

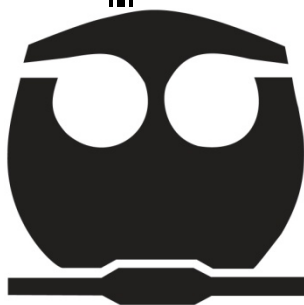


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
TERMODINÁMICA DE COMPLEJOS DE
INCLUSIÓN ANTIOXIDANTE-CICLODEXTRINA**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C A
P R E S E N T A :
IZA ESTELA MARTÍNEZ ISLAS**



MÉXICO, D.F.

2011

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Viades Trejo Josefina Esperanza**

VOCAL: **Profesor: Pérez Casas Silvia del Socorro**

SECRETARIO: **Profesor: Martínez Olmedo María de los Ángeles**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Tecante Coronel Alberto**

2° SUPLENTE: **Profesor: Novelo Torres Alma Miriam**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE TERMOFÍSICA 102, DEPARTAMENTO DE
FISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

Dra. SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS
ASESOR DEL TEMA

IZA ESTELA MARTÍNEZ ISLAS
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo de:

El consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 24822-49811Q)

El Subprograma 127: Formación Básica en Investigación de la Facultad de Química, UNAM.

La dirección General de apoyo académico de la UNAM (proyecto PAPIIT IN105107)

La Facultad de Química de la UNAM (proyecto PAIP 3290-09)

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A mi madre: Por el amor, apoyo, confianza, paciencia y por brindarme todo su tiempo.

A mis abuelos: Por su cuidado, entrega, sacrificios, consejos, cariño y por considerarme como una de sus hijas hasta su último día de vida.

A la Dra Silvia: por su amistad, confianza, ayuda y consejo en todo momento.

A mi familia: Por su gran apoyo, cuidado y cariño.

A mis amigos: Por escucharme y hacerme sonreír siempre y por los momentos inolvidables que vivimos juntos.

A Alejandro: Porque siempre ha sido un gran apoyo y mi mejor amigo.

A mis profesores: Por compartir su conocimiento.

A mis compañeros, maestros y personal del laboratorio 102.

A la facultad de Química y a la UNAM: por ayudarme a descubrir mi verdadera pasión por las ciencias.

*A mi madre, porque toda mi vida has sido mi mayor inspiración
y tu apoyo me ha ayudado cada día de mi vida.*

*A mis abuelos, mis segundos padres, que estén donde estén les
debo todos mis logros.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTIOXIDANTES	5
1.1 Oxidación en alimentos	6
1.1.1 Pardeamiento enzimático	7
1.1.2 Autooxidación de los lípidos	8
1.2 Antioxidantes	10
1.2.1 Antioxidantes polifenólicos (flavonoides)	11
1.2.2 Actividad antioxidante	13
1.3 Antioxidante utilizado: (±)-catequina	15
1.3.1 Historia	16
1.3.2 Obtención	17
1.3.3 Propiedades físicas y químicas	18
CAPÍTULO II. CICLODEXTRINAS	20
2.1 Historia	21
2.1.1 Periodo de descubrimiento (de 1891 a la década de 1930)	21
2.1.2 Periodo de estudios sistemáticos o de exploración (entre las décadas de 1930 y 1970)	22
2.1.3 Periodo de producción industrial y de búsqueda de aplicaciones (a partir de la década de 1970)	22
2.2 Obtención	23
2.3 Estructura química	24
2.3.1 Ciclodextrinas nativas	24
2.3.2 Ciclodextrinas modificadas	26
2.4 Complejos de inclusión	28
2.5 Toxicidad	29
2.6 Principales aplicaciones	30
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
3.1 Material y equipo	33
3.2 Reactivos	33
3.3 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	34
3.4 Descripción del equipo (TAM)	35
3.5 Arreglo experimental	38
CAPÍTULO IV. FUNDAMENTO TERMODINÁMICO	41
4.1 Modelo termodinámico empleado TAM	42
4.2 Cálculo del cambio de Entropía y de Energía Libre de Gibbs	44
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
5.1 Resultados a fuerza iónica constante	46
5.1.1 Pruebas con las CD nativas	46
5.1.2 Resultados obtenidos con β -CD hidroxipropiladas	49
5.2 Dependencia de los parámetros termodinámicos con el pH a 298.15K	59
5.3 Dependencia de los parámetros termodinámicos con la temperatura a pH=3 y pH=4	66

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO	77
REFERENCIAS.....	80

Introducción



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

En la actualidad, uno de los mayores retos de la industria alimenticia es la preservación de frutas y legumbres; debido a que de manera natural se realizan procesos de oxidación que afectan su olor, sabor, color, textura, valor nutricional e inocuidad. Dos de estos procesos son la autooxidación de los lípidos y el pardeamiento enzimático catalizado por la polifenoloxidasasa (PFO); los antioxidantes y sulfitos son, respectivamente, las mejores alternativas para prevenirlos.

Los antioxidantes más comunes en la naturaleza son polifenólicos, y dentro de éstos, los de mayor actividad antioxidante son los flavonoides. El flavonoide utilizado en el presente trabajo es la (\pm)-catequina.

Por otro lado, a pesar de que los sulfitos son potentes inhibidores de la PFO, su uso en alimentos está restringido por autoridades nacionales e internacionales debido a su alta toxicidad; es por esto que se buscan alternativas para prevenir este proceso. Una alternativa muy prometedora surgió en los años noventa, cuando se patentó el uso de ciclodextrinas (naturales y modificadas) para la preservación de jugos de frutas y vegetales.

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos que al encapsular los sustratos (formando un complejo de inclusión, anfitrión-huésped: [ciclodextrina-sustrato]), impiden la formación del complejo enzima-sustrato y por lo tanto previenen su oxidación.

Existen diversos anfitriones, sin embargo las ciclodextrinas son las más adecuados en este caso, debido a que:

- Modifican las propiedades del huésped, principalmente aumentan su solubilidad y disminuyen su reactividad.
- Son productos seminaturales, provenientes de una fuente renovable y natural (el almidón).
- Son producidas por toneladas con tecnologías amigables con el medio ambiente, lo que ha abatido sus altos precios iniciales.

- No existe toxicidad inherente a las CD por lo que son utilizadas hoy en día como aditivos en medicamentos, alimentos o cosméticos.

En alimentos, es común observar complejos de inclusión con β -CD debido a que es totalmente metabolizada por la micro flora del colon además de que el pH en el jugo gástrico es ideal para una rápida disociación del complejo.

La catequina es un potente antioxidante, muy poco soluble en agua y es sustrato de la PFO de la uva negra. En el presente trabajo se estudia la posibilidad de encapsularla utilizando β -CD y caracterizar éste complejo mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Además se pretende que este trabajo sirva como preámbulo para el uso de la catequina y del complejo con β -CD como aditivo en alimentos para retardar la autooxidación de los lípidos y el pardeamiento enzimático en jugos.

El presente trabajo consta de 5 capítulos:

En el primer capítulo se presenta una revisión bibliográfica de generalidades del proceso de oxidación en alimentos, de los antioxidantes y las propiedades físicas y químicas de la (\pm)-catequina.

En el capítulo II se presenta una revisión bibliográfica acerca de las propiedades físicas y químicas, la obtención, toxicidad, aplicaciones y la estructura de las ciclodextrinas; además de generalidades acerca de los complejos de inclusión.

En el capítulo III se enlista el material, equipos y reactivos utilizados, además se describen la técnica utilizada (ITC) y las partes más importantes del calorímetro utilizado (TAM).

En el capítulo IV se explican el fundamento termodinámico y el modelo utilizado por el TAM utilizado en el cálculo de los parámetros termodinámicos.

En el capítulo V se presentan los resultados experimentales obtenidos y el análisis de los mismos.

Finalmente se presentan las conclusiones y referencias al final de este escrito.

Objetivos

- Formar complejos estables antioxidante (A) – ciclodextrina (CD) con diversas estequiometrías (CD_nA_m).
- Determinar los parámetros termodinámicos (ΔH , ΔG , ΔS y K) de los complejos antioxidante-ciclodextrina, mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica.
- Estudiar los efectos de la temperatura y el pH en la formación de los complejos.

Hipótesis

- Es posible caracterizar la formación del complejo CD_nA_m mediante calorimetría de titulación isotérmica.
- Es posible determinar los parámetros para la optimización de la formación del complejo CD-A.
- La (\pm)-catequina puede formar complejos de inclusión y así mejorar su solubilidad y retrasar el proceso de oxidación.

Capítulo I.

Antioxidantes

1.1 Oxidación en alimentos

En alimentos, principalmente frutas y vegetales se llevan a cabo procesos de oxidación durante su almacenamiento, distribución, procesamiento o preparación final.

Dos de estos procesos son el pardeamiento enzimático y la autooxidación de los lípidos (figura 1.1.). Estos procesos están asociados a la formación o modificación de compuestos con olor que afectan su aroma, y de los hidroxiácidos que afectan el sabor. Además se presentan procesos que provocan la modificación del color, debido a reacciones de Maillard (entre los compuestos reducidos de lípidos y proteínas), y de la textura por reacciones de entrecruzamiento de proteínas. Asimismo, el valor nutricional se ve modificado por el decremento de ácidos grasos esenciales y la destrucción de vitaminas de grasas y la inocuidad de los alimentos por la oxidación del colesterol¹.

