

**ENCAPSULAMIENTO DE BIXINA, NORBIXINA Y GERANIOL
POR β -CICLODEXTRINAS**

JONATHAN PAZ MONTOYA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2003.**

**ENCAPSULAMIENTO DE BIXINA, NORBIXINA Y GERANIOL
POR β -CICLODEXTRINAS**

JONATHAN PAZ MONTOYA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título
de Químico.**

Director

**RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ
Magíster en Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2003.**

Director _____
M. Sc RICARDO BENÍTEZ

Jurado _____
Dr. FABIO ANTONIO CABEZAS

Jurado _____
Mg. JORGE CARRERA

Fecha de sustentación: Popayán, 3 de diciembre de 2003.

Gracias a nuestro señor todo poderoso por permitirnos estar en la tierra cumpliendo nuestros sueños.

A mis padres por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A mis hermanas y sobrinos por su invaluable apoyo y permanente motivación.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Ricardo Benítez Benítez, Magíster en Ciencias químicas y profesor del departamento de química, Universidad del Cauca. Director del trabajo de grado, por sus valiosas orientaciones.

Miembros del grupo de investigación en Química de Productos Naturales. Universidad del Cauca, por la colaboración brindada durante el desarrollo del trabajo.

Todos los profesores del departamento de química de la Universidad del Cauca, por mostrarme los conocimientos en las diferentes áreas y permitir la formación de un nuevo investigador.

Compañeros del programa de química de la universidad del cauca y especialmente a Carlos Eduardo Ararat, por su colaboración en la realización de diferentes análisis en la Universidade de Estadual Paulista, Brasil.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GENERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. MARCO TEÓRICO	16
4.1 CICLODEXTRINAS	16
4.1.1 Propiedades químicas	17
4.1.2 Propiedades físicas	19
4.1.3 Complejación ciclodextrina – huésped	21
4.1.4 Especificaciones de SBE7 – β CD	25
4.2 AROMATIZANTES	26
4.2.1 Producción industrial y biogénica	27
4.2.2 Propiedades físicas y químicas de geraniol	28
4.2.3 Usos del geraniol	29
4.3 ACHIOTE	29
4.3.1 Toxicología	32

4.3.2	Uso del achiote (semilla)	33
4.3.3	Comercialización	33
4.3.4	Características físicas y químicas	34
4.3.5	Bixina y norbixina como pigmentos carotenoides	34
5.	PARTE EXPERIMENTAL	38
5.1	SOLVENTES E INSTRUMENTOS	38
5.2	EXTRACCIÓN DE BIXINA POR SOXHLET	40
5.3	EXTRACCIÓN DE NORBIXINA CON AGUA	41
5.4	EXTRACCIÓN DE BIXINA POR PERCOLACIÓN	42
5.5	EXTRACCIÓN DE NORBIXINA POR PERCOLACIÓN CON NaOH 0.1%	43
5.6	RECRISTALIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS	44
5.7	ENCAPSULAMIENTOS	45
5.7.1	Encapsulamientos de bixina.	45
5.7.2	Encapsulamientos de norbixina.	47
5.7.3	Encapsulamiento de geraniol.	49
6.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
6.1	ANÁLISIS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN	51
6.2	ANÁLISIS DE LA EXTRACCIÓN APOLAR DE <i>Bixa orellana</i>	53
6.3	ANÁLISIS DE LA EXTRACCIÓN POLAR DE <i>Bixa orellana</i>	59
6.4	CARACTERIZACIÓN DE GERANIOL	64
6.5	CARACTERIZACIÓN DE CICLODEXTRINA	68
6.6	ANÁLISIS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE ENCAPSULAMIENTO	73
6.7	ANÁLISIS DEL ENCAPSULAMIENTO DE BIXINA	75
6.8	ANÁLISIS DEL ENCAPSULAMIENTO DE NORBIXINA	82
6.9	ANÁLISIS DEL ENCAPSULAMIENTO DE GERANIOL	88

6.10 ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	93
6.11 ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE HUÉSPEDES Y COMPLEJOS	95
7. CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	103
ANEXOS	109

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Composición de las semillas de achiote	31
Tabla 2 Composición por partes de la semilla de achiote	32
Tabla 3 Interpretación de las bandas en el IR de EB1	54
Tabla 4 Interpretación de las bandas en el IR de EB2	60
Tabla 5 Interpretación de las bandas en el IR de geraniol	66
Tabla 6 Interpretación de las bandas en el IR de SBE7- β -CD	70
Tabla 7 Datos de encapsulamiento	73
Tabla 8. Estabilidad termo oxidativa de huéspedes y complejos a diferente tiempo	99

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclodextrina con “n” unidades de glucosa	16
Figura 2. Forma toroidal de una molécula de β -CD	18
Figura 3. Posición de los grupos OH de los carbonos 2 y 3	19
Figura 4. Dimensiones de las ciclodextrinas	20
Figura 5. Análisis termal de β - Ciclodextrinas	21
Figura 6. Ilustración de la inclusion de tolueno por una ciclodextrina	22
Figura 7. Geranio (<i>Pelargonium</i> sp)	26
Figura 8. Geraniol	28
Figura 9. Árbol de <i>Bixa orellana</i>	29
Figura 10. Fruto del árbol de <i>Bixa orellana</i>	30
Figura 11. Semillas de <i>Bixa orellana</i>	31
Figura 12. Estructura molecular de cis – bixina	34
Figura 13. Estructura molecular de cis – norbixina	34
Figura 14. Espectro Uv – Vis de EB1	53
Figura 15. Espectro IR de EB1	54
Figura 16. Cromatograma HPLC de EB1	56
Figura 17. Cromatograma HPLC de EB1 a 428nm	57
Figura 18. Foto de microscopia óptica 400X de EB1	57
Figura 19. Microscopia electrónica de barrido de EB1	58
Figura 20. Espectro Uv – Vis de EB2	59
Figura 21. Espectro IR de EB2	60
Figura 22. Cromatograma HPLC de EB2	62

Figura 23. Foto de microscopia óptica 400X de EB2	63
Figura 24. Microscopia electrónica de barrido de EB2	63
Figura 25. Espectro Uv – Vis de geraniol	64
Figura 26. Espectro IR de geraniol	65
Figura 27. Cromatograma HPLC de geraniol	67
Figura 28. Espectro Uv – Vis de SBE7- β -CD	68
Figura 29. Espectro IR de SBE7- β -CD	69
Figura 30. Cromatograma HPLC de SBE7- β -CD	71
Figura 31. Foto de microscopia óptica 100X de SBE7- β -CD	72
Figura 32. Foto de microscopia óptica 400X de SBE7- β -CD	72
Figura 33. Espectro Uv – Vis del complejo de bixina	75
Figura 34. Espectro IR del complejo de bixina	76
Figura 35. Espectro IR del complejamiento fallido de bixina (0.25:1)	77
Figura 36. Espectro IR del complejamiento fallido de bixina (0.5:1)	
78	
Figura 37. Cromatograma HPLC para el complejo de bixina	79
Figura 38. Cromatograma HPLC de ciclodextrina en el complejo de bixina	80
Figura 39. Foto microscopia óptica 400X del complejo de bixina (1:1)	82
Figura 40. Foto microscopia óptica 400X del complejo de bixina (0.1:1)	82
Figura 41. Espectro Uv – Vis del complejo de norbixina	82
Figura 42. Espectro IR del complejo de norbixina	83
Figura 43. Espectro IR del complejamiento fallido de norbixina (0.25:1)	84
Figura 44. Cromatograma HPLC para el complejo de norbixina	85
Figura 45. Cromatograma HPLC de ciclodextrina en el complejo de norbixina	86
Figura 46. Foto microscopia óptica 400X del complejo de norbixina (1:1)	87

Figura 47. Foto microscopia óptica 400X del complejo de norbixina (0.1:1)	87
Figura 48. Espectro Uv – Vis del complejo de geraniol	88
Figura 49. Espectro IR del complejo de geraniol	89
Figura 50. Cromatograma HPLC para el complejo de geraniol	90
Figura 51. Cromatograma HPLC de ciclodextrina en el complejo de geraniol	91
Figura 52. Foto microscopia óptica 400X del complejo de geraniol	92
Figura 53. DRX de ciclodextrina.	93
Figura 54. DRX de bixina	93
Figura 55. DRX del complejo de bixina	93
Figura 56. DRX de norbixina	94
Figura 57. DRX del complejo de norbixina	94
Figura 58. Comparación de los DSC de bixina, norbixina y ciclodextrina	95
Figura 59. Comparación DSC de todos los complejos	96
Figura 60. TOX inicial para huéspedes y ciclodextrina	97
Figura 61 TOX inicial para todos los complejos	97
Figura 62 TOX a 6 meses para huéspedes y ciclodextrina	98
Figura 63. TOX a 6 meses para todos los complejos	98

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Características de α , β , γ , Ciclodextrinas	109
Anexo 2. Curva de calibración en HPLC para geraniol	110
Anexo 3. Curva de calibración en HPLC para ciclodextrina	114
Anexo 4. Cálculos y resultado en los ensayos de acomplejamiento.	121

RESUMEN

El encapsulamiento de bixina, norbixina y geraniol por sulfobutil éter β -ciclodextrina, aumenta la solubilidad en agua, disminuye las pérdidas por volatilización, brinda protección contra los factores ambientales como luz directa del sol, oxígeno y exceso de calor, evitando de esta manera la rápida degradación de los huéspedes. Las moléculas colorantes a encapsular en esta investigación fueron extraídas del achiote (*Bixa orellana L*), usando dos métodos diferentes, percolación y soxhlet. Los encapsulamientos se realizaron con la técnica de inclusión en líquido con diferentes variables, de acuerdo con las características químicas de cada uno de los huéspedes. Los porcentajes de cuantificación fueron bastante satisfactorios, analizados por cromatografía líquida de alta resolución y gravimetría; además se caracterizaron por sus propiedades físicas y espectroscópicas, logrando estandarizar las condiciones de análisis. Finalmente se logró un aumento en la estabilidad de todos los encapsulados demostrándolo con calorimetría de barrido diferencial (DSC) y análisis térmico oxidativo (TOX).

INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas son en general oligosacáridos cíclicos que, compuestos de residuos de D-glucopiranosas conectados a través de enlaces alfa 1-4. Los miembros más comunes de la familia son las ciclodextrinas alfa, beta y gamma, formadas por seis, siete y ocho monómeros de glucosa respectivamente; obteniéndose mediante una actividad enzimática específica sobre la molécula del almidón, la cual se convierte en un material cristalino de un peso molecular y tamaño específico.

Las ciclodextrinas son moléculas cíclicas que tienen la habilidad de encapsular otras moléculas al interior de sus rígidas estructuras. La habilidad de estas inusuales moléculas de formar complejos de inclusión - los cuales pueden cambiar las propiedades físicas y químicas de sus moléculas huéspedes - ofrecen una variedad de potenciales usos en la industria de los alimentos. Se conoce que los aceites causantes del sabor y aroma de extracción natural consisten en mezclas de unos cuantos componentes hasta varios cientos de ellos. Muchos de estos pueden ser insolubles en agua o son susceptibles de volatilización, o ambos. La MICROENCAPSULACION o la combinación de estos aceites con las ciclodextrinas pueden reducir o eliminar la volatilidad y la susceptibilidad a la oxidación, así como frecuentemente mejoran la solubilidad acuosa del aceite, entre muchas otras ventajas.

La inclusión molecular en la cavidad de las ciclodextrinas proporciona protección contra los factores ambientales que pudieran perjudicar a las moléculas incluidas. Estas son usadas como aditivos o como ayuda para el procesamiento de alimentos. En esta investigación se encapsularon compuestos colorantes y aromatizantes de forma que el complejo de inclusión fuese funcional, es decir, que mejorase las propiedades y la biodisponibilidad de las sustancias, así como también, permitir un aumento en la comercialización de dichos productos al ser desde todo punto de vista de mejor calidad.

Para la microencapsulación a desarrollar se cuenta con los huéspedes Bixina y Norbixina, extraídos con solvente apolar y polar respectivamente del achiote (*Bixa orellana*), así como el compuesto aromatizante geraniol. El hospedador es un derivado de la β -ciclodextrina con mayor porcentaje de solubilidad en agua.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los alimentos han sido una preocupación constante de los seres humanos. El cuerpo necesita constantemente energía y agua, pero el proceso de proveer estos elementos en la forma de alimentos y bebidas involucran mucho más que la sola ingestión de calorías y líquidos. Se acostumbra a seleccionar alimentos y bebidas que nos agradan, muchas veces haciendo caso omiso del énfasis moderno de las necesidades nutricionales. Cuando se trata de aceptación de los alimentos por el consumidor final, su éxito depende en gran parte por sus propiedades organolépticas de sabor, color y aroma.

Una parte muy importante del crecimiento de la industria alimentaria es la demanda de alimentos con "sabor a hogar". El consumidor come cada vez más fuera de su casa, pero quiere que los alimentos tengan una calidad similar a la que se elaboran en su hogar, sin necesidad de emplear mucho tiempo para prepararlos. Sin embargo para satisfacer este "sabor a hogar" las industrias - grandes o pequeñas - emplean en su gran mayoría aditivos sintéticos o que aún siendo certificado su uso, todavía no se conoce con claridad su efecto en el metabolismo del consumidor y en muchos casos se modifican químicamente debido a factores metabólicos, causando diferente tipo de trastornos digestivos.

Actualmente existe una conciencia de consumir alimentos naturales, los consumidores cada vez más demandan productos "sanos" y leen cuidadosamente las etiquetas para estar seguros de que no se emplearon aditivos sintéticos.

Los colorantes y aromatizantes pueden ser de origen natural o formulaciones sintéticas; muchos de estos componentes son escasamente solubles en agua o son susceptibles a la desestabilización por oxidación, volatilización, o ambas, produciendo cambios en sus estructuras que impiden que dicho compuesto realice su papel en el alimento, o causan pérdida por imposibilidad de comercialización.

El bajo nivel económico que predomina entre los campesinos productores de achiote (*Bixa orellana*) en el departamento del Cauca, la falta de incentivos y programas especiales para la producción y comercialización, son algunas de las causas por las cuales se presentan pérdidas pre y post cosecha. Dichas materias primas se logran comercializar en estado fresco y sin ningún grado de transformación agroindustrial, y además desconociendo el gran valor agregado que se les podría dar si se llegan a industrializar.

Mediante el encapsulamiento con ciclodextrinas se lograría obtener un producto totalmente natural, con mayores posibilidades de solubilización en agua, protección contra los factores ambientales y mayor durabilidad. Este producto final con mejores características, tendrá un mayor valor y mayor demanda comercial, beneficiando inicialmente a los campesinos productores de colorantes y aromatizantes en el departamento del Cauca.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Encapsular con β -ciclodextrins los colorantes (Bixina y Norbixina), así como un aceite esencial (Geraniol) con el fin de mejorar su biodisponibilidad y aumentar su valor agregado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extraer y purificar Bixina y Norbixina a partir del fruto de Achiote (*Bixa orellana*), usando dos métodos diferentes, percolación y soxhlet.

Realizar el encapsulamiento en solución de Bixina, Norbixina y Geraniol con β - ciclodextrinas.

Cuantificar los porcentajes de inclusión empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y caracterizando todos los compuestos mediante espectroscopia infrarroja y espectrofotometría ultravioleta visible.

Analizar la estabilidad de los huéspedes y de los complejos de inclusión, de acuerdo a factores como termoestabilidad, solubilidad en agua y susceptibilidad a la oxidación.

3. JUSTIFICACIÓN

Con esta propuesta, se pretende crear una serie de productos, que teniendo como base, compuestos colorantes y aromatizantes de origen natural, satisfagan tanto al procesador de alimentos como al consumidor final en calidad, estabilidad y costo.

Es fundamental reconocer la técnica de microencapsulación como la forma más saludable y novedosa para preservar las sustancias inestables, puesto que el huésped no queda expuesto a la oxidación; Convirtiendo así una sustancia lábil en un producto con mejor perfil de color y aroma, Inigualable estabilidad y mayor vida útil. Los productos obtenidos bajo esta técnica están libres de riesgos microbiológicos y no requieren conservantes ni antioxidante extras que interfieran en la preparación de algunos alimentos. Los compuestos encapsulados minimizan el escape de sustancias volátiles y evitan así la contaminación de las instalaciones de producción. La densidad y tamaño de las partículas del complejo proveen una excelente fluidez en los sistemas de transporte y dosificación, sin despedir polvos y consecuentemente sin permitir pérdidas en la elaboración.

Por otra parte, si miramos el panorama socio-económico del productor de estas materias primas, mediante proyectos conexos derivados de esta propuesta inicial, se pueden emprender planes y programas cuyo objetivo sea el de mejorar la calidad de vida del productor Caucano mediante la compra de cosechas destinadas a la agroindustrialización de aditivos para alimentos, incentivar la producción de dichas materias primas en sus diferentes calidades y sobre todo generar una conciencia de que estos productos agrícolas pueden ser la fuente de recursos económicos y de bienestar de los diferentes agentes de la cadena agroindustrial (productor, transformador y consumidor final).

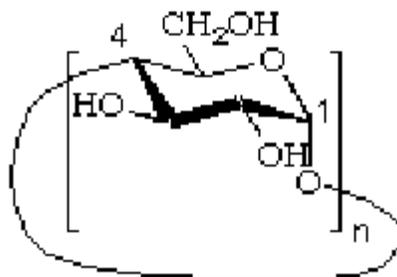
La realización de esta investigación, con evidentes proyecciones tecnológicas, permitirá un avance cualitativo en aspectos básicos relacionados con la industria de alimentos, tanto en sus aspectos de transformación de alimentos como de conservación de los mismos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 CICLODEXTRINAS

Cuando el almidón es expuesto a degradación enzimática por enzimas amilolíticas (e.g. α -amilasa), este resulta generalmente en pequeñas cadenas de sacáridos. Si, así mismo, el almidón es degradado por la enzima ciclodextrina Glucosiltransferasa (CGTasa), el producto primario del rompimiento de la cadena son oligoglucosidos circulares enlazados por $\alpha(1\rightarrow4)$, llamadas ciclodextrinas [Szejtli (1996), Fromming y Szejtli (1994)], ver figura 1. La formación de la ciclodextrina se origina de una reacción de transglucosilación intramolecular, sin participación de moléculas de agua [Larsen, 1998]¹.

Figura 1. Ciclodextrina con “n” unidades de glucosa.



Las ciclodextrinas (CDs) también conocidas como dextrinas de Schardinger o cicloamilosas, fueron primero aisladas por Villiers en 1891, y caracterizadas por Schardinger en 1904. Schardinger fue también responsable por el aislamiento del primer microorganismo (*Bacillus macerans* sp.) capaz de formar la enzima (CGTasa) [Szejtli, 1996].

¹ MADSEN, Ulrich. Production and characterization of modified cyclodextrins. University of Aalborg and Kansas. Estados Unidos, 2000, p. 1-1.

Las ciclodextrinas son capaces de formar compuestos de inclusion con varias moléculas, alterando así sus propiedades físicas/químicas. Hay tres ciclodextrinas bien conocidas producidas naturalmente α -, β -, γ -ciclodextrinas, que consisten de 6, 7, y 8 unidades de glucosa respectivamente².

Las ciclodextrinas han ganado mucha atención en el área de las drogas farmacéuticas por su mejoramiento en la solubilidad y o estabilidad de varias moléculas con actividad medicinal. Así mismo, la mayor parte de las aplicaciones de la ciclodextrina incluye sus usos en el campo de los alimentos, farmacia, textiles, papel, ciencias de la separación molecular (e.g. cromatografía, electroforesis y química analítica),y otras industrias [Szejtli (1994), Fromming y Szejtli (1994)].

Las ciclodextrinas que tienen más de 8 unidades de glucosa han sido reportadas por Szejtli y Larsen en 1996 y 1998 respectivamente, pero debido al bajo porcentaje de rendimiento y a la dificultad en la purificación, estas ciclodextrinas son menos caracterizadas y actualmente no tienen importancia en aplicaciones comerciales. Las ciclodextrinas con menos de seis unidades de glucosa en el anillo no han sido formadas enzimáticamente debido a razones estéricas, pero pueden ser obtenidas por síntesis química [Szejtli (1994), Fromming y Szejtli (1994)]. Al igual que las ciclodextrinas más grandes, estas también tienen un menor interés comercial³.

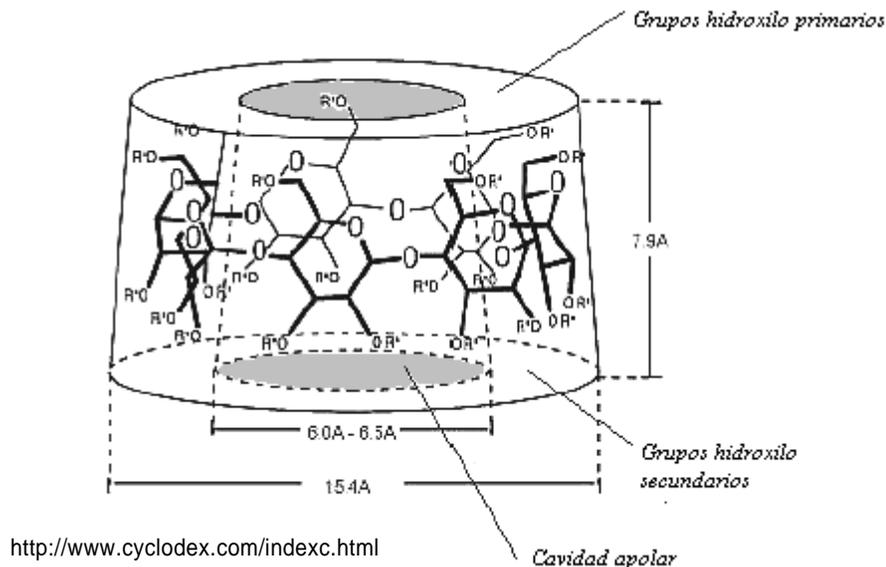
4.1.1 Propiedades químicas. Las ciclodextrinas han captado la atención por sus propiedades específicas, en parte, debido a sus inigualables estructuras. Como una consecuencia del enlace α (1 \rightarrow 4) de las unidades de glucosa, todos los grupos hidroxilos secundarios están situados en un lado de los dos bordes, mientras que, todos los grupos hidroxilos primarios están situados sobre el otro borde, ver figura 2. La estructura de la ciclodextrina proporciona una molécula como un cono hueco conformado con una superficie exterior hidrofílica y una cavidad interior hidrofóbica rica en electrones (para mas características de α , β y γ -CD ver Tabla 1 en ANEXO 1). La superficie hidrofílica genera una solubilidad en agua relativamente buena para la ciclodextrina y la cavidad hidrofóbica provee un medio favorable en el cual “se acomoda” una molécula típicamente hidrofóbica, de ahora en adelante llamada “molécula huésped”. Esta

² Ibid., p.1-1.

³ MADSEN, Ulrich., Op. cit., p. 1-2

asociación de las moléculas huésped aisladas con el solvente acuoso, permite un incremento de la solubilidad en agua y/o la estabilidad del huésped⁴.

Figura 2. Forma toroidal de una molécula de β -CD



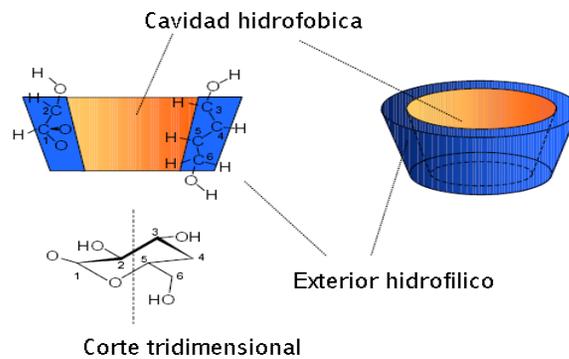
La β -CD es la de mayor interés comercial entre las tres ciclodextrinas naturales, por su fácil condición de producción, diámetro de la cavidad, disponibilidad, estado legal de aceptación y su precio. Esta es la más ampliamente usada y representa al menos el 95% de toda la producción y consumo de ciclodextrinas [Szejtli 1994]. β -CD posee una cavidad de 6-6,8 Å, la cual es capaz de acomodar grupos aromáticos encontrados en muchas moléculas y drogas [Rajewski and Stella 1996]. Desafortunadamente, las β -CD tienen la más baja solubilidad en agua comparada con α -CD y γ -CD, ver tabla 2 en ANEXO 1.

Las ciclodextrinas son menos solubles en agua que sus comparables sacáridos lineales. Esto es probable, debido a la fuerte energía del enrejado cristalino entre cada molécula y a la incapacidad de algunos de los grupos hidroxilo para interactuar con las moléculas de agua. Por ejemplo, el grupo OH en el carbono 2 de una de las unidades de glucosa puede formar un

⁴ Ibid., p.1-2.

fuerte enlace de hidrógeno con el grupo OH del carbono 3 de la unidad de glucosa adyacente, lo cual reduce la capacidad para formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua del alrededor [Szejtli 1996, Frömring and Szejtli 1994]. Esta formación del enlace de hidrógeno intra- molecular es probablemente la razón de la baja solubilidad de la β -CD, debido a la estructura inflexible de los grupos hidroxilo secundarios⁵, ver figura 3.

Figura 3. Posición de los grupos OH de los carbonos 2 y 3.



www.wacker-biochem.com

El cinturón de hidrógenos está incompleto para la α -CD y por consiguiente solo cuatro enlaces de hidrógeno pueden estar formados completamente. El cinturón de hidrógenos está también incompleto para γ -CD, pero estas poseen una estructura más flexible y es de esta manera la más soluble de las tres ciclodextrinas [Szejtli 1996; Frömring and Szejtli 1994; Szejtli 1998]⁶.

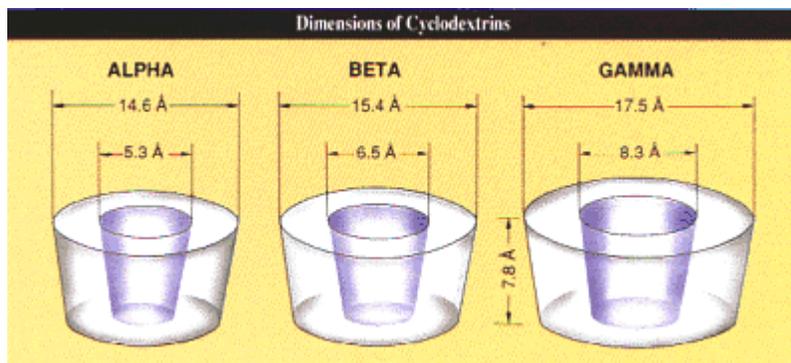
4.1.2 Propiedades Físicas. Algunas de las dimensiones de las ciclodextrinas son vistas en la figura 4. Los diferentes diámetros y volúmenes de la cavidad reflejan los diferentes números de moléculas de glucosa en el anillo de la ciclodextrina. Las mediciones fueron obtenidas de datos de cristalografía de rayos X. Estas dimensiones son importantes a la hora de escoger una

⁵ MADSEN, Ulrich., Op. cit., p. 1-3

⁶ MADSEN, Ulrich., Op. cit., p. 1-3

ciclodextrina para hacer el encapsulamiento, ya que si se usa una γ -CD para encapsular solo un anillo fenilo, muy probablemente no se acomodara y pasara sin ser retenido.⁷

Figura 4. Dimensiones de las ciclodextrinas



<http://www.cerestar.com>

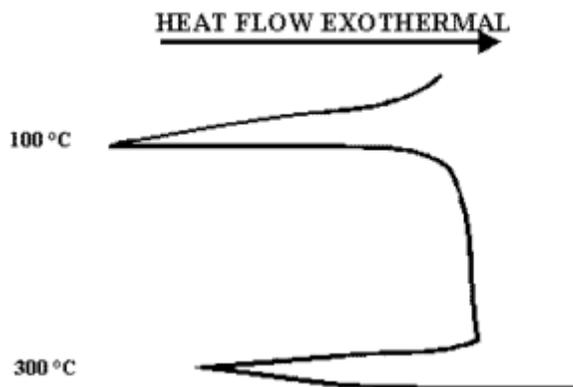
Otras propiedades de las ciclodextrinas como pesos moleculares, volúmenes de la cavidad, puntos de fusión e higroscopicidad se pueden ver en la Tabla 2 en ANEXO 1. Respecto a la higroscopicidad, los ensayos demuestran que las ciclodextrinas permanecen como polvos y no licuefactan, incluso después de una prolongada exposición en condiciones de alta humedad relativa.

La figura 5 muestra un termograma obtenido usando calorimetría de barrido diferencial (DSC) de β -CD. Los termogramas de α y γ son idénticos. El primer pico que se ve ocurre a 100° C donde la energía es absorbida cuando el agua es evaporada de los cristales. El segundo pico comienza en 260° C y tiene un máximo a 300° C; a esta temperatura ocurre la fundición de los cristales y la descomposición de la ciclodextrina. El punto de fundición y el de descomposición no pueden ser separados uno del otro⁸.

⁷ CERESTAR, Cyclodextrins – a unique form of starch [online]. Estados Unidos, 1997 [cited 4 dic. 2002]. Physical properties. Available from internet : <<http://www.betadexcyclodextrin.com/html/welcome.html>

⁸ CERESTAR, Op. cit., Thermal stability.

Figura 5. Análisis termal de β -ciclodextrina.



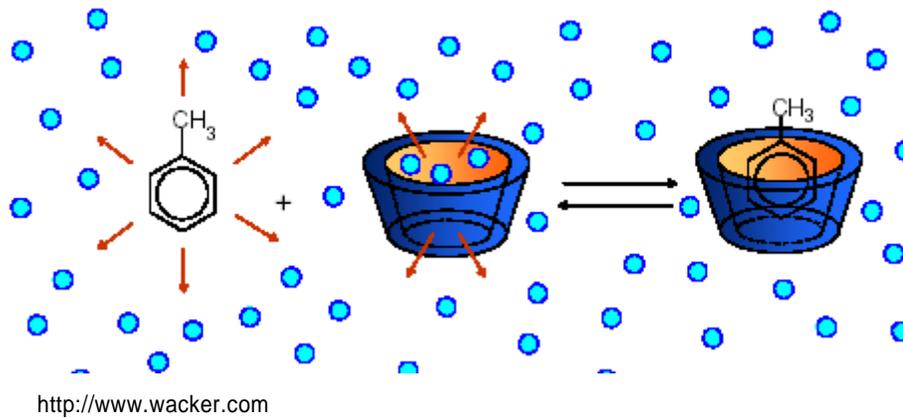
<http://www.cerestar.com>

4.1.3 Complejación Ciclodextrina-Huésped. Las diferentes ciclodextrinas pueden ser consideradas como una cavidad vacía de un tamaño molecular definido. Cuando la cavidad es ocupada con una molécula de otro sustrato, esto es llamado un “Complejo de inclusión”. Los complejos de inclusión son sistemas que constan de dos o más moléculas, en los cuales una de las moléculas, el hospedador, incluye enteramente o parcialmente la molécula huésped. Las moléculas en el complejo de inclusión están solo en contacto por fuerzas físicas y sin enlaces covalentes [Szejtli 1996; Duchêne and Wouessidjewe 1996]. Por otra parte, el equilibrio Disociación- Asociación es probablemente el mayor aspecto característico de la asociación hospedador – huésped [Szejtli 1996]⁹.

Mecanismo de inclusión: dado que la cavidad de la ciclodextrina es hidrofóbica, la inclusión de una molécula en la cavidad de la ciclodextrina es básicamente una sustitución del agua dentro de la cavidad con una sustancia menos polar; esta sustitución es favorable para ambos, la ciclodextrina y el huésped, como se ilustra en la figura 6.

⁹ MADSEN, Ulrich., Op. cit., p. 1-4

Figura 6. Esquema de ilustración de la inclusión de tolueno por una ciclodextrina, los círculos pequeños representan las moléculas de agua.



La “fuerza impulsadora” en la complejación no está totalmente comprendida, pero parece ser una combinación de diferentes influencias dependiendo específicamente del huésped y de la ciclodextrina. Estos efectos pueden ser interacciones hidrofóbicas, interacciones de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo y la liberación de la entalpía del agua [Szejtli 1996; Duchêne and wouessidjewe 1996; Connors 1997]¹⁰.

