 1996).

El estudio de solubilidad de fases también permite determinar los parámetros termodinámicos involucrados en la formación del complejo: energía libre (ΔG^*), entalpía (ΔH^*) y entropía (ΔS^*) de formación determinando la K_e a diferentes temperaturas.

I.4.2.3. Relación entre las constantes de equilibrio (k_e), las propiedades del complejo y su estabilidad.

La magnitud del valor de K_e de los complejos es de gran importancia ya que determina sus posibilidades de aplicaciones prácticas. En general, los valores comprendidos entre 100 y 5000 M^{-1} , parecen ser los más adecuados. Complejos muy lábiles resultan en una liberación prematura del huésped (debido a una interacción débil o un incremento bajo de la solubilidad). Por otra parte, complejos muy estables (alta K_e) produce una liberación retardada o incompleta del huésped y entonces la absorción del huésped es impedida o dificultada. Así, usando este concepto de liberación modificada, se puede alcanzar la liberación de fármacos (Cabral-Marques, 1994) y

flavores (Numanoglu y col., 2007). En efecto, esos valores pequeños de K_e mejoran notablemente las propiedades fisicoquímicas, bio-farmacéuticas, y fármaco-técnicas de una droga y/o otras moléculas respecto al de estado libre.

En general, para los complejos formados en solución, la relación molar huésped-ciclodextrina es 1:1 salvo para los huéspedes con cadenas largas o moléculas bifuncionales (huésped con dos anillos aromáticos en extremos opuestos de una pequeña molécula). En el caso particular de los sabores, como la mayoría de ellos son mono y sesquiterpenoides o derivados del fenilpropano, con un peso molecular de 120 a 160, la estequiometría habitual es 1:1 (Szente y Szejtli, 2004). Sin embargo en la bibliografía existen otras relaciones huésped:CD tales como alilisocianato:BCD (1:2) (Li y col., 2007) y (-)- α -bisabolol:BCD (Waleczek y col., 2003).

Las sustancias naturales responsables del aroma consisten en varios componentes. Entonces, es importante que todos esos componentes puedan ser incluidos en la CD. Así, en una mezcla de potenciales sustancias a ser incluidas en una ciclodextrina el que primero va a ser incluido es el más hidrofóbico. En la Tabla I.7 se muestra una gran variedad de sabores encapsulados en β -ciclodextrina (Astray y col., 2009).

La formación y estabilidad de los complejos de inclusión, con estequiometría superior a 1:1 va a depender de varios factores: compatibilidad geométrica (tamaño y forma geométrica del sustrato con respecto a la CD), polaridad del sustrato, propiedades fisicoquímicas del solvente (polaridad, pH, fuerza iónica, viscosidad, etc).

Tabla I.7. Cantidad de diferentes sabores encapsulados en β -ciclodextrina

Flavor	Cantidad incluido en el complejo (%)
Aceite de anís	9
Benzaldehído	8,70
Carvacrol	10,5
Aceite de canela	8,76
Aceite de limón	8,75
Aceite naranja	9,20
Aceite de menta	9,70
Aceite de timol	9,60
Vainillina	6,20

I.5. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN. CONSIDERACIONES GENERALES.

Los complejos se pueden obtener por diferentes métodos. La elección del más adecuado es muy importante, pues esto puede determinar la efectividad del proceso de inclusión molecular (Challa y col., 2005; Cabral-Marques, 1994) y es función de las siguientes variables:

- Las propiedades fisicoquímicas del material activo y la naturaleza de la ciclodextrina utilizada (tipo y naturaleza de los sustituyentes, en el caso de los derivados).
- La cinética de equilibrio del complejo.
- Los ingredientes adicionales utilizados en la formulación y el proceso de obtención.

En efecto la adición de pequeñas cantidades de polímeros solubles en agua puede incrementar la capacidad de la ciclodextrina de solubilizar un huésped, por aumento de K_e (Loftsson y Masson, 2004). Por otra parte, otros aditivos pueden competir por la cavidad de la ciclodextrina y así disminuir K_e , por ejemplo sustancias con efectos hidrotrópicos positivos o negativos (Challa y col., 2005).

En síntesis no existe un único método o proceso para obtener los complejos. Para cada compuesto a encapsular se debe desarrollar un proceso. Sin embargo, a escala de laboratorio, el método más frecuentemente utilizado es coprecipitación seguido de liofilización.

En general el proceso de obtención de los complejos consiste en la agitación o mezclado de la solución acuosa de la ciclodextrina con el huésped puro o en solución (fría, caliente, acida o básica). Una vez alcanzada el equilibrio el agua es eliminada por secado spray, liofilización u otro método conveniente. En base a esto podemos considerar que el proceso de obtención de los complejos sólidos comprende dos etapas: a) preparación de los complejos y b) secado de los complejos preparados por alguno de los métodos que se describirán en la siguiente sección.

I.5.1. Métodos de preparación de los complejos de inclusión

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

- 1)** Coprecipitación
- 2)** De mezcla espesa (*slurry*)
- 3)** De pasta (*kneading*)
- 4)** Métodos de mezclado en seco.
- 5)** Liofilización
- 6)** Secado *spray*

Los tres primeros 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.4.2). 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 compuesto huésped.

En algunos casos, el agua también es necesaria para mantener la integridad del complejo. Está presente en los cristales del complejo y además puede formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las moléculas de CDs 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 continua. 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 BCD es la menos soluble de las CDs, antes de añadir el ingrediente a encapsular, la solución de ciclodextrina, se calienta hasta 60° C para disolver la BCD. 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 luego se separa por filtración (Duchêne y Wouessidjewe, 1990; Hirayama y Uekama, 1987; Tokumura y col., 1984)

Este método es el más utilizado en el laboratorio. Tiene la ventaja que fácilmente se puede verificar 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 viabilidad 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 de mezcla espesa o *slurry*

En este método la CD 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 mezcla de las CDs con el compuesto. Además, como las CDs necesitan disolverse por completo para formar los complejos, a medida que va formándose el complejo y precipita, mayor cantidad de ciclodextrina se disuelve para formar más complejo.

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 o *kneading*

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.5.2

4) Método de mezclado en seco

Este método no requiere de agua en el mezclado de la CD 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 este caso, el compuesto encapsulado estaría sirviendo también de solvente para la CD.

5) Liofilización

En este método a una solución acuosa de ciclodextrina, el huésped seco o disuelto en la proporción adecuada, es adicionado con agitación hasta obtener una solución límpida. La solución mixta obtenida es liofilizada. El sólido obtenido lavado con dietil

éter (eliminar restos de huésped no encapsulado) y secado al vacío (Junco y col., 2002; Fujioka y col., 1983). Sin embargo, en algunos casos las 2 últimas etapas pueden omitirse.

Este método es el más adecuado para compuestos hidrosolubles ya que la CD y el huésped pueden ser disueltos en agua antes del secado y para compuestos termolábiles (Szejtli, 1982). Además, produce un polvo seco con un alto rendimiento de complejo (Jones y col., 1984).

6) Secado spray

El huésped y la ciclodextrina son disueltos en agua y si fuera necesario cantidades pequeñas de hidróxido de amonio, etanol u otros co-solventes son adicionados para obtener una solución límpida antes del secado. Las variables del secado (temperatura de entrada y salida, caudal y concentración de la corriente de alimentación, etc.) debe ser ajustado de acuerdo al sistema a secar (Cabral-Marques y Almeida, 2009; Almeida y Cabral-Marques, 2004). Este método es solo adecuado para sustancias termoestables ya que se usan temperaturas entre 50 y 70° C.

I.5.2. Secado de los complejos. Consideraciones generales

En el caso de los complejos generados mediante los métodos 1 a 3 de la sección anterior, es necesario la eliminación de agua para obtener los complejos secos. En estos casos 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 (ver sección 1.4.2). 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 método para eliminar el agua del complejo, tal como liofilización, secado spray, secado en lecho fluidizado o secado al vacío. Las propiedades del complejo tienen también que tenerse en cuenta para la elección del método de secado a utilizar.

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 pueden ser necesarios aplicar ciertos ajustes en la temperatura. 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, también se puede perder el compuesto encapsulado debido a su liberación, resultado del equilibrio establecido por el complejo con el agua presente.

I.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.

La formación de complejos de inclusión puede detectarse por métodos muy diversos, gracias a las modificaciones que se producen en las propiedades de la molécula encapsulada. Estas modificaciones pueden ser físicas (solubilidad, tensión superficial); químicas (reactividad, variaciones en el valor de las constantes de ionización ácido-

base) o espectroscópicas, tanto modificaciones cualitativas (posición de los máximos) como cuantitativas (variaciones en el coeficiente de absorción molar o en la intensidad de fluorescencia) de los parámetros espectrales. Entonces, la interacción entre el huésped y la ciclodextrina puede estudiarse por un gran número de métodos a saber:

- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termo gravimétrico (TGA).
- Resonancia Magnética Nuclear (NMR).
- Difractometría de Rayos X,
- Espectroscopía infrarroja
- Espectroscopía Raman
- Microscopía electrónica de barrido
- Solubilidad de fases
- Espectroscopia Visible y Ultravioleta
- Métodos ópticos
- Espectroscopia de Fluorescencia
- Espectroscopia de masa
- Cromatografía

I.6.1. MÉTODOS PARA ANALIZAR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS EN ESTADO SÓLIDO.

I.6.1.1 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 Reineccius, 1990).

En líneas generales, el comportamiento térmico de las CDs naturales (α, β, γ) es similar, aunque se van a encontrar diferencias en el contenido de agua y las temperaturas del comienzo 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 de ebullición por debajo de 300° C, que es la temperatura a la cual se descomponen las CDs. En la sección Materiales y Métodos se describiera su aplicación concreta a las ciclodextrina y sus complejos

I.6.1.2. 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.

El estudio de los complejos con CDs 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). Locci y col., (2004) utilizaron esta técnica para determinar la formación de complejos de inclusión de la CDs con eugenol, carvacrol y timol (componentes de aceites esenciales).

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. La espectroscopía NMR permite entonces, comprobar fehacientemente que el complejo se ha formado (Polyakov y col., 2004a y b).

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 determinar 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 determinar la formación del complejo de Inclusión.

I.6.1.3. 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 las CDs naturales o el huésped cristalino son sometidas a la difractometría 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. Esta técnica es sumamente útil para verificar la formación de complejos de inclusión en el caso de huéspedes líquidos. En efecto, ya que estos no presentan ningún patrón de difracción, si son incluidos se va a obtener un difractograma con un patrón bien definido (Szejtli, 1982).

I.6.1.4. Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía infrarroja por 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 puede ser utilizada para determinar la formación de ciertos tipos de 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, se produce un corrimiento o disminución de la intensidad de ciertas bandas características del espectro correspondiente al huésped. Sin embargo, dichos cambios son muy sutiles, debido a que el huésped representa un 5-10% del peso total del complejo, por lo cual requiere una interpretación cuidadosa del espectro (Hedges, 1998).

A pesar de las limitaciones mencionadas anteriormente, en ciertos casos los cambios en el espectro indican la formación fehaciente del complejo. Así, la banda correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo que aparecen entre 1650 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} en el huésped libre se corre a mayores números de onda en el complejo (Szejtli, 1982). Por ejemplo la banda que aparece a 1700 cm^{-1} en los esteres de ácido p-hidroxibenzoico se corre 40 cm^{-1} en el complejo. Igualmente el espectro de transformada de Fourier (FTIR) del carvone y el limoneno en la región entre $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ presenta una banda a 1730 debido al estiramiento del grupo carbonilo que permite determinar si ha ocurrido o no la inclusión (Partanen y col., 2002)

En conclusión, podemos decir que la aplicación de el método de infrarrojo se limita a aquellos huéspedes que tienen ciertas bandas de absorción características como los grupos carbonilo, hidroxilo o C-H u otros que permitan evaluar si existen diferencias entre los espectros del huésped libre y encapsulado (Ribeiro y col., 2003).

I.6.1.5. Espectroscopía Raman

Esta técnica es complementaria del IR y la información que aporta es semejante. Las bandas se desplazan y se modifican como consecuencia del proceso de inclusión. Probablemente, la espectroscopia Raman resulta de mayor utilidad en el caso de complejos en medios líquidos, donde la presencia de soluciones acuosas no supone un obstáculo, como ocurre en el caso de la espectroscopia IR (Rao y col., 2006).

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. Esta dispersión está dirigida en todas las direcciones, excepto en la de la propia dirección del dipolo (Skoog y col., 1992).

I.6.1.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En esta técnica se barre mediante un barrido 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.

La microscopía electrónica da entonces una información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos. Esto 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, que hacen que la técnica seleccionada sea más sensible o confiable para el complejo en particular.

I.6.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE COMPLEJOS EN SOLUCIÓN.

La mayoría de estos métodos permiten la caracterización del complejo mediante el cálculo de su estequiometría y sus constantes de asociación. En general puede hablarse de estequiometría 1:1 para la mayoría de los complejos con CDs. Sin embargo, si la molécula huésped es demasiado grande para el tamaño de la cavidad, pueden producirse asociaciones de dos moléculas de CDs por cada molécula huésped. Si por el contrario la cavidad es lo suficientemente grande como para alojar a dos moléculas huésped, la estequiometría anteriormente citada se invierte. El cálculo de la constante de asociación que define la estabilidad del complejo, puede llevarse a cabo en virtud de la variación de alguna de las propiedades físicas o químicas de la molécula huésped al producirse la inclusión. Esta variación puede relacionarse con la concentración de CDs, lo que permite el cálculo de la constante de estabilidad.

I.6.2.1. Método de solubilidad de fases

Este método se basa en la obtención del diagrama de solubilidad de fases tal como se ha descrito en la sección I.4.2.2

I.6.2.2. Espectroscopía Visible y Ultravioleta

Constituye, junto con el dicroísmo circular (DC), una de las técnicas instrumentales más utilizadas en la detección de complejos de inclusión de CDs en solución. Su utilidad reside en el hecho de que es una técnica versátil, de muy sencillo manejo, al mismo tiempo precisa, por lo que proporciona datos de gran fiabilidad en el cálculo de la K_e . Es una técnica de amplia aplicación ya que la mayoría de las moléculas orgánicas absorben en la región UV o visible del espectro, experimentando variaciones en las posiciones de los máximos de absorción (cualitativas) o en el valor del coeficiente de absorción molar (cuantitativas), tras la formación del complejo con CDs. Asimismo, ha de considerarse que numerosas moléculas orgánicas son débilmente solubles en agua, por lo cual, al no dar lugar a soluciones homogéneas, son difícilmente analizables por esta espectrofotometría. Sin embargo, la inclusión produce la solubilización, lo cual permite obtener el espectro de absorción en solución acuosa, pudiéndose producir variaciones en su espectro comparables a las que se observarían al disolver la molécula en solventes de baja polaridad, con respecto a otros solventes más polares (Basan y col., 2001).

I.6.2.3. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular permite la detección de complejos de inclusión con CDs en solución acuosa. La formación de complejos de inclusión induce actividad óptica en compuestos que no la poseen, debido al proceso de inclusión en sí y a los cambios conformacionales que se producen en la cavidad de la ciclodextrina. El signo de la

actividad rotatoria o efecto Cotton inducido, depende de la relación espacial entre el centro de simetría y el cromóforo perturbado. La intensidad del efecto depende de la rigidez del complejo formado.

I.6.2.4. Espectroscopía de Fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia (Benesi y Hildebrand, 1949; Scatchard, 1949), es una técnica de gran utilidad en el estudio de los complejos de inclusión, fundamentalmente debido a su extrema sensibilidad. Esta característica, las hace apropiadas para estudiar los cambios conformacionales que se producen en las moléculas al pasar del estado fundamental al excitado, así como para profundizar en la geometría de los complejos de inclusión.

La detección del complejo puede establecerse en función de los cambios espectrales observados, tanto en el espectro de excitación como en el de emisión, en la mejora o incremento de la intensidad de la luminiscencia, el rendimiento cuántico, las variaciones en los tiempos de vida de los estados excitados.

I.6.2.5. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), tal como ocurre en el estado sólido, proporciona información muy valiosa, debido a que el estudio de los espectros de RMN permite esclarecer las relaciones geométricas y la disposición de la molécula huésped en el interior de la cavidad de las CDs, así como las características dinámicas de los complejos en solución acuosa, a partir de las variaciones en el valor

del desplazamiento químico y de las constantes de acoplamiento (Harabagiu y col., 2004).

Aunque se pueden realizar distintos tipos de RMN, los más difundidos son de ^{15}N , ^1H y ^{13}C . La ^1H -RMN permite la obtención de espectros en solución acuosa deuterada. Puesto que la mayoría de los complejos con CDs se estudian en agua, es la más aplicada. Sin embargo, por regla general, los complejos con CDs presentan una solubilidad en D_2O muy baja, lo que dificulta la obtención de los mismos al tener que trabajar a bajas concentraciones de CDs. Por el contrario, la ^{13}C -RMN permite la obtención de los espectros en agua donde la solubilidad es mayor, pero dado que es menos sensible, necesitan emplearse concentraciones más elevadas de CDs y complejo.

El empleo de otros disolventes orgánicos deuterados puede alterar y descomponer el complejo. El DMSO o el dioxano, parecen ser los más apropiados debido a su elevada polaridad, a la vez que contribuyen a mantener la estabilidad del complejo.

La detección de complejos de inclusión mediante esta técnica, se basa en las variaciones en el valor del desplazamiento químico de los protones (δ).

I.6.2.6. Cromatografía

La formación de complejos de inclusión con CDs solubles en la fase móvil que se emplea en un proceso de separación cromatográfica, altera los valores del tiempo de retención. Así pues, cuando en cromatografía líquida se añaden CDs a la fase móvil, los tiempos de retención se acortan, dependiendo del valor de la constante de asociación del complejo (Hioki, 1977). En consecuencia, estudiando la variación en el valor del

tiempo de retención con respecto a la concentración de CDs puede calcularse el valor de la K_e de los complejos (Barr y Spach, 1978; Uekama y col., 1998). La modificación de estos parámetros cromatográficos se ha empleado con fines analíticos (Muñoz de la Peña y col., 1991).

I.7. APLICACIONES DE LAS CICLODEXTRINAS Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Como ya se describió cada molécula de agente activo es complejado por una molécula de ciclodextrinas produciendo una microencapsulación. Esto produce cambios drásticos en las propiedades químicas y físicas de la molécula huésped, como ya se ha señalado en la Sección I.4.2.

Esas características de las CDs, hacen que sean adecuadas para su aplicación en diferentes campos como: química analítica, agricultura, farmacia, industria alimentaria y cosmética (Singh y col., 2002).

I.7.1 Cosmética y aseo personal

En este sector, el empleo de CDs está ampliamente extendido, ya que estabilizan los compuestos de interés, permiten el control de olores desagradables y mejoran la conversión de un ingrediente líquido en sólido. Esto se aplica en pastas de dientes, cremas sólidas y líquidas para la piel, suavizantes para la ropa, toallitas de papel, tejidos y desodorantes, aumento de la solubilidad de sustancias en agua y una mayor estabilidad térmica de los aceites.

Las CDs interaccionan con los compuestos volátiles impidiendo su volatilización y produciendo fragancias de larga duración (Prasad y col., 1999). En la preparación de productos de baño, las CDs regulan la salida de la fragancia al formar complejos de inclusión con éstas y con fosfato de calcio (Tatsuya, 1999) y también se utilizan para secuestrar aromas y así reducir los olores corporales (Trinh y col., 1999). El polvo seco de CDs, con un tamaño de partícula inferior a 12 μm , se utiliza para el control de olores en pañales, productos menstruales, toallitas de papel y preparaciones para el cuidado del cabello con el fin de proteger los mercaptanos volátiles.

Las CDs se han empleado en pasta de dientes a base de sílice para aumentar casi tres veces la disponibilidad de triclosán (agente antimicrobiano) (Loftsson y col. 1999). De forma similar las CDs se utilizan en los autobronceadores y cremas para estabilizar la emulsión y mejorar su aplicación, haciendo el bronceado más natural que los tintes tradicionales a base de dihidroxicetona tradicional (Scalia y col., 1999).

I.7.2 Industria alimentaria

En la industria alimentaria, las CDs se han utilizado como agentes complejantes de vitaminas, colorantes alimentarios y aromas (Buschmann y Schollmayer, 2002; Szejtli, 1998; Loftsson y Brewster, 1996). También se han usado para la protección del flavor en los alimentos durante el procesado y almacenamiento y retener compuestos en determinados procesos industriales, por ejemplo para eliminar colesterol en leches, mantequilla o huevos (Jung y col., 2008; Kwak y col., 2004) (Figura I.17).

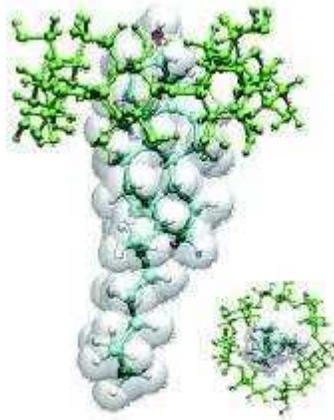


Figura I.17. Complejo de inclusión colesterol-ciclodextrina

I.7.2.1. Ciclodextrinas como agentes atrapadores de sabores

La formación de complejos de inclusión con sabores, ofrece una protección efectiva de cada uno de los sabores que hay en un alimento. Esta encapsulación molecular, inhibe o excluye las interacciones moleculares entre los diferentes componentes naturales o sintéticos que dan sabor a los alimentos.

I.7.2.2 Ciclodextrinas como agentes protectores frente a la oxidación por oxígeno

Hay sabores o ingredientes alimentarios sensibles al oxígeno (ácidos grasos no saturados, colorantes, etc.) que al ser complejados con CDs, mejoran su estabilidad química. Este efecto fue descrito en 1987 por Szente y Szejtli, que midieron el consumo de O_2 para registrar su efecto sobre ingredientes libres o complejados. Los resultados de estos experimentos y otros posteriores mostraron que la complejación con CDs impide casi totalmente las alteraciones químicas del sabor, debidas a la

presencia de oxígeno, incluso cuando se almacena el alimento en atmósferas de oxígeno puro (Szente y Szejtli 1987, 2004).

I.7.2.3. Ciclodextrinas como agentes protectores frente a la luz

Numerosos componentes de los alimentos son sensibles a la luz, como en el caso del citral (componente responsable del olor a cítricos frescos) que en presencia de luz UV se transforma en fotocitral A y fotocitral B y le confieren al alimento un aroma y sabor no deseados. Cuando el citral es complejado con BCD, no se observan productos de descomposición en las 6 primeras horas de exposición del alimento a la luz (Szejtli y col., 1979). Resultados similares se obtuvieron al complejar el cinamaldehído con BCD, estabilizándolo frente a la luz UV (Szente y Szejtli 1987, 2004).

I.7.2.4. Ciclodextrinas como agentes protectores frente a la temperatura

Los complejos formados con sabores volátiles o aceites esenciales, en estado sólido, poseen una notable resistencia al calor, de hecho al comparar con las formulaciones tradicionales, la retención de dicho sabor en el alimento mejora mediante el empleo de CDs. Así la complejación de aceites esenciales naturales con CDs evita que se volatilicen durante el procesado del alimento (Szente y Szejtli 1987, 2004).

I.7.2.5. Ciclodextrinas para aumentar la vida útil de los alimentos

En un estudio llevado a cabo con doce sabores diferentes (naturales y sintéticos) complejados en BCD y almacenados en condiciones no extremas de temperatura y

humedad relativa (25°C y 60%) durante 14 años, se demostró, tras analizar cada año las muestras, que la encapsulación molecular de dichos compuestos concentrados con CDs, mejoró notablemente su estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo (Szente y Szejtli 1987, 2004). El poder de conservación de las BCD depende de la estructura, polaridad y geometría del sabor encapsulado, mostrando una protección más eficaz con terpenoides y propanoides que con sabores de estructura fenólica.

I.7.2.6. Aplicaciones de las ciclodextrinas vacías

Las CDs pueden ser utilizadas para estabilizar emulsiones de aceite en agua, como mayonesa y aderezos de ensaladas. Los colorantes naturales de salsa de tomate pueden ser estabilizados mediante la adición de 0,2% de BCD, no alterándose el color al elevar la temperatura a 100°C durante 2 horas (Kawashima, 1980). En productos cárnicos transformados, las CDs mejoran la retención de agua y la textura del alimento (Ota y Takeda, 1981). También pueden ser utilizadas para prevenir el pardeamiento en alimentos mínimamente procesados. (Núñez-Delicado y col., 2005).

La gelatinización es una característica importante de almidones y en los alimentos que lo contengan, como las harinas. La presencia del 1,5% de BCD aumenta el poder de hinchamiento y la solubilidad de los gránulos de almidón de trigo y especialmente la lixiviación de la fracción de amilosa, aumentando en un factor de 4 la viscosidad de estas pastas (Kim y Hill, 1984). Esto puede ser debido a que las CDs desestabilizan los complejos almidón-lípidos, ya que al utilizar harinas desgrasadas el efecto de las CDs se vió sensiblemente reducido.

Las CDs se pueden utilizar para enmascarar sabores no deseados. Así, para eliminar los compuestos fenólicos responsables del sabor amargo del café y el té, que se forman en su proceso de elaboración (90°C durante varias horas), se adicionaron BCD al 0,1% a dichas bebidas, obteniéndose resultados favorables (Yu, 1988).

El hidrolizado de caseínas de leche es un extracto proteico fácilmente digerible, pero tiene un desagradable sabor amargo que limita su uso. La adición de 10 % de BCD enmascara el sabor amargo (Specht y col., 1981).

El sabor amargo de zumos de uva o mandarina también disminuye sensiblemente al añadir el 0,3% de BCD antes del tratamiento térmico. Esto es debido a que naringina y limonina (compuestos responsables del sabor amargo) forman complejos estables con β -ciclodextrinas, lo que reduce el amargor del zumo (Shaw y Wilson, 1983).

En el caso de la elaboración de café soluble, la extracción acuosa del café tostado en presencia de CDs, genera un café soluble que conserva mejor los compuestos volátiles exhibiendo un mejor aroma que el elaborado en ausencia de CDs (Wagner y col., 1988).

Las BCD, también se han utilizado para elaborar mantequilla baja en colesterol, que se comercializa en Bélgica. Esta técnica de eliminación del colesterol, también ha sido aplicada con éxito en la leche utilizada en la elaboración de manteca, consiguiendo eliminar más del 90% del colesterol de forma sencilla. Con esta tecnología también se han elaborado quesos, cremas e incluso huevos bajos en colesterol (Szente y Szejtli 1987, 2004).

I.7.2.7. Aplicaciones especiales de las ciclodextrinas en alimentos

Una de las aplicaciones más interesantes y desafiantes de las CDs es su uso en envases activos. Las CDs vacías o los complejos CDs-agente antimicrobiano y antioxidante incorporados en las películas de plásticos para el envasado de alimentos, reduce eficazmente la pérdida de sustancias aromáticas y alargan la vida útil del producto. Así, la adición a pasta de pescado de 0,1% de complejos yodo-CDs inhibe la putrefacción durante dos meses a 20° C (Hara y Hashimoto, 2002). También se ha comprobado que la incorporación de complejos CDs-fungicida a films utilizados para el envasado de quesos, inhiben el crecimiento rápido de hongos en la superficie del queso, alargando así la vida útil de producto (Karatsu, 1992).

I.7.3. Industria farmacéutica

Los fármacos deben tener un cierto nivel de solubilidad en agua para poder llegar a las membranas celulares, pero también han de ser lo suficientemente hidrofóbicos para poder atravesarlas.

Una de las propiedades de las CDs es su capacidad para mejorar la absorción de fármacos a través de las membranas biológicas. Las CDs actúan como portadores de fármacos aumentando su solubilidad y transportándolos hasta la superficie de las membranas celulares de tejidos como la piel, la mucosa o la córnea del ojo. (Uekama y col., 1998; Lofsson y Stefánsson, 1997).

La mayoría de los fármacos no tienen suficiente solubilidad en agua y los sistemas tradicionales para su formulación incluyen una combinación de componentes, que suele

causar irritación u otras reacciones adversas. Las CDs no son irritantes y ofrecen ventajas adicionales tales como estabilización de los compuestos activos, reducción de su volatilidad y capacidad de enmascarar sabores amargos o irritantes y malos olores de los fármacos (Irie y Uekama, 1999; Szejtli, 1998; Hedges, 1998; Zhao y col., 1995). Esto se traduce en una mejor biodisponibilidad, aumentando el efecto farmacológico que permite una reducción de la dosis a administrar.

I.7.4. Agricultura e industria química

Las CDs forman complejos con una amplia variedad de productos químicos agrícolas, incluidos herbicidas, insecticidas, fungicidas, repelentes, feromonas y reguladores del crecimiento (Lucas-Abellán y col., 2008).

Las CDs modificadas, pueden utilizarse en reacciones de catálisis, hidrólisis selectiva y en la hidroximetilación de fenoles. Estas modificaciones químicas de las CDs, les confiere una gran actividad catalítica, ya que aumentan la velocidad de reacción en la conversión de ácido fenilpirúvico a fenilalanina (Atwood, 1990).

Las CDs se pueden utilizar en la protección del medio ambiente, solubilizando contaminantes orgánicos y metales pesados, para su eliminación de suelos, agua y atmósfera (Gao y Wang, 1998). Las aguas residuales que contienen compuestos aromáticos ecológicamente inaceptables, como fenol, *p*-clorofenol y benceno; tras ser tratadas con BCDs reducen considerablemente los niveles de estos hidrocarburos aromáticos respecto de sus niveles iniciales. Las BCD aceleran la degradación de todos los tipos de hidrocarburos que influyen en la cinética de crecimiento, produciendo un

aumento de la biomasa y una mejor utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Bardi y col., 2000).

I.8. PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN

I.8.1. Actividad de agua e isothermas de sorción de agua

La presencia de agua y sus interacciones con otros componentes son factores importantes a tener en cuenta en la estabilidad de las diferentes formulaciones o alimentos. Sin embargo, se ha observado que sistemas con el mismo contenido de agua difieren significativamente en su estabilidad microbiológica y química. Esto se debe a la diferencia en la fuerza, con los constituyentes no acuosos están asociados con el agua. El agua unida fuertemente está menos disponible para las reacciones degradativas, tales como el crecimiento de microorganismos y las reacciones químicas, que el agua que está asociada débilmente.

La actividad de agua (a_w) es el parámetro que permite determinar la magnitud de la interacción del agua con los diferentes constituyentes sólidos de un sistema (Fennema, 1996). La a_w se define como:

$$a_w = \left(\frac{p}{p_0} \right)_T \quad (1.5)$$

Donde:

a_w : actividad de agua

p : presión de vapor de agua en el producto a temperatura T

p_0 : presión de vapor del agua pura a la temperatura T

Esta igualdad se basa en asumir la existencia de equilibrio termodinámico. Generalmente en alimentos o formulaciones deshidratados esta condición puede no cumplirse y por ello sería más correcto usar el término presión de vapor relativa (PVR) en lugar del término a_w (Fennema, 1996).

En el equilibrio, a temperatura constante, las actividades de agua de los componentes de una mezcla son iguales, mientras que los contenidos de agua pueden no serlo. La actividad de agua está relacionada con el contenido acuoso a través de la isoterma de sorción de agua. Las isotermas de sistemas cristalinos y amorfos son significativamente diferentes, tal como se observa en la Figura I.18.

Un sólido cristalino adsorbe muy poca agua hasta una a_w dada, a partir de la cual comienza la disolución de los cristales (Figura I.18 b). En el sistema amorfo, las moléculas se encuentran en un ordenamiento al azar, y están relativamente más libres para interactuar con el agua, por lo tanto la adsorción de agua a bajas a_w es mayor en los sistemas amorfos que en los cristalinos (Figura I.18 a). Además existen materiales que a bajos contenidos de agua y bajas a_w , son amorfos, pero cristalizan con la adición de agua (Figura I.18 c).

En la formulación y diseño de productos farmacéuticos, cosméticos, y alimenticios, varios de esas formas están involucradas simultáneamente: 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". Entonces, las isoterms de sorción de agua son herramientas termodinámicas muy utilizadas para determinar las interacciones existentes entre el agua y otros compuestos de los alimentos. 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 condiciones apropiadas de procesamiento de alimentos, como secado, mezclado, embalaje y almacenamiento, que optimicen o maximicen la retención de propiedades como aroma, textura, color, nutrientes y estabilidad biológica (Tolaba y col., 2004; Sukumar y col., 2002).

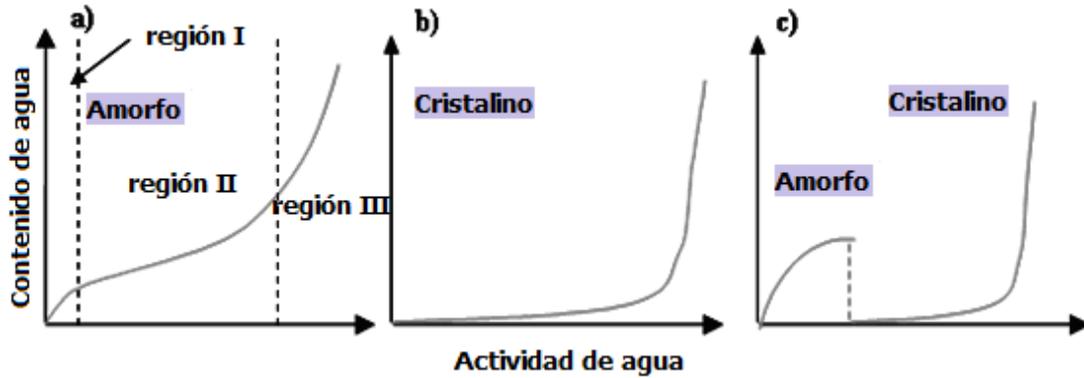


Figura I.18. Isotermas de sorción de agua correspondientes a sistemas amorfos, cristalinos y a materiales amorfos que cristalizan a medida que aumenta la actividad de agua.

Además, 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.

I.8.2. Propiedades de hidratación de las ciclodextrinas

Las CDs son un sistema modelo muy bueno para investigar las interacciones agua-biomoléculas (Winkler y col, 2000; Moreira da Silva y col, 2002). Debido a que la mayoría de reacciones que involucran CDs ocurren en un ambiente acuoso, la interacción entre CDs 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.

La interacción de la ciclodextrina con el huésped no solo define la formación de los complejos (Figura I.14, sección I.4.2) sino que también afecta su estabilidad. En efecto, si la cantidad de agua es suficiente, el equilibrio se puede desplazar hacia los compuestos libres, liberando al componente activo.

Así, cuando las formulaciones deshidratadas de CDs que contienen el componente activo son almacenadas, el análisis de sus propiedades de adsorción de agua es fundamental para determinar las condiciones óptimas de almacenamiento. Este objetivo puede lograrse, como hemos visto en la sección anterior determinando las isotermas de sorción de la ciclodextrina, el huésped y el complejo.

Las CDs naturales son cristalinas y cristalizan a partir del agua como hidratos de composición variable. La α -ciclodextrina, que comúnmente se la encuentra como un hexahidrato, $\alpha\text{-CD}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, puede existir en 3 formas cristalinas diferentes. La β -ciclodextrina (BCD) generalmente se la encuentra como el undecahidrato $\text{BCD}\cdot 11\text{H}_2\text{O}$ y como dodecahidrato $\text{BCD}\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 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.

Los diferentes derivados de las CDs existentes en el mercado tales como la metil- β -ciclodextrina (MBCD) y la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD) por el contrario, son sistemas amorfos.

Las CDs se utilizan en la confección de diferentes formulaciones farmacéuticas, cosméticas y alimenticias tales como tabletas capsulas, etc. (como ya se ha señalado en la sección I.7). La performance de dichas formulaciones (como se ha señalado en la sección anterior) depende del contenido de humedad residual presente en el sólido final, entonces resulta necesario determinar la isoterma de sorción de las CDs y de los complejos formados.

I.8.3. Estado vítreo y estabilidad

En alimentos complejos desde el punto de vista termodinámico no existen estados de equilibrio estable, pero si se puede llegar a varios estados de equilibrio metaestable. En estos casos, el estado físico es extremadamente sensible a la humedad, la temperatura y el tiempo de observación (Franks, 1994).

Un material no cristalino puede existir en el estado vítreo o en el estado líquido sobreenfriado ("gomoso") dependiendo de la temperatura y de la presencia de agua. El cambio entre estos dos estados, se conoce como transición vítrea. El término transición vítrea se refiere a la temperatura a la cual los vidrios inorgánicos empiezan a

ablandarse y fluir (Sperling, 1986). Por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g), característica de cada sistema, el material es un sólido amorfo (vidrio) altamente viscoso. La transición vítrea (T_g) puede utilizarse como un parámetro descriptivo del estado físico de las macromoléculas, el cual puede diferir de la movilidad de las moléculas más pequeñas como el agua (Vittadini y Chinachoti, 2003). La movilidad molecular en los vidrios está restringida a vibraciones y movimientos rotacionales de rango corto (Sperling, 1986). Los cambios que ocurren en el estado vítreo, durante el llamado "envejecimiento físico", son extremadamente lentos (Jouppila, 1999; Roos y col., 1996; Slade y Levine, 1991; Levine y Slade, 1986). A temperaturas superiores a T_g , el sistema pasa del estado vítreo al de líquido sobre-enfriado, la viscosidad disminuye de 10^{12} a 10^3 Pa.s (Sperling, 1986), aumenta la movilidad molecular y los movimientos traslacionales. Por lo tanto, al ocurrir la transición vítrea, los materiales son más susceptibles a cambios físicos o químicos. El parámetro $(T-T_g)$ o sea la diferencia entre la temperatura del experimento y la T_g , en muchos casos permite definir las variables cinéticas de los cambios físico-químicos asociados. Así, un valor de $(T-T_g)$ alto y positivo, indicaría condiciones para altas velocidades de transformaciones.

Los sólidos amorfos se obtienen cuando las moléculas del soluto son inmovilizadas mediante un rápido congelamiento o una rápida deshidratación, como sucede en los procesos de liofilización o secado por aspersión o "spray" (Figura I.19). Como resultado de estos procesos, el sistema experimenta un rápido incremento de la viscosidad y por ende una importante disminución en la movilidad molecular. Las moléculas de soluto no

pueden alcanzar configuraciones de equilibrio y por lo tanto no pueden organizarse para formar un cristal, sino que permanecen en forma desordenada o amorfa.

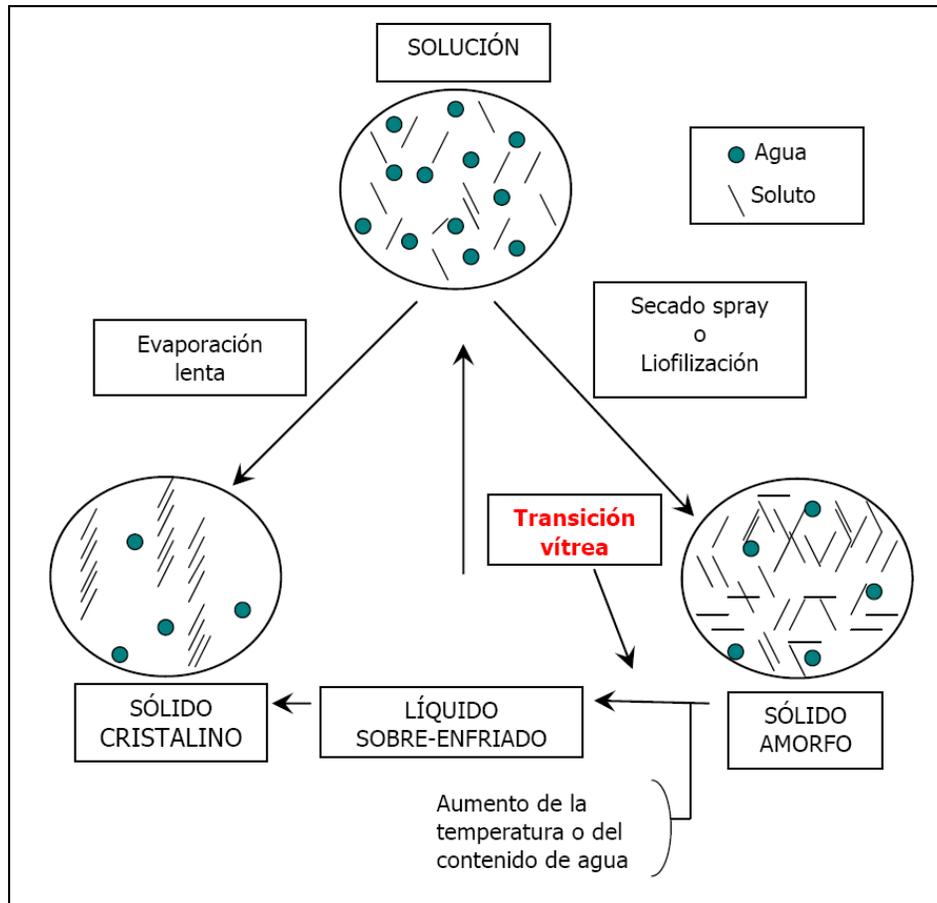


Figura I.19. Formación de un sólido amorfo o cristalino a partir de una solución. Adaptado de Karmas y col., 1992.

Una aplicación interesante del estudio de la transición vítrea es la comprensión de las propiedades de textura de sistemas alimenticios, y la explicación de los cambios que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Nelson y Labuza, 1994). A medida que los polímeros absorben agua no todas sus propiedades se afectan de la misma manera, en el rango bajo a intermedio de humedades algunas propiedades mecánicas muestran un máximo en función del contenido de agua, mientras que la T_g

disminuye continuamente (Chang y col., 2000). En cuanto a la relación entre el estado amorfo y la cinética de las reacciones químicas, la mayoría de los estudios evidencian efectos combinados de la transición vítrea y otros factores como el contenido de agua, actividad de agua, temperatura y concentración de reactivos, sobre la velocidad de reacciones químicas (Bell, 1996; Buera y Karel, 1995; Bell y Hageman, 1994; Roos y Himberg, 1994; Karmas y col., 1992).

La movilidad molecular en un sistema amorfo puede ser afectada por la adición de compuestos de bajo peso molecular, que actúan como plastificantes. En los sistemas alimentarios el plastificante más importante es el agua. En la Figura I.20 se muestra, para una matriz de azúcar, la curva de T_g en función del contenido de agua. A medida que aumenta el contenido acuoso, disminuye la T_g (Roos, 1992) y la transición de un sistema vítreo a uno sobre-enfriado se puede dar tanto por aumento de la temperatura como del contenido de agua. Los materiales sobreenfriados están en un estado de no equilibrio y exhiben cambios dependientes del tiempo a medida que se acercan al equilibrio. De esta forma, pueden ocurrir cambios en sus características mecánicas o cambios en la difusión de solutos (Roos, y col., 1996). Los cambios mecánicos incluyen los fenómenos de colapso, pegajosidad, apelmazamiento y pérdida de porosidad (Levine y Slade, 1991; Flink, 1983; Trsourouflis, y col., 1976; Bellows y King, 1973; White y Cakebread, 1966). Los cambios en la difusión afectan la cinética de cristalización de azúcares amorfos, la liberación de aromas y en algunos casos las cinéticas de las reacciones químicas controladas por difusión (Roos y col., 1996).

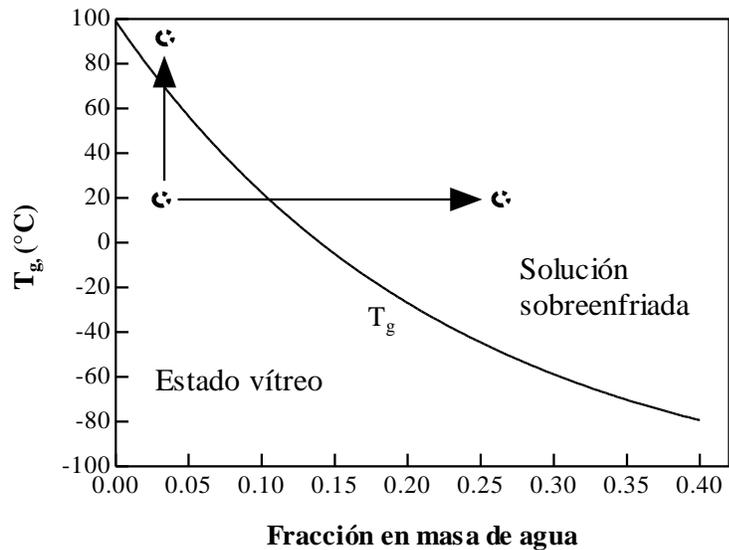


Figura I.20. Curva de temperatura de transición vítrea en función del contenido de agua. Adaptado de Cardona y col., (1997).

En el caso de aromas encapsulados en polvo, son muy importantes las consecuencias que ocasiona el almacenamiento a temperaturas mayores que T_g . La cristalización de azúcares en la matriz carrier puede causar la pérdida de aromas. Además, los fenómenos de pegajosidad, apelmazamiento y colapso de los polvos, no sólo produce productos con un aspecto indeseable para el consumidor, sino que también provoca la pérdida de aromas, y la dificultad en la reconstitución de los polvos.

I.8.3.1. Relación entre los cambios físicos de la matriz, la actividad de agua y la transición vítrea

Los fenómenos de apelmazamiento, pegajosidad y colapso ocurren en polvos como consecuencia de un aumento de temperatura o humedad. El término "colapso" se utiliza

para describir la pérdida de estructura, la reducción del tamaño de los poros y un encogimiento volumétrico en materiales secos.

El colapso y la temperatura de transición vítrea son fenómenos relacionados, mientras la transición vítrea de un material polimérico es generalmente reversible, el colapso de las matrices liofilizadas es irreversible. La Figura I.21 muestra la relación entre la temperatura de transición vítrea y la aparición de fenómenos físicos de deterioro.

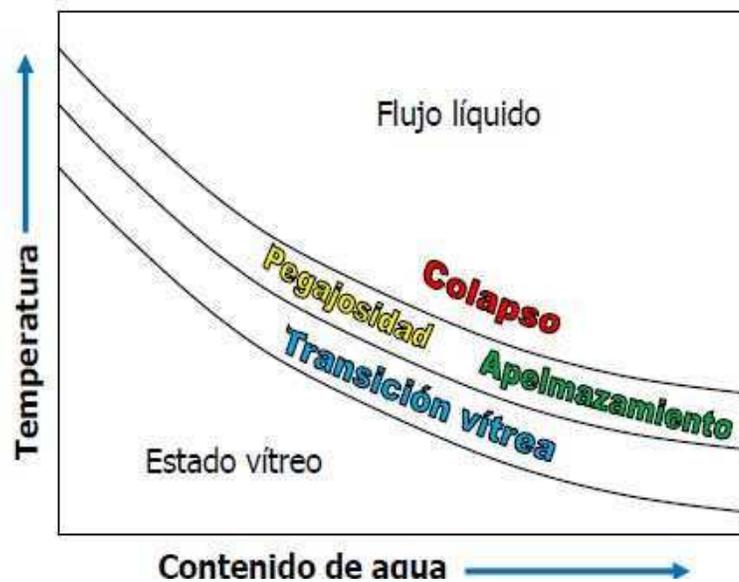


Figura I.21. Consecuencias de la transición vítrea sobre los fenómenos físicos. Adaptado de Roos 1995b.

Por lo tanto, el conocimiento de la T_g y su dependencia con el contenido de agua se podría usar para controlar los problemas de pegajosidad, especialmente para la producción y estabilización de polvos liofilizados (Roos, 1995). En efecto, muchas características físicas, tales como cristalización, apelmazamiento, pegajosidad, colapso, movilidad molecular, y difusividad no se puede explicar completamente con el concepto de actividad de agua, es necesario recurrir al concepto de T_g .