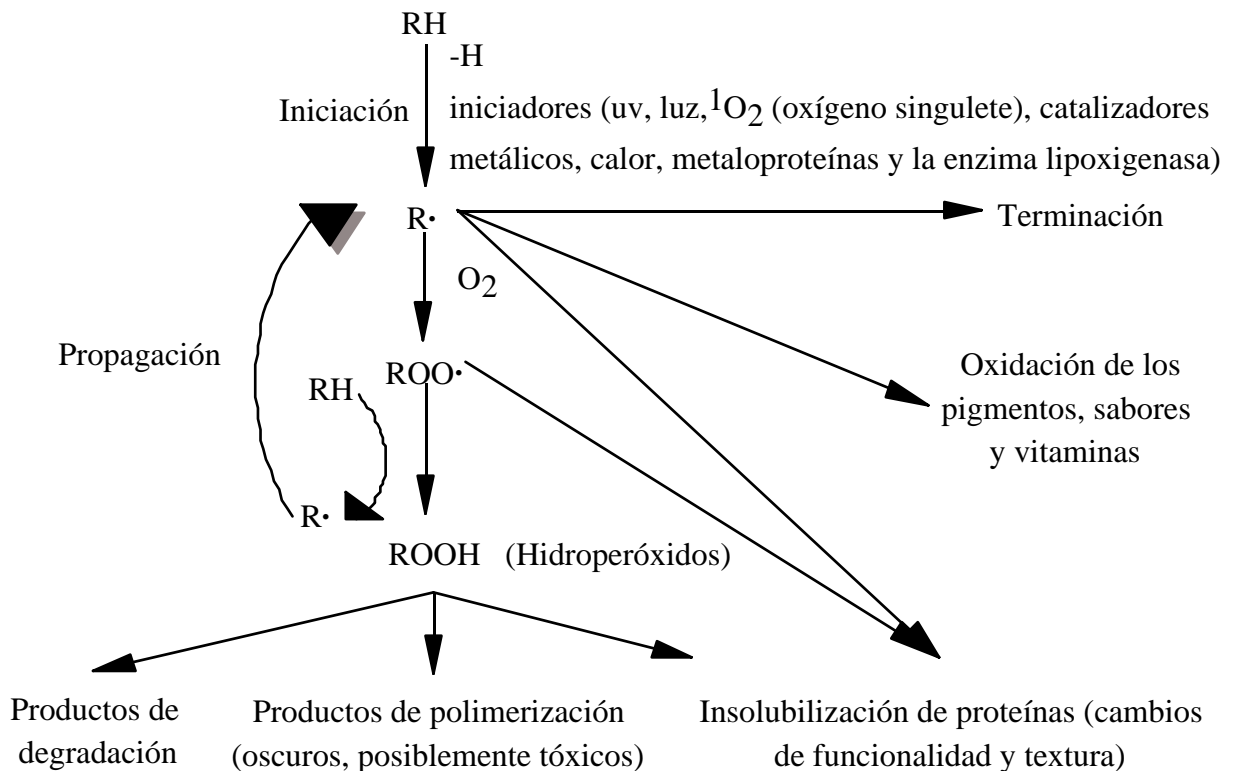


Figura 1. 1: Esquema general de la autooxidación de los lípidos.

Existen diversas formas de prevenir los procesos de oxidación, sin embargo el presente trabajo se enfocará al estudio del uso de antioxidantes y el uso de ciclodextrinas para encapsular sustratos fenólicos de la polifenoloxidasas que cataliza el pardeamiento enzimático.

1.1.1 Pardeamiento enzimático

Las frutas y vegetales al ser cortados, pelados, exprimidos o maltratados, desarrollan un color café, resultado de un proceso llamado “pardeamiento enzimático”. Este proceso debe su nombre a que las primeras reacciones que se llevan a cabo, son catalizadas por la enzima polifenoloxidasas (PFO).

Los sustratos de la enzima son principalmente compuestos monofenólicos y difenólicos que se encuentran en los tejidos vegetales. Los o-difenoles son oxidados a o-quinonas en presencia de la PFO y de oxígeno atmosférico. Las o-quinonas son electrófilos fuertes que pueden sufrir fácilmente ataques nucleofílicos del agua, polifenoles, aminoácidos, péptidos y proteínas; dando lugar a productos de adición tipo Michaelⁱ (1,4). Además son muy inestables y potentes oxidantes que pueden sufrir reacciones de condensación para producir polímeros coloridos de estructuras complejas (en su mayoría desconocida), denominados de forma genérica, melanoidinas.²

El pardeamiento enzimático depende de la presencia de oxígeno, agentes reductores, iones metálicos, el pH y la actividad de la enzima. Puede prevenirse mediante la eliminación de oxígeno (por medio de vacío o de atmósfera inerte); utilizando agentes reductores (capaces de reaccionar con las o-quinonas para dar o-difenoles); por inhibición directa de la enzima PFO; variando condiciones de pH y temperatura; utilizando agentes quelantes que actúen sobre el grupo prostético de la enzima (Cu^{2+}), o bien usando agentes capaces de encapsular los sustratos fenólicos.

Los sulfitos son potentes inhibidores de la PFO, sin embargo su uso está restringido en alimentos, debido a su alta toxicidad. Desde 1986 la FDA

ⁱ Adición de un nucleófilo a un compuesto carbonílico α,β -insaturado.

(Administración de Alimentos y Medicamentos), por sus siglas en inglés, prohibió su uso en alimentos y desde 1998 el JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios) al cual pertenece México, estableció que la ingesta diaria permitida no debía superar concentraciones mayores a 0.7mg/kg; desde entonces se han buscado alternativas para prevenir el pardeamiento enzimático. Una de las cuales es el uso de ciclodextrinas (nativas y modificadas) para preservar jugos³ de manzana, durazno, pera y plátano. Su uso en jugos de frutas y vegetales, se patentó en 1990⁴.

1.1.2 Autooxidación de los lípidos

En los alimentos los lípidos más comunes son triglicéridos (en forma de aceites en vegetales y grasas en animales) y los fosfolípidos (en membranas biológicas). Además los ácidos grasos poliinsaturados (ácidos grasos libres, triglicéridos o fosfolípidos) pueden descomponerse por la reacción espontánea entre el oxígeno atmosférico y los lípidos; conocida como autooxidación.

La autooxidación se lleva a cabo por reacciones en cadena vía radicales libres, las cuales son iniciadas cuando los lípidos son expuestos a la luz, al calor, a radiación ionizante, iones metálicos (hierro y cobre) o metaloproteínas (que funcionan como catalizadores) y por la acción de la enzima lipoxigenasa (presente en el maíz, pepinos, avena, cebada, soya, chicharos y jitomates, principalmente), (figura 1.2).

Todo mecanismo por radicales libres involucra 3 pasos: Iniciación, propagación y terminación. La abstracción de un átomo de hidrógeno, del lípido R, por especies reactivas da lugar a la iniciación de la reacción. Otro tipo de iniciación se da en aceites, debido a que existen trazas de hidroperóxidos que pueden sufrir rupturas homolíticas o reaccionar en presencia de iones metálicos como catalizadores.

Generalmente la abstracción del átomo de hidrógeno se lleva a cabo donde el enlace es más débil (energía de disociación pequeña); especialmente cuando el carbono está en posición α a un doble enlace, y mucho más cuando se encuentra entre dos alquenos (figura 1.3).



Figura 1. 2: Mecanismo de la autooxidación de los lípidos.

Lo anterior se debe a que el radical obtenido se estabiliza por resonancia, ya que el solapamiento de un orbital pi con los orbitales p permiten que el electrón impar esté deslocalizado sobre átomos de carbono. En el caso de tener un carbono α a dos alquenos como aquél de la figura 1.3, el radical obtenido puede deslocalizarse a través de 5 átomos de carbono. En este sistema, la reacción con el oxígeno se da preferentemente por adición a los carbonos terminales C-1 o C-5.

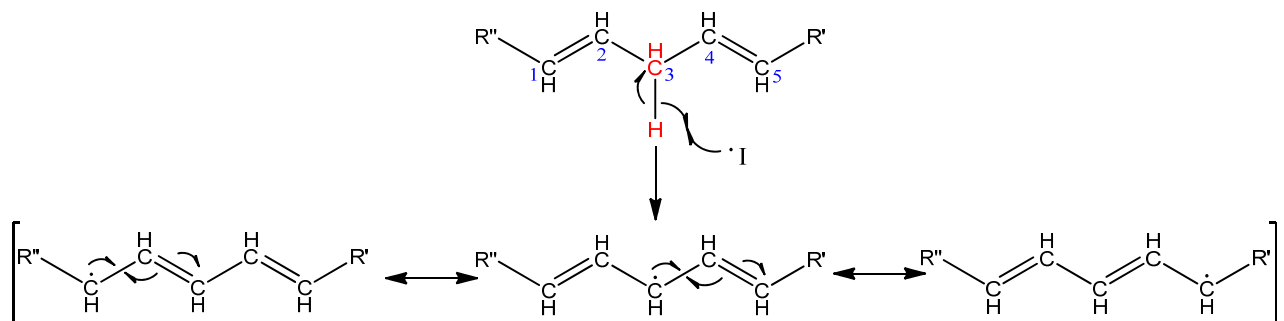


Figura 1. 3: Formación y deslocalización de un radical libre.

La autooxidación posee un periodo de inducción durante el cual los cambios en los lípidos son tan pequeños que son casi imperceptibles, posteriormente la deterioración oxidativa es mucho más rápida. Pequeñas concentraciones de prooxidantes como los iones metálicos acortan este tiempo; contrariamente, los

antioxidantes lo incrementan. En los alimentos, existen antioxidantes naturales (A), sin embargo estos antioxidantes naturales se pierden fácilmente y es necesario adicionar más, para retardar efectivamente el proceso de oxidación.