Interacciones Hidrofóbicas: las interacciones hidrofóbicas ocurren cuando moléculas no polares tienden a aglomerarse en un medio acuoso debido a la remoción de las superficies apolares en contacto con el agua. La estructura del agua circundante es un factor crítico en las interacciones hidrofóbicas “clásicas”. Las interacciones resultan en una ΔH° levemente positiva y una ΔS° gran positiva a baja temperatura, es decir que se “conduce a la entropía” [Connors 1997; Loftsson and Brewster 1996; Easton and Lincoln 1999]. El hecho que la entropía cambie es positivo, aun cuando las moléculas se aglomeren, muestra que debe ser una contribución de la entropía del solvente y que las moléculas del solvente deben estar más libres para moverse, una vez que, las moléculas de soluto se agruparan en pequeños agregados [Atkins 1994]. Sin embargo, la ciclodextrina es una molécula “semi-polar” lo que significa una cavidad más hidrofóbica que el agua pero menos hidrofóbica que el n-octanol fundamentado sobre la constante dieléctrica de los grupos toluidinil después de la inclusión, lo cual facilita un medio adecuado para las interacciones con huéspedes hidrofóbicos [Szejtli 1996]. Si las interacciones

¹⁰ MADSEN, Ulrich., Op. cit., p. 1-5

hidrofóbicas ocurren, por ende, no debe ser una expectativa que el sistema “clásico” se aplique en el sistema de las ciclodextrinas [Easton and Lincoln 1999]¹¹.

Interacciones de Van der Waals: cuando dos moléculas son atraídas a la vez, ambas se atraen y se repelen una de la otra dependiendo de la distancia que las separa. La fuerza de atracción de las moléculas es causada por instantáneos y cortos momentos de desequilibrio en la distribución electrónica de un átomo que genera un dipolo temporal. Estos cortos momentos de vida de el dipolo inducido resultan en una inducción en la distribución electrónica de un átomo vecino que genera una polarización temporal. Esta polarización minimiza la repulsión electrón-electrón entre los átomos también conocida como interacciones de dipolo inducido-dipolo inducido o fuerzas de dispersión de London. Otras fuerzas involucradas son las de dipolo-dipolo inducido y la de dipolo permanente. Pero ninguna de ellas es de tipo covalente o iónico [Van Holde et al. 1998; Martín 1993]. Estas fuerzas son usualmente débiles para todas las clases de interacciones, pero probablemente son muy numerosas en la cavidad de la ciclodextrina y por esta razón tienen que ser tomadas en consideración [Szejtli 1996; Connors 1997]¹².

Puentes de hidrógeno: si un hidrógeno es acercado a un átomo que es muy buen atrayente de electrones (como N, O, o F) el ultimo hidrógeno del enlace comienza a cargarse muy positivamente y el otro átomo comienza a cargarse negativamente (i.e., polar). El hidrógeno es el átomo mas pequeño en la tabla periódica, lo cual hace esto posible para el átomo de hidrógeno y que el otro átomo consiga estar muy junto. La combinación de una alta polaridad y una gran aproximación resulta en una interacción particularmente fuerte debido a la fuerza de atracción entre las dos cargas opuestas, esta es proporcional a la magnitud de sus cargas dividida por el cuadrado de la distancia entre ellas. En realidad, estas interacciones son tan fuertes como todas las otras pequeñas interacciones dipolo-dipolo [Chang 1990].

Los puentes de hidrógeno desempeñan un papel importante en la estabilidad de los complejos de ciclodextrina en solución acuosa. Esto puede contribuir enormemente al cambio

¹¹ MADSEN, Ulrich., Op. cit., p. 1-6

¹² Ibid., p. 1-6

conformacional en la ciclodextrina, el huésped, o en ambos, lo cual resulta en una mayor estabilidad del complejo [Easton and Lincoln 1999]¹³.

Liberación de la “gran entalpía” del agua: cuando el agua es substituida de la cavidad de la ciclodextrina ocurre un decrecimiento en la energía. Esto es causado por el incremento in la interacción solvente-solvente, desde el contacto superficial entre el solvente y la cavidad de la ciclodextrina, así como entre el solvente y la molécula huésped. Además el agua dentro de la cavidad de la ciclodextrina no puede poseer su capacidad tetrahedral con los puentes de hidrógeno, comparado con el del solvente circundante, y esto es por consiguiente reportado con frecuencia como una “alta energía” del agua o “gran entalpía” del agua. Una de las principales fuerzas impulsadoras para la complejación podría ser por consiguiente la liberación de esta “alta energía” del agua de la cavidad de la ciclodextrina, lo cual permite entonces formar todos sus puentes de hidrógeno complementarios con el agua circundante [Szejtli 1996; Loftsson and Brewster 1996; Connors 1997]¹⁴.

Procedimientos de inclusión por β -CD: como se mencionó anteriormente la solubilidad de la ciclodextrina se incrementa con la temperatura. La acomplejación solamente ocurre en solución y el uso de la elevada temperatura permite obtener una gran concentración inicial de B-CD.

Hay tres caminos para preparar un complejo de B-CD; en cada uno, es esencial disolver la B-CD y la molécula huésped.

1. Líquido-líquido: revolver o agitar una solución de B-CD, caliente o fría, ácida o alcalina con la especie huésped. Si el huésped es insoluble, luego deberá ser disuelta en un solvente soluble en agua. En complejo típico de un aceite esencial puede ser preparado en una solución al 15% de B-CD a 70 C adicionando el aceite esencial y luego enfriando mientras se agita. El complejo cristalino puede ser filtrado y secado.

2. Líquido-sólido: la B-CD sólida y el huésped pueden ser mezcladas en un poderoso mezclador. Puede ser agregada bastante agua para formar una pasta y la mezcla por largo

¹³ Ibid., p. 1-7

¹⁴ MADSEN, Ulrich., Op. cit., p. 1-7

tiempo permite que toda la B-CD y el huésped se disuelvan. No pueden ser usados solventes en este método, no hay oportunidad para que se establezca un equilibrio.

3. Gas-liquido: pasando vapor a través de la solución de B-CD, caliente o fría, se formarán los complejos con diversos solventes u otros químicos presentes en el gas. El complejo puede ser de cualquier forma, separado por filtración o recuperar los volátiles por medio de destilación por arrastre con vapor.¹⁵

4.1.4 Especificaciones de sulfobutil eter β – ciclodextrina SBE₇ β -CD. La ciclodextrina usada en todos los encapsulamientos, fue aportada por CyDex, Inc. En Estados Unidos, la cual, apporto los siguientes datos de seguridad del material.

SBE₇ β -CD: sal sódica de sulfobutil éter beta ciclodextrina.

Formula química: $C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_8SO_3Na)_n \cdot xH_2O$ donde $n = 6,0 - 7,1$

CAS Number: 182410-00-0

Nombre químico: Beta- Ciclodextrina sulfobutil éter, sal sódica

Punto de fusión: 234,5 - 236° C

Punto de descomposición: 269 – 272 ° C

Contenido de agua: máximo permitido 10% , encontrado 2,6% \pm 0.2

Claridad de la solución: a 30% w/v en agua, la solución es clara y libre de materiales extraños.

pH de la solución: una solución de 30% w/v en agua, el rango estándar esta entre 5,4 – 6,8; y experimentalmente se encontró 6,2

Promedio del grado de sustitución: teórico entre 6.0 y 7.1, experimentalmente se encontró para este numero de batch, 6.6

Solubilidad en agua: Mayor de 90g /100mL

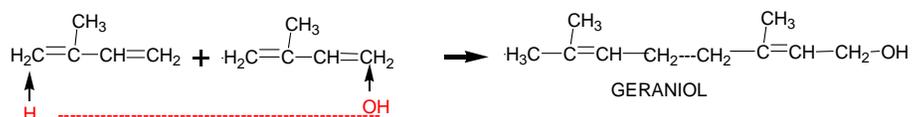
Este producto no tiene ninguna contraindicación para su manipulación, no se encuentran efectos ante la exposición de la piel, ojos, a la inhalación o a la ingestión.

¹⁵ PAGINGTON, J.S. β -cyclodextrins: the success of molecular inclusion. Chemistry in Britain. Mayo de 1997.

4.2 AROMATIZANTES

Los consumidores de hoy en día, esperan que un alimento tenga una calidad irreprochable, un aroma y un gusto atrayente. La mayor parte de los alimentos producidos industrialmente difícilmente pueden ser elaborados sin la adición de un aroma apropiado. En efecto, sin los aromas, ciertos alimentos como por ejemplo las gaseosas, los helados de crema o los productos de confitería serían simplemente insípidos. Es esta necesidad, la que conduce a desarrollar la industria aromática a fin de suministrar los requerimientos de la industria alimentaria¹⁶.

El geraniol está ubicado dentro de la categoría de los alcoholes primarios terpénicos, ya que está compuesto de dos unidades de isopreno con la adición de una molécula de agua.



El geraniol (trans-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol) es ampliamente difundido en la naturaleza y es encontrado en mayor proporción en los aceites de geranio (figura 7), rosa, lavanda, y citronela, así como en otros aceites esenciales. El doble enlace 2-3 origina la existencia de un isomero geométrico del cual la modificación cis es conocida como nerol. Los dos isómeros se encuentran juntos en cantidades diferentes en los aceites naturales; el aceite de geranio contiene más geraniol que nerol, pero este último puede ser encontrado en proporciones considerables en bergamota y cyclamen¹⁷.

Figura 7. Geranio (*Pelargonium sp.*)



¹⁶ AUDRIN, A; LOLINGER, J et BAUER, W. Science alimentaire 2: Aromes et colorants. Université de Lausanne, 2002. p. 58.

¹⁷ BREWSTER, Q. Ray. Organic chemistry. Second edition. Estados Unidos de America: Prentice-Hall, 1953. p.759,760.

En la naturaleza los terpenos son producidos por la vía del isopreno, que es una parte integral del común de las plantas y la biosíntesis animal. Las sustancias terpeno oxigenadas son también componentes comunes de las comidas tradicionales. Datos cuantitativos en los casos naturales indican que la ingestión oral de estas sustancias ocurre predominantemente por el consumo de las comidas en las cuales ellos se encuentran naturalmente. [Stofberg and Grunschober, 1987; Stofberg and Kirschman 1985], al menos 25.000 libras entre geraniol , nerol, citronerol y esterres relacionados son consumidos anualmente como aditivos en sustancias saborizantes en los Estados Unidos [Stufberg and Grundschober, 1987]; el geraniol también está reconocido actualmente por la (FDA) Administración de Drogas y Alimentos en los Estados Unidos, como GRAS(generalmente considerado como seguro) por sus usos destinados a las sustancias aromatizantes [Hall and Oser1965]¹⁸.

Además, el geraniol está endógeno en los animales. Como el pirofosfato y los esterres de coenzima A (CoA), el geraniol esta presente en todas las células como un intermediario en la biosíntesis del colesterol. A través de todas las células tiene el potencial de producir colesterol, una producción tan grande como del 90% ocurre en el hígado y el intestino. En la biosíntesis del colesterol el isopentil-pirofosfato y un isomero, el dimetilalil pirofosfato, ambos con cinco fragmentos de carbono son condensados para producir geraniol CoA, un fragmento de 10 carbonos; la isopentil pirofosfato Transferasa entonces media la adición de una segunda mitad de isopentil pirofosfato para el geraniol CoA produciendo farnesil CoA, un fragmento de 15 carbonos. Dos moléculas condensadas de farnesil formaran el escualeno, un fragmento de 30 carbonos que es eventualmente ciclisado para producir colesterol [Voet and Voet, 1990; Stein, 1986].

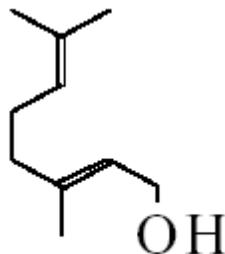
4.2.1 Producción Industrial y Biogénica. Desde que el geraniol es usado para preparar citral (una mezcla de geraniol y neral), un importante material de sabor y fragancia y un intermediario en la síntesis de vitamina A, la síntesis a gran escala de geraniol ha sido desarrollada [Bauer and Garbe, 1985]. Casi todo lo comercialmente disponible, geraniol grado técnico es producido a partir de pineno. En este proceso el pineno es pirolizado a mirceno, el cual es convertido en cloruro de geraniol y neril. La mezcla

¹⁸ The flavor and fragrance high production volume consortia. Test plan for terpenoid primary alcohols and related esterres [online]. Washington D.C.,EUA : February 26 2001 [cited 11 dic 2002]. Chapter 2, Category analysis. Documento PDF. Available from internet. < <http://www.epa.gov/chemrtk/terprial/c12956.pdf>

de cloruros es entonces convertida en una mezcla de acetato de geraniil / neril, la cual es subsecuentemente hidrolizada y colocada en destilación fraccionada para obtener geraniol 98% pureza y nerol [Weiss, 1959]. En años recientes el geraniol comercialmente disponible ha llegado a ser producido por la isomerización del linalol. La isomerización se lleva a cabo usando catálisis con orto - vanadato, produciendo una mezcla con 90% de geraniol y nerol, el cual puede ser altamente purificado vía destilación [Yoshiaki et al., 1973].

4.2.2 Propiedades físicas y químicas de geraniol.

Figura 8. Geraniol



El geraniol (figura 8), es un líquido aceitoso incoloro, presenta un olor fresco, dulce, agradable, de tipo rosa floral¹⁹. El geraniol C₁₀ H₁₈ O, pm: 154.24, presenta un punto de fusión de -15° C, punto de ebullición de 229° C a 760mmHg, peso específico d₂₅²⁵ 0.870 - 0.885g/ml, índice de refracción n_D²⁰ 1.4710 – 1.4780, rotación óptica -2° a +2°²⁰. Presenta absorbancias en el ultravioleta de 194 a 205 nm²¹.

Presión de vapor: Datos reportados por [vuilleumeir et al., 1995] confirman que la presión de vapor es 0.023mmHg a 20° C. El umbral de aroma ó umbral de reconocimiento, es la mínima concentración de una sustancia para ser percibida, este umbral para el geraniol es de 40µg/Kg a 20° C. Coeficiente de partición: Octanol/agua, los valores calculados de Log Kow son de 3.47, reportados por [SRC] Syracuse Research Corporation. Solubilidad en agua: calculada es de 256mg/L a 25° C , pero bastante soluble en

¹⁹ Takho camphor co.,Ltd. Essential oil [online]. Taiwan,2000 [cited 16 sept. 2003]. Geraniol. Disponible en internet : <<http://www.camphor.com.tw/f-pro3a.htm>>

²⁰ HAWLEY,G. Gessner. Diccionario de química y de productos químicos. Segunda edición. España: Ediciones omega, S.A, 1985. p.429.

²¹ BAUDI, D. Salvador. Diccionario de tecnología de los alimentos. México: Addison wesley longman, 1988.p.62,63.

etanol y eter. Fotodegradación: la vida media de fotodegradación calculada por modelamiento con [AOPWIN] atmosféric oxidation potential, está entre 19 minutos y 1,3 horas; estructuralmente esta substancia es un alcohol primario insaturado que tiene el potencial para formar especies de radical en la fase gaseosa y también para oxidarse al correspondiente aldehído insaturado; la reactividad química conoce que este substrato soporta cortos periodos de vida media de fotodegradación. Estabilidad en agua: no se encuentra hidrólisis en la estructura, mostrando ser estable en solución acuosa. Biodegradación: se realizaron estudios por duplicado y mostraron que el geraniol es fácilmente biodegradable (i.e. 100% de biodegradación) según los métodos de OECD 301B, OECD 301C ó DOC. Metodo F del (Blue Bookseries, 1991), [BBA,1990; Ginvaudan-Roure, 1989; Quest, 1994]. Ecotoxicidad : en agua para el hábitat de pescados, en 96 horas LC₅₀ para geraniol es calculada en 10,7mg/L con un programa de ECOSAR; los datos citados experimentales citados para geraniol indican un muy bajo orden de toxicidad para algas, la no inhibición para el crecimiento fue observada a 100mg/L. Datos salud humana: se ha encontrado LD₅₀ oral en ratas de 3450-6330mg/Kg. Indicando que el geraniol tiene una muy baja toxicidad en agua. [Moreno 1972, 1973; Amawaki,1962; Jenner, 1964.]²²

4.2.3 Usos del geraniol. Se usa como saborizante en concentraciones hasta de aproximadamente 11ppm del producto final, en insecticidas como atrayente de escarabajos, aromatizante de interiores de casas y perfumería de delicadas lociones, jabones y cosméticos.

4.3 ACHIOTE (*Bixa orellana* Lineo.)

Bixa orellana L. "Achiote o annatto" (figura 9), es una planta arbustiva, con hojas de forma variable,

Figura 9. Árbol de *Bixa orellana*



²² The flavor and fragrance high production volume consortia. Test plan for terpenoid primary alcohols and related esters [online]. Washington D.C.,EUA : February 26 2001 [cited 11 dic 2002]. Chapter 3, Test plan. Documento PDF. Available from internet. <<http://www.epa.gov/chemrtk/terprial/c12965.pdf>

flor hermafrodita, de fruto capsular y numeroso, en los cuales se halla la semilla (arilo o pepas) de la cual se obtiene el colorante. Pertenece a la familia **Bixaceae**, orden parietales y división angiosperma²³.

FRUTO : (figura 10), es una cápsula ovoide, puntiaguda o acorazonada, de 3 a 5 cm de largo, y un poco menos de ancho, se presenta en racimos de 6 a 12, con las puntas dirigidas hacia arriba. Su superficie está generalmente cubierta de abundantes apéndices que unos llaman espinas flexibles y otros llaman pelos rígidos. Lo cierto es que generalmente no son punzantes y raramente son hostiles. A veces no existen, en algunas variedades (var. *leiocarpa*), y entonces la superficie de la cápsula es lisa o verrucosa. En su interior el fruto contiene las semillas y un líquido aceitoso que baña a las semillas. El fruto en su juventud es verde, pero conforme va madurando adquiere un color rosado, rojo, rojo oscuro o marrón. Esta variabilidad que no solo es cambiante con la edad sino con la raza, hace que algunos expertos hayan encontrado razones para complicar la nomenclatura. Los frutos además tardan de 6 a 8 meses desde la fecundación de la flor hasta la maduración completa que ocurre en el verano. Cuando el fruto está maduro, las valvas se abren y las semillas caen espontáneamente o pueden ser liberadas por sacudimiento²⁴.

Figura 10. Fruto del árbol de *Bixa orellana*



SEMILLAS : (figura 11), Se encuentran adheridas a la pared del cápsula o valvas, por medio de la placenta. Son pequeñas, livianas y su forma varía desde la pirámide triangular hasta la redondeada. La variabilidad en tamaño, peso y número de semillas es grande (30 – 50) , dependiendo de la variedad.

²³ RAINLABS. Achiote (*Bixa orellana* L.) [online]. Perú, 2002 (citado 25 febrero 2003). Composición química , p. 5 . Documento word. Disponible de internet : < <http://www.rainlabs.com/docs/achioteespañol.doc>.

²⁴ Ibid., p 6.

La cubierta exterior, contiene un colorante rojo- amarillento o anaranjado brillante, que cubre la semilla a manera de pulpa resinosa. Este colorante es el pigmento que se explota comercialmente²⁵.

Figura 11. Semillas de *Bixa orellana*



A continuación se presenta en la tabla 1 el análisis próximo y algunos otros nutrientes importantes en las semillas.

Tabla 1. Composición de las semillas de achiote
(Composición por 100 g de Achiote)

Componentes	Unidades	Fresco	Seco
Valor energético	Cal	54,0	33,4
Humedad	%	84,4	5,6
Proteínas	g	0,1	6,6
Grasa	g	0,3	4,6
Carbohidratos	g	14,3	78,2
Fibras	g	0,5	14,5
Cenizas	g	1,0	5,0
Calcio	mg	7,0	120,0
Fósforo	mg	10,0	116,0
Hierro	mg	0,8	5,6
Vitamina A	mg	5,0	185,0
Tiamina	mg	0,0	0,09
Riboflavina	mg	0,05	0,19
Niacina	mg	0,3	1,7
Ácido ascórbico	mg	2,0	7,0

Fuente: Tabla de composición para uso en América Latina. 1961, citada por Cabezudo (1973).

²⁵ RAINLABS, Op. Cit., p. 6.

En la siguiente tabla 2, se encuentra por separado, los componentes de cada una de las capas de la semilla, aclarando que los pigmentos solo ocupan una pequeña región en el exterior.

Tabla 2. Composición por partes de la semilla del Achiote

Cubierta Exterior	68% del total
Celulosa	40% - 45%
Humedad	20% - 25%
Pigmentos	4,0 % - 5,5 %
Azúcares	3,5% - 5,2%
Cutícula	22% del total
Celulosa y taninos	1,0% - 1,65% de reserva
Aceite esencial	0,05%
Semilla Interior	10% del total
Piel	1,8%
Aceites esenciales	0,1% -1,1%
Sustancia cerosa	3%
Alcaloides	Trazas.

Fuente: Organización de Investigación Industrial de África del Este, citado por Dendy (1966)

4.3.1 Toxicología. Si bien es cierto que el achiote es una excelente fuente de carotenos (provitamina A), adicionarlo como harina de semilla a los concentrados para la alimentación de gallinas o pollos, existen reportes de investigaciones que indican la presencia de un alcaloide tóxico, en el embrión de la semilla, dejando entrever que los residuos de las semillas como alimento de aves son dudosos [Castro luna, Américo 1996].

La comisión del Codex de la FAO (1974), indica que para los extractos de achiote la ingestión diaria admisible (IDA), es de 0,01 – 1,25 mg por Kg de peso corporal, expresado en Bixina [Castro luna, Américo 1996]. Asimismo los estudios realizados hasta el momento no han reportado toxicidad en las dosis utilizadas en el uso popular para consumo humano tanto de semillas como del resto de la planta²⁶.

²⁶ RAINLABS, Op. Cit.,p. 7.

4.3.2 Uso del achiote (semilla).

* En la Industria de Alimentos:

Como condimento en embutidos, como colorante en solución en aceite utilizado para colorear mantequilla, margarina, helados. Su solución en agua ligeramente alcalina para colorear quesos. También se utiliza para colorear galletas, tortas, panetones, artículos de confitería.

* En la Industria Cosmética:

En la fabricación de lápices labiales, bronceadores, polvos faciales, sombras para ojos, vaselina para el cabello, esmalte para uñas, otros.

*En la Industria farmacéutica: Como colorante de jarabes.

En General: En cerámica, textilería, ceras para pisos, betunes para calzado. Se ha experimentado para teñir tejido adiposo. Los pigmentos puros de annatto poseen colores potentes altamente tintoriales. Para muchas aplicaciones 100 ppm del pigmento puro se requieren para obtener el matiz o intensidad deseados. Los productos muy altamente coloreados requerirán más, pero en la mayoría de los casos menos de 100 ppm. Debe señalarse que los preparados y extractos de annatto contienen entre 0,5% y 15% del pigmento puro de annatto²⁷.

4.3.3 Comercialización. El achiote, se exporta como semilla y en polvo, así como el extracto al que se denomina bixina y el derivado de este es la norbixina. En cuanto a los precios de la semilla se muestra una caída al pasar de US\$ 0,95 el Kg en septiembre de 1997 a US\$ 0.55 /0.60 en noviembre de 1999. Con relación a sus derivados los exportadores de estos productos han mejorado la calidad de acuerdo a las exigencias del mercado lográndose ubicar zonas de producción de mayor concentración como es el Valle de la Convención en Cuzco, Perú. Así tenemos que hace dos años se exportaba bixina / norbixina de contenido 35% a 40% de concentración, hoy para los cristales de bixina es de 95% de concentración y norbixina de 60% de concentración y el achiote en polvo de 70% de concentración. Entre 1997 –1999

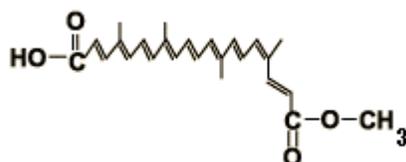
²⁷ RAINLABS, Op. Cit.,p. 9.

se ha incrementado las exportaciones de achiote como semilla, mientras que las ventas del extracto han disminuido notablemente²⁸.

4.3.4 Características físicas y químicas.

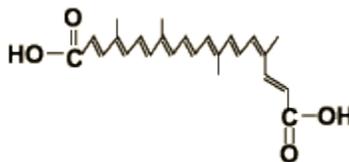
* Bixina : (Figura 12), $C_{25}H_{30}O_4$, nombre científico: Ácido 9' – cis – 6,6' – diapocaroteno – 6,6' dioico, mono metil ester. Peso molecular 394.25g/mol; punto de fusión 189,5 – 190,5° C; punto de descomposición 217° C; cristales romboédricos de color rojo oscuro, tiene absorbancia a 503, 474,5 y 439nm con $E^{1\%}_{1cm}$ 2870 a 502nm en cloroformo; insoluble en agua, soluble en solventes orgánicos bastante polares, levemente soluble en éter etílico²⁹.

Figura 12. Estructura molecular de cis - bixina



* Norbixina: (figura 13), $C_{24}H_{28}O_4$, nombre científico: Acido, 6' – metilhidrogen – 9'- cis – 6,6' diapocaroteno – 6,6' dioico. Peso molecular 380.48g/mol; punto de fusión 192; punto de descomposición 202 ; es amorfo y se encuentra como polvo naranja, sinónimo, C.I. natural orange 4; tiene absorbancia a 502, 471.5, 442nm con $E^{1\%}_{1cm}$ 2870 a 482nm en NaOH 0.1N; Soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos³⁰.

Figura 13. Estructura molecular de cis - norbixina



²⁸ IQBAL Mohammad, Food and agriculture organization of the United Nations. International trade in non-wood forest products: an overview [online]. Rome, November 1993, (citado 29 sep. 2003). Chapter VI, 6 prices. Available from internet: <http://www.fao.org/docrep/x5326e/x5326e09.htm>

²⁹ REITH, J. F., GIELEN, J. W. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts. In: Journal of food science, Vol. 36, n. 6, 1971, p. 861 – 864,

³⁰ Ibid., p. 861 – 864.

4.3.5 Bixina y norbixina como pigmentos carotenoides. Aunque ellos sean utilizados en microcantidades, los colorantes alimenticios juegan un papel único en la aceptación de los alimentos por el consumidor, de hecho la primera apreciación de un alimento por el consumidor esta ligada al color. La experiencia nos enseña a asociar el color con la calidad y las propiedades sensoriales de un producto. La apariencia de un alimento, influencia nuestra percepción de su gusto, de su aroma y de su textura; por consiguiente juega un papel mayor en nuestro placer³¹.

En la industria alimentaría, las materias primas vegetales y animales son sometidas a tratamientos de transformación mecánica, química y térmica. En el transcurso de estos diferentes procedimientos, la aparición de compuestos pardos o la decoloración de pigmentos, son los principales problemas mas evidentes. Estos fenómenos son el resultado de reacciones enzimáticas o no enzimáticas que intervienen sobre los pigmentos y/ o sobre los substratos compuestos principalmente de materia vegetal o animal³².

Los carotenoides forman un grupo de pigmentos particularmente esparcido. Ciertamente ellos están disponibles gracias a la industria química que ha aumentado su desarrollo. Su presencia en la naturaleza no es muy evidente pero son disimulados por otros pigmentos (como por ejemplo el amarillamiento de las hojas en el otoño). La presencia de numerosos dobles enlaces insaturados conjugados explica los colores rojo vino, naranja y amarillo en las frutas, legumbres, y champiñones; igual que en flores, insectos, aves, pescados y otros animales³³.

Otra característica importante de los carotenoides es su aporte como provitamina A, el aporte dado para la síntesis de vitaminas es muy importante, ya que los hombres y los animales poseen como única fuente de vitamina A, a los carotenos y carotenoides.

La mayor parte de los carotenoides son insolubles en el agua y débilmente solubles en los aceites. En estado puro, los cristales de carotenoides son muy sensibles a la oxidación debido a su naturaleza fuertemente insaturada. Esta oxidación implica directamente una disminución del color rojo por efecto de la desaparición de los enlaces conjugados. La oxidación es acelerada por la acción de la luz, y en presencia de aceites por los catalizadores metálicos, en particular el cobre, el hierro y el manganeso; el

³¹ AUDRIN, A; LOLINGER, J et BAUER,W.Science alimentaire 2: Aromes et colorants. Universite de Lausanne, 2002. p. 90.

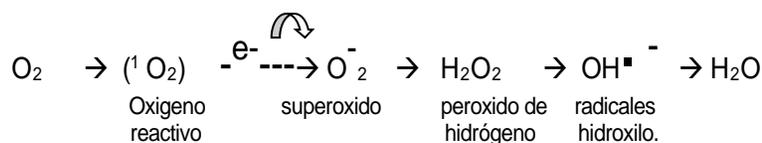
³² Ibid., p.80

³³ Ibid. , p.92

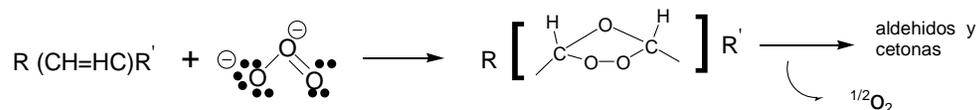
contacto con los hidroperoxidos de ácidos grasos induce una descomposición radical libre; por lo tanto es necesario conservarlos al vacío en atmósfera inerte³⁴.

En el caso de los radicales libres, la especie de oxígeno reactivo es generada durante el metabolismo regular, pero son intensificados después de la exhibición a los xenobioticos (e.g. pesticidas). Como armas poderosas, ellos efectúan el rompimiento del DNA, preoxidan las instauraciones lipídicas, alteran la actividad enzimática y depolimerizan los polisacáridos. En general, ocasionan una muerte celular. Los compuestos naturales, los cuales son ricos en dobles enlaces conjugados, actúan debido a su efecto antioxidante, en la destrucción (secuestrando, cambiando, anulando, descomponiendo) de esos radicales libres. Este es exactamente el mayor beneficio producido por los carotenoides de la alimentación, o de formulaciones médicas.

Las mediciones a través de la fotoemisión indican, que la capacidad de secuestro del oxígeno reactivo por parte de los carotenos y xantofilas es el máximo para licopeno, es alto para astaxantina o cantaxantina, es medio para b-carotenos o Bixina, Norbixina y bajo para luteína y crocina³⁵.



Un ensayo realizado con ozono y una solución de bixina, muestra como en el transcurso de la reacción hay un fenómeno de decoloración en las moléculas del carotenoide, lo cual fue medido directamente por espectrofotometría visible. Una de las posibles reacciones iniciales entre el carotenoide y el ozono se muestra a continuación.



³⁴ Ibid., p. 92.

³⁵ FONTANA, Jose D. Carotenoids, attractive colors and biological action [online] Federal University of Paraná, Brasil, 1997 [cited 19 sep. 2002]. Market appeal and biological action, p 3. Available from internet : < http://www.biotecnologia.com.br:8080/bio/13_ei.htm.

Como resultado de este ensayo se encontró que en un intervalo de 25 minutos de reacción, la eficiencia de la ozonólisis fue alta con astaxantina ($t_{1/2} = 6\text{min}$) comparado con el carotenoide bixina ($t_{1/2} = 14\text{min}$).

Externamente los factores ambientales son altamente destructibles para la estructura libre y natural de los carotenos; vapores ácidos o de oxidación, luz, calor y oxígeno, son factores que combinados inducen indudablemente a una alteración estructural, lo cual independientemente de la conservación del calor (aunque cambiado) puede que no responda a las propiedades biológicas deseadas³⁶.

Por medio de ensayos con espectroscopia visible se midió la influencia del medio ambiente en muestras de solución clorofórmica de bixina, indicando que después del sexto día de experimentación, los factores más adversos están dados bajo la exposición de (luz y O_2), degradando la bixina en un 40%³⁷.

En otras investigaciones sobre los extractos de annatto, se ha encontrado que los mayores productos de degradación termal han sido caracterizados como los isómeros amarillo-coloreados y los productos de hidrólisis de el trans-monometil éster del ácido 4,8- dimetiltetradecaenoico (C_{17}) [Mckeown, 1963, 1965; Scotter, 1995).