I.8.3.2. Estabilidad del aroma encapsulado durante el almacenamiento

El objetivo principal de la microencapsulación de aromas líquidos o aceites es proveer polvos secos que fluyan libremente, otorgando además protección contra reacciones de deterioro y evitando la pérdida del aroma durante el procesamiento y almacenamiento. Además, la encapsulación permite la liberación controlada de aromas y el retraso de oxidación de aceites.

Las propiedades de las sustancias encapsuladas están relacionadas con la estructura de la matriz, que a su vez está directamente relacionada con la T_g del material. En el estado vítreo, la matriz es físicamente estable y no sufre ningún cambio estructural significativo. Por el contrario en el estado sobreenfriado, pueden ocurrir movimientos moleculares ocasionando el deterioro del aroma encapsulado (Ubbink y Schoonman, 2003). En este caso el deterioro físico estaría asociado a la ocurrencia de apelmazamiento, colapso y cristalización. Por lo tanto, para conservar las propiedades y estructura de los productos que contienen aromas encapsulados, es necesario mantener la matriz en estado vítreo durante el almacenamiento.

La Figura 1.22 es una representación esquemática de los fenómenos que ocurren cuando se almacena una partícula secada por *spray* en un ambiente húmedo. Puede observarse como la partícula adsorbe vapor de agua, seguido por un cambio de estado de la matriz de vítreo a gomoso. En la matriz en estado gomoso, el aroma encapsulado puede moverse fácilmente, al mismo tiempo, la adsorción de oxígeno en la pared se vuelve más importante progresando la oxidación del aroma (Walzel y Furuta, 2011).

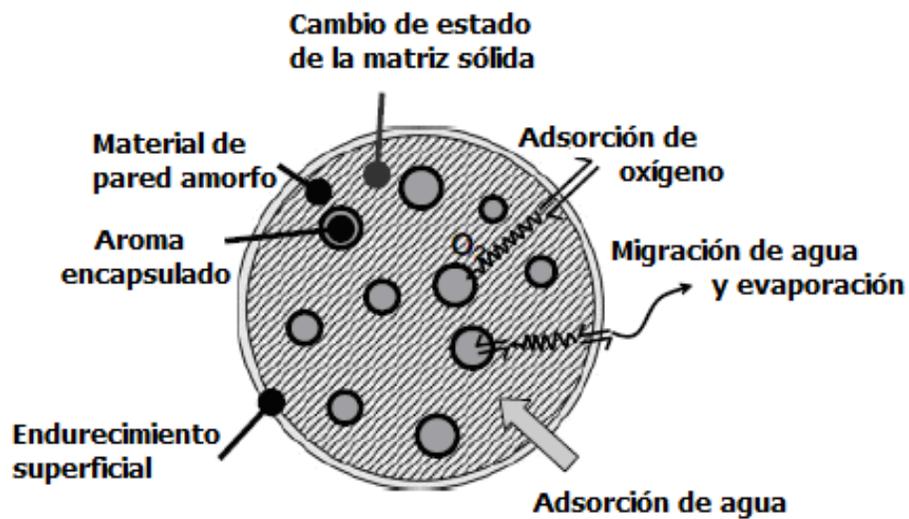


Figura I.22. Características generales de un flavor hidrofóbico encapsulado en una matriz vítrea. Se indican las principales características estructurales y los cambios físicos y químicos que influyen en la estabilidad del flavor encapsulado. Adaptado de Walzel y Furuta, 2011.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

La presente Tesis tiene como objetivo general estudiar la encapsulación de dos componentes de aceites esenciales, ampliamente utilizados en las industrias alimenticias, de cosméticos y farmacéuticas por medio de la formación de complejos de inclusión en CDs naturales y modificadas o en una matriz continua.

El estudio se enfocó en la estabilización, solubilización y implementación de técnicas de liberación controlada de estos.

Se estudió además el efecto de las variables que afectan la eficiencia de encapsulación y estabilidad de dichas formulaciones:

- intrínsecas: propiedades químicas, físicas y estéricas de las CDs, la matriz continua y del compuesto a incluir.
- externas: humedad y temperatura de almacenamiento.

II.2. Objetivos específicos

- Generar los complejos de inclusión de dos sabores hidrofóbicos de estructura diferente 1) un terpeno como el timol 2) un compuesto aromático como el cinamaldehído.
- Estudiar la formación de los complejos en solución con el fin de:
 - Obtener las constantes de equilibrio (K_e) de los complejos con las diferentes CDs y a diferentes temperaturas para determinar la estequiometría de los complejos y los parámetros termodinámicos: energía libre (ΔG^*), entalpía (ΔH^*) y entropía (ΔS^*) de formación de los complejos.
- Comparar las propiedades de los complejos de inclusión de los sabores en la ciclodextrina natural β -ciclodextrina con las de sus derivados metil- β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina en solución y en estado sólido.
- Preparar emulsiones para encapsular los sabores hidrofóbicos en una matriz continua de almidón modificado.
- Obtener formulaciones deshidratadas de los complejos de inclusión formados y de los sabores encapsulados en matrices de almidón modificado.
- Caracterizar los complejos y las formulaciones deshidratadas empleando diferentes técnicas a saber: calorimetría diferencial de barrido (DSC), Difractometría de rayos X (XRD), Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

- Almacenar las formulaciones deshidratadas obtenidas bajo diferentes condiciones de humedad relativa con el fin de determinar:
 - las isotermas de sorción de agua de las CDs, los complejos de inclusión formados, el almidón modificado y la matriz continua conteniendo los sabores.
 - la retención de los compuestos encapsulados en función del tiempo para determinar su cinética de liberación.

III. Materiales y Métodos

III.1. Elección de los sistemas

Un paso muy importante en el desarrollo de ingredientes funcionales activos es el diseño de formulaciones que permitan la estabilización, solubilización y liberación controlada de componentes activos a los cuales son añadidos. Esto puede ser logrado por la formación de una matriz continua donde el componente activo queda atrapado o por la formación de complejos de inclusión con el objetivo de modificar las propiedades fisicoquímicas del compuesto incluido. Por razones económicas y su facilidad de obtención, la β -ciclodextrina ha sido la ciclodextrina más utilizada. Sin embargo, ésta posee una solubilidad limitada, por lo que se han realizado numerosas modificaciones estructurales con el objetivo de producir cambios en las propiedades físico químicas y habilidad para formar complejos de las CDs naturales. Dado que los equilibrios de formación y descomposición de los complejos están gobernados por sus interacciones con el agua, es interesante analizar las propiedades de las CDs en ambientes de humedad variable. Además, la eficiencia de encapsulación de la ciclodextrina depende de las propiedades químicas, físicas y estéricas de la ciclodextrina y del compuesto a incluir.

Con el objetivo de comparar la encapsulación molecular con la encapsulación en una matriz continua, se eligió al HiCap 100, un almidón modificado por la adición de una cadena n-octenil succinato que le confiere propiedades hidrofóbicas y en consecuencia, buenas propiedades emulsificantes.

El timol y el cinamaldehído son dos componentes importantes de aceites esenciales naturales ampliamente utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica. En base a esto los sistemas elegidos fueron los siguientes:

Encapsulación molecular en Ciclodextrinas

- Flavores a encapsular: Timol y Cinamaldehido.
- Sistema encapsulante:
 - a. Ciclodextrina natural: β -ciclodextrina (BCD).
 - b. Ciclodextrinas modificadas: metil- β -ciclodextrina (MBCD) y hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD).

Encapsulación en una matriz continua

- Flavor a encapsular: timol.
- Sistema encapsulante: Matriz continua de un almidón modificado por adición de una cadena hidrofóbica de octenil succinato (HiCap 100).

III.2. Preparación de los sistemas

III.2.1. Preparación de los complejos de inclusión

Para la preparación de los complejos sólidos se utilizaron los siguientes materiales:

- β -ciclodextrina (Sigma Chemical Co. St Louis MO, EEUU).
- Metil- β -ciclodextrina (Sigma Chemical Co. St Louis MO, EEUU).

- Hidroxipropil- β -ciclodextrina (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 bidestilada.

III.2.1.1. Preparación de los complejos de inclusión con β -ciclodextrina (BCD).

Los complejos sólidos 1:1 de timol-BCD y cinamaldehído-BCD se prepararon por medio del método de coprecipitación en medio acuoso (Hedges, 1998; Mulinacci y col., 1996). Para esto, se preparó una solución saturada de BCD 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. Dicha solución se almacenó durante 24 horas a 2° C y el precipitado formado 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 su secado por liofilización. Los sistemas deshidratados así obtenidos fueron pulverizados y almacenados en desecadores al vacío sobre $MgClO_4$.

III.2.1.2. Preparación de los complejos de inclusión con la metil- β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Los complejos de inclusión sólidos 1:1 del timol y el cinamaldehído con la Metil- β -ciclodextrina (MBCD) y la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD) fueron obtenidos solubilizando en agua 5 o 10 g respectivamente de las CDs a 50° C con agitación. A dicha solución se agregó la cantidad de ligando necesario para obtener los complejos 1:1, agitando los sistemas a velocidad constante y a temperatura ambiente durante 3 horas. Las emulsiones resultantes posteriormente fueron deshidratadas por liofilización.

III.2.1.3. Preparación de las mezclas físicas de las ciclodextrinas con los sabores.

Las mezclas físicas del timol y cinamaldehído con las diferentes CDs en relación 1:1 fueron preparadas mezclando íntimamente ambos componentes en un mortero con la ayuda de un pilón durante 5 minutos. Las mezclas así obtenidas fueron pulverizadas y almacenadas en desecadores al vacío sobre $MgClO_4$ hasta su uso.

III.2.1.4. Preparación de las matrices continuas conteniendo timol.

Para la preparación de las matrices continuas conteniendo el flavor se utilizaron los siguientes materiales:

- Almidón modificado HiCap 100 (Saporiti Sabores, Argentina).
- Timol (Carlo Erba Reagenti, Rodano, MI, Italia).
- Agua bidestilada.
- Tween 80 (Biopack, Argentina)

III.2.1.5. Preparación de las emulsiones conteniendo timol.

Para esto, se preparó una solución al 40% P/P de HiCap 100 en agua bidestilada con agitación hasta obtener una solución clara y transparente. A continuación, y sin suspender la agitación, se agregó lentamente 2 g de timol y 50 µl de Tween 80 como emulsificante (cada 100 ml). La emulsión resultante fue homogeneizada por 1 minuto a 9500 RPM con un Ultraturrax T18 Basic (IKA® Works, Inc., USA) y a continuación fue deshidratada por liofilización o secado por spray.

III.2.2. Secado de los sistemas preparados

III.2.2.1. Liofilización

Se distribuyeron 2,5 ml de las distintas soluciones en viales de 5 ml. Los viales se congelaron a -20 ° C durante 24 horas y posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización durante 48 horas. Este procedimiento se realizó en un liofilizador ALPHA 1-4 LD2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH Alemania), cuya placa condensadora opera a -84 °C, a una presión de 0,04 mbar. En la Figura III.1 se muestra el esquema básico del equipo liofilizador empleado. Los sistemas deshidratados obtenidos se almacenaron en un desecador al vacío sobre MgClO₄ (perclorato de manganeso) hasta su uso.

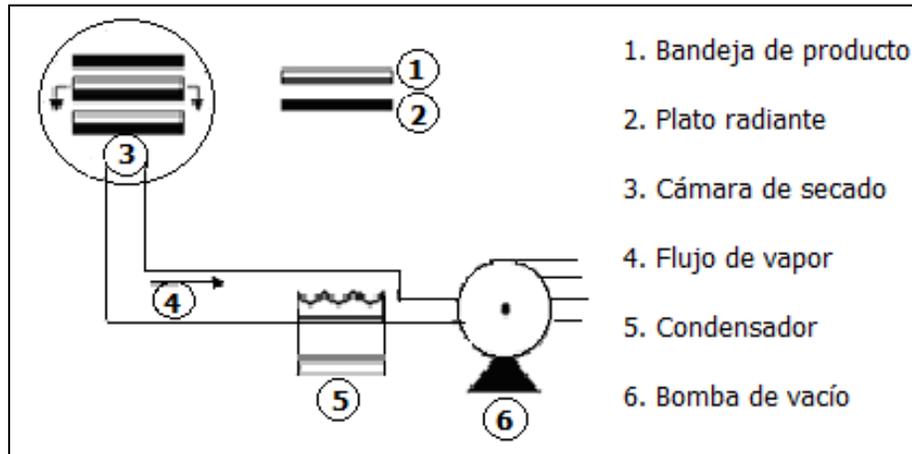


Figura III.1. Esquema básico de un equipo liofilizador como el utilizado.

III.2.2.2. Secado spray

Las emulsiones utilizando almidón modificado HiCap 100 se secaron también por secado spray. Dicho proceso fue realizado utilizando un secador spray a escala de laboratorio, Mini Spray Dryer Büchi B290 (Flawil, Suiza), cuyo esquema de secado en co-corriente se muestra en la Figura III.2. Las condiciones operativas del proceso de secado fueron: temperatura de entrada del aire $98 \pm 2^\circ \text{C}$, temperatura de salida del aire $68 \pm 2^\circ \text{C}$, caudal de 8 mL/min, presión de aire 3,2 bar, y diámetro de boquilla de 1,5 mm (Lee y col., 1999). Una vez obtenidos, los polvos se recolectaron en bolsas de cloruro de polivinilideno (PVDC) que se sellaron y se almacenaron en un freezer a -20°C hasta su utilización.

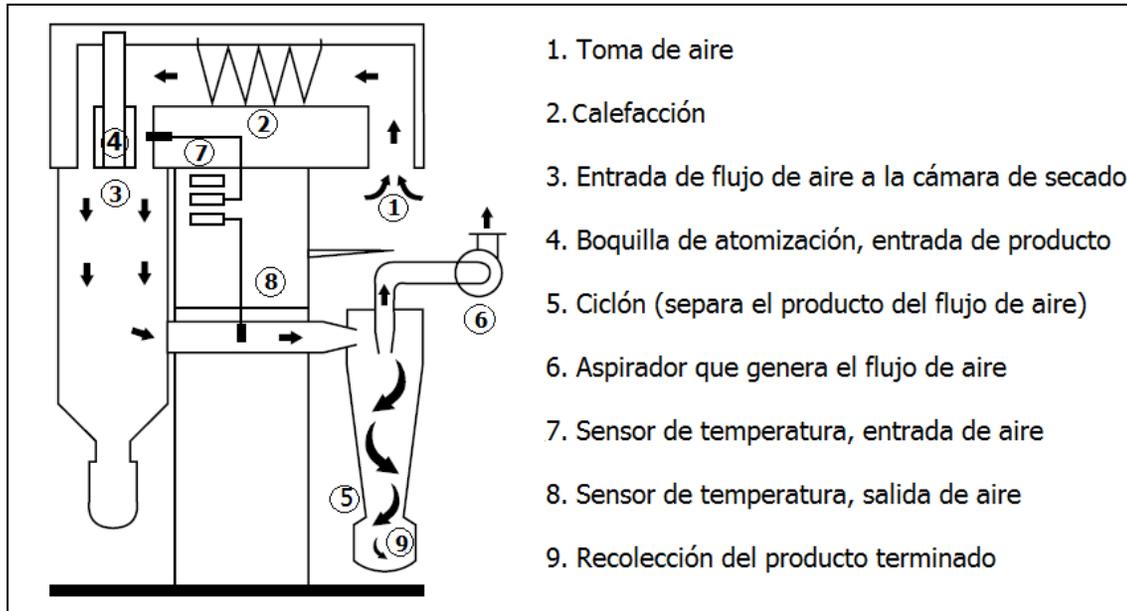


Figura III.2. Esquema del proceso de secado spray en co-corriente en un equipo como el utilizado en este trabajo. Adaptado de Training Papers Spray Drying, BÜCHI Labortechnik AG, 1997 - 2002.

III.2.3. ALMACENAMIENTO

III.2.3.1. Preparación de sistemas con diferente contenido de agua.

Con el fin de obtener sistemas con diferente contenido de agua, alícuotas de aproximadamente 0,5 g de las muestras deshidratadas fueron colocadas en viales de vidrio y almacenados en desecadores al vacío en atmósfera de humedad relativa (HR) controlada y a 25 ° C. Para esto, fueron empleadas soluciones salinas saturadas de diferentes HR (Greenspan, 1977; Labuza y col., 1976; Iglesias, 1975).

En cada desecador se colocaron 100 ml. de solución saturada, con un exceso del 50% de sal para asegurar que la solución estuviese saturada al finalizar el ensayo. Esto último se verificó con un higrómetro AquaLab Serie 3 (Decagon Devices, Pullman, Washington, USA).

Las sales saturadas (calidad analítica, Merck) fueron seleccionadas de manera de cubrir el rango de humedades relativas comprendidas entre 11 y 97%, y cuyos valores son: LiCl (11%), $C_2H_3KO_2$ (22%), $MgCl_2$ (33%), K_2CO_3 (44%), NaBr (58%), NaCl (75%), KCl (84%), K_2SO_4 (97%), (Greenspan, 1977).

Las muestras se pesaron periódicamente hasta alcanzar el equilibrio, lo que se verificó por 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 humedad relativa utilizada y del sistema. A determinados intervalos de tiempo de almacenamiento las muestras se retiraron para realizar las distintas determinaciones.

En las muestras de alta humedad relativa se verificó la ausencia de crecimiento fúngico, observando con lupa estereoscópica antes de ser utilizadas y descartando aquellas que presentarán desarrollo de hongos.

II.2.3.2. Determinación del contenido de agua en los sistemas estudiados.

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 peso entre la masa antes y después del secado (peso húmedo y peso seco) considerándose constancia de peso cuando las diferencias fueron menores que 0.0005 g).

Las condiciones utilizadas (tiempo/temperatura) aseguraron una determinación adecuada del contenido de agua en los sistemas bajo estudio (Mazzobre y col, 2001; Schebor, 2000; 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 porcentaje en base seca (g de agua/100 g de masa seca).

III.2.3.3. Características físicas de las muestras equilibradas.

Las características físicas de las muestras luego de alcanzar el equilibrio, fueron registradas tomando fotos de dichas muestras, con una cámara digital Nikon (Power Shot A70, USA). Esto permitió evidenciar los cambios estructurales que ocasiona la sorción de agua en las muestras durante la equilibración y al mismo tiempo dejar constancia del aspecto que presentaban las muestras, al iniciar los diferentes estudios.

III.2.3.4. Caracterización de las isotermas de sorción de agua.

Numerosas ecuaciones empíricas y semiempíricas han sido propuestas para correlacionar la humedad de equilibrio con la actividad de agua (a_w) de alimentos (Boquet y col., 1978; 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 (Ecuación III.1) es una ecuación a dos parámetros que ha sido ampliamente utilizada hasta 1985 y cuyo uso fue reomendado por la comisión de Coloides y Química de superficies de la UIPAC, 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:

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

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:

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 Guggenheim-Anderson-de Boer (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). Debido a que la ecuación de BET sólo es aplicable hasta una a_w de 0,4 y nuestro estudio cubre un rango de a_w de 0,22 a 0,97, la caracterización de las isothermas de sorción se efectuó por medio de la ecuación de GAB.

Dicha 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, Lomauro y col., 1985; Furmaniak y col., 2009). 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:

$$m = \frac{m_o C_G \cdot k \cdot a_w}{[(1 - k a_w)(1 + k C_G - k a_w)]} \quad (III.2)$$

Donde:

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

m_o: 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 la diferencia entre el calor de sorción en la monocapa con respecto al de multicapa (que es diferente al calor de condensación del agua pura).

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

Para obtener las isotermas de adsorción se graficaron los datos obtenidos del contenido de agua (m) en función de la humedad relativa (HR) en el equilibrio. A partir del ajuste realizado con la ecuación GAB se obtuvieron los valores de m_o, C_G y k.

III.2.4. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES TÉRMICAS DE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS.

Las transiciones térmicas de todos los sistemas estudiados se determinó por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Esto se realizó utilizando un equipo Mettler DSC 822 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza) (Figura III.3).



Figura III.3. Fotografía del equipo de calorimetría diferencial de barrido.

La muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, y en general se utiliza una cápsula vacía como referencia. El instrumento registra las diferencias en el flujo de calor entregado por el equipo a la muestra y a la referencia en función de la temperatura y del tiempo.

En los termogramas, las cristalizaciones aparecen como picos exotérmicos y las fusiones, como picos endotérmicos. En la Figura III.4 se muestra un termograma correspondiente al perfil termoanalítico de un sistema huésped- β -ciclodextrina.

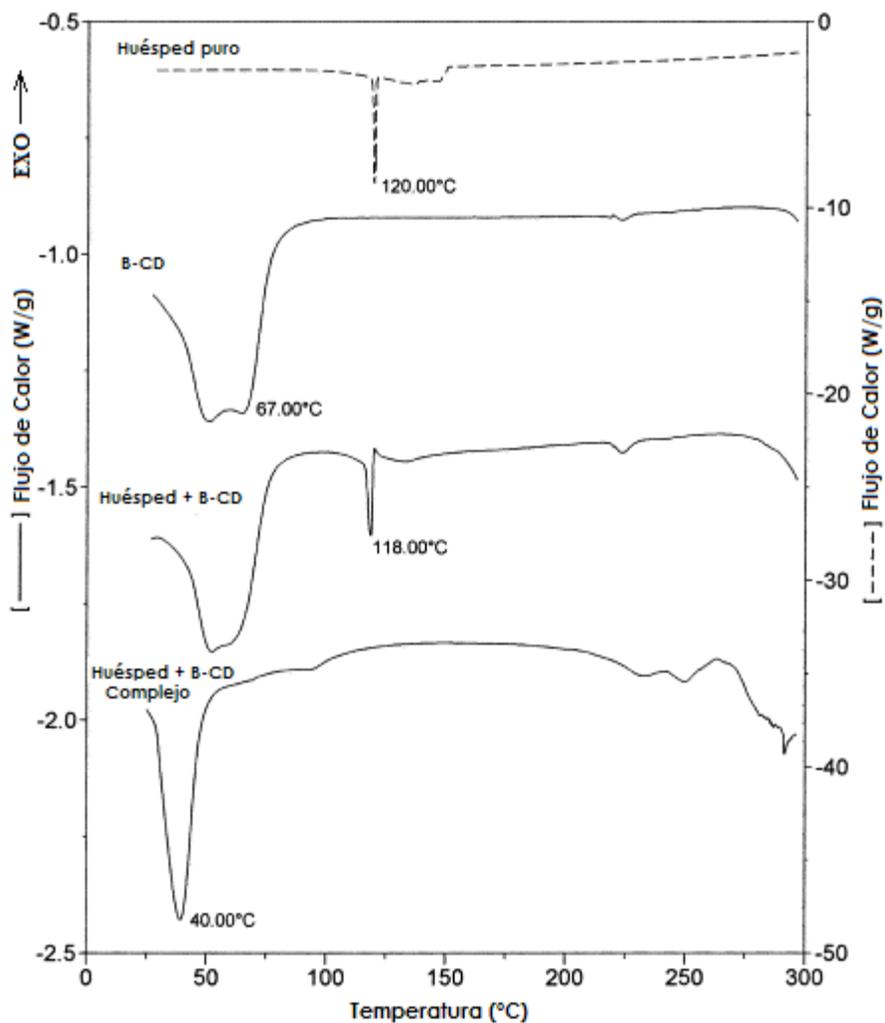


Figura III.4. Perfil termoanalítico de un sistema huésped-BCD realizado por DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido). (Adaptado de Giordano y col., 2001).

La calorimetría diferencial de barrido detecta la transición vítrea en base al cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p). En la Figura III.5, se muestra un termograma típico que muestra la transición vítrea, indicando el comienzo, el punto medio y el final de la misma. El ΔC_p en la transición vítrea, se evidencia como un cambio en la línea de base del termograma.

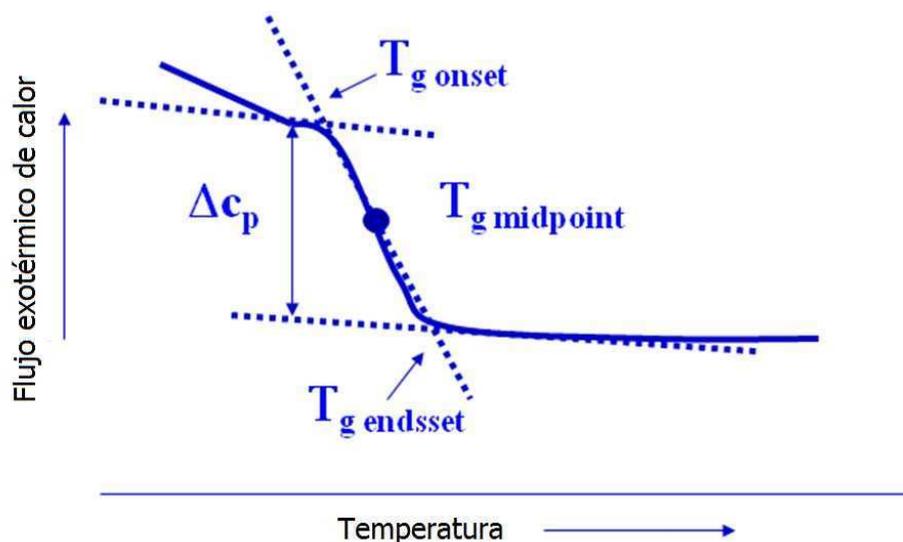


Figura III.5. Termograma típico obtenido por DSC mostrando la transición vítrea.

III.2.4.1. Procedimiento

El instrumento se calibró para temperatura, flujo de calor y entalpías de fusión usando agua tri-distilada (PF= 0.0 °C, $\Delta H= 6,013 \text{ kJ mol}^{-1}$), Indio (PF= 156,6 °C, $\Delta H= 3,28 \text{ kJ mol}^{-1}$), plomo (PF = 327.5 °C, $\Delta H= 4,799 \text{ kJ mol}^{-1}$) and zinc (PF= 419,6 °C, $\Delta H= 7,32 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Roos and Karel, 1991). La muestra deseada (entre 5 y 10 mg) se colocó en una cápsula de aluminio de 40 μL herméticamente cerrado (una cápsula vacía y perforada se empleó como referencia). Todas las mediciones se realizaron a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Esta velocidad de calentamiento se utiliza comúnmente para observar en forma clara transiciones térmicas en biopolímeros (Ablett y col., 1993; Sopade y col., 2004; Tananuwong y Reid, 2004).

Esta técnica se empleó para verificar la formación de los complejos de inclusión de las diferentes CDs con el timol y el cinamaldehído, seguir la liberación de los mismos

durante el almacenamiento, determinar las transiciones vítreas, y otras transiciones térmicas que pudieran presentar las muestras estudiadas.

III.2.4.2. Determinación de la formación de los complejos, ligando libre y estabilidad de los complejos.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es utilizado como un método de rutina que permite detectar rápidamente, la formación de los complejos de inclusión (Pinto y col., 2005).

En la gran mayoría de casos, cuando los termogramas de los complejos muestran la desaparición del pico de fusión del huésped se considera que se ha formado el complejo (Miller y col., 2007). En efecto, 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 este caso, la metodología es casi siempre el mismo: se compara el comportamiento térmico de los componentes por separado, su mezcla física y finalmente el complejo de inclusión formado, preparado según una variedad de procedimientos estándar. El propósito de esto es evidenciar la diferencia entre la mezcla física y el supuesto complejo de inclusión obtenido (Williams y col., 1998, Pinto y col., 2005; Miller y col., 2007).

Para determinar el porcentaje de compuesto o ligando liberado (% L) de los complejos almacenadas a diferentes HR 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:

$$\%L = \frac{\Delta H_s}{\Delta H_o} \cdot 100 \quad (\text{III .3})$$

donde,

%L = porcentaje de ligando liberado

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

ΔH_o : calor de fusión del timol o del cinamaldehído en los complejos recién preparados.

Las temperaturas de fusión informadas corresponden a la temperatura a la cual la curva comienza a desviarse de la línea de base para dar el pico endotérmico de fusión. Los valores de entalpía de fusión se obtuvieron calculando el área de la transición endotérmica en relación a la masa de hésped presente en la muestra.

Las temperaturas y los valores de entalpía (ΔH , que se expresó en J/g) de las transiciones de primer orden (relajaciones entálpicas) se obtuvieron por medio del programa del equipo de medición, integrando el área bajo la curva de la transición. En el caso del timol, el punto de fusión se encuentra entre 48 y 50 °C (Mourtzinis y col., 2008) y para el cinamaldehído entre -7,5 °C a -10 °C (Carlotti y col., 2007).

Para evitar los fenómenos de distorsión que se observan al comienzo y al 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 la transición y finalizando por lo menos a una temperatura 10 °C superior a dicha temperatura.

El rango de temperatura programado fue desde -40 °C a 100 °C para los sistemas con timol y desde -100 °C a 120 °C para los sistemas con cinamaldehído, respectivamente. Cada una de las muestras fue calentada a 10 °C/min. Para las muestras de alto contenido de agua la temperatura final fue menor para evitar la ruptura de la cápsula causada por el incremento de la presión de vapor del agua.

El enfriamiento del equipo se realizó con nitrógeno líquido a una presión en el tanque de 150 kPa. Una corriente continua de nitrógeno gaseoso de 200 mL/min (medido con un caudalímetro (Bruno Shillig, Argentina)) fue utilizada para evitar la condensación de agua sobre las cápsulas y sobre el sensor. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se informó el valor promedio. Los termogramas fueron analizados con el programa STAR[®] Software v. 6.1 (Mettler Thermal Analysis).

III.2.4.3. Determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g).

Las temperaturas de transición vítrea de los sistemas estudiados fueron determinadas en forma dinámica (velocidad de calentamiento 10°C/min.), a partir de las discontinuidades detectadas en las curvas de flujo de calor versus temperatura (ver Figura III.5). La T_g se consideró como la temperatura a la cual comienza el cambio en

el calor específico (valor "onset"), que se detecta en el termograma como un corrimiento endotérmico en la línea de base. Se informó el valor promedio de al menos dos réplicas. La desviación estándar para la medición de temperatura de transición vítrea fue de ± 1 °C.

III.2.5. ESTUDIO DE SOLUBILIDAD DE FASES

El estudio de solubilidad de fases de los complejos permitió obtener las constantes de equilibrio de los complejos (K_e) y los parámetros termodinámicos energía libre (ΔG^\ddagger), entalpía (ΔH^\ddagger) y entropía (ΔS^\ddagger) de formación del complejo.

III.2.5.1 Determinación de las constantes de equilibrio de los complejos

Las constantes de equilibrio (K_e) del timol y CINAM con BCD y las CDs modificadas (MBCD y HPBCD) fueron determinados por el método de solubilidad de fases (Higuchi y Connors, 1965) a 25 °C, 37 °C y 50 °C. Una cantidad fija en exceso de timol o CINAM fue agregada a tubos Falcón de 50 ml, conteniendo 10 ml de soluciones acuosas de CDs de concentraciones crecientes. El rango de concentraciones utilizado varió de acuerdo a la ciclodextrina. Para la BCD dicho rango fue desde 0 a 0,015 M, mientras para la MBCD y la HPBCD fue desde 0 a 0,075M. Los tubos Falcón cerrados herméticamente, fueron colocados en un baño termostático y agitados mecánicamente hasta alcanzar el equilibrio. Se hicieron estudios preliminares con el fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio y se verificó que el mismo fue de 120 horas para la BCD, mientras que para la MBCD y la HPBCD fue de 24 horas.

Para el CINAM el experimento se llevo a cabo en la oscuridad, para evitar su degradación fotoquímica.

Las soluciones obtenidas una vez alcanzado el equilibrio, fueron filtradas a través de un filtro de membrana de 0,45 μm (Millipore). El contenido del componente activo en el filtrado (mol/l), fue determinado espectrofotométricamente (espectrofotómetro, UV-1203 Shimadzu, Kyoto, Japón) a 275 nm y a 282 nm para el timol y el cinamaldehído respectivamente. Para determinar dicho contenido previamente se obtuvieron curvas de calibración de ambos componentes. En todas las determinaciones espectrofotométricas se utilizó como blanco una solución de la CDs correspondiente. Los ensayos se realizaron por triplicado y se informó el valor promedio de los mismos.

Los cambios en la solubilidad del timol y el CINAM obtenidos por la adición de distintas concentraciones de CDs (BCD, MBCD y HPBCD), permitió obtener los diagramas de solubilidad fases.

En dichos diagramas se grafica la concentración del ligando en función de la concentración de las CDs (Figura III.6).

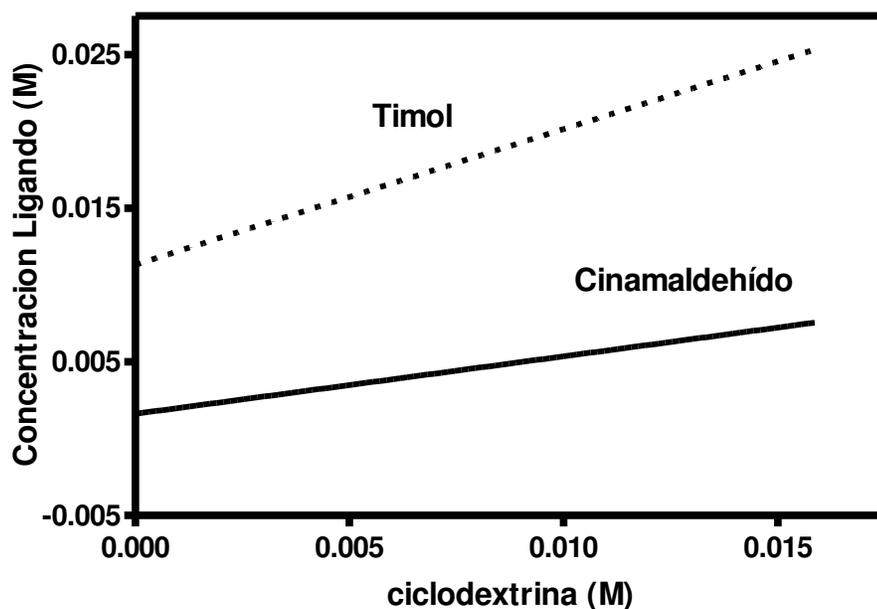


Figura III.6. Diagramas de solubilidad de fases

A partir de los mismos se determinó la estequiometría y la constante de estabilidad de los complejos resultantes. Las constantes de estabilidad aparente (K_e) fueron estimadas a partir de la línea recta de los diagramas de solubilidad de fase de acuerdo a la siguiente ecuación (Higuchi y Connors, 1965):

$$K_e = \frac{\textit{pendiente}}{S_o \times (1 - \textit{pendiente})} \quad (\text{III.4})$$

Donde S_o (solubilidad intrínseca) es la solubilidad del timol o del cinamaldehído en agua pura y la *pendiente* es la pendiente de la línea recta del diagrama de solubilidad de fases.

III.2.5.2. Determinación los parámetros termodinámicos: energía libre (ΔG^*), entalpía (ΔH^*) y entropía (ΔS^*) de formación de los complejos.

En general, se ha aceptado que la principales fuerzas impulsoras involucradas en la formación del complejo son: los puentes de hidrógeno entre los grupos oxhidrilos de las CDs y el compuesto incluido, las fuerzas de Van der Waals entre las CDs y el huésped, las interacciones hidrofóbicas y la expulsión de moléculas de agua de "alta energía" de la cavidad de la ciclodextrina hacia el medio acuoso externo (Jiang y col., 2010). La interacción hidrofóbica implica básicamente cambios positivos de entropía acompañado de un cambio positivo leve de la entalpía, mientras que todas las otras fuerzas implican valores de ΔH y ΔS negativos (Jiang y col., 2010). Los parámetros termodinámicos (ΔH^* y ΔS^*) de formación de los complejos de inclusión fueron determinados a partir de la ecuación de Van't Hoff (ecuación III.5) y graficando $\ln K_e$ en función de $1/T$.

$$\ln K_C = -\frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta H^*}{R} \quad (\text{III.5})$$

El cambio de energía libre que ocurre durante el proceso de inclusión (ΔG^*) fue obtenido a partir de la ecuación (III.6):

$$\Delta G^* = -RT \ln K_e \quad (\text{III.6})$$

III.2.6. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE TIMOL EN LA MATRIZ DE ALMIDÓN HICAP 100.

La cantidad de timol superficial, encapsulado y retenido durante el almacenamiento en la matriz de almidón modificado (HiCap100) fue determinado como se describe en las siguientes secciones.

III.2.6.1. Determinación del timol superficial.

El método de determinación del timol superficial y encapsulado se basa en que este es lipofílico y entonces soluble en hexano mientras que la matriz de almidón es hidrosoluble.

El timol superficial se determinó mediante el lavado de alícuotas de 0,025 g de las muestras en estudio con 2 ml de hexano en tubos de vidrio, y posterior agitación durante dos minutos en un vortex. Este tratamiento resultó adecuado para remover todo el timol presente en la superficie. (Mourtzinos y col., 2008). A continuación los polvos se separaron del solvente por decantación y filtración. La absorbancia en la fase orgánica fue medida en una cubeta de cuarzo a 275 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (UV-1203 Shimadzu). Se ha encontrado que esta longitud de onda corresponde a la máxima absorbancia del espectro timol entre 200 y 600 nm, y coincide con los resultados obtenidos por Mourtzinos y col., (2008). Una curva estándar fue obtenida midiendo la absorbancia de soluciones de timol de diferente concentración en hexano. Como blanco se uso una cubeta con hexano.

III.2.6.2. Determinación del timol encapsulado inicial

El timol encapsulado se determinó dispersando los polvos remanentes del lavado superficial, con 2 ml de agua y agitando durante dos minutos en un vortex (con el fin de disolver la matriz y poder liberar el timol encapsulado). Este tratamiento se repitió 2 veces. A continuación se agregaron 4 ml de hexano, se agitó dos minutos en un vortex y se dejó en reposo durante 30 minutos con el fin de lograr una separación nítida de las fases. La fase orgánica fue separada de la acuosa con una pipeta Pasteur y la cantidad de timol presente en la misma se determinó con un espectrofotómetro midiendo la absorbancia 275 nm.

La eficiencia de encapsulación (EE) durante el proceso de liofilización se calculó con la siguiente fórmula (ecuación III.9):

$$EE = \frac{\text{g de timol encapsulado}}{\text{g de timol totales agregados a la matriz}} \times 100 \quad (\text{III.7})$$

III.2.6.3. Determinación del timol encapsulado durante el almacenamiento.

Con el fin de determinar la cantidad de timol remanente en la matriz durante el almacenamiento, a intervalos de tiempo determinados se extrajeron muestras equilibradas a diferentes HR, durante 120 días y se determinó el timol superficial y encapsulado según lo descrito en las secciones III.2.6.2 y III.2.6.3 respectivamente. Esto permitió calcular el porcentaje de retención (%R) a cada tiempo. El mismo se determinó dividiendo el EE a cada tiempo por el valor del EE inicial.

III.2.7. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMA SÓLIDOS

Iii.2.7.1. Microscopía Electrónica De Barrido (SEM)

El Microscopio electrónico de barrido es una herramienta que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos y proporciona información morfológica del material analizado, utilizando un haz de electrones para formar una imagen (He y col., 2008, Utsuki y col., 1996).

Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque simultáneamente una gran parte de la muestra. Su alta resolución posibilita estudiar la morfología de partículas de muy pequeño tamaño ($\sim 100 \text{ \AA}$) y obtener una visión tridimensional, que puede ser identificativa. La morfología se entiende como la forma que adquiere la materia cuando se divide finamente, en función de su estructura y de los procesos de cambio que induce dicha forma (Beddow, 1986). En efecto 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 CDs van a presentar grandes masas de partículas iguales (Ribeiro y col., 2003). Es decir, que permite determinar si la inclusión ocurrió.

Las características microestructurales de los distintos sistemas estudiados se analizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido con un cañón de electrones por emisión de campo (FEG-SEM) de la firma Carl Zeiss NTS, modelo Supra 40 (Alemania) con detector InLes y con una columna GEMINI® de tercera generación que permite obtener una imagen topográfica clara de la muestra (Figura III.7.).

Las muestras se colocaron en un soporte de aluminio, utilizando el apoyo de una cinta adhesiva bifaz de carbón conductor y luego se recubrieron con nanopartículas de oro (Cressington Scientific Instruments 108 Sputter Coater). Las imágenes se tomaron con el detector dentro de la lente, utilizando un voltaje de aceleración de 3,00 kV. a temperatura ambiente y en un rango de 100 a 10.000 X.



Figura III.7. Microscopio electrónico de barrido Zeiss Supra 40.

III.2.7.2. Difractometría de Rayos-X (DRX).

La difracción de Rayos X es una técnica analítica que permite estudiar la estructura interna de los sólidos cristalinos. Se basa en el hecho de que, en función de su estructura interna y de los tipos de átomos que la componen, cada fase cristalina tiene un difractograma propio y característico.

Los rayos x son ondas electromagnéticas, al igual que la luz visible, pero con una longitud de onda mucho menor, en el intervalo comprendido entre 0.1 y 10 Å, por lo que se trata de radiaciones ionizantes muy energéticas.

Los rayos X se generan normalmente mediante tubos a vacío, donde un filamento de wolframio (cátodo) es sometido a una corriente eléctrica de varios mA, estableciéndose una diferencia de potencial de varios kV entre ese cátodo y un ánodo metálico, habitualmente de cobre. En esas condiciones, se produce la emisión de electrones desde el cátodo, que impactan con mucha energía en el ánodo, arrancando electrones de las capas internas de la estructura electrónica del metal que constituye el cátodo

Por otro lado, en la materia cristalina los átomos están dispuestos de una manera ordenada y periódica en el espacio, formando planos cristalinos que están separados un valor constante. Estos espaciados son de la misma magnitud que la longitud de onda de los RX y cada plano difractará a un ángulo de incidencia determinado, θ , por lo cual, los rayos incidentes pueden difractarse por las redes cristalinas de acuerdo con la Ley de Bragg, Ecuación III.8.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (III.8)$$

Donde n es el orden de reflexión, λ la longitud de onda de los rayos X, d la distancia interplanar de la red cristalina y θ el ángulo de difracción.

El detector de RX es un dispositivo que convierte la radiación emitida en impulsos eléctricos, de modo que puedan ser procesados mediante un contador electrónico

puntual o lineal, y ser representados gráficamente en forma de intensidad (eje vertical) frente al ángulo 2θ (eje horizontal) recorrido por el detector.

El difractograma de una fase cristalina muestra un fondo continuo al que se le superponen una serie de "picos" o máximos de difracción, también llamados "reflexiones", dispuestos en determinados valores del ángulo 2θ , directamente equiparable al valor interplanar. Su intensidad o altura se suele asignar de manera relativa, dando una intensidad del 100% al pico más alto y el resto proporcionalmente.

El número y la posición de los máximos de difracción en el difractograma son el resultado de la simetría interna de la fase cristalina y de la celda unidad (que se define como la porción más simple de la estructura cristalina que al repetirse mediante traslación reproduce todo el cristal). La intensidad de las reflexiones depende de la cantidad y tipo de átomos de la celda unidad. La anchura de las reflexiones es función de la configuración del difractómetro y de diferentes características inherentes a la muestra, como el tamaño del cristal o la existencia de microtensiones en la estructura (Sangüesa, 2007). Un difractograma estándar utilizado para identificación puede medirse en menos de una hora, con lo cual es un método de análisis rápido.

Así, la técnica de difracción de RX es útil ya que si el complejo de inclusión se ha formado, el difractograma obtenido va a mostrar un patrón de tipo halo (Ribeiro y col., 2003), con picos difusos y anchos, característicos de un compuesto amorfo. Dicho difractograma difiere de las señales obtenidas para el compuesto activo y la CD puros (Ning y col., 2005; Chen y col., 2006).

Se realizaron análisis de difracción por rayos-X sobre los distintos sistemas utilizando un difractómetro Siemens D5000 (ver Figura III.8), modo $\theta - 2\theta$, radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) y un monocromador de grafito, desde 5 a 50 grados (con un paso de 0,02 grados a 0.7 segundos por paso). Se empleó el software Diffract AT para resolver los picos de difracción.



Figura III.8. Difractómetro de rayos X Siemens D5000.

III.2.7.3. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La técnica de FTIR se emplea para la elucidación estructural del complejo huésped:CD formado y ayuda a demostrar qué parte de la molécula del principio activo se encuentra dentro o fuera de la cavidad de la ciclodextrina (Manolikar y Sawant, 2003; McMullan y col., 1973). En los espectros infrarrojo aparecen absorciones a frecuencias características, que pueden atribuirse a grupos químicos específicos (Stuart, 2004).

La espectroscopía infrarroja es la rama de la espectroscopia que estudia las interacciones de la materia con la región infrarroja del espectro electromagnético. Se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los distintos niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma, de la superficie de energía potencial molecular, de la geometría molecular, de las masas atómicas y, posiblemente, del acoplamiento vibracional.

Para el análisis de los distintos sistemas de estudio se utilizó el método de ATR o de reflectancia total atenuada.

III.2.7.3.1 Reflectancia Total Atenuada (ATR).

En la técnica ATR (Attenuated Total Reflection) lo más interesante es que el haz incide por detrás de la muestra, y al tratarse de una interfaz donde el medio externo tiene una densidad óptica menor que la del medio donde incide, la radiación sufre reflexión total (Figura III.9) (Bruker optics, 2009).

La presencia en la superficie de moléculas que absorben radiación produce una atenuación de la radiación reflejada. Este hecho tiene lugar porque el medio absorbente cambia el índice de refracción local, lo que hace que parte de la radiación penetre en el medio menos denso y sea, por lo tanto, atenuada, de ahí el origen de la denominación de esta técnica.

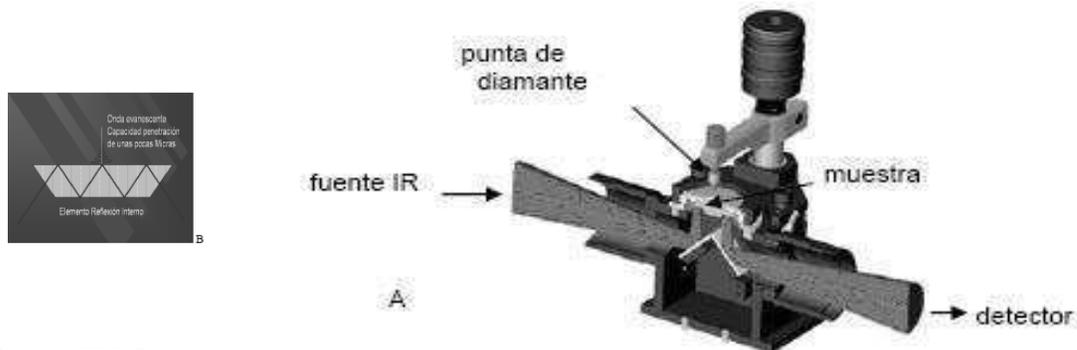


Figura III.9. Figura del equipo ATR.

Esta técnica se utilizó para determinar las posibles interacciones entre el timol y CINAM con las distintas CDs, y del timol con HiCap 100. Las mediciones fueron realizadas en un espectrofotómetro FTIR Nicolet Magna Systems 560 (Thermo Electron Corporation GMBH), con detector MCT/A refrigerado con nitrógeno líquido, con un accesorio Spectra-Tech Foundation Thunderdone ATR (Spectra-Tech, Inc., Estados Unidos de América) de simple reflexión con cristal de diamante-Se/Zn y un ángulo de incidencia de 45 °. No se aplicó la corrección ATR disponible en el programa (que permite comparar los espectros ATR con los obtenidos por transmisión) debido a que no se requería dicha comparación. Se utilizó este accesorio debido a que los sistemas pueden ser analizados directamente sin ninguna manipulación. El banco óptico fue purgado con aire seco libre de CO₂ durante el análisis, y los espectros fueron tomados en el modo reflexión entre 675 y 4000 cm⁻¹, adquiriendo 64 escaneos como promedio con resolución de 4 cm⁻¹ y con una apertura de 31.