1.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son todas aquellas sustancias capaces de retrasar, retardar o prevenir el desarrollo de la ranciedad o la deterioración de sabores debido a la oxidación (deterioro oxidativo de los lípidos). Éstos extienden la vida útil de los alimentos y reducen el desgaste y pérdidas nutricionales; sin embargo no pueden mejorar la calidad de un alimento ya oxidado. Lo anterior se debe principalmente a que los antioxidantes intervienen en el paso de propagación, reaccionando con radicales alcoxilo e hidroperoxilos dando lugar a radicales más estables o especies no radicalarias como se muestra en el esquema siguiente.

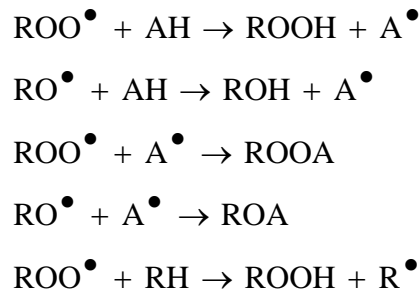


Figura 1. 4: Mecanismo de acción del Antioxidante (A).

Los antioxidantes se dividen en primarios o secundarios dependiendo de la forma en que interfieren en el proceso de oxidación. Los primarios reaccionan con los radicales libres (lipídicos) de alta energía para producir productos termodinámicamente más estables. Los secundarios actúan de diversas formas: sea como agentes quelantes de catalizadores metálicos, como captadores de oxígeno, ayudando a la conversión de hidropéroxidos a especies no radicalarias (aminoácidos y proteínas), absorbiendo radiación UV o desactivando el oxígeno singleteⁱⁱ. Por último, los antioxidantes sinérgicos, promueven la actividad de los antioxidantes, pero no tienen actividad antioxidante propia.

ⁱⁱ La oxidación de los lípidos en presencia de oxígeno singlete es mucho más rápida que en presencia de oxígeno triplete.

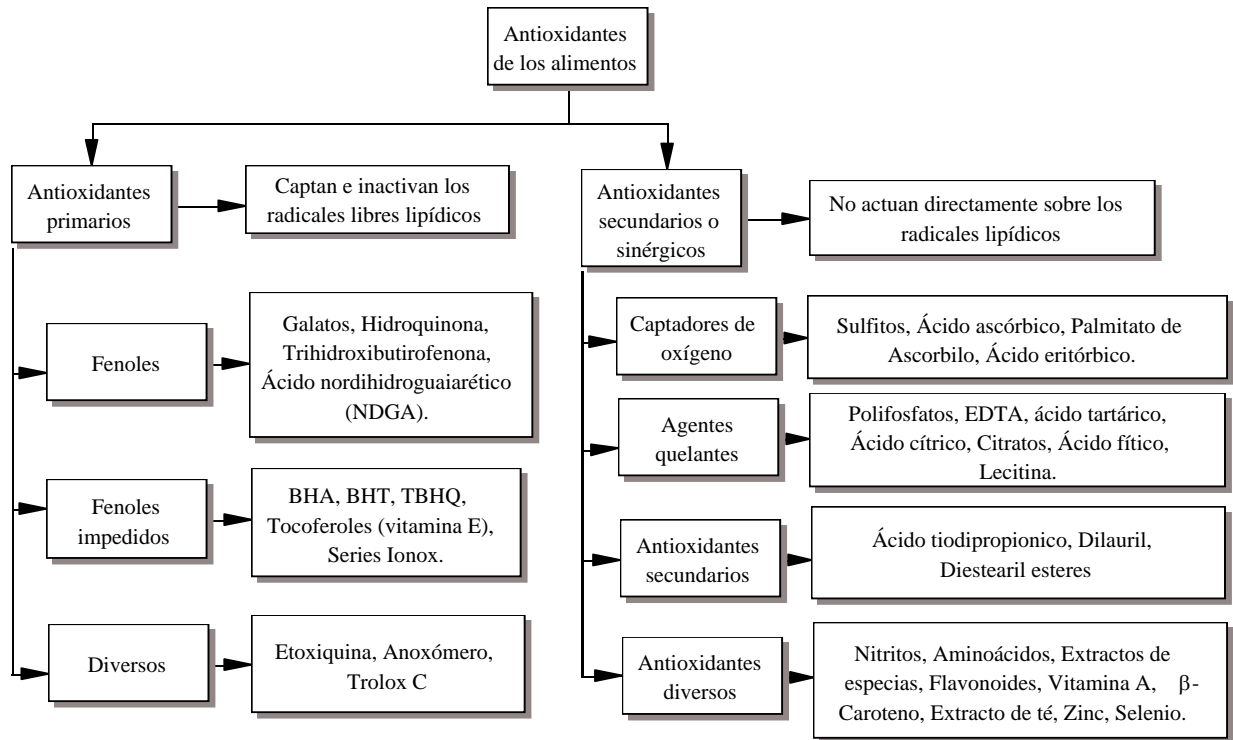


Figura 1. 5: tipos de antioxidantes

Un antioxidante ideal es aquel que no imparte color, olor o sabor (incluso después de periodos prolongados de almacenamiento y calentamiento), es efectivo a bajas concentraciones, es de fácil obtención, está disponible a bajo costo, es fácil de incorporar y su actividad antioxidante no está limitada por el tipo de lípido. Además en alimentos se espera que ni el antioxidante ni sus productos sean tóxicos en concentraciones mayores a las ingeridas normalmente y también que sean fáciles de detectar, de identificar y de medir.

Debido a que la mayoría de los antioxidantes naturales son componentes comunes de los alimentos y han sido utilizados en la dieta de muchos miles de años, los humanos se han adaptado a su consumo⁵.

1.2.1 Antioxidantes polifenólicos (flavonoides)

Los antioxidantes más comunes en la naturaleza poseen al menos un anillo fenólico en su estructura. Los flavonoides son los antioxidantes fenólicos que presentan una mayor actividad antioxidante.

Los flavonoides son una extensa clase de polifenoles de bajo peso molecular y se encuentran en frutas y vegetales; principalmente en manzanas, cebollas, bayas, tés, cerveza y vino. En general se encuentran unidos a azúcares, ácidos orgánicos y otras moléculas, pero en el caso de la catequina es común encontrarla en su forma libre o de galato o polímero. Se les asocia actividad antiinflamatoria, antialérgica y anticancerígena. Su actividad depende de la reactividad de sus grupos hidroxilo, además pueden actuar como agentes reductores (terminadores de radicales libres), captadores de oxígeno, pueden formar quelatos con metales y reaccionar con los hidroperóxidos. A pesar de su gran actividad antioxidante, sólo algunos son aceptados para su uso en alimentos.

La estructura de los flavonoides se basa en dos anillos aromáticos A y B y un heterociclo de 6 miembros (pirano) C. Se dividen en flavonoles, flavonas, isoflavonas y los flavan-3-oles en función de las sustituciones que presentan.

Los flavan-3-oles tienen grupos hidroxilo en las posiciones 3, 5 y 7 del esqueleto de los flavonoides (figura 1.6). La catequina incluye también grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4'.

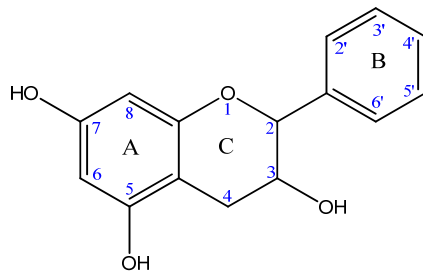


Figura 1. 6: Estructura de un flava-3-ol

Las propiedades de los polifenoles, especialmente, como donadores de protones y electrones son un factor para predecir su potencial como captadores de radicales libres. Esta gran actividad se debe principalmente a la relativa estabilidad de los radicales fenoxilo, debido a su deslocalización en el anillo como se muestra en las estructuras resonantes; sin embargo el fenol por sí mismo es inactivo como antioxidante.

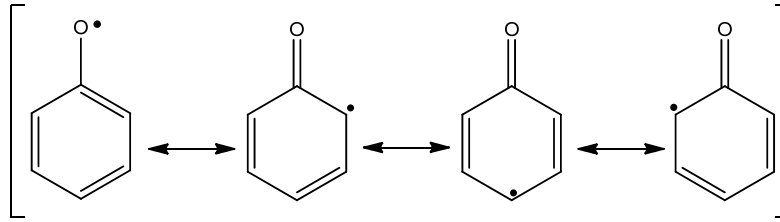


Figura 1. 7: Estructuras resonantes del radical fenoxilo.

La presencia de un segundo grupo hidroxilo en la posición orto (catecol), incrementa su actividad antioxidante principalmente por la estabilización del intermediario.

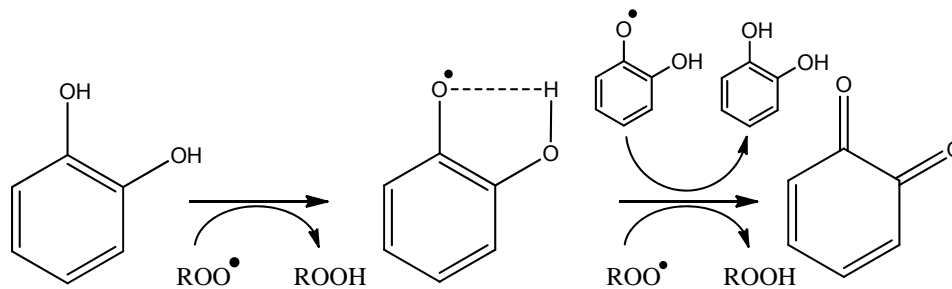


Figura 1. 8: Reacción de hidroperóxidos con un antioxidantes catecólico.