Los tres procesos comerciales principales, que son usados para extraer los pigmentos de las semillas secas de annatto, son: i) extracción directa con aceite, ii) extracción directa con álcali acuoso, iii) extracción indirecta con solvente [Preston and Rickard, 1980]. El aceite caliente es usado para facilitar la isomerización del contenido natural de 9'- cis- bixina en el relativamente más soluble trans- bixina. Los principales colorantes producidos por la extracción directa con aceite son 9'-cis- bixina, all – trans –bixina y C_{17} . Este método es generalmente empleado para dar una formulación de color satisfactoria en grasas o producto basados en aceite, como la mantequilla. La extracción directa con alcali acuoso produce soluciones del álcali metálico o sal amónica con 9'- cis- norbixina, más una pequeña cantidad del pobremente soluble isómero all-trans- norbixina. Alternativamente, el ácido libre de la norbixina puede ser precipitado con ácido diluido, filtrado, lavado y secado para producir una formulación sólida. En la extracción indirecta de annatto, los pigmentos son extraídos de las semillas con solventes, el cual es subsecuentemente removido; este produce un extracto altamente concentrado, principalmente de 9'-cis- bixina con una cantidad despreciable de trans-bixina y 9'-cis- norbixina. Los pigmentos extraídos con

³⁶ FONTANA, Jose D. Op. Cit., p 6.

³⁷ FONTANA, Jose D. Ibid., p 10.

solvente pueden usarse como polvo seco, molido con aceite natural para producir una suspensión, o, hidrolizarse con álcali acuoso para producir una solución principalmente de 9-cis- norbixina³⁸.

³⁸ SCOTTER, Michael J. et al. Analysis de annatto (Bixa orellana) food coloring formulations. 1 determination of coloring components and colored thermal degradation products by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. En: Journal of agricultural and food chemistry. Colney, United Kingdom. Vol 46, 1998; p.1031-1038.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. SOLVENTES E INSTRUMENTOS.

Los solventes usados en la extracción de colorantes a partir de (*Bixa orellana*) son:

Cloroformo RPA. Mallinckrodt

Etanol RPA. Mallinckrodt

Eter de petroleo 10/20 comercial

Agua destilada

Agua deionizada

Hidroxido de sodio 1% y 0.1%

Ácido clorhídrico 1N y 0.2N

Los solventes usados en la formación de los complejos de inclusión son:

Agua deionizada

Cloroformo RPA Mallinckrodt

Ácido clorhídrico 0.1%

Etanol RPA. Mallinckrodt

Los solventes usados en el análisis instrumental de extractos y de complejos son:

Agua grado HPLC pH =6,2 Mallinckrodt

Metanol grado HPLC Mallinckrodt

Acetonitrilo grado HPLC Mallinckrodt

Filtros :

Filtro con tamaño de poro (25 - 12 μ m) Schleicher and Schuell.

Filtro de membrana 0.45µm Fisher Scientific

Los instrumentos usados en los procedimientos de extracción y encapsulamiento son:

Rota-evaporador, LaboroTa 400i WB Heidolph.

Bomba de vacío, Rotavac Heidolph.

Centrífuga, Hermle Z 300.

Balanza analítica, XT220A Precisa.

Estufa, Fisher Scientific isotemp oven.

Plancha de calentamiento, Fisher Scientific isotemp.

Destilador de agua, Schott Geräte GmbH 8200.

Deionizador de agua, Electrónica y Química, modelo D-1.

Nevera, Haceb no frost.

Liofilizador, Labconco Freeze Dryer 4.5.

Los instrumentos analíticos usados son:

Fusímetro, Electrothermal 9100.

Espectrofotómetro uv – vis: se tomaron diferentes espectros de huéspedes y de complejos de inclusión con el fin de reconocer la forma de sus bandas, así como los máximos de absorbancia en cada uno de los casos. Este análisis fue llevado a cabo en un equipo UV-160A Shimadzu de doble haz, en las instalaciones del laboratorio de química analítica de la Universidad del Valle. El experimento se logró bajo condiciones de temperatura controlada de 20°C en la sala.

La preparación de las muestras se realizó uniformemente, tomando como solvente y blanco, una solución de agua:metanol en relación (6:4). Se tomó esta solución porque todos los huéspedes, los complejos y la ciclodextrina, se lograron solubilizar fácilmente, además, se encontró que la resolución de los espectros de los complejos aumentaba favorablemente, en comparación con el uso de solo agua.

Espectrofotómetro infrarrojo: todos los análisis de espectroscopia infrarrojo fueron tomados en un equipo FTIR-8400 Shimadzu en las instalaciones del laboratorio de química analítica de la Universidad del Valle, Cali, Colombia; bajo condiciones de temperatura controlada en la sala de 20°C.

Todas las muestras sólidas analizadas de huéspedes y de complejos, fueron desecadas por 24 horas de antelación en una cámara de desecación con silica gel, para evitar interferencias con moléculas de agua del medio.

HPLC Hewlett Packard 1100, bomba cuaternaria, detector UV,
Columna: Nova Pac, ODS C18, (150 x 4.6 i.d)mm, 5µm.

Microscopio electrónico de barrido, Scanning electrón microscope Sm-300.

Microscopio óptico, Nikon Microphot, con sistema de analizador de imágenes Leica Q 550 IW.

Difractómetro de rayos X, XDS – 2000

DSC y TOX, instrumentos Perkin Elmer

5.2 EXTRACCIÓN DE BIXINA POR SOXHLET

Se tomó 2140,0g de fruto del árbol de achiote (*Bixa orellana*).

Se abrió el fruto, se separaron la oleoresina, la corteza y las semillas, se obtuvieron 428,0 g de semillas de color rojo en su cubierta exterior.

Las semillas se colocaron, sobre papel aluminio, en estufa con recirculación de aire a 27°C por 8 horas.

Estas semillas se sometieron a extracción tipo soxhlet. Con 1000.0 mL de CHCl₃, a temperatura de 30 ± 2 °C con manta eléctrica.

Luego de 2 horas con 8 reflujos, se terminó de extraer el colorante apolar de la cubierta exterior de las semillas.

Se tomó la solución colorante y se conectó a un equipo de destilación para separar el cloroformo con un vacío de 550 mmHg, 27 °C y 90 rpm durante 3 horas. Se concentró el extracto hasta un volumen de 60 mL. Solución Bixa Apolar (SBAs).

La SBAs, se depositó en una probeta de 100mL y se adicionaron 10.0 mL de etanol, agitó y se colocó en nevera a 4°C, esto con el fin de precipitar el colorante y separarlo de la oleorresina que lo acompaña.

Cuatro horas después, se separó la oleorresina sobrenadante del resto de la solución (donde se observó el inicio de la precipitación del colorante); Este procedimiento se realizó dos veces más con porciones de 10.0 mL de etanol en cada caso, hasta que no se observó oleorresina sobrenadante.

El colorante precipitado se trasladó a una caja de petri y se dejó en la estufa, a temperatura ambiente (24°C), por 24 horas, para evaporación de los solventes remanentes.

La caja de petri con el colorante se colocó a desecación en una cámara al vacío con silica gel por 12 horas. Extracto rotulado como EB1.

5.3 EXTRACCIÓN DE NORBIXINA CON AGUA

Las semillas remanente de la extracción de bixina en el soxhlet, se colocaron sobre papel aluminio, durante 2 horas en la estufa a temperatura ambiente, con el fin de eliminar residuos de solvente.

Las semillas se pasaron a un embudo de separación de 1L, se adicionaron 100,0 mL de agua destilada, se agitó por una hora en forma mecánica, se separó la solución acuosa y se repitió la extracción 4 veces mas con la misma cantidad de agua.

Los 500.0 mL de solución acuosa se colocaron, a -5°C, por 6 horas, se liofilizó por 20 horas hasta total evaporación del agua, se obtuvo un coloide del colorante (SBP).

A SBP se le adicionó una solución acuosa de NaOH al 1% , con el fin de saponificar y asegurarse la obtención de la norbixina El pH final fue de 7,88 el cual se neutralizó con HCl 0,2N hasta pH de 6,95.

La solución, se depositó en una probeta de 100mL y se adicionaron 10.0 mL de etanol, se agitó y se colocó en nevera a 4°C, esto con el fin de precipitar el colorante y separarlo de la oleorresina que lo acompaña.

Cuatro horas después, se separó la oleorresina sobrenadante del resto de la solución (donde se observó el inicio de la precipitación del colorante); Este procedimiento se realizó 4 veces más con porciones de 10.0 mL de etanol en cada caso, hasta que no se observó oleorresina sobrenadante.

El colorante precipitado se trasladó a una caja de petri y se dejó en cámara de desecación con silica gel a temperatura ambiente (24°C), por 24 horas, para evaporación de los solventes remanentes. Extracto rotulado como EB2

5.4 EXTRACCIÓN DE BIXINA POR PERCOLACIÓN

Se tomó 5800,0g de fruto del árbol de achiote (*Bixa orellana*)

Se abrió el fruto, se separaron la oleorresina, la corteza y las semillas, se obtuvieron 1161,0 g de semillas de color rojo en su cubierta exterior, se colocaron en una botella ámbar de 4 L . Se agregó éter de petróleo 10/20 hasta llenar totalmente. Se dejó en precolación por 24horas.

Se concentró la solución hasta 50mL, separando el éter de petróleo por rota-evaporación a 90rpm, 30°C, 25 minutos y posteriormente 210rpm a 35°C, por 10 minuto usando 450mmHg de presión en cada caso.

El concentrado se paso a un frasco ámbar con tapa y se dejó a -10 °C El éter recuperado se agregó en la botella donde están las semillas (pepas) enrazando nuevamente.

La percolación se efectuó 4 veces con las mismas condiciones, obteniendo finalmente 200mL de SBAp.

De SBAp se separó una oleorresina sobrenadante; posteriormente se adicionaron 100.0 mL de etanol, se agitó y se dejó en reposo por 10 horas a temperatura ambiente, esto con el fin de precipitar el colorante y separarlo del resto de la oleorresina que lo acompaña, este procedimiento se realizó 3 veces más hasta que no se observó oleorresina sobrenadante.

El colorante precipitado se trasladó a una caja de petri y se dejó en la estufa, a temperatura ambiente (24°C), por 24 horas, para evaporación de los solventes remanentes.

El colorante se secó en una cápsula al vacío con silica gel por 12 horas. Extracto rotulado como EB1p

5.5 EXTRACCIÓN DE NORBIXINA POR PERCOLACIÓN CON NaOH 0.1%

Las semillas remanente de la extracción por percolación etérea, se colocaron en la estufa con recirculación de aire a 30° C, durante 4 horas, con el fin de eliminar residuos de solvente.

Se agregó NaOH 0.1% =0,025N hasta llenar totalmente la botella ámbar de 4L donde se colocaron las semillas.

Se dejó en percolación durante 4 días, agitando esporádicamente

Se neutralizó la solución de pH 12,5 hasta 6,73 con HCl 1N

Se concentró la solución hasta 500mL, separando la mayor cantidad de agua por rota-evaporación a 120rpm, 45° C y 450mmHg por 40 minutos.

Al extracto de la solución de bixa polar por percolación (SBPp), se adicionó 3 porciones de 150mL de etanol y se dejó precipitar el colorante por 12 horas en cada porción a 4°C.

Se eliminó las aguas superficiales que contienen resina líquida y el precipitado se centrifugó a 4000rpm por 8 minutos.

Seguidamente se congeló a -10° C el precipitado de SBPp. por 6 horas y se liofilizó por 24 horas mas, hasta que se encontró un material bien seco rotulado como EB2p.

5.6 RECRISTALIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se realizó por separado un proceso de recristalización para los extractos apolares EB1 y EB1p.

- Se tomó cada uno de los extractos y se disolvió en 40mL de CHCl_3 , agitando uniformemente.
- Se filtró al vacío en papel filtro de (25-12 μm), se colocó la solución en frasco ámbar sin tapa para permitir la volatilización del CHCl_3 a 25°C, hasta sequedad del extracto.
- Finalmente, el sólido obtenido se introdujo en una cámara de desecación con silica gel, por 8 horas hasta peso constante, obteniendo 5.3098g de EB1 y 13,4326g de EB1p
- Luego se guardó en congelador a -10°C previamente sellado.

La muestra EB2 y EB2p también se recristalizaron por separado.

- Se tomó cada uno de los extractos y se disolvió en 50 mL de agua deionizada a una temperatura de 30°C, hasta obtener una solución homogénea.
- Se filtró al vacío en papel filtro de (25-12 μm), colocando la solución filtrada en un beacker de 100mL.
- Luego se colocó el extracto seco en cámara de desecación con silica gel por 8 horas hasta peso constante, obteniendo 17.7245g de EB2 y 43.2660g de EB2p.
- Finalmente se guardó en congelador a -10°C, previamente sellado.

5.7 ENCAPSULAMIENTOS

5.7.1. Encapsulamientos de bixina.

Método de encapsulamiento de bixina 1:1(ciclodextrina:bixina) en moles.

1. Se tomaron 0.1740g de ciclodextrina y se disolvieron en un balón de fondo plano de 100mL con 40mL de H₂O deionizada.
2. Luego se tomaron 0.0311g del colorante de bixina y se disolvieron en un beaker de 25mL con 10mL de CHCl₃, esta solución se adicionó rápidamente al balón de fondo plano con ciclodextrina.
3. Se bajó el pH de la solución con HCl 0.1% de 6.03 a 5.51, con el fin de favorecer la forma protonada del grupo ácido carboxílico del huésped.
4. Se agitó magnéticamente a 400rpm, controlando la temperatura a 30°C (\pm 2°C), durante 40 horas.
5. Al finalizar la agitación, se filtró al vacío la solución con papel de (25-12 μ m).
6. La solución filtrada se depositó en un vaso de 100mL, se introdujo en una estufa con recirculación de aire a 35°C por 48 horas.
7. El complejo de inclusión se pasó a la cámara de desecación con silica gel a temperatura ambiente por 12 horas.
8. Finalmente se pesó el complejo de inclusión con apariencia cristalina de color rojo, obteniéndose 0.1882g.

Método de encapsulamiento de bixina 0.5:1 (ciclodextrina:bixina) en moles

1. Se tomaron 0.1741g de ciclodextrina y se disolvieron en un balón de fondo plano de 100mL con 40mL de H₂O deionizada.

2. Luego se tomaron 0.0631g del colorante de bixina y se disolvieron en un beaker de 25mL con 10mL de CHCl_3 , esta solución se adicionó rápidamente al balón de fondo plano con ciclodextrina.
3. Se siguieron los pasos 3 al 7, igual que la metodología de encapsulamiento (1:1) ciclodextrina:bixina
4. Finalmente se pesó el complejo de inclusión con apariencia cristalina de color rojo, obteniéndose 0.1778g.

Método de encapsulamiento de bixina 0.25:1 (ciclodextrina:bixina) en moles.

1. Se tomaron 0.0870g de ciclodextrina y se disolvieron en un balón de fondo plano de 100mL con 40mL de H_2O deionizada.
2. Luego se tomaron 0.0631g del colorante de bixina y se disolvieron en un beaker de 25mL con 10mL de CHCl_3 , esta solución se adicionó rápidamente al balón de fondo plano con ciclodextrina.
3. Se siguieron los pasos 3 al 7, igual que la metodología de encapsulamiento (1:1) ciclodextrina:bixina
4. Finalmente se pesó el complejo de inclusión con apariencia cristalina de color rojo, obteniéndose 0.0883

Método de encapsulamiento de bixina 0.1:1(ciclodextrina:bixina) en moles.

1. Se tomaron 0.0345g de ciclodextrina y se disolvieron en un balón de fondo plano de 100mL con 40mL de H_2O deionizada.
2. Luego se tomaron 0.0631g del colorante de bixina y se disolvieron en un beaker de 25mL con 10mL de CHCl_3 , esta solución se adicionó rápidamente al balón de fondo plano con ciclodextrina.

3. Se siguieron los pasos 3 al 7, igual que la metodología de encapsulamiento (1:1) ciclodextrina:bixina.
4. Finalmente se pesó el complejo de inclusión con apariencia cristalina de color rojo, obteniéndose 0.0350g.

5.7.2 Encapsulamientos de norbixina.

Método de encapsulamiento de norbixina 1:1(ciclodextrina:norbixina) en moles.

1. Se pesaron 0.0301g de norbixina y se disolvieron en un balón de fondo plano de 30mL con 10,5mL de H₂O deionizada.
2. Se tomaron 0.1740g de ciclodextrina, los cuales fueron adicionados en forma sólida a la solución de norbixina en el balón de fondo plano.
3. Se bajó el pH de la solución con HCl 0.1% de 6.23 a 5.49, con el fin de favorecer la forma protonada de los dos grupos ácido carboxílico del huésped.
4. Se agitó magnéticamente a 400rpm, controlando la temperatura a 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), durante 40 horas.
5. Al finalizar la agitación, se filtró al vacío la solución con papel de (25-12 μm).
6. La solución filtrada se depositó en un vaso de 50mL, se introdujo en una estufa con recirculación de aire a 35°C por 10 horas.
7. El complejo de inclusión se pasó a la cámara de desecación con silica gel a temperatura ambiente por 3 horas más.
8. Finalmente se pesó el complejo de inclusión con apariencia cristalina de color rojo-anaranjado, obteniéndose 0.1930g

Método de encapsulamiento de norbixina 0.5:1 (ciclodextrina:norbixina) en moles

1. Se pesaron 0.0601g de norbixina y se disolvieron en un balón de fondo plano de 30mL con 10,5mL de H₂O deionizada.
2. Se tomaron 0.1740g de ciclodextrina, los cuales fueron adicionados en forma sólida a la solución de norbixina en el balón de fondo plano.
3. Se siguieron los pasos 3 al 7, igual que la metodología de encapsulamiento (1:1) ciclodextrina:norbixina
4. Finalmente se pesó el complejo de inclusión con apariencia cristalina de color rojo - anaranjado, obteniéndose 0.1804g.

Método de encapsulamiento de norbixina 0.25:1 (ciclodextrina:norbixina) en moles

1. Se pesaron 0.0602g de norbixina y se disolvieron en un balón de fondo plano de 30mL con 10,5mL de H₂O deionizada.
2. Se tomaron 0.0870g de ciclodextrina, los cuales fueron adicionados en forma sólida a la solución de norbixina en el balón de fondo plano.
3. Se siguieron los pasos 3 al 7, igual que la metodología de encapsulamiento (1:1) ciclodextrina:norbixina
4. Finalmente se pesó el complejo de inclusión con apariencia cristalina de color rojo - anaranjado, obteniéndose 0.0887g.

Método de encapsulamiento de norbixina 0.1:1 (ciclodextrina:norbixina) en moles

1. Se pesaron 0.0602g de norbixina y se disolvieron en un balón de fondo plano de 30mL con 10,5mL de H₂O deionizada.

2. Se tomaron 0.0348g de ciclodextrina, los cuales fueron adicionados en forma sólida a la solución de norbixina en el balón de fondo plano.
3. Se siguieron los pasos 3 al 7, igual que la metodología de encapsulamiento (1:1) ciclodextrina:norbixina
4. Finalmente se pesó el complejo de inclusión con apariencia cristalina de color rojo - anaranjado, obteniéndose 0.0361g.

5.7.3 Encapsulamiento de geraniol.

Método de encapsulamiento de geraniol 1:1 (ciclodextrina: geraniol) en moles.

1. Se pesó en vidrio de reloj, 1.2394g de ciclodextrina.
2. En otro recipiente se tomó 0.1mL (± 0.01) de geraniol con pipeta de 1mL, y se solubilizó con 1mL de etanol.
3. En un balón de fondo redondo de 25mL se agregó 12.5mL de etanol, se introdujo un agitador magnético y seguidamente se calentó en plancha hasta una temperatura de 52°C.
4. Cuando llegó el etanol a 52°C, comenzó la agitación a 100rpm y se agregó la ciclodextrina.
5. Luego de 2 minutos, se adicionó la solución de geraniol al balón de fondo redondo y se apagó el calentamiento.
6. Se tomaron 3mL más de etanol, y se lavó el recipiente de disolución de geraniol, agregando estos lavados por las paredes del balón de fondo redondo.
7. La agitación se aumentó a 300rpm y se mantuvo por 4 horas.

8. Transcurrido el tiempo de reacción, se retiró el agitador magnético, se colocó una tapa al balón de fondo redondo, y se llevó a la nevera a 4°C por 8 horas, para estabilización del complejo.
9. Luego, se conectó el balón de fondo redondo a un rota-evaporador, donde se eliminó el etanol a 90rpm, 30°C y 450mmHg.
10. Seguidamente se colocó el recipiente de reacción en estufa de recirculación de aire a 25°C por 10 horas y luego en cámara de desecación con silica gel por 3 horas más.
11. Finalmente se pesó el complejo de inclusión de geraniol, con apariencia de polvo blanco, obteniéndose 1.3140g.

6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN..

Cuadro 1. Variables en los métodos de extracción.

	EB1p POR PERCOLACIÓN	EB1 POR SOXHLET	EB2p POR PERCOLACIÓN CON NaOH 0,1%	EB2 CON H ₂ O
Temperatura máxima usada	35 °C	30 °C	45 °C	25 °C
Tiempo total de extracción	7 días	1 días	7 días	3 días
Solvente gastado	5L éter 10/20	1L CHCl ₃	4L NaOH 0.1%	500mL H ₂ O

Cuadro2. Porcentajes de obtención en los métodos de extracción.

	EB1p POR PERCOLACIÓN	EB1 POR SOXHLET	EB2p POR PERCOLACIÓN CON NaOH 0,1%	EB2 CON H ₂ O
Cantidad de fruto usado (g)	5800	2140	5800	2140
Cantidad usada de semilla (g)	1161	428	1161	428
% De obtención respecto a semilla	1,16	1,24	3,72	4,14
% De obtención respecto a fruto	0,23	0,24	0,74	0,82

En el cuadro 1 se encuentra que la extracción por soxhlet es mucho más rápida que la extracción por percolación; esto se debe a que el sistema soxhlet permite hacer varios reflujos consecutivos con el mismo solvente.

Otra ventaja del método soxhlet, es el uso de una pequeña cantidad de solvente para una gran cantidad de semillas, de esta manera en cada reflujo es el mismo solvente el que extrae mas cantidad de

colorante y con mínimas pérdidas de cloroformo por volatilización.

Es importante notar que en el sistema de extracción soxhlet, hay una variable adicional que es el vacío, lo cual es una gran ventaja respecto a cualquier sistema de extracción, ya que permite usar el cloroformo que es el solvente que solubiliza más la bixina y a una temperatura inferior a 30° C. La importancia de usar una temperatura baja en la extracción, radica en que, se debe evitar la isomerización de las moléculas de bixina, ya que podrían impedir el posterior encapsulamiento por efecto estérico; además, por exceso de calor se podrían romper los enlaces dobles en la cadena, disminuyendo potencialmente el color.

Se observa en el cuadro 2, que no hay gran diferencia en los porcentajes de obtención de los extractos apolares, lo cual indica que en cualquiera de los dos métodos a usar, se puede conseguir máxima extracción.

En el cuadro 1 se encuentra una notable diferencia en la temperatura usada para el extracto polar. Esto se debe a que en extracción con agua, se usa menor cantidad de agua, por lo tanto no es necesario rota evaporar; Contrariamente, en percolación con NaOH 0.1% se realiza una rota evaporación a 45 °C con el fin de disminuir el volumen de agua. Este factor de temperatura es importante al igual que en la extracción de bixina, porque, con menor temperatura disminuyen las posibilidades de isomerización de las moléculas y los rompimientos de los dobles enlaces.

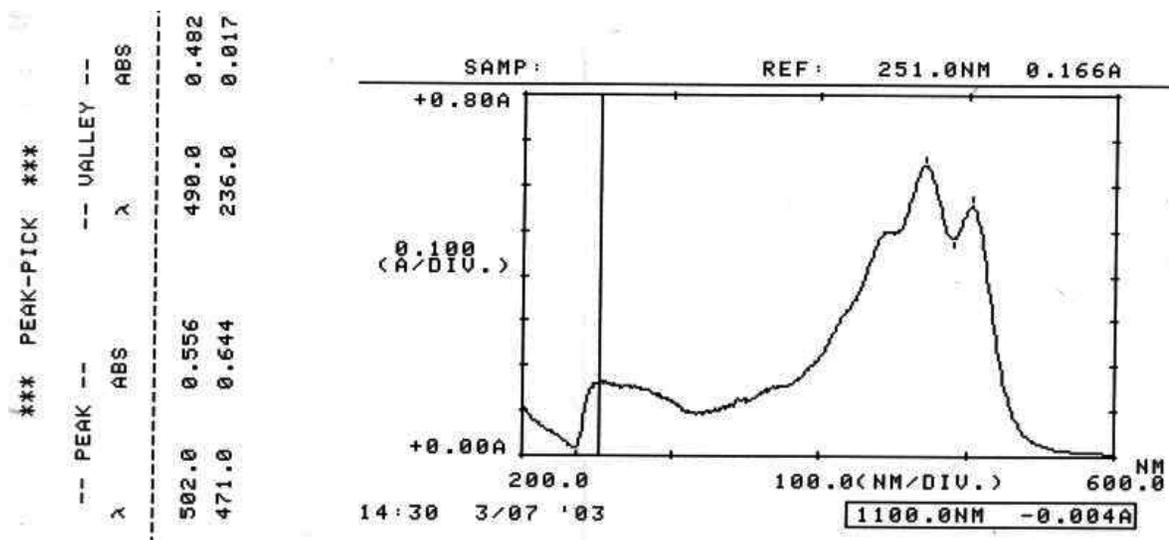
Otra de las ventajas en la extracción con agua, es su menor tiempo de operación, esto se debe a que el colorante extraído en agua se puede liofilizar directamente y luego saponificarse con un mínimo volumen de NaOH, permitiendo la manipulación de un colorante más concentrado en el resto del procedimiento; En contraposición, la percolación por 4 días con NaOH 0,1%, no se puede liofilizar toda la solución colorante porque quedaría hidróxido de sodio sólido mezclado con la norbixina.

En cuanto a los porcentajes de obtención, el cuadro 2, muestra que hay mayor obtención en la extracción con agua, posiblemente debido a una menor manipulación de la solución colorante que a su vez conlleva a menores pérdidas del material. En general el método de extracción con agua, es mucho más sencillo y rápido, con un poco más de obtención que en percolación con NaOH 0,1%, y lo mejor es que se realiza a temperatura ambiente.

6.2 ANÁLISIS DE LA EXTRACCIÓN APOLAR DE *Bixa*

Análisis de espectroscopia ultravioleta – visible del extracto apolar.

Figura 14. Espectro Uv-Vis de EB1.

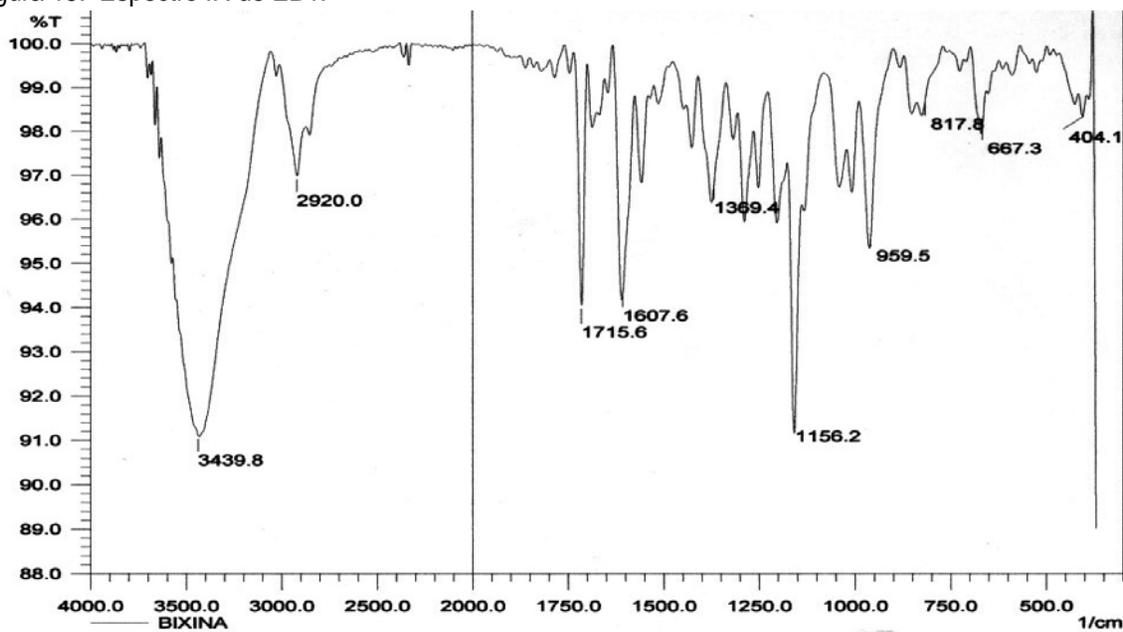


Se observa en la figura 14, que EB1 tiene las bandas características de Bixina a : 502, 471, y 440nm, además se nota la forma de carotenoide con los 3 hombros³⁹.

³⁹ GOODWIN T.W. Chemistry and biochemistry of plant pigments.

Análisis de espectroscopia infrarroja del extracto apolar.

Figura 15. Espectro IR de EB1.



Análisis de las bandas:

Para facilitar el entendimiento del espectro (figura 15), es conveniente guiarse bajo la estructura teórica de la molécula de 9'-cis-bixina que se muestra a continuación.

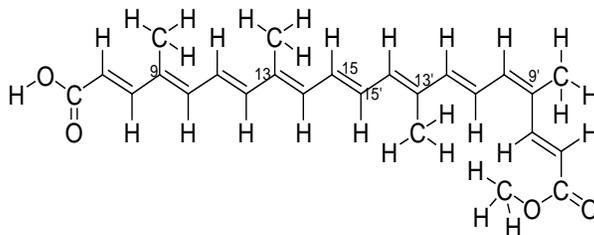
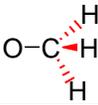
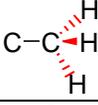
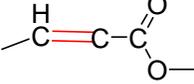
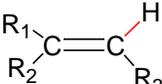
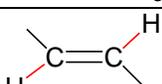
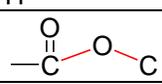
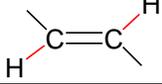
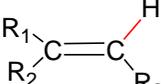
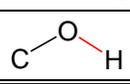


Tabla 3. Interpretación de las bandas en el IR de EB1.

<i>banda exptal</i> (cm^{-1})	TIPO DE VIBRACIÓN	ENLACE QUE CORRESPONDE A LA VIBRACIÓN	BANDA TEÓRICA (cm^{-1})
3439.8	Elongación		3650-3400 fuerte y centrada
2920.0	Elongación metilo de ester		2960 – 2850 media
2850.0	Elongación metilo en la cadena		2960 – 2850 media
1715.6	Elongación de carbonilo		1780 – 1640 fuerte
1607.6 1560	Elongación alqueno conjugado con oxígeno		1670 – 1550 media conjugadas
1400	Deformación en el plano		1440 – 1370 débil
1369.4	Deformación en el plano		1380 – 1280 débil
1156.2	Elongación		1300 – 1100 fuerte
959.5	Deformación fuera del plano		1000 - 900
817.8	Deformación fuera del plano		850 - 780
667.3	Deformación fuera del plano		750 – 650 débil

En la tabla 3, Se encuentra que EB1 tiene un espectro consistente con los grupos funcionales presentes en la molécula de bixina, además hay muy buena definición de las bandas, indicando un compuesto con un alto grado de pureza.

Análisis de los puntos de fusión del extracto apolar.

Experimentalmente se encontró para EB1:

Punto fusión = 185° C

Punto de descomposición = 220°C

Teóricamente para bixina es

189° C

217 °C

Análisis de HPLC del extracto apolar.