El análisis espectral fue realizado usando el programa Omnic version 7.3 (Thermo Electron Corporation GmbH); en este caso, la región de la "huella digital" (*finger print region*), que se extiende desde los 400 hasta los 1500 cm⁻¹, muestra las bandas correspondientes a cada uno de los sistemas estudiados y es aquella en que se

focalizará el análisis. Las muestras analizadas fueron los polvos deshidratadas obtenidas por liofilización.

III.2.8. TRATAMIENTO MATEMÁTICO DE LOS DATOS.

El cálculo de los parámetros de las regresiones lineales y no lineales y sus desvíos estándar, el modelado de los datos experimentales, como así también la normalización de los espectros infrarrojos se realizó utilizando programas provistos por la biblioteca Graph Pad Prism (V5.1). Estos programas minimizan el cuadrado de la diferencia entre los valores predichos y experimentales. Además como complemento se utilizó Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) para Windows XP.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS EN SOLUCIÓN

IV.1.1. SOLUBILIDAD DE FASES

El estudio de solubilidad de fases de los complejos permitió obtener las constantes de equilibrio de los complejos (K_e) y los parámetros termodinámicos: energía libre (ΔG^*), entalpía (ΔH^*) y entropía (ΔS^*) de formación del complejo.

IV.1.1.1. Determinación de las constantes de equilibrio de los complejos

Las constantes de equilibrio (K_e) del timol y cinamaldehído con la β -ciclodextrina y las CDs modificadas (metil- β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina) fueron determinadas por el método de solubilidad de fases (Higuchi y Connors, 1965) a 25° C, 37° C y 50° C, de acuerdo con la técnica descrita en la sección III.2.5.1 de Materiales y Métodos.

En la Figuras IV.1a y 1b; Figuras IV.2a y 2b y Figuras IV.3a y 3b se muestran los diagramas de solubilidad de fases del timol y el CINAM con la BCD, HPBCD y MBCD respectivamente. En dichos diagramas se grafica la concentración de timol o cinamaldehído en función de la concentración de la BCD a 25, 37 y 50° C.

Todos los diagramas muestran que la solubilidad del timol y del CINAM se incrementa linealmente con la concentración de CD, sin formación de precipitado en el rango de concentraciones de CDs usado. Este comportamiento ha sido denominado como de tipo A_L (Higuchi y Connors, 1965). Este incremento de solubilidad está relacionado con la capacidad de las CDs de incluir al timol y al CINAM. La pendiente de los diferentes

gráficos fueron todas menores que 1, lo que indicaría la formación de complejos 1:1 (Higuchi y Connors, 1965).

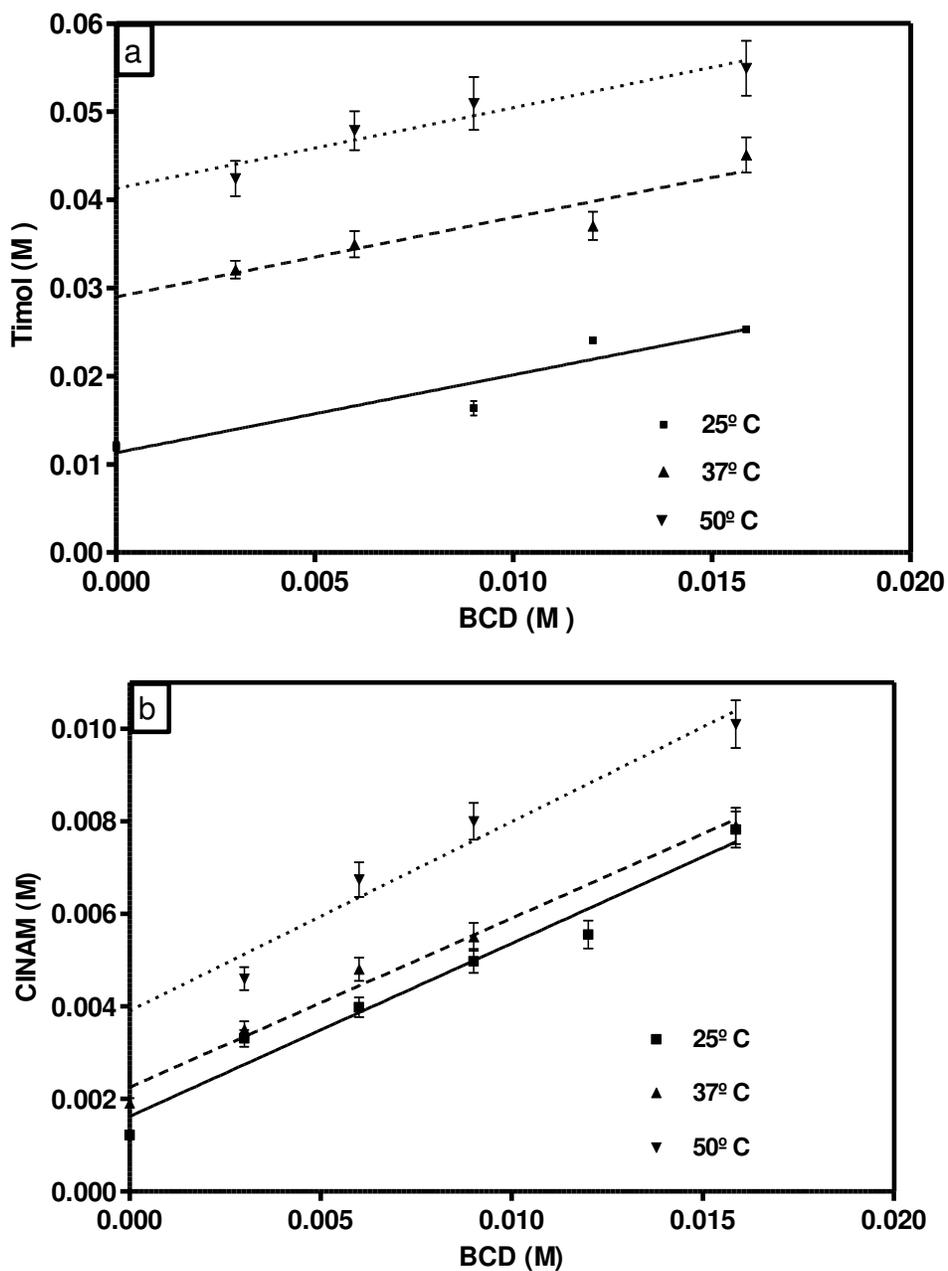


Figura IV.1. Diagramas de solubilidad de fases del timol (a) y del CINAM (b) con la BCD (en concentraciones molares) a 25, 37 y 50° C. Las barras de error representan la desviación estándar (en los casos en que no son visibles se encuentran ocultas por el símbolo).

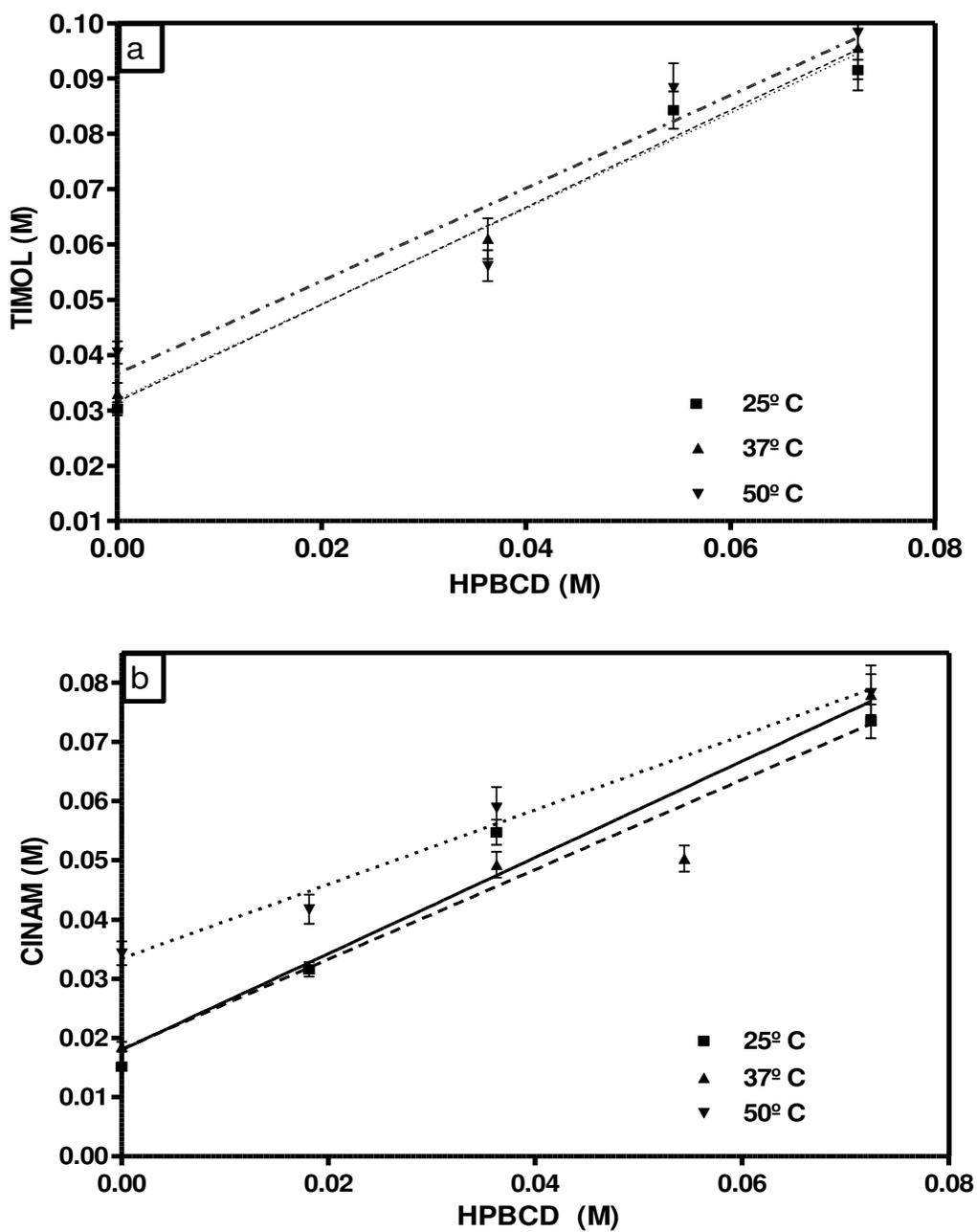
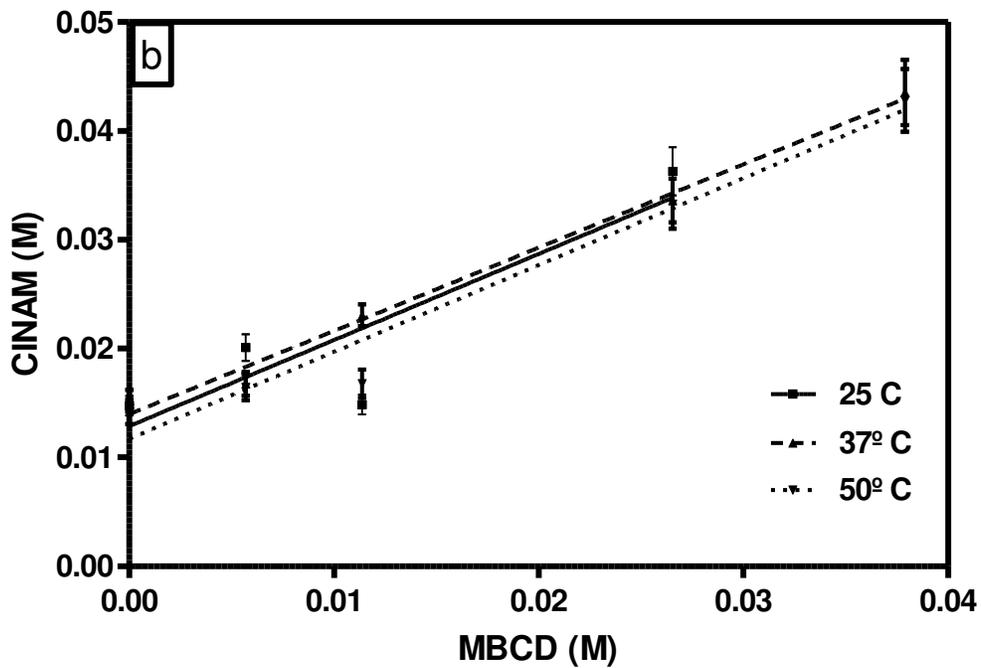
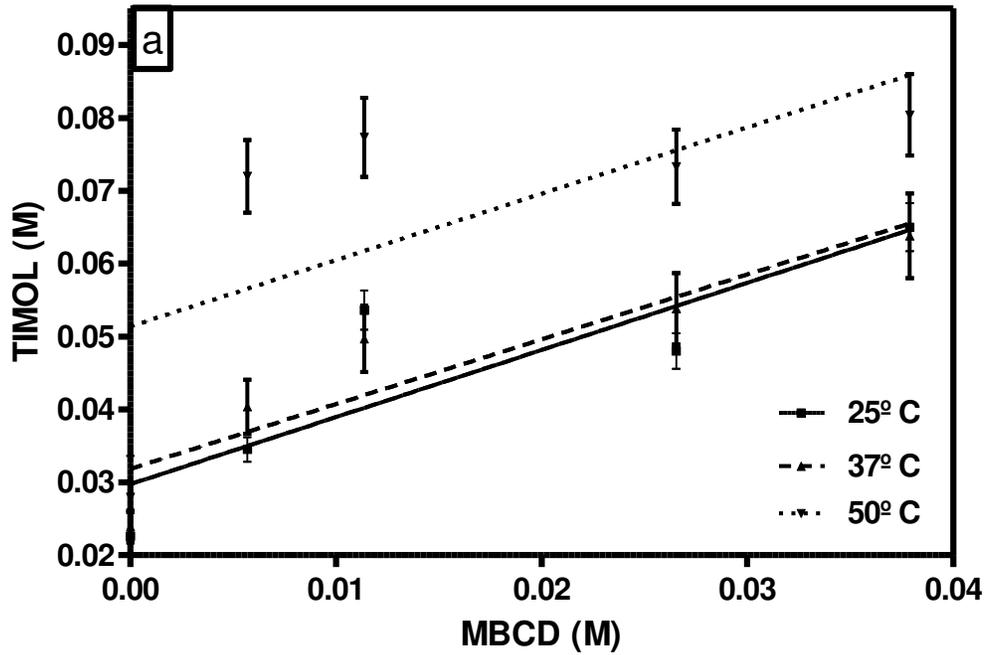


Figura IV.2. Diagramas de solubilidad de fases del timol (a) y del CINAM (b) con la HPBCD a (en concentraciones molares) 25, 37 y 50° C. Las barras de error representan la desviación estándar (en los casos en que no son visibles se encuentran ocultas por el símbolo).



Figuras IV.3. Diagramas de solubilidad de fases del timol (a) y del CINAM (b) con la MBCD (en concentraciones molares) a 25, 37 y 50° C. Las barras de error representan la desviación estándar (en los casos en que no son visibles se encuentran ocultas por el símbolo).

Los resultados obtenidos coinciden con lo señalado en la Introducción (sección I.4.2.3), donde se comentó que para los sabores, la estequiometría informada en la mayoría de los trabajos es 1:1 (Szente y Szejtli, 2004).

A partir de la línea recta de los diagramas de solubilidad fueron estimadas las constantes de estabilidad aparente (K_e) de acuerdo con la ecuación III.4 (Materiales y Métodos) (Higuchi y Connors, 1965):

$$K_e = \frac{\text{pendiente}}{S_0 \times (1 - \text{pendiente})} \quad (\text{III.4})$$

donde S_0 (solubilidad intrínseca) es la solubilidad del timol o del cinamaldehído en agua pura y *pendiente* es la pendiente de la línea recta del diagrama de solubilidad de fases.

En la Tabla IV.1 se muestran los valores de S_0 y de las constantes de solubilidad (K_e) de los complejos del timol con la BCD, HPBCD y MBCD y en la Tabla IV.2 los correspondientes al CINAM, a 25, 37 y 50° C obtenidos a partir de la ecuación III.4.

Tabla IV.1. Valores estimados de la solubilidad intrínseca (S_0) y de las constantes de estabilidad, K_e para los complejos del timol con BCD, HPBC y MBCD a 25, 37 y 50° C y sus correspondientes desviaciones estándar (σ).

T* (°C)	BCD		HPBCD		MBCD	
	$S_0 \pm \sigma_{S_0}$ (10 ³ M)	$K_e \pm \sigma_{K_e}$ (M ⁻¹)	$S_0 \pm \sigma_{S_0}$ (10 ³ M)	$K_e \pm \sigma_{K_e}$ (M ⁻¹)	$S_0 \pm \sigma_{S_0}$ (10 ³ M)	$K_e \pm \sigma_{K_e}$ (M ⁻¹)
25	11 ± 1	664 ± 28	32 ± 1	233 ± 11	30 ± 2	392 ± 20
37	29 ± 1	323 ± 15	32 ± 2	200 ± 10	32 ± 2	251 ± 23
50	41 ± 2	270 ± 13	51 ± 2	21 ± 1	51 ± 3	200 ± 14

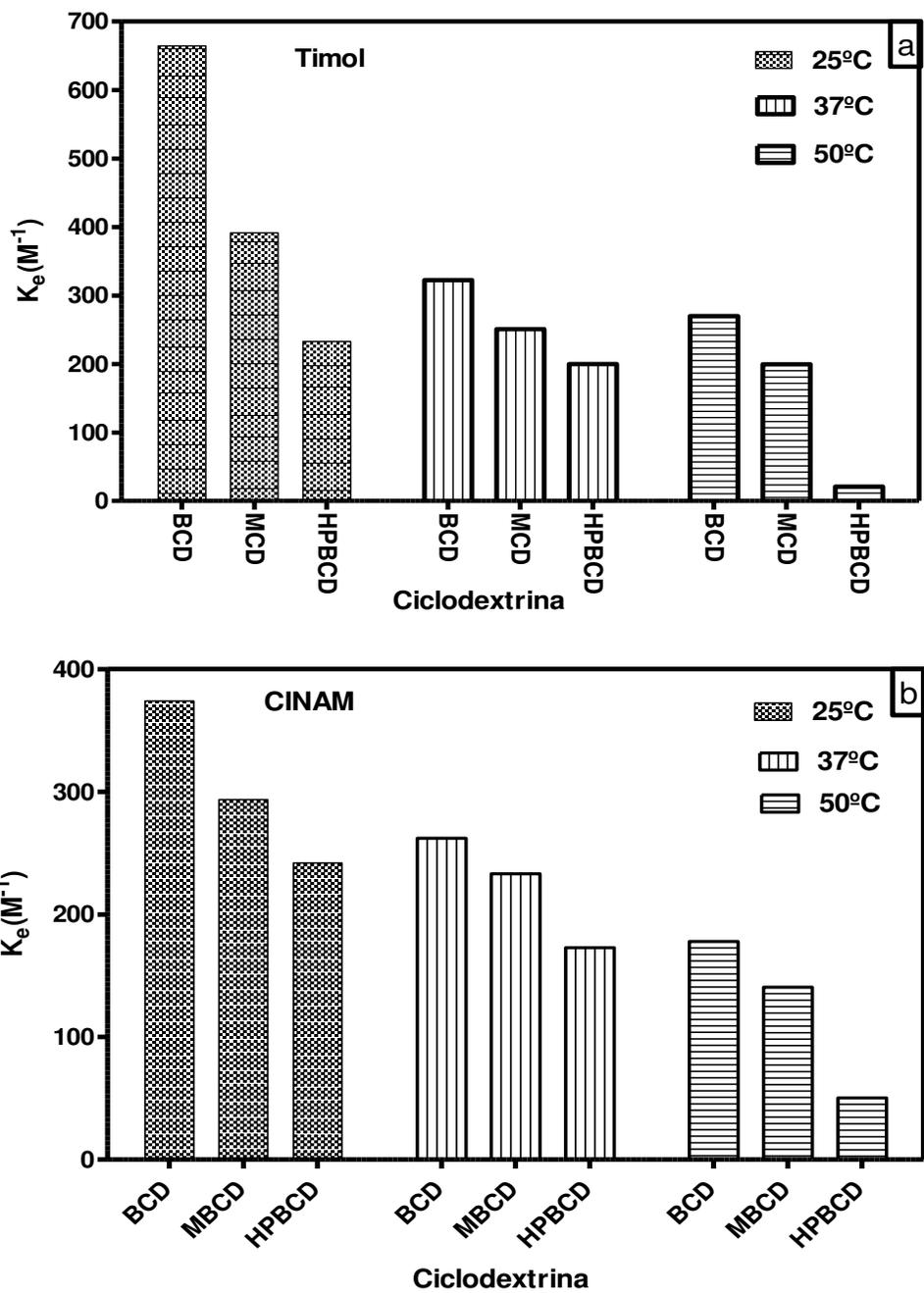
* T: temperatura

Tabla IV.2. Valores estimados de la solubilidad intrínseca, S_0 y de las constantes de estabilidad, K_e para los complejos del CINAM con BCD, HPBC y MBCD a 25, 37 y 50° C y sus correspondientes desviaciones estándar (σ).

T* (°C)	BCD		HPBCD		MBCD	
	$S_0 \pm \sigma_{S_0}$ (10³M)	$K_e \pm \sigma_{K_e}$ (M⁻¹)	$S_0 \pm \sigma_{S_0}$ (10³M)	$K_e \pm \sigma_{K_e}$ (M⁻¹)	$S_0 \pm \sigma_{S_0}$ (10³M)	$K_e \pm \sigma_{K_e}$ (M⁻¹)
25	1,6 ± 0,1	374 ± 18	18 ± 0,7	242 ± 12	13 ± 1	294 ± 18
37	2,2 ± 0,1	262 ± 10	18 ± 0,8	173 ± 8	14 ± 1	233 ± 18
50	3,9 ± 0,2	178 ± 8	33 ± 2	51 ± 2	14 ± 1	141 ± 11

* T: temperatura

La BCD, la HPBCD y la MBCD muestran distintas afinidades hacia el timol y el CINAM, como lo indican los valores de K_e . Así, el grado de interacción de ambos compuestos con las diferentes CDs fue en el orden: BCD > MBCD > HPBCD. En efecto, las K_e de los complejos de BCD fueron mayores que los de MBCD, y estas mayores que las correspondientes a la HPBCD (Tablas IV.1 y IV.2). Además, la magnitud de dicho incremento fue función de la temperatura y del compuesto incluido. Así, para ambos compuestos, a 25 °C y 37 °C el valor de K_e de la BCD es entre 1,5 a 2,5 mayor que los de los complejos de MBCD y la HPBCD. Por otra parte, a 50°C los valores de K_e para los complejos con BCD fueron 10 veces superiores para el timol y 4 veces para el CINAM respecto de la HPBCD. A su vez, si se compara los complejos de BCD respecto a los de MBCD, los valores de K_e a 50°C son 1,5 veces mayores (guardan una relación similar que a 25 y 37°C). Las Figuras IV.4a (timol) y IV.4 b (CINAM) sintetizan gráficamente la descripción precedente.



Figuras IV.4. Constantes de equilibrio de la BCD, MBCD y HPBCD con el timol (a) y con el CINAM (b) a 25, 37 y 50° C.

Estos resultados se podrían atribuir a que la derivación de la CD con grupos alquilo o hidroxialquilo produce una barrera estérica que dificulta la entrada del huésped dentro

de la cavidad de la CD y que este efecto es mayor cuando mayor es el tamaño del grupo adicionado. Jiang y col., (2010) hallaron resultados similares para los complejos el cinamaldehído (contenido en el aceite esencial de *Cinnamomum laureirii*) con metil e hidroxipropil- β -ciclodextrinas.

Además, los valores de las K_e de los complejos timol-BCD, fueron mayores que los correspondientes a los complejos CINAM-BCD a todas las temperaturas. Esto se puede atribuir a que el grupo lateral C=C-CHO (del CINAM), que posee un grupo insaturado, hace que la molécula sea menos flexible lo que dificulta su entrada en las CDs (Rekharsky y Inoue, 1998). En el caso de la HPBCD, a 25 y 37° C no existen diferencias significativas mientras que a 50° C existe mayor afinidad de la HPBCD por el CINAM que por el timol, ya que a 50° C el aumento de la temperatura compensa dicho efecto negativo. Esto demuestra que las interacciones específicas ciclodextrina-huésped juegan un papel importante en el valor de las constantes de equilibrio pero los efectos estéricos también son importantes (tamaño y geometría del ligando y la ciclodextrina (Jain y Adeyeye, 2001)).

IV.1.1.2. Termodinámica del proceso de inclusión

El estudio de la termodinámica del proceso de inclusión es importante ya que permite determinar la naturaleza de las interacciones entre la CD y el huésped.

La afinidad del huésped hacia las diferentes CDs depende de numerosos factores a saber: polaridad, tamaño y forma, tanto de la CD como del huésped y la capacidad de

formar uniones por puente de hidrógeno (Martin del Valle, 2004; Jiang y col., 2010; Singh y col., 2002).

En general, se ha aceptado que las principales fuerzas impulsoras involucradas en la formación del complejo son: los puentes de hidrógeno entre los grupos oxhidrilos de la BCD y el compuesto incluido, las fuerzas de Van der Waals entre la BCD y el huésped, las interacciones hidrofóbicas y la expulsión de moléculas de agua de "alta energía" de la cavidad de la BCD hacia el medio acuoso externo (Jiang y col., 2010). La interacción hidrofóbica implica básicamente cambios positivos de entropía acompañado de un cambio positivo leve de la entalpía, mientras que todas las otras fuerzas implican valores de ΔH y ΔS negativos (Jiang y col., 2010; Tong, 2001). Todos estos factores influyen en la solubilidad del compuesto incluido y en las constantes de estabilidad de los complejos formados.

La reacción total de inclusión incluye una serie de etapas elementales tales como desolvatación del huésped y de la cavidad interna de la CD, cambios conformacionales del huésped y la CD, unión del huésped y la CD, reorganización del solvente fuera y dentro de la cavidad de la CD y finalmente relajación estructural del complejo. (Al Omari y col., 2007; Lo Meo y col., 2003)

Como se observa en las tablas IV.1 y IV.2, los valores de las constantes de equilibrio (K_e) disminuyen al aumentar la temperatura, lo que indica que el proceso de formación del complejo es exotérmico. Estos resultados concuerdan con los reportados por Mourtzinou y col. (2008) y Karathanos y col. (2007).

Los parámetros termodinámicos entalpía (ΔH^*) y entropía (ΔS^*) de formación de los complejos de inclusión se determinaron a partir de la dependencia de las constantes aparentes de formación de los complejos (K_e) con la temperatura. Para ello se utilizó la ecuación de Van't Hoff (Ecuación IV.1) y se graficó $\ln K_e$ en función de $1/T$ (Tommasini et al., 2004).

$$\ln K_e = -\frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R} \quad \text{IV.1}$$

Donde R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta en grados Kelvin.

Los valores correspondientes de ΔH^* y ΔS^* fueron obtenidos partir de la pendiente y de la ordenada al origen respectivamente de dichos gráficos. El cambio de energía libre que ocurre durante el proceso de inclusión (ΔG^*) se obtuvo a partir de la ecuación IV.2

$$\Delta G^* = -RT \ln K_e \quad \text{IV.2}$$

Los valores obtenidos a partir de la Ecuación IV.1 (ΔH^* y ΔS^*) y Ecuación IV.2 (ΔG^*) se muestran en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3. Parámetros termodinámicos (ΔH^* , ΔS^* y ΔG) determinados para la reacción de formación de los complejos de la BCD, MBCD y la HPBCD con timol y cinamaldehído y su correspondiente desviación estándar (σ)

Complejo	$\Delta G_{25} \pm \sigma_{\Delta G 25}$ (KJ/mol)	$\Delta G_{37} \pm \sigma_{\Delta G 37}$ (KJ/mol)	$\Delta G_{50} \pm \sigma_{\Delta G 50}$ (KJ/mol)	$\Delta H^* \pm \sigma_{\Delta H^*}$ (KJ/mol)	$\Delta S^* \pm \sigma_{\Delta S^*}$ (J/K mol)
Timol-BCD	-16,1 \pm 0,7	-15,1 \pm 0,7	-15,8 \pm 0,8	-20,1 \pm 0,8	-14,4 \pm 0,4
CINAM-BCD	-14,7 \pm 0,7	-14,4 \pm 0,7	-13,9 \pm 0,7	-24 \pm 1	-31 \pm 1
Timol-HPBCD	-13,7 \pm 0,6	-13,8 \pm 0,6	-8,13 \pm 0,4	-98 \pm 4	-274 \pm 11
CINAM-HPBCD	-13,8 \pm 0,6	-13,4 \pm 0,5	-10,53 \pm 0,4	-63 \pm 3	-162 \pm 6
Timol-MBCD	-14,8 \pm 0,6	-14,2 \pm 0,5	-14,22 \pm 0,7	-22 \pm 1	-23 \pm 1
CINAM-BCD	-14,1 \pm 0,7	-14,0 \pm 0,5	-13,28 \pm 0,8	-24 \pm 1	-31 \pm 2

Estos resultados muestran que ambos compuestos tienen una tendencia marcada a formar complejos de inclusión con todas las CDs (BCD, MBCD y HPBCD). Los valores negativos de entalpía indican que el proceso de interacción de las CDs con ambos huéspedes es exotérmico. Los valores de entropía, también fueron negativos en dicho proceso. Este último comportamiento puede ser atribuido a que la formación del complejo causa una disminución de los grados de libertad translacionales y rotacionales del complejo comparados a los de las moléculas libres, dando lugar a un sistema más ordenado (Tong, 2001). Estos resultados (de acuerdo a lo comentado anteriormente) indicarían, que las principales fuerzas impulsoras involucradas en la reacción de inclusión son las fuerzas de Van der Waals y la expulsión de moléculas de agua de alta energía del interior de la cavidad de la CDs, ya que las interacciones hidrofóbicas

implican básicamente cambios positivos de entropía acompañado de un cambio positivo leve de la entalpía (Tong, 2001; Jiang y col., 2010). Similares resultados fueron hallados por Karathanos y col., (2007). Este tipo de comportamiento da lugar también a una compensación entalpía-entropía (Al Omari y col., 2007; Charumanee y col., 2006).

IV.1.1.3. Efecto compensación entropía-entalpía

Para que la reacción de formación del complejo sea espontánea, además que el cambio de energía libre de Gibbs sea negativo, debe existir una contribución entrópica o entálpica que explique este resultado. La Figura IV.5 muestra el aporte de ambos parámetros a la espontaneidad del proceso de inclusión para cada complejo a 25° C. Se puede apreciar que en todos los casos el factor que contribuye a la espontaneidad de la reacción es el término entálpico ya que el término $-T\Delta S$ es positivo pues la entropía es negativa como se mencionó anteriormente. Sin embargo, la magnitud en que ambos términos contribuyen varía según el complejo.

Se puede observar que la modificación de la CD produce cambios en la magnitud relativa de los efectos entálpicos y entrópicos a la espontaneidad del proceso de inclusión. Así, mientras que para la BCD y la MBCD los valores de ΔH^* fueron significativamente mayores que el término $-T\Delta S^*$ (Figura IV.5) para la HPBCD en cambio los valores de $-T\Delta S^*$ fueron aproximadamente iguales a los valores de ΔH^* .

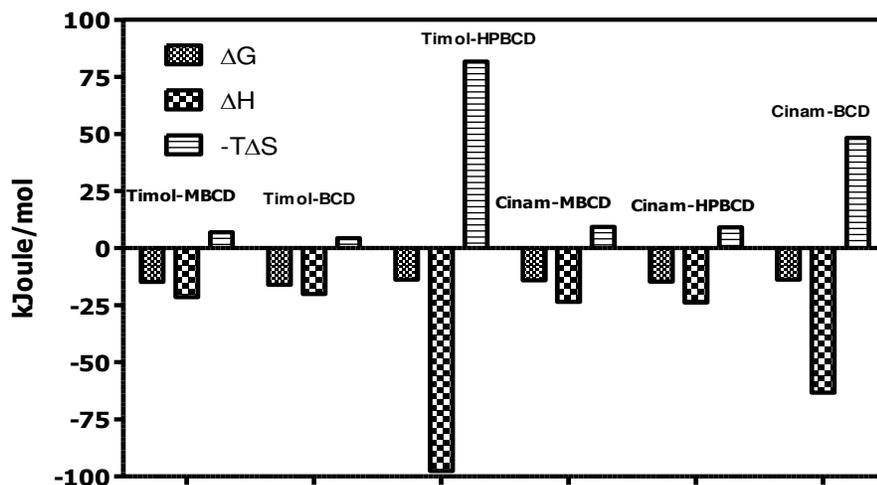


Figura IV.5. Contribución de la entalpía y entropía a la espontaneidad de la reacción a 298 K

IV.2. ESTUDIO DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS

IV.2.1. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES TÉRMICAS DE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS.

Como ya se describió en Materiales y Métodos la Calorimetría Diferencial de Barrido se empleó para verificar la formación de los complejos de inclusión de las diferentes CDs con el timol y el cinamaldehído, seguir la liberación de los mismos durante el almacenamiento, determinar las transiciones vítreas, y otras transiciones térmicas que pudieran presentar los sistemas sólidos estudiados.

IV.2.1.A. Determinación de las propiedades térmicas de las ciclodextrinas y los complejos de inclusión.

IV.2.1.A.1. Confirmación de la formación de los complejos de inclusión de la BCD, MBCD y la HPBCD.

Antes de confirmar la formación de los complejos se consideró de interés determinar los termogramas de las CDs puras, ya que el mismo puede proporcionar información respecto a la estructura de las mismas.

En la Figura IV.6 se muestran los termogramas de la BCD, MBCD y HPBCD. El termograma de la BCD pura presentó un pico endotérmico que se inicia a alrededor de 93° C debido posiblemente a la eliminación del agua de solvatación (Hedges, y McBride, 1999; Giordano y col., 2001). En cambio la MBCD y la HPBCD además de los picos de eliminación de agua que comienzan a 118° C y 165° C respectivamente presentaron una Tg a 110° C (MBCD) y a 124° C (HPBCD). Estos resultados confirman que la BCD es cristalina mientras que la MBCD y la HPBCD son amorfas. Similares resultados encontraron Mazzobre y col. (2010).

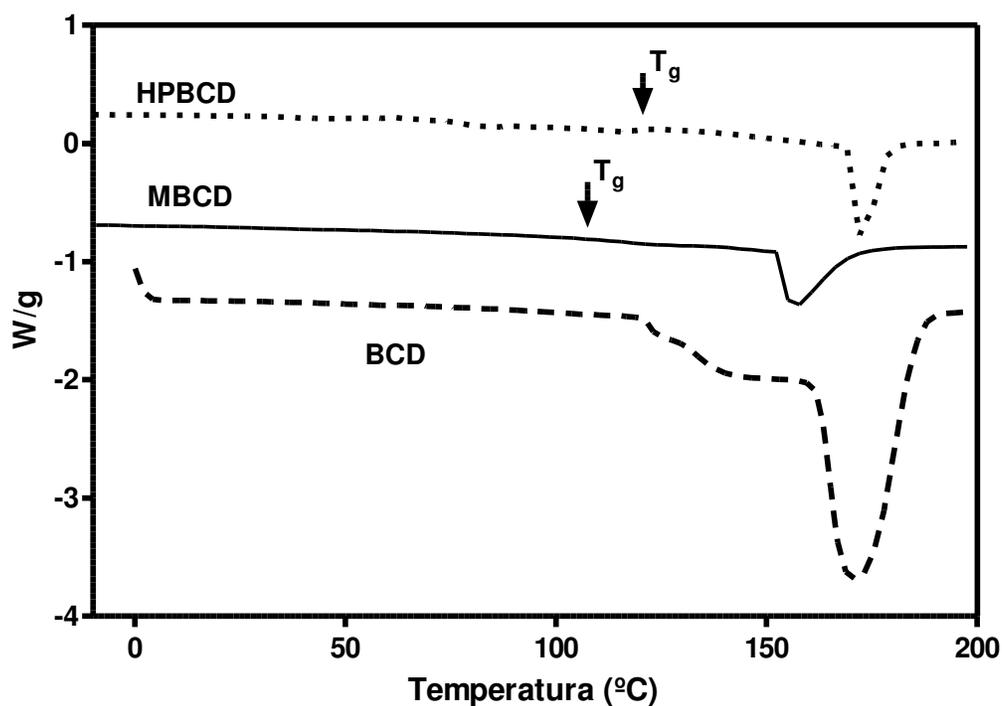


Figura IV.6. Termogramas de la BCD, MBCD e HPBCD a 0% de HR. En la misma se indican los picos de fusión y las temperaturas de transición vítrea (T_g).

Para verificar la formación de los complejos de inclusión con las diferentes CDs se utilizó la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de acuerdo a la metodología descrita en la sección III.2.4.2 de Materiales y Métodos.

La Figura IV.7a muestra los termogramas obtenidos por DSC, para el timol y los complejos timol-CDs 1:1. El termograma del timol muestra un pico endotérmico en un rango de temperatura de 48 a 52° C que corresponde a su punto de fusión, mientras que en las curvas de los complejos timol-CDs dicho pico desapareció (Figura IV.7 a). Mourtzinis y col. (2008) encontraron un valor similar en un estudio sobre la estabilidad de monoterpenos encapsulados en BCD y matrices de almidón. Un comportamiento

similar presentaron los complejos CINAM-CDs 1:1. (Figura IV.7 b). A temperatura ambiente el cinamaldehído 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 término 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). Dichos picos desaparecen completamente en los complejos CINAM-CDs 1:1. Esto es una fuerte evidencia de la formación de los complejos de inclusión. En efecto la desaparición completa de los picos térmicos de las moléculas huéspedes, cuando son examinadas como complejos, es generalmente considerada como una prueba real de inclusión (Karathanos y col., 2007; Pralhad y Rajendrakumar, 2004; Ribeiro y col., 2003; Williams, 1998).

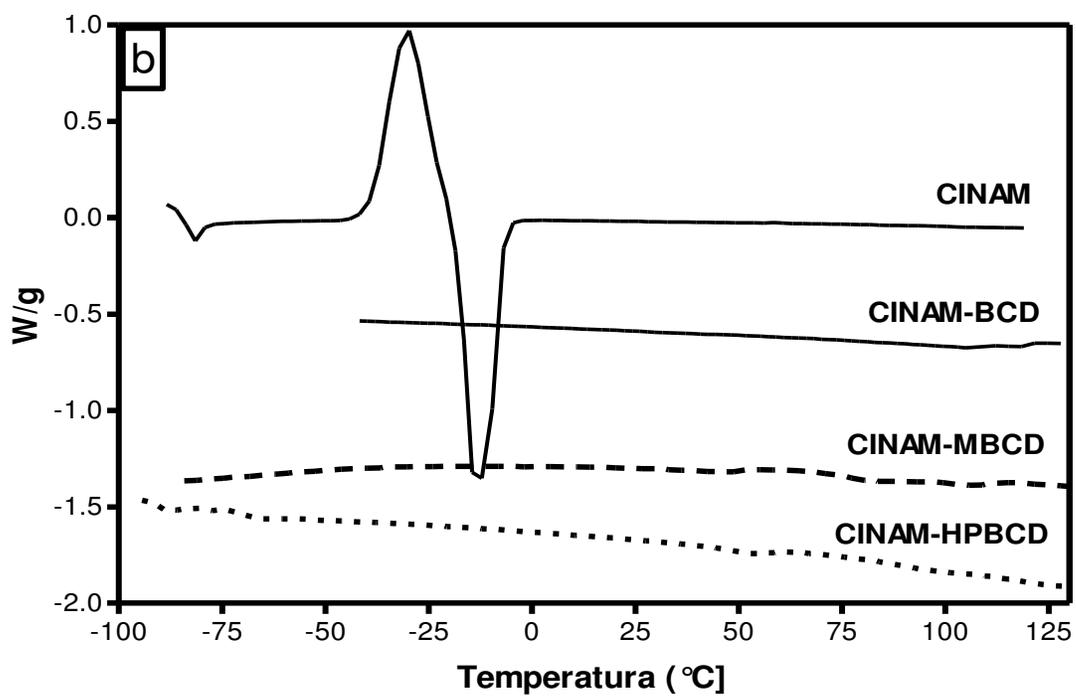
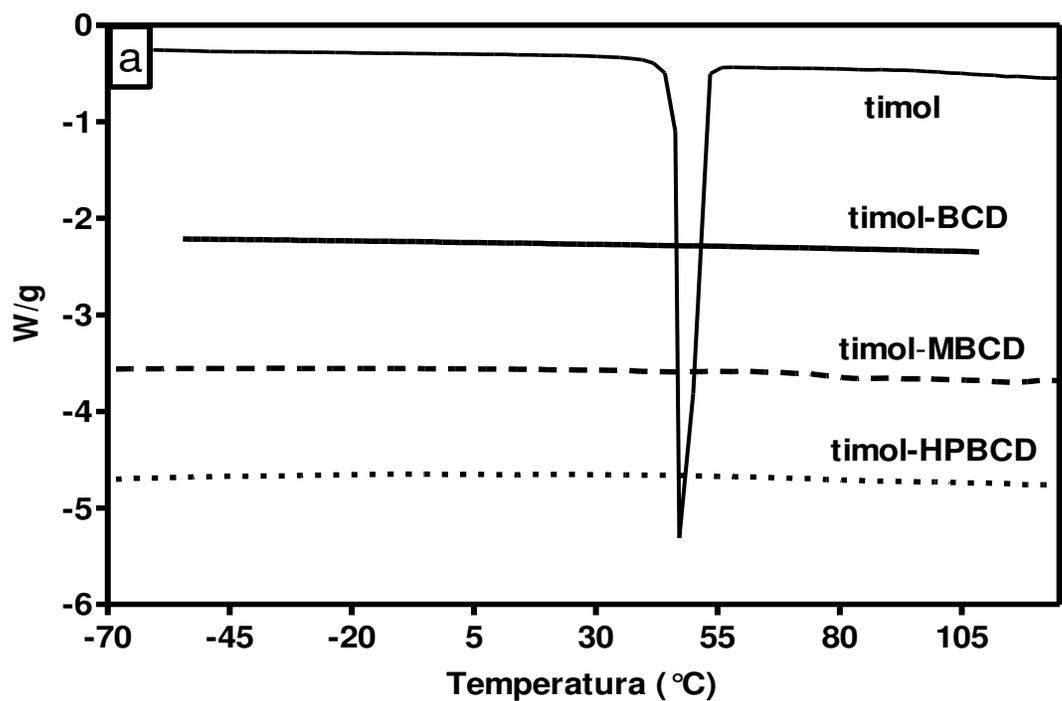


Figura IV.7. Termogramas del a) timol y sus complejos con BCD, MBCD e HPBCD y b) cinamaldehído (CINAM) y sus complejos con BCD, MBCD e HPBCD recién preparados.

IV.2.1.A.2. Determinación de la liberación del flavor de los complejos de inclusión durante el almacenamiento.

Debido a que los sabores encapsulados son generalmente almacenados durante extensos períodos de tiempo antes de ser utilizados en alimentos y bebidas, es importante determinar no solo la retención inicial del componente activo en la cavidad de las CDs o la matriz, sino también determinar la cantidad retenida en función del tiempo. Con este objetivo a intervalos de tiempo determinados se tomaron muestras y se determinó el porcentaje de compuesto o ligando liberado (% L) de los complejos almacenados a diferentes HR y 25° C. Para calcular dicho porcentaje se utilizó la calorimetría diferencial de acuerdo a la técnica descrita en la sección III.2.4.2 (Materiales y métodos) utilizando la fórmula (III.3):

$$\%L = \frac{\Delta H_s}{\Delta H_o} \cdot 100 \quad (\text{III.3})$$

donde,

% L: porcentaje de ligando liberado.

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

ΔH_o : calor de fusión del timol o del cinamaldehído en los complejos recién preparados.

Dicho estudio reveló, que la cantidad de timol y CINAM liberada de sus respectivos complejos de inclusión fue función de la HR, del tipo de CD, compuesto encapsulado y del tiempo de almacenamiento.

Se observó, que en el caso de la BCD durante 84 días de almacenamiento, el timol y el cinamaldehído fueron liberados de sus respectivos complejos de inclusión solamente a 84 y 97% de HR.

En la Figura IV.8 a y b, a modo de ejemplo se muestran los termogramas de los complejos de CINAM-BCD a 84% y 97 % HR respectivamente, a diferentes tiempos de almacenamiento.

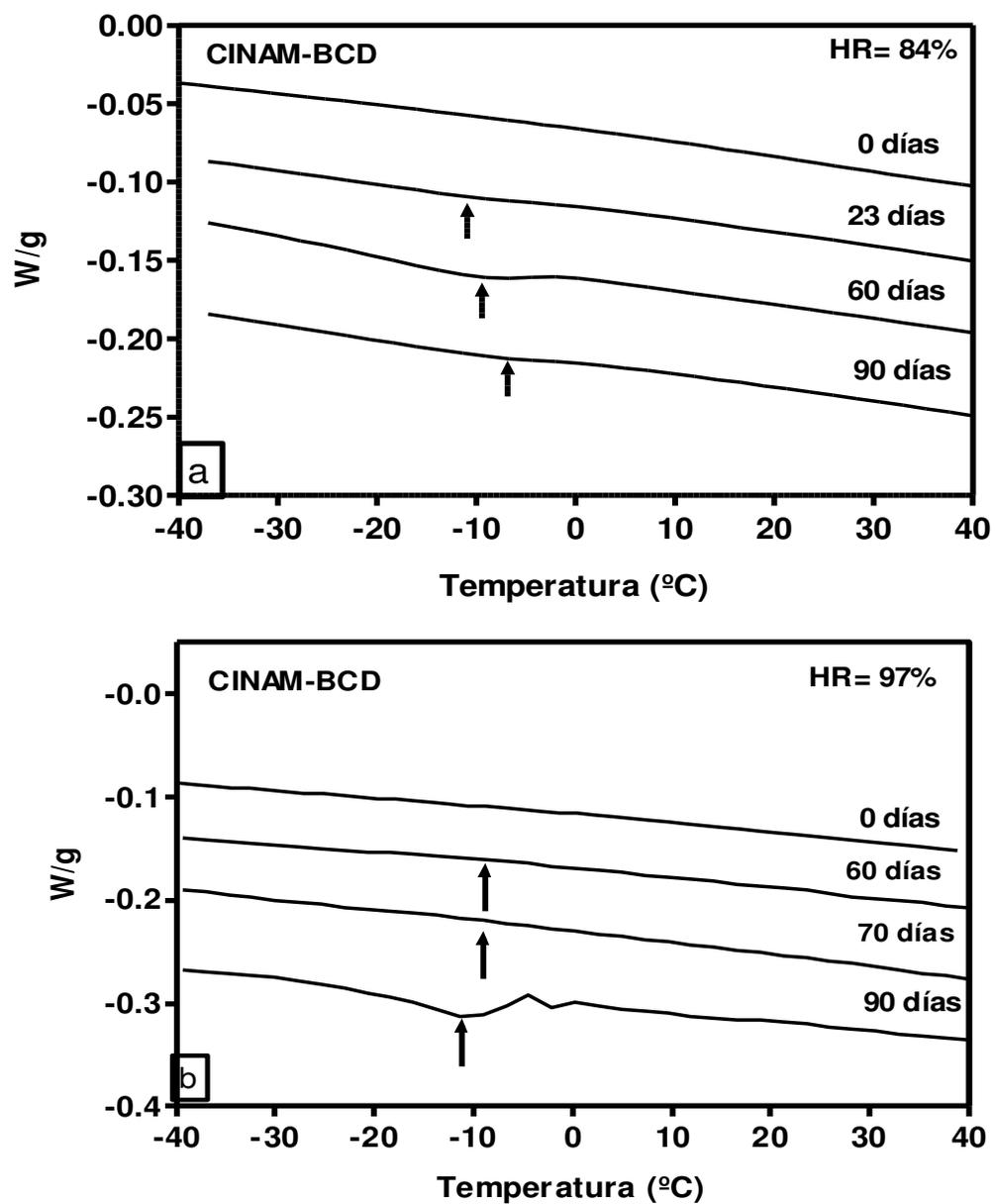


Figura IV.8. Termogramas obtenidos por DSC del complejo CINAM-BCD a 84% HR (a), y 97 % HR (b) y 25°C a distintos tiempos de almacenamiento.