1.2.2 Actividad antioxidante

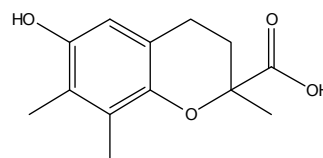
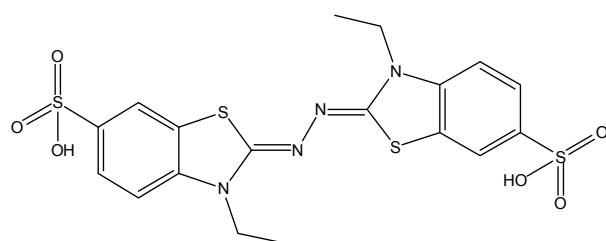
La actividad antioxidante depende de varios factores como la composición lipídica, la concentración del antioxidante, la temperatura, la presión del oxígeno y la presencia de otros antioxidantes.

Estudios previos⁶ han demostrado que la actividad antioxidante está determinada por:

1. Su reactividad como agente donador de electrones y protones (potencial de reducción).
2. La reactividad del radical derivado del antioxidante, (habilidad de estabilizar y deslocalizar los electrones no apareados).
3. Su reactividad con otros antioxidantes.
4. Su capacidad de formar quelatos con metales de transición.

Idealmente todas estas propiedades deben ser medidas para determinar la actividad antioxidante, sin embargo en la práctica se han desarrollado técnicas que combinan algunas de éstas propiedades para dar un valor estimado de su actividad.

Los métodos más utilizados se basan en la habilidad de captar un radical orgánico como la ORAC (Capacidad de absorción del radical oxígeno) y la TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox).



ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxilo)

Figura 1. 9: Estructura del ABTS y el Trolox

Rice-Evans y sus colaboradores⁷ desarrollaron la TEAC que permite clasificar a los flavonoides en función de su actividad como captadores de radicales libres. Este método se basa en la habilidad de un antioxidante de captar a pH=7.4 un radical catión cromóforo del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) en relación de aquella del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxilo (Trolox) que es un análogo soluble en agua de la vitamina E. La TEAC, se define como la concentración de Trolox con la misma capacidad antioxidante que 1mM del antioxidante sujeto de estudio.

Otro método fue desarrollado por Jovanovic⁸, éste se basa en los potenciales de reducción a pH=7 (E_7 del par $A - O^{\bullet} / A - OH$ evaluado in vitro).

Finalmente otra medida que se asocia con la actividad antioxidante de captación es el potencial de medio pico $E_{p/2}$ ⁱⁱⁱ. Esto se debe a que tanto la oxidación electroquímica $A - OH \rightarrow H^+ + A - O^{\bullet} + e^-$ como la reacción de donación de un

ⁱⁱⁱ De acuerdo a la IUPAC, se define como el potencial del electrodo de trabajo para el que la diferencia entre la corriente total y la corriente residual es igual a la mitad de la corriente de pico.

átomo de hidrógeno $A-OH \rightarrow H^{\bullet} + A-O^{\bullet}$ involucran la ruptura de un mismo enlace.

Los flavonoides con un bajo potencial de medio pico ($E_{p/2} < 0.2\text{mV}$) y una actividad grande ($TEAC \geq 1.9\text{mM}$), son buenos captadores. En el caso de la catequina, se tienen los siguientes valores $TEAC = 2.4\text{mM}$ y $E_{p/2} = 0.16\text{mV}$, lo que la convierte en un buen antioxidante, además que debido a su potencial $E_7 = 0.57\text{V}$, es capaz de reducir radicales libres altamente oxidantes como son:

$$E_7(HO^{\bullet}, H^+ / HO) = 2.31\text{V}$$

$$E_7(RO^{\bullet}, H^+ / ROH) = 1.6\text{V}$$

$$E_7(ROO^{\bullet}, H^+ / ROOH) = 1.00\text{V}$$

De acuerdo a Rice-Evans, la catequina debe su poder antioxidante a la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3', 4', 3, 5 y en menor importancia a aquellos en 5 y 7. Su actividad se vería incrementada si tuviera un grupo carbonilo en la posición 4 y un doble enlace entre 2 y 3.

1.3 Antioxidante utilizado: (\pm)-catequina

Existen antioxidantes que son extraídos principalmente del té y tienen una estructura similar a la catequina que se conocen como catequinas. Son sensibles a la oxidación, la luz, el pH, son astringentes y amargas, además de ser muy poco solubles en agua. Las catequinas son: Catequina, epicatequina (EC), galocatequina (ECG), epigalocatequina (EGC) y galato de epigalocatequina (EGCG).⁹

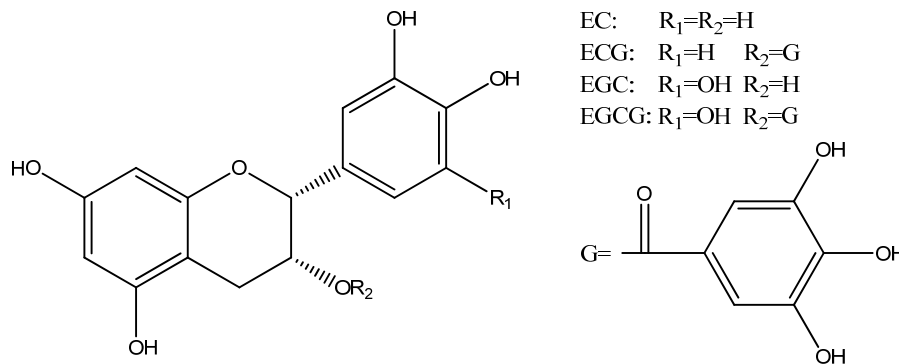


Figura 1. 10: Principales catequinas.

A pesar de que las análogas de la catequina presentan una mayor actividad, los diastereoisómeros (+)-catequina (2R:3S) y su levorotatorio diastereoisómero (-)-epicatequina (2R:3R) son los flavan-3-oles más comunes en la naturaleza y su costo es mucho menor. En el presente estudio se utilizará la (±)-catequina como antioxidante.

1.3.1 Historia

La catequina fue descubierta en 1821 por el químico analítico alemán, F.F Runge (descubridor de la anilina) y fue aislada de un extracto de la planta india *Acacia Catechu*. Actualmente se cree que Runge aisló una mezcla de (-)-epicatequina con algunas trazas de (+)-catequina. Diez años después, Ness van Esebeck, utilizó por primera vez el nombre de catequina. El nombre del catecol deriva de la catequina debido a que es uno de los productos de su pirolisis.

A finales del siglo XIX y principios del XX, la planta *Gambir Catechu*, fuente principal de la catequina, se volvió comercial e investigadores como A.G. Perkin y St. Von Kostanecki, realizaron varios estudios e hicieron varias contribuciones en la elucidación de su estructura.

A pesar de que Perkin distinguió una diferencia entre la catequina de la *Acacia* y del *Gambir*, no pudo inferir en qué consistía. Esto se debe a que no presentaba actividad óptica en alcohol (disolvente comúnmente utilizado), sin embargo la rotación específica en acetona es +16°. Por su parte, Kostanecki determinó su estructura, pero años después demostraron que era incorrecta. Sin embargo en 1920 Freudenberg, utilizó una de sus reacciones (figura 1.11) para determinar la estructura de la catequina y descubrió que tenía el mismo esqueleto que un flavonoide. En 1957, E. Hardegger y sus colaboradores demostraron la configuración de la (+) catequina y posteriormente la de la (-) epicatequina.

En los años siguientes se realizaron estudios de su actividad antioxidante y de posibles aplicaciones farmacéuticas.

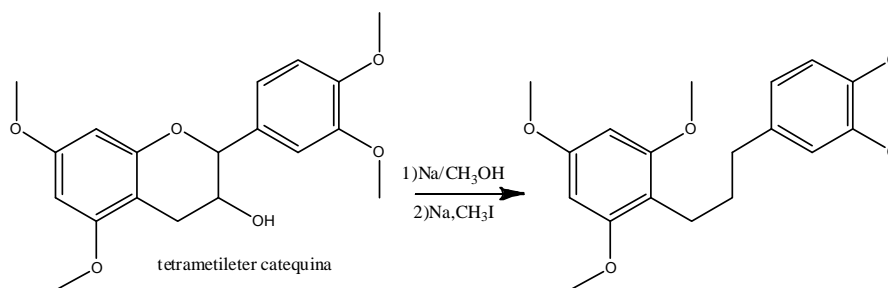


Figura 1. 11: Reacción de Kostanecki para determinar la estructura de la catequina.

1.3.2 Obtención

Los estereoisómeros de la catequina son extraídos de las plantas *Uncaria gambir*, *Camelia*, *Quercus* y *Casteanea*, además de las uvas negras, el té verde y el vino rojo. El producto mayoritario es la (+)-catequina.

La planta *Acacia Gambir* o simplemente *Gambir*, es la mejor fuente de la (+)-catequina. El material es pulverizado y posteriormente es amasado en mezcla de hielo-agua para disolver la mayor parte de los taninos; la catequina se encuentra en estado cristalino en el crudo. El crudo se colecta, se seca y se recristaliza repetidamente de agua caliente utilizando carbón activado para quitar el color. Otra forma de obtenerla es pulverizar el bloque de *Gambir* y mezclarlo con arena, extrayéndolo completamente con éter y recristalizando de agua.

A su vez, la planta *Acacia Catechu*, es la mejor fuente de la (-)-epicatequina. Si la extracción del duramen (parte interna del tronco de un árbol) se realiza con agua, se obtiene una mezcla de estereoisómeros de catequina y de epicatequina. Sin embargo, una extracción con acetona y recristalización de etilacetato de sodio da lugar a la (-)-epicatequina.