Condiciones cromatográficas:

$\lambda = 502\text{nm}$

Temperatura: ambiente

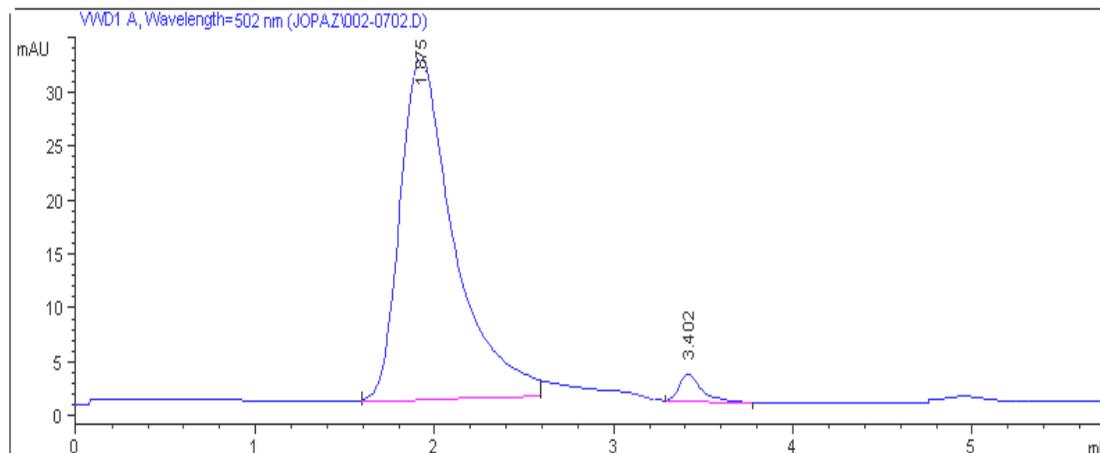
Volumen de inyección: 20,0 μL

Fase móvil: A = agua B = Acetonitrilo

Gradiente:

TIEMPO (min)	0.0	1.5	2.0	3.5	4.0	5.0	5.8 stop time
% A	100	100	70	70	70	70	
% B	0.0	0.0	30	30	30	30	
FLUJO(mL/min)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	

Figura 16. Cromatograma HPLC de EB1

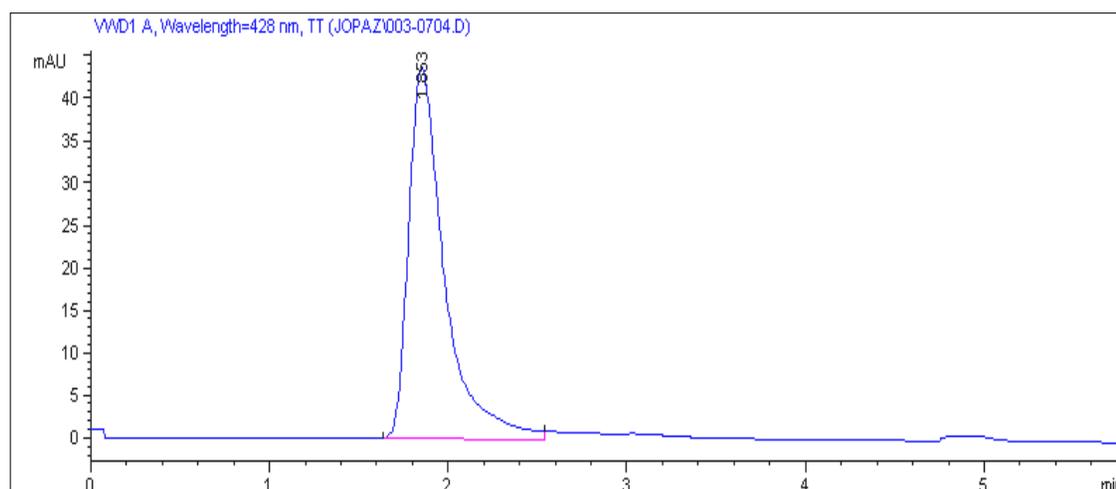


#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	1.875	485.2	32	0.2206	0.499	96.9
2	3.402	15.5	2.6	0.0886	0.67	3.1

En el HPLC de EB1 (figura 16), se observa un compuesto predominante y un compuesto que se encuentra en un porcentaje despreciable y que fácilmente no debe tomarse en cuenta. Según la muestra patrón, se ha encontrado que el compuesto principal es el 9-Cis bixin, corroborando otras investigaciones realizadas en el área.⁴⁰

Cromatograma 2 de EB1: otro cromatograma en iguales condiciones pero cambiando la longitud de onda a $\lambda = 428\text{nm}$.

Figura 17. Cromatograma HPLC de EB1 a 428nm



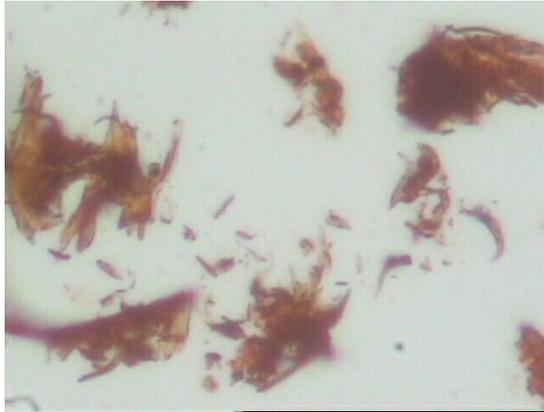
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	1.853	611.8	43.7	0.2069	0.527	100

Es importante notar que la longitud de onda en la cual aparece la banda representativa para la bixina es 502nm, demostrado con espectroscopia visible; pero hay que tener en cuenta que en esta longitud de onda el detector UV que tiene el equipo de HPLC ya no tiene una gran intensidad, es por esta razón que al tomar el mismo cromatograma pero a una longitud de onda de 428nm (figura 17), las intensidades crecen un poco ya que esta llegando mas intensidad por parte de la lámpara del detector.

⁴⁰ SCOTTER, Michael J. et al. Analysis de annatto (Bixa orellana) food coloring formulations. 1 determination of coloring components and colored thermal degradation products by high performance liquid chromatography with photodiode array detection, En: Journal of agricultural and food chemistry. Colney, United Kingdom. Vol 46, 1998; p.1031-1038.

Foto de microscopía óptica.

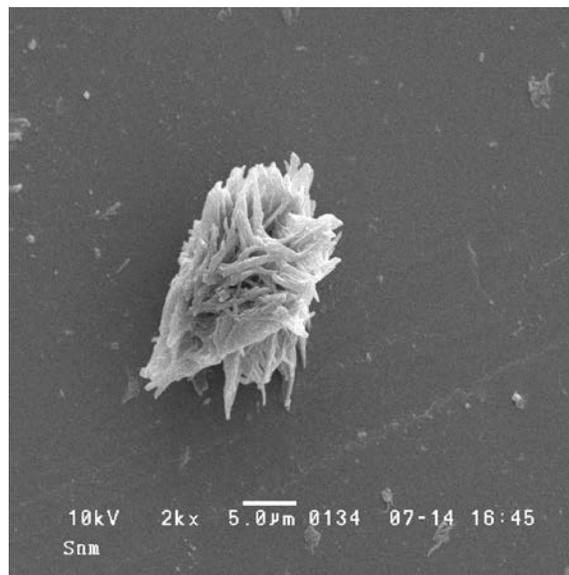
Figura 18. Foto de microscopía óptica 400x de EB1.



Se observa en la figura 18 que EB1 es un material rojo con estructura cristalina definida, lo cual coincide a grosso modo con las mismas características de la bixina.

Foto de microscopía electrónica de barrido. MEB

Figura 19. MEB de EB1

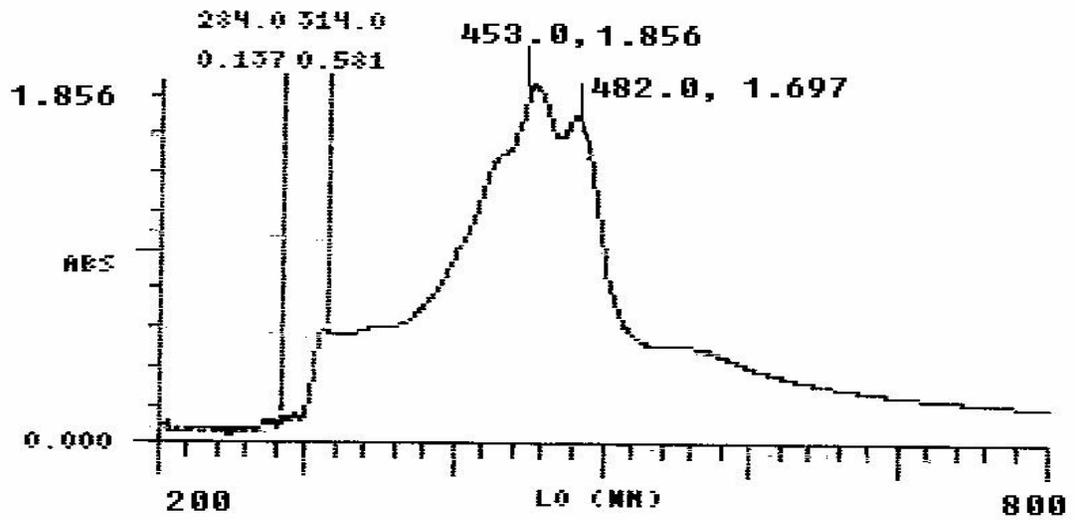


En la figura 19, se observa una micrografía de EB1, lo cual presenta una estructura con las características de cristal romboédrico, tal como lo describen para bixina (Reith, J. F., Gilen, J. W. 1971), corroborando de esta manera, la observación de cristales en la foto de microscopía óptica

6.3 ANÁLISIS DE LA EXTRACCIÓN POLAR DE *Bixa*

Análisis de espectroscopia ultravioleta – visible del extracto polar.

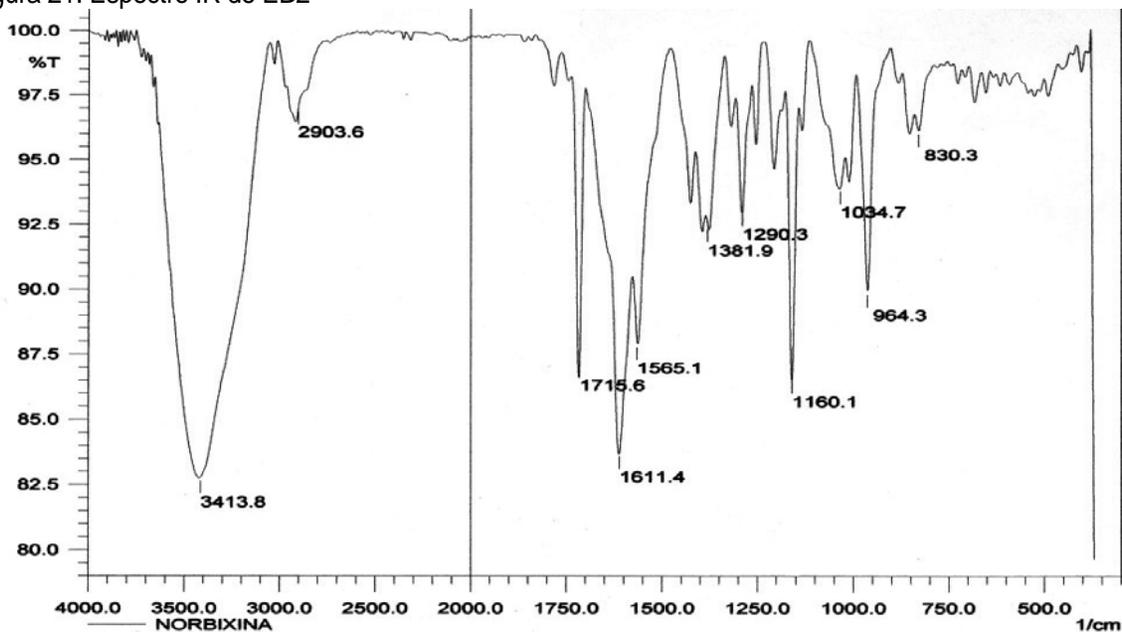
Figura 20. Espectro Uv-Vis de EB2



Se encuentra en la figura 20, que EB2 tiene las bandas principales de norbixina de: 482, 453 y 430nm en los 3 hombros representativos del caroteno.

Análisis de espectroscopia infrarroja del extracto polar.

Figura 21. Espectro IR de EB2



Análisis de las bandas:

Para facilitar el entendimiento del espectro, es conveniente guiarse bajo la estructura teórica de la molécula de 9'-cis-norbixina que se muestra a continuación.

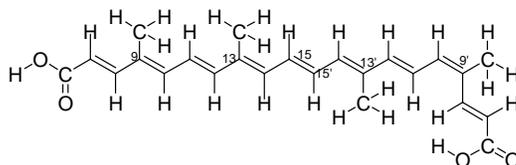
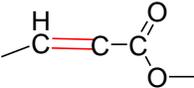
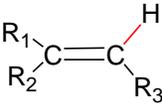
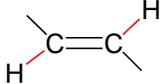
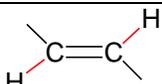
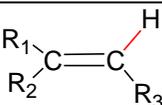


Tabla 4. Interpretación de las bandas en el IR de EB2

<i>banda exptal</i> (cm^{-1})	TIPO DE VIBRACIÓN	ENLACE QUE CORRESPONDE A LA VIBRACIÓN	BANDA TEÓRICA (cm^{-1})
3413.8	Elongación		3650-3400 fuerte y centrada
2903.6	Elongación metilo		2960 – 2850 media
1715.6	Elongación de carbonilo		1780 – 1640 fuerte

1611.4 1565.1	Elongación alqueno conjugado con oxígeno		1670 – 1550 media conjugadas
1381.9	Deformación en el plano		1440 – 1370 débil
1290.3	Deformación en el plano		1380 – 1280 débil
1160.1	Elongación		1250 - 1050 fuerte y un poco ancha
964.3	Deformación fuera del plano		1000 - 900
830.3	Deformación fuera del plano		850 - 780

Respecto al IR de EB1 (figura 15) y EB2 (figura 21), se encuentra que tienen grupos funcionales similares a bixina y norbixina respectivamente, además, son dos sustancias que aunque parecen similares, fueron extraídas por dos métodos diferentes uno apolar y otro polar, lo cual permite descartar la presencia de una misma sustancia en EB1 y EB2.

Se observa diferencia en EB1 por la presencia marcada del grupo ester. También se nota una gran diferencia entre las intensidades de las bandas de 1607,6 en EB1 y 1611,4 en EB2 pertenecientes a una elongación carbono – carbono de alqueno conjugado con oxígeno; teóricamente esta diferencia es debido a que en bixina se está conjugando el doble enlace con un grupo Ester y por lo tanto por tener menor momento dipolar su intensidad de vibración es menor, por el contrario en norbixina el doble enlace C=C se está conjugando con el grupo ácido que tiene mayor momento dipolar y por consiguiente su intensidad es mayor. En las otras bandas no se ve gran diferencia, pero se puede notar en general, que se trata de compuestos con una pureza bastante alta, ya que hay muy buena definición de las bandas representativas y no se encuentran interferencias apreciables.

Análisis de los puntos de fusión del extracto polar.

Experimentalmente se encontró para EB2:

Punto fusión = 196° C

Punto de descomposición = 210°C

Teóricamente el de norbixina es:

192

202

Análisis de HPLC del extracto polar.

Condiciones cromatográficas:

λ = 480nm

Temperatura: ambiente

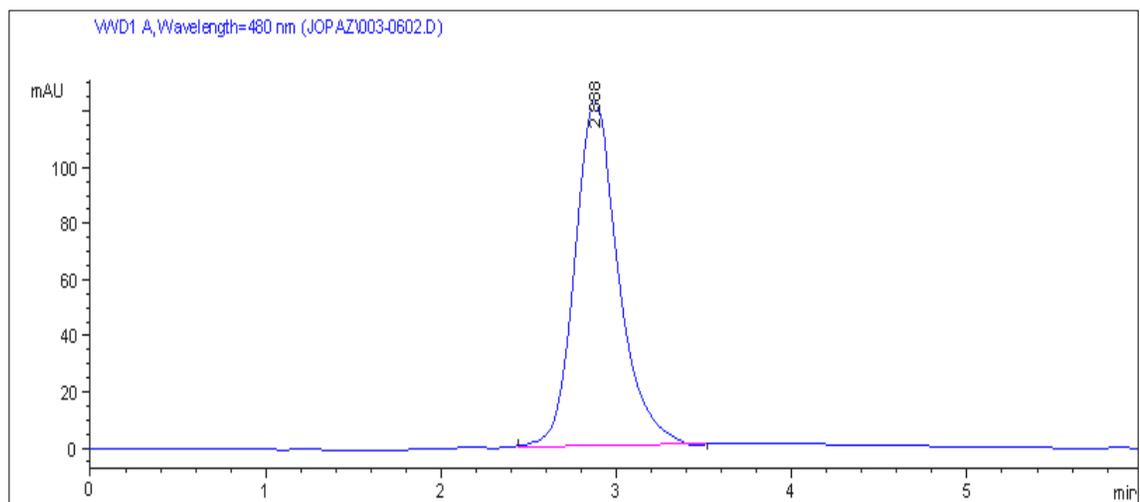
Volumen de inyección: 20,0 μ L

Fase móvil: A = agua B = Acetonitrilo

Isocrático: A = 30% B = 70%

Flujo : 0.5mL/min

Figura 22. Cromatograma HPLC de EB2

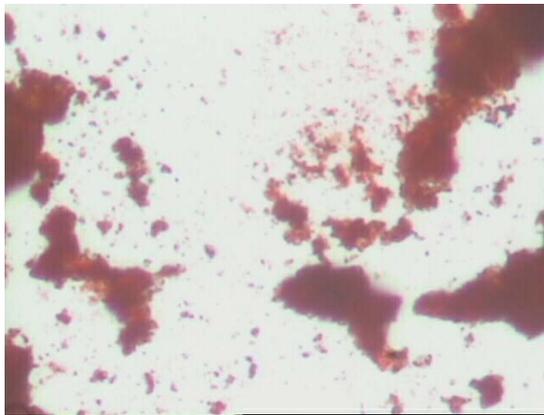


#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	2.888	2284.6	124.8	0.3218	0.788	100

Se encuentra en la figura 22, que EB2 tiene un solo pico. Según la muestra patrón, se ha encontrado que el compuesto principal es el 9-Cis norbixina, corroborando otras investigaciones realizadas en la extracción acuosa de semillas de *Bixa orellana*⁴¹.

Foto de microscopía óptica.

Figura 23. Foto de microscopía óptica 400x de EB2.

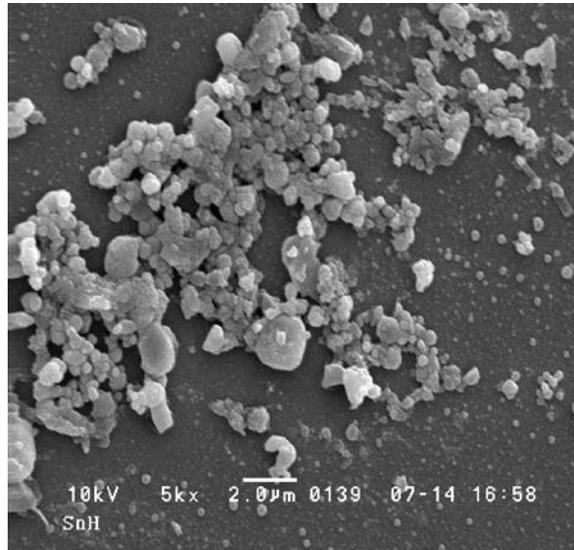


Se observa en Figura 23, un material homogéneo sin estructura cristalina definida y de color rojo, lo cual indica que EB2 presenta iguales características que norbixina, ya que ésta es amorfa, Tal como lo expresa (Reith, J. F., Gielen, J. W. 1971).

⁴¹ SCOTTER, Michael J. et al. Analysis de annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1 determination of coloring components and colored thermal degradation productos by high performance liquid chromatography with photodiode array detection, En: Journal of agricultural and food chemistry. Colney, United Kingdom. Vol 46, 1998; p.1031-1038.

Foto de microscopía electrónica de barrido.

Figura 24. MEB de EB2



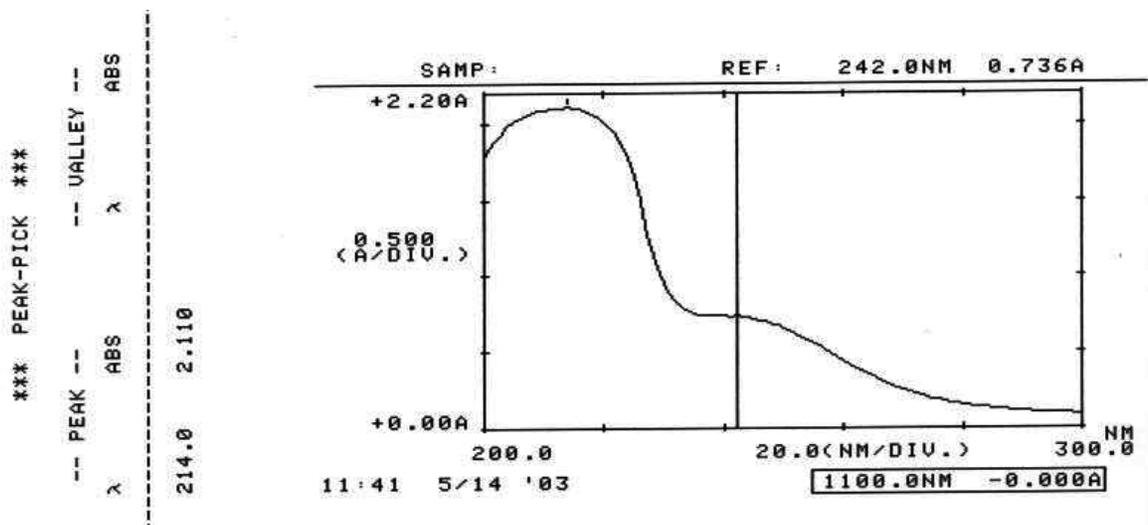
En la figura 24, se puede observar con la técnica de microscopía electrónica de barrido, un material granular sin estructura cristalina, corroborando la presencia de un material similar a la norbixina.

6.4 CARACTERIZACIÓN DE GERANIOL

Análisis de espectroscopía ultravioleta – visible.

Ampliación de la zona de máxima absorción de geraniol.

Figura 25. Espectro Uv- Vis de geraniol

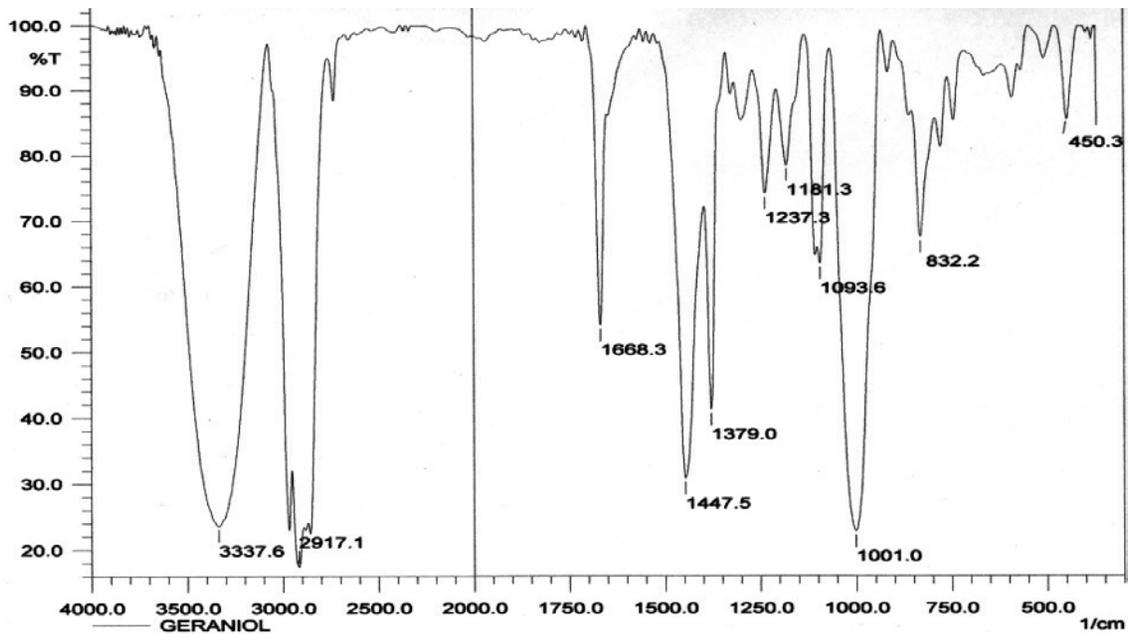


Se encontró que el espectro con sistema de barrido (figura 25), tiene una banda ancha cercana a 200nm en la región ultravioleta, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura de 194nm.⁴²

Análisis de espectroscopia infrarroja.

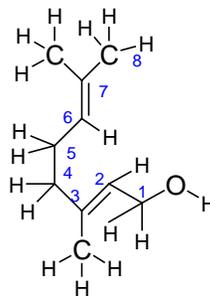
Fue tomado del liquido de geraniol, usando una cubeta de cuarzo y bajo el procedimiento de refracción en el FTIR.

Figura 26. Espectro IR de geraniol.



Análisis de las bandas:

Para un mejor entendimiento del espectro infrarrojo (figura 26), se utilizará la estructura teórica del Trans - 3,7 - Dimetil - octadienol - 2,6 (geraniol) como referencia.



⁴² BAUDI, D. Salvador. Diccionario de tecnología de los alimentos. México: Addison wesley longman, 1988.p.62,63.

Tabla 5. Interpretación de las bandas en el IR de geraniol.

<i>banda exptal</i> (cm^{-1})	TIPO DE VIBRACIÓN	ENLACE QUE CORRESPONDE A LA VIBRACIÓN	BANDA TEÓRICA (cm^{-1})
3337.6	Elongación alcohol primario		3600-3200 fuerte y ancha
3000	Elongación alqueno		3100 - 2900 media
2917	Elongación de metilos		2960 - 2850 fuerte
2840	Elongación metilenos		2960 - 2750 fuerte
1668.3	Elongación alqueno		1680 - 1660 media
1447.5	Deformación en el plano		1430 - 1500 fuerte
1379.0	Deformación en el plano alcohol 1rio		1410 - 1250 media
1237.3 1181.3	Deformación en el plano		1240 - 1080 medias conjugadas
1001.0	Elongación de alcohol conjugado con alqueno		1150 - 1000 fuerte y un poco ancha
832.2	Deformación fuera del plano		850 - 780 fuerte
750	Deformación fuera del plano		750 - 650 débil
715	Deformación fuera del plano metilenos		750 - 715 media

En la tabla 5, se nota muy bien definidas las bandas para el grupo funcional característico de alcohol primario, así como la terminación isopropílica y los dos dobles enlaces.

Análisis de los puntos de ebullición.

Experimentalmente se observó:
Punto de ebullición = 231 °C

Teóricamente:
229° C

Análisis de HPLC de geraniol.

Condiciones cromatográficas:

$\lambda = 206\text{nm}$

Temperatura: ambiente

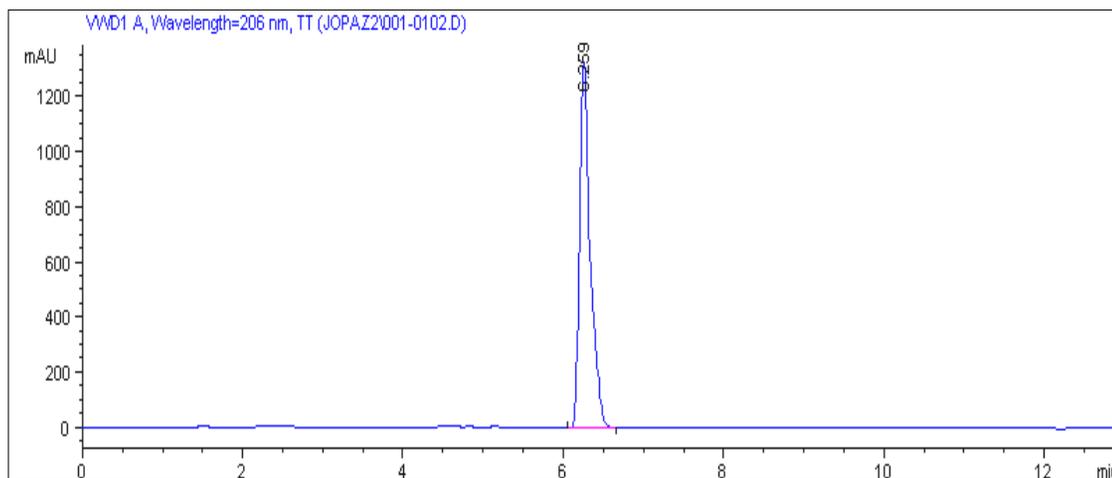
Volumen de inyección: 20,0 μL

Fase móvil : A = agua B = Acetonitrilo

Gradiente :

TIEMPO(min)	0.0	2.5	3.0	8.0	8.5	10	11	13 Stop Time
% A	100	100	40	40	0.0	0.0	100	
% B	0.0	0.0	60	60	100	100	0.0	
FLUJO(mL/min)	0.6	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

Figura 27. Cromatograma HPLC de geraniol



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	6.259	15927	1368.7	0.1514	0.493	100

El cromatograma (figura 27), muestra que el Geraniol es un compuesto puro y con unas intensidades grandísimas en 206nm, además hay que notar que en esta longitud de onda la intensidad de la lámpara UV del detector es bastante grande, lo cual ayuda para que las intensidades del pico sean bastante grandes con una mínima cantidad de muestra.

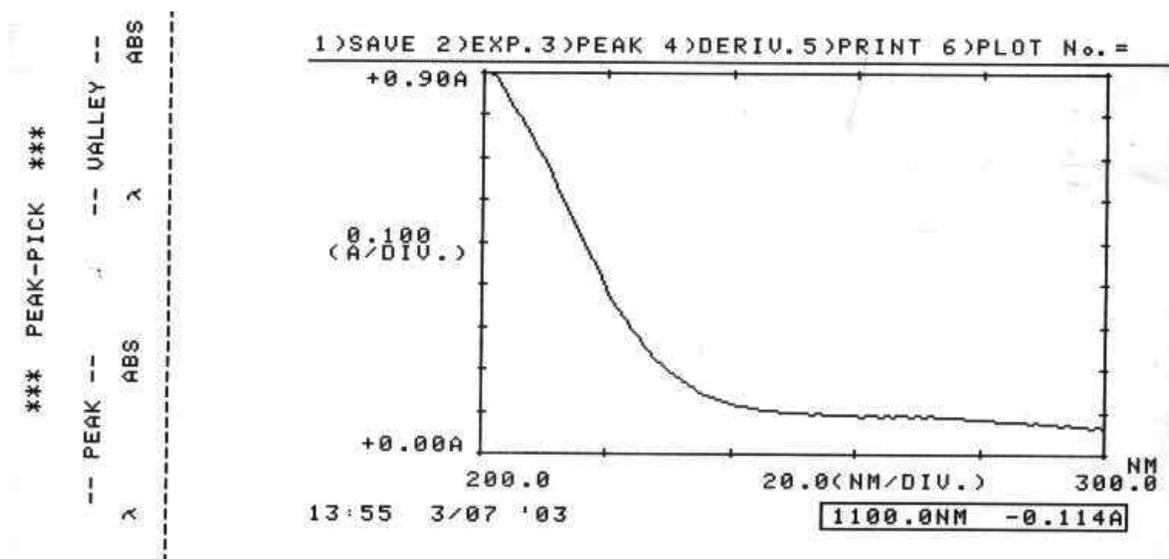
En el ANEXO 2 se encontrara la curva de calibración en HPLC para el geraniol.

6.5 CARACTERIZACIÓN DE CICLODEXTRINA

Análisis de espectroscopia ultravioleta – visible.

Ampliación de la absorbancia de la SBE7- β -CD.

Figura 28. Espectro UV- Vis de SBE7- β -CD

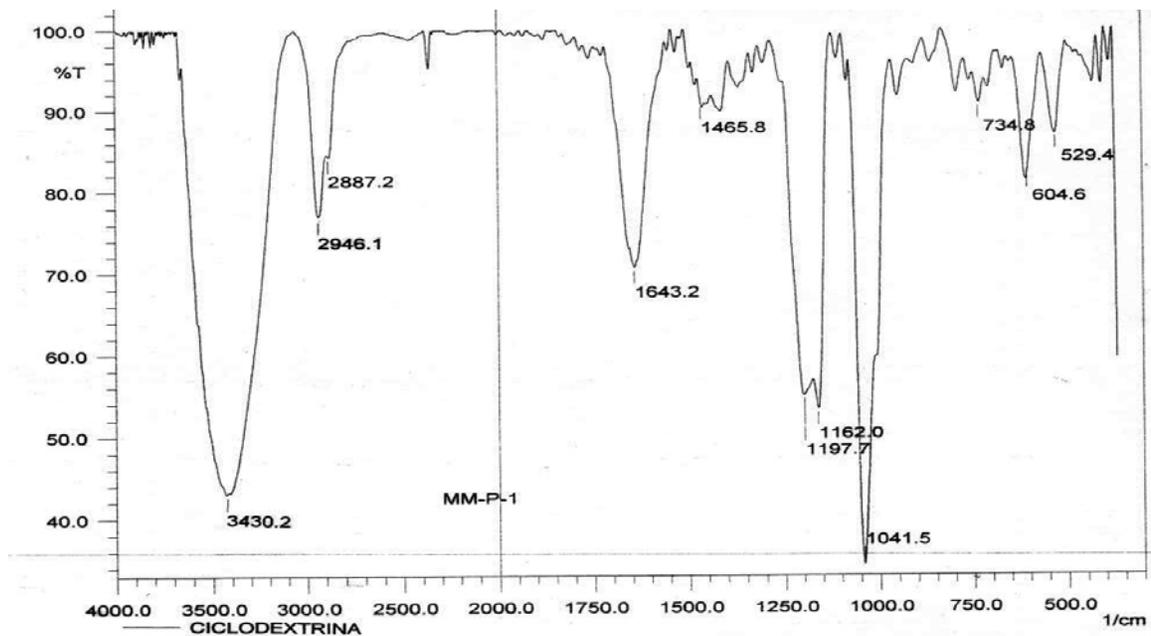


La figura 28, muestra que el espectro con sistema de barrido encontró un máximo de absorbancia en la región entre 200 y 220nm. No fue posible una mayor exploración, porque el equipo solo tiene un rango entre 1100y 200nm y además porque la región del ultravioleta llega hasta 190nm.