Los complejos de la MBCD y HPBCD con el timol mostraron un comportamiento totalmente diferente a los de la BCD ya que la liberación del huésped ocurrió aún a bajas HR y como en el caso de la BCD fue función del tiempo.

En la Figura IV.9 a y b se muestran los termogramas de los complejos timol-MBCD y timol-HPBCD respectivamente, luego de 3 meses de almacenamiento a 25°C. Los termogramas obtenidos muestran, en el rango de 48-50° C el pico correspondiente a la fusión del timol, lo que indica que el mismo se liberó del complejo. Además, se observa que la magnitud de dicho pico es función de la HR y de la naturaleza de la CD. En la Figura IV.10 a y b se muestran los termogramas correspondientes a los complejos CINAM-MBCD y CINAM-HPBCD respectivamente durante 3 meses de almacenamiento. Se observa que dichos complejos presentaron un comportamiento similar a los de la BCD y la liberación del huésped ocurre solo a 84 y 97% de HR. No obstante es necesario aclarar, que pasados los 3 meses de almacenamiento, como veremos más adelante (Sección IV.2.5, estabilidad), la desencapsulación ocurre también a bajas HR.

Esto demuestra el rol importante que juega en el equilibrio de formación del complejo, el agua y polaridad, tamaño y forma, tanto de la CD como del huésped y la capacidad de formar uniones por puente de hidrógeno (Jiang, 2010; Martín del Valle, 2004; Singh y col., 2002).

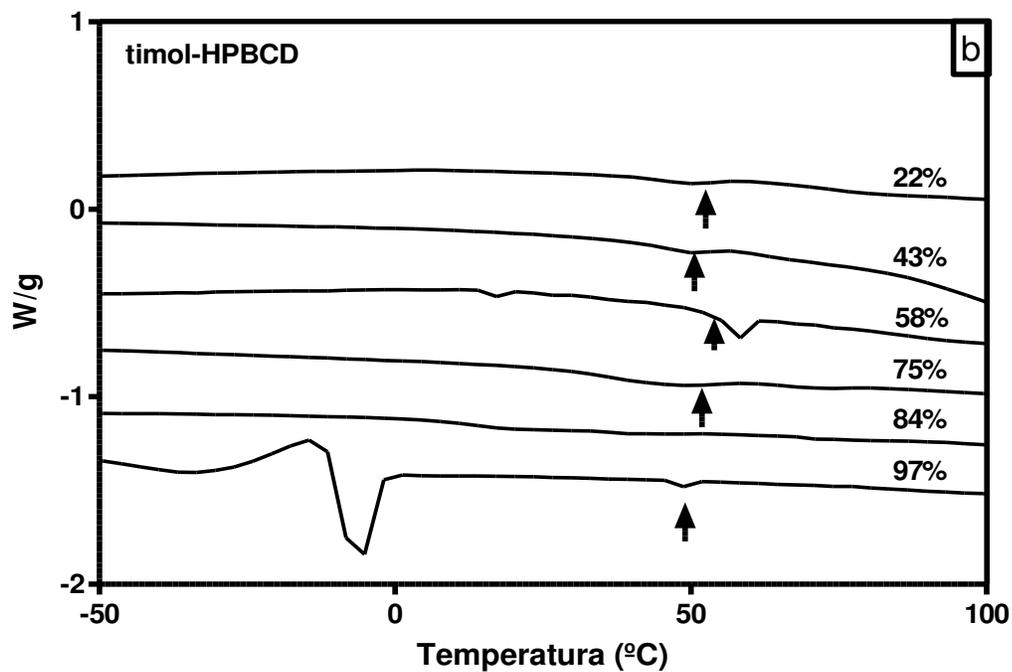
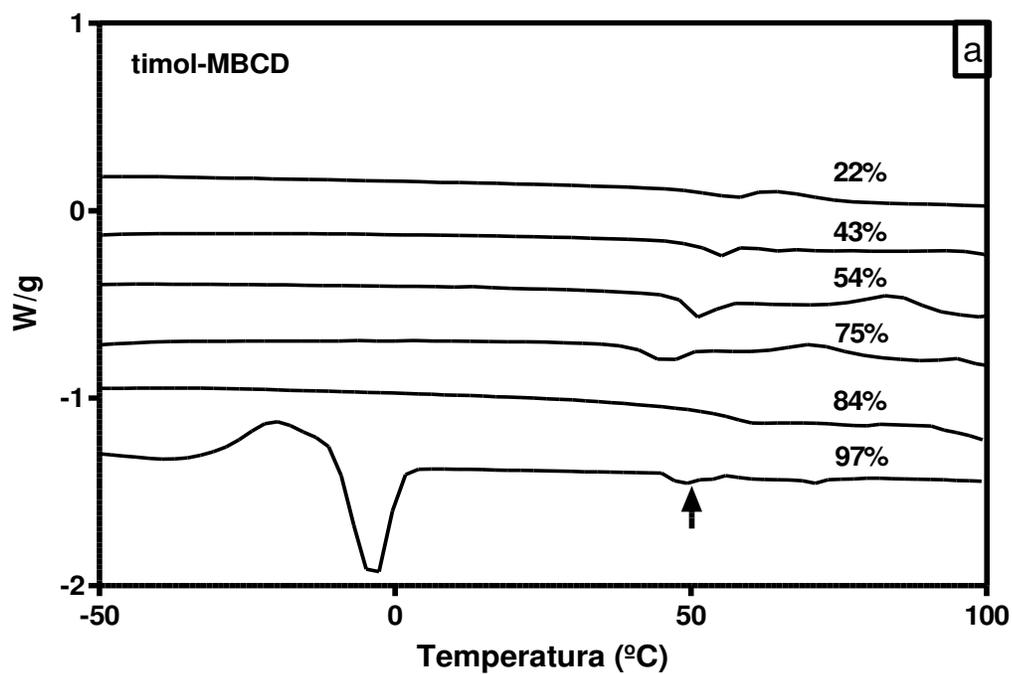


Figura IV.9. Termogramas obtenidos por DSC del complejo timol-MBCD (a) timol-HPBCD (b) a diferentes HR a 3 meses de almacenamiento a 25°C.

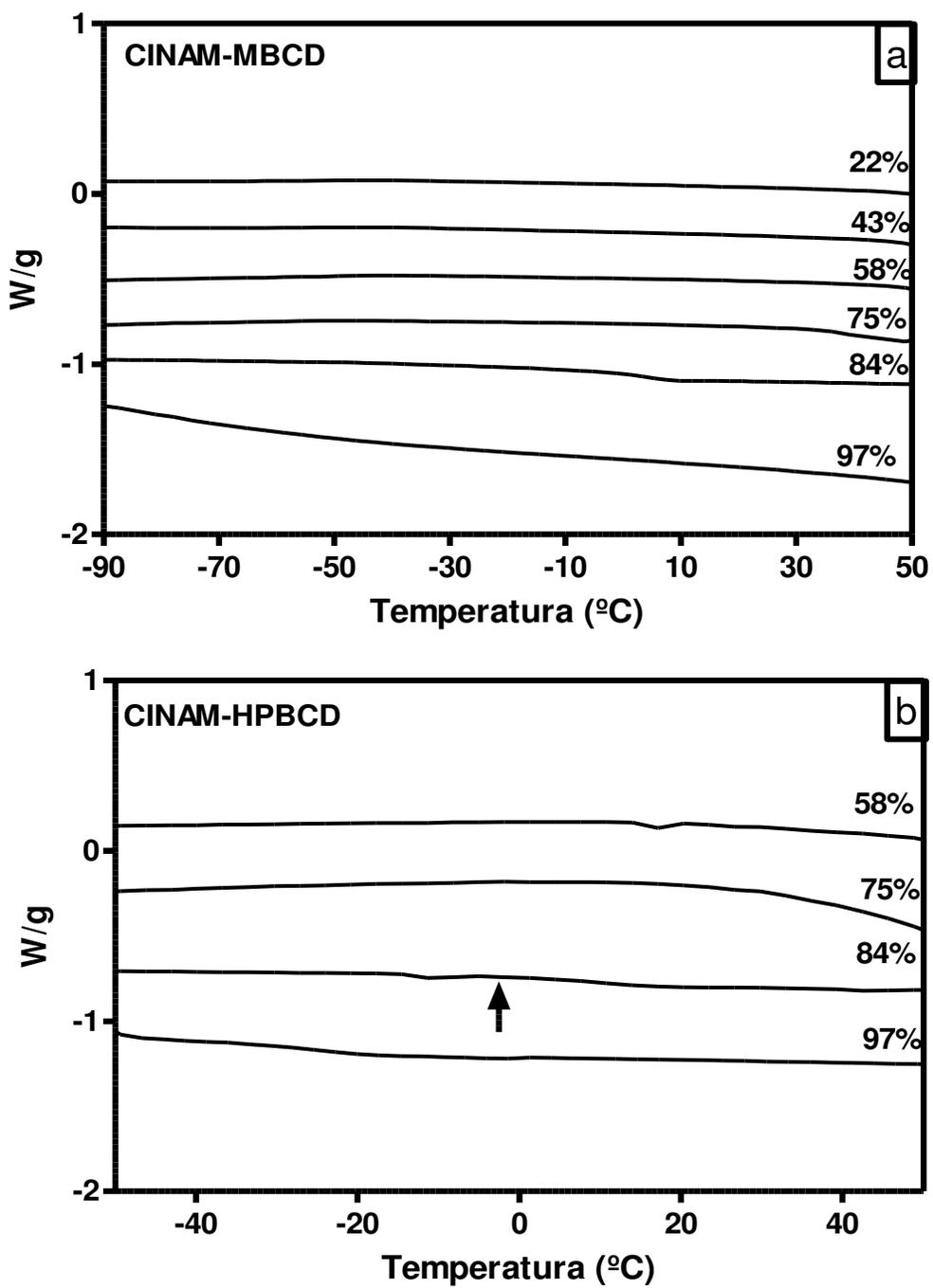


Figura IV.10. Termogramas obtenidos por DSC del complejo CINAM-MBCD (a) CINAM-HPBCD (b) a 3 meses de almacenamiento a 25°C y a diferentes HR.

Además, como en el caso de la BCD la cantidad de timol o CINAM liberado del complejo se incremento a lo largo del tiempo. En la Figura IV.11 se muestran los termogramas de los complejos de timol-MBCD, timol-HPBC, CiNAM-MBCD y CINAM-HPBCD a 97% de HR y diferentes tiempos. En dichos gráficos se puede apreciar que el pico de fusión del timol (50°C) y del CINAM (-10°C) se incrementa al aumentar el tiempo de almacenamiento y que dicho incremento fue diferente según la CD o el huésped.

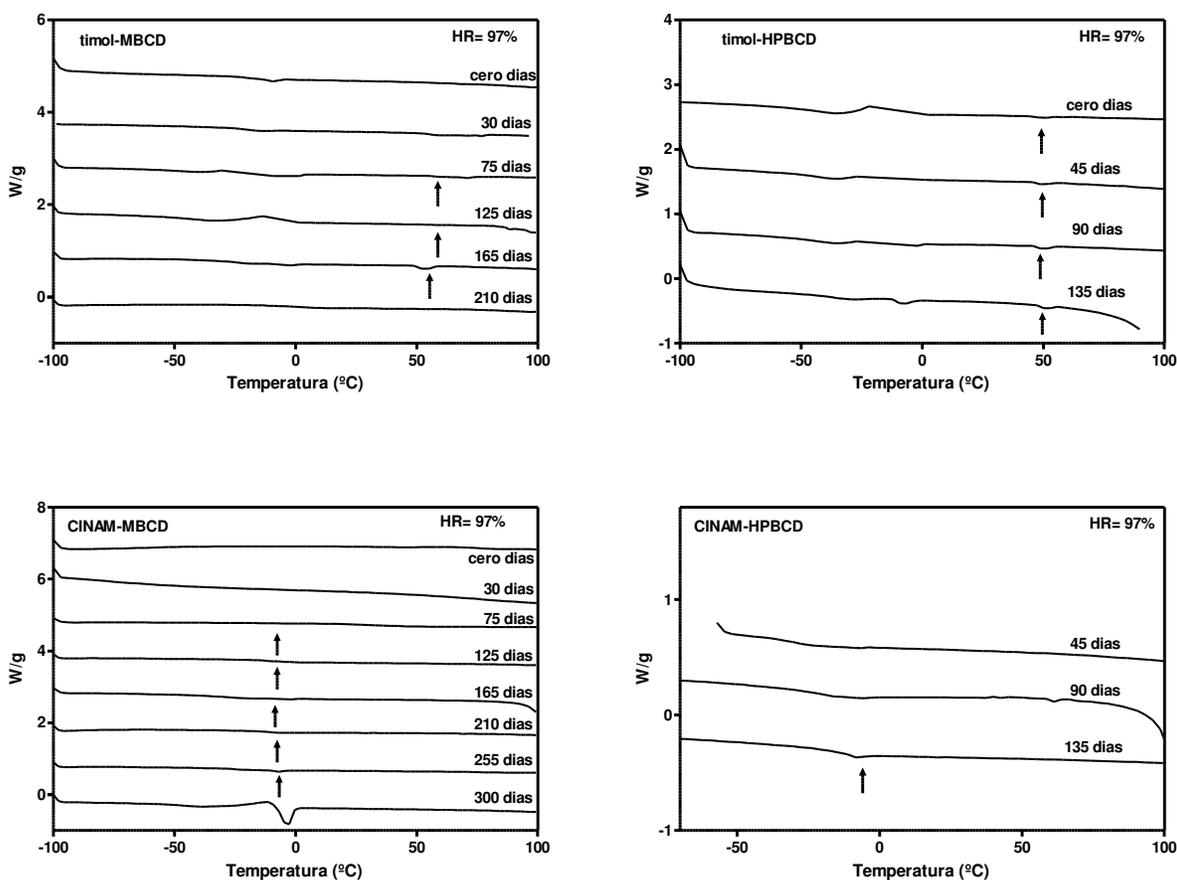


Figura IV.11. Termogramas obtenidos por DSC para los complejos timol-MBCD, CINAM-MBCD, timol-HPBCD y CINAM-HPBCD a 97% HR y a distintos tiempos de almacenamiento a 25°C .

IV.2.1.A.3. Determinación de las temperaturas de transición vítrea de la MBCD, HPBCD y sus complejos de inclusión con timol y cinamaldehído.

Como ya se señaló en la sección IV.2.1.A.1, la MBCD, la HPBCD y sus complejos con timol y CINAM son amorfos y presentan transiciones vítreas. Por lo tanto se consideró de interés determinar las transiciones vítreas de los complejos correspondientes: timol-MBCD, CINAM-MBCD, timol-HPBCD y CINAM-HPBCD para verificar si la inclusión del huésped en la CD modifica dichas transiciones. En la Figura IV.12 se muestran los termogramas de los complejos a diferentes HR y en la Figura IV.13 los termogramas de la MBCD. Se observa, que en todos los casos los valores de T_g disminuyen al aumentar la HR de la matriz.

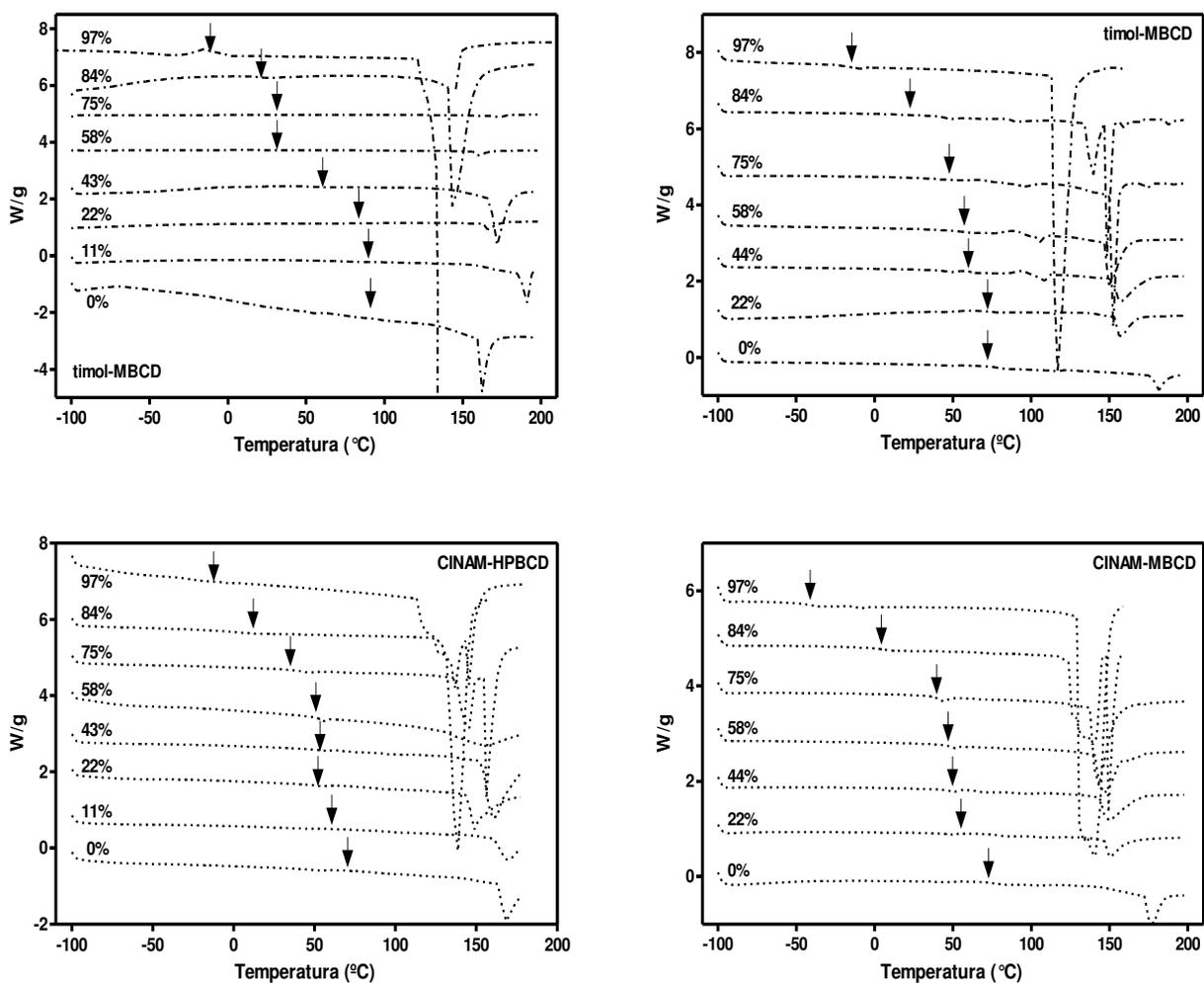


Figura IV.12. Termogramas de los complejos timol-MBCD, timol-HPBCD, CINAM-MBCD y CINAM-HPBCD recién equilibrados a 25°C y a diferentes HR. La temperatura de transición vítrea (T_g) está indicada con una flecha.

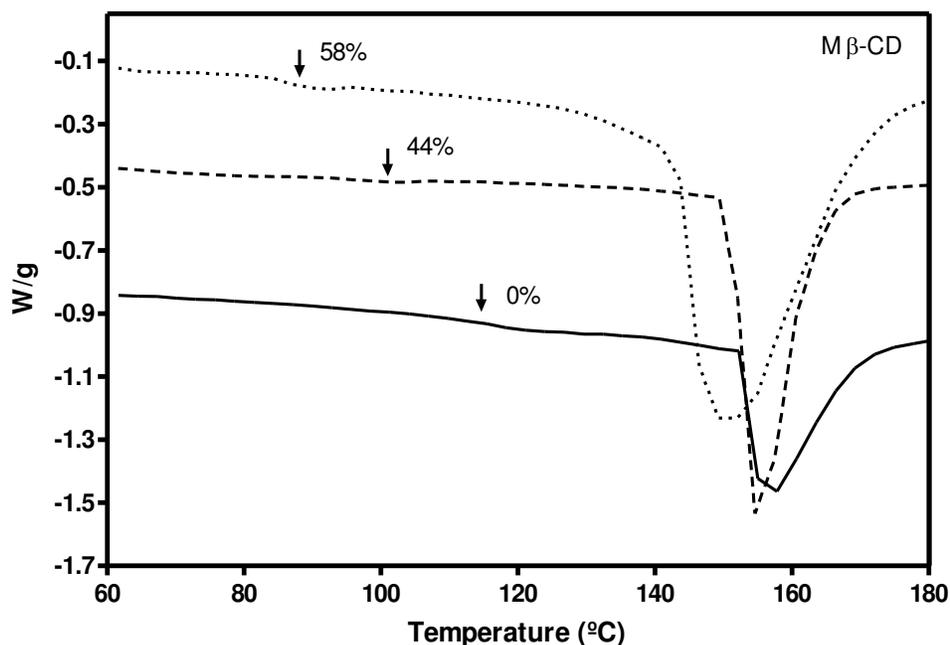


Figura IV.13. Termogramas de Mβ-CD recién equilibradas a 25°C y a diferentes HR. La temperatura de transición vítrea (T_g) está indicada con una flecha.

En la Figura IV.14 se muestran las temperaturas de transición vítrea (T_g) vs humedad en base seca de la HPBCD y sus complejos y de la Mβ-CD y complejos.

Si bien la inclusión del huésped en la CD no afectó de manera significativa las isotermas de sorción de la Mβ-CD (Figura IV.22) y la HPBCD (Figura IV.24), sí produjo una disminución de los valores de T_g lo cual estaría indicando que en presencia de los huéspedes se producen modificaciones estructurales que afectan las características físicas de la matriz. Por otro lado no se detectaron en el termograma transiciones que pudieran evidenciar la presencia de formas cristalinas hidratadas. Los valores de T_g obtenidos se correspondieron con el aspecto físico de las muestras, que se colapsaron cuando su T_g era menor que 25°C

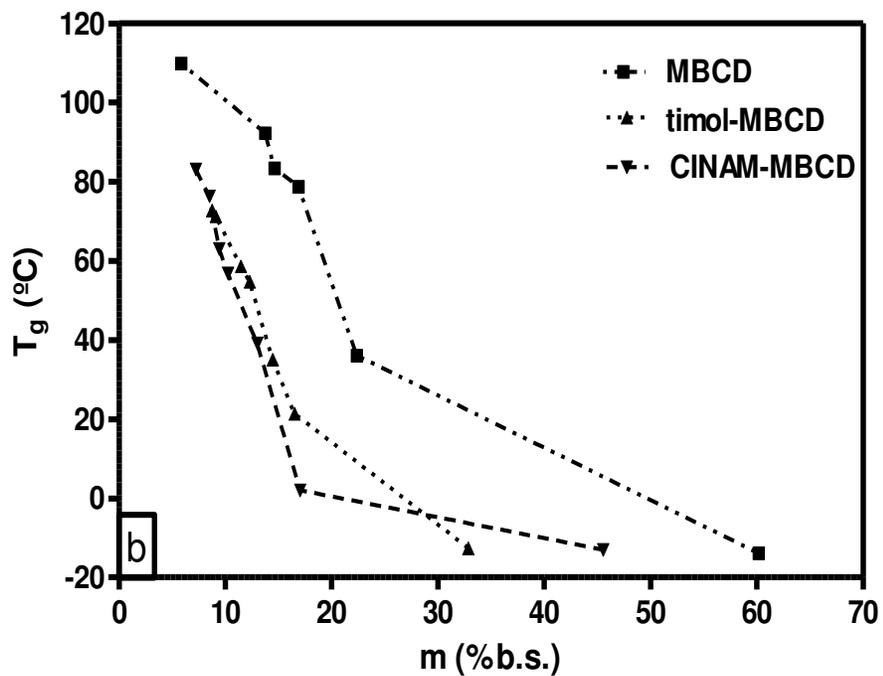
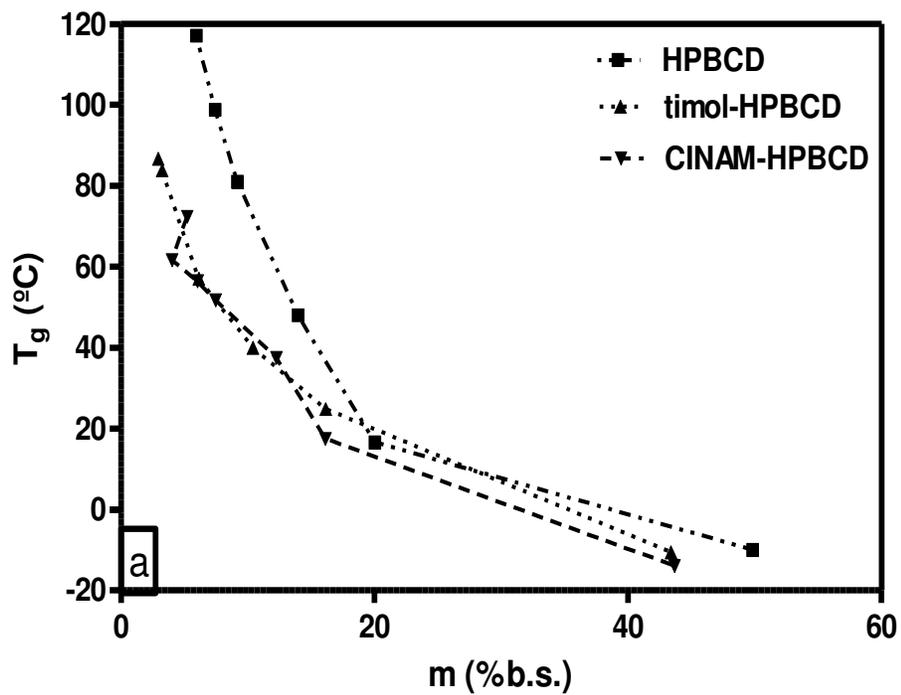


Figura IV.14. Temperatura de transición vítrea (T_g) en función del contenido de agua (m) en base seca de la HPBCD y sus complejos (a) y de la MBCD y complejos (b).

IV.2.1.B. Determinación de las propiedades térmicas del almidón HiCap 100 y del timol encapsulado en una matriz de almidón HiCap 100.

Las transiciones térmicas fueron determinadas sobre las muestras equilibradas a cada HR. Cada muestra fue calentada a una velocidad de $10^{\circ} \text{C}/\text{min}$ entre 40°C y 160°C en orden de determinar la transición vítrea (T_g) y el punto de fusión (T_m). La T_g fue considerada como el comienzo de la discontinuidad de la curva de flujo de calor vs temperatura y el T_m como el inicio del pico de fusión.

En la Figura IV.15 se muestran los termogramas de la matriz timol-HiCap 100 recién equilibrada (tiempo cero) a diferentes HR. En la misma se aprecia que los termogramas presentan una transición vítrea y un pico de fusión y que ambos se corren a menores temperaturas al aumentar la HR de la matriz. Los valores de las transiciones obtenidos en este trabajo coinciden con los hallados por Xie y col., (2010).

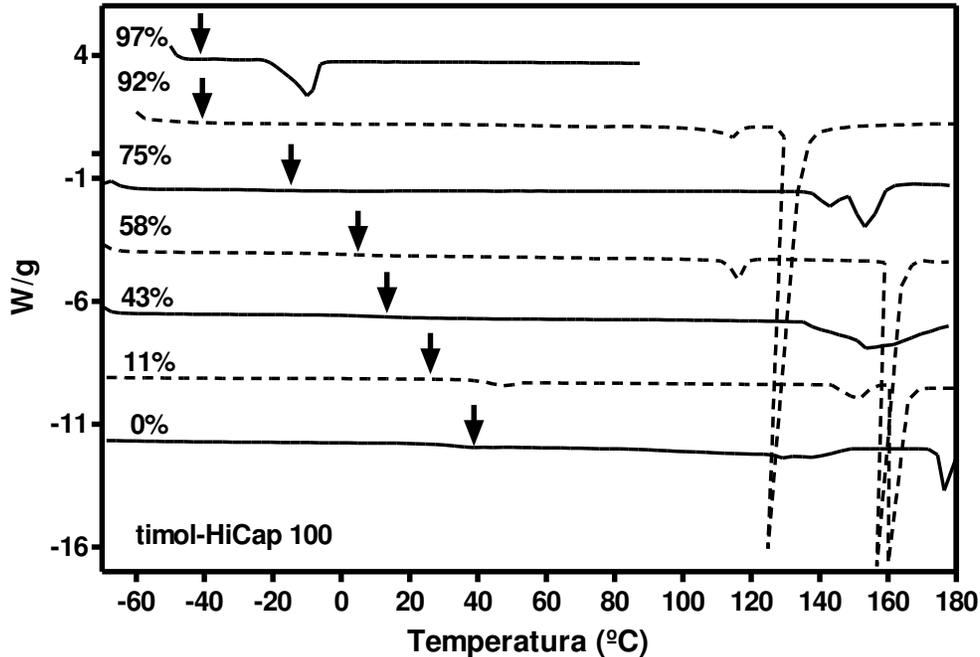


Figura IV.15. Termogramas de los complejos timol-HiCap 100 recién equilibrados a 25°C y a diferentes HR. La temperatura de transición vítrea (T_g) está indicada con una flecha.

En la Figura IV.16 se muestran los valores experimentales de la temperatura de transición vítrea de las matrices puras, HiCap 100 liofilizada (HiCap-Liof) y HiCap 100 secada por spray (HiCap-SP) y de la matriz timol-HiCap 100 obtenida por liofilización (timol-HiCap 100) en función del contenido de agua en base seca (m). Dicha Figura muestra que el efecto plastificante del agua sobre las diferentes matrices presenta un comportamiento similar al de las isotermas de sorción (sección IV.2.3.3, Figura IV.27). En efecto, la disminución relativa de T_g ocasionado por el aumento del contenido de agua a la matriz fue función de la naturaleza de la matriz. La matriz pura de HiCap-Liof mostró valores mayores de T_g que las matrices de HiCap-SP y timol-HiCap al mismo

contenido de agua. La magnitud de la diferencia de los valores de T_g fue mayor a bajos contenido de agua. Además, muestra que la incorporación del timol a la matriz del HiCap-Liof modifica la estructura de la misma.

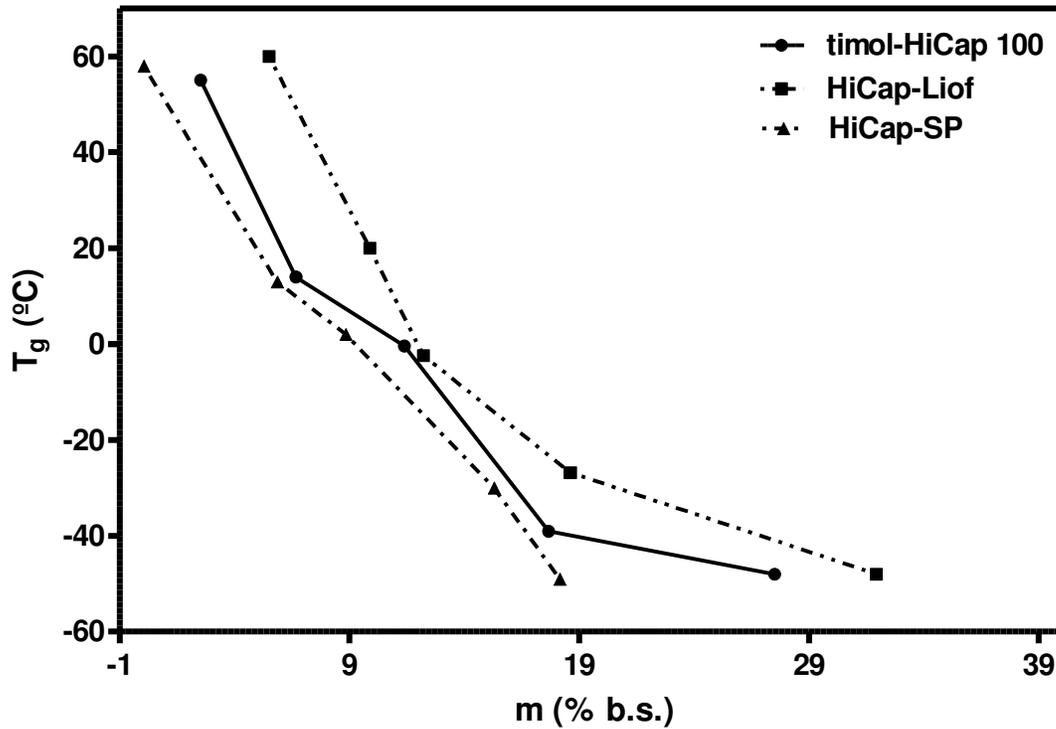


Figura IV.16. Temperatura de transición vítrea (T_g) en función del contenido de agua (m) en base seca del Hi-Cap-100 liofilizado, secado por spray y de la matriz de Hi-Cap-100 conteniendo timol encapsulado por liofilización.

IV.2.2. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA DE LAS CICLODEXTRINAS Y SUS COMPLEJOS.

IV.2.2.1. Cinética de adsorción de agua

La cinética de adsorción de agua muestra un proceso de hidratación típico, en el que el agua es adsorbida rápidamente al inicio del proceso y luego disminuye la velocidad de adsorción gradualmente hasta alcanzar un valor de equilibrio.

Las Figura IV.17 muestra el contenido de agua en función del tiempo para la BCD, MBCD, HPBCD y sus respectivos complejos con el timol y el CINAM a 25° C.

El tiempo necesario para alcanzar el contenido acuoso del equilibrio fue aproximadamente 10 o 12 días para las muestras almacenadas a humedades relativas (HR) comprendidas entre 22 y 75 %, mientras que para las muestras almacenadas a 84 y 97% HR requirieron un tiempo mayor (14 a 16 días). La cantidad de agua adsorbida en el equilibrio por las CD_s y los complejos correspondientes fue significativamente diferente. Así, para las CDs el contenido de agua adsorbido fue MBCD>HPBCD>BCD especialmente a altas HR (Figura IV.17). Este comportamiento es debido a que la adición de grupos alquilo o hidroxialquilo al anillo de la BCD transforma la estructura cristalina de la BCD en amorfa y consecuentemente produce un aumento notable en la cantidad de agua adsorbida (Loftsson y Masson, 2004). Además se observó que mientras para los complejos de la BCD y la MBCD la cantidad de agua adsorbida fue menor que la de las CDs correspondientes, los complejos de la HPBCD presentaron una adsorción aproximadamente igual a la de la HPBCD.

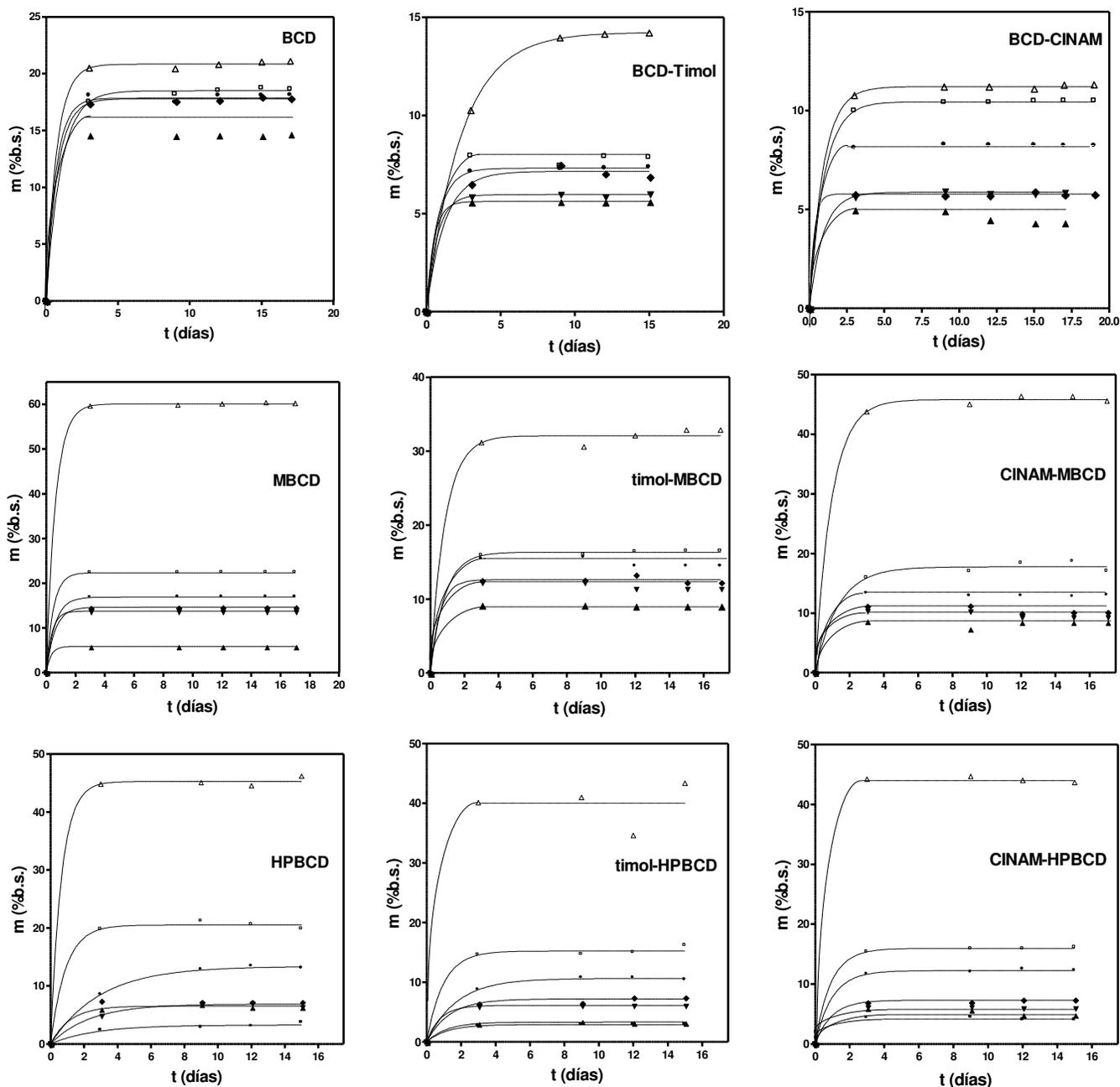


Figura IV.17. Cinética de absorción de agua de la β -ciclodextrina (BCD), metil- β -ciclodextrina (MBCD), hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD) y sus respectivos complejos con timol y cinamaldehído (CINAM) a 25° C y a diferentes Humedades Relativas (HR). ■ 11%; ▲ 22 %; ▼ 43%; ◆ 58%; ● 75%; □ 84%; △ 97%. En donde m es el contenido de agua definido en base seca y t es el tiempo en días.

Este comportamiento diferente produce también diferencias notables en el aspecto físico que presentan visualmente las muestras luego de alcanzado el equilibrio como se detallara en la siguiente sección.

IV.2.2.2. Características físicas de las muestras equilibradas.

Se tomaron fotos con una cámara digital (Power Shot A70, USA) con el fin de evidenciar los cambios que ocasiona la modificación de las CDs en las propiedades de sorción de la BCD, sus complejos y dejar constancia de las características físicas que presentaban las muestras al iniciar los estudios sobre los complejos sólidos.

En las Figuras siguientes se muestran las fotografías para los distintos complejos de inclusión estudiados. Estas fotografías fueron tomadas apenas las muestras llegaron al equilibrio para cada HR respectiva, en el rango de HR entre 0 y 97%, para tener un registro del aspecto físico inicial. La Figura IV.18 (a, b, c) corresponde a los complejos de inclusión del timol con las tres CDs estudiadas. A simple vista se puede ver que en las muestras de timol con BCD (Figura IV.18.a), la estructura se mantiene, a todas las HR a las que se equilibró el complejo para su estudio. En las muestras de los complejos de las CDs modificadas (HPBCD y MBCD) no sucede lo mismo. En el caso de la HPBCD, a 75% de HR se produce un colapso estructural, lo cual ya es visible en las fotos. A 84 y 97% se perdió la estructura por completo, volviéndose líquida. En el caso de los complejos de inclusión con MBCD, se puede notar un colapso estructural a partir de 58% de HR para finalmente a 97% perder completamente la estructura (Figura IV.18.c)

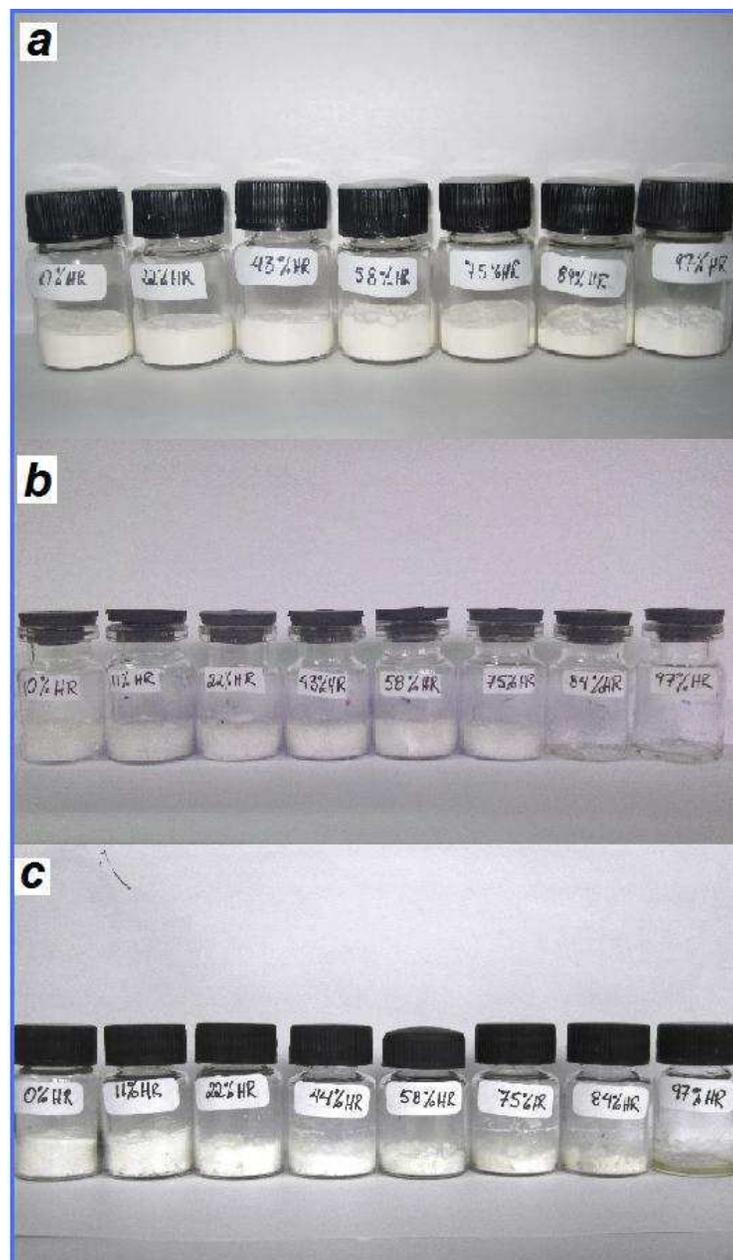


Figura IV.18. Fotografía de los complejos del timol equilibrados a diferentes HR y 25°C, (a) BCD-timol (b) HPBCD-timol y (c) MBCD-timol.

En la Figura IV.19 se muestran, en cambio, los complejos del CINAM con las tres CDs estudiadas. En el caso de los complejos de inclusión con BCD, al igual que con el timol, la estructura se conserva luego del equilibrio a cada una de las HR estudiadas. Esto no

sucede con los complejos de inclusión con las otras CDs, pues en los complejos con HPBD se nota un dramático cambio en su estructura a partir de 75% de HR. Algo similar ocurre con los complejos con MBCD.

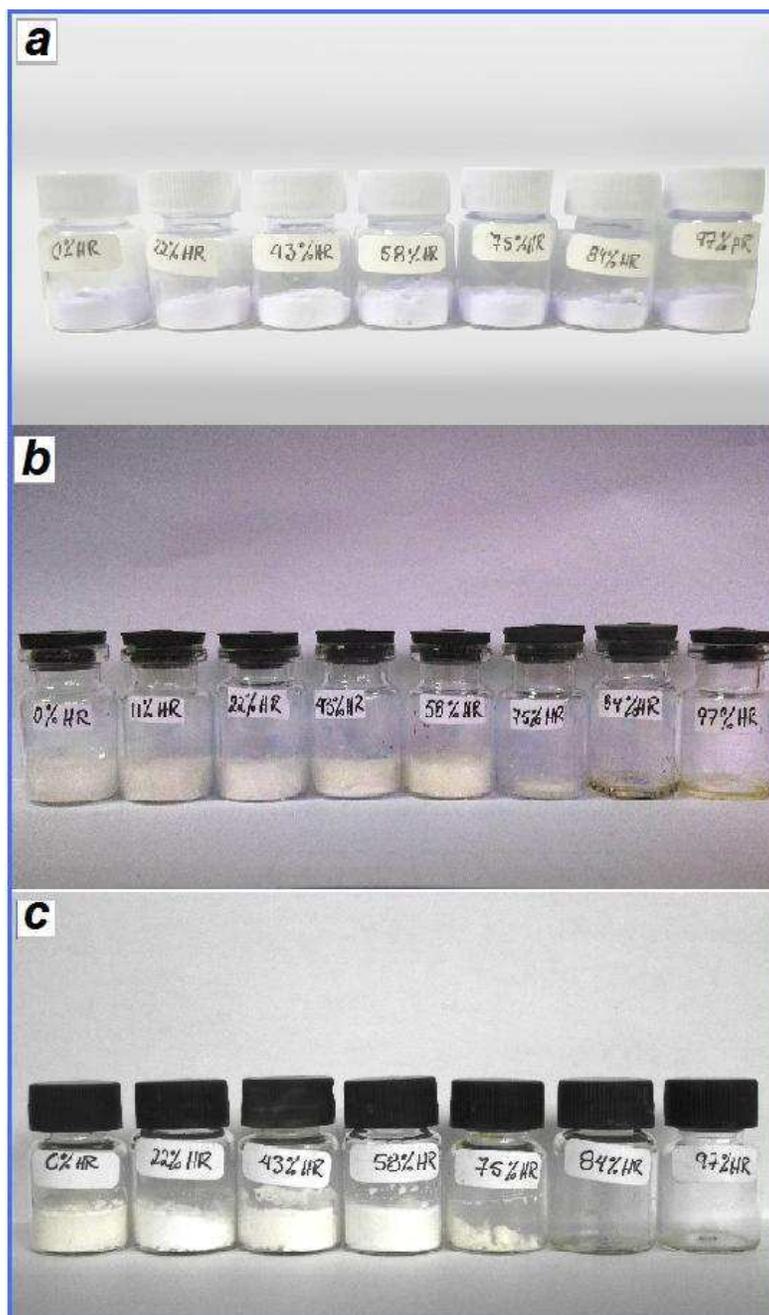


Figura IV.19. Fotografía de los complejos del CINAM equilibrados a diferentes HR y 25°C, (a) BCD-CINAM, (b) HPBCD-CINAM y (c) MBCD-CINAM

IV.2.2.3. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA

IV.2.2.3.1. Isotermas de sorción de agua de la β -ciclodextrina y sus complejos.