Si la (+)-catequina es calentada en una solución acuosa con carbonato de sodio, aparecen en la solución catequinas estereoisoméricas y productos de condensación como los taninos. El producto principal es la (+)-epicatequina, además de 2 racematos uno de los cuales es la mezcla equimolar de (+) y (-)-epicatequina. Si la (-)-epicatequina es sometida a las mismas condiciones, se

obtiene (-)-catequina y 2 racematos uno de los cuales es la (±) catequina y el otro es la (±)-epicatequina.

La síntesis de las catequinas se realiza mediante la reducción de sus respectivas antocianinas o por el método de Weinges que consiste en reducir dihidroflavonoles obtenidos mediante extracción de fuentes naturales.

Además la (±)-catequina está presente en una concentración 0.18% (m/m) y la (-)-epicatequina con una concentración del 0.49%, en las hojas del té verde.

Finalmente, la presencia de catequina en coníferas se conocía desde 1953, pero recientemente se descubrió que el abeto blanco contiene cantidades considerables para ser una fuente económicamente viable de obtención de catequina.

1.3.3 Propiedades físicas y químicas

La (±)-catequina es también conocida como: trans-3,3',4',5,7-pentahidroxiavana; cis-(±)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopirano-3,5,7-triol y (±)-2*r*-(3,4-dihidroxifenil)-cromano-3*t*,5,7-triol. Tiene fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$, MM=290.28g.mol⁻¹, punto de fusión de 200°C y solubilidad en agua de 89mg/100g.

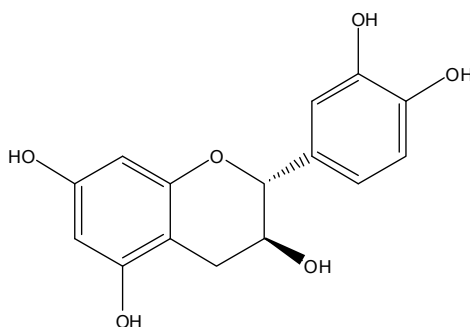


Figura 1. 12: Estructura de la (±)-catequina.

La catequina y la epicatequina sufren epimerización in vitro en la posición 2 en soluciones acuosas calientes como se muestra: (+)-catequina ⇌ (+)-epicatequina y (-)-epicatequina ⇌ (-)-catequina. En presencia de ácidos minerales o agua muy caliente, las catequinas sufren autocondensaciones formando dímeros o polímeros como la dicatequina.

En condiciones alcalinas, la catequina sufre un rearrreglo dando lugar a la formación del ácido catequínico y a dímeros y polímeros coloridos.

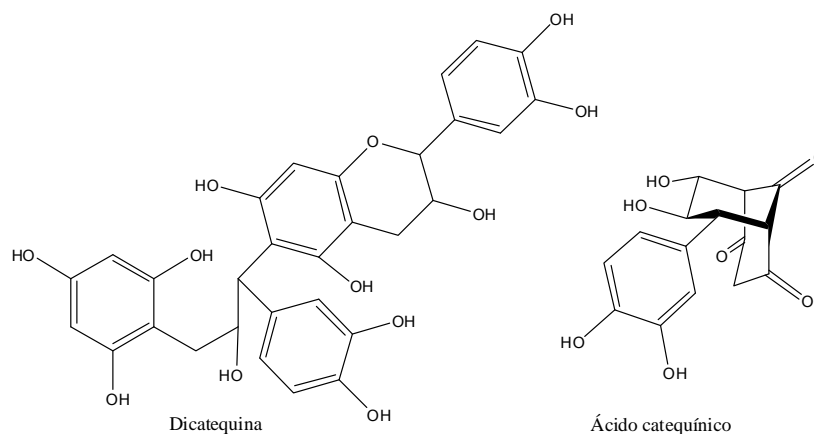


Figura 1. 13: Estructura de la dicatéquina y el ácido catequínico.

La presencia de la polifenoloxidasas de la uva negra, en condiciones alcalinas y aire, permite la formación de dehidrocatequina A (compuesto amarillo) y de los ácidos 2'- y 6'-hidroxicatequínicos. Se ha reportado que a $\text{pH} < 4$ se observa la formación de dímeros principalmente incoloros en una solución ligeramente amarillenta, mientras que conforme se incrementa el pH , se observan compuestos coloridos principalmente debido a la formación de la dehidrocatequina A.¹⁰

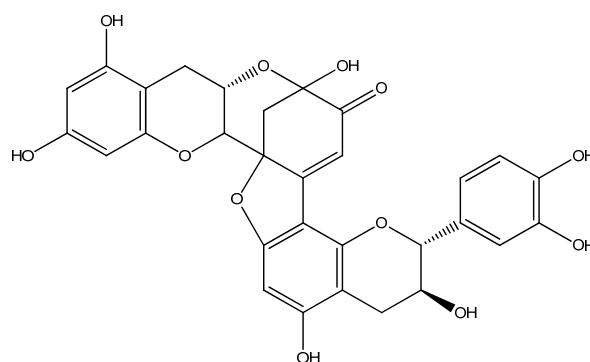


Figura 1. 14: Estructura de la dehidrocatequina A.

En el estudio anterior¹⁰, la oxidación de la (+)-catequina, en presencia de la polifenoloxidasas de la uva, fue monitoreada vía HPLC en un intervalo de pH 3-7 y sólo a $\text{pH}=3$ (5min) y en menor cantidad a $\text{pH}=4$, se detectó la presencia de la o-quinona derivada de la (+)-catequina por lo que se concluyó que las o-quinonas son especies muy reactivas que aumentan su reactividad conforme se aumenta el pH .¹¹

Capítulo II.

Ciclodextrinas

Algunas de las moléculas más utilizadas en el estudio de complejos de inclusión, son las ciclodextrinas (CD). Esto se debe principalmente a su capacidad de encapsular un número considerable de pequeñas moléculas hidrofóbicas o parcialmente hidrofóbicas. Los complejos de inclusión son comúnmente llamados anfitrión-huésped (*host-guest*) refiriéndose como huésped (guest) a cualquier molécula hidrofóbica capaz de formar estos complejos con una ciclodextrina (host).

Las CD presentan una cavidad interna hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica, que es la base de sus principales aplicaciones industriales: como acarreadores de fármacos, como aditivos en alimentos, en cosméticos, en industria textil, en química analítica, entre otras. Estas aplicaciones se basan en el hecho que los complejos pueden cambiar las propiedades químicas del huésped, por ejemplo su solubilidad o estabilidad.

2.1 Historia

József Szejtli¹² divide la historia del desarrollo de las ciclodextrinas en 3 periodos: de descubrimiento, de estudios sistemáticos y por último el de producción industrial y de búsqueda de aplicaciones.

2.1.1 Periodo de descubrimiento (de 1891 a la década de 1930)

La historia de las ciclodextrinas se remonta a 1891, cuando el científico francés A. Villiers, aisló 3g de una sustancia cristalina, a partir de la digestión bacteriana de 1000g de almidón. Villiers determinó que su fórmula molecular era $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$ y la nombró celulosina debido a que al igual que la celulosa, presentaba resistencia a la hidrólisis ácida y no mostraba propiedades reductoras.

Posteriormente, en 1903, el biólogo austriaco, Schardinger reportó que aproximadamente 25-30% del almidón podía convertirse en dextrinas cristalinas que eran idénticas a la celulosina de Villiers. Nombró estas dextrinas como la α -dextrina y la β -dextrina; Siendo la α -dextrina el producto mayoritario en cada experimento. Las diferenció e identificó a través de los colores que presentaban sus complejos con yodo. El complejo α -dextrina-yodo es de color azul cuando está

húmedo y verde grisáceo cuando está seco. Por su parte, el complejo β -dextrina es café rojizo sea seco o húmedo.

Schardinger continuó sus estudios por ocho años más y descubrió que las dextrinas podían ser obtenidas no sólo a partir del almidón de las papas como lo hizo Villiers en primer lugar, sino también, a partir de arroz y de trigo. Asoció la formación de las dextrinas al tipo de bacteria con la que se realizaba la digestión del almidón. Algunos autores¹³ consideran 1911, año en el que se publica el último artículo de Schardinger, como la fundación de la química de las ciclodextrinas.

En 1935, K. Freudenberg y R. Jacobi descubrieron la γ -ciclodextrina. En años siguientes se aislaron nuevas ciclodextrinas de mayor tamaño.

2.1.2 Periodo de estudios sistemáticos o de exploración (entre las décadas de 1930 y 1970)

En 1938, Freudenberg y sus colaboradores mostraron que las ciclodextrinas son unidades de glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos α -(1,4) en forma de anillo con una cavidad interna. En 1954, el alemán F. Cramer, uno de los colaboradores de Freudenberg, publica el libro "*Einschlussverbindungen*" donde describe las principales características estructurales y fisicoquímicas de las 3 ciclodextrinas nativas (α , β y γ) incluyendo estructura química, tamaño de la cavidad, solubilidad, reactividad, habilidad de formación de complejos y su efecto en la estabilidad de los huéspedes.

2.1.3 Periodo de producción industrial y de búsqueda de aplicaciones (a partir de la década de 1970)

Hasta antes de esta década, se creía que las ciclodextrinas no podrían tener aplicaciones debido a su alto costo y a su aparente toxicidad. Sin embargo después de estudios serios, se demostró que no existía toxicidad inherente a las ciclodextrinas.

A partir de este momento los estudios, patentes y artículos relacionados con las aplicaciones tuvieron su máximo auge, y fue en 1981 cuando se realizó el primer simposio internacional de ciclodextrinas. En los años posteriores se desarrollaron

nuevos métodos para sintetizar CD con lo que se abatieron sus costos de producción y aumentaron sus aplicaciones.