En el caso particular de la ciclodextrina, su absorción en la región ultravioleta se debe al grupo funcional ion sulfonato que hace parte de la ramificación en la β -ciclodextrina y que además es el grupo que favorece su gran solubilidad en el agua.

Análisis de espectroscopia infrarroja.

Figura 29. Espectro IR de SBE7- β -CD



Análisis de las bandas:

Para un mejor entendimiento del espectro infrarrojo (figura 29), se utilizará la estructura teórica de la Sal sódica de Sulfobutil éter - β -Ciclodextrina, SBE7- β -CD usada en las reacciones de encapsulamiento.

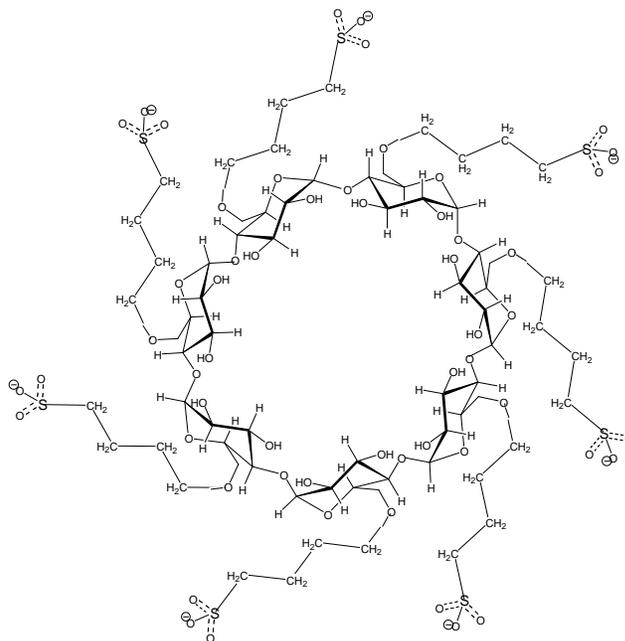
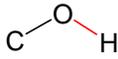
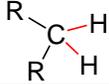
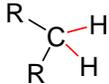
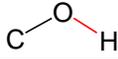
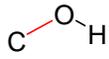
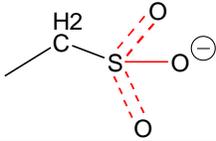
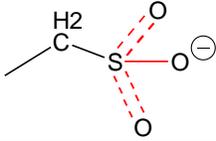
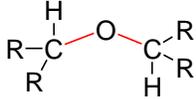
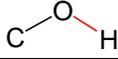
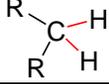
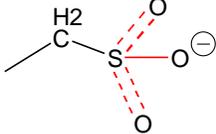


Tabla 6. Interpretación de las bandas en el IR de SBE7 – β -CD.

<i>banda exptal</i> (cm⁻¹)	tipo de VIBRACIÓN	ENLACE QUE CORRESPONDE A LA VIBRACIÓN	BANDA TEÓRICA (cm⁻¹)
3430.2	Elongación alcohol 2rio		3600-3200 amplia y centrad
2946.1	Elongación metilénicos		2800 – 3000 fuerte
2887.2	Elongación metinicos		2900 – 2800 media
1643.2	Elongación		1650 –1580 media
1465.8	Deformación metilénicos		1480 – 1440 fuerte
1410	Deformación en el plano alcohol 2rio		1410 – 1250 débil
1197.7	Elongación		1250 – 1050 media y un poco ancha
1162.0	Deformación lon sulfonato		1260 – 1160 fuerte
1070	Deformación lon sulfonato		1100 – 1010 media
1041.5	Elongación Éter dialquílico, o cíclico saturado		1150 – 1050 fuerte
760	Deformación fuera del plano		750 – 650 débil
734.8	Deformación fuera del palno		750 – 720 media
604.6 529.4	Deformación		>625 débil

En la tabla 6, se observan bandas muy bien definidas, y representativas de todos los grupos funcionales de la molécula de sulfobutil éter β -ciclodextrina.

Análisis de los puntos de fusión.

Experimentalmente se encontró:	Teóricamente
Punto de fusión = 245 °C	236 ° C
Punto de descomposición = 265°C	270 ° C

Análisis de HPLC de SBE7- β -CD.

Condiciones cromatográficas:

λ = 206nm

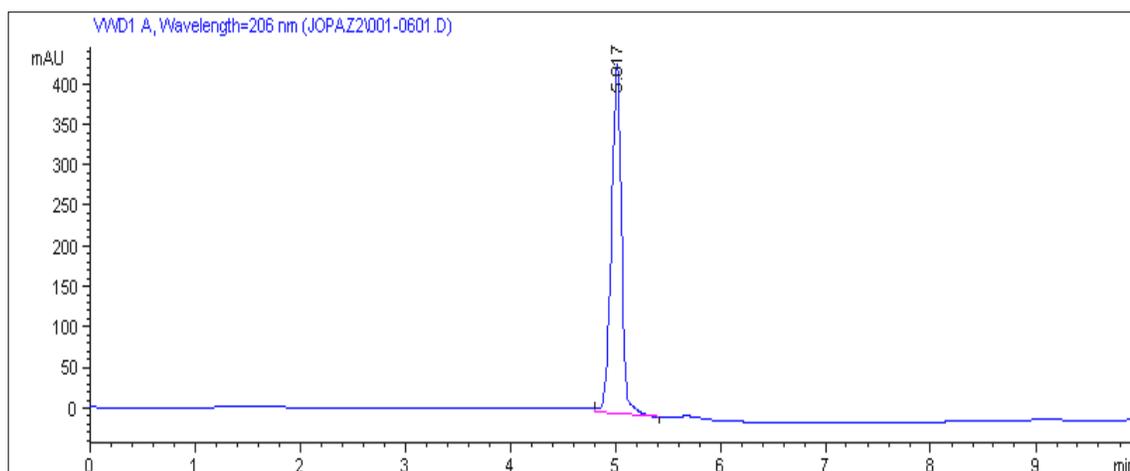
Temperatura: ambiente

Volumen de inyección: 16.0 μ L

Fase móvil: A = agua B = Acetonitrilo

TIEMPO(min)	0.0	3.0	3.5	5.5	6.0	10 Stop Time
% A	10	10	100	100	10	
% B	90	90	0.0	0.0	90	
FLUJO(mL/min)	0.6	0.6	1.0	1.0	0.6	

Figura 30. Cromatograma HPLC de SBE7 – β -CD



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	5.017	2999.2	431.6	0.1046	1.149	100

El cromatograma de SBE7- β -CD (figura 30), muestra que la ciclodextrina es un compuesto puro y que presenta un alto grado de respuesta a 206nm, debido a que en esta longitud de onda la intensidad de la lámpara UV del detector es bastante grande, lo cual ayuda para que las intensidades del pico sean bastante grandes con una mínima cantidad de muestra.

En el ANEXO 3 se encuentra la curva de calibración por HPLC para la SBE7- β -CD.

Foto de microscopía óptica.

Figura 31. Foto microscopía óptica 100x de SBE7- β -CD



Figura 32. Foto microscopía óptica 400x de SBE7- β -CD



Se aprecia claramente en la Figura 31 la forma redonda de la ciclodextrina, y en la figura 32 la cavidad de cada uno de los aglomerados.

6.6 ANÁLISIS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE ENCAPSULAMIENTO

Tabla 7. Datos de encapsulamientos

Relación inicial cdx:huped	Huésped teórico (g)	Huésped experimental (g)	Huésped en el complejo(g)	%Huésped en el complejo	Cdxtrina teórica (g)	Cdxtrina experimental (g)	Total complejo teórico(g)	Total Complejo Expetal(g)	% De rendimiento	Relación final cdx:huesped
 1:1	0.0316	0.0311	0.0231	74.3	0.1742	0.1740 HPLC0.1314	0.1971	0.1882	95.5	1,36:1 1,03:1
0.5:1	0.0631	0.0631	0.0103	16.3	0.1742	0.1741	0.1844	0.1778	96.4	3.06:1
0.25:1	0.0631	0.0631	0.0053	8.4	0.0871	0.0870	0.0923	0.0883	95.6	3.02:1
0.1:1	0.0631	0.0631	0.0015	2.37	0.0348	0.0345	0.0360	0.0350	97.0	4.16:1
 101:1	0.0304	0.0301	0.0301	100	0.1742	0.1740 HPLC0.1751	0.2041	0.1930	94.6	1:1 1,016:1
0.5:1	0.0604	0.0601	0.0154	25.6	0.1742	0.1740	0.1894	0.1804	95.2	1.97:1
0.25:1	0.0604	0.0602	0.0050	8.30	0.0871	0.0870	0.0920	0.0887	96.4	3.04:1
0.1:1	0.0604	0.0602	0.0028	4.65	0.0348	0.0348	0.0376	0.0361	95.8	2.17:1
 1:1	0.0878	0.0974 HPLC	0.0974	110%	1.2394	1.2903 HPLC	1.3272	1.3140	99	0.94:1 HPLC

g CDX x $\frac{1\text{mol CDX}}{2177.46\text{g}}$, g Bixina x $\frac{1\text{mol}}{394.52\text{g}}$, g Norbixina x $\frac{1\text{mol}}{380.48\text{g}}$, g Geraniol x $\frac{1\text{mol}}{154.24\text{g}}$

-  Datos para el acomplejamiento de bixina
-  Datos para el acomplejamiento de norbixina
-  Datos para el acomplejamiento de geraniol

 Representa los datos de los mejores encapsulamientos, los cuales, se les practico todas las pruebas analíticas.

En el anexo 4 se encuentran los cálculos para la explicación de los datos de la tabla 7.

Los métodos de encapsulamiento fueron modificados varias veces hasta encontrar las mejores condiciones posibles, estas modificaciones permitieron que se aumentara la cantidad de huésped

encapsulado, con una menor temperatura y evitando utilizar aparatos muy sofisticados, con el fin de facilitar la conversión de la metodología al nivel industrial.

Debido a la experiencia ganada en la elaboración de los diferentes métodos de encapsulamiento, se encontró la manera de determinar perceptivamente si se realizó el encapsulamiento, esto, antes de confirmar analíticamente. Es así como en el caso de bixina, por percepción óptica se dice que hay encapsulamiento cuando el solvente del huésped se ha volatilizado completamente y dicho huésped pasa a la solución acuosa de ciclodextrina, tornándola de color rojo. En el caso de norbixina, en el que se utilizó el mismo solvente para solubilizar el huésped y la ciclodextrina, por percepción óptica se dice que hay total encapsulamiento cuando no hay precipitado del huésped. Finalmente en el caso del aceite esencial geraniol, nuestra percepción olfativa nos indica, que hay acomplejamiento cuando al finalizar la reacción, se encuentra un sólido blanco sin la característica olorosa del huésped; esto ocurre porque no hay presión de vapor y tampoco volatilización de las moléculas del aceite esencial.

De otra parte, también se encontró una estrecha relación entre la característica apolar del huésped, con el volumen de disolución de ciclodextrina y la agitación. Esto obedece a que las moléculas apolares tienden a quedarse en el medio apolar y a asociarse entre ellas, por consiguiente disminuye notablemente la interacción con la ciclodextrina. Este efecto fue solucionado, aumentando los volúmenes de disolución de ciclodextrina, las revoluciones de agitación y el tiempo de reacción, todo esto con el fin de obtener una buena dispersión de las moléculas huésped y un mayor tiempo de interacción con la ciclodextrina.

En los ensayos de encapsulamiento de bixina, se encontró, que entre todos los solventes apolares usados, el cloroformo es el que tiene una mayor capacidad de solubilización, además es un solvente que tiene una alta presión de vapor, lo cual facilita su eliminación mientras se agita rápidamente toda la mezcla. El otro solvente usado fue la acetona, el cual solubilizó una pequeña fracción de bixina del magneto y que se adicionó nuevamente a la mezcla de ración. La acetona fue un solvente muy apropiado en este paso de la reacción, porque no desencapsuló la bixina que ya estaba acomplejada, además por su máxima solubilidad también con el agua, pudo formar una sola fase con la mezcla acuosa y el resto de bixina sin encapsular.

Otro factor que no tuvo muchas variaciones pero que de igual forma fue importante, es el pH. Aunque en los ácidos orgánicos la constante de acidez es muy grande, se quiso favorecer la permanencia de la

forma protonada en las estructuras de bixina y norbixina, esto con el fin de evitar la formación de un anión que podría impedir la entrada de dichos huéspedes en la cavidad apolar de la ciclodextrina. Cuantitativamente se muestra en la tabla 7, que se encontró una relación de ciclodextrina: bixina (1:1) en moles, del cual solo el 74,3% pudo ser encapsulado; pero satisfactoriamente fue el mejor porcentaje de encapsulamiento realizado. También se encontró que el método realizado disminuye enormemente las pérdidas de material ya que su porcentaje de rendimiento fue del 95.4%.

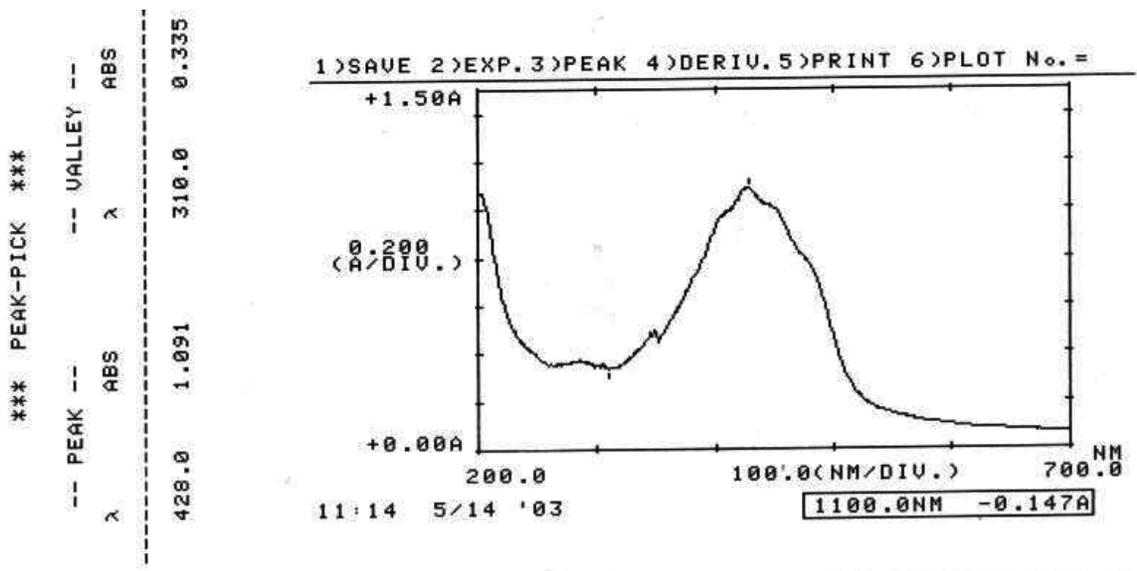
El mejor encapsulamiento con norbixina, fue el realizado con una relación (1:1) en moles de ciclodextrina: norbixina, arrojando gravimétricamente un 100% de encapsulamiento. Además, siendo totalmente diferente al método de encapsulamiento de bixina, también tiene un porcentaje de rendimiento bastante bueno de 94.6%, lo cual indica que las pérdidas de material en el proceso de encapsulamiento fueron mínimas.

En el caso del geraniol, el porcentaje de encapsulamiento se determinó por HPLC, lo cual se muestra mas adelante, pero el porcentaje de rendimiento hallado gravimetricamente, muestra un 99%, lo cual indica que el método usado para encapsular geraniol, evita casi en su totalidad las pérdidas del material. Químicamente se podría decir que es algo realmente bueno, teniendo en cuenta que se trata de un aceite esencial bastante volátil.

6.7 ANÁLISIS DEL ENCAPSULAMIENTO DE BIXINA

Análisis de espectroscopia ultravioleta – visible.

Figura 33. Espectro UV- Vis del complejo de bixina.



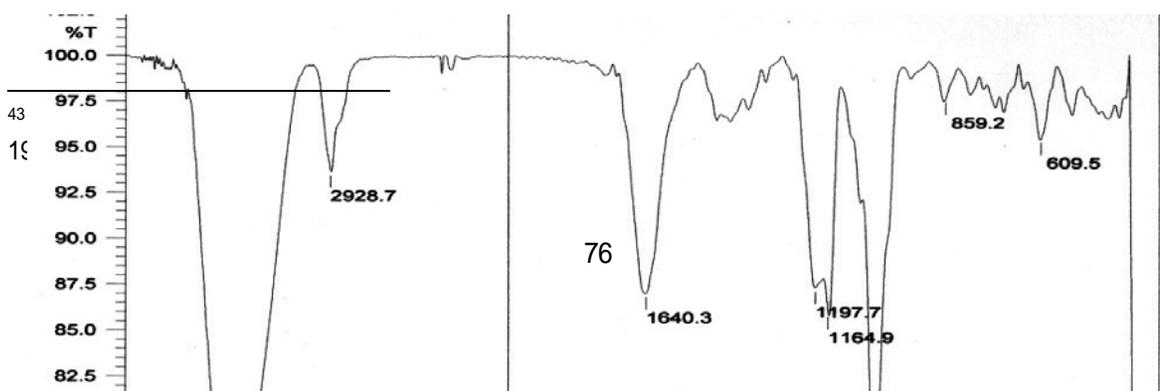
En la figura 33, se aprecia notablemente, como después de encapsulada la bixina, se mantienen sus características estructurales en solución, y el corrimiento de banda ocasionado por una menor energía vibracional producto del encapsulado. Se ven bandas principales en 450, 428, 406nm en los 3 hombros.

En los espectros de bixina y su complejo de inclusion, se ve notoriamente un desplazamiento de la banda a menor longitud de onda, comúnmente llamado corrimiento batocromático; este corrimiento ha sido estudiado por muchos investigadores, comenzando por **Cramer** en 1951 y se cree que puede originarse debido a que hay una alta densidad electrónica prevalente dentro de la cavidad de la ciclodextrina que puede movilizar los electrones de las moléculas huésped incluidas, resultando en un cambio de varias propiedades espectrales tanto para el huésped como para la ciclodextrina misma. Estos estudios han sido realizados principalmente en otras moléculas colorantes apolares de tipo organometálico como (Mo,Zn,Co)-tiocianatos.⁴³

Análisis de espectroscopia infrarrojo.

Se ha encontrado un espectro con características diferentes a las correspondientes a bixina, pero aun el complejo de inclusion sigue siendo rojo como la bixina original.

Figura 34. Espectro IR del complejo de bixina.



Análisis de las bandas:

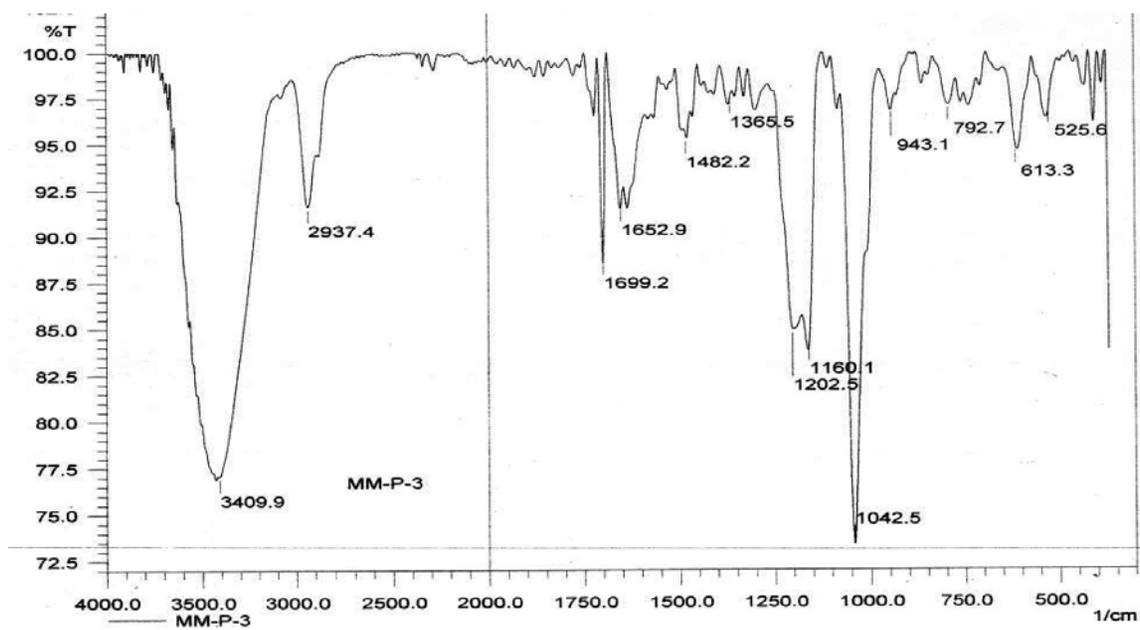
Se encuentra en la figura 34, un espectro infrarrojo igual al espectro de ciclodextrina Figura 29, por lo tanto se recomienda ver este último para comprender el significado de las bandas.

ACOMPLEJAMIENTOS FALLIDOS:

Como prueba de acomplejamientos fallidos se muestran 2 espectros infrarrojo con 2 relaciones molares diferentes de ciclodextrina.

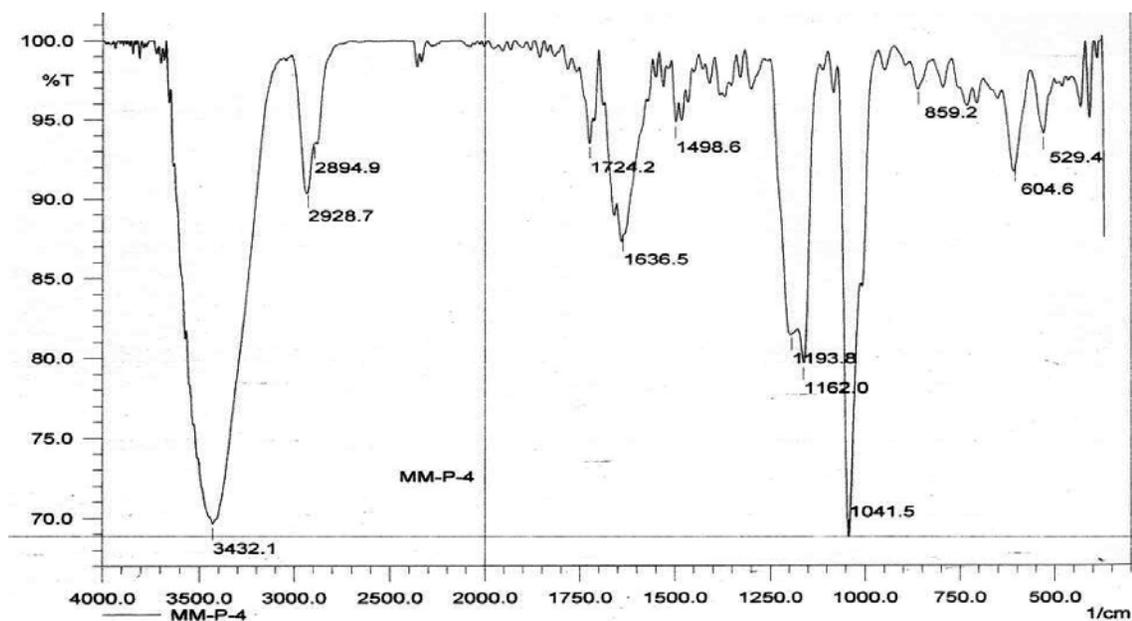
Acomplejamiento fallido 0,25:1 ciclodextrina: bixina

Figura 35. Espectro IR de acomplejamiento fallido de bixina (0.25:1)



Acomplejamiento fallido 0,5:1 ciclodextrina: bixina

Figura 36. Espectro IR de acomplejamiento fallido de Bixina (0.5:1)



La figura 35, corresponde al producto final de una reacción de acomplejamiento 0,25:1 en moles de ciclodextrina: bixina, aquí se muestra un compuesto con bandas similares a la ciclodextrina, pero además con una banda de bixina a 1699.2 que corresponde posiblemente a una elongación C=O de carbonilo. Contrariamente a lo que se ve en el acomplejamiento total de bixina, ya que no es visible la banda del carbonilo. Experimentalmente se encontró que este acomplejamiento fallido no muestra solubilidad de la bixina en agua.

En la figura 36, la otra relación de 0,5:1 en moles de ciclodextrina: bixina también se observa la banda posiblemente de carbonilo a 1724,2 pero ya un poco menos intensa, en este acomplejamiento fallido la bixina tampoco presenta solubilidad en agua.

Análisis de los puntos de fusión.

Experimentalmente se encontró

Punto de fusión = 240°C

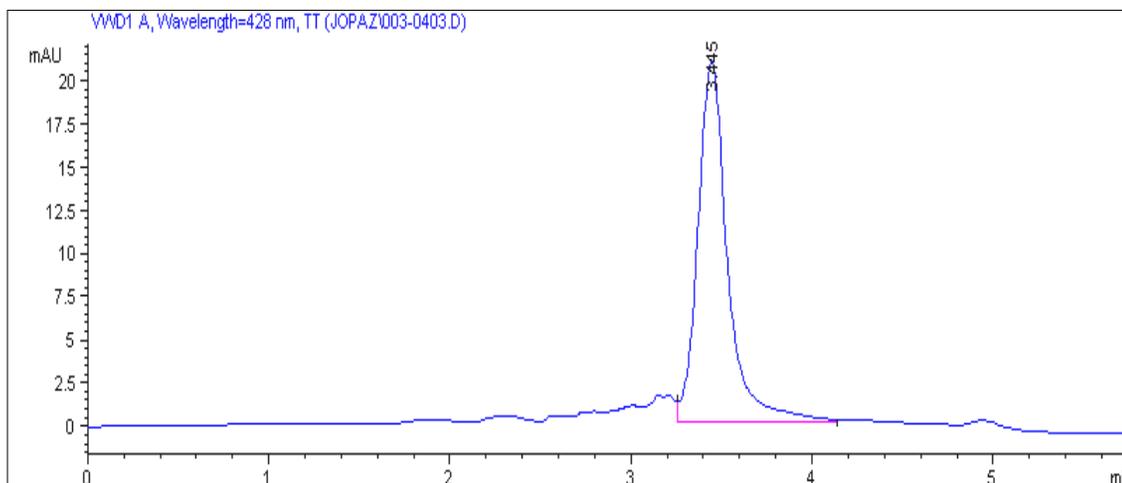
Punto de descomposición = 255°C

Análisis de HPLC del complejo de bixina (1:1) en moles ciclodextrina: bixina.

Las condiciones cromatográficas para el complejo de inclusion de bixina son iguales que para la bixina pura, esto con el fin de cuantificar la bixina que tal vez no se encapsulo en la reacción.

$\lambda = 428\text{nm}$, analizado previamente en barrido UV –VIS.

Figura 37. Cromatograma HPLC para el complejo de bixina



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	3.445	238.6	20.9	0.1713	0.776	100

Debido a que el complejo de inclusion tiene una banda con máximo de 428nm producto del acomplejamiento con la ciclodextrina, se hace necesario también, tomar un cromatograma de la bixina pura a 428nm para determinar el tiempo de retención y compararlo con el del complejo de inclusion, este cotejamiento indicará si el complejo de inclusion presenta el mismo tiempo de retención de la bixina pura y si por el contrario fueren diferentes existiría la posibilidad de cuantificar la bixina que no encapsulo dentro de la reacción de acomplejamiento.

Se encontró que la bixina pura tiene un tiempo de retención muy diferente al tiempo de retención del complejo de inclusión de bixina (Figura 37), además también se encuentra que en este último, solo hay un pico representativo lo cual indica que no existe bixina sin reaccionar dentro del producto final en la reacción de acomplejamiento.

De esta manera no es necesario realizar una curva de calibración en HPLC para cuantificar la bixina sin reaccionar, porque cromatográficamente no se encuentra, pero si se puede hallar por gravimetría la bixina que no se solubilizo, tomando en cuenta la cantidad que se quedo retenida en el papel filtro, tal como se indico en el procedimiento.

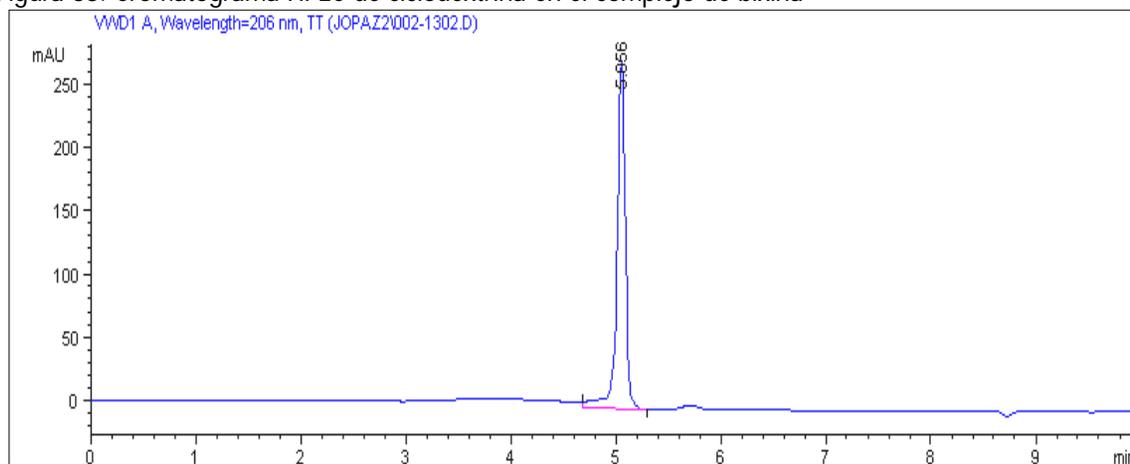
se determinara también la ciclodextrina remanente en cada uno de los complejos de inclusión para cuantificar mediante curva de calibración

✿ *Cuantificación de ciclodextrina en el complejo de bixina.*

Condiciones Cromatográficas:

Como se trata de determinar la ciclodextrina que no esta acomplejada, se usa las mismas condiciones que en el cromatograma del ciclodextrina pura.

Figura 38. Cromatograma HPLC de ciclodextrina en el complejo de bixina



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	5.056	1640.9	275.3	0.1012	1.4	100

En la reacción de acomplejamiento de bixina se encontró gravimetricamente que una parte de la bixina adicionada inicialmente no se solubilizo en agua por el encapsulamiento con ciclodextrina y precipitó. De esta manera se cree que si inicialmente había una relación en moles de 1:1 ciclodextrina : Bixina,

entonces ahora al final de la reacción debe de haber ciclodextrina libre producto del incompleto encapsulamiento.

Por esto se determinó en HPLC (figura 38) y el método de curva patrón (anexo 3) la cantidad de ciclodextrina libre, o mas químicamente, la ciclodextrina que tiene iguales características a la ciclodextrina pura.

De esta cuantificación se encontró que hay 0.0426g de ciclodextrina en el complejo de inclusion que tienen características parecidas a una ciclodextrina pura. Teniendo en cuenta que la cantidad de partida de la reacción de acomplejamiento fue de 0.1740g, se calcula que la cantidad encontrada corresponde a un 25,5%.