En la Figura IV.20 a y b se muestran las isotermas de sorción de agua de la BCD y sus complejos expresando el contenido de agua en (g de agua/100g de agua) y en moles (de agua/moles CDS) respectivamente.

La isoterma de sorción obtenida para la BCD coincide con datos previos publicados por Cserhádi y Forgács (2003). La BCD alcanzó un plateau alrededor del 45% de RH, y su contenido de agua se mantuvo aproximadamente constante hasta 75% de HR, donde sube abruptamente. Fujiwara y col. (1983) demostraron que la BCD forma hidratos estables y puede cristalizar como undecahidrato a partir de soluciones acuosas. Por eso se considero interesante expresar la cantidad de agua adsorbida como moles de agua por cada mol de BCD seca (Figura IV.20. b). Se observa que durante el proceso de adsorción la captura de agua se produce hasta 45 % de HR. Luego de esta etapa, aparece un *plateau*, que se mantiene hasta llegar a 75 % de HR. Esto puede deberse a la formación de un hidrato cristalino estable de la BCD. En este punto, se llega a un hidrato de aproximadamente 10,5 moles de agua por mol de BCD. Más allá de 75% HR cantidad de agua adsorbida aumenta rápidamente hasta llegar a un valor de 12,5 moles de agua por mol de BCD. Este comportamiento fue similar al encontrado por otros investigadores. Marini y col. (1995), demostró que la cantidad de moléculas de agua varían de 12,3 a 9,4 moléculas de una manera continua y reversible, cuando la HR cambia de un valor inicial de 100 a 15%. Esta etapa del proceso de deshidratación

involucra casi exclusivamente parte de las 7 moléculas incluidas dentro de la cavidad de la BCD.

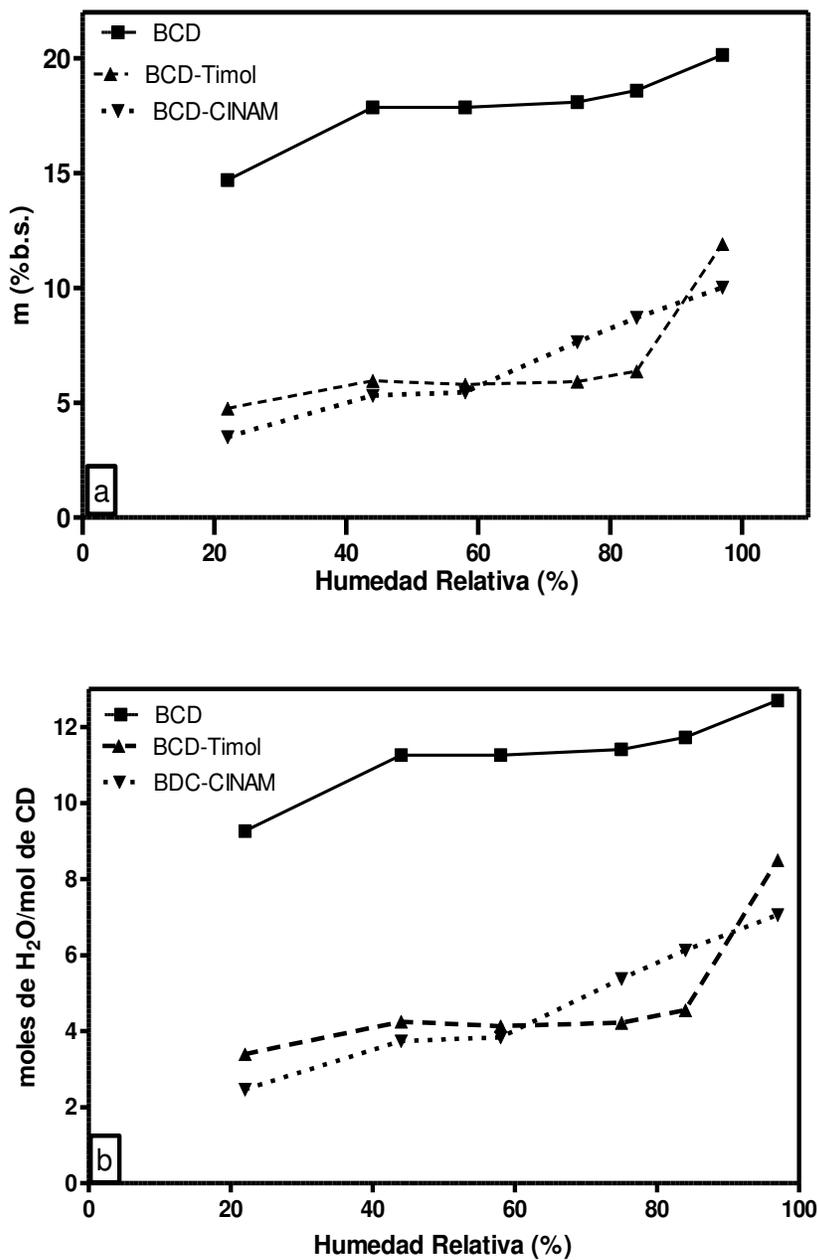


Figura IV.20. Isotherma de sorción de agua de la BCD y sus complejos con el Timol y el cinamaldehído 25° C. (a) contenido de agua (m) expresado en porcentaje de base seca (g de agua/ 100g de sólidos) en función de la humedad relativa y (b) moles de agua/moles de CD en función de la humedad relativa.

Por otra parte, la estructura del hidrato de BCD ha sido determinada por varios métodos (Winkler y col., 2000). Lindner y Saenger (1978, 1982) hallaron, a través de estudios de cristalografía, que la BCD está asociada con 12 moléculas de agua para así formar un dodecahidrato. Ambos autores observaron que la mitad de las moléculas de agua se ubican en ocho sitios específicos de la cavidad; el resto se distribuye en otros ocho sitios entre la superficie y los intersticios de las CDs. Es así que 6,5 moléculas de agua estarán ubicadas en estos sitios específicos de la cavidad y 5,5 moléculas restantes del dodecahidrato están distribuidas por el resto de la molécula de la BCD. De esta manera, los autores concluyeron que las moléculas de agua dentro de la BCD están en estado "activo" y que fácilmente podrían ser removidas por ligandos capaces de formar complejos con la ciclodextrina.

Los complejos de BCD-Timol y BCD-CINAM mostraron un perfil de sorción similar a la BCD, sin embargo la cantidad de agua absorbida fue menor. De hecho, estos complejos forman hidratos con 7 moléculas de agua, en el caso del complejo con cinamaldehído y 8.5 moléculas para el caso del complejo con timol (IV.9 b).

Estos resultados confirmarían que la formación del complejo de timol o cinamaldehído con BCD implica el desplazamiento de moléculas de agua del interior de la cavidad de la CD (Szejtli, 1998).

IV.2.2.3.2. Isotermas de sorción de agua de la Metil- β -ciclodextrina (MBCD) y sus complejos.

En la Figura IV.21 se muestran las isotermas de sorción de agua de la metil β -ciclodextrina (MBCD), un derivado soluble de la BCD (en comparación con ésta). Se observó que la MBCD mostró un contenido de agua similar a la BCD entre 22 y 75% de HR. Sin embargo, mientras la BCD alcanzó un *plateau* alrededor del 43% de RH, y su contenido de agua se mantiene aproximadamente constante hasta 85% de HR que corresponde a la formación de un dodecahidrato (como ya se señaló en la sección anterior), la MBCD presentó un comportamiento de tipo sigmoideo y no se alcanzó un *plateau*, lo que indica que no se formaron hidratos. (Mazzobre y col., 2009). A una HR de 95% se observó una interacción de 45 moles de agua por mol de MBCD (Figura IV.21). Además a humedades relativas superiores a 84% la MBCD presentó colapso estructural y encogimiento, fenómeno que no fue observado en la BCD. De esta manera, las isotermas de sorción mostradas en Figura IV.21 reflejan que la modificación de la BCD afecta significativamente su interacción con el agua, sobre todo a humedades relativas altas. La baja solubilidad de la BCD ha sido atribuida a la interacción de los grupos hidroxilos secundarios adyacentes a la cavidad con el agua. Entonces, cualquier cambio estructural en la molécula de la CD causa una modificación de su solubilidad e interacción con el agua (dos Santos y col., 2007, Astray, 2009).

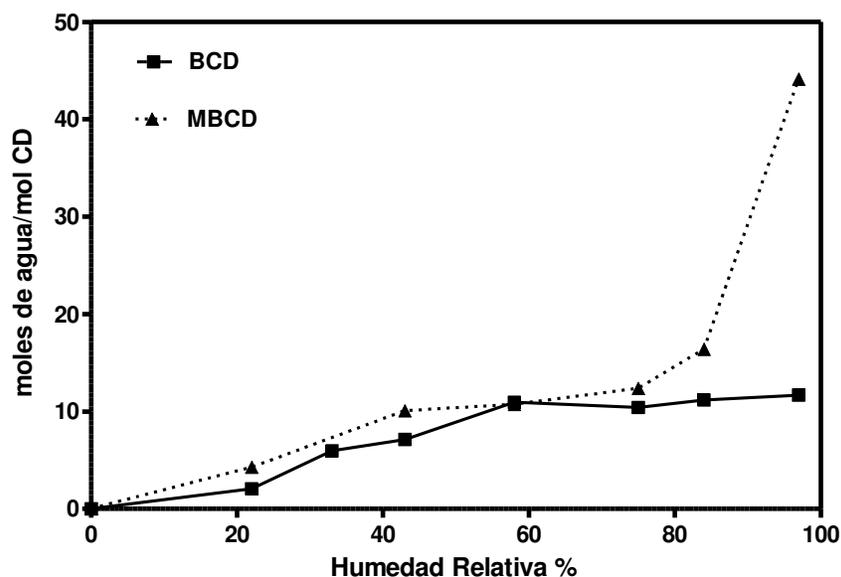


Figura IV.21. Isotherma de sorción de agua a 25° C de la MBCD comparada con la ciclodextrina natural, la BCD.

En la Figura IV.22 se muestran las isotermas de sorción de la MBCD y sus complejos de inclusión con timol y CINAM. En este caso se observa que las isotermas de sorción de los complejos de inclusión fueron similares a la de la MBCD. Sólo a HR mayores a 90%, el comportamiento fue algo diferente, en donde la presencia del huésped redujo el contenido de agua del sistema. Además, la presencia de una T_g bien definida confirmó las características amorfas de la MBCD y sus complejos (IV.2.1.A.3, Figura IV.14).

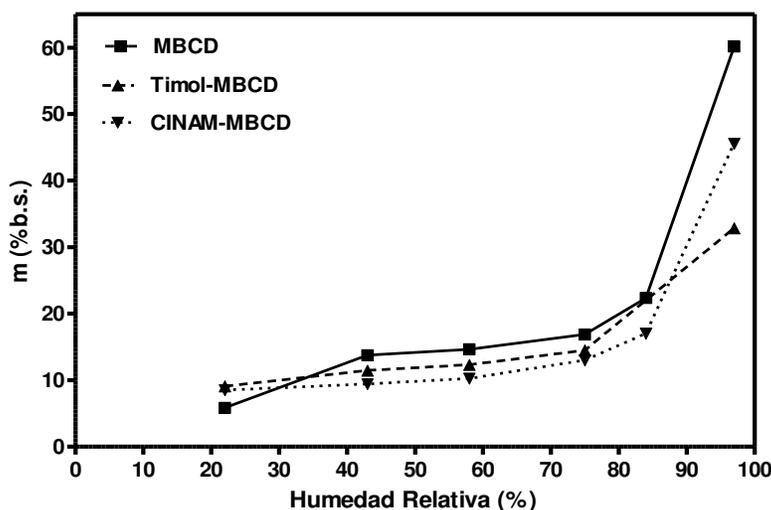


Figura IV.22. Isotermas de sorción de agua a 25° C de la MBCD (■) en comparación con las isotermas de los complejos con timol (▼) y cinamaldehído (▲), expresadas como contenido de agua (m) en base seca en función de la humedad relativa.

Aunque la presencia del huésped no afectó significativamente las isotermas de sorción de la MBCD (Figura IV.22) sí produjo modificaciones estructurales que afectan las características físicas del sistema. Esto ocasionó una disminución en los valores de T_g de los complejos respecto a los de la MBCD. Los sistemas almacenados a 84 y 97% de HR estaban colapsados (Figuras IV.19 c y IV.18 c) y los valores de T_g fueron menores a 25° C (temperatura de almacenamiento) (ver sección IV.2.1.A.3). La modificación de la estructura de la BCD confirió propiedades de hidratación, solubilidad y amorficidad muy diferentes a la BCD que pueden ser utilizadas para el diseño de productos con propiedades funcionales determinadas.

IV.2.2.3.3. Isotermas de sorción de agua de la Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD) y sus complejos.

En la Figura IV.23 se muestran las isotermas de sorción de agua de la (HPBCD), otro derivado hidrosoluble de la BCD en comparación con la BCD. Se puede apreciar que la (HPBCD) presentó, un comportamiento similar a la MBCD, es decir que no forma un hidrato, y tiene características sigmoideas, alcanzando un valor de 60% de agua adsorbida a 90% de HR. Además a humedades relativas superiores a 75% la HPBCD presentó colapso estructural y encogimiento al igual que la MBCD. De esta manera, las isotermas de sorción mostradas en Figura IV.23 reflejan que la modificación de la BCD afecta significativamente su interacción con el agua, sobre todo a humedades relativas altas. Como en el caso de la MBCD se observa que la isoterma de sorción de los complejos de inclusión de la HPBCD fue similar a la de la HPBCD (Figura IV.24). Sin embargo, a diferencia de la MBCD la presencia del huésped no redujo el contenido de agua ni aún a altas HR (Figura IV.22). Esta diferencia en el comportamiento de los complejos de ambas ciclodextrinas modificadas, puede ser debido a que la cantidad de agua adsorbida a altas HR por la MBCD (60 moléculas de agua/mol) es mucho mayor que la adsorbida por HPBCD (40 moléculas de agua/mol). Además, la presencia de una T_g bien definida tanto en la HPBCD como en los complejos HPBCD-timol y HPBCD-CINAM confirmó las características amorfas de los sistemas (ver Sección IV.2.1.A.3). Esto ocasiona que a HR altas (> 75%) donde la T_g está debajo de la temperatura de almacenamiento (25° C) las muestras presentaran colapso estructural y encogimiento (Figuras IV.18 b y IV.19 b).

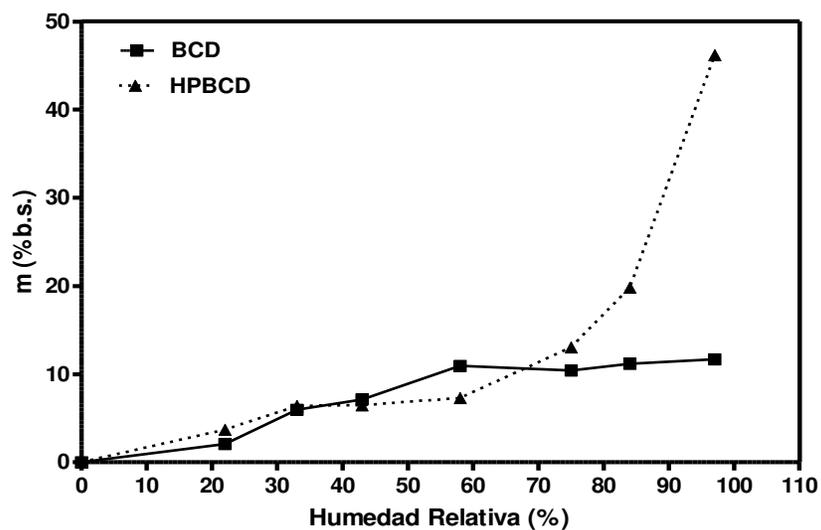


Figura IV.23. Isothermas de sorción de agua a 25° C de la HPBCD (▼) en comparación con las isothermas de la BCD (■), expresadas como contenido de agua (m) en base seca en función de la humedad relativa.

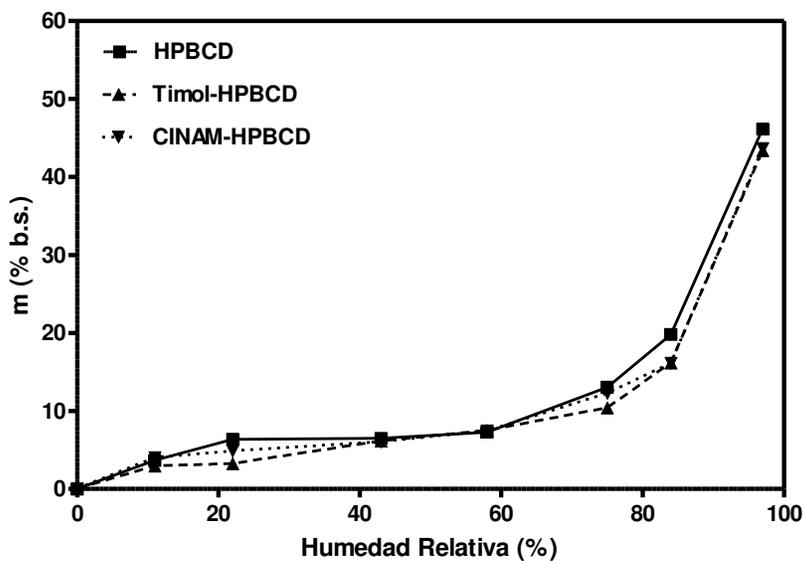


Figura IV.24. Isothermas de sorción de agua a 25° C de la HPBCD (■) en comparación con las isothermas de los complejos con timol (▼) y cinamaldehído (▲), expresadas como contenido de agua (m) en base seca en función de la humedad relativa.

IV.2.3. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE SORCIÓN DE AGUA DEL ALMIDÓN HICAP 100 Y DEL TIMOL ENCAPSULADO EN UNA MATRIZ DE ALMIDÓN HICAP 100

IV.2.3.1 Cinética de adsorción de agua

En la Figura IV.25 se muestra el contenido de agua en función del tiempo para el HiCAP-100 liofilizado, secado por spray y el timol encapsulado por liofilización en la matriz HiCap 100 a 25° C. El tiempo requerido para alcanzar el equilibrio fue función de la HR del sistema requiriendo las muestras con HR mayores a 75% un tiempo mayor.

La máxima cantidad de agua adsorbida por la matriz de Hicap-100 a cada HR fue función del método de secado usado. En efecto a HR superiores a 58% las muestras secadas por liofilización adsorbieron una cantidad de agua significativamente mayor que las secadas por spray (Figura IV.25 a y b). Lee y Lee (2008) encontraron resultados similares para las isotermas de hongos de *Inonotus obliquus* secados por liofilización y aspersion.

La presencia del timol en la matriz modifica las propiedades de sorción del almidón. En efecto la matriz conteniendo el timol adsorbió menor cantidad a todas las HR (Figura IV.25 c). Además, todas las muestras equilibradas evidencian perdida de estructura, aún a bajas HR como se muestra en la siguiente seccion.

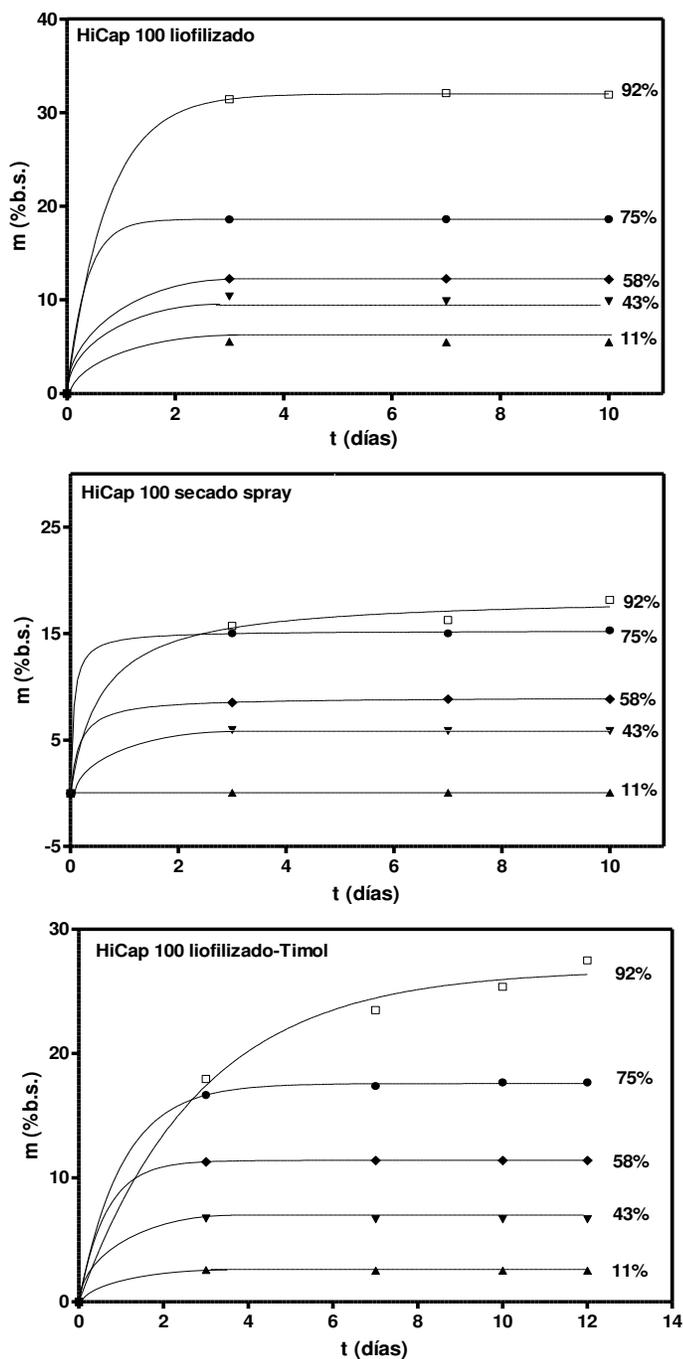


Figura IV.25. Cinética de absorción de agua del almidón Hicap100 deshidratado por liofilización y secado spray y del timol encapsulado en HiCap 100 por liofilización a 25° C y a diferentes Humedades Relativas (HR%). Expresado como contenido de agua (m) en base seca en función del tiempo (t) en días.

IV.2.3.2. Características físicas de las muestras equilibradas

Las fotografías digitales permiten observar los cambios estructurales que ocasiona la sorción de agua en la matriz timol-HiCap 100 y dejar constancia de las características que presentaban las muestras al iniciar los estudios de dicha matriz.

En la Figura IV.26 se muestra una foto del sistema timol-HiCap 100 obtenido por liofilización. Esta fotografía fue tomada apenas las muestras llegaron al equilibrio para cada HR, en el rango de HR entre 0 y 97% , para tener registro del aspecto físico inicial.

La única HR en la que no hubo una notoria pérdida de estructura fue a 0%. A 58% de HR el sistema se presentaba completamente apelmazado y duro y finalmente a 97% de HR el sistema se volvió líquido.



Figura IV.26. Fotografía de la matriz timol-HiCap 100 liofilizada y equilibrada a 25°C y a diferentes HR.

IV.2.3.3. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA DE LOS SISTEMAS HICAP 100 Y TIMOL-HICAP 100

En la Figura IV.27 se muestran los valores experimentales de las isothermas de sorción de agua a 25° de las matrices puras, HiCap 100 liofilizada (HiCap-Liof) y HiCap 100 secada por spray (HiCap-SP) y de la matriz timol-HiCap 100 obtenida por liofilización (timol-HiCap). En la misma se puede apreciar notables diferencias entre las isothermas de la matriz del HiCap 100 obtenida por liofilización y la obtenida por secado spray. Los valores del contenido de agua de la matriz liofilizada fueron significativamente mayores que los correspondientes a matriz secada por spray a la misma HR. Lee y Lee (2008) encontraron resultados similares para las isothermas de hongos de *Inonotus obliquus* secados por liofilización y aspersion y lo atribuyeron a que la matriz obtenida por liofilización es mucho más porosa que la obtenida por secado spray.

La presencia del timol modificó las propiedades de sorción de la matriz de HiCap-100 liofilizada especialmente a bajas HR. Las isothermas de sorción fueron caracterizadas por medio de la ecuación de GAB (III.2 Materiales y Métodos):

$$m = \frac{m_o C_G \cdot k \cdot a_w}{[(1 - k a_w)(1 + k C_G - k a_w)]} \quad (III.2)$$

Donde:

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

m_o: 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

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

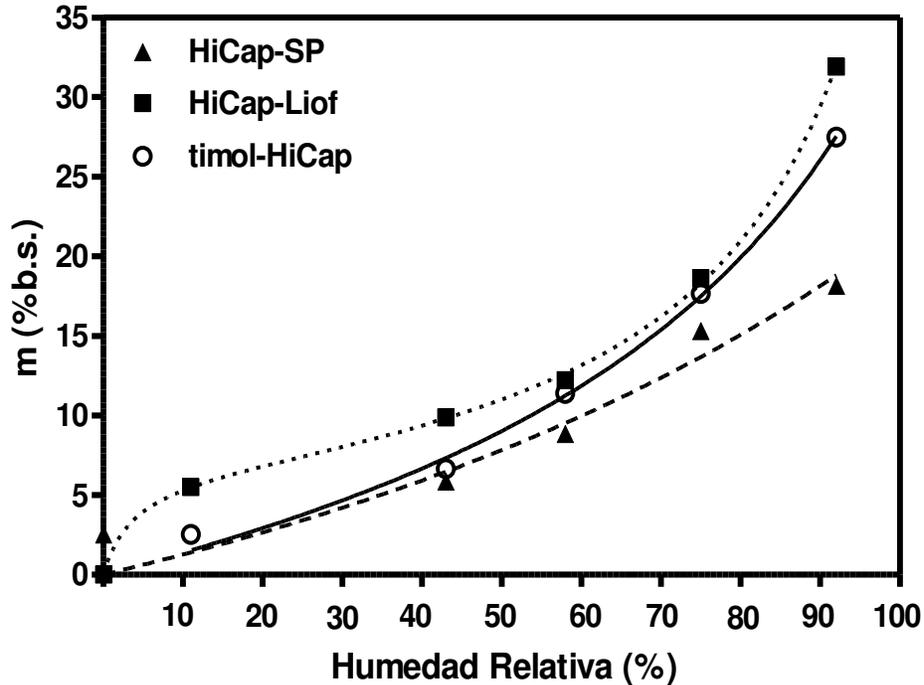


Figura IV.27. Isotermas de sorción de agua del HiCap liofilizado y secado por spray y del timol encapsulado en HiCap por liofilización a 25° C, expresadas como contenido de agua (m) en base seca en función de la humedad relativa. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas los predichos por la ecuación de GAB.

Los valores de los parámetros de dicha ecuación (m_0 , C_G y k), sus correspondientes desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de correlación (R^2) se muestran en Tabla IV.4. El modelo de GAB describió adecuadamente las isotermas de sorción de todos los sistemas estudiados (Tabla IV.4). En efecto, los valores de R^2 fueron en todos los casos

$\geq 0,94$ y el error porcentual de todos los parámetros fue $\leq 15 \%$, excepto para el parámetro C. El buen ajuste entre los valores experimentales (símbolos) y los predichos por la ecuación de GAB (líneas) también puede observarse en la Figura IV.27.

Tabla IV.4. Valores de los parámetros de la ecuación de GAB: m_0 , k y C_G con sus correspondientes desviaciones estándar (σ) y coeficientes de correlación (R^2).

Matriz	$M_0 \pm \sigma_0$ (g H ₂ O/g MS)%	$C_G \pm \sigma_{CG}$	$k \pm \sigma_k$	R^2
HiCap-Liof	6,5 \pm 0,2	30,3 \pm 9,2	0,86 \pm 0,006	0,999
HiCap-SD	45,7 \pm 0,09	47,1 \pm 7,7	0,38 \pm 0,003	0,939
timol-HiCap	14,1 \pm 0,1	1,40 \pm 0,20	0,69 \pm 0,16	0,996

MS= masa seca

IV.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO

En esta sección se analizarán algunas propiedades físicas de las diferentes formulaciones conteniendo CINAM y timol encapsulado en las CDs o en una matriz continua (almidón HiCap100). Con el fin de caracterizar los diferentes sistemas se realizaron estudios de difracción de rayos X (XRD), espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

IV.2.4.1. Difractometría de Rayos X

Siguiendo la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos, varios sistemas (incluyendo las mezclas físicas y complejos de CDs) fueron analizados por difracción de rayos X.

La difracción de rayos X además de proveer información acerca de la estructura cristalina, puede proporcionar datos respecto a la cantidad relativa de las fases cristalinas y amorfas presentes en el sistema (Osella, 2002).

Los patrones de difracción de rayos X para el timol, el CINAM, la BCD, la HPBCD, sus complejos y mezclas físicas se pueden observar en las Figuras IV.28, IV.29 y IV.30. Se calculó además el grado de cristalinidad relativa (RDC), que es igual a la relación entre I_{SA} y I_{REF} , donde I_{SA} es la altura de un pico a un ángulo característico en el difractograma de la muestra bajo investigación y I_{REF} es la altura de pico para el mismo ángulo, para la referencia y que corresponde al 100% de cristalinidad (Ribeiro et al., 2003, Veiga y col., 1998). Entonces, para determinar las posibles interacciones entre el timol, BCD e HPBCD (como se menciona en Materiales y Métodos), como muestra de referencia para calcular el RDC para los distintos sistemas se empleó timol cristalino. Para los sistemas utilizando BCD también se empleó a la misma como referencia. En el caso de los sistemas de CINAM, se utilizó como referencia la BCD, ya que el CINAM es líquido a temperatura ambiente. Los valores RDC y algunas intensidades de picos de los sistemas se presentan en las Tablas IV.5, IV.6, IV.7 y IV.8.

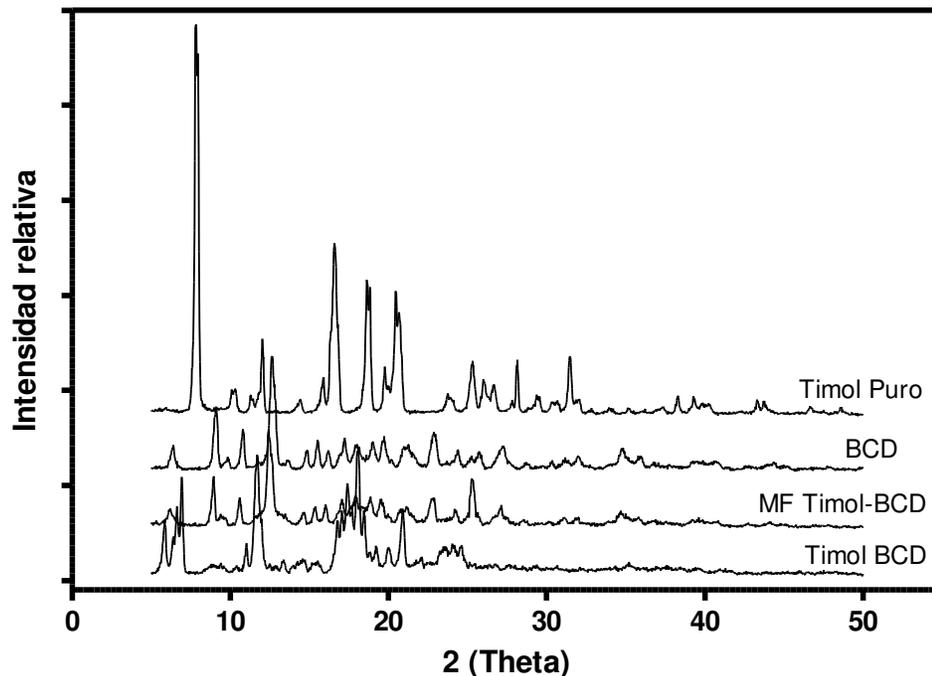


Figura IV.28. Patrones de difracción de Rayos X para el timol puro, la BCD, su mezcla física (MF) y su complejo de inclusión liofilizados.

En la Figura IV.28 se ven los patrones de difracción de Rayos X del timol puro, BCD, su mezcla física y su complejo de inclusión. El difractograma del timol revela varios picos de difracción de muy alta intensidad, siendo esto un indicativo de su naturaleza cristalina. Las intensidades y posiciones de los picos se muestran en la Tabla IV.5.

Además del timol, la BCD mostró un difractograma cristalino, teniendo los picos más relevantes a valores de 2θ de 6,4; 9,125; 12,65; 17,225; 19,025; 22,875 y 27,225°. Al comparar los patrones de difracción de los componentes puros con la mezcla física (MF timol-BCD) se ve que esta presenta un patrón muy similar al de la BCD, sin embargo en distintas posiciones, los picos característicos de la BCD decrecen. Además, al comparar

los patrones de difracción de los componentes puros con la mezcla física (MF timol-BCD) se observa claramente la superposición de ciertos picos característicos. Sin embargo, también es posible observar una intensidad menor en ellos, algo que se atribuye a la reducción del tamaño de partícula durante la preparación de la mezcla física y a la dilución de los componentes cristalinos puros (Ribeiro y col., 2003). En cuanto a los complejos de inclusión, también es notoria la menor intensidad en los picos correspondientes al timol. En la Tabla IV.5, si se comparan las intensidades de la mezcla física (a los ángulos de difracción elegidos) con las correspondientes al complejo (liofilizado), este presenta picos con intensidades mayores a las esperadas. Sin embargo, al observar los gráficos se observa una gran diferencia entre los difractogramas de la mezcla física y el complejo, presentando éste último picos a nuevos ángulos de difracción, mostrando que en el complejo de inclusión se ha formado una estructura cristalina distinta (Veiga y col., 1998).

En la Figura IV.29 se muestran los patrones de difracción de rayos X correspondientes a la HPBCD, su mezcla física con timol (MF timol-HPBCD) y su complejo de inclusión (timol-HPBCD). Se incluye el difractograma para el timol con fines comparativos. Como se muestra en los valores de las intensidades de picos (Tabla IV.5), todos los picos de difracción se reducen significativamente al entrar en contacto el timol con la BCD o la HPBCD. Para la HPBCD se registró un patrón compatible con un estado amorfo. La mezcla física y el complejo de inclusión también muestran patrones difusos, que indican un estado predominantemente amorfo, que se hace más notorio cuando se forma el complejo de inclusión que en la mezcla física. Sin embargo, al ser amorfas la HPBCD, su

mezcla y su complejo de inclusión, esta técnica de DRX no permite obtener conclusiones sobre si se formo un complejo de inclusión o si sólo es una mezcla de sus componentes.

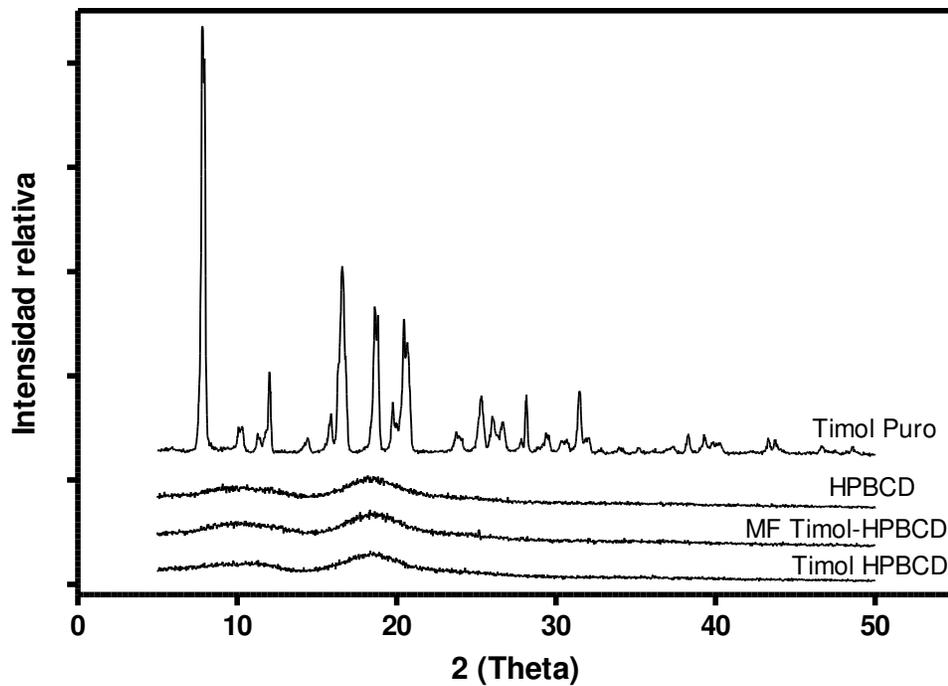


Figura IV.29. Patrones de Difractometría de Rayos X para el timol puro, la HBCD, su complejo de inclusión y su mezcla física (MF) liofilizados.

Tabla IV.5. Intensidades de los picos seleccionados del timol en los patrones de difracción de Rayos X para los sistemas con BCD y HPBCD.

Posición Pico, 2 θ (°)	Timol	Timol-BCD		Timol-HPBCD	
		MF ^a	L ^b	MF ^a	L ^b
7,825	4154	71	89	195	168
12,025	839	231	526	229	187
16,575	1852	132	271	250	219
18,625	1463	276	288	373	302
20,450	1345	138	165	262	193
25,325	610	557	148	133	100
28,150	620	98	113	129	83
31,475	656	114	91	83	59

a: MF= mezcla física

b: L: liofilizado

En la Tabla IV.6 se muestran los valores de cristalinidad relativos de los sistemas que incluyen al timol con la BCD y la HPBCD, tomando como referente de cristalinidad total al timol y a la misma BCD. Al comparar los valores de la mezcla físicas y complejo de inclusión de timol-HBCD, se obtiene valores esperados, en donde la cristalinidad del complejo de inclusión es menor a la obtenida en la simple mezcla física. Al comparar los valores de la mezcla físicas y complejo de inclusión del timol-BCD, este factor no es tan importante para ser mencionado, pues si nos fijamos únicamente en el, parecería que la cristalinidad se reduce más en la mezcla física. Sin embargo, y como ya se mencionó, al observar los difractogramas se observan cuán diferentes son entre sí. Al utilizar la BCD como referencia de cristalinidad total, se puede notar una pérdida de ella en el complejo de inclusión, al ser comparada con la mezcla física.

Tabla IV.6. Grado relativo de cristalinidad (RDC) de picos seleccionados de timol y BCD para los sistemas con BCD y HPBCD.

Referencia	Timol-BCD			Timol-HPBCD	
	2 θ (°)	MF ^a	L ^b	MF ^a	L ^b
Timol	7,825	0,017	0,021	0,047	0,040
	12,025	0,275	0,627	0,273	0,223
	16,575	0,071	0,146	0,135	0,118
	18,625	0,189	0,197	0,255	0,206
	20,450	0,103	0,123	0,195	0,143
	25,325	0,913	0,243	0,218	0,164
	28,150	0,158	0,182	0,208	0,134
	31,475	0,174	0,139	0,127	0,090
BCD	6,400	0,543	1,407	-	-
	9,125	0,178	0,174	-	-
	12,625	0,642	0,079	-	-
	17,225	0,511	1,436	-	-
	19,025	0,675	0,695	-	-
	22,875	0,716	0,354	-	-
	27,225	0,609	0,366	-	-

a: MF= mezcla física

b: L: liofilizado

En la Figura IV.30 se muestran los difractogramas de los complejos de CINAM con la BCD y la HPBCD, y la mezcla física con la BCD.

Se compararon los difractogramas del complejo CINAM-BCD y mezcla física CINAM-BCD con el correspondiente a la BCD. Se comprueba que algunos picos característicos que aparecen en el difractograma de la BCD no se modifican, mientras que otros se corren ligeramente (12,625°), o disminuyen su intensidad (7,825; 28,150; 31,475°) e inclusive algunos se intensifican (mezcla física a 8,925°).

En la Tablas IV.7 y IV.8 se muestran las intensidades de picos y valores de RDC de los sistemas con CINAM, BCD e HPBCD. Tomando como referencia a la BCD, se puede notar la disminución del grado de cristalinidad en todas las posiciones angulares características. Además, al observar los valores de RDC calculados para la mezcla física y el complejo de inclusión CINAM-BCD (Tabla IV.8), se refleja el descenso en cristalinidad de un sistema a otro (9,125°; 12,625°; 19,025°; 27,225°), sugiriendo un fenómeno de desorden debido a la formación del complejo (Cortes y col., 2001).

Tabla IV.7. Intensidades de los picos seleccionados de la BCD en los patrones de difracción de Rayos X para los sistemas con CINAM.

Posición Pico, 2θ (°)	BCD	CINAM-BCD		CINAM-HPBCD
		MF ^a	L ^b	L ^b
7,825	4154	89	71	168
12,025	839	526	231	187
16,575	1852	271	132	219
18,625	1463	288	276	302
20,450	1345	165	138	193
25,325	610	547	148	100
28,150	620	113	98	83
31,475	656	91	114	59

a: MF= mezcla física

b: L: liofilizado

Tablas IV.8. Grado relativo de cristalinidad (RDC) de picos seleccionados de BCD para la mezcla física y complejo de inclusión del sistema CINAM-BCD.

CINAM-BCD			
Referencia	2θ ($^{\circ}$)	MF ^a	L ^b
	6,400	0,444	1,114
	9,125	0,155	0,120
	12,625	0,436	0,096
BCD	17,225	0,476	1,326
	19,025	0,473	0,443
	22,875	0,447	0,469
	27,225	0,447	0,309

a: MF= mezcla física

b: L= liofilizado

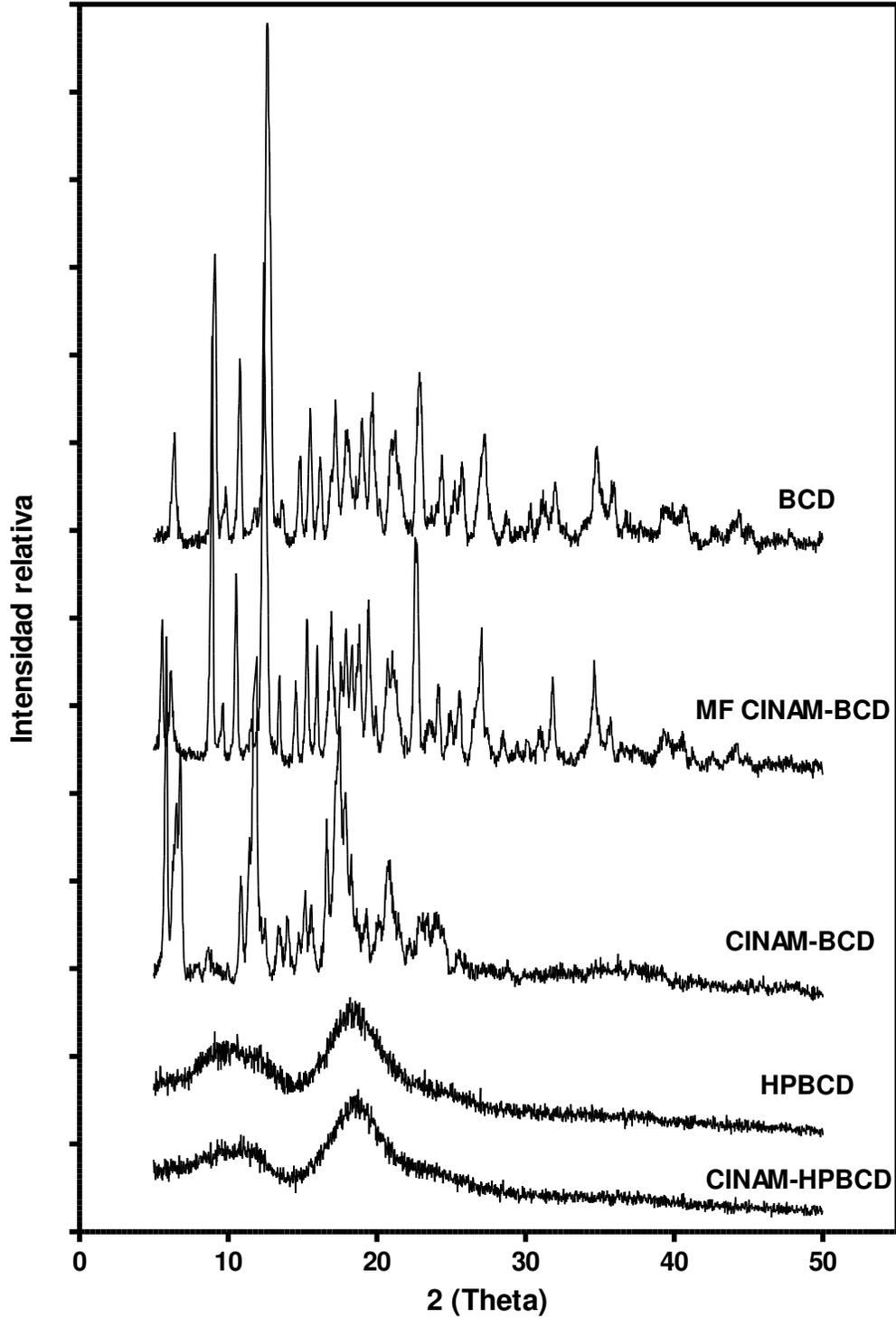


Figura IV.30. Patrones de Difractometría de Rayos X para la BCD, la mezcla física con CINAM, su complejo de inclusión con CINAM, la HPBCD y su complejo con CINAM liofilizados.

IV.2.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido

Siguiendo la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos, la morfología superficial de los compuestos puros y de los sistemas binarios (incluyendo las mezclas físicas y complejos de CDs) fueron analizados por microscopía electrónica de barrido (SEM). Distintas microfotografías fueron tomadas y son mostradas en las figuras siguientes.

En la Figura IV.31 se muestran las microfotografías correspondientes a la BCD pura, el timol puro, su complejo de inclusión y su mezcla física. Del análisis realizado por SEM, el timol se presenta como pequeños cristales (1 a 20 μm), y las partículas de BCD se presentan como cristales tipo paralelogramos tridimensionales de tamaño irregular (20 a 250 μm). Por su parte la mezcla física de la BCD con el timol mostró la presencia de cristales de timol mezclados y algunos pegados entre sí, revelando que no hay una interacción entre los dos elementos puros. Por el contrario, se logra ver un cambio en el complejo de inclusión timol-BCD, en donde se ven estructuras más regulares en su forma y en su tamaño que indicaría la formación del complejo timol-BCD

En la Figura IV.32 se muestran las microfotografías correspondientes al complejo de inclusión de CINAM-BCD y la mezcla física entre la BCD y el CINAM. La mezcla física (MF CINAM-BCD) muestra grandes bloques de materiales por un lado (hasta 200 μm), y por otro lado, apelmazamiento de pequeñas estructuras. Esto último seguramente se debe a que el CINAM es líquido, causando que restos de la BCD se peguen entre sí. En cuanto al complejo de inclusión CINAM-BCD, al igual que con el complejo timol-BCD, las estructuras presentan más regularidad y su tamaño promedio es menor.