2.2 Obtención

El tratamiento del almidón con amilasa del *Bacillus macerans* da una mezcla de aproximadamente 60% de α -CD, 20% de β -CD y 20% de γ -CD junto con pequeñas cantidades de ciclodextrinas con más de 8 unidades de glucopiranosas¹⁴. Debido a que el proceso de purificación de las CD nativas es muy complicado, se desarrollaron nuevos métodos para la obtención de las CD.

Las ciclodextrinas se obtienen por la licuefacción del almidón a altas temperaturas en presencia de α -amilasa y ácidos como HCl(ac). Después se enfría a una temperatura óptima y se agrega la enzima ciclodextringlucosiltransferasa (CGT-asa). Posteriormente puede ser sometida a dos diferentes tratamientos, en ausencia o presencia de disolvente. En el primero, se realiza la separación por centrifugación. En el segundo, se utiliza un agente para formar complejos (tolueno para obtener un complejo con β -CD, 1-decanol para la formación del complejo con α -CD y con ciclohexadecanol para la γ -CD). Los complejos formados son insolubles en la mezcla anterior y por lo tanto se separan por filtración. El disolvente puede ser eliminado por destilación o extracción. La solución acuosa obtenida al eliminar el disolvente, se trata con carbón activado y se filtra. Las ciclodextrinas son obtenidas cristalizando y filtrando esta disolución.

Las CGT-asas son producidas por un gran número de microorganismos como el *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans* y *Alkalophylic bacillus* No 38-2. Además la ingeniería genética ha hecho posible la producción de nuevas CGT-asas más activas y específicas que aquellas obtenidas por los microorganismos antes mencionados.

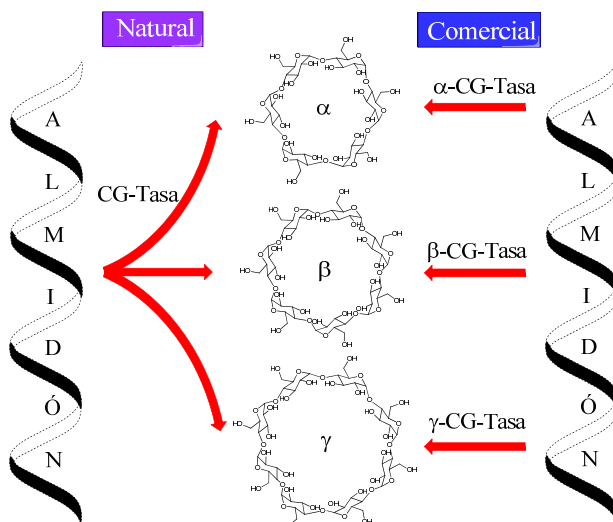


Figura 2.1: Representación esquemática de la obtención de las CD nativas a partir de almidón y CGT-asas naturales y comerciales.

2.3 Estructura química

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por unidades de D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos α -(1,4).

2.3.1 Ciclodextrinas nativas

Las 3 ciclodextrinas nativas o de primera generación y las más utilizadas son la α -CD, β -CD y γ -CD; las cuales están constituidas de 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosas respectivamente formando un cono trunco. En la figura 2.2 se esquematizan las ciclodextrinas nativas donde $n=6, 7$ y 8 representan respectivamente la α, β y γ -CD.

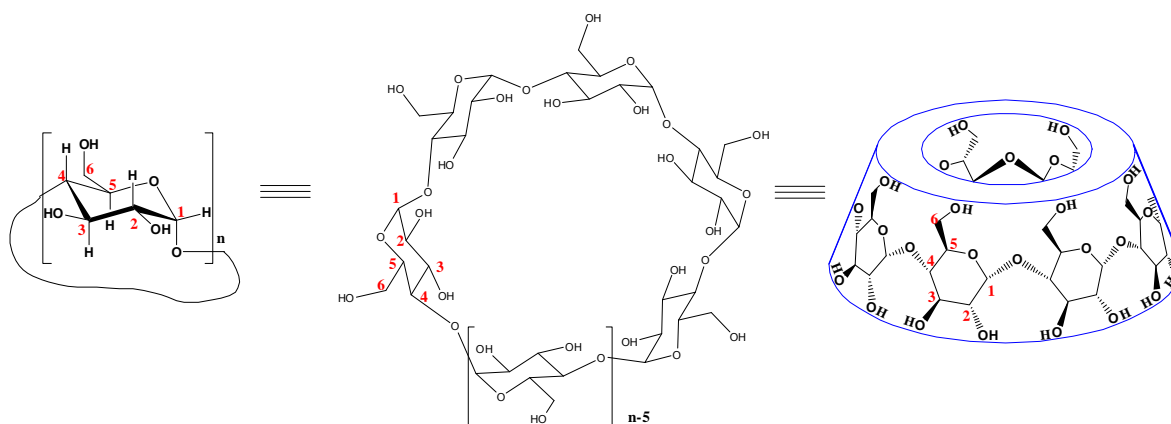


Figura 2.2: Diferentes representaciones de las ciclodextrinas.

Sus principales propiedades se encuentran en la tabla 2.1 y sus estructuras en la figura 2.3.

Tabla 2.1: Características de las 3 ciclodextrinas principales.

Ciclodextrina	α	β	γ
Unidades de glucopiranososa	6	7	8
Masa molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	972	1135	1297
Solubilidad en agua ($\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) a 25°C	14.5	1.85	23.2
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Volumen aproximado de la cavidad (Å^3)	174	262	427

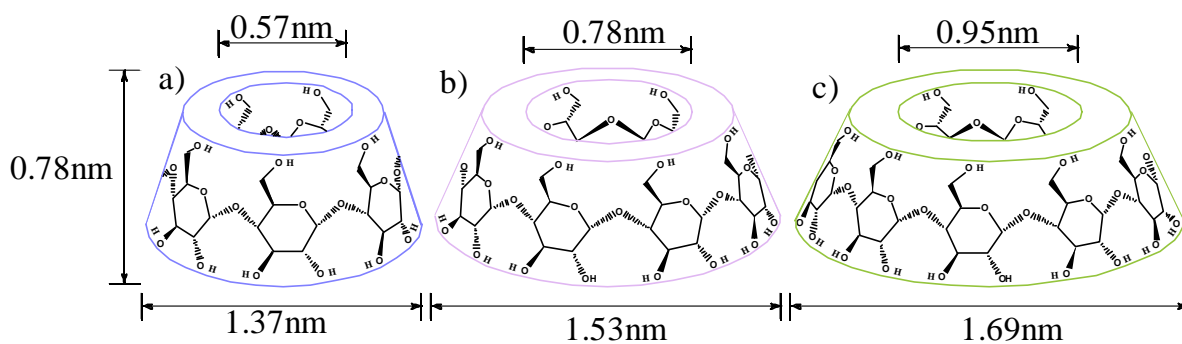


Figura 2.3: Estructura y diámetro externo e interno de la a) α -CD, b) β -CD y c) γ -CD.

No se pueden formar CD de menos de 6 unidades de glucopiranososa debido al impedimento estérico. Además, las ciclodextrinas de más de 8 unidades de glucopiranososa son poco utilizadas ya que a diferencia de las CD nativas, no forman un cono regular, sino una estructura colapsada, como se muestra en la figura 2.4, por lo que su cavidad real es más pequeña que aquella de la γ -CD.

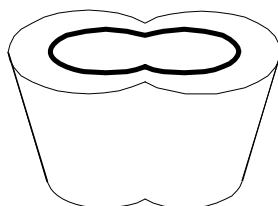


Figura 2.4: Cilindro colapsado, estructura de la δ -CD

De acuerdo a las estructuras, de las 3 ciclodextrinas nativas, obtenidas mediante cristalografía¹⁵ de rayos X, se observa que los hidroxilos secundarios ($\text{C}_2\text{-OH}$ y

C₃-OH) se localizan en la parte más ancha del cono, mientras que los OH primarios (C₆-OH) se encuentran en la parte angosta. La cavidad interna está delimitada por los hidrógenos (C₅-H y C₃-H) y los oxígenos del enlace glucosídico (C₅-O) cuyos pares libres están dirigidos hacia el interior de la cavidad.

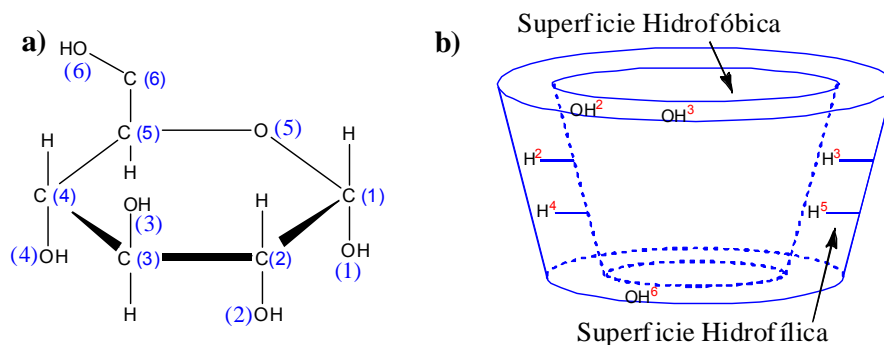


Figura 2.5: a) Glucopiranososa b) Representación esquemática de la localización de los hidrógenos e hidroxilos de las ciclodextrinas.