De otro lado, se analiza que hay un 75,5% o 0,1314g del material inicial de ciclodextrina que no tiene las características de una ciclodextrina libre, es decir, se encuentra formando un complejo de inclusión con la bixina. Esta teoría se pudo comprobar gracias a que gravimetricamente se cuantifico exactamente cuanta bixina quedo sin solubilizar y cuanta quedo solubilizada en agua por el acomplejamiento, de lo cual se tiene que 0.0231g de bixina corresponden a $5.8552E^{-5}$ moles y que 0.1314g de ciclodextrina corresponden a $6.0345E^{-5}$ moles, es decir, una relación casi de 1:1 en moles y de 17.6% en peso de bixina respecto a ciclodextrina.

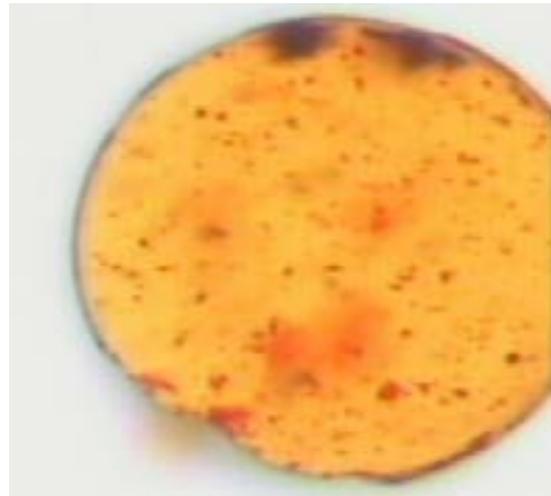
Foto de microscopia óptica.

Figura 39.
Foto ampliada 400x del complejo con relación

Figura 40.
foto ampliada 400x del complejo con relación

1:1 ciclodextrina: bixina

0.1 :1 ciclodextrina: bixina

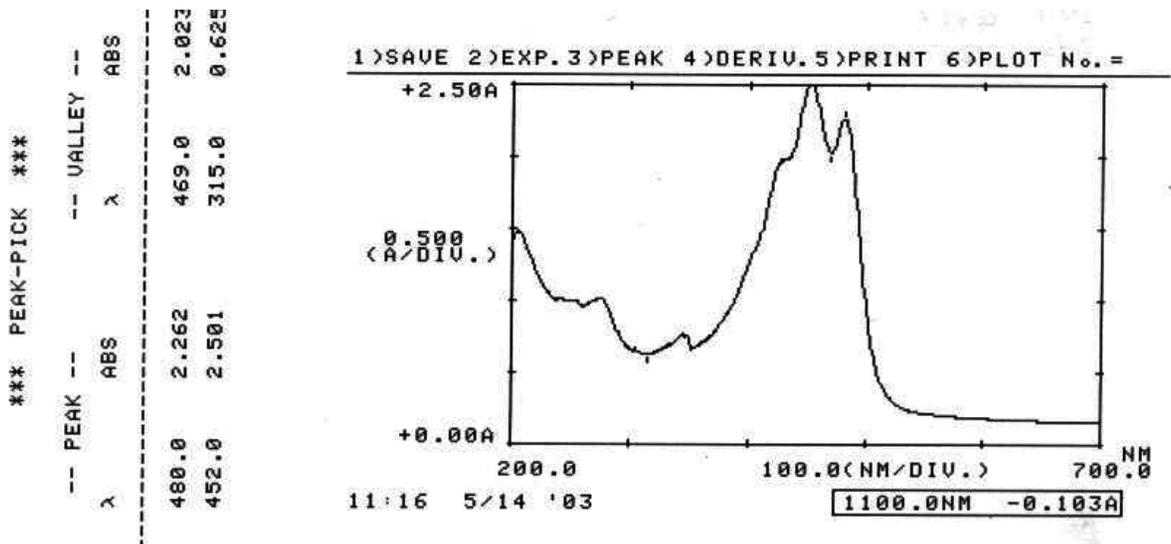


Se observa como al aumentar la cantidad de ciclodextrina en el encapsulamiento, la bixina queda más acomplejada, permitiendo obtener cristales rojos más oscuros.

6.8 ANÁLISIS DEL ENCAPSULAMIENTO DE NORBIXINA

Análisis de espectroscopia ultravioleta – visible.

Figura 41. Espectro Uv – Vis del complejo de norbixina

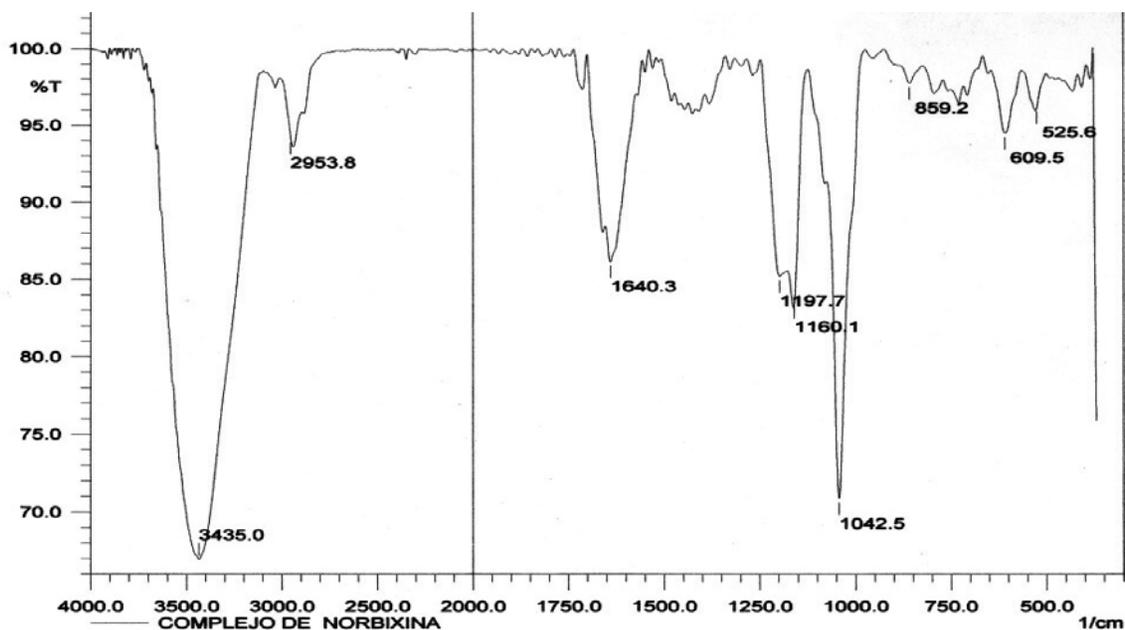


Se puede observar en la figura 41, que no hay corrimiento de la banda de norbixina por el acomplejamiento, pero sigue teniendo las mismas características estructurales, por la forma de los 3 hombros carotenoides.

En los complejos de inclusión de norbixina, tal vez no se da dicho desplazamiento de banda ya que la norbixina no es de carácter apolar; Para asegurar esta inferencia, es necesario ampliar la investigación en el campo, ya que hasta el momento no se tiene conocimiento de que es lo que pasa con este otro tipo de moléculas.⁴⁴

Análisis de espectroscopia infrarrojo.

Figura 42. Espectro IR del complejo de norbixina.



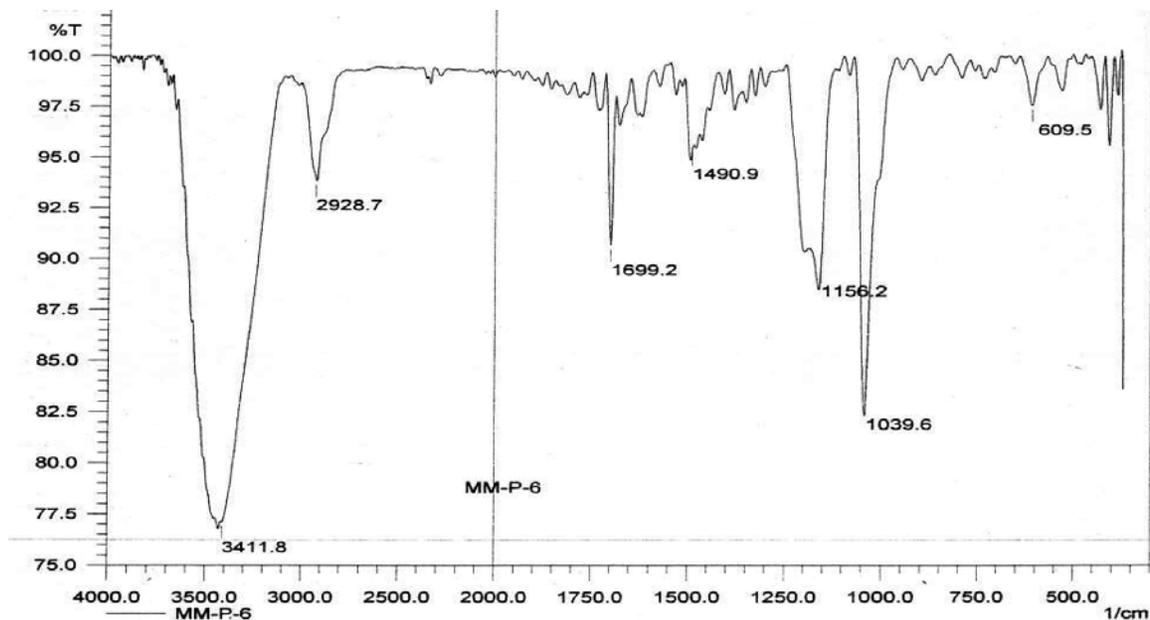
Las características de este espectro (figura 42) difieren enormemente respecto de las de norbixina (figura 21), pero concuerdan muy bien con el espectro de ciclodextrina (figura 29) visto anteriormente; aunque visualmente el complejo muestre un polvo rojo.

⁴⁴ LAJOS SZENTE, JÓZSEF SZEJTLI, Non chromatographic analytical uses of cyclodextrins, En: The analyst reviews, april 1998, vol 123 pg 735 – 741.

acomplejamientos fallidos:

Como prueba de acomplejamientos fallidos de norbixina, se muestra 1 espectro infrarrojo de la relación 0,25:1 en moles ciclodextrina: norbixina.

Figura 43. Espectro IR del acomplejamiento fallido de norbixina (0.25:1)



El encapsulado con norbixina en relación 0,25: 1 en moles ciclodextrina: norbixina (figura 43), aparece la posible banda de carbonilo a 1699,2 muy definida, indicando que la parte del grupo funcional ácido en la punta de la cadena de carbonos de norbixina se encuentra por fuera de la ciclodextrina, esto se manifiesta experimentalmente al tener un punto de fusión y de descomposición igual a la norbixina sin encapsular.

Análisis de los puntos de fusión. Relación (1:1)

Experimentalmente se encontró.

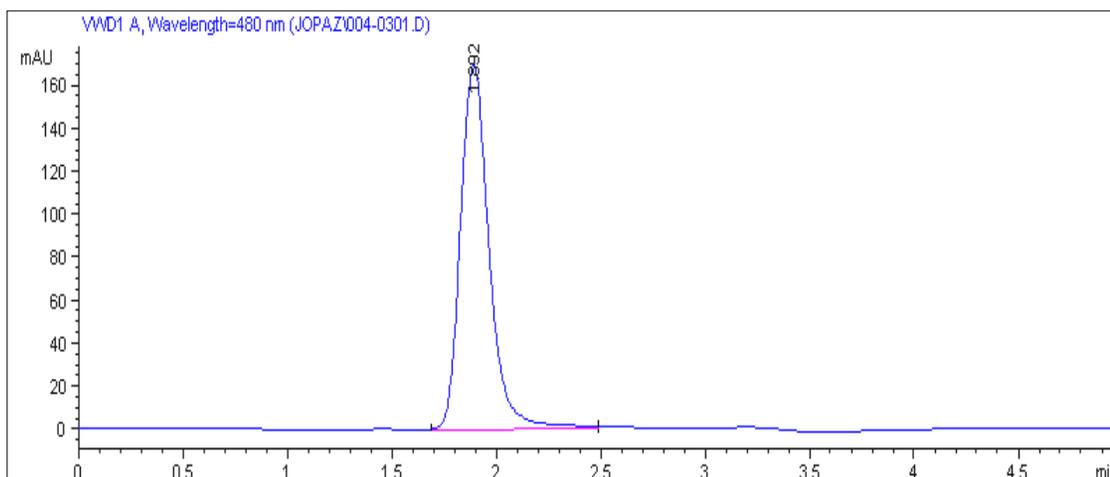
Punto de fusión = 255 °C

Punto de descomposición = 275°C

Análisis de HPLC del complejo de norbixina (1:1) en moles, ciclodextrina: norbixina.

Usando las mismas condiciones cromatográficas que en la norbixina pura, se realiza el cromatograma del complejo de inclusion de norbixina; por análisis anteriores en UV-VIS se ha encontrado que tanto la norbixina como el complejo de inclusion tienen un máximo de absorbancia en la misma longitud de onda (480nm).

Figura 44. Cromatograma HPLC para el complejo de norbixina



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	1.892	1624.6	170.2	0.1463	0.771	100

Observando la figura 44, se infiere que a esta longitud de onda hay un compuesto que no corresponde a la norbixina pura (figura 22), porque el tiempo de retención es diferente, y que tampoco corresponde a la ciclodextrina porque esta no tiene absorbancia en esta longitud de onda según análisis de UV-VIS (figura 28), por lo tanto solo nos queda la posibilidad de que este pico corresponda al complejo de inclusion de la norbixina, corrido a menor tiempo de retención puesto que por estar unido a una ciclodextrina le da un mayor carácter polar y consecuentemente así salir primero que la norbixina pura un poco menos polar.

También queda visto que en la reacción de inclusion, no queda norbixina sin encapsular ya que no hay presencia de picos en los alrededores de $t_r = 2.888$, por lo tanto no se puede cuantificar norbixina sin encapsular por curva de calibración, pero si se puede estimar por gravimetría, teniendo en cuenta la norbixina que quedó en el papel filtro en el inicio del procedimiento, como se indico anteriormente.

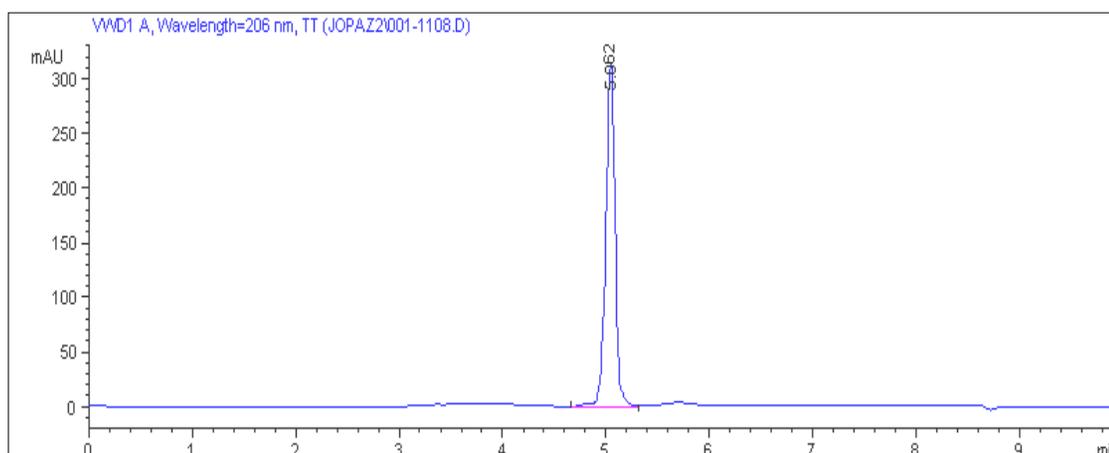
Se determinara también la ciclodextrina remanente en el complejos de inclusion de norbixina, para cuantificar mediante curva de calibración

✿ Cuantificación de ciclodextrina en el complejo de norbixina.

Condiciones Cromatográficas:

Las condiciones son iguales a las usadas en el cromatograma de ciclodextrina pura (figura 30)

Figura 45. Cromatograma HPLC de ciclodextrina en el complejo de norbixina.



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	5.062	1988.1	314.6	0.0941	1.172	100

Se observa en la figura 45, que el complejo de inclusion de norbixina, tiene una cantidad de ciclodextrina libre, que puede ser cuantificada con una curva de calibración de ciclodextrina (Anexo 3).

En la cuantificación por HPLC y curva patrón se encontró que la cantidad de ciclodextrina presente en el complejo de inclusion de norbixina es de 0.1751g, lo cual se acerca bastante al valor tomado experimentalmente con balanza analítica en el inicio de la reacción, que es de 0.1740g. De esta manera se puede inferir que la ciclodextrina presente en el complejo de inclusion tiene características parecidas a la ciclodextrina pura, reteniéndose a través de la columna cromatográfica con interacciones semejantes. De igual forma se puede pensar que la manera como esta encapsulada la molécula de norbixina en la ciclodextrina es totalmente diferente a la molécula de bixina ya que esta ultima es de carácter apolar y puede estar totalmente dentro de la cavidad de la ciclodextrina, como se explica

teóricamente. A diferencia, la norbixina es de carácter polar, con sus dos extremos carboxílicos en la estructura, por esto se cree que su inclusión en la ciclodextrina a sido parcial, es decir, solo un apequeña parte de la norbixina a quedado unida a la molécula de ciclodextrina, resultando en un complejo de inclusion que posee en su mayoría las características de una ciclodextrina pura.

De otra parte, se asegura por medio de esta cuantificación, que se sigue manteniendo en el complejo de inclusion la relación en moles de 1:1 ya que 0.1751g de ciclodextrina equivalen a $8.0414E^{-5}$ moles y la cantidad de norbixina sigue siendo de 0.0301g que equivalen a $7.911E^{-5}$ moles, esta misma relación se cuantifica en porcentaje en peso como de 17.2% de norbixina respecto a ciclodextrina.

Foto de microscopia óptica.

Figura 46.

Foto ampliada 400x, del complejo con relación 1:1 ciclodextrina: norbixina

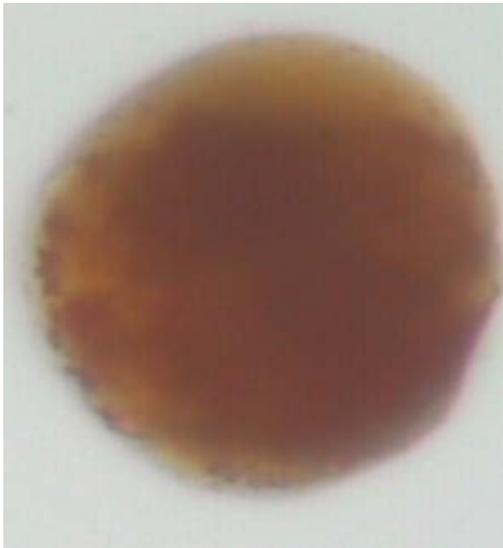
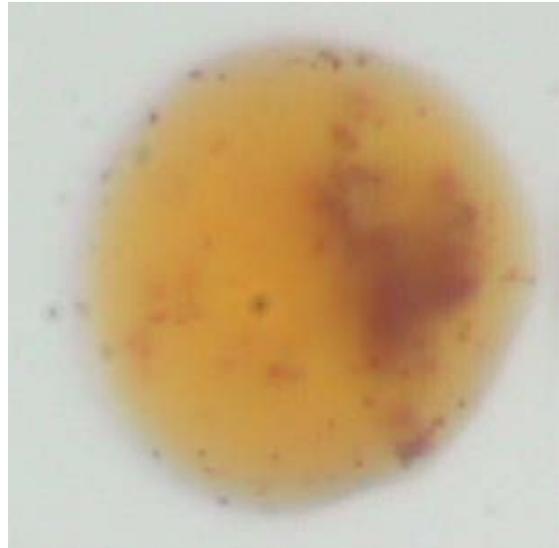


Figura 47.

Foto ampliada 400x, del complejo con relación 0,1:1 ciclodextrina: norbixina

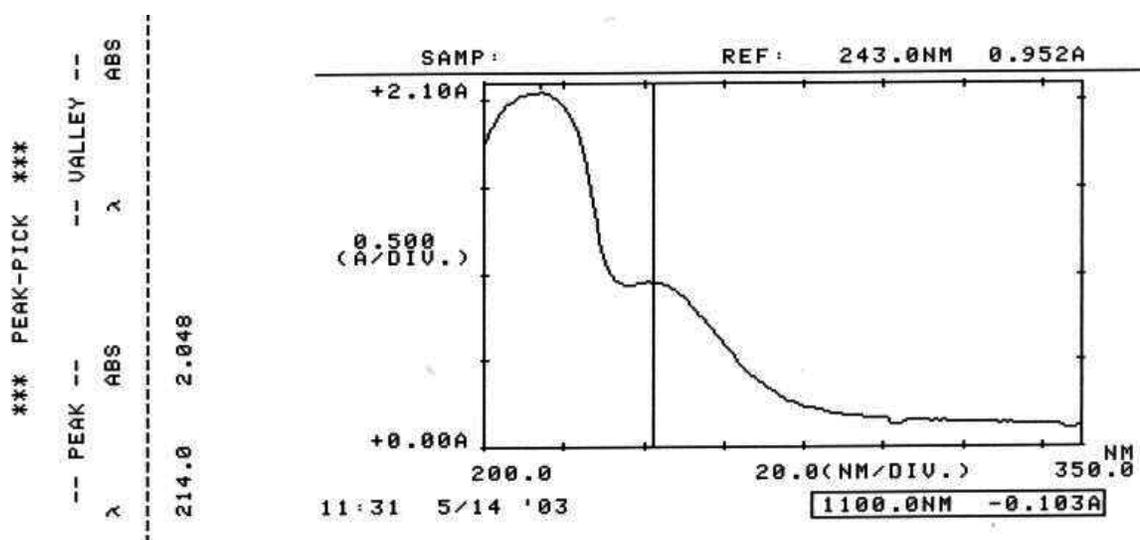


Se observa como al aumentar la cantidad de ciclodextrina en la reacción de inclusion, también hay un aumento en la coloración rojo de las partículas del complejo, indicando un mayor encapsulamiento del huésped norbixina.

6.9 ANÁLISIS DEL ENCAPSULAMIENTO DE GERANIOL

Análisis de espectroscopia ultravioleta – visible.

Figura 48. Espectro Uv. Vis del complejo de geraniol.



Se encuentra una gran similitud entre los espectros de geraniol (figura 25) y su complejo de inclusion (figura 48), demostrando esto que, el aceite esencial liquido, mantiene sus características estructurales en el complejo sólido.

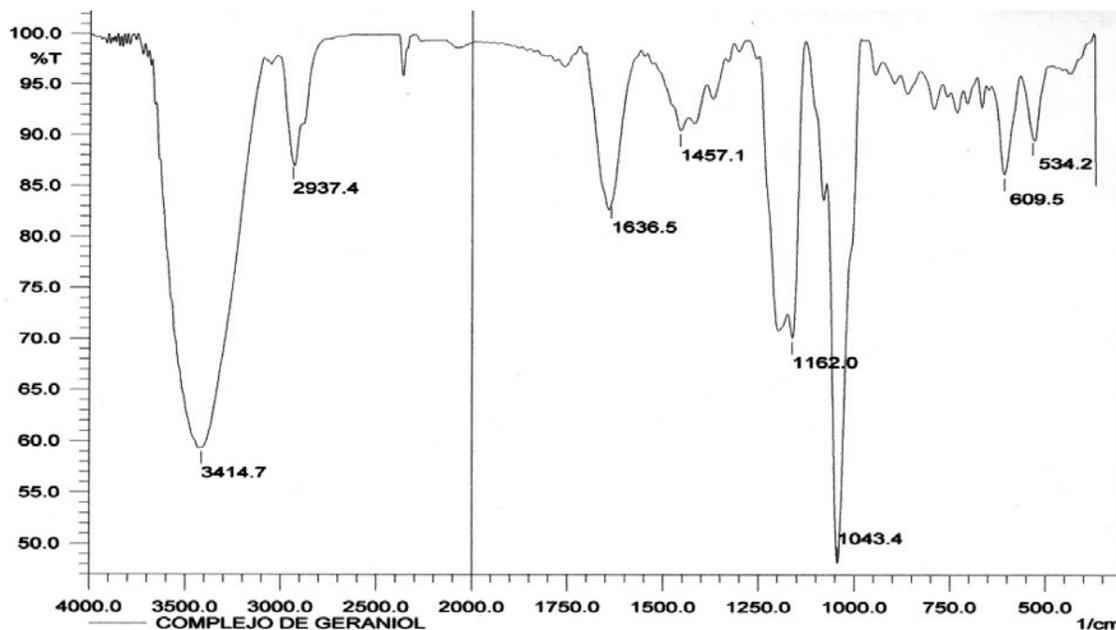
En el complejo de inclusión de geraniol, tal vez no se da dicho desplazamiento de banda porque su absorción en el ultravioleta ya se encuentra a una longitud de onda muy baja del espectro. Para asegurar esta inferencia, es necesario ampliar la investigación en el campo, ya que hasta el momento no se tiene conocimiento de que es lo que pasa con este otro tipo de moléculas.⁴⁵

⁴⁵ LAJOS SZENTE, JÓZSEF SZEJTLI, Non chromatographic analytical uses of cyclodextrins, En: The analyst reviews, april 1998, vol 123 pg 735 – 741.

Análisis de espectroscopia infrarrojo.

Aunque el geraniol es líquido, éste complejo de inclusion es de forma sólida, una gran característica de los encapsulados de aceites esenciales. Debido a éste estado sólido se pudo realizar el espectro en forma de pastilla y no en cubeta de cuarzo como el geraniol puro.

Figura 49. Espectro IR del complejo de geraniol.



Como era de esperarse, el complejo de inclusion de geraniol (figura 49) al igual que los complejos de bixina (figura 34) y norbixina (figura 42), presentan las características del espectro de ciclodextrina (figura 29), pero no, las de su propia estructura. Se recomienda ver nuevamente el espectro de ciclodextrina para analizar las bandas.

Análisis de los puntos de fusión.

Experimentalmente se encontró

Punto de fusión = 240 °C

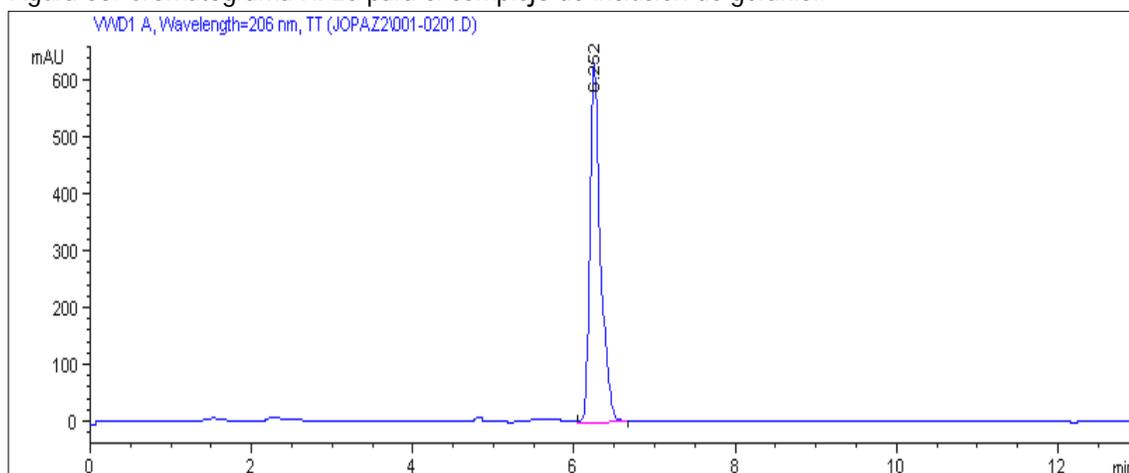
Punto de descomposición = 265°C

Análisis de HPLC del complejo (1:1) en moles, ciclodextrina: geraniol.

✿ Cuantificación de geraniol en el complejo de inclusion:

El cromatograma del complejo de inclusion se realizó con las mismas condiciones usadas en el cromatograma del geraniol puro, incluso la longitud de onda es igual, ya que se encontró por análisis en espectroscopia UV-VIS que este complejo no presenta desplazamiento a menores longitudes de onda.

Figura 50. Cromatograma HPLC para el complejo de inclusion de geraniol.



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	6.252	6619.4	632.6	0.1512	0.51	100

Se encontró que al disolver el complejo de inclusion de geraniol en el solvente agua:metanol (6:4), para inyectar en el cromatógrafo, hubo una liberación de geraniol del complejo, favoreciendo así que se presente el mismo tiempo de retención en el cromatograma. De esta manera se hace posible cuantificar la cantidad de geraniol presente en el complejo sólido por medio de una curva estándar (anexo 2).

Para la cuantificación de geraniol presente en el complejo de inclusion en estado sólido, se uso la técnica de cromatografía liquida de alta resolución HPLC, junto con el método de curva patrón. Los resultados muestran que existe 0.11mL de geraniol en todo el complejo de inclusion final, mientras que experimentalmente se tomo un valor de 0.1mL(± 0.01) medido con pipeta graduada de 1mL, esta medición conlleva a un error instrumental de la pipeta en la cual se puede tener 0.11mL o 0.09mL para el caso de medir 0.1mL. Por esto se llega a la conclusión de que la cantidad de geraniol presente en el complejo de inclusion en estado sólido, es igual a la cantidad agregada inicialmente en la reacción. De

esta manera se puede inferir que el método encontrado para este encapsulamiento evita la pérdida de huésped en el transcurso de la reacción y de su obtención final, además de que, probablemente puede estar totalmente encapsulado dentro de la ciclodextrina, formando así el estado sólido.

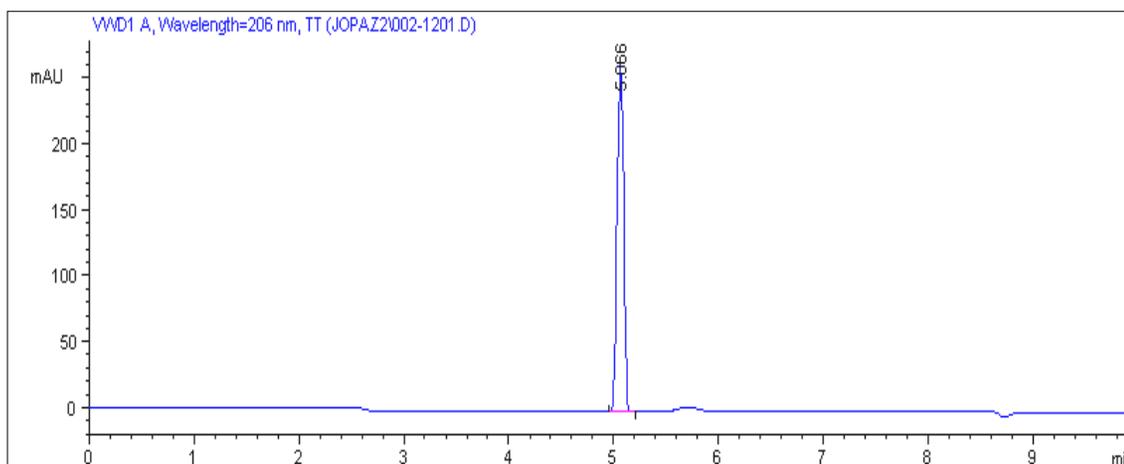
Se determina también la ciclodextrina remanente en el complejo de inclusión de geraniol, para cuantificar mediante curva de calibración

✿ Cuantificación de ciclodextrina en el complejo de geraniol:

Condiciones cromatográficas:

Son iguales que en el cromatograma de ciclodextrina pura.

Figura 51. Cromatograma HPLC de ciclodextrina en el complejo de geraniol



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry	%
1	5.066	1337.3	268	0.0905	1.011	100

Hay que notar que aunque el geraniol puro también tiene un máximo representativo en la longitud de onda de 206nm (figura25), no se puede ver en este cromatograma ya que el gradiente de la fase móvil es totalmente diferente; mediante éste cromatograma se pretende ver, la ciclodextrina libre (sin encapsular), producto del exceso en la reacción y que será cuantificado por curva de calibración (anexo 3).