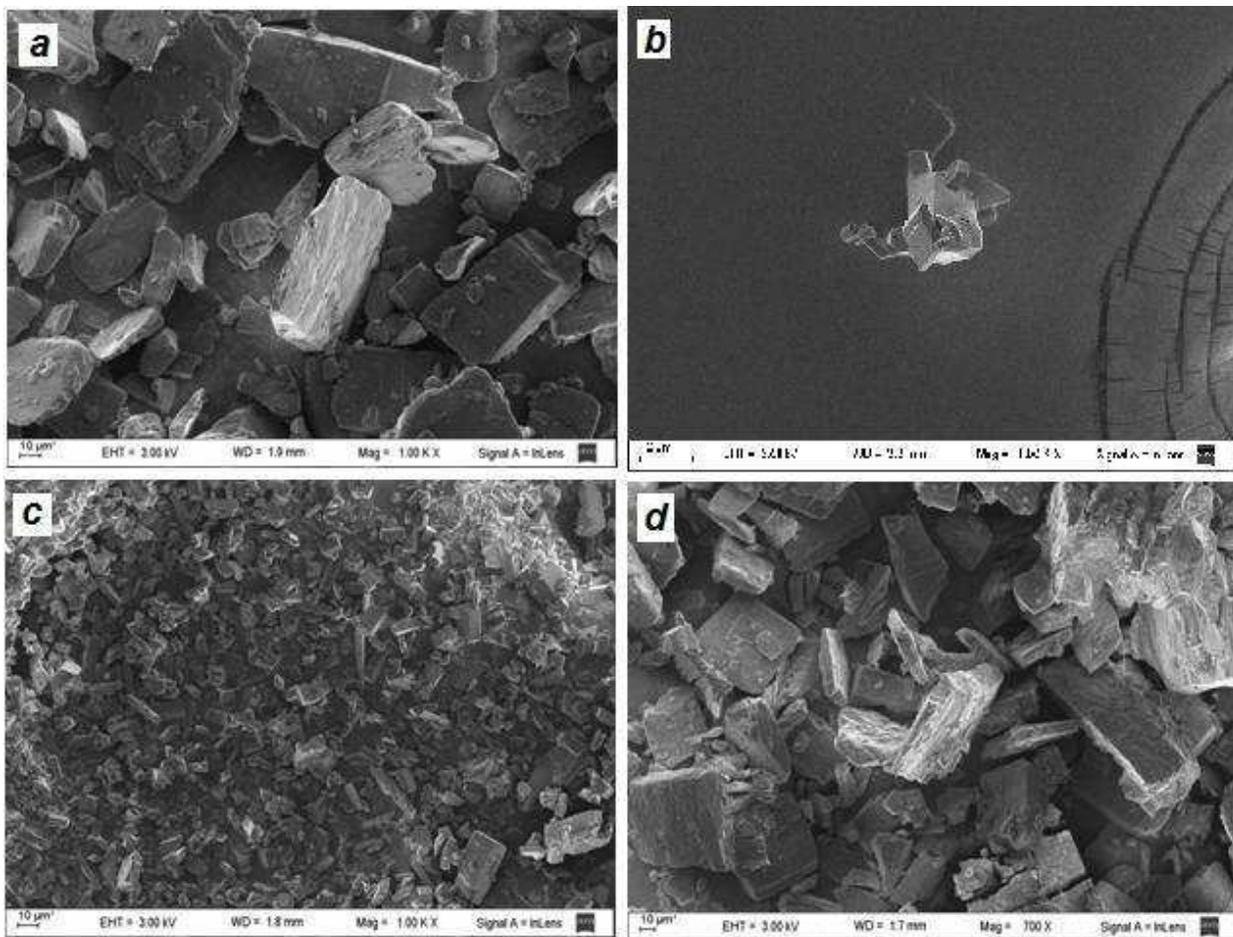


Figura IV.31. Micrografías realizadas por SEM de: BCD (a), timol (b), Complejo timol-BCD (c), MF timol-BCD (d).

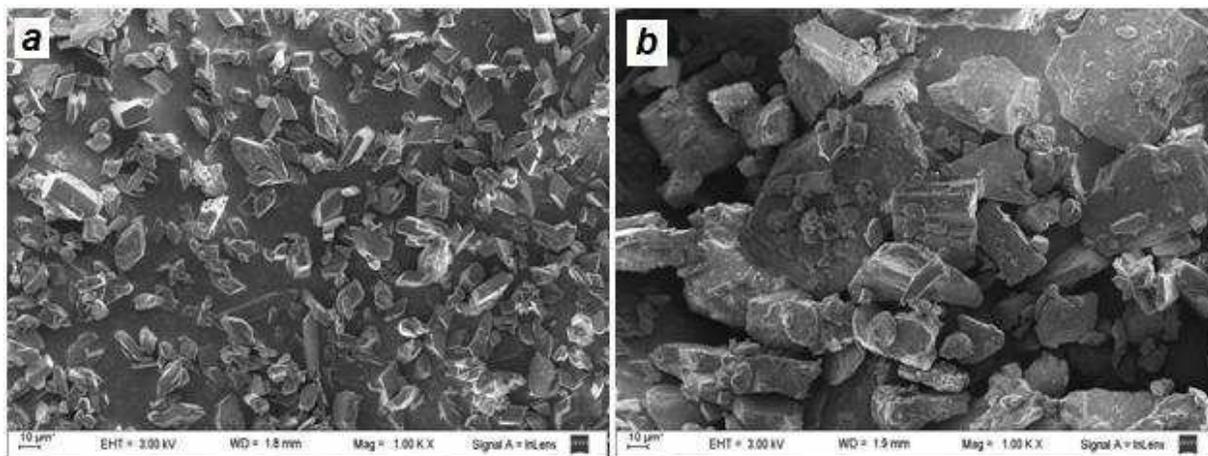


Figura IV.32. Micrografías realizadas por SEM de: Complejo CINAM-BCD (a), MF CINAM-BCD (b).

En las Figura IV.33 se muestra las micrografías correspondientes a la HPBCD pura y la MBCD pura. Ambas son muy parecidas entre sí, presentándose como partículas esféricas y huecas en apariencia, en una gran distribución de tamaños (1-150 μm), que concuerda con su naturaleza amorfa.

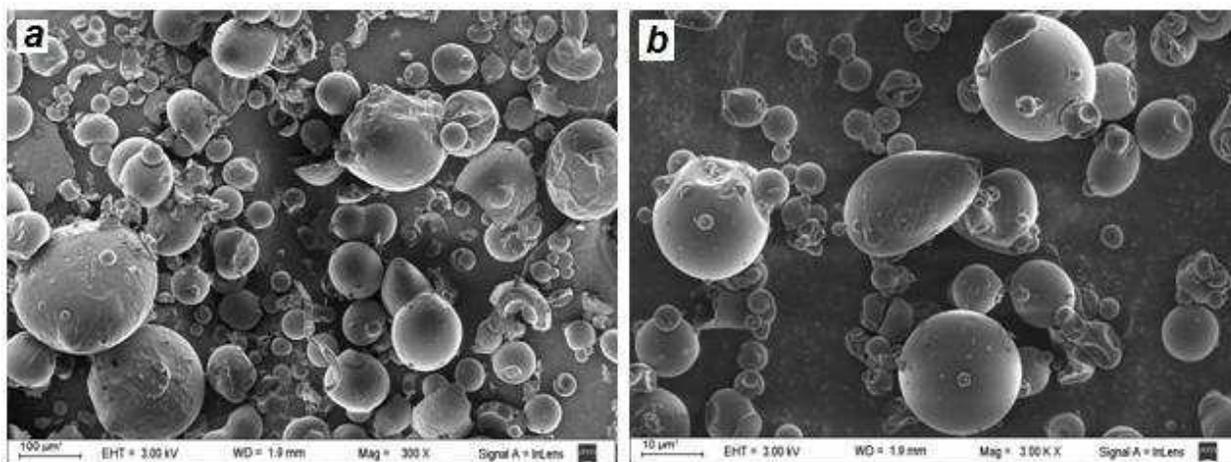


Figura IV.33. Micrografías realizadas por SEM de: HPBCD (a) y MBCD (b), liofilizadas

En la Figura IV.34 se muestran las mezclas físicas y los complejos de inclusión del timol con las dos CDs modificadas: la HPBCD y la MBCD. En el caso de las mezclas físicas, se logra ver algunas formas con líneas rectas, además de las esféricas correspondientes a las CDs, lo cual es un indicio de una escasa interacción entre los dos elementos. Esto tal vez es más evidente en la mezcla física correspondiente a timol e HPBCD (Figura IV.34 a). Por el contrario, al observar los respectivos complejos de inclusión, se puede notar un cambio drástico en la morfología original de ambos elementos. Piezas amorfas de tamaños variados y aspecto de láminas fue común para ambos complejos de inclusión, pudiéndose distinguir un sólo componente.

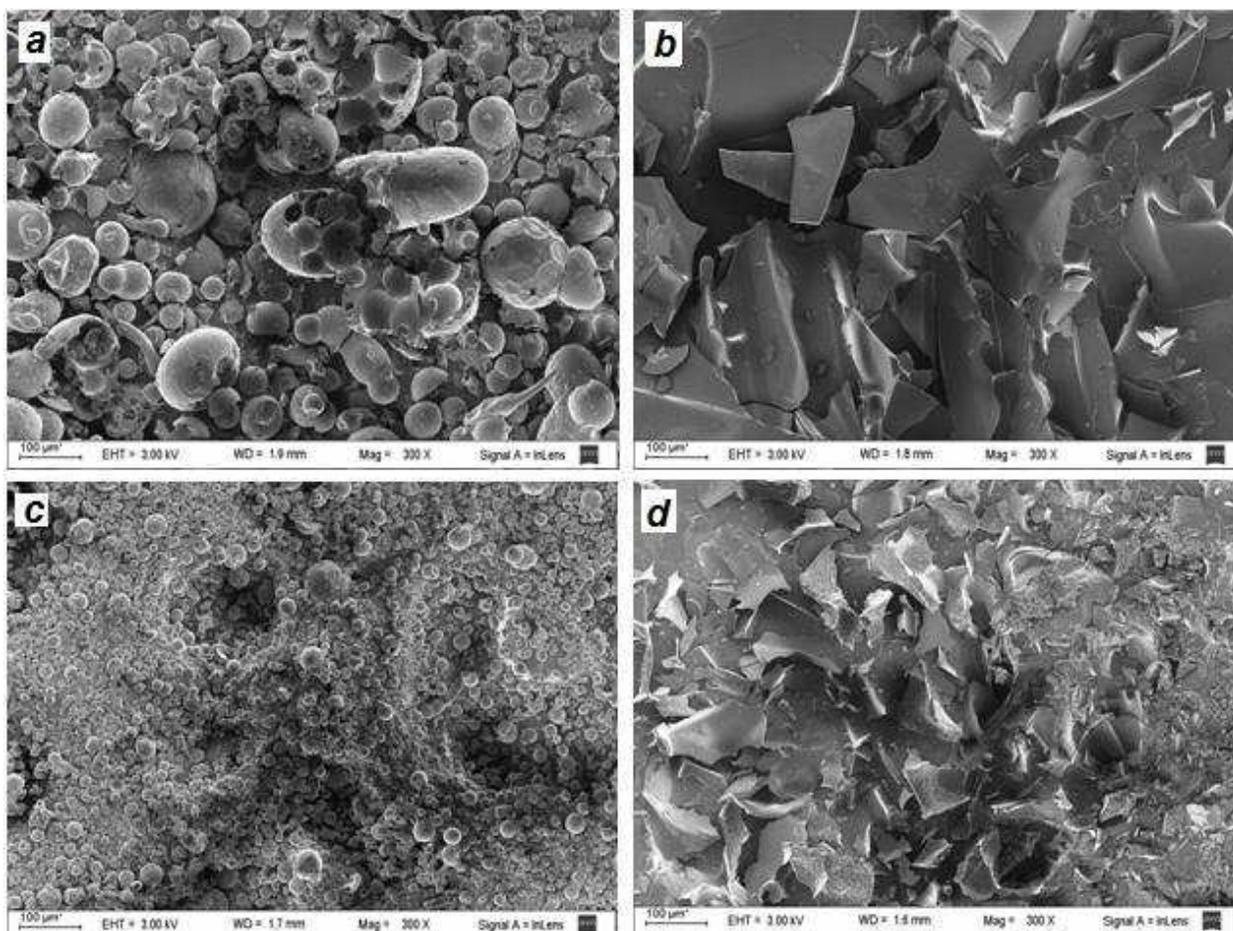


Figura IV.34. Micrografías realizadas por SEM de: MF timol-HPBCD (a), Complejo timol-HPBCD (b), MF timol-MBCD (c) y Complejo timol-MBCD (d), liofilizados.

En la Figura IV.35 se muestran las mezclas físicas y los complejos de inclusión del CINAM con la HPBCD y la MBCD. En el caso de las mezclas físicas, se puede ver un conjunto de formas distintas, pero siempre con predominancia de las formas esféricas correspondientes a las CDs. Al observar las microfotografías de los complejos de inclusión, se vuelve a observar un cambio drástico en la morfología original de ambos elementos, al igual que en aquellas microfotografías del timol. Piezas amorfas de tamaños variados y aspecto de láminas fue común para ambos complejos de inclusión, donde se distingue un sólo componente. Sin embargo, cabe mencionar una diferencia

en los tamaños promedios de las estructuras mencionadas, siendo las de la HPBCD más grandes que aquellos con la MBCD.

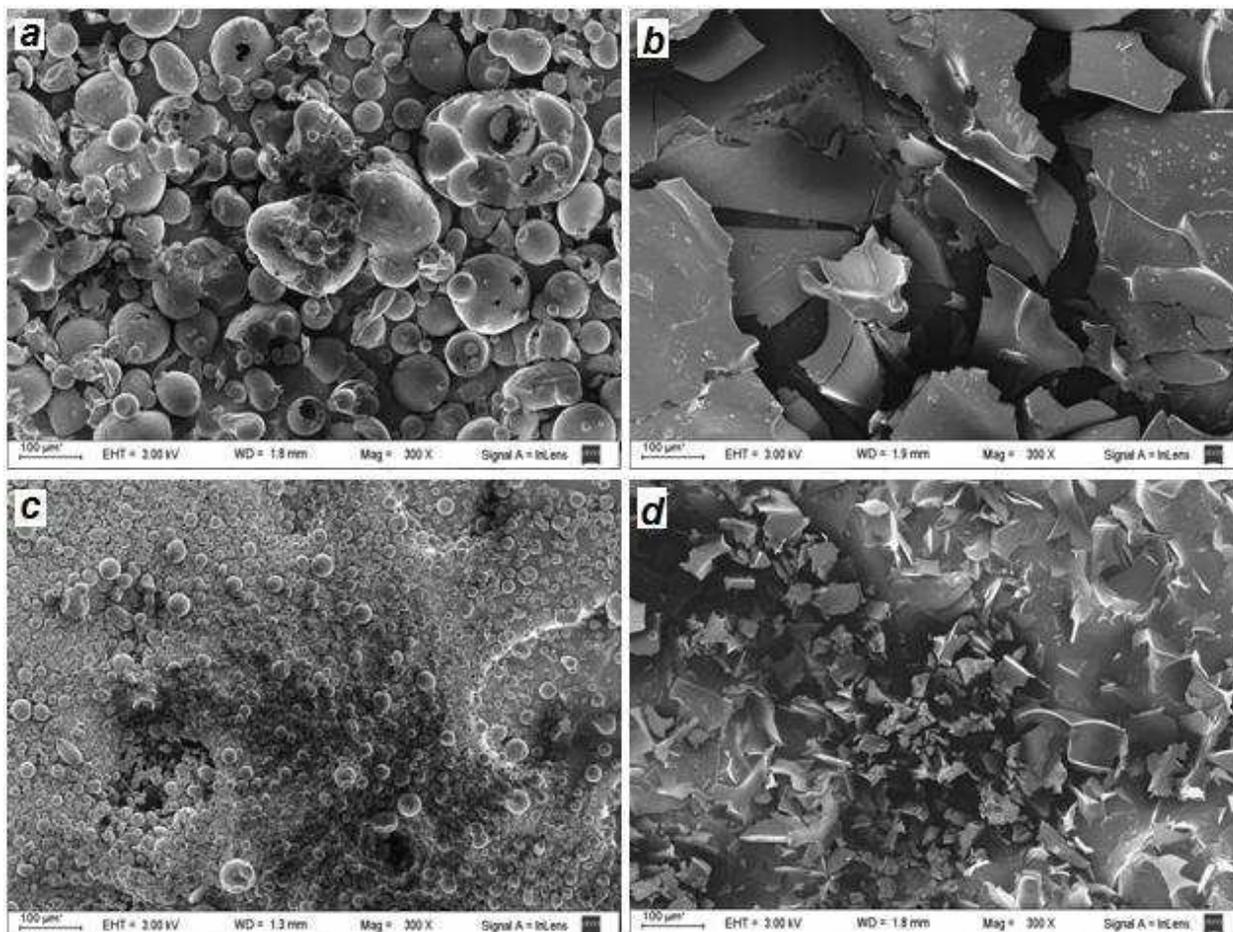


Figura IV.35. Micrografías realizadas por SEM de: MF CINAM-HPBCD (a), Complejo CINAM-HPBCD (b), MF CINAM-MBCD (c) y Complejo CINAM-MBCD (d), liofilizados.

El cambio drástico en la forma y el aspecto de las partículas de los componentes puros y las mezclas físicas al ser comparadas con los complejos de inclusión, es un indicativo de la presencia de una nueva fase sólida. Sin embargo, puede ser simplemente una consecuencia de un cambio de morfología cristalina o *habitus* en aquellos sistemas o tal vez ser una evidencia de la existencia de una sola fase

(Fernandes y col., 2002). Por lo tanto, los estudios de SEM por sí solos no pueden caracterizar sistemas en fase sólida.

En la Figura IV.36 se muestran micrografías del almidón HiCap 100 (a) con un aumento de 1000x y la morfología externa del HiCap 100 conteniendo al timol (b). Las formas en el HiCap puro se presentan como esferas, de superficie no lisa. Sin embargo, su morfología cambia por completo al ser liofilizado junto al timol. Se puede observar una gran estructura amorfa que al ser magnificada (5000x) se presenta como pequeñas esferas de superficie muy rugosa.

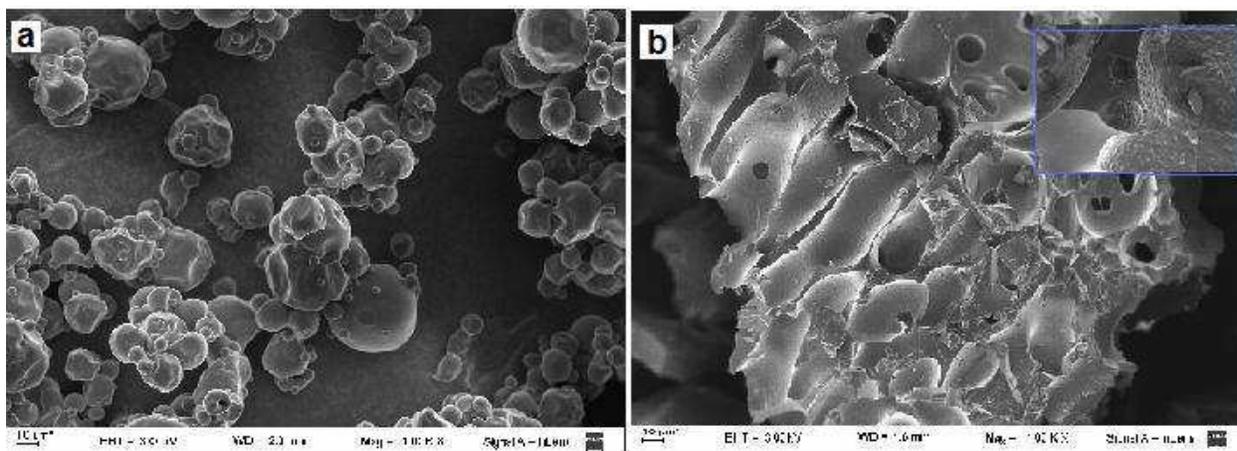


Figura IV.36. Micrografías realizadas por SEM de: HiCap 100 liofilizado (a) y timol encapsulado en Hicap 100 (b), liofilizados. La figura inserta muestra un aumento de 5000x.

Como en el caso de la formación de los complejos de inclusión, la encapsulación del timol en el HiCap 100 produce cambios en su morfología que pueden evidenciarse por SEM. Esto demostraría que la técnica SEM es una herramienta útil para verificar la formación de complejos inclusión y la encapsulación en matrices continuas.

IV.2.4.3. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En los complejos de inclusión que generalmente se obtienen como polvos amorfos, el análisis de XRD no es apropiado para obtener una información estructural, dado que no es posible discriminar si el producto obtenido es un verdadero complejo de inclusión o una mezcla dispersa homogénea de dos componentes amorfos, debido a las señales muy anchas y un patrón de difracción difuso. Partiendo de esto, se utilizó espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) mediante la utilización de un dispositivo de reflectancia total atenuada (ATR, *attenuated total reflectance*) de una reflexión con cristal de diamante-Zn/Se, para evaluar la interacción entre las distintas CDs y las moléculas huésped en el estado sólido, dado que la formación del complejo puede producir cambios en el espectro de absorción (Variación en la intensidad o corrimiento de los picos de absorción). La ventaja de este dispositivo es que permite utilizar la muestra sin diluciones y sin la necesidad de utilizar matrices dispersantes (como el KBr comúnmente utilizado), simplificando la preparación de las muestras y el posterior procesamiento de los datos. Se ha comprobado que el método ATR-IR puede ser aplicado exitosamente para una discriminación confiable y rápida, por ejemplo en aceites esenciales de diferentes tipos de albahaca (Bruker Optics, 2009). La ausencia de manipulación de la muestra garantiza rapidez en el proceso de medición y una alta reproducibilidad de los espectros, haciendo que la técnica FTIR-ATR sea muy adecuada también para revelar diferencias en el estado sólido incluyendo estado de hidratación y formas cristalinas polimórficas, y en líneas generales, en la identificación y caracterización de productos farmacéuticos (Crupi y col., 2007).

Por lo general, los espectros infrarrojo (IR) obtenidos en sistemas que contienen biomoléculas son muy complejos debido a que cada grupo funcional presente en una molécula contribuye a la formación del espectro. El resultado neto es un espectro donde las asignaciones de banda pueden ser difíciles debido a que se produce superposición y mezcla de diferentes modos de vibración (Schulz y Baranska, 2009). Muchos de los cambios en el espectro de absorción suelen ser muy sutiles requiriendo una interpretación cuidadosa del espectro (Hedges, 1998).

Los espectros infrarrojos de los distintos sistemas con CDs fueron analizados y comparados con los espectros de los compuestos puros y sus mezclas físicas.

En el caso de los huéspedes utilizados (timol y CINAM), al tratarse de sustancias con anillo aromático, sus espectros infrarrojos muestran las señales características de dichos compuestos y también dan información sobre el tipo de sustitución del anillo aromático (orto, para o meta) y de los grupos funcionales adicionados al anillo aromático (Martinez, 2001).

Evidencias de la formación de complejos se presentan claramente en la región del espectro a partir de 1700 cm^{-1} (Crupi y col., 2007). Por esto, a continuación se presentan varias figuras de los sistemas estudiados, enfocándose el análisis en los espectros normalizados desde 1800 a 600 cm^{-1} . En la figura IV.37 se muestran los espectros normalizados correspondientes al timol y sus sistemas con la BCD. El espectro de timol nos muestra bandas características que están señaladas (738 , 804 , 942 , 1090 y 1285 cm^{-1}) y coinciden con resultados previos (Schulz y Baranska, 2009; Schulz y col., 1999). El espectro de la BCD muestra la banda característica del grupo OH a 1645 - 1670

cm^{-1} , tal como lo observó Chittiteeranon y col. (2007) en un trabajo encapsulando una fragancia sintética. La mezcla física del timol con la BCD (MF timol-BCD) presenta varios picos característicos del timol, en especial a 1285 (correspondiente a las vibraciones de flexión del grupo OH) y a 804 y 738 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones del anillo del timol (anillo del benceno C-H). Además, en la zona correspondiente a la banda de 942 cm^{-1} se observa lo que podría considerarse una superposición de los picos de la BCD y del timol. Las flechas en la Figura IV.37 muestran las principales diferencias entre la MF y el complejo de inclusión. Estos resultados indicarían, que en la mezcla física no hay interacciones importantes entre los dos compuestos (BCD y timol), o al menos es mucho menor con respecto al complejo de inclusión.

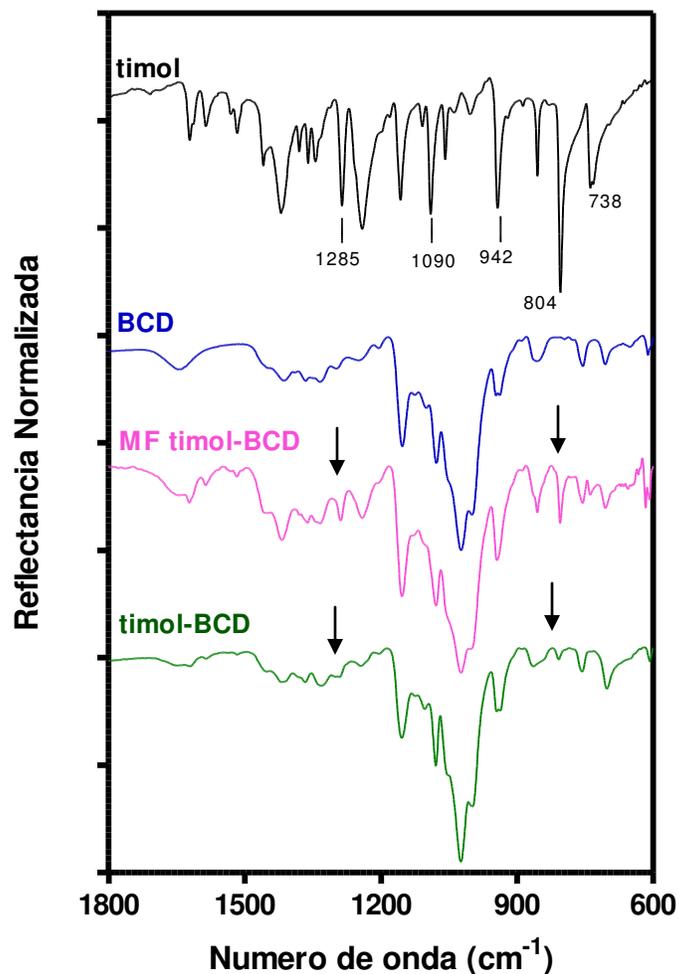


Figura IV.37. Espectros FTIR-ATR normalizados de: timol puro, BCD, la mezcla física (MF) de timol y BCD y finalmente, el complejo de inclusión de ambos. Se destacan algunas bandas características en las que se señala el número de onda en cm^{-1} .

En la Figura IV.38 se muestran los espectros FTIR normalizados para el timol y sus sistemas con las CDs modificadas: a) con HPBCD y b) con MBCD, en el rango de 1800 a 600 cm^{-1} . En ambas figuras se muestra también, el espectro del timol con sus respectivas bandas características, con fines comparativos. El espectro FTIR-ATR de HPBCD muestra bandas de absorción prominentes a 1155 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} y

1010 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de estiramiento C=H y C-O. En el espectro de la MF timol-HPBCD se observan algunos picos característicos del timol (más evidente a 804 cm^{-1}), sugiriendo poca o nula interacción entre las moléculas, mientras que en el complejo, éstos se han reducido considerablemente o desaparecido. Además, la banda a 804 cm^{-1} aparece más ancha, menos definida y ligeramente corrida a una menor longitud de onda. La posición (número de onda) de los picos característicos del timol se muestran en la Tabla IV.9, para los distintos sistemas estudiados.

En el espectro de la MF-timol-MBCD (Figura IV.38b) se aprecian los picos característicos del timol, siendo los más destacados aquellos a 1285, 804 y 738 cm^{-1} . Por su parte, el complejo de timol-MBCD muestra un espectro muy parecido al de la MBCD pura, y los picos característicos de timol pasan desapercibidos. En la tabla IV.9 se indica qué señales desaparecen cuando se forma el complejo timol-MBCD.

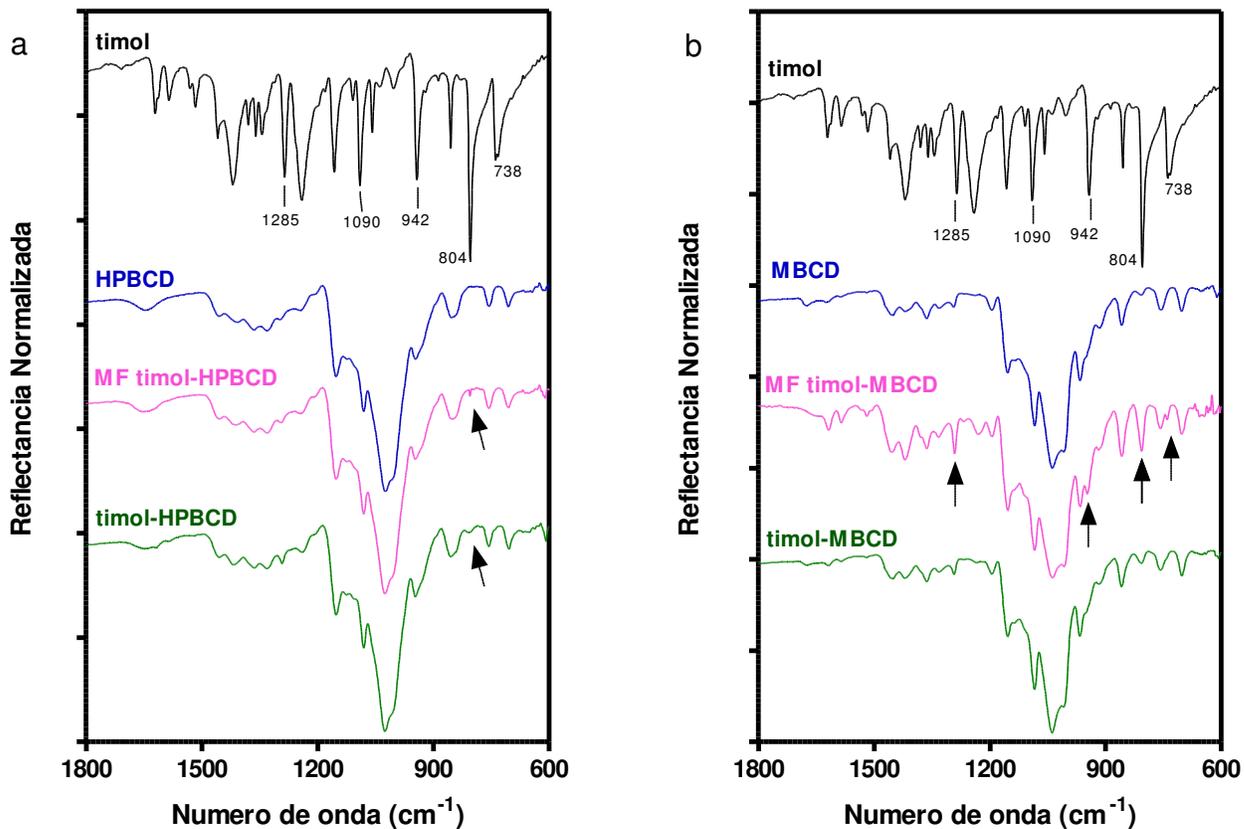


Figura IV.38: Espectros FTIR-ATR normalizados de: a) timol puro, HPBCD, la mezcla física de timol e HPBCD y el complejo de inclusión de ambos, y b) timol puro, MBCD y el complejo de inclusión entre ambos. Se destacan algunas bandas características del timol en las que se señala el número de onda en cm⁻¹.

Tabla IV.9. Bandas características de FTIR-ATR (cm^{-1}) para el timol y sus respectivos sistemas con CDs. Se han resaltado las bandas más representativas.

Asignación	Timol	MF	Complejo	MF	Complejo	MF	Complejo
Banda IR		timol-BCD	Timol-BCD	timol-HPBCD	Timol-HPBCD	timol-MBCD	Timol-MBCD
C=C	1620	1620	1620	1619	-	1619	1620
	1420	1420	1419	1419	1419	1420	1421
O-H	<u>1285</u>	<u>1288</u>	<u>1290</u>	<u>1293</u>	<u>1293</u>	<u>1290</u>	<u>1292</u>
	1156	1149	1154	1152	1152	1152	1153
	1090	-	-	1100	-	1100	-
	1058	1057	-	1058	-	-	-
	942	944	944	945	947	947	951
CH	<u>804</u>	<u>805</u>	<u>808</u>	<u>805</u>	<u>806</u>	<u>806</u>	<u>807</u>
CH	738	737	-	-	-	739	-

En la Figura IV.39 se presentan los espectros normalizados del CINAM y sus sistemas con la BCD. A modo de comparación, se muestra el espectro del CINAM con sus bandas características destacadas, que coinciden con los datos de bibliografía (Martínez, 2001). El CINAM muestra una banda débil a 3330 , otras a 3060 , 2812 , 2741 cm^{-1} (no mostrado en la Figura), una intensa a 1669 cm^{-1} (debida al grupo carbonilo), la banda correspondiente al doble enlace del alqueno ($=\text{C-H}$) cerca de 970 cm^{-1} , y a 744 y 688 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones CH de flexión fuera de plano del anillo aromático (monosustituido) (Nakamoto, 1986; Buttler y Harrod, 1992). El espectro de la mezcla física del CINAM y la BCD (MF CINAM-BCD) no muestra bandas de absorción muy intensas como podría esperarse, sin embargo, éste presenta varios de los picos característicos del CINAM, aunque ligeramente corridos de su frecuencia original. La banda que se aprecia es justamente la correspondiente al grupo carbonilo C=O , a 1669

cm^{-1} . En cuanto al complejo CINAM-BCD, se observa la desaparición o reducción considerable de la mayoría de los picos característicos del CINAM. Estos resultados se muestran en la Tabla IV.10.

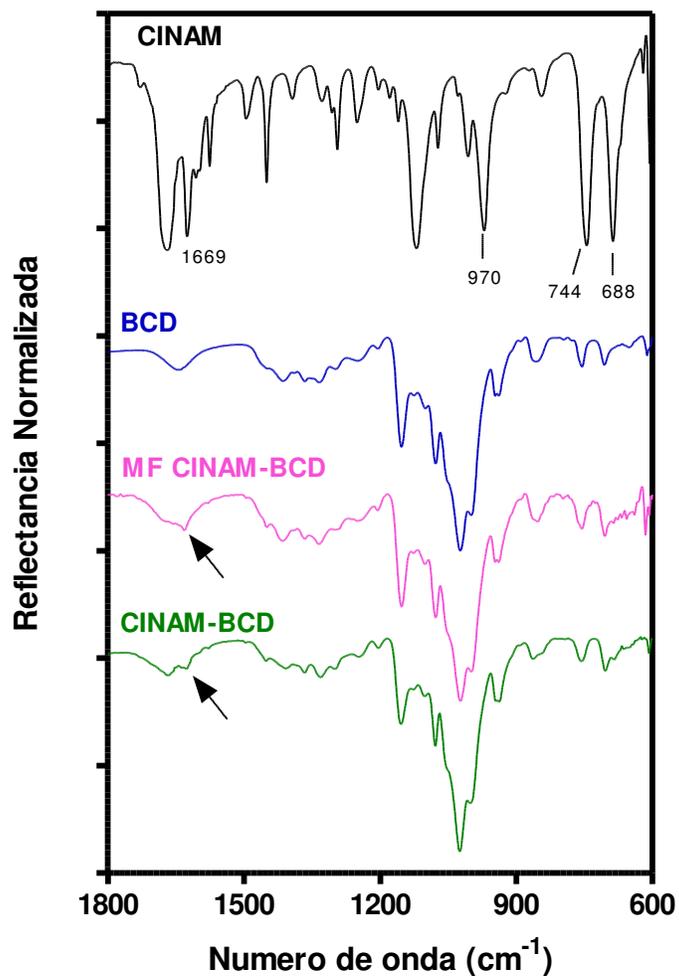


Figura IV.39. Espectros FTIR-ATR normalizados del CINAM puro, BCD, la mezcla física de CINAM y BCD y el complejo de inclusión de ambos. Se destacan algunas bandas características del CINAM en las que se señala el número de onda en cm^{-1} .

En la Figura IV.40 a, se muestran los espectros normalizados de la MF y del complejo del CINAM con la HPBCD. En la MF se pueden observar algunos picos del CINAM, en particular el correspondiente a 1669 cm^{-1} . A 744 cm^{-1} parece superponerse con un pico correspondiente a la HPBCD, mientras que el pico a 688 cm^{-1} (característico del CINAM) se hace evidente especialmente en comparación con el complejo de inclusión. Finalmente, en la Figura IV.40 b, se muestran los distintos sistemas entre la MBCD y el CINAM. En la MF no se observan a simple vista los picos característicos del CINAM excepto a 1669 cm^{-1} . En el área entre 700 y 800 cm^{-1} aparecen dos picos característicos de la ciclodextrina que parecen ser más intensos en la MF que en el mismo complejo. Sin embargo, al comparar ambos espectros, quizás esto se deba simplemente a una mejor adquisición de la señal en la MF.

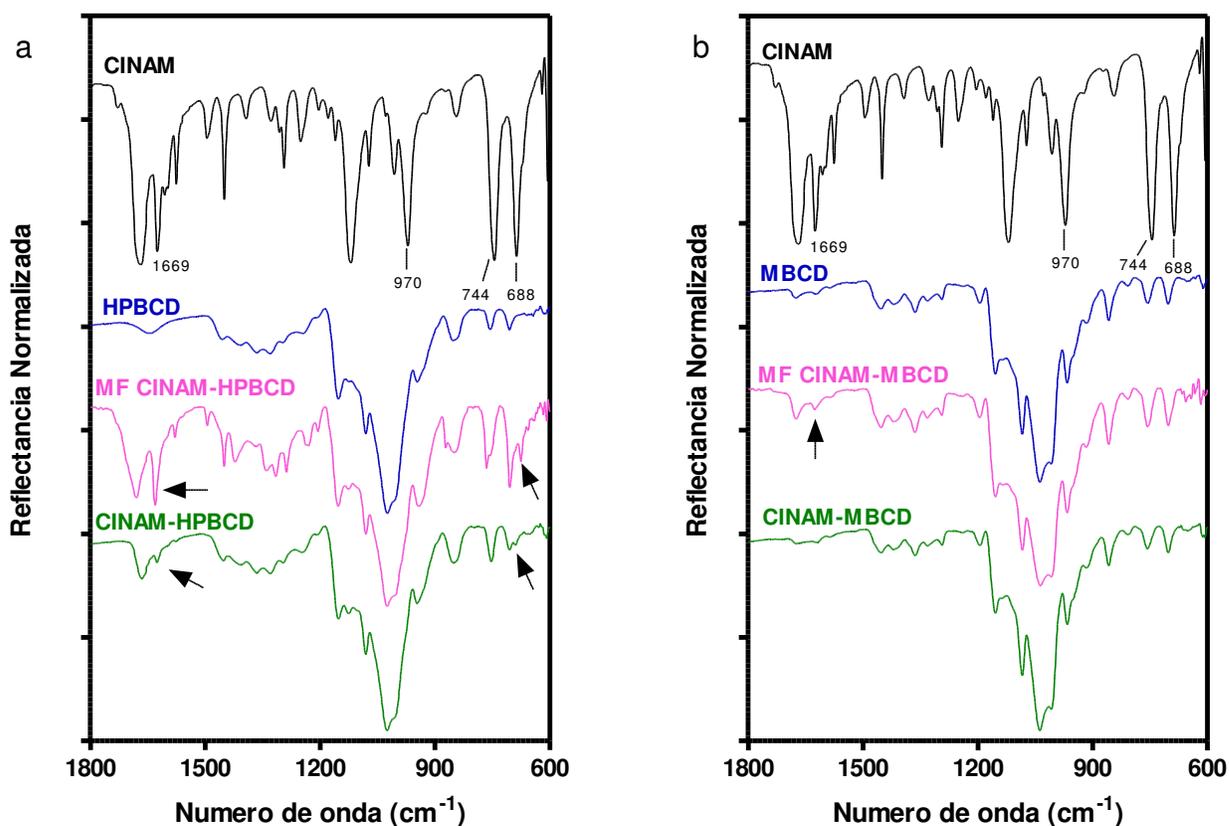


Figura IV.40. Espectros FTIR-ATR normalizados de: a) CINAM puro, HPBCD, la mezcla física de CINAM e HPBCD y el complejo de inclusión de ambos. b) CINAM puro, MBCD, la mezcla física de CINAM y MBCD y el complejo de inclusión de ambos. Se destacan algunas bandas características del CINAM en las que se señala el número de onda en cm^{-1} .

Tabla IV.10. Bandas características de FTIR-ATR (cm^{-1}) para el CINAM y sus respectivos sistemas con CDs. Se ha resaltado la banda más representativa.

Asignación	CINAM	MF	CINAM-BCD	MF	CINAM-HPBCD	MF	CINAM-MBCD
Banda IR		CINAM-BCD		CINAM-HPBCD		CINAM-MBCD	
C=O	<u>1669</u>	<u>1669</u>	<u>1670</u>	<u>1668</u>	<u>1669</u>	<u>1674</u>	<u>1674</u>
=C-H	970	-	-	-	-	-	969
CH	744	754	757	754	752	-	-
CH	688	691	692	675	690	-	-

En particular, al observar la región analizada de los distintos sistemas estudiados, las bandas más representativas de ambos componentes de aceites esenciales en los complejos de inclusión (resaltadas en las tablas IV.9 y IV.10) presentan un cambio hacia una frecuencia más baja respecto a los picos respectivos de los compuestos puros y sus mezclas físicas. Este comportamiento ya fue observado por otros autores al comparar compuestos puros, mezclas físicas y los respectivos complejos de inclusión (Stancanelli y col., 2008; Crupi y col., 2007; Ribeiro y col., 2003). Esto es indicativo de la existencia del complejo como un nuevo compuesto con bandas espectroscópicas distintas.

Es interesante resaltar que los espectros de los complejos suelen ser muy parecidos a los de la ciclodextrina *carrier*, dado que las bandas características de éstas se superponen sobre aquellas de los huéspedes que alojan. Este fenómeno es debido a las diferencias entre pesos moleculares de los componentes (Stancanelli y col., 2008).

Estos resultados confirman la existencia de fuertes interacciones del timol y el CINAM con las CDs, dado que los cambios espectrales pueden ser atribuidos a la disociación de los puentes de hidrógeno intermoleculares del huésped y de las CDs, que puede resultar en la formación del complejo de inclusión (Mura y col., 1998; Erden y Celebi, 1988).

En la Figura IV.41 se muestran los espectros normalizados del timol, almidón HiCap 100 y del timol encapsulado en HiCap 100. Si bien la región entre 800 y 1500 cm^{-1} suele presentar una alta superposición de picos y un espectro complejo, lo que dificulta la asignación exacta de una banda (Kizil y col, 2002), a simple vista se observa que los

espectros de HiCap 100 y del sistema con timol presentan señales características del polímero del almidón. Así en la región entre 1200 a 1000 cm^{-1} se obtuvieron señales cercanas a 1150, 1075 y 1015 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones de las uniones C-O y C-C de las unidades de glucosa (Staroszczyk, y col. 2010). En las zonas señaladas sobre el espectro de timol-HiCap 100 se puede apreciar que entre 1400 a 1500 cm^{-1} , se produce una aparente superposición de varios picos propios del HiCap y del timol. Entre 1000 y 1100 cm^{-1} se aprecia que el pico ancho del HiCap 100 parece intensificarse y correrse ligeramente a una frecuencia menor. Esto se corrobora con los datos presentados en la Tabla IV.11 en donde se muestran algunos picos característicos del timol y del almidón HiCap 100 puro, y los picos fácilmente observables del sistema timol-HiCap 100.

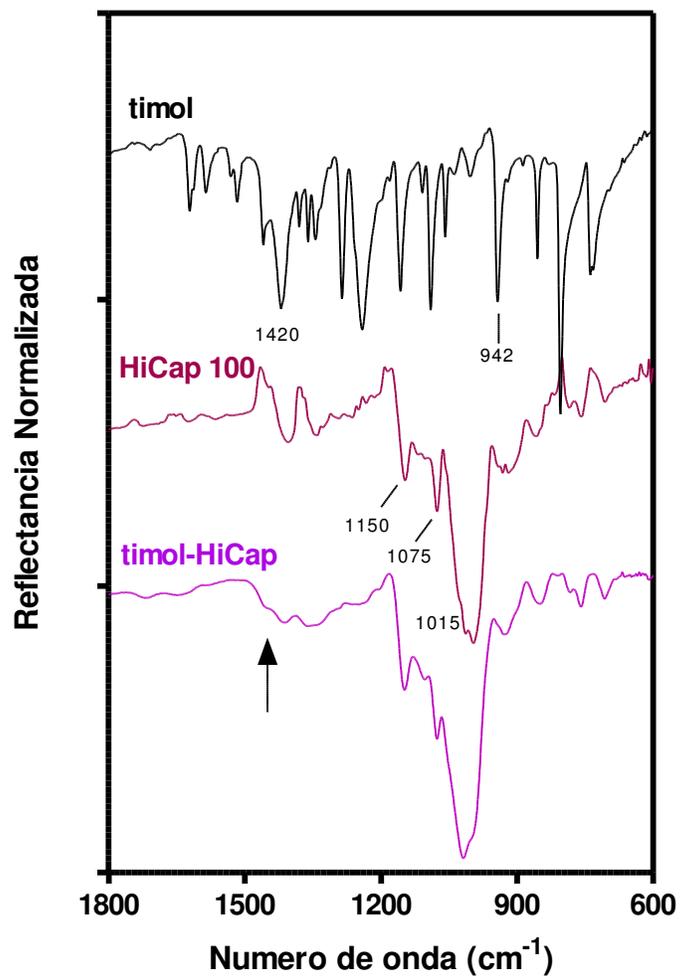


Figura IV.41. Espectros FTIR-ATR normalizados de timol puro, HiCap 100 puro y el sistema timol-HiCap 100.

Tabla IV.11. Bandas características de FTIR-ATR (cm^{-1}) del timol y almidón HiCap 100 y su comparación con el sistema timol-HiCap 100.

Timol	HiCap 100	Timol-HiCap 100
1620	1449	1638*
1420	1370	1413*
1285	1292	1291
1156	1146	1148
1090	1076	1075
942	1015	1018
804	917	943*
738	996	927

* bandas características correspondientes al espectro del timol

IV.2.5. ESTABILIDAD DE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS

Este estudio proporciona información sobre la cinética de liberación del compuesto activo en las CDs o en la matriz continua bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Dicha información permitirá comparar la capacidad de los diferentes sistemas de proteger al compuesto activo durante largos periodos de tiempo y en consecuencia elegir las condiciones de almacenamiento más adecuadas de acuerdo al sistema utilizado.

IV.2.5.1. ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS DE CICLODEXTRINAS: CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL TIMOL Y DEL CINAMALDEHÍDO DE LAS CICLODEXTRINAS

A partir de los termogramas de los complejos de inclusión obtenidos a las diferentes HR y tiempos de almacenamiento y mostrados en la sección IV.2.1.A (Propiedades Térmicas), se determinó la cantidad de ligando liberado del complejo durante el almacenamiento. El % de ligando liberado se calculó de acuerdo a la técnica descrita en la sección III.2.4.2 (Materiales y Métodos).