Los hidroxilos secundarios C₂-OH pueden formar puentes de hidrógeno con los C₃-OH de la glucopiranososa vecina. La β-CD tiene una simetría perfecta y forma una estructura rígida a lo que se le atribuye su baja solubilidad en agua. Sin embargo, una glucopiranososa de la α-CD se encuentra ligeramente distorsionada por lo que sólo 4 de los 6 posibles puentes de hidrógeno, pueden formarse. Por último, la γ-CD es una estructura no-coplanar y más flexible por lo que es la más soluble de las tres. La solubilidad de las CD depende de la temperatura, como lo muestran las siguientes expresiones¹⁶ para la concentración (mg.mL⁻¹) en función de la temperatura (K).

$$C_{\alpha\text{-CD}} = (112.71 \pm 0.45) e^{-(3530 \pm 31)[(1/T)-(1/298.1)]} \quad (2.1)$$

$$C_{\beta\text{-CD}} = (18.3236 \pm 0.099) e^{-(14137 \pm 31)[(1/T)-(1/298.1)]} \quad (2.2)$$

$$C_{\gamma\text{-C}} = (219.4 \pm 9.8) e^{-(3187 \pm 320)[(1/T)-(1/298.1)]} \quad (2.3)$$

Estudios espectroscópicos¹⁷ sugirieron que la conformación de las ciclodextrinas en solución era casi idéntica a aquella en estado cristalino.

2.3.2 Ciclodextrinas modificadas

Aparte de las ciclodextrinas naturales antes mencionadas, existen CD sintéticas, derivadas de las CD nativas; dependiendo de las características del sustituyente,

el volumen de la cavidad hidrofóbica puede verse modificado y por consiguiente, su solubilidad y estabilidad contra la luz o el oxígeno pueden variar, además de que puede ayudar a controlar la reactividad de la molécula huésped.

Las ciclodextrinas poseen 18 (α -CD), 21 (β -CD) ó 24 (γ -CD) hidroxilos que son susceptibles a modificarse químicamente y por lo tanto existe una infinidad de derivados con diferentes sustituciones. Las principales CD modificadas, que son producidas industrialmente, son: las metiladas (RAMEB), hidroxialquiladas (hidroxipropil- β -CD e hidroxipropil- γ -CD), acetiladas (acetil- γ -CD) y otras como la clorotiazinil- β -CD, glucosil- β -CD y maltosil- β -CD. Además otras CD que son producidas en menor cantidad son la sulfobutil- β -CD y las CD sulfatadas.

2.3.2.1 Grados de sustitución.

Se pueden sustituir los hidroxilos C₂-OH, C₃-OH y C₆-OH por otros grupos y así formar las CD modificadas, sin embargo los hidroxilos primarios son más reactivos que los secundarios por lo que se favorece la sustitución en C₆-OH. Pero debido a que la diferencia de reactividad no es muy grande, es difícil obtener un solo derivado de las CD padre.

El número de grupos funcionales sustituidos está dado por un valor conocido como MS o sustitución molecular, por sus siglas en inglés. Este valor es un promedio del número de grupos hidroxilo sustituidos en una glucopiranososa y se obtiene mediante el cociente del número total de sustituyentes de una CD entre el número de unidades de glucopiranososa.

Tabla 2.2: Valores de MS mínimos y máximos para las hidroxipropil-CD derivadas de las tres CD nativas.

Ciclodextrina	Valor mínimo de MS	Valor máximo de MS
HP- α -CD	$1/6 = 0.167$	$18/6 = 3$
HP- β -CD	$1/7 = 0.143$	$21/7 = 3$
HP- γ -CD	$1/8 = 0.125$	$24/8 = 3$

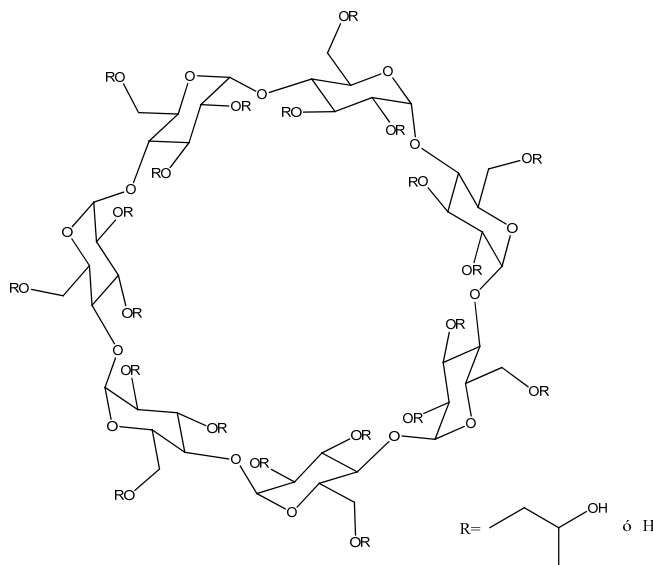


Figura 2.6: Estructura de la 2-hidroxipropil- β -CD

2.4 Complejos de inclusión.

El acomodo detallado en la sección 2.3.1 da como resultado una superficie hidrofílica por fuera y una cavidadⁱ no polar al interior, lo que es descrito como un entorno micro heterogéneo¹⁶. Lo anterior le provee a la CD una matriz hidrofóbica capaz de alojar moléculas pequeñas e hidrofóbicas formando complejos de inclusión anfitrión-huésped.

Existen diversos factores que determinan la afinidad del huésped por cierta CD, como son la polaridad, el tamaño, la geometría y la habilidad de formar puentes de hidrógeno¹⁸.

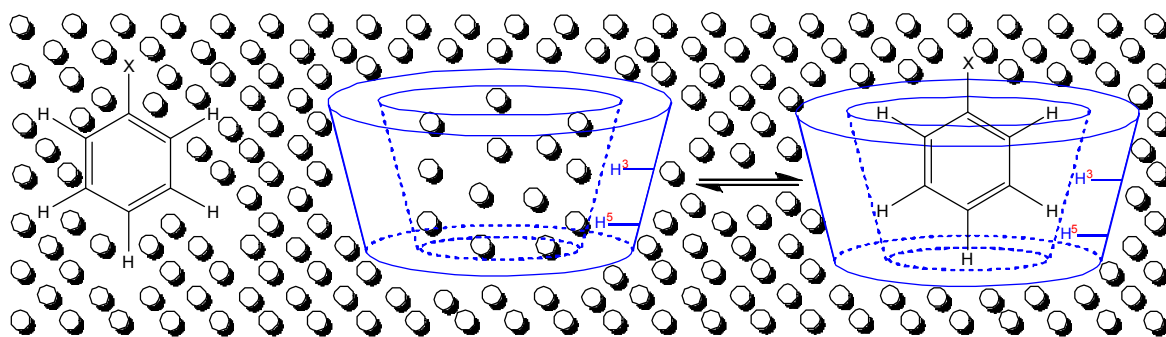


Figura 2.7: Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión entre una pequeña molécula y una CD en solución acuosa. (Cada círculo representa una molécula de agua)

ⁱ La presencia de grupos OH en la CD permite alojar algunas moléculas de agua en su cavidad.

En general, se ve favorecida la formación de complejos 1:1, sin embargo se han observado estequiometrias diversas.

A pesar de que no existe ruptura ni formación de enlaces covalentes durante la formación del complejo, la fuerza motriz de la reacción radica en el cambio de entalpía. Lo anterior se debe principalmente a que moléculas de agua, al interior de la cavidad, son desplazadas por moléculas hidrofóbicas presentes en la disolución, las cuales forman interacciones débiles del tipo no polar- no polar disminuyendo así el impedimento estérico y por lo tanto dando lugar a un estado de energía más estable. Incluso se ha afirmado¹⁶ que las especies que forman el complejo de inclusión, pueden alcanzar una estabilidad del orden de enlaces covalentes, debido a su acomodo espacial y la suma de todas las interacciones producidas.

2.5 Toxicidad

Como se ha mencionado al principio de este capítulo, diversos estudios han demostrado que no existe toxicidad inherente a las Ciclodextrinas. Incluso todas las CD nativas están dentro de la lista del GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos). Además de acuerdo al Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), la ingesta diaria admisible de β -CD en alimentos es de 5mg/kg.¹⁶

En general, las ciclodextrinas naturales y sus derivados hidrofílicos, no pueden permear las membranas biológicas lipofílicas (como la córnea). Todos los estudios de toxicidad han demostrado que la ingesta oral de las CD no es dañina debido a que el tracto intestinal no las absorbe. Sin embargo la α -CD, β -CD y las β -CD metiladas no son recomendadas para una administración parental (inyección o infusión); contrariamente a γ -CD, 2-hidroxipropil- β -CD, sulfobutiléter β -CD, β -CD sulfatada y maltosil- β -CD.

En alimentos, las ciclodextrinas modificadas son utilizadas como ingredientes debido a que prácticamente no son absorbidos en el tracto gastrointestinal alto (1-2% para la β -CD) y son completamente metabolizados por la micro flora del colon.

Además es común observar complejos de inclusión con β y γ -CD debido a que el pH en el jugo gástrico es idóneo para una rápida disociación del complejo. La principal desventaja del uso de la β -CD es que forma complejos con el colesterol. En cambio, los complejos con α -CD son escasos debido a su pequeño radio en la cavidad interna y porque la CD no es metabolizada por la amilasa pancreática y la flora intestinal¹⁹.

2.6 Principales aplicaciones.

La principal aplicación de las CD es como anfitrión en la formación de complejos de inclusión debido a la modificación de las propiedades del huésped que aloja dentro de su cavidad interna. Los cambios más notables son:

- La estabilización de sustancias sensibles a la luz, el calor o el oxígeno (como los componentes lipofílicos de los alimentos).
- La modificación de la reactividad química del huésped (fragancias, sabores, vitaminas, aceites esenciales).
- La fijación de sustancias muy volátiles.
- El aumento en la solubilidad del huésped (vitaminas).
- La modificación de sustancias líquidas a polvos.
- La protección contra la degradación del huésped por microorganismos.
- El enmascaramiento de malos olores o sabores.
- El enmascaramiento de pigmentos o del color del huésped.
- La actividad catalítica de las CD con el huésped.
- La liberación controlada de fármacos o de constituyentes de alimentos.