Con la cuantificación de ciclodextrina usando HPLC y el método de curva patrón, se encontró la cantidad de 1.2903g de ciclodextrina en el complejo de inclusión que tienen características similares a la

ciclodextrina pura por su interacción con la fase estacionaria. Teniendo en cuenta que la cantidad inicial tomada experimentalmente para el acomplejamiento fue de 1.2394g , se calcula una diferencia mínima del 4% pero que no altera significativamente la relación en moles con el huésped. Según el cromatograma de cuantificación de geraniol en el complejo de inclusion, se analizó como al solubilizar el complejo sólido en el solvente agua:metanol (6:4), había ocurrido una liberación del huésped, por su gran energía cinética, alta presión de vapor y por estar en disolución con un solvente que contiene metanol que es menos polar que el agua, e ideal para solubilizar aceites esenciales. En resumen, se puede inferir que debido a la disolución del complejo de geraniol sólido en el solvente agua:metanol, se pudo cuantificar tanto ciclodextrina como geraniol y mostrar así que la relación en moles de 1:1 se mantiene, ya que 0.0974g de geraniol equivalen a $6.3148E^{-4}$ y 1.2903g de ciclodextrina corresponden a $5.9257E^{-4}$ moles, esta misma relación se cuantifica en porcentaje en peso como de 7,5% de geraniol respecto a ciclodextrina. Teóricamente es aceptable este valor ya que autores como (Reinecius, G. A., Coulter, S. T.) muestran un máximo del 9% en peso para otros aceites esenciales.

Foto de microscopia optica.

Foto ampliada 400x, del complejo con relación 1:1 Ciclodextrina: Geraniol.

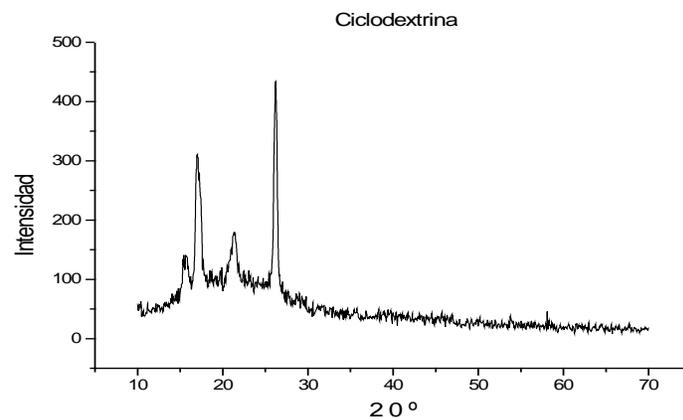
Figura 52. Foto microscopía óptica 400x del complejo de geraniol.



Se puede apreciar en la figura 52, dos estructuras diferentes, la primera es grande, circular y con cavidad correspondiente a la ciclodextrina, la segunda es más pequeña circular, también incolora y se encuentra dentro de la primera estructura, correspondiente al geraniol.

6.10 ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Figura 53. DRX de ciclodextrina.



Difractogramas de bixina y su complejo de inclusion.

Figura 54. DRX de bixina.

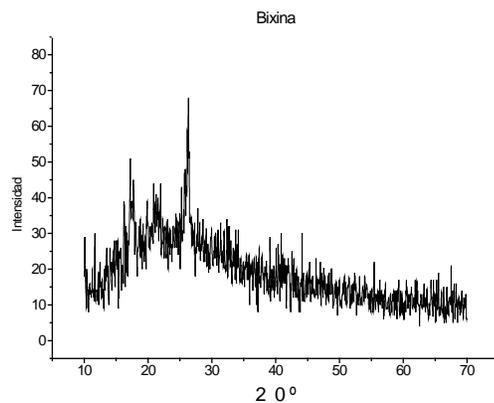
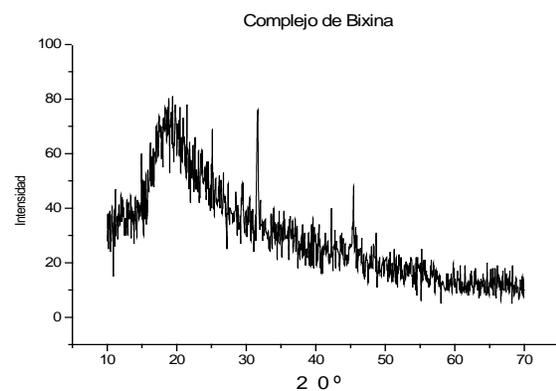


Figura 55. DRX del complejo de bixina.



Difractogramas de norbixina y su complejo de inclusion.

Figura 56. DRX de Norbixina

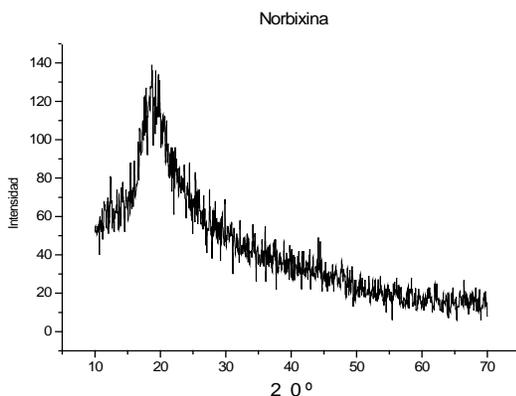
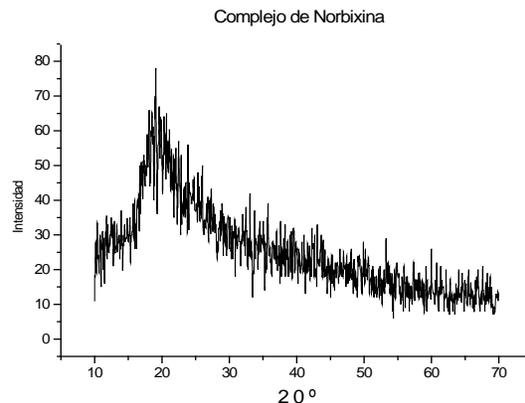


Figura 57. DRX del complejo de norbixina



Las ciclodextrinas y sus derivados pueden ser cristalizados del agua y examinados por cristalografía de rayos X como moléculas “ huecas” o como complejos de inclusion.

Dependiendo del tamaño y carácter iónico o molecular del sustrato, son formadas las estructuras “acanaladas” o “enjauladas” en las cuales las moléculas de ciclodextrina están apiladas como monedas en un rollo o dispuestas en un modelo espina de pez.

El análisis de la estructura en un solo cristal por rayos X es el mejor método para la determinación de la formación del complejo. Se puede establecer una precisa relación geométrica entre la molécula huésped y el hospedador, además de la identificación de sus interacciones. Esta técnica es, de esta forma, muy complicada para uso rutinario⁴⁶.

En general la identificación de la formación de un complejo, por rayos X, se basa en que, si la difracción del compuesto resultante no corresponde a las de los componentes puros, es porque puede existir un verdadero complejo de inclusion.

Con relación a estos análisis realizados anteriormente por (Saenger, W. 1980), se encontró que hay una alta probabilidad de haber realizado los encapsulamientos de bixina y norbixina. Ya que en el primer caso

⁴⁶ SAENGER, W.; Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. In: Angewandte chemie internacional, Vol 19, n. 5, 1980, p. 347,350.

(bixina), el difractograma del supuesto complejo de bixina (figura 55) es diferente a los de Ciclodextrina (figura 53) y Bixina (figura 54) .

Igualmente en el difractograma del supuesto complejo de norbixina (figura 57) se ve una diferencia total con el difractograma de ciclodextrina (figura 53) y una gran disminución en la intensidad respecto al difractograma de norbixina (Figura 56). Lo que demuestra que, en este caso la inclusión no se ha realizado totalmente, si no que se realizó parcialmente dejando una fracción de la molécula de norbixina fuera de la estructura de ciclodextrina, implicando que los difractogramas tanto del complejo como de norbixina tengan una señal parecida, pero disminuida en intensidad por la ciclodextrina.

6.11 ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE HUÉSPEDES Y COMPLEJOS

Análisis de *Calorimetría de barrido diferencial (DSC)* .

Figura 58. Comparación de los DSC de bixina, norbixina y ciclodextrina.

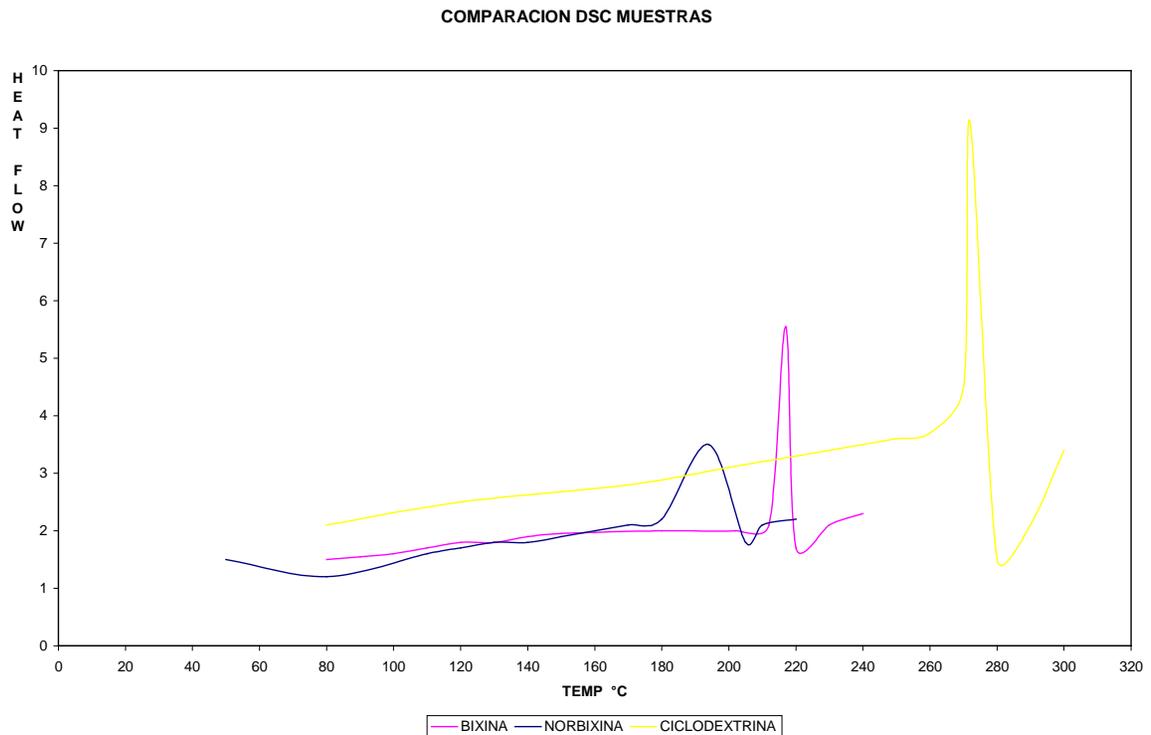
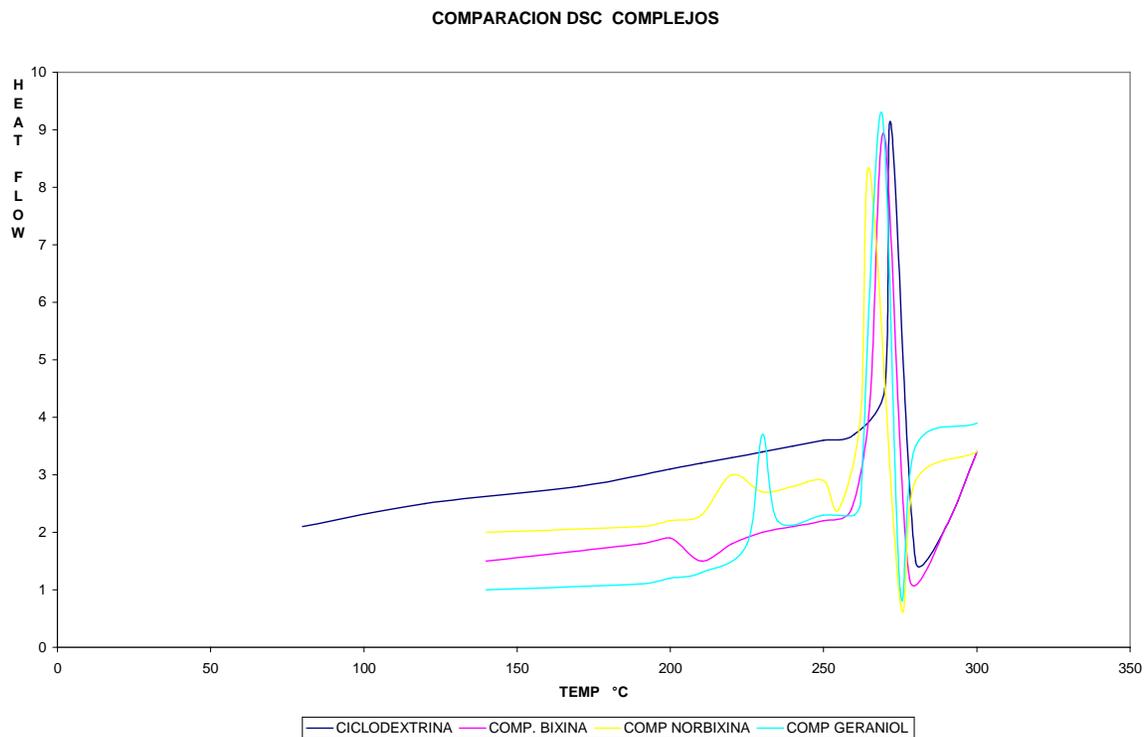


Figura 59. Comparación DSC de todos los complejos.



La figura 58, indica con claridad que las muestras a analizar tienen puntos de descomposición que corresponden teóricamente a bixina y norbixina, corroborando los anteriores análisis espectrofotométricos y cromatograficos. Además se observa para la ciclodextrina un punto de descomposición mucho mas alto que el de los huéspedes.

Se encuentra en la figura 59, que los complejos de inclusion, presentan una mejor estabilidad térmica que las moléculas huéspedes, esto ocurre ya que la ciclodextrina las recubre y protege hasta una temperatura alrededor de los 270 °C, temperatura a la que se alcanza su propia desestabilización térmico-estructural. De esta manera se genera un complejo que contiene al huésped con todas sus propiedades organolépticas, pero más estable a las altas temperaturas.

Análisis Termo-Oxidativo (TOX).

El análisis TOX o de estabilidad termo-oxidativa busca establecer la capacidad de las diferentes moléculas a resistir atmósferas altamente oxidativas a la par de altas temperaturas.

Figura 60. TOX inicial para huéspedes y ciclodextrina.

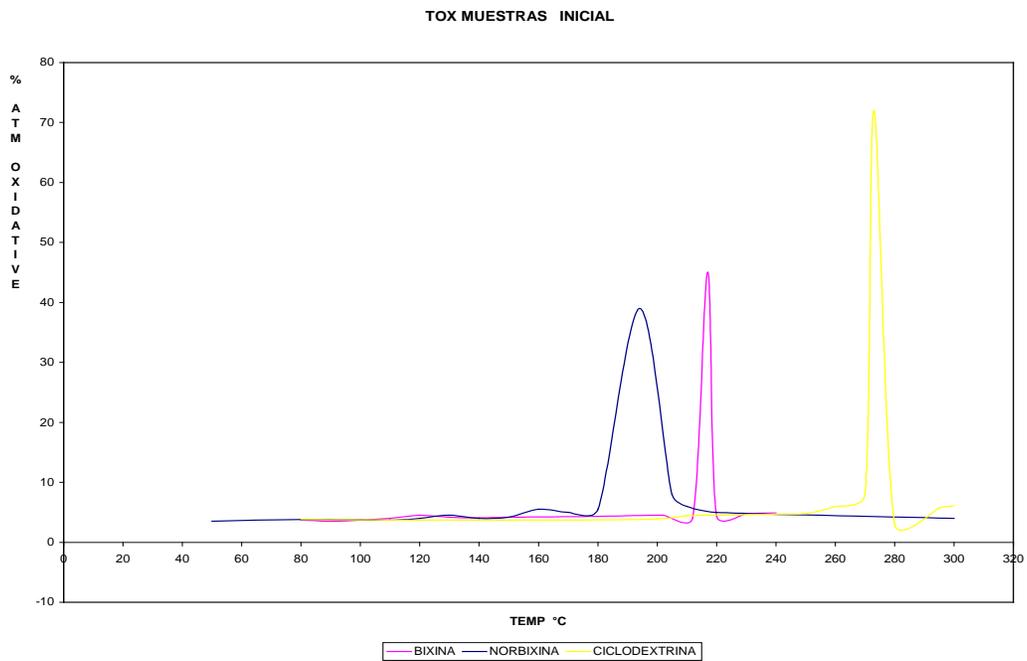


Figura 61. TOX inicial para todos los complejos

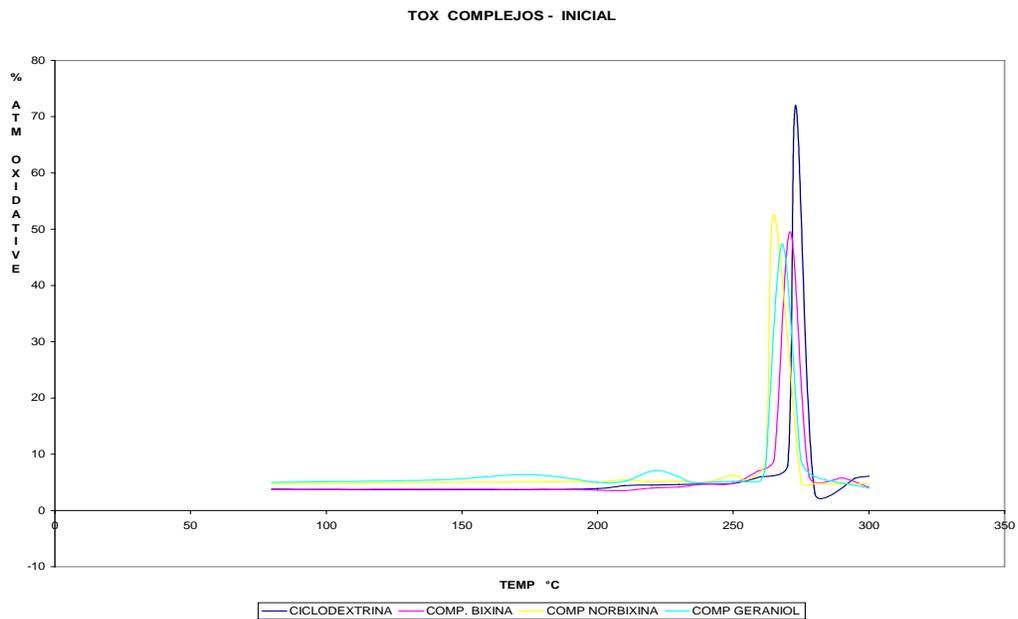


Figura 62. TOX a 6 meses para huéspedes y ciclodextrina.

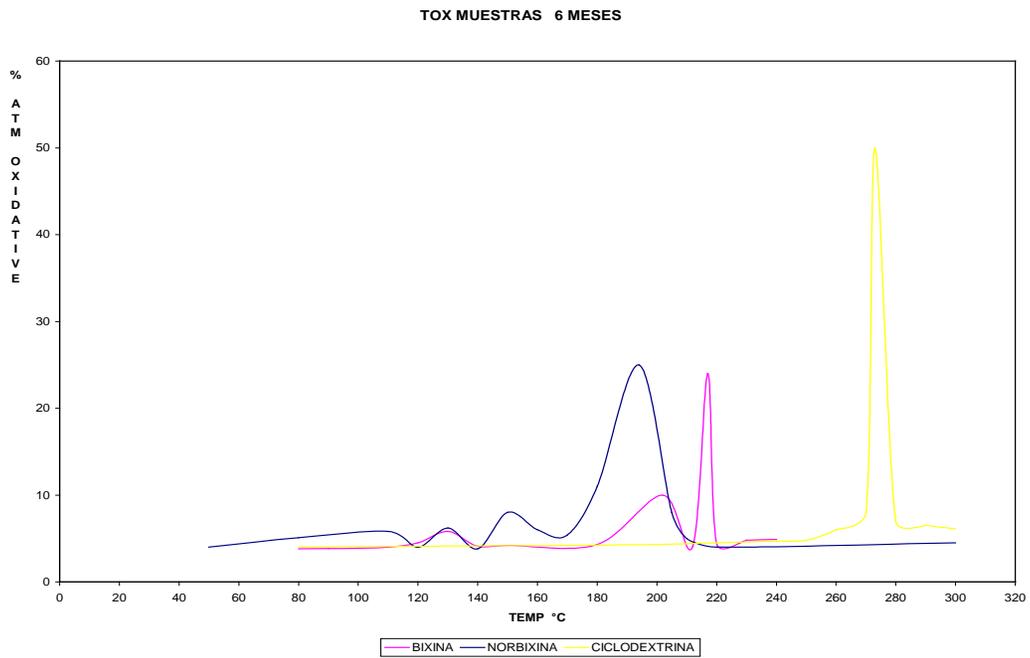
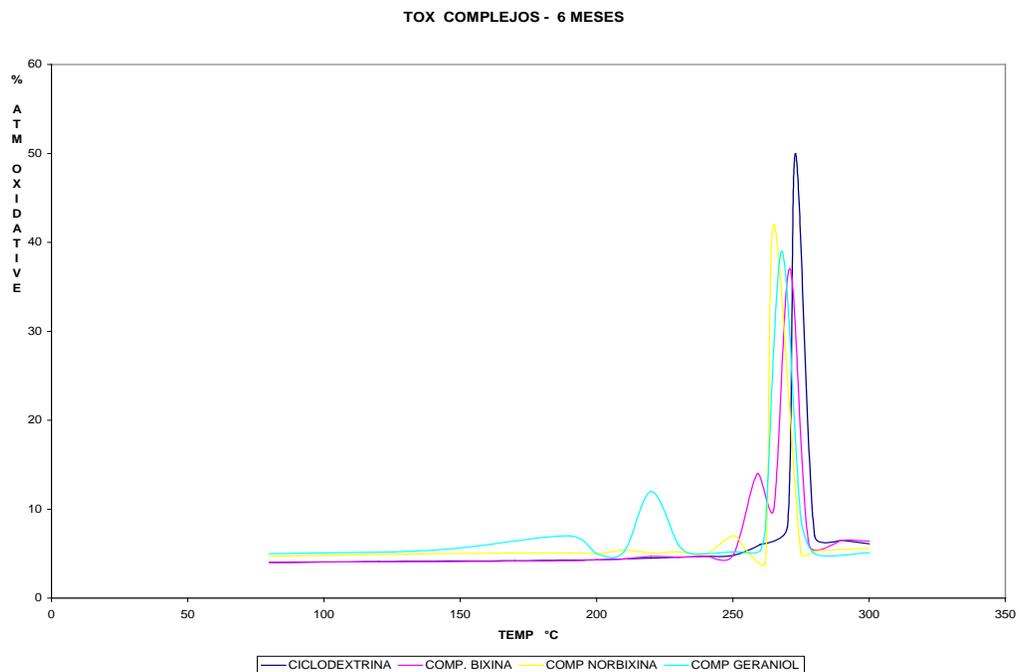


Figura 63. TOX a 6 meses para todos los huéspedes.



En las figuras 60 y 61 se observan los análisis de TOX para los huéspedes, la ciclodextrina y los complejos de inclusión, estas muestras se toman como punto inicial, pues se analizan dos días después de su extracción y/o síntesis. Los resultados indican una mayor inestabilidad térmico-oxidativa para norbixina (cerca de los 200°C y 40 % de atmósfera oxidativa) mientras que la bixina presenta mayor estabilidad y la ciclodextrina es nuevamente la más estable de las tres muestras. Para los complejos los resultados indican el mismo orden de estabilidad, pero cada complejo es más estable que su respectivo huésped.

En las figuras 62 y 63 se observan los análisis de TOX para los huéspedes, la ciclodextrina y los complejos de inclusión, estos análisis se toman a los seis meses “relativos” después de su extracción y/o síntesis. Los resultados coinciden con los de las figuras 60 -61 al mostrar una mayor inestabilidad térmico-oxidativa para norbixina seguido de la bixina y la ciclodextrina es nuevamente la más estable de las tres muestras, resultado similar al de los complejos. En el caso de las figuras 62 se observa una mayor inestabilidad de los huéspedes con respecto a la muestra inicial (Fig. 60), es evidente que al encapsular dichos huéspedes les confiere una mayor estabilidad que los no encapsulados en el mismo tiempo.

Tabla 8. Estabilidad termo-oxidativa de huéspedes y complejos a diferente tiempo

Compuesto	Inicio	6 Meses	1 Año	3 Años	5 Años
Bixina	++++	++	-	-	
Comp. Bixina	++++	++++	++++	+++	++
Norbixina	++++	++	-	-	
Comp. Norbixina	++++	++++	++++	+++	++
Geraniol	++++	+	-	-	
Comp. Geraniol	++++	++++	+++	++	
Ciclodextrina	++++	++++	++++	++++	

Convenciones :

++++ 100 % estable

+++ 75 % estable

++ 50 % estable

+ 25 % estable

- Inestable (Se ha generado una Mezcla de compuestos)

En la tabla 8, se observan los resultados del análisis de estabilidad termo-oxidativo para huéspedes, complejos de inclusión y ciclodextrina, tomando ésta última como referencia, por ser una molécula muy estable. Los análisis se realizaron luego de haber obtenido todos los compuestos en un periodo de 7 días, con el fin de conseguir mayor confiabilidad.

Estos análisis se realizaron con un equipo que, simula la oxidación natural de los compuestos con el pasar del tiempo, marca "Perkin Elmer". En laboratorios externos a la Universidad del Cauca.

Para todos los huéspedes y el complejo de geraniol se realizaron los análisis simulando un tiempo de hasta 3 años; para los complejos de bixina y norbixina se extendió la simulación hasta 5 años, debido a que mostraron una gran resistencia a la descomposición.

Luego de 6 meses, los huéspedes bixina y norbixina presentan una estabilidad del 50%, mientras que el geraniol se ha degradado aun más, con solo un 25 % de estabilidad. En este mismo periodo de tiempo, se ve como todos los complejos de inclusión presentan una estabilidad cercana al 100%.

Después de un año, ningún huésped presenta estabilidad, es decir, se han degradado para formar sus respectivas moléculas de oxidación, perdiendo así las características como colorantes y aromatizantes según el caso. Igualmente con el mismo periodo de tiempo los complejos de bixina y norbixina siguen con una estabilidad cercana al 100%, y el complejo de geraniol comienza a presentar oxidación, disminuyendo su estabilidad al 75%.

Transcurrida la simulación de tres años, se encuentra que la estabilidad de los complejos de bixina y norbixina comienza a disminuir al 75% y la del complejo de geraniol cae a un 50%.

Finalmente, el estudio de simulación, para los complejos de bixina y norbixina, indica que después de cinco años (60 meses), aun permanece con una estabilidad del 50 %. Indicando de esta manera que estos complejos de inclusión duran 10 veces más que sus respectivos huéspedes puros.

Para el geraniol, se infiere que aproximadamente al tercer mes su estabilidad es del 50%, para lo cual, se compara con el complejo de inclusión, al tener el 50% pero después de tres años; es decir, una durabilidad de 12 veces más que el geraniol puro.

7.CONCLUSIONES

En el fruto de *Bixa orellana*, se encontró dos extractos denominados en este trabajo como EB1 y EB2, los cuales fueron extraídos con solvente apolar y polar respectivamente. Estos extractos presentaron características químicas diferentes, y al ser comparados con sustancias patrón de bixina y norbixina se determinó por HPLC que se trata de los mismos componentes.

Se encontró por el análisis de ultravioleta visible, que los extractos EB1 y EB2, presentaron bandas características correspondientes a bixina y norbixina respectivamente.

En los espectros infrarrojo se encontraron grupos funcionales similares en EB1 y EB2, a excepción del grupo éster en EB1; el análisis de estas bandas indicó la existencia de todas las bandas presentes también en Bixina y Norbixina, corroborando de esta forma el análisis ultravioleta.

Experimentalmente se encontraron compuestos de color rojo – anaranjado para los complejos de bixina y norbixina y de color blanco para el complejo de geraniol, los cuales fueron totalmente solubles en agua y de otras características organolépticas iguales al respectivo huésped puro.

Se encontró que el encapsulamiento de los tres diferentes huéspedes, se realiza con mayor eficiencia, colocando en relación equimolar (1:1) ciclodextrina: Huésped. Los análisis de HPLC indicaron en este caso que se logró encapsular el 74.3% con el huésped bixina, 100% con geraniol y la formación de un encapsulamiento parcial con el 100% de norbixina.

Se ha encontrado que en los tres diferentes complejos de inclusión, el espectro infrarrojo presenta las mismas características vibracionales que la ciclodextrina patrón, es decir, que los únicos enlaces que se encuentran en vibración son los del hospedador y no los del huésped. Teniendo en cuenta que los complejos presentan características físicas notables de color rojo en bixina y norbixina y olor característico en geraniol, se descarta la opción de que dichos huéspedes no se encuentren en el complejo y que por esta razón no aparezcan sus bandas. De otra forma, se puede inferir que la única razón por la cual las vibraciones de los huéspedes no se muestran, es porque estos se encuentran

impedidos para vibrar de manera como lo harían las moléculas libres. Se cree entonces que debido al encierro o al encapsulamiento, los huéspedes dentro de la cavidad de ciclodextrina no presentan sus bandas características frente a la luz infrarroja.

Durante la investigación con reacciones de encapsulamiento, la técnica de espectroscopia infrarrojo ha sido una herramienta importante en la valoración de acomplejamientos fallidos con los tres diferentes huéspedes, ya que muestra todos los grupos funcionales que pueden vibrar libremente y por este motivo dar un indicio para indicar si los huéspedes están dentro o fuera de la cavidad de la ciclodextrina.

Con los análisis de calorimetría de barrido diferencial (DSC), se encontró que el punto de descomposición de los huéspedes puros, se incremento en forma de complejos hasta aproximadamente 270° C, correspondiente también al punto de fusión de la ciclodextrina; indicando con estos resultados que la ciclodextrina protege las sustancias huéspedes hasta alcanzar la desestabilización estructural con el punto de fusión.

El análisis TOX muestra como los complejos de inclusión, presentan mayor estabilidad ante una atmósfera oxidativa en un mismo periodo de tiempo, comparado con los huéspedes puros

Por medio de los análisis de TOX y DSC, se comparó la estabilidad de los complejos de inclusión con los huéspedes puros, encontrando que en los primeros seis meses son mucho más estable los complejos formados con sulfobutil éter β -ciclodextrina, debido a que no se observan restos de otras sustancias producto de la oxidación, contrariamente como lo muestra el análisis para los huéspedes puros.

Finalmente, se pudo obtener tres diferentes compuestos, producto de la unión química entre la sulfobutil éter β -ciclodextrina, y los tres diferentes huéspedes, bixina, norbixina y geraniol. Este aporte a la ciencia es de gran ayuda a la industria alimentaria, donde se podrán usar estos compuestos con características mucho más resistentes a la degradación.

BIBLIOGRAFÍA

AUDRIN, A; LOLINGER, J et BAUER, W. Science alimentaire 2: Aromes et colorants. Université de Lausanne, 2002. p. 58, 80, 90, 92.

BAUDI, D. Salvador. Diccionario de tecnología de los alimentos. México: Addison Wesley Longman, 1988. p. 62, 63.

BREWSTER, Q. Ray. Organic chemistry. Second edition. Estados Unidos de América: Prentice-Hall, 1953. p. 759, 760.

CERESTAR, Cyclodextrins – a unique form of starch [online]. Estados Unidos, 1997 [cited 4 dic. 2002]. Physical properties. Available from internet: <<http://www.betadexcyclodextrin.com/html/welcome.html>

FONTANA, Jose D. Carotenoids, attractive colors and biological activity [online] Federal University of Paraná, Brasil, 1997 [cited 19 sep. 2002]. Market appeal and biological action, p 3. Available from internet: <http://www.biocologia.com.br:8080/bio/13_ei.htm

HAWLEY, G. Gessner. Diccionario de química y de productos químicos. Segunda edición. España: Ediciones Omega, S.A, 1985. p. 429.

IQBAL Mohammad, Food and Agriculture Organization of the United Nations. International trade in non-wood forest products: an overview [online]. Rome, November 1993, (cited 29 sep. 2003). Chapter VI, 6 prices. Available from internet: <http://www.fao.org/docrep/x5326e/x5326e09.htm>

LAJOS SZENTE, JÓZSEF SZEJTLI, Non chromatographic analytical uses of cyclodextrins, En: The analyst reviews, april 1998, vol 123 pg 735 – 741.

MADSEN, Ulrich. Production and characterization of modified cyclodextrins. University of Aalborg and Kansas. Estados Unidos, 2000, p. (1-1 a 1-8), (1-10 a 2-17).

PAGINGTON, J.S. β -cyclodextrins: the success of molecular inclusion. Chemistry in Britain. Mayo de 1997.