IV.2.5.1.1. Cinética de liberación del timol

Las Figuras IV.42 a, b y c muestran el porcentaje de timol liberado (% L) de los complejos de la BCD, MBCD y HPBCD respectivamente, en función del tiempo, a diferentes HR.

Como ya se mostró en la sección IV.2.1.A.2. (Propiedades Térmicas), el timol se liberó de su respectivo complejo con la BCD sólo a altas HR. Además aún a esas altas HR el % liberado fue bajo, siendo de 1 y 27 % a 84 y 97% respectivamente, luego de 3 meses de almacenamiento (Figura IV.42a). Sin embargo mientras que a 84 % HR durante casi todo el almacenamiento no se libero nada, incrementándose levemente luego de 75 días, a 97% al mes de almacenamiento el % liberado se incremento linealmente hasta los 2 meses y luego se mantuvo constante hasta los 3 meses.

Los complejos de timol-MBCD y timol HPBCD presentaron un comportamiento totalmente diferente, ya que aún a bajas HR el timol se liberó de la CD. (Figuras IV.42.

b y c). A un dado tiempo de almacenamiento, el % liberado se incrementó al aumentar la HR de almacenamiento. Además, cabe señalar que en el de los complejos timol-MBCD, al comenzar el almacenamiento parte del timol se había liberado durante el tiempo de equilibración (observar en la Figura IV.42b el % de timol liberado es diferente de cero) excepto a 97% HR. El comportamiento anómalo que ocurre a 97 % (donde uno esperaría que ocurriera la mayor liberación) puede deberse a que el alto colapso del sistema que ocurre a esta HR (Propiedades de sorción, Figura IV.18 c), impide la difusión del timol y entonces no se libera. Los complejos timol-HPBCD presentaron un comportamiento opuesto, ya que durante la equilibración no ocurre liberación del timol, excepto a 97% HR (Figura IV.42 c). Además, comparando las Figura IV.18 b y Figura IV.18 c, el % de timol liberado a una dada HR y tiempo, fue mayor para la MBCD que para HPBCD.

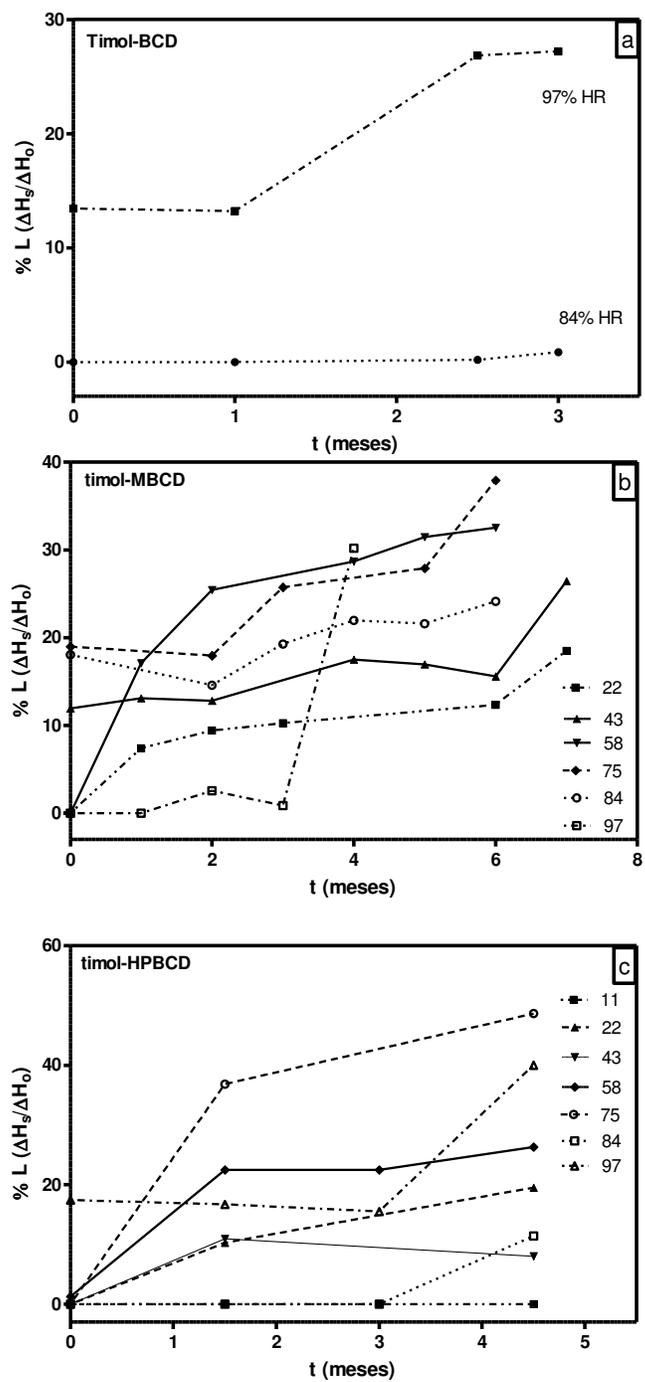


Figura IV.42. Porcentaje de timol liberado (%L) de su complejo, (a) timol-BCD, (b) timol-MBCD y (c) timol-HPBCD en función del tiempo a 25°C y a distintas HR.

IV.2.5.1.2. Cinética de liberación del cinamaldehído

Las Figuras IV.43. a, b y c muestran el porcentaje de CINAM liberado (% L) de los complejos de la BCD, MBCD y HPBCD respectivamente, en función del tiempo, a diferentes HR.

Como ya se mostró en la sección IV.2.1.A.2. (Propiedades Térmicas), el CINAM se liberó del complejo CINAM-BCD sólo a 84 y 97 % HR. Sin embargo, el % L de CINAM liberado fue mayor al mostrado por los complejos timol-BCD, siendo de 13 y 27 % a 84 y 97% de HR respectivamente, luego de 75 días de almacenamiento (Figura IV.43. a), La liberación del CINAM de los complejos con las CDs modificadas (CINAM-MBCD y CINAM-HPBCD) presentaron un comportamiento similar al de los complejos CINAM-BCD. En efecto, en el caso de los complejos CINAM-MBCD, luego de 3 meses de almacenamiento, se liberó un 3% de CINAM a 97% de HR y de un 30 % a 84% de HR luego de 6 meses de almacenamiento. A todas las otras HR no se observó liberación de CINAM aún luego de 10 meses de almacenamiento (Figura IV.43. b).

El % L de CINAM liberado de los complejos CINAM-HPBCD hasta 3 meses de almacenamiento fue muy bajo y solo a 84% de HR se observó una liberación de 20% de CINAM. Luego de 3 meses el % liberado de CINAM se incrementó abruptamente a 97 y 75 % de HR mientras que a 43 y 58 % de HR se mantuvo cercano a cero luego de 6 meses de almacenamiento (Figura IV.43. c),

Estos resultados muestran que tanto las CDs naturales (BCD) o modificadas (MBCD y HPBCD) pueden mantener alojados en su anillo al huésped, durante largos periodos de tiempo. Dicho tiempo es función de la HR de almacenamiento, la naturaleza de la CD y

el ligando. Además se observa que el CINAM permaneció encapsulado durante largos periodos de tiempo en el interior de la cavidad en todas las CD aún a altas HR. En cambio el timol se liberó de las CDs modificadas aún a bajos HR y en tiempos relativamente cortos.

Estas diferencias de comportamiento pueden ser ocasionadas por la diferente estructura química, que presentan el timol y el CINAM, lo que ocasiona diferencias en su hidrofobicidad y características estéricas.

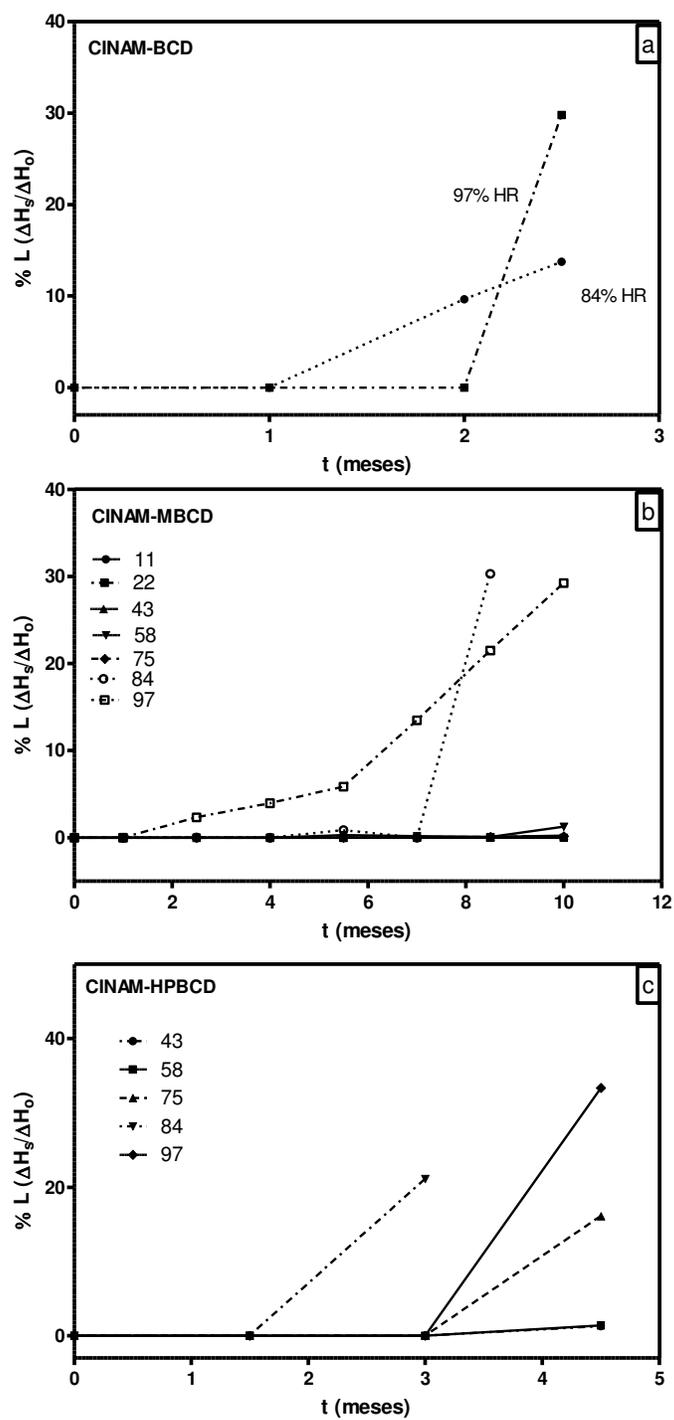


Figura IV.43. Porcentaje de timol liberado (% L) de su complejo, (a) CINAM-BCD, (b) CINAM-MBCD y (c) CINAM-HPBCD en función del tiempo a 25°C y a distintas HR.

IV.2.5.2. ESTABILIDAD DEL TIMOL ENCAPSULADO EN LA MATRIZ DE HICAP 100. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL TIMOL

IV.2.5.2.1. Retención del timol durante el almacenamiento

La cantidad de timol superficial, encapsulado y retenido durante el almacenamiento en la matriz de almidón modificado (HiCap 100) fue determinado como se describe en las secciones III.2.6.1, III.2.6.2. III.2.6.3 (Materiales y Métodos).

En todas las muestras analizadas la concentración de timol superficial, determinado por espectrofotometría en los lavados con hexano, fue despreciable. Esto no quiere decir que el timol permaneció encapsulado, sino que no pudo ser detectado en la superficie debido a su rápida degradación. Entonces, en el presente estudio sólo será analizado el timol encapsulado. En la Figura IV.44 se muestra el % de retención (%R) de timol en función del tiempo a 25° C y a diferentes HR de almacenamiento. La forma general de las curvas de retención (% R) consistió en una etapa inicial de rápido decrecimiento, seguido de una fase lenta que se aproxima a un *plateau* (Figura IV.44). Dichas curvas fueron ajustadas por medio de la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{R - R_{\infty}}{R_0 - R_{\infty}} = -k_D t \quad \text{IV.3}$$

Donde:

R_0 : % de retención de timol a tiempo cero

R_{∞} : % de retención de timol en el equilibrio

K_R : constante cinética de retención

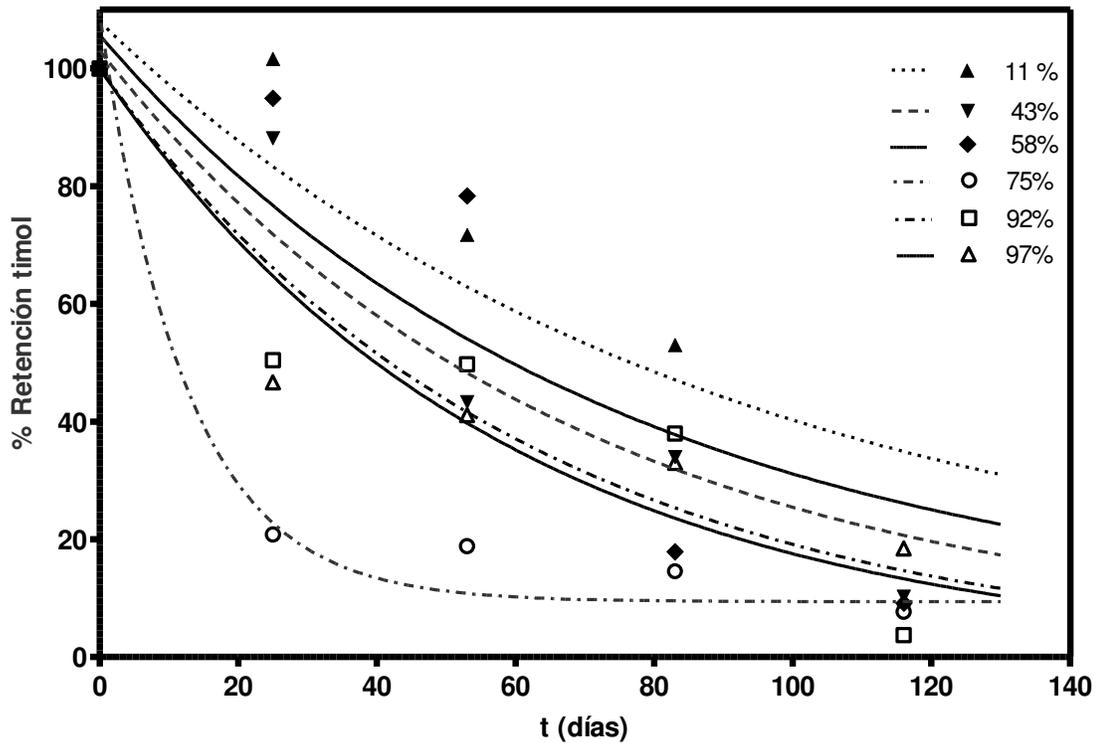


Figura IV.44. Retención (%) de timol encapsulado en HiCap 100 en función del tiempo a 25°C y a diferentes HR.

Resultados similares fueron hallados por Elizalde y col. (2002), Sutter y col. (2007), Prado y col. (2006) para β -caroteno encapsulado en matrices de trehalosa, manitol y PVP respectivamente.

Los valores de R_0 , R_∞ , k_D y las correspondientes desviaciones estándar (σ_{R_0} , σ_{R_∞} and σ_{k_D}) se muestran en la Tabla IV.12. Los coeficientes de correlación (R^2) entre los valores experimentales y aquellos predichos, utilizando la Ecuación IV.3 fueron altos excepto a 58% de HR ($R^2= 0,783$)

Tabla IV.12. Parámetros que describen la retención de timol en HiCap 100 a 25°C, y diferentes HR.

Matriz	HR %	T_g (°C)	R₀±σ_{R0}	R_∞± σ_{R∞}	K_R±σ_{k_R}	R²
HiCap100	0	58±2	100±10	58±15	0,006±0,002	0,815
	11	55±1	94±9	44±6	0,011±0,007	0,805
	44	14±2	100±10	25±4	0,015±0,006	0,928
	58	-0,38±1	100±11	26±4	0,014±0,01	0,783
	75	-39±3	100±5	10±3	0,080±0,02	0,968
	92	-48±1	100±13	12±4	0,016±0,008	0,875
	97	-56±3	100±11	13±3	0,017±0,007	0,886

La velocidad de liberación de Timol (k_R) y la retención fue dependiente de la RH. El valor de R_∞ disminuyó a medida que aumentó la HR hasta 58%, mientras que entre 75 y 97% HR, no hubo diferencias significativas. Los valores de la constante cinética de degradación k_R fueron bajos a 11 y 43 % HR. Sin embargo, dichos valores se incrementaron notablemente entre 58 y 75 % de HR donde alcanzó su valor máximo, para luego presentar un descenso brusco entre 75 y 97 % de HR (ver Figura IV.45). Resultados similares fue hallado por otros investigadores. (Soottitantawat y col., 2005).

Esto podría ser explicado por el cambio de la estructura de la matriz (Ramoneda y col., 2011; Soottitantawat y col., 2004), mientras la estructura individual de la cápsula se mantenga intacta, se logra mantener una alta retención del volátil incorporado. A bajas HR la matriz permaneció en el estado vítreo mientras que a partir de 58% HR la matriz se plastificó por efecto del agua, paso al estado gomoso, la matriz adquirió mayor movilidad y entonces el timol puede difundir (Tabla IV.13). Justamente, a estas

HR se produjo el colapso estructural de la matriz, haciendo que la superficie efectiva disminuya y la liberación del timol también. En efecto a HR 11 y 44% las muestras estaban en el estado vítreo a 25° C mientras que a HR de 75 y 92% las matrices presentaron colapso estructural, con apariencia pegajosa y compacta tal como se evidencia en las micrografías electrónicas por SEM de los sistemas al finalizar el almacenamiento (Figura IV.46).

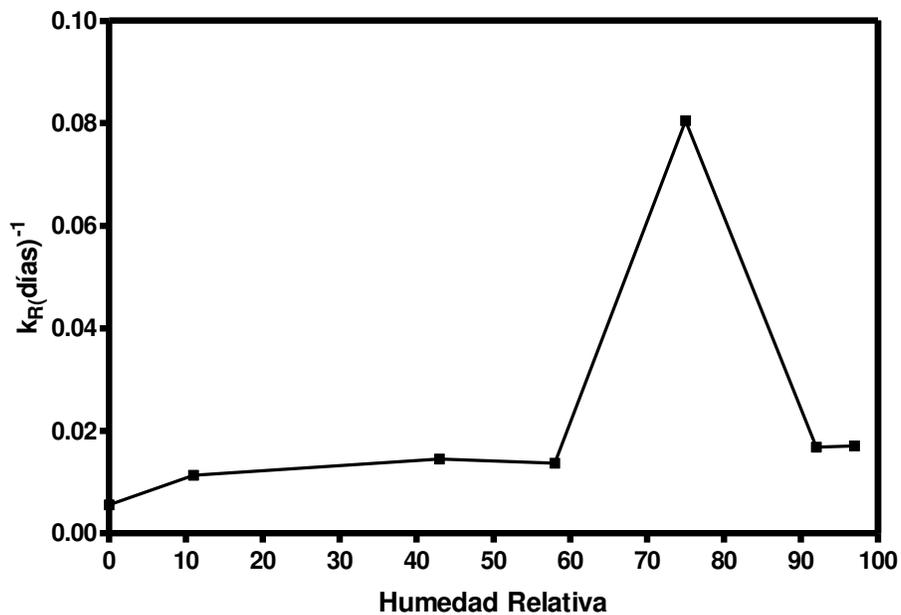


Figura IV.45. Efecto de la humedad relativa en la constante de liberación de timol (k_R) encapsulado en HiCap 100 a 25°C.

La retención de timol siguió una cinética de primer orden alcanzando un *plateau* cuyo valor fue dependiente de la HR del sistema, además, las constantes cinéticas de liberación de timol (k_R) fueron dependientes de la HR del sistema. Se puede concluir que la retención del timol está controlada por las características físicas de la matriz y su colapso estructural, que a su vez dependen de la HR del sistema.

Estos resultados pueden contribuir al conocimiento de los factores fisicoquímicos que afectan la retención de biomoléculas lábiles encapsuladas en matrices deshidratadas.

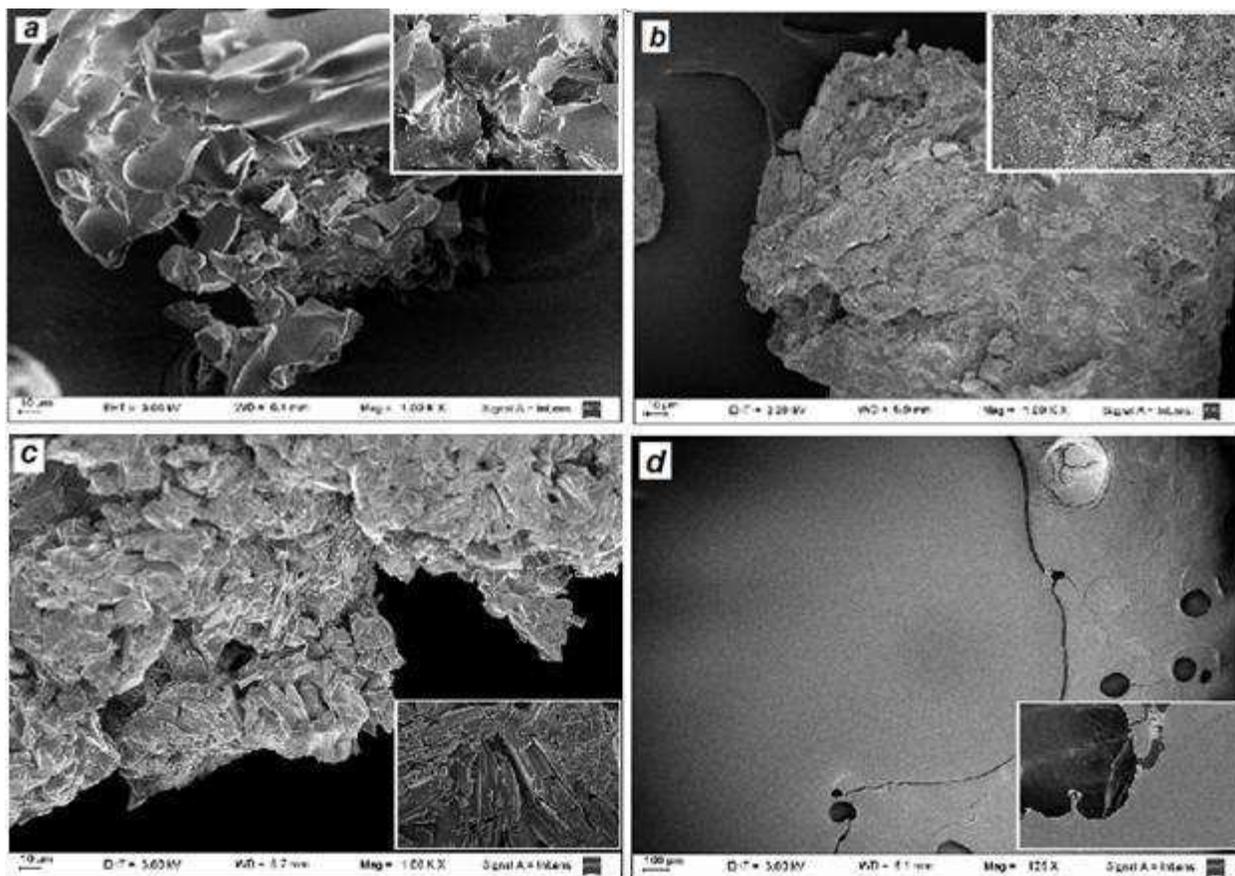


Figura IV.46. Micrografías electrónicas realizadas por SEM de timol encapsulado en Almidón HiCap 100 al final del almacenamiento a 25°C y a distintas HR: a) 43% x1000 y x5000 en el recuadro, b) 75% x1000 y x5000 en el recuadro, c) 92% x1000 y x5000 en el recuadro y d) 97% x125 y x1000 en el recuadro.

IV.2.5.3. Comparación de la estabilidad y liberación de los compuestos encapsulados en un sistema confinado (ciclodextrinas) y en una matriz continua.

En la Figura IV.47 está representado el porcentaje de timol (a) y cinalmadehído (b) liberado de sus respectivos complejos con las distintas ciclodextrinas estudiadas. Las flechas indican la HR para la cual el valor de T_g fue de 25°C (mostradas en las Figura IV.14).

Se puede observar que en el caso del timol (Figura IV.47a) la liberación es baja a HR bajas pasa por un máximo cerca de 75% HR y luego disminuye. El máximo de liberación para las CD modificadas (HPBCD y MBCD) ocurre a valores de HR para los cuales la T_g es menor que 25°C, cuando la muestra comienza a colapsar. Esto puede atribuirse a los efectos contrapuestos del efecto del agua en el equilibrio de formación del complejo (que favorece la liberación del ligando) y del colapso (Figura IV.18 b y c) que impone restricciones a la difusión del timol en el complejo. Para la BCD, que es de naturaleza cristalina, el comienzo de la liberación se produce a la HR 84%, que coincide con el aumento de la sorción de agua observada en la isoterma correspondiente (sección IV.2.2.3.1, Figura IV.20).

El cinamaldehído presenta un comportamiento distinto, ya que en las matrices de HPBCD y MBCD no ocurre su liberación hasta aproximadamente 75% HR, también en relación con el valor en que la T_g se hace menor que la temperatura ambiente. La diferencia entre ambos comportamientos se puede deber a la mayor solubilidad del

cinamaldehído en agua, que evita los efectos mencionados negativos del colapso para la difusión y liberación del ligando. La liberación de cinamaldehído de la BCD tiene una dependencia con la HR similar a la del timol, pero comienza a una HR un poco menor en las condiciones estudiadas.

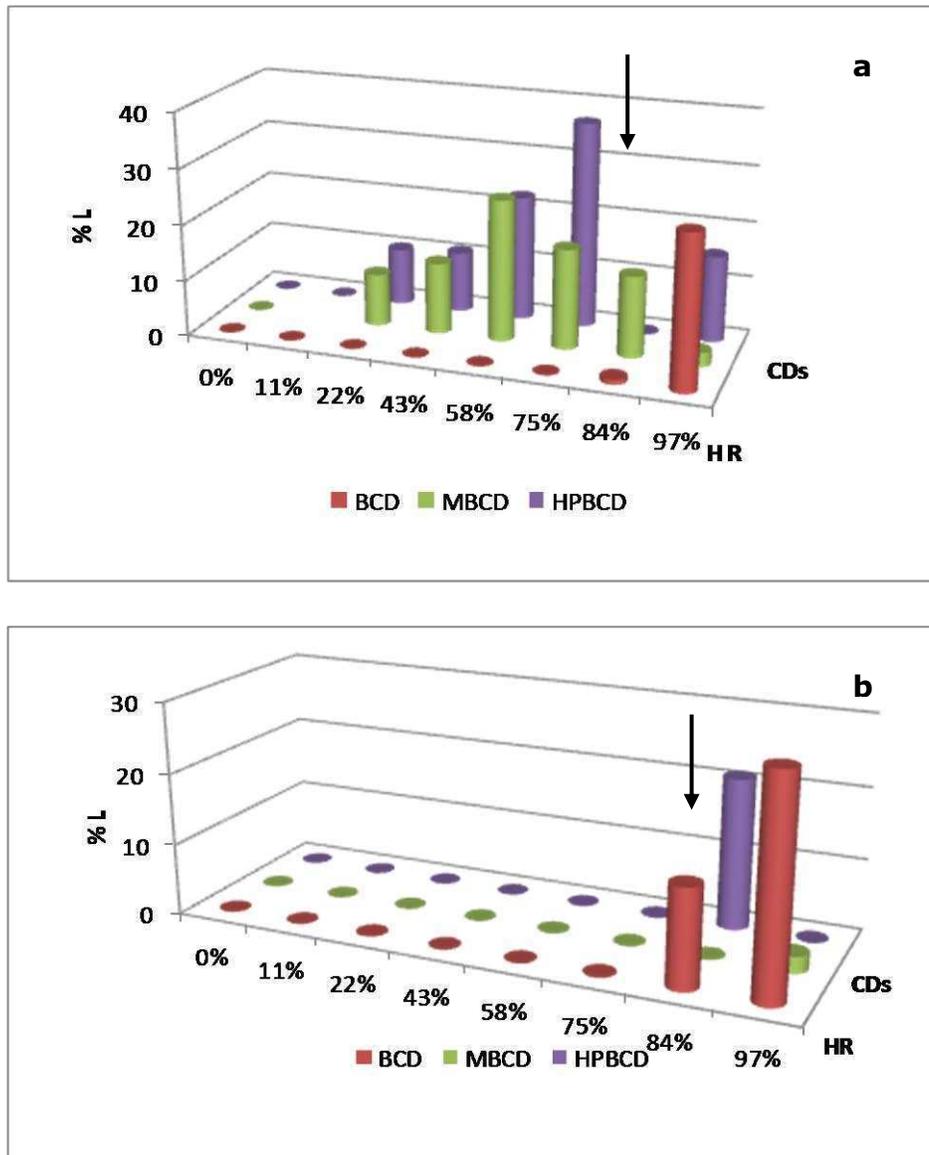


Figura IV.47. Porcentaje de ligando liberado (%L) de los complejos a los 3 meses de almacenamiento a 25° C en función de la Humedad Relativa (HR%), (a) timol y b (CINAM)

La liberación de timol de la matriz de almidón modificado está representada en la Figura IV.48 en función de la HR, donde se indican además los valores de $(T-T_g)$. En primer término, la fracción de timol liberada en esta matriz continúa fue mucho mayor que para los complejos de las CDs a una dada HR (comparar con la Figura IV.47 a y b).

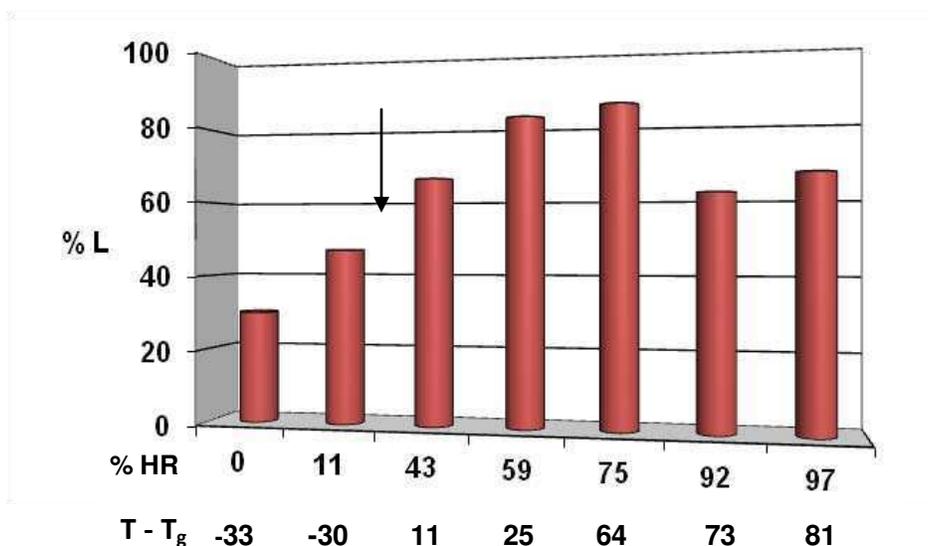


Figura IV.48 Efecto de la HR en el porcentaje de timol liberado (%L) del timol encapsulado en HiCap 100 a los 3 meses de almacenamiento y a 25° C.

A diferencia de lo que ocurre con los complejos de timol con las distintas CD, la liberación fue muy alta aún a las más bajas HR. Al igual que en los casos anteriores, la flecha indica las condiciones en las que los sistemas pasan a estar en estado gomoso. Como se ve, ocurre liberación de timol aun por debajo de T_g , cuando aún no se percibe colapso estructural en las muestras (Figura IV.26). A 43% de HR, que corresponde a $(T-T_g)$ solo de 11° C, la liberación de timol es cercana al valor máximo de pérdida, que ocurre a 75% HR, condición a la que el valor de $(T-T_g)$ es mayor que 50° C y al igual

que en el caso de los complejos de CD, la liberación disminuye a las más altas HR (84 y 97%). Sin embargo el efecto del colapso es menor en la matriz de HiCap que en los complejos de CD. Cabe señalar que el colapso es mucho mayor en los complejos de CDs que que en las matrices de HiCap, lo que se puede observar comparando las Figuras IV.18 y IV.26.

V. Resumen e integración de resultados

V.1. Estudio de los sistemas en solución

V.1.1. Solubilidad de fases

- Todos los diagramas de solubilidad mostraron que la solubilidad del timol y del CINAM se incrementa linealmente con la concentración de las CDs presentando un comportamiento denominado tipo A_L . Este incremento de solubilidad está relacionado con la capacidad de las CDs de incluir al timol y al CINAM. Además la pendiente de los diagramas para todas las CDs fueron menores que 1, lo que indicaría la formación de complejos 1:1.
- La BCD, la HPBCD y la MBCD mostraron afinidades diferentes hacia el timol y el CINAM, como lo indican los valores de K_e . Así, el grado de interacción de ambos compuestos con las diferentes CDs fue en el orden: BCD > MBCD > HPBCD. En efecto, las K_e de los complejos de BCD fueron mayores que los de MBCD, y estas mayores que las correspondientes a la HPBCD. Además, la magnitud de dicho incremento fue función de la temperatura y del compuesto incluido. Estos resultados se podrían atribuir a que la derivación de la CD con grupos alquilo o hidroxialquilo produce una barrera estérica que dificulta la entrada del huésped dentro de la cavidad de la CD y que este efecto es mayor cuando mayor es el tamaño del grupo adicionado.
- Los valores de las K_e de los complejos timol-BCD, fueron mayores que los correspondientes a los complejos CINAM-BCD a todas las temperaturas. Esto se atribuye a que el grupo lateral $C=C-CHO$ (del CINAM) posee un grupo insaturado

que hace que la molécula sea menos flexible lo que podría dificultar su entrada en las CDs.

- Esto permite concluir que las interacciones específicas ciclodextrina-huésped juegan un rol importante en el valor de las constantes de equilibrio así como los efectos estéricos (tamaño y geometría del ligando y la ciclodextrina).

V.1.2. Termodinámica del proceso de inclusión

El estudio de la termodinámica del proceso de inclusión permitió determinar la naturaleza de las interacciones entre la CD y el huésped.

- Los resultados hallados para los parámetros termodinámicos entalpía (ΔH^*), entropía (ΔS^*) y energía libre de Gibbs (ΔG^*) de formación de los complejos de inclusión muestran que ambos compuestos tienen una tendencia marcada a formar complejos de inclusión con todas las CDs (BCD, MBCD y HPBCD).
- Los valores negativos de entalpía indican que el proceso de interacción de las CDs con ambos huéspedes es exotérmico. Esto implica que las fuerzas impulsoras principales involucradas en la reacción de inclusión son las fuerzas de Van der Waals y la expulsión de moléculas de agua de alta energía del interior de la cavidad de la CDs.
- Los valores de entropía también fueron negativos en dicho proceso. Este comportamiento puede ser atribuido a que la formación del complejo causa una disminución de los grados de libertad translacionales y rotacionales del complejo

comparados a los de las moléculas libres, dando lugar a un sistema más ordenado

- Los valores negativos de la energía libre de formación de los complejos indican que el proceso de formación de los complejos es espontáneo.
- La magnitud de la contribución entrópica ($-T\Delta S^*$) y entálpica (ΔH^*) a la espontaneidad de la reacción (ΔG^* negativa) fue diferente para los diferentes complejos. Así, mientras que para la BCD y la MBCD los valores de ΔH^* fueron significativamente mayores que el término $T\Delta S^*$, para la HPBCD en cambio los valores de $-T\Delta S^*$ fueron aproximadamente igual a los valores de ΔH^* , lo que indica menor facilidad para la formación del complejo en este último caso.

V.2. Estudio de los sistemas sólidos

V.2.1. Propiedades térmicas de los sistemas estudiados

- La desaparición completa de los picos de fusión térmicos de las moléculas huésped (CINAM y timol) cuando fueron examinadas como complejos indica que los complejos se formaron.
- Los termogramas de la CDs mostraron que mientras la BCD es cristalina la MBCD y la HPBCD son amorfas presentado T_g .
- La inclusión del huésped en MBCD o HPBCD produjo una disminución significativa de los valores de T_g , lo cual indica que en presencia de los huéspedes se producen modificaciones estructurales que afectan las características físicas del

sistema. En efecto, se verificó que a 25° C a HR superiores a 75% HR se produce el colapso estructural de los complejos de dichas CDs, y a 84 y 97% se perdió la estructura por completo, volviéndose líquido, lo cual ya es visible en las fotos (Figuras IV.18 y IV.19 b y c).

- La determinación de los termogramas durante el almacenamiento permitió determinar la cantidad de timol o CINAM liberado del complejo en función del tiempo.

V.2.2. Propiedades de sorción de agua de las ciclodextrinas y sus complejos

- La isoterma de sorción de la BCD presentó un perfil trifásico presentando un *plateau* 75% HR, lo que indica la formación de un hidrato cristalino estable de 10,5 de la BCD. Más allá de 75% HR cantidad de agua adsorbida aumenta rápidamente hasta llegar a un valor de 12.5 moles de agua por mol de BCD.
- Los complejos de BCD-Timol y BCD-CINAM mostraron un perfil de sorción similar a la BCD. Sin embargo, la cantidad de agua absorbida a una dada HR fue menor. De hecho, estos complejos forman hidratos con 7 moléculas de agua, en el caso del complejo con cinamaldehído y 8,5 moléculas para el caso del complejo con timol.
- Esto confirmó que la formación de complejos de timol o cinamaldehído con BCD implica el desplazamiento de moléculas de agua del interior de la cavidad de la CD.

- Las isothermas de sorción de agua de la HPBCD y la MBCD presentaron un perfil sigmoideo, lo que refleja sus características amorfas.
- La presencia del ligando no afectó significativamente las isothermas de sorción de la MBCD y la HPBCD.

V.2.3. Propiedades de sorción de agua de la matriz continua.

- Las isothermas de sorción de agua de los sistemas HiCap 100 y timol- Hicap 100 presentaron un perfil sigmoideo.
- El método de secado afecta las propiedades de sorción de las matrices. Así, los valores del contenido de agua de la matriz liofilizada fueron significativamente mayores que los correspondientes a matriz secada por aspersión a la misma HR.
- La presencia de timol modificó las propiedades de sorción de la matriz de HiCap liofilizada especialmente a bajas HR.
- El modelo de GAB describió adecuadamente las isothermas de sorción de todos los sistemas estudiados.

V.3. Caracterización de los sistemas en estado sólido

- El uso de SEM, DSC, XRD y FTIR-ATR permitió elucidar de una manera profunda las interacciones en estado sólidas de los distintos sistemas entre el timol y el CINAM con las CDs utilizadas, y sugieren la formación de nuevas fases sólidas,

algunas en el estado amorfo, aportando fuertes evidencias la formación de complejos de inclusión.

V.4. Estabilidad de los sistemas estudiados

V.4.1. Cinética de liberación del huésped de los complejos de ciclodextrina

- La cantidad liberada de huésped (timol o cinamaldehído) de sus respectivos complejos de inclusión fue función de la HR, de las características estructurales de la CD y huésped y del tiempo de almacenamiento.
- El timol y el CINAM se liberaron de la BCD solo a 84 y 97% de HR.
- Los complejos de timol-MBCD y timol HPBCD presentaron un comportamiento totalmente diferente a la de la BCD, ya que aún a bajas HR el timol se liberó de la CD. A un dado tiempo de almacenamiento, el % liberado se incrementó al aumentar la HR de almacenamiento.
- La liberación del CINAM de los complejos, CINAM-MBCD y CINAM-HPBCD presentó un comportamiento similar al de los complejos CINAM-BCD. En efecto, en el caso de los complejos CINAM-MBCD, luego de 3 meses de almacenamiento, se liberó un 3% de CINAM a 97% de HR y de un 30 % a 84% de HR luego de 6 meses de almacenamiento. El % L de CINAM liberado de los complejos CINAM-HPBCD hasta 3 meses de almacenamiento fue muy bajo y sólo después de 3 meses el % liberado se incrementó abruptamente a 97 y 75 % de HR.

- Estas diferencias de comportamiento son ocasionadas por la diferente estructura química, que presentan el timol y el CINAM, lo que ocasiona diferencias en su hidrofobicidad y características estéricas.
- Estos resultados muestran que tanto las CDs naturales (BCD) o modificadas (MBCD y HPBCD) pueden mantener alojados en su anillo al huésped, durante largos períodos de tiempo. Dicho tiempo es función de la HR de almacenamiento, la naturaleza de la CD y el ligando. Además se observa que el CINAM permaneció encapsulado durante largos períodos de tiempo en el interior.

V.4.2. Estabilidad del timol encapsulado en la matriz de HiCap 100

- La retención de timol siguió una cinética de primer orden alcanzando un *plateau* cuyo valor fue dependiente de la HR del sistema.
- Las constantes cinéticas de retención de timol (k_D) fueron dependientes de la HR del sistema y de las características físicas de la matriz.
- Se puede concluir que la retención del timol está controlada por las características físicas de la matriz y su colapso estructural, que a su vez dependen de la HR del sistema.

V.4.3. Comparación de la cinética de liberación del timol encapsulado en un sistema confinado (ciclodextrinas) y en una matriz continua.

La liberación de timol de la matriz de almidón modificado, al igual que en el caso de las CDS, fue función de la HR %, sin embargo existen diferencias significativas entre las CDs y la matriz continua. En primer término, la fracción de timol liberada en esta matriz continua fue mucho mayor que para los complejos de las CDs a una dada HR (2 ó 3 veces) y la liberación fue muy alta aún a las más bajas HR (a diferencia de lo que ocurre con los complejos de timol con las distintas CDs). Al igual que para MBCD e HPBCD la liberación se incrementa abruptamente cuando los sistemas pasan a estar en estado gomoso. La máxima liberación ocurre a 75% HR, condición en que el valor de $(T-T_g)$ es alto, mayor que 50°C. Además, al igual que en el caso de los complejos de las CDs, la liberación disminuye a las más altas HR (84 y 97%) cuando los sistemas colapsan y entonces se restringe la difusión del timol hacia el medio.

V.4.4. Relación entre propiedades termodinámicas (K_e) de los complejos en solución y la estabilidad (cinética de liberación del ligando) de los mismos en estado sólido

Se trató de establecer si existía una vinculación entre el comportamiento de los complejos en solución y en estado sólido. Con tal objetivo se relacionaron las constantes termodinámicas de formación de los complejos y la cinética de liberación del huésped (% L) en estado sólido. En La Figura V.1 a y b se muestra el porcentaje de ligando liberado a cada HR en función del ΔG ($-RT \ln K_e$). En el caso de los complejos

del timol a bajas HR (22%, 43% y 58%) se observa que existe una correlación entre el % liberado y el ΔG (Figura V.1 a) de cada matriz. En efecto, cuanto más negativo es ΔG menor es el % L. A HR superiores a 75 % HR (84 y 97%) no se verifica esta correlación. Esto puede atribuirse a los efectos contrapuestos del efecto del agua en el equilibrio de formación del complejo (que favorece la liberación del ligando) y del colapso, que impone restricciones a la difusión del timol en el complejo. Para la BCD, que es de naturaleza cristalina, el comienzo de la liberación se produce a la HR 84%, que coincide con el aumento de la sorción de agua observada en la isoterma correspondiente.

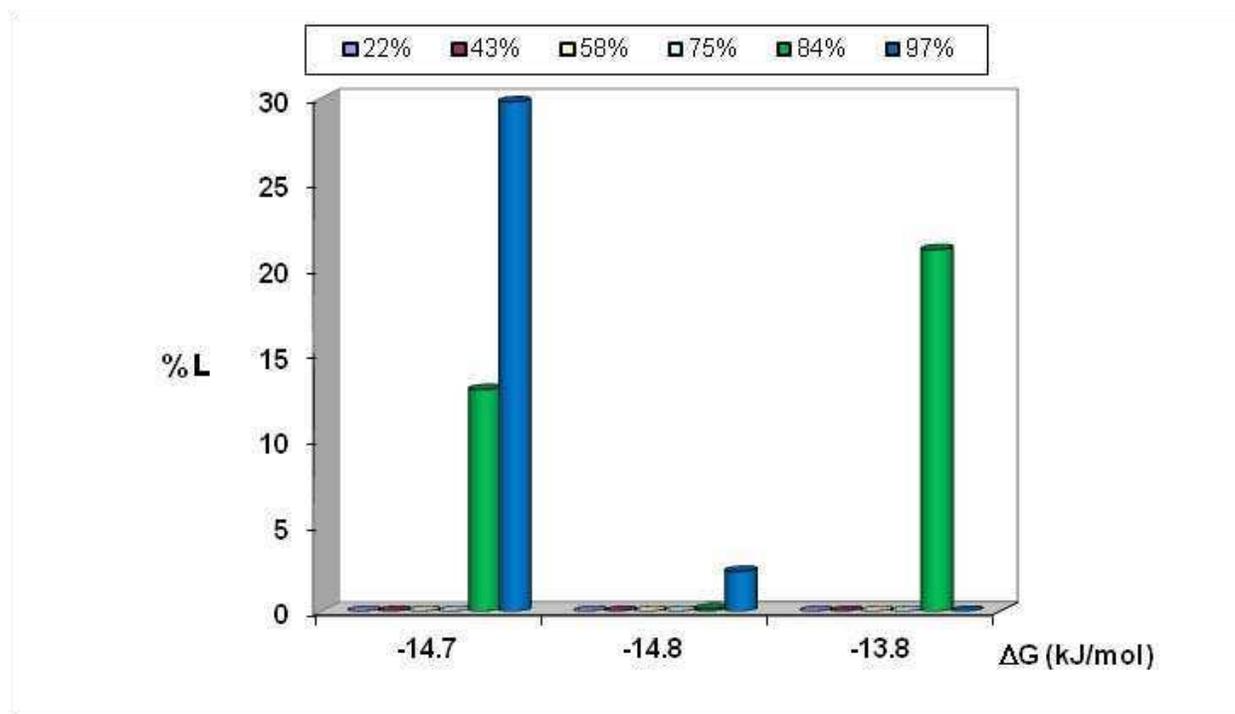
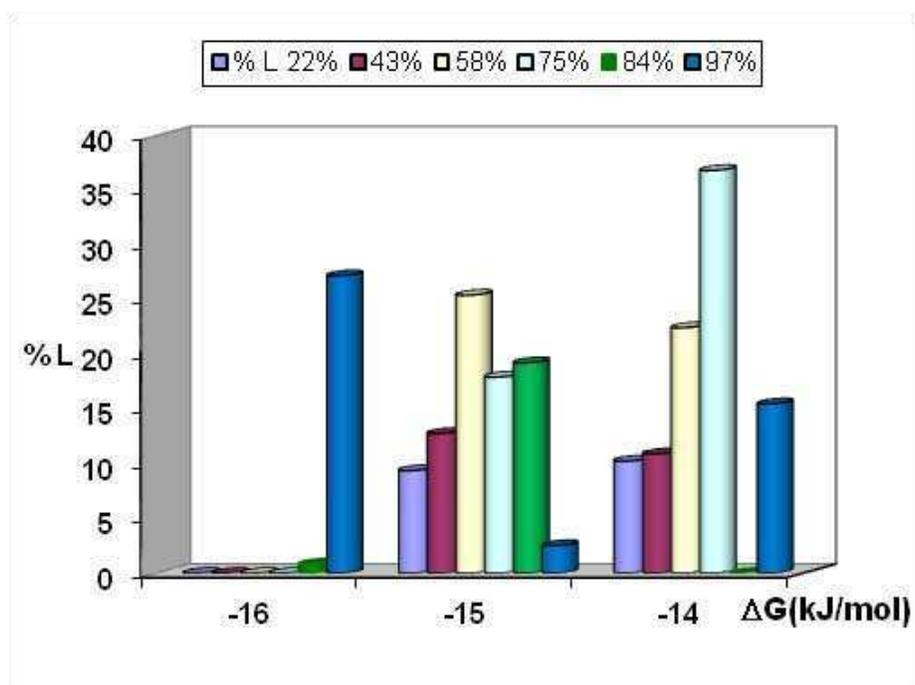


Figura V.1. Porcentaje liberado a los 3 meses (%L) de almacenamiento a 25° C en función del ΔG ($-RT \ln K_e$) a diferentes HR y 25° C a) timol y b) cinamaldehido .

VI. Conclusiones

La formación de los complejos de 2 compuestos hidrofóbicos (timol y cinamaldehído) con una CD natural (BCD) y dos de sus derivados solubles (MBCD y HPBCD) fue confirmada a través de la utilización de las técnicas descritas en esta tesis que permitieron la caracterización fisicoquímica de los mismos.

El estudio de solubilidad de fases permitió determinar la estequiometría, las constantes termodinámicas y los parámetros termodinámicos: entalpía (ΔH^*), entropía (ΔS^*) y energía libre de Gibbs (ΔG^*) de formación de los complejos de inclusión. La estequiometría de los complejos fue en todos los casos 1:1.

Mediante estos estudios se determinó, por ejemplo, que si bien la MBCD y la HPBCD poseen mejores propiedades solubilizantes, la BCD fue la que mostró la mayor afinidad por los huéspedes analizados de complejación ($> K_e$), y mayor retención aún a humedades relativas altas (hasta 84%)

La determinación de las propiedades de hidratación de los complejos, CDs y la matriz continua, en combinación con las térmicas, permitió concluir que la BCD y sus complejos son cristalinos, mientras que las CDs modificadas (MBCD y HPBCD) y sus complejos correspondientes son amorfos y presentan una transición vítrea bien

definida. La matriz continua por su parte, presentó un comportamiento similar al de MBCD e HPBCD.

El uso de SEM, DSC, XRD y FTIR-ATR permitió confirmar de una manera más profunda la existencia de interacciones en el estado sólido, entre los huéspedes (timol y CINAM) con las diferentes CDs y además permitió evidenciar la formación de nuevas fases sólidas.

La cantidad liberada de huésped (timol o cinamaldehído) de sus respectivos complejos de inclusión fue función de la HR, de las características estructurales de la CD y el huésped y del tiempo de almacenamiento.

En los complejos de la BCD, que son cristalinos y no colapsan, la liberación se produce sólo a partir 84% HR, que coincide con el aumento de la sorción de agua observada en la isoterma. En el caso de los complejos del timol con MBCD e HPBCD la liberación del timol se incrementa y luego disminuye como consecuencia del colapso estructural de los complejos. El cinamaldehído presentó un comportamiento distinto, ya que en las matrices de HPBCD y MBCD no ocurre su liberación hasta aproximadamente 75% HR. La diferencia entre ambos comportamientos se puede deber a la mayor solubilidad del cinamaldehído en agua que evita los efectos mencionados negativos del colapso para la difusión y liberación del ligando.

La fracción de timol liberada en la matriz continua del almidón modificado HiCap fue mucho mayor que para los complejos de las CDs a una dada HR y la liberación fue muy alta aún a las más bajas HR. La liberación se incrementa abruptamente cuando los sistemas pasan a estar en estado gomoso y luego disminuye a las más altas HR cuando el sistema colapsa y entonces se restringe la difusión del timol hacia el medio.

En síntesis, la liberación de los huéspedes de las CDs y del timol de la matriz continua estuvo determinada por las propiedades de sorción de agua y térmicas del sistema que a su vez determinan las características físicas de la misma.

El estudio de los complejos en solución permite determinar la estequiometría y si es posible la formación del complejo. La determinación de las constantes termodinámicas es un paso previo importante para establecer las potenciales aplicaciones en la liberación controlada de fármacos, colorantes o sabores. Sin embargo, como no es cinético, sino termodinámico, no da información de la estabilidad del sistema ni aún a altas HR, donde se esperaría que exista una correlación entre K_e y el % L. En nuestro caso los efectos de no equilibrio y el colapso de la estructura, no permite establecer correlaciones con las constantes termodinámicas (K_e) del sistema líquido. A pesar de ello, es de hacer notar que en el caso de la BCD, tiene una K_e mayor y en ella se produce la liberación de los huéspedes estudiados recién a valores de HR de 84%.

Los resultados de esta tesis demuestran que la formación de complejos de inclusión produce importantes modificaciones físico-químicas en el compuesto incluido. Esto afecta la estabilidad y la biodisponibilidad del huésped. De esta manera, mediante el control de esos aspectos, los factores relevantes para el diseño de procedimientos de encapsulación, estabilización y liberación controlada de sabores, pigmentos y otros aditivos alimentarios pueden ser controlados. Dichos factores son de gran interés en las industrias de alimentos, farmacéuticas, cosméticas y de biotecnología.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Referencias Bibliográficas

- Ablett, S.; Drake, A.; Izzard, M. y Lillford, P.**, 1993. Studies of the glass transition in malto-oligomers. Cap. 9. En: "The Glassy State in Foods", pp. 189-206, J.M. Blanshard y P.J. Lillford (Ed.), *Nottingham University Press*, Loughborough.
- Aguilera, J. M.; Levi, G., y Karel, M.**, 1993. "Effect of water on glass transition and caking of fish protein hydrolyzates". *Biotechnol. Prog.*, 9: 641-645.
- Almeida, R. y Cabral-Marques, H.**, 2004. "Pulmonary administration of beclomethasone: α -cyclodextrin complex" In Duchêne, D. (ed.), *Proceedings of the 12th International Cyclodextrin Symposium*, de Santé, Montpellier, France, APGI Publishing, 889-892.
- Ahlneck, C. y Zografí, G.**, 1990. "The molecular basis of moisture effects on the physical and chemical stability of drugs in the solid state". *Int. J. Pharm.* 62: 87-95.
- Akiyama, Y. y Miyao, K.**, 1979. "Microencapsulation of royal jelly". Jpn. Kokai JP 77 80 463.
- Al Omari, M. M.; Zhugul, M. B.; Davies, J. E. D. y Badwan, A. A.**, 2007. "Thermodynamic enthalpy-entropy compensation effects observed in the complexation of basic drug substrates with β -cyclodextrins" *J. Incl. Phenom Macrocycl Chem.* 57: 379-384.
- Angell, W. F. y France, P. A.**, 2001. "Detergent composition having granular cyclodextrin". *PCT Int Appl WO 01 18,163*.
- Anglea, S.; Karathanos, V., y Karel, M.**, 1993. "Low temperature transitions in fresh and osmotically dehydrated plant materials". *Biotechnol. Prog.*, 9, 204-209.
- Arcila-Lozano, C. C.; Loarca-Piña, G.; Lecona-Urbe, S. y González de Mejía, E.**, 2004. "El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes". *ALAN* 54: 100-111.
- Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R. y Simal-Gándara, J.**, 2009. "A review on the use of cyclodextrins in foods" *Food Hydrocolloids.* 23: 1631-1640.
- Atwood, J. L.** 1990. "Inclusion phenomenon and molecular recognition". New york: Plenum.
- Bardi, L.; Mattei, A.; Steffan, S. y Marzona, M.**, 2000. "Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with beta-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability". *Enzyme Microb Technol.* 27, 709-713.
- Barr, R. C. y Spach, M. S.**, 1978. "Inverse calculation of QRS-T epicardial potentials from body surface potential distributions for normal and ectopic beats in the intact dog" *Circ. Res.* 42: 661-675.

- Basan, H.; Günden, N.; Ertaş, N. y Tevfik, M.**, 2001. "Quantitative determination of piroxicam in a new formulation (piroxicam- α - cyclodextrin) by derivative UV spectrophotometric method and HPLC" *J Pharm Biomedical Anal*, 26: 171-178.
- Beddow, J. K.**, 1986. "Recent applications of morphological analysis. Particle characterization in technology. Morphological analysis" *Third Ed. CRC Press*, Florida, 149-122.
- Bell, L.**, 1996. "Nonenzymatic browning in reduced-moisture amorphous systems as impacted by water activity and glass-rubber transition". Poster presentado en ISOPOW VI Meeting, Santa Rosa, California, Marzo 2-8.
- Bell, L., y Hageman, M.**, 1994. "Differentiating between the effects of water activity and glass transition dependent mobility on a solid state chemical reaction: aspartame degradation". *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2398-2401.
- Bellows R., y King C.**, 1973. "Product collapse during freeze drying of liquid foods". *AIChE Symp. Ser.*, 69, (132), 33-41.
- Bender, M. y Komiyama, M.**, 1978. "Cyclodextrin chemistry-reactivity and structure, concepts in organic chemistry" (Editors: Hafner, K.; Lehn, J. M.; Rees, C. W.; Schleyer, P.; Trost, B. M. y Zahradnik, R.) Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
- Benesi, H. A. y Hildebrand, J. H.**, 1949. "A spectrophotometric investigation on the interaction on the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons" *J Am Chem Soc*, 71: 2703-2707.
- Beristain, C. I.; Vazquez, A.; Garcia, H. S. y Vernon-Carter E. J.**, 1996. "Encapsulation of orange peel oil by cocrystallization" *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29: 645-647.
- Bizot, H.**, 1983. "Using the GAB model to construct sorption isotherms" In "*Physical Properties for Foods*". Eds Jowit, R. y col. Applied Science, London, 43 - 44.
- Bonnet, P.**, 2001. "Etude par modélisation moléculaire de dimères de cyclodextrins et de leurs complexes d'inclusion" Thèse en Cotutelle Université d'Orleans, Universidad Autónoma de Barcelona. Orleans.
- Boquet, R.; Chirife, J. e Iglesias, H. A.**, 1978. "Equations for fitting water sorption isotherms of food. Part 2. Evaluation of various two-parameters models". *Journal Food Technology*, 13, 319-323.
- Botelho, M. A.; Nogueira, N. A; Bastos, G. M.; Fonseca, S. G.; Lemos, T. L.; Matos, F. G.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V. S. y Brito, G. A.**, 2007. "Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens" *Braz J Med Biol Res* 40: no.3 Ribeirão Preto Mar.

- Bruker Optics**. 2009. Application Note # AN-75E. website: www.brukeroptics.com
- Buera, M., y Karel, M.**, 1995. "Effect of physical changes on the rates of nonenzymic browning and related reactions". *Food Chem.*, 52: 167-173.
- Buschmann, H. J. y Schollmayer, E.** 2002. "Application of ciclodextrins in cosmetic products: a review" *J. Cosmet. Sci.*, 53, 185-191.
- Buttler, I. S., y Harrod, J. F.** 1992. "Quimica Inorganica. Principios y aplicaciones". Addison-Wesley Iberoamericana, Capitulo 6.
- Cabral-Marques, H. M.**, 1994. "Preparation of complexes. Evidence for complex formation" *Rev Port Farm*, XLIV: 157-163.
- Cabral-Marques, H. M. y Almeida, R.**, 2009. "Optimisation of spray-drying process variables for dry powder inhalation (DPI) formulations of corticosteroid/cyclodextrin inclusion complexes" *Eur J Pharm Biopharm* 73: 121–129.
- Cabral-Marques, H. M.**, 2010. "A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles" *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 313–326.
- Cardona, S.; Schebor, C.; Buera, M.; Karel, M. y Chirife, J.**, 1997. "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.
- Carlotti, M.; Sapino, S.; Cavalli, R.; Trotta, M.; Trotta, F.; Martina, K.**, 2007. "Inclusion of cinnamaldehyde in modified γ -cyclodextrins" *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57: 445-450.
- Chadha, R.; Kashid, N. y Saini, A.**; 2004. "Account of analytical techniques employed for the determination of thermodynamics of inclusion complexation of drugs with cyclodextrins". *J. Sci. Ind. Res.*, 63: 211–229.
- Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K.**, 2005. "Cyclodextrins in drug delivery: An updated review" *AAPS PharmSciTech*, 6: 329-357.
- Chang, Y. I. y Reineccius, G.**, 1990. "Interaction of β -cyclodextrin with Enantiomers of Limonene and Carvone" *Journal of Food Science*, 55: 1686-1688.
- Chang Y. P.; Cheah P. B. y Seow C. C.** 2000. "Plasticizing-antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state". *Journal of Food Science*, 65 (3), 445-451.
- Charumanee, S.; Titwan, A., Sirithunyalug, J.; Weiss-Greiler, P.; Wolschann, P.; Viernstein, H. y Okonogi, S.**, 2006. "Thermodynamics of the encapsulation by cyclodextrins" *J Chem Technol Biotechnol*, 81: 523-529.

- Chen, M.; Diao, G. y Zhang, E.**, 2006. "Study of inclusion complex of β -cyclodextrin and nitrobenzene" *Chemosphere*, 63: 522–529.
- Chittiteeranon, P.; Soontaros, S. y Pongsawasdi, P.**, 2007. "Preparation and characterization of inclusion complexes containing fixolide, a synthetic musk fragrance and cyclodextrins". *J Inc Macrocycl Chem*, 57: 69-73.
- Connors, K.**, 1997. "The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution" *Chemical Review, American Chemical Society*, 97: 1325-1357.
- Cortes, M. E.; Sinisterra, R. D.; Avila-Campos, M. J.; Tortamano, N. y Rocha, R. G.**, 2001. "The Chlorhexidine: beta-cyclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation". *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 40: 297-302.
- Cosentino, S.; Tuberoso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E. y Palmas, F.**, 1999. "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils" *Letters in Applied Microbiology*, 29: 130-135.
- Crupi, V.; Ficarra, R.; Guardo, M.; Majolino, D.; Stancanelli, R. y Venuti, V.**, 2007. "UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with β -cyclodextrins" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44: 110-117.
- Cserháti, T y Forgács, E.** 2003. Cyclodextrins in Chromatography. *Royal Society in Chemistry*. Capítulo 1, pág. 7.
- De Marco, P. V. y Thakkar, A. L.**, 1970. "Cyclohepta -amylose inclusion complexes. A proton magnetic resonance study" *Journal Chemical Society, Chemical Communications*, 1: 2-4.
- Di Pasqua, R.; Betts, G.; Hoskins, N.; Edwards, M.; Ercolini, D. y Mauriello, G.**, 2007. "Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 4863–4870.
- Dodziuk H.**, 2006. Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications. *Ed. H. Dodziuk, Wiley-vch, Weinheim*.
- Dos Santos, C.; Mazzobre, M. F.; Elizalde, B. y Buera, M. P.**, 2007. "Influencia de modificaciones de β -ciclodextrina sobre su interacción con el agua y ligandos de distinta estructura" In: Alimentos Ciencia e Ingeniería de alimentos (ISSN: 1390-2180). 16: 71-73.
- Duchêne, D. y Wouessidjewe, D.**, 1990. "Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives" *Drug Dev Ind Pharm*, 16: 2487-2499.
- Dziezak, J. D.**, 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 4:136-159.

- Elizalde, B. E.; Herrera, L. y Buera, P.,** 2002. "Retention of β -Carotene encapsulated in a trehalose-based matrix as affected by water content and sugar crystallization". *J. Food Sci.* 57: 3039-3045.
- Erden, N. y Çelebi, N.,** 1988. "A study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin" *International Journal of Pharmaceutics*, 48: 83-89.
- Fennema, O.,** 1996. Water and Ice. En: "Food Chemistry", 3rd edition, Fennema, O. (Ed.), Marcel Dekker, New York.
- Fereidoon, S. y Xiao-Qing, H.,** 1993. "Encapsulation of Food Ingredients" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6): 501-547.
- Fernandes, C.M., Vieira, M.T., Veiga, F. J. B.,** 2002. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine–cyclodextrins inclusion compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15: 79–88.
- Flink, J.,** 1983. "Structure and structure transitions in dried carbohydrate materials. En: Physical Properties of Food". Eds. Peleg y Bagley. Inc Westport, CT.: AVI Publishing Co. pp. 473-521.
- Franks, F.,** 1994. "Long term stabilization of biological". *Biotech*, 12: 253-256.
- Fujioka, K.; Kurosaki, Y.; Sato, S.; Noguchi, T. y Yamahira Y.,** 1983. "Biopharmaceutical study of inclusion complexes. I. Pharmaceutical advantages of cyclodextrin complexes of bencyclane fumarate" *Chem Pharm Bull*, 31: 2416-2423.
- Fujiwara, T.; Yamazaki, M.; Tomizu, Y.; Tokuoka, R.; Tomita, K.; Matsuo, T.; Suga, M. y Saenger, W.,** 1983. "The Crystal structure of a new form of β -cyclodextrin water inclusion complexes" *Nippon Kagaku Kaishi*, 181-187.
- Furmaniak, S.; Terzyk, A.P.; Gołembiewski, R.; Gauden, P.A. y Czepirski, L.** 2009. "Searching the most optimal model of water sorption on foodstuffs in the whole range of relative humidity". *Food Res. Int.* 42, 1203–1214.
- Gao, S. y Wang, L.,** 1998. "Application of cyclodextrin in environmental science". *Huanjing Kexue Jinzhan.* 6, 80–86.
- Giordano, F.; Novak, C., y Moyano, J. R.,** 2001. "Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds" *Thermochimica Acta*, 380: 123 – 151.
- Goubet, I.; Le Quere, J. L. y Voilley, A.,** 1998. "Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state" *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 48: 1981–1990.
- Greenspan L.,** 1977. "Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions" *J. of Res. Of the Natl. Bureau of Standards*, 81A: 89-102.

- Hara, H. y Hashimoto, H.** 2002. "Antimicrobial and insect-repellent cyclodextrin films". Jpn. Kokai JP 2002029901.
- Harabagiu, V.; Simionescu, B. C.; Pinteala, M.; Merrienne, C.; Mahuteau, J.; Guégan, P. y Cheradame, H.**, 2004. "Synthesis and characterization of persilylated cyclodextrins" *Carbo Polym*, 56: 301-311.
- He, Y.; Fu, P.; Shen, X. y Gao, H.**, 2008. "Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy" *Micron*, 39: 495-516.
- Hedges, A.R.**, 1998. "Industrial applications of cyclodextrins" *Chem Rev*, 98: 2035-2044.
- Hedges, A. y McBride, C.**, 1999. "Utilization of β -cyclodextrin in Food". *Cereal Foods World*, 44 (10): 700-704.
- Hernandez-Sanchez, Pilar**, 2011. "Encapsulacion de aceite de clavo para su aplicación en la industria alimentaria". Tesis presentada a la Universidad Catolica San Antonio, Murcia, España.
- Higuchi, T. y Connors, K. A.**, 1965. "Phase-solubility techniques" *Adv Anal Chem Instr*, 4: 117-212.
- Hioki, Z.**, 1977. "Constraints on the Mixing Angle between Ordinary and Heavy Leptons in a (V-A) Model" *Prog Theor Phys*, 58: 1859-1868.
- Hirayama F. y Uekama K.**, 1987. "In Cyclodextrins and their Industrial Uses" Duchêne, D., Ed.; Editions de Santé: Paris; Capítulo 4: 131-172.
- Iglesias, H. A.**, 1975. "Isotermas de sorción de agua en remolacha azucarera y análisis del fenómeno de sorción de agua en alimentos". Tesis, F.C.E. y N.
- Imdorf, A.; Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Maquelin, C.**, 1995. Apilife VAR: a new varroacide with thymol as the main ingredient. *Bee World*, 76 (2): 77-83.
- Irie, T. y Uekama, K.**, 1999. "Cyclodextrins in peptide and protein delivery". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 36, 101-123.
- ISP**, International Specialty Products, 2009. "CAVAMAX Cyclodextrins forming and analyzing drug inclusion complexes". Página web: <http://online1.ispcorp.com/Brochures/Pharma/CavamaxBulltn.pdf> *Pharmaceutical Technical Bulletin*.
- Jackson, L. S. y Lee, K.**, 1991. "Microencapsulation in the food industry". *Lebensmittel-Wissenschaft unn Technology*. 24, 289-297.

- Jain, A.C. y Adeyeye, M.C.**, 2001. Hygroscopicity, phase solubility and dissolution of various substituted sulfobutylether beta-cyclodextrins (SBE) and danazol-SBE inclusion complexes. *Int J Pharm*, 212:177–186.
- Jiang, S.; Li, J. y Jiang, Z.**, 2010. "Inclusion reactions of β -cyclodextrin and its derivatives with cinnamaldehyde in *Cinnamomum loureirii* essential oil" *Eur Food Res Technol*, 230: 543-550.
- Jones, S. P.; Grant, D. J. W.; Hadgraft, J.; Parr, G. D.**, 1984. Cyclodextrins in the pharmaceutical sciences. Part I: Preparation, structure and properties of cyclodextrins and cyclodextrin inclusion compounds. *Acta Pharm. Technol.*, 30: 213-223.
- Jouppila, K.**, 1999. "Crystallization of amorphous carbohydrates: Studies on lactose and starch". Helsinki, Finlandia.
- Junco, S.; Casimiro, T.; Ribeiro, N.; Nunes da Ponte, M. y Cabral Marques, H. M.**, 2002. "A comparative study of naproxen- β -cyclodextrin complexes prepared by conventional methods and using supercritical carbon dioxide" *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 44: 117-121.
- Jung, T. H.; Ha, H. J. y Kwak, H. S.**, 2008. "Development of cholesterol-reduced mayonnaise with crosslinked α -cyclodextrin and added phytosterol". *Korean J. Food Sci. animal Res.* 28, 211-217.
- Karathanos, V.; Mourtzinou, I.; Yannakopoulou, K. y Andrikopoulos, N.**, 2007. "Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin" *Food Chem*, 101: 652-658.
- Karatsu, M.**, 1992. "Antibacterial stretch packaging films for food". *Jpn. Kokai JP 04359029*.
- Karmas, R.; Buera, M. P., y Karel, M.**, 1992. Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 873-879.
- Kawashima, K.**, 1980. "Prevention of discoloration of food colorants". *Jpn. Kokai JP 8071464*.
- Kim, H. O. y Hill, R. D.**, 1984. "Modification of wheat flour dough characteristics with cyclodextrins". *Cereal Chemistry*, 61, 406–407.
- Kizil, R.; Irudayaraj, J. y Seetharaman, K.**, 2002. "Characterization of Irradiated Starches by Using Ft-Raman and FTIR Spectroscopy" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3912-3918.
- Koehler, J. E.; Saenger, W. y van Gunsteren, W. F.**, 1988. Conformational differences between α -cyclodextrin in aqueous solution and in crystalline form: a molecular dynamics study. *J. Mol. Biol.*, 203:241–250.

- Kordali, S.; Cakir, A.; Ozer, H., Cakmakci, R.; Kesdek, M., Mete, E.** 2008. "Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene" *Bioresource Technology*, 99: 8788–8795.
- Kwak, H. S.; Kim, J. H.; Choi, H. J. y Kang, J.,** 2004. "Immobilized β -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk". *Arch. Pharmacol. Res*, 27: 873-877
- Labuza, T.; Acott, K.; Tatini, S.; Lee, R. Y.; Flink, J. y McCall, W.,** 1976. "Water activity determination: a collaborative study of different methods" *Journal of Food Science*, 41: 910.
- Lederer, M. y Leipzig-Pagani, E.** 1996. "A simple alternative determination of the formation constant for the inclusion complex between rutin and β -cyclodextrin" *Analitica Chimica Acta*, 329: 311-314.
- Lee, J. H. y Lee, M. J.** 2008. "Effect of drying method on the moisture sorption isotherms for *Inonotus obliquus* mushroom". *LWT - Food Science and Technology*, 41: 1478–1484.
- Lee, S. W.; Kim, M. G. y Kim C. K.,** 1999. "Encapsulation of ethanol by spray drying technique: effects of sodium lauryl sulphate" *International Journal of Pharmaceutics*, 187: 193–198.
- Levine, H. y Slade, L.,** 1986. "Polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products". *Carbohydr. Polym.*, 6: 213-244.
- Levine, H. y Slade, L.** 1988. "(Collapse) phenomena - a unifying concept for interpreting the behaviour of low moisture foods". En: *Food Structure - Its Creation and Evaluation* Ed. Blanshard y Nitchell. Butterworths, London. pp.149-180.
- Levine, H. y Slade, L.,** 1992. "Glass transitions in foods". En: *Physical chemistry of foods* Eds. Schwartzberg y Hartel. Dekker, New York. pp. 83-221.
- Li, X.; Jin, Z. y Wang J.,** 2007. "Complexation of allyl isothiocyanate by α - and β -cyclodextrin and its controlled release characteristics" *Food Chem*, 103: 461-466.
- Lindner, K. y Saenger, W.** 1978. " β -cyclodextrin dodecahydrate: Crowing of water molecules whitin a hydrofobic cavity" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 17: 694-695.
- Lindner, K. y Saenger, W.,** 1982. "Crystal and molecular structure of cyclohepta-amylose dodecahydrate" *Carbohydrate Res: Molecular dynamics simulations and quantum chemical*, 99: 103-115.

- Lo Meo, P.; D'Anna, F.; Riela, S.; Gruttadauria, M. y Noto, R.**, (2003) "Spectrophotometric study on the thermodynamics of binding of α - and β -cyclodextrin towards some *p*-nitrobenzene derivatives" *Org. Biomol. Chem*, 1: 1584-1590.
- Locci, E.; Lai, S.; Piras, A.; Marongiu, B. y Lai, A.**, 2004. ¹³C-CPMAS and ¹H-NMR Study of the inclusion complexes of β -cyclodextrin with carvacrol, thymol, and eugenol prepared in supercritical carbon dioxide" *Chem Biodiversity*, 1: 1354-1366.
- Loftsson, T. y Brewster, M. E.**, 1996. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization" *J of Pharmaceutical Sciences*, 85(10): 1017-1025.
- Loftsson, T., y Stefánsson, E.**, 1997. "Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye". *Drug. Devel. Ind. Pharm.*, 23, 473-481.
- Loftsson, T. y Masson, M.**, 2004. "The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs" *STP Pharma Sciences*, 14, 35-43.
- Lomauro, C.J.; Bakshi, A.S. y Labuza, T.P.**, 1985. "Evaluation of food moisture isotherm equations. 1: fruit, vegetable and meat products". *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 18 (2), 111-117.
- Lucas-Abellán, C., Gabaldón-Hernández, J. A., Penalva, J., Fortea, M. I. y Núñez-Delgado, E.**, 2008. "Preparation and Characterization of the inclusion complex of chlorpyrifos in cyclodextrins to improve insecticide formulations" *J Agric.Food Chem.*, 56, 8081-8085.
- Madene, A.; Jacquot, M.; Scher, J. y Desobry, S.**, 2006. "Flavour encapsulation and controlled release a review" *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1-21.
- Manolikas, M. K. y Sawant, M. R.**, 2003. "Study of solubility of isoproturon by its complexation with β -cyclodextrin" *Chemosphere*, 51(8): 811-816.
- Marini, A.; Berbenni, G.; Bruni, V.; Massarotti, P. y Mustarelli, P.**, 1995. "Dehydration of the cyclodextrins: A model system for the interactions of biomolecules with water" *Journal of Chemical Physics*, Vol. 103 No. 17.
- Maroulis, Z. B.; Tsami, E.; Marinos-Kouris, D. y Saravacos, G. D.** 1988. "Applications of the GAB model to sorption isotherms of fruits". *Journal of Food Engineering*, 7, 63-78.
- Martin Del Valle, E. M.**, 2004. "Cyclodextrins and their uses: a review" *Process Biochem*, 39: 1033-1046.
- Martinez, A.**, 2001. "Aceites Esenciales". Artículos en página web: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

- Mazzobre, M. F.; Longinotti, M. P.; Buera, M. del Pilar; Corti, H. R.**, 2001. "Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems, in relation to biomaterial stabilization. 1. Water sorption behaviour and ice crystallization/melting" *Cryobiology*, 43: 199-210.
- Mazzobre, M. F.; Elizalde, B. E.; Dos Santos, C.; Ponce-Cevallos, P. A. y Buera, M. P.**, 2009. "Nanoencapsulation of food ingredients in cyclodextrins: Effect of water interactions and ligand structure" *Functional Food Product Development*. Wiley Blackwell, Oxford, U.K. In press.
- McMullan, R. K.; Saenger, W.; Fayos, J. y Mootz, D.**, 1973. "Topography of cyclodextrin inclusion complexes: Part I. Classification of crystallographic data of α -cyclodextrin inclusion complexes" *Carbohydr. Res*, 31: 37-46.
- Miller, L. A.; Carrier, R. L. y Ahmed, I.**, 2007. "Practical considerations in development of solid dosage forms that contain cyclodextrin" *J Pharm Sci*, 96: 1691-1707.
- Moreira da Silva, A.; Empis, J. M. y Texeira-Diaz, J.**, 2002. "Inclusion of carvone enantiomers in cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin): thermal behaviour and H•D and D•H exchange" *Carbohydrate Research*, 337: 2501-2504.
- Mourtzinis, I.; Kalogeropoulos, N.; Papadakis, S. E.; Konstantinou, K. y Karathanos, V.T.**, 2008. "Encapsulation of Nutraceutical Monoterpenes in β -Cyclodextrin and Modified Starch" *Journal of Food Science*, 73: 89-94.
- Mulinacci, N.; Melani, F.; Vincieri, F. F.; Mazzi, G. y Romani, A.**, 1996. "H-NMR NOE and molecular modelling to characterize thymol and carvacrol β -cyclodextrin complexes" *International Journal of Pharmaceutics*, 128: 81-88.
- Muñoz de la Peña, A.; Ndou, T. T.; Anigbogu, V. C. y Warner, I. M.**, 1991. "Solution studies of beta-cyclodextrin pyrene complexes under reversed-phase liquid chromatographic conditions: effect of alcohols as mobile phase comodifiers" *Anal Chem*, 63: 1018-1023.
- Mura, P.; Bettinetti, G. P.; Manderioli, A.; Faucci, M. T.; Bramanti, G. y Sorrenti, M.**, 1998. "Interactions of ketoprofen and ibuprofen with β -cyclodextrins in solution and in the solid state" *International Journal of Pharmaceutics*, 166: 189-203.
- Nakamoto, K.**, 1986. "Infrared and Raman Spectra". Wiley-Interscience, New York, 4ta. Edición.
- Nelson, K. y Labuza, T.**, 1994. "Water activity and food polymer science: implications of state on Arrhenius and WLF models in predicting shelf life" *J. Food Eng*, 22: 271-287.
- Ning L. I.; Zhang Y. H.; Wu Y. N.; Xiong X.L. y Zhang Y. H.**, 2005. "Inclusion complex of trimethoprim with cyclodextrin". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39: 824-829.

- Numanoğlu, U.; Şen, T.; Tarimci, N.; Kartal, M.; Koo, O. M. y Önyüksel, H.**, 2007. "Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: Linalool and benzyl acetate" *AAPS PharmSciTech*, 8(4): 34-42.
- Núñez-Delicado, E.; Serrano-Megías, M.; Pérez-López, A. J.; López-Nicolás, J. M.**, 2005. "Polyphenol oxidase from dominga table grape". *J. Agri. Food Chem.*, 53, 6087-6093.
- Onwulata, C. I.** 2011. "Encapsulation of New Active Ingredients". *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3:183–202.
- Osella, C. A.**, 2002. "Pan sin gluten: Influencia de la composición y de la historia térmica de los constituyentes sobre sus propiedades termofísicas". Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral y Universidad de Buenos Aires.
- Ota, T. y Takeda, F.**, 1981. "Cyclodextrins as cheese additives". *Jpn. Kokai JP8175060*.
- Partanen, R.; Ahro, M.; Hakala, M.; Kallio, H. y Forssell, P.**, 2002. "Microencapsulation of caraway extract in β -cyclodextrin and modified starches" *Eur Food Res Technol*, 214: 242-247.
- Pinto, L. M.; Fraceto, L. F.; Santana, M. H.; Pertinhez, T.; Oyama, S. y de Paula, E.**, 2005. "Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39: 956-963.
- Polyakov, N. E; Leshina, T. V; Hand, E. O.; Petrenko, A. y Kispert, L.**, 2004a. " β -Ionine cyclodextrins inclusion complexes H NMR study and photolysis" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 161: 261-267.
- Polyakov, N. E; Leshina, T. V; Hand, E. O. y Kispert, L. D.**, 2004b. "Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: NMR, EPR, and Optical Studies" *Free Radical Bio Med*, 36, 872-80.
- Ponce-Cevallos, P. A.; Buera, M. P. y Elizalde, B. E.**, 2010. "Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability" *J. Food Eng*, 99: 70-75.
- Popplewell, L. M.; Black J. M.; Norris, L. y Porzio, M.**, 1995. Encapsulation systems for flavors and colors. *Food Technol.* 49(5): 76-78.
- Prado, S. M.; Buera, M. P. y Elizalde, B. E.** (2006). "Structural collapse prevents B-carotene loss in a supercooled polymeric matrix". *J. Agric. Food Chem.*, 54: 79-85
- Pralhad, T., y Rajendrekumar, K.**, 2004. "Study of freeze-dried quercetin cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34: 333–339.

- Prasad, N.; Strauss, D. y Reichart, G.,** 1999. Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals. *European Patent*. 1,084,625.
- Ramonedá, X. A.; Ponce-Cevallos, P. A.; Buera, M. P. y Elizalde, B. E.,** 2011. "Degradation of β -carotene in amorphous polymer matrices. Effect of water sorption properties and physical state". *Journal of Food, Science and Agriculture*, 91: 2587–2593.
- Rao, B. P., Zurréis, S. y Balasangameshwer, C. N.,** 2006. "Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- β -ciclodextrina y β -ciclodextrina de rifampicina". *Ars Pharm*, 47: 37-59.
- Regiert, M.,** 2007. "Oxidation-stable linoleic acid by inclusion in α -cyclodextrin" *Journal Inclusion Phenomenon Macrocyclic Chemistry*, 57: 471-474.
- Reineccius, G. A.,** 1991. "Carbohydrates for flavor encapsulation" *Food Technology*, 45: 144-147.
- Reineccius, T. A.; Reineccius, G. A. y Peppard, T. L.,** 2004. "Utilization of β -cyclodextrin for improved flavor retention in thermally processed foods" *J. Food Sci*, 69(1): 58-62.
- Reineccius, T. A.; Reineccius, G. A. y Peppard, T. L.** 2005. "The effect of solvent interactions on α -, β -and γ -cyclodextrins/flavour molecular inclusion complexes". *J. Agric. Food Chem.*, 53, 388-392.
- Rekharsky, M. V y Inoue, Y.,** 1998. "Complexation thermodynamics of cyclodextrins" *Chem Rev*, 98: 1875-1918.
- Ribeiro, L. S.; Ferreira, D. y Veiga, F.,** 2003. "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.
- Roller, S. y Seedhar, P.,** 2002. "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.
- Roos, Y.,** 1992. "Reaction kinetics and thermodynamics in food systems; Part II, Phase transitions and transformations". En: *Handbook of Food Engineering*. Eds. Lund y Heldman. New York, Marcel Dekker.
- Roos Y.** 1995. "Phase Transitions in Food". New York, NY: Academic Press.
- Roos Y.** 1995b. "The physical state of amorphous materials". En: *Phase Transitions in Foods*. Ed. Taylor. Academic Press, New York. Pp. 26-34.
- Roos Y. y Himberg M. J.,** 1994. "Non-enzymatic browning behaviour, as related to glass transition of a food model at chilling temperatures" *J. Agric. Food Chem.*, 42 (4): 893-898.

- Roos Y. and Karel M**, 1991. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. *J Food Sci* 56: 38-43.
- Roos, Y.; Jouppila, K. y Zielasko.**, 1996. "Non-enzymatic browning-induces water plasticization" *J. Thermal Anal.*, 47: 1437-1450.
- Saenger, W.; Jacob, J.; Gessler, K.; Steiner, T.; Hoffmann, D.; Sanbe, H.; Koizumi, K.; Smith, S. M. y Takaha T.**, 1998. "Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues-Beyond the Doughnut" *Chem Rev*, 98(5): 1787-1802.
- Sangüesa, F. J.**, 2007. "El análisis mineralógico mediante difracción de RX (DRX) y sus aplicaciones" *Revista Tierra y Tecnología*, 32: 75-86.
- Scalia, S.; Villani, S. y Casolari, A.** 1999. "Inclusion complexation of the sunscreen agent 2-ethylhexyl-p- dimethylaminobenzoate with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: effect on photostability". *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 1367–1374.
- Scatchard, G.**, 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad.Sci*, 51: 660-672.
- Schebor, C.**, 2000. "Estudios sobre la transición vítrea y la estabilidad de biomateriales de baja humedad" Tesis de Doctorado, UBA, Bs.As.
- Schulz, H., Krüger, H., Steuer, B. y Pank, F.**, 1999. "Bestimmung von Inhaltsstoffen des Majorans (*Origanum majorana* L.) mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie" *Z Arzn Gew Pfl*, 4: 62-67.
- Schulz, H. y Baranska, M.**, 2009. Capítulo 12: "Fruits and vegetables" pág. 321-353. En "Infrared spectroscopy for food quality analysis and control" Editor: Da-Wen, S.
- Shaw, P. E. y Wilson, C. W.**, 1983. "Debittering of citrus juices with cyclodextrin polymer". *J. Food Sci.* 48, 646-647.
- Singh, M.; Sharma, R. y Banerjee, U. C.**, 2002. "Biotechnological applications of cyclodextrins" Research Review Paper. *Biotechnol Adv*, 20: 341-359.
- Skoog, D.; Holler, J. y Nieman, T.**, 1992. "Principios de Análisis Instrumental" Mc Graw Hill, Quinta edición, Madrid.
- Slade L. y Levine, H.**, 1991. "Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30: 115-360.
- Specht, M.; Rothe, M.; Szente, L., y Szejtli, J.** 1981. "Removal of phenylalanine from protein hydrolysates". *Ger. Offen.* 147 615.

Sperling L. H., 1986. "Introduction to Physical Polymer Science". John Wiley y Sons, New York.

Soottitantawat, A.; Yoshii, H.; Furuta, T.; Ohgawara, M.; Forssell, P.; Partanen, R.; Poutanen, K. y Linko, P., 2004. "Effect of water activity on the release characteristics and oxidative stability of d-limonene encapsulated by spray drying" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5): 1269-1276.

Soottitantawat, A.; Takayama, K.; Okamura, K.; Muranaka, D.; Yoshii, H.; Furuta, T.; Ohgawara, M. y Linko, P., 2005. "Microencapsulation of *l*-menthol by spray drying and its release characteristics" *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6 (2): 163-170.

Sopade, P. A.; Halley, P. J.; D'Arcy, B. R.; Bhandari, B., y Caffin, N., 2004. "Dynamic and steady-state rheology of Australian honeys at subzero temperatures". *Journal of Food Process Engineering*, 27, 284–309.

Stancanelli, R.; Ficarra, R.; Cannava, C.; Guardo, M.; Calabro, M. L.; Ficarra, L., Ottan, R.; Maccari, R.; Crupi, V.; Majolino, D. y Venuti, V., 2008. "UV-vis and FTIR-ATR characterization of 9-fluorenon-2-carboxyester/(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin inclusion complex". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47: 704–709.

Staroszczyk, H., y Janas, P., 2010. "Microwave-assisted synthesis of zinc derivatives of potato starch". *Carbohydrate Polymers*, 80(3): 962-969.

Stuart, B., 2004. Chapter I: "Introduction" pp. 1-13. In "Infrared spectroscopy: fundamentals and applications". Wiley, Chichester (U.K).

Sukumar, D., Hemavathy, J. y Bhat, K., 2002. Moisture sorption studies on onion powder. *Food Chemistry*, 78 (4), 479-48.

Sutter, S.; Elizalde, B. E. y Buera, P., 2007. " β -carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion". *International Journal of Pharmaceutics*, 332: 45-54.

J. Szejtli et al., *Acta Chim. Acad. Sci., Hung.*, 101, 27 (1979).

Szejtli, J., 1982. "Cyclodextrins and their Inclusion Complexes" *Akademiai Kiado: Budapest*, 94-108; 115–122.

Szejtli, J., 1998. "Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry" *American Chemical Society*, 98: 1743-1753.

Szente, L., Szejtli, J. 1987. "Stabilization of flavors by cyclodextrins". Eds., *Flavor Encapsulation Am. Chem. Soc. Symp. S. Risch, S., Reineccius, G.* New Orleans: ACS. Series 370, 148–158.

- Szente, L. y Szejtli, J.**, 2004. "Cyclodextrins as food ingredients" *Trends in Food Sci and Technol*, 15: 137-142.
- Tananuwong, K. y Reid, D.**, 2004. "DSC and NMR relaxation studies of starch-water interactions during gelatinization". *Carbohydrate Polymers*, 58: 345-358.
- Tatsuya, S.**, 1999. "Stabilisation of fragrance in bathing preparations". *Japanese Patent 11,209,787*.
- Teixeira, M. I.; Andrade, L. R.; Farina, M. y Rocha-Leão, M. H. M.**, 2004. "Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying" *Material Science and Engineering*, 24: 653-658.
- Tokumura, T.; Ueda, H.; Tsushima, Y.; Kasai, M.; Kayano, M.; Amada, I. y Nagai, T.**, 1984. "Inclusion complex of cinnarizine with β -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state" *J Incl Phenom*, 2: 511-521.
- Tolaba, M.; Peltzer, M.; Enriquez, N. y Pollio, M. L.**, 2004. "Grain Sorption equilibria of Quinoa Grains" *Journal of Food Engineering*, 61: 36-371.
- Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabrò, M.L.; Stancanelli, R. y Ficarra, P.**, 2004. "Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin". *J Pharm Biomed Anal.*, 35(2): 379-387.
- Tong, L. H.**, 2001. "Cyclodextrin chemistry-theory and application" *Science Press*, Beijing, pp 163-176.
- Trinh, J.; Dodd, T. M.; Bartolo, R. y Lucas, J. M.**, 1999. "Cyclodextrin based compositions for reducing body odour". *US Patent 5,897,855*.
- Tsouroufis, S.; Flink, J. M., y Karel, M.**, 1976. "Loss of structure in freeze-dried carbohydrates solutions: Effect of temperature, moisture content and composition". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27, 509-519.
- Ubbink J., y Schoonman A.** 2003. "Flavor delivery systems" En: *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. on-line edition. Wiley, New York.
- Uekama, K. y Otagiri, M.**, 1987. "Cyclodextrins in drug carrier systems" *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 3: 1-40.
- Uekama, K.; Hirayama F e Irie T.**, 1998. "Cyclodextrin drug carrier systems" *Chem Rev*, 98: 2045-2076.
- Utsuki, T.; Brem, H.; Pitha, J.; Loftsson, T.; Kristmundsdottir, T.; Tyler, B. M. y Olivi, A.**, 1996. "Potentiation of anticancer effects of microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl α -cyclodextrin" *Journal of Controlled Release*, 40: 251-260.

- Van den Berg, C.**, 1981. "Water activity and its estimation in foods systems: Theoretical aspects" In L. y. S. Rockland, G. (Ed.), *Water Activity: Influences on Food Quality*. 1-61. New York: Academic Press.
- Vardar-Ünlü, G.; Candan, F.; Sokmen, A.; Dafereta, D.; Polissiou, M.; Sokmen, M. Donmez, E. y Tepe, B.**, 2003. "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.
- Veiga, F.; Teixeira-Dias, J. J. C.; Kedzierewicz, F.; Sousa, A. y Maincent, P.**, 1996. "Inclusion complexation of tolbutamide whit β -cyclodextrin and hidroxypropyl- β -cyclodextrin" *International Journal of Pharmaceutics*, 129: 63-71.
- Villiers**, 1891. Sur la fermentation de la féculé par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 112: 536-538.
- Vittadini, E. y Chinachoti, P.**, 2003. "Effect of physico-chemical and molecular mobility parameters on Staphylococcus aureus growth" *International Journal of Food Science & Technology*, 38 (8): 841-847.
- Wagner, C. W.; Wilson, C. W. y Shaw, P. E.** 1988. "Reduction of grape fruit bitter components by cyclodextrin polymers". *Journal of Food Science*, 53, 516.
- Waleczek, K. J.; Cabral Marques, H. M.; Hempel, B. y Schmidt, P. C.**, 2003. "Phase solubility studies of pure (-)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin" *Eur J Pharm Biopharm*, 55: 247-251.
- Walzel, P. y Furuta, T.**, 2011. "Morphology and Properties of Spray-Dried Particles", Ch 6 in "Modern Drying Technology, Volume 3: Product Quality and Formulation. Evangelos Tsotsas, Dr. Prof. Arun S. Mujumdar (eds).
- Wang, C. X. y Chen, Sh. L.**, 2005. "Fragrance-release property of β -cyclodextrin inclusion compounds and their application in aromatherapy" *Journal of Industrial Textiles*, 34(3): 157-166.
- Weisser, H.**, 1995. "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.
- White, G. y Cakebread, S.**, 1966. "The glassy state in certain sugar-containing food products" *J. Food Technol.*, 1:73.
- Williams, R. O.; Mahaguna, V. y Sriwongjanya, M.**, 1998. "Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46: 355-360.

- Winkler, R. G.; Fioravanti, S.; Ciccotti, G.; Margheritis, C. y Villa, M.,** 2000. "Hydration of β -cyclodextrin: A molecular dynamics simulation study" *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 14: 659-667.
- Wolf, W.; Spiess, W. E. L. y Jung, G.,** 1985. "Standardization of isotherms measurements (COST-Project 90 y 90 bis)". In D. Simatos and J. L. Multon eds, *Properties of Water of Foods*, (pp. 661-677), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Xie, Y.Zhou, H., Liang, X., He, B., Y Han, X.,** 2010. "Study on the morphology, particle size and thermal properties of vitamin A microencapsulated by starch octenylsuccinate". *Agricultural Sciences in China*, 9: 1058-1064.
- Yoshida, A.; Arima, H.; Uekama, K. y Pitha J.,** 1988. "Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of β -cyclodextrins" *Int J Pharm*, 46: 217-222.
- Youdim, K. A. y Deans S. G.,** 1999. "Beneficial effects of thyme oil on age-related changes in the phospholipids C20 and C22 polyunsaturated fatty acid composition of various rat tissues" *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of lipids*, 1438: 140-146.
- Yu, E. K. C.,** 1988. "Novel decaffeination process using cyclodextrins" *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28: 546-552.
- Yu, X.; Kappes, S. M.; Bello-Pérez, L. A. y Schmith, S. J.,** 2008. "Investigating the Moisture Sorption Behavior of Amorphous Sucrose Using a Dynamic Humidity Generating Instrument". *JFS E: Food Engineering and Physical Properties*, 73, 25-35.
- Yúfera, E. P.,** 2007. "Química Orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria", Editorial Reverte 1995, Tomo 2, España.
- Zhang, J. y Zografí G.** 2000. "The Relationship between "BET" – and "Free Volume" – Derived Parameters for water vapor absorption into amorphous solids". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, 1063-1072.
- Zhao, T.; Tamsamani, J. y Agarwal, S.,** 1995. "Use of cyclodextrin and its derivatives as carriers for oligonucleotide delivery". *Antisense Res* 5:185–92.