RAINLABS. Achiote (Bixa orellana L.) [online]. Perú, 2002 (citado 25 febrero 2003). Composición química p. 5, Documento word. Disponible de internet: < <http://www.rainlabs.com/docs/achioteespañol>

REITH, J. F., GIELEN, J. W. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts. In: Journal of food science, Vol. 36, n. 6, 1971, p. 861 – 864,

REINECIUS, G. A, COULTER, S.T.; Flavor encapsulation. In: Food reviews international, Vol 5, n.2, 1989, p. 147- 176.

SAENGER, W.; Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. In: Angewandte chemie international, Vol 19, n. 5, 1980, p. 344 – 362.

SCOTTER, Michael J. et al. Analysis de annatto (Bixa orellana) food coloring formulations. 1 determination of coloring components and colored thermal degradation productos by high performance liquid chromatography with photodiode array detection, En: Journal of agricultural and food chemistry. Colney, United Kingdom. Vol 46, 1998; p.1031-1038.

SON LI, WILLIAM C. PURDY, Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry, En: Chemical reviews, 1992, vol92, N°6 , pg 1457-1470.

Takho camphor co.,Ltd. Essential oil [online]. Taiwan,2000 [cited 16 sept. 2003]. Geraniol. Disponible en internet : <<http://www.camphor.com.tw/f-pro3a.htm>>

The flavor and fragrance high production volume consortia. Test plan for terpenoid primary alcohols and related esters [online]. Washington D.C.,EUA : February 26 2001 [cited 11 dic 2002]. Chapter 2, Category analysis. Documento PDF. Available from internet. < <http://www.epa.gov/chemrtk/terpriar/c12956.pdf>

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

ATKINS, P.W.; Physical Chemistry 5th ed., 1994, Oxford University Press, Oxford, UK.
Blanch, H. and Clark, D.; Biochemical Engineering, Marcel Dekker, Inc. New York, NY, USA, 1996.

Bauer K. and Garbe D. Common Flavor and Fragrance Materials Verlagsgesellschaft mbH, D-6940, Weinheim, Federal Republic of Germany. (1985)

CABEZUDO, S. (1973), Extracción de colorante a partir de achiote. Tesis Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.

CASTRO, L. Américo (1996), Contribución al estudio Químico de la Bixa Orellana o "Achiote" y su importancia como aditivo en la industria alimentaria. Fac. Farmacia y Bioquímica U.N.M.S.M. Lima-Perú.

CONNORS, K.A.; *The Stability of Cyclodextrin Complex in Solution*, Chemical Review, 1997, 97, 1325-1357.

DENDY D.A.V. (1966) Annato, The pigment of Bixa orellana. East Afr. Agr. Forest J.

DUCHÊNE, D. and WOUESSIDJEWE, D.; Pharmaceutical and Medical Applications of Cyclodextrins, in Polysaccharides in medical Applications, ed. by Severian Dumitriu, 1996. p. 575 - 602

EASTON, C. and LINCOLN, S.; *Modified Cyclodextrin*, Imperial College Press, London, England, 1999.

FRAGRANCE MATERIALS ASSOCIATION (FMA). Reported values for boiling point.

FRAGRANCE MATERIALS ASSOCIATION (FMA). Reported values for vapor pressure

FRÖMMING, K.H. and SZEJTLI, J.; Cyclodextrins in Pharmacy, Kluwer Academic Publisher, London, England (1994).

GIVAUDAN-ROURE (1991) Partition coefficient n-octanol/water of d,l-citronellol. Private communication to FMA.

GIVAUDAN-ROURE (1989) Determination of the ready biodegradability of d,l-citronellol. Unpublished report to FMA.

HALL R.L. and OSER, B.L. Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the food additives amendment. III GRAS Substances. *Food Technology*, (1965) **19**, 151-197.

JENNER P.M., HAGAN, E.C., Taylor, J.M., Cook, E.L., and Fitzhugh, O.G. (1964) Food flavorings and compounds of related structure I. Acute Oral Toxicity. *Fd Cosmet. Toxicol.* **2**, 327-343.

LARSEN, K.L.; Production and Analysis of Large Cyclodextrins, 1998, Ph.D. Thesis, Aalborg University, Denmark.

LOFTSSON, T. and BREWSTER, M.E.; *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization*, Journal of Pharmaceutical Science, 1996, 85(10), 1017-1025

MARTIN, A.N.; *Physical Pharmacy 4th ed*, Lippincott Williams & Wilkins, 351 West Camden Street, Baltimore, Maryland, USA. 1993,

MCKEOWN, G. G. Composition of oil-soluble annatto food colours. III. Structure of the yellow pigment formed by the thermal degradation of bixin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1965, 48 (4), 835 – 837.

MCKEOWN, G. G. Composition of oil-soluble annatto food colours. II. Thermal degradation of bixin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1963, 46 (5), 790 – 796.

Merck & Co., Inc. The Merck Index (1997) Published by Merck Research Laboratories, 12th edition, Whitehouse Station, NJ

MORENO O. M. (1973) Acute oral toxicity studies on rats and rabbits. Unpublished report to RIFM.

MORENO O. M. (1972) Acute oral toxicity of nerol in rats and rabbits. Unpublished report to RIFM.

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and chemistry of annatto. Food Chem. 1980, 5, 47 – 56.

Quest International Ltd. (1994) The ultimate biodegradability of citronellol in the sealed vessel test. Private communication to FMA.

SCOTTER, M. J.; Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. Food Chem. 1995, 53, 177 – 185.

STEIN E. (1986) Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. in “Textbook of Clinical Chemistry” edited by N. Tietz. p. 829-895. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.

STOFBERG J. and GRUNDSCHOBBER, F. Consumption ratio and food predominance of flavoring materials. *Perfumer and Flavorist*, (1987) **12**, 27.

STOFBERG J. and KIRSCHMAN, J.C. The consumption ratio of flavoring materials: A mechanism for setting priorities for safety evaluation. *Fd. Chem. Toxic.*, (1985) **23**, 857-860.

SYRACUSE RESEARCH CORPORATION (SRC) Private communication to FMA.

SZEJTLI, J.; Medical Application of Cyclodextrins, In: Medical Research Reviews, 1994, 14(3), 353-386.

SZEJTLI, J.; Chemistry, Physical and Biological Properties of Cyclodextrins, In: Szejtli, J. and Osa, T. (eds.) Comprehensive Supramolecular Chemistry, Elsevier Science Ltd., Oxford, UK. Vol. 3, Cyclodextrins, 1996,

SZEJTLI, J.; Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, Chemical Review, 1998, 98, 1743-1753.

VAN HOLDE, K.; JOHNSON, W.C.; and Ho, P.S.; *Principles of Physical Biochemistry*, Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey 07458, USA. 1998.

VOET D. and VOET, J. G. Biochemistry. John Wiley & Sons, NY. (1990)

VUILLEUMIER C., FLAMENT, I., SAUVEGRAIN, P. (1995) Headspace analysis study of evaporation rate of perfume ingredients applied onto skin. *International Journal of Cosmetic Science*, **17**, 61- 76.

WIESS R. (1959) International Flavors and Fragrances, Inc. US Patent 2882323.

YAMAWAKI T. (1962). Pharmacological effects of geraniol. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **58**, 394- 400.

YOSHIAKI O., Ninagawa, Y. Fujita, Y., Hosogai, T., Nishida, T., Tamai, Y., and Itoi, K (1973) Kuraray Co., Ltd. JA 758004. *Chemical Abstracts*, **83**, 97637n (1975).

ANEXO 1

Tabla 1 Algunas características de α -, β -, y γ -CD

Parameters	α -CD	β -CD	γ -CD
Number of glucose units	6	7	8
MW [g/mol]	972	1135	1297
Solubility in water at room temperature [g/100 ml]	14.5	1.85	23.2
$[\alpha]_D$ at 25°C [°C]	150 ± 0.5	162.5 ± 0.5	177.4 ± 0.5
Cavity diameter [pm ²]	470 - 530	600 - 680	750 - 830
Height of torus [pm]	790 ± 10	790 ± 10	790 ± 10
Diameter of outer periphery [pm]	1460 ± 40	1540 ± 40	1750 ± 40
Approximate volume of cavity (10 ⁶ pm ³)	174	262	427
Approximate cavity volume in mol of cyclodextrin [ml]	104	1257	256
Approximate cavity volume in 1 g of cyclodextrin [ml]	0.10	0.14	0.20
pK _a (by potentiometry) at 25°C	12.332	12.202	12.081
Hydrolysis by <i>A. oryzae</i> α -amylase	Negligible	Low	Rapid
Enthalpy of solution, ΔH° [kJ mol ⁻¹]	32.1	34.8	32.4
Entropy of solution, ΔS° [J K ⁻¹ mol ⁻¹]	57.8	49.0	61.5

^a picometer.

Szejtli, J.; Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, In: Chemical Review, 1998, 98.

Tabla 2 Dimensiones y propiedades físicas de ciclodextrinas.

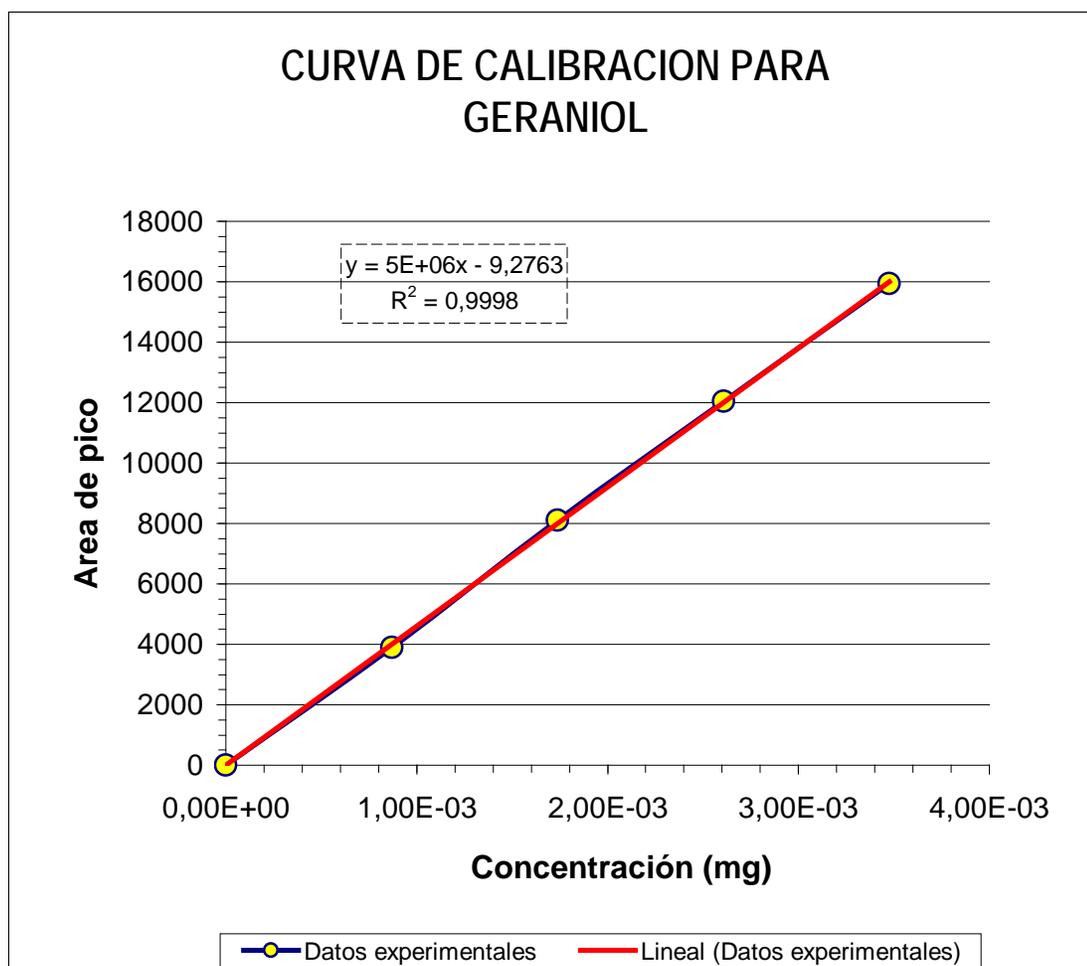
Tipo de CD	Rango de fusión °C	PM	Tamaño molecular (Σ)			Vol cavidad (ml/mol)	Valores pK _a	Higroscopicidad a 30°C y 85% H.R.
			Diámetro interno	Diámetro externo	Altura de la cavidad			
(6) α	255-260	972	~ 4.7- 5.3	14.6 ± 0.4	7.8 ± 0.1	174 [6 H ₂ O]	12.33	12%
(7) β	255-265	1135	~ 6.0- 6.5	15.4 ± 0.4	7.8 ± 0.1	262 [11 H ₂ O]	12.20	13.5%
(8) γ	240-245	1297	~ 7.5- 8.3	17.5 ± 0.4	7.8 ± 0.1	472 [17 H ₂ O]	12.08	17%

CERESTAR, Cyclodextrins – a unique form of starch [online]. Estados Unidos, 1997 [cited 4 dic. 2002]. Physical properties. Available from internet : <<http://www.betadexcyclodextrin.com/html/welcome.html>

ANEXO 2

CURVA DE CALIBRACIÓN EN HPLC PARA GERANIOL.

Concentración (mg)	Area de pico
3,48E-03	15926,5
2,61E-03	12043,5
1,74E-03	8104,9
8,69E-04	3887,7
0,00E+00	0



Concentraci3n de la muestra problema:

$$X = \frac{Y - 9,2763}{5,00E+06} = \frac{6619,1 - 9,2763}{5,00E+06} = 1,3219e-3 \text{ mg de geraniol en el complejo de inclusi3n.}$$

Datos cromatográficos obtenidos en la curva patrón de geraniol.

1 Inyección de 20 μ L de geraniol puro.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	6.253	15890.6	1360.8	0.1548	0.502
2	6.259	15927	1368.7	0.1514	0.493
3	6.247	15962	1347.2	0.1520	0.495
Promedio:		15926.5			

2 Inyección de 15 μ L de geraniol puro.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	6.243	12002	1085.4	0.1560	0.494
2	6.244	12073.2	1098	0.1553	0.496
3	6.245	12055.3	1093	0.1545	0.495
Promedio:		12043.5			

3 Inyección de 10 μ L de geraniol puro.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	6.248	8098.2	754	0.1515	0.501
2	6.254	8112	758.4	0.1539	0.498
3	6.255	8104.6	757.9	0.1532	0.497
Promedio:		8104.9			

4 inyeccion de 5 μ L de geraniol puro.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	6.252	3874.7	371.4	0.1508	0.507
2	6.249	3889.1	363.8	0.1531	0.502
3	6.245	3899.5	359.4	0.1557	0.497
Promedio:		3887.7			

Inyecciones de 20µL la muestra del complejo de geraniol.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	6.252	6619.4	632.6	0.1512	0.510
2	6.246	6620.7	628.5	0.1529	0.512
3	6.241	6617.2	623.1	0.1530	0.505
Promedio:		6619.1			

Operaciones matemáticas para determinar la concentración de geraniol en cada una de las inyecciones.

Se tomo 0.01mL \approx 10µL de geraniol puro al 99% y se aforo en 50mL de solvente agua:metanol (6:4)

Densidad del geraniol : 0.878g/mL

$$0.01\text{mL} \times \frac{0.878\text{g}}{1\text{mL}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} = 8.78\text{mg de geraniol}$$

$$8.78\text{mg} \times \frac{99}{100} = 8.6922\text{mg geraniol}$$

$$\frac{8.6922\text{mg geraniol}}{50\text{mL}} \times \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} = 173.844\frac{\text{mg geraniol}}{\text{L solución}} \approx 173.844\text{ppm}$$

1. primera concentración

$$173.844\text{ppm} \times \frac{1\text{L}}{1.0\text{E}^6\mu\text{L}} \times 20\mu\text{L} = 3.4768\text{E}^{-3}\text{mg}$$

2. Segunda concentración

$$173.844\text{ppm} \times \frac{1\text{L}}{1.0\text{E}^6\mu\text{L}} \times 15\mu\text{L} = 2.6076\text{E}^{-3}\text{mg}$$

3. Tercera concentración

$$173.844\text{ppm} \times \frac{1\text{L}}{1.0\text{E}^6\mu\text{L}} \times 10\mu\text{L} = 1.7384\text{E}^{-3}\text{mg}$$

4. Cuarta concentración.

$$173.844\text{ppm} \times \frac{1\text{L}}{1.0\text{E}^6\mu\text{L}} \times 5\mu\text{L} = 8.6922 \text{E}^{-4}\text{mg}$$



Interpolación en la curva patrón de geraniol, para determinar su concentración en el complejo.

$$\text{Ecuación de la recta : } Y = 5.0 \text{E}^6 X - 9.2763$$

$$X = \frac{6619.1 - 9.2763}{5.0 \text{E}^6} = 13219 \text{E}^{-3}\text{mg}$$

Cuantificación de el contenido de geraniol en todo el complejo obtenido.

- Complejo obtenido experimentalmente: 1.3272g complejo
- La preparación de la muestra del complejo para ser inyectada en el cromatografo consiste de 9,0mg de complejo y aforar a 10mL con solución de Agua:Metanol (6:4).

$$\frac{1.3219 \text{E}^{-3}\text{mg geraniol}}{20\mu\text{L}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{L}} \times \frac{10\text{mL}}{9,0\text{mg}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \times 1.3272\text{g Complejo} =$$

= 97.4680mg geraniol en todo el complejo de inclusion.

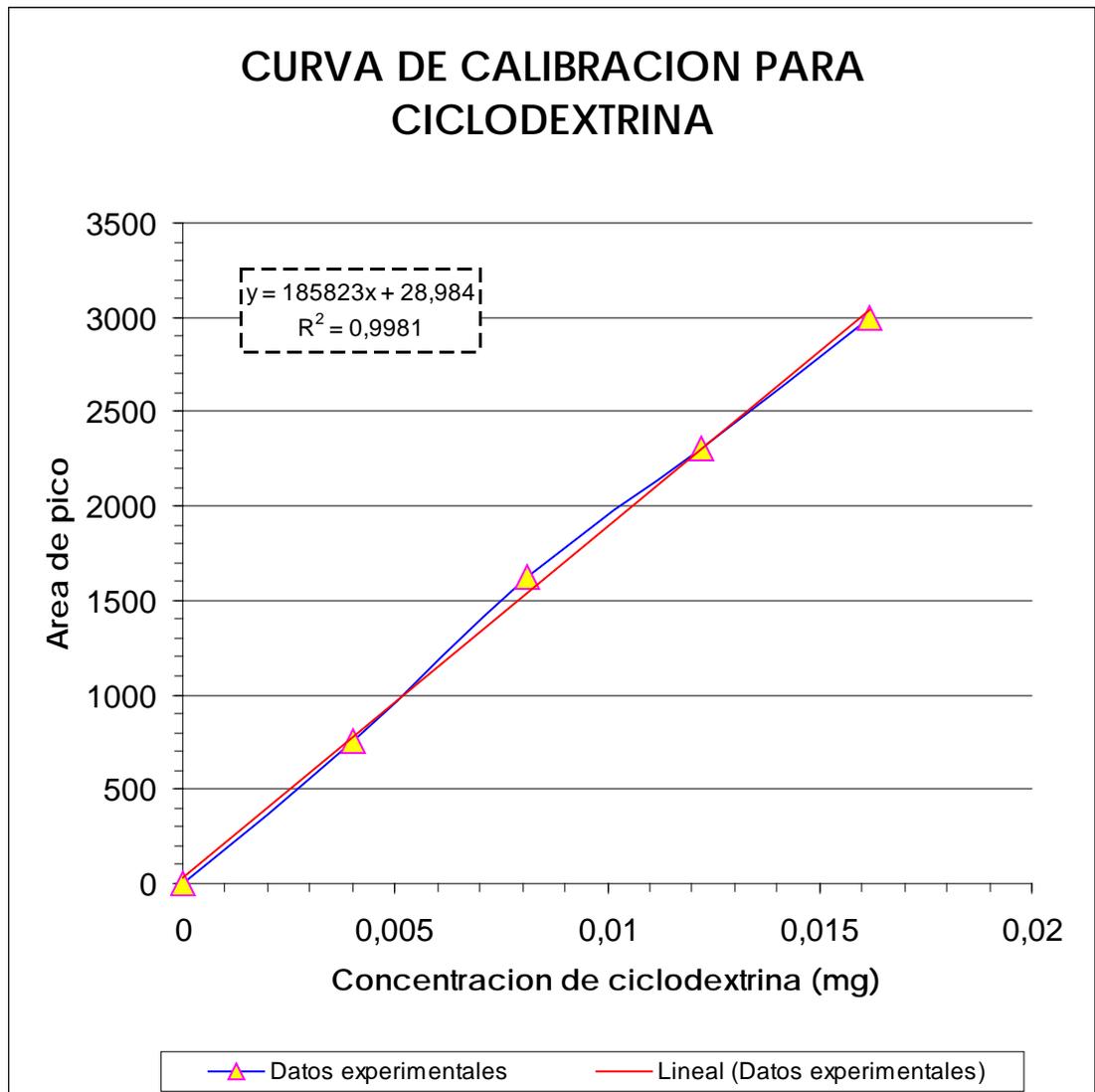
Conversión de mg a mL de geraniol.

$$97.4680\text{mg} \times \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} \times \frac{1\text{mL}}{0.878\text{g geraniol}} = 0.1110\text{mL de geraniol}$$

ANEXO 3

CURVA DE CALIBRACIÓN EN HPLC PARA SBE7- β -CD.

Concentracion (mg)	Area de pico
0,0162	2992,7
0,0122	2310,3
0,0081	1619,7
0,004	749,9
0	0



- ★ Cuantificación de ciclodextrina en los complejos de inclusion.

Datos cromatograficos de la curva patron de ciclodextrina

1. Inyección de 16 μ L de ciclodextrina pura.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	5.017	2999.2	431.6	0.1046	1.149
2	5.027	2987.3	448.1	0.1014	1.17
3	5.023	2991.6	427.6	0.1056	1.185
Promedio:		2992.7			

2. Inyección de 12 μ L de ciclodextrina pura.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	5.018	2312.6	389.9	0.0993	1.209
2	5.027	2302.3	367.5	0.0993	1.232
3	5.022	2308.1	361.7	0.0961	1.242
Promedio:		2310.3			

3. Inyección de 8 μ L de ciclodextrina pura.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	5.026	1603.5	310.9	0.087	1.16
2	5.035	1638.3	326.4	0.0865	1.096
3	5.037	1617.2	304.5	0.082	1.048
Promedio:		1619.7			

4. Inyección de 4 μ L de ciclodextrina pura.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	5.030	747.4	137.2	0.0911	0.951
2	5.033	743	140.1	0.0852	1.009
3	5.033	759.3	144.9	0.0815	1019
Promedio:		749.9			

Datos cromatograficos de los diferentes Complejos de Inclusion:

Inyección de 16 μ L del Complejo de Bixina.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	5.058	1652.3	270.8	0.1057	1.14
2	5.056	1640.9	275.3	0.1012	1.4
3	5.052	1646.1	281.1	0.1011	1.09
Promedio:		1646.4			

Inyección de 16 μ L del Complejo de Norbixina.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	5.063	1962.5	297.5	0.1071	0.993
2	5.062	1988.1	314.6	0.0941	1.172
3	5.058	1930.3	306.2	0.0997	1.125
Promedio:		1960.3			

Inyección de 12 μ L del complejo de Geraniol.

# INYECCION	TIEMPO	AREA	ALTURA	ANCHO	SIMETRIA
1	5.066	1337.3	268	0.0905	1.011
2	5.061	1325.8	251.7	0.0911	1.009
3	5.066	1344.7	265.7	0.0912	1.014
Promedio:		1335.9			

- Operaciones matemáticas para determinar la concentración en cada una de las inyecciones de ciclodextrina pura.

Se partió de una solución de 5090ppm de ciclodextrina en Agua:metanol (6:4), luego se tomó 1mL y se llevó hasta 5mL en balón aforado con el mismo solvente, para obtener una solución menos concentrada de 1018ppm.

$$\frac{50.9\text{mg Ciclodextrina}}{10\text{mL}} \times \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} = 5090\text{ppm}$$

$$5090\text{ppm} \times \frac{1\text{mL}}{5\text{mL}} = 1018\text{ppm}$$

1. Primera concentración.

$$1018\text{ppm} \times \frac{1\text{L}}{1.0\text{E}^6\mu\text{L}} \times 16\mu\text{L} = 0.0162\text{mg}$$

2. Segunda Concentración.

$$1018\text{ppm} \times \frac{1\text{L}}{1.0\text{E}^6\mu\text{L}} \times 12\mu\text{L} = 0.0122\text{mg}$$

3. Tercera concentración.

$$1018\text{ppm} \times \frac{1\text{L}}{1.0\text{E}^6\mu\text{L}} \times 8\mu\text{L} = 0.0081\text{mg}$$

4. Cuarta concentración.

$$1018\text{ppm} \times \frac{1\text{L}}{1.0\text{E}^6\mu\text{L}} \times 4\mu\text{L} = 0.0040\text{mg}$$

✿ Interpolación en la curva patrón de Ciclodextrina para determinar su concentración en los diferentes complejos:

$$\text{Ecuación de la recta : } Y = 185823X + 28.984$$

Cuantificación de ciclodextrina en complejo de Bixina.

$$X = \frac{1646.4 - 28.984}{185823} = 0.0087\text{mg}$$

- Complejo obtenido experimentalmente: 0.1971g complejo
- La preparación de la muestra del complejo para ser inyectada en el cromatógrafo consiste de 25.1mg de complejo y aforar a 10mL con solución de Agua:Metanol (6:4).

$$\frac{0.0087\text{mg Ciclodextrina}}{16\mu\text{L}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{L}} \times \frac{10\text{mL}}{25.1} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \times 0.1971\text{g Complejo} =$$

$$= 42.6984\text{mg de ciclodextrina libre en el complejo de inclusion de bixina.}$$
$$\approx 0.0426\text{g}$$

Ciclodextrina usada inicialmente en la reacción: 0.1740g

Ciclodextrina totalmente acomplejada con bixina: $0.1740 - 0.0426 = 0.1314\text{g}$

Relación en moles de Ciclodextrina y bixina al final del acomplejamiento.

$$0.1314\text{g} \times \frac{1\text{ mol}}{2177.46\text{g}} = 6.0345\text{E}^{-5}\text{ moles}$$

Gravimetricamente la cantidad de bixina que quedo es.

$$0.0231\text{g} \times \frac{1\text{mol}}{394.52\text{g}} = 5.8552\text{E}^{-5}\text{ moles.}$$

Cuantificación de ciclodextrina en complejo de Norbixina.

$$X = \frac{1960.3 - 28.984}{185823} = 0.0103\text{mg}$$

- Complejo obtenido experimentalmente: 0.2041g complejo
- La preparación de la muestra del complejo para ser inyectada en el cromatógrafo consiste de 7,5mg de complejo y aforar a 10mL con solución de Agua:Metanol (6:4).

$$\frac{0.0103\text{mg Ciclodextrina}}{16\mu\text{L}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{L}} \times \frac{10\text{mL}}{7,5\text{mg}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \times 0.2041\text{g Complejo} =$$
$$= 175.1858\text{mg de ciclodextrina en el complejo de inclusion.}$$
$$\approx 0.1751\text{g}$$

Ciclodextrina usada inicialmente en la reacción: 0.1740g

Ciclodextrina excedente por cuantificación: $0.1740 - 0.1751 = -0.0011\text{g}$ de más

Relación en moles de Ciclodextrina y Norbixina al final del acomplejamiento.

$$0.1751\text{g} \times \frac{1\text{ mol}}{2177.46\text{g}} = 8.0414\text{E}^{-5}\text{ moles de ciclodextrina}$$

Norbixina usada en el complejo:

$$0.0301\text{g} \times \frac{1\text{mol}}{380.48\text{g}} = 7.911\text{E}^{-5}\text{ moles. de Norbixina}$$

Cuantificación de ciclodextrina en complejo de Geraniol.

$$X = \frac{1335.9 - 28.984}{185823} = 0.0070\text{mg}$$

- Complejo obtenido experimentalmente: 1.3272g complejo

- La preparación de la muestra del complejo para ser inyectada en el cromatógrafo consiste de 6.0mg de complejo y aforar a 10mL con solución de Agua:Metanol (6:4).

$$\frac{0.0070\text{mg Ciclodextrina}}{12\mu\text{L}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{L}} \times \frac{10\text{mL}}{6,0\text{mg}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \times 1.3272\text{g Complejo} =$$

= 1290.3mg de ciclodextrina libre en el complejo de inclusion de bixina.

≈ 1.2903g

Ciclodextrina usada inicialmente en la reacción: 1.2394g

Ciclodextrina excedente por cuantificación: 1.2394 – 1.2903 = -0.050g de mas

Relación en moles de Ciclodextrina y geraniol al final del acomplejamiento.

$$1.2903\text{g} \times \frac{1\text{ mol}}{2177.46\text{g}} = 5.9257\text{E}^{-4}\text{ moles de Ciclodextrina}$$

Geraniol determinado por curva patrón en el complejo:

$$0.0974\text{g} \times \frac{1\text{mol}}{154.24\text{g}} = 6.3148\text{E}^{-4}\text{ moles. de geraniol}$$

ANEXO 4

CÁLCULOS, DATOS Y RESULTADOS DE ENCAPSULAMIENTOS.

Encapsulamiento de bixina: (1:1)en moles, ciclodextrina: bixina

Relación en moles

$$0.0311\text{g bixina en base seca} \times \frac{1\text{mol}}{394.52\text{g}} = 7.880\text{E}^{-5} \text{ moles de bixina}$$

$$0.1740\text{g Ciclodextrina en base seca} \times \frac{1\text{mol}}{2177.46\text{g}} = 8.00\text{E}^{-5} \text{ moles de ciclodextrina}$$

$$\text{bixina sin encapsular hallada gravimetricamente} = 0.0080\text{g}$$

$$\% \text{ bixina sin encapsular} = 0.0080 / 0.0311 \times 100 = 25.7\%$$

$$\text{bixina encapsulada hallada gravimetricamente} = 0.0231\text{g}$$

$$\% \text{ bixina encapsulada} = 100 - 25.7 = 74.3\%$$

$$\text{complejo de inclusion encontrado experimentalmente} = 0.1882\text{g}$$

$$\text{complejo de inclusion, valor teórico} = 0.1740\text{g Ciclodextrina} + 0.0231\text{g bixina} = 0.1971\text{g}$$

$$\% \text{ de rendimiento del complejo} = 0.1882 / 0.1971 \times 100 = 95.4\%$$

Encapsulamiento de norbixina: (1:1)en moles, ciclodextrina: norbixina

Relación en moles

$$0.0301\text{g norbixina en base seca} \times \frac{1\text{mol}}{380.48\text{g}} = 7.91\text{E}^{-5} \text{ moles de norbixina}$$

$$0.1740\text{g Ciclodextrina en base seca} \times \frac{1\text{mol}}{2177.46\text{g}} = 8.00\text{E}^{-5} \text{ moles de ciclodextrina}$$

$$\text{Norbixina sin encapsular hallada gravimetricamente} = 0.0$$

$$\% \text{ Norbixina encapsulada} = 100 \%$$

$$\text{complejo de inclusion encontrado experimentalmente} = 0.1930\text{g}$$

$$\text{complejo de inclusion, valor teórico} = 0.1740\text{g Ciclodextrina} + 0.0301\text{g norbixina} = 0.2041\text{g}$$

$$\% \text{ de rendimiento del complejo} = 0.1930 / 0.2041 \times 100 = 94.6\%$$

Encapsulamiento de geraniol: (1:1) en moles, ciclodextrina: geraniol

Relación en moles

$$0.1 \text{ mL geraniol} \times \frac{0.878 \text{ g}}{1 \text{ mL}} = 0.0878 \text{ g} \times \frac{1 \text{ mol}}{154.24 \text{ g}} = 5.69 \text{ E}^{-4}$$

(densidad)

$$1.2394 \text{ g Ciclodextrina} \times \frac{1 \text{ mol}}{2177.46 \text{ g}} = 5.69 \text{ E}^{-4} \text{ moles de ciclodextrina}$$

en base seca

% de geraniol encapsulado = Determinado por HPLC

complejo de inclusion encontrado experimentalmente = 1.3140g

complejo de inclusion, valor teórico = 1.2394g Ciclodextrina + 0.0878g geraniol = 1.3272g

% de rendimiento del complejo = $1.3140 / 1.3272 \times 100 = 99\%$