En la industria farmacéutica las CD se utilizan como agentes complejantes, acarreadores de fármacos o aditivos mejorando las propiedades del fármaco, principalmente su solubilidad y su biodisponibilidad.

En cosméticos y artículos de tocador son usadas para la estabilización de sabores, fragancias, eliminación de componentes indeseables, liberación selectiva de fragancias y la conversión de ingredientes líquidos a polvo.

En la industria química se usan como catalizadores para mejorar la selectividad de las reacciones, para separación de enantiómeros y purificación de algunos compuestos a escala industrial.

También son utilizadas en procesos ambientales, debido a que aumenta la solubilidad de contaminantes orgánicos y metales pesados del agua y el suelo.

Finalmente, en alimentos se utilizan principalmente para la encapsulación o liberación selectiva de grasas, colorantes y saborizantes. Lo anterior permite conservar sus propiedades organolépticas inclusive si son sometidos a procesos rigurosos como congelación, descongelación y horneado. Además que ayuda a remover o enmascarar componentes indeseables (como el colesterol de productos animales como huevos y productos lácteos y los compuestos fenólicos causantes del oscurecimiento en los alimentos). Por último, otra aplicación es la formación de complejos con agentes edulcorantes como el aspartame, lo cual estabiliza y mejora el sabor.

Capítulo III.

Metodología

Experimental

En el siguiente capítulo se enlista el material, reactivos y equipo utilizados y se explica el procedimiento experimental.

3.1 Material y equipo.

- ❖ Agitadores magnéticos
- ❖ Espátula cromo níquel
- ❖ Jeringa de plástico de 20mL
- ❖ Jeringas de vidrio con cánula de 1mL
- ❖ Jeringas de vidrio de 2.5 y 5mL
- ❖ Matraces esmerilados de 50, 125 y 250mL
- ❖ Papel pH
- ❖ Piseta
- ❖ Balanza analítica OHAUS Modelo AP250D precisión de 10^{-4} g
- ❖ Desionizador de agua Nanopure Infinity Modelo D8961
- ❖ Destilador de agua Barnstead Mega-Pure[®] system MP-1
- ❖ Monitor de Actividad Térmica (TAM) Thermometric, Suecia, Modelo 2277
- ❖ Parrilla de agitación magnética Thermolyne Type 1000 Stir Plate
- ❖ pH-metro Thermo Orion Ag/AgCl Modelo 91-72BN
- ❖ Sonificador Cole-Parmer Modelo 8892

3.2 Reactivos

- ❖ Agua destilada, desionizada y desgasificada
- ❖ Ácido acético glacial (J.T. Baker, CH_3COOH ; Pureza $\geq 99.8\%$; MM $60.05\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; CAS. 64-19-7, En catálogo 9507-05)
- ❖ Acetato de Sodio trihidratado (J.T. Baker, $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Pureza $\geq 99.5\%$; MM $136.08\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; CAS. 6131-90-4, En catálogo 3460-01)
- ❖ Cloruro de Potasio (J.T. Baker, KCl ; Pureza $\geq 99.8\%$; MM $74.55\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; CAS.7447-40-7, En catálogo 3040-01)
- ❖ (\pm)-Catequina (Sigma; $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$; MM $290.28\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; CAS. 7295-85-4; En catálogo C1788-5G)
- ❖ HP- β -CD $\cdot 2.6\text{H}_2\text{O}$, MS 1.0 (Aldrich; Pureza $\geq 98\%$; MM 1540 g mol^{-1} ; CAS. 94035-02-6; lote. AU04207TS)

- ❖ HP- β -CD•4.5H₂O, MS 0.8 (Aldrich; Pureza \geq 98%; MM 1460g.mol⁻¹; CAS. 128446-35-5, lote. 049221)
- ❖ HP- β -CD•4.5H₂O, MS 0.6 (Aldrich; Pureza \geq 98%; MM 1380g.mol⁻¹; CAS. 128446-35-5, lote. 05002EJ)
- ❖ α -CD•5.8H₂O (Aldrich; C₃₆H₆₀O₃₀•5.8H₂O; Pureza \geq 98%; MM 972.86g.mol⁻¹; CAS.10016-20-3, lote.KO15620CO)
- ❖ β -CD•8.6H₂O (Aldrich; C₄₂H₇₀O₃₅•8.6H₂O; Pureza \geq 98%; MM 1135.01g.mol⁻¹; CAS.68168-23-0, lote. LU01326JU)
- ❖ γ -CD•7.7H₂O (Cerestar; C₄₈H₈₀O₄₀•7.7H₂O; Pureza \geq 98%; MM 1297.15g.mol⁻¹; CAS. 17465-86-0, Lote F8045-6)

El agua, contenida en la cavidad de las ciclodextrinas utilizadas en este trabajo, se determinó por el método de Karl Fisher en el laboratorio de Control Analítico de la Facultad de Química de la UNAM.

3.3 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La calorimetría es el estudio de la transferencia de calor durante procesos químicos o físicos²⁰. Esta técnica es muy utilizada principalmente porque prácticamente cualquier reacción libera o absorbe calor²¹. Además, un calorímetro es un dispositivo para medir la energía transferida en forma de calor. Sin embargo, en algunas ocasiones los cambios caloríficos, que ocurren en las reacciones, son tan pequeños que se requiere emplear calorímetros más sensibles; a estos instrumentos se les denomina como microcalorímetros²² cuyo apelativo es independiente de las dimensiones del equipo.

La microcalorimetría de titulación isotérmica es una técnica analítica utilizada para medir directamente el calor liberado o absorbido en las reacciones químicas o en los cambios físicos. En esta técnica, uno de los reactivos en solución (titulante) es añadido, poco a poco o de forma continua, a una solución (analito) y se mide, a presión constante, la variación de temperatura asociada. Como el flujo de calor, producto de cada titulación es medido a presión constante, su cambio de entalpía es obtenido directamente.

Mediante esta técnica se puede obtener la estequiometría (n), la constante de equilibrio (K) y el ΔH°_f del complejo formado. Estos a su vez, nos permiten calcular el cambio de entropía y de energía libre de Gibbs (mediante las ecuaciones 4.11 y 4.12) que nos permiten caracterizar los complejos formados.

3.4 Descripción del equipo (TAM)²³

Para la técnica ITC, se utiliza un monitor de actividad térmica o TAM, por sus siglas en inglés. Este equipo permite monitorear reacciones endotérmicas y exotérmicas y es capaz de detectar diferencias de temperatura de hasta 10^{-4} °C.

El TAM posee un baño de agua de 25L que actúa como termostato, manteniendo la temperatura constante en un intervalo de $\pm 2 \times 10^{-4}$ °C. En el interior del baño, están colocadas cuatro unidades calorimétricas independientes que permiten monitorear hasta 4 experimentos al mismo tiempo.

Asimismo, el termostato puede trabajar en un intervalo de temperatura de 5 a 80°C, lo que permite monitorear reacciones en este mismo intervalo de temperatura.

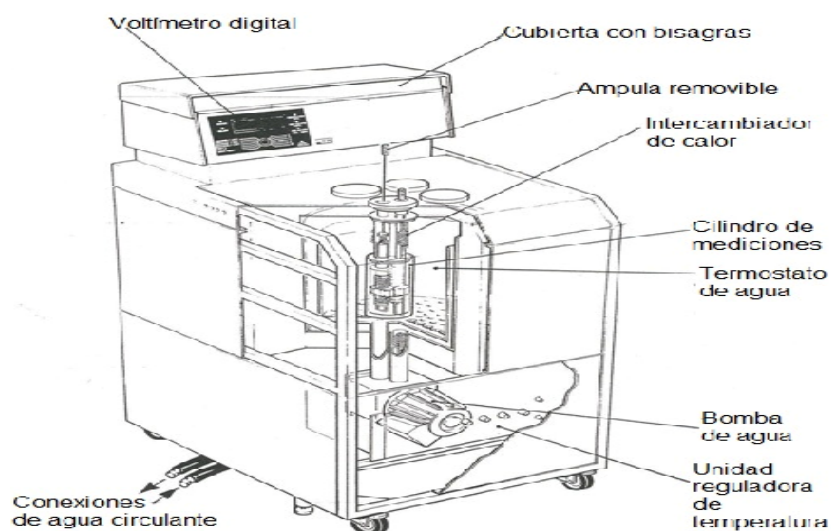


Figura 3.1: Representación esquemática del TAM

El microcalorímetro utiliza la configuración diferencial mejor conocida como principio de celdas gemelas que consiste en un sistema de dos celdas: una de muestra y otra de referencia. Este arreglo permite cancelar las perturbaciones térmicas de los alrededores.

Idealmente, el calor liberado es cuantitativamente transferido de la celda o recipiente de reacción a un dissipador de calor para establecer un equilibrio térmico con sus alrededores. El flujo de calor es registrado colocando una termopila entre la celda y el dissipador de calor. En el TAM las termopilas son elementos Peltier.

Los elementos Peltier actúan como generadores termoeléctricos y se componen de semiconductores unidos en serie, ensamblados en forma de emparedado. Estos detectores son altamente sensibles y pueden responder a diferencias de temperaturas de menos de 10^{-6} °C. Los elementos Peltier convierten la energía térmica en una señal de voltaje proporcional al flujo de calor mediante el efecto Seebeck²⁴.

Un par de elementos Peltier se colocan en extremos opuestos de cada celda y para medir la diferencia en el flujo de calor entre las dos celdas, los dos pares se montan en serie pero en forma opuesta como se muestra en la figura 3.2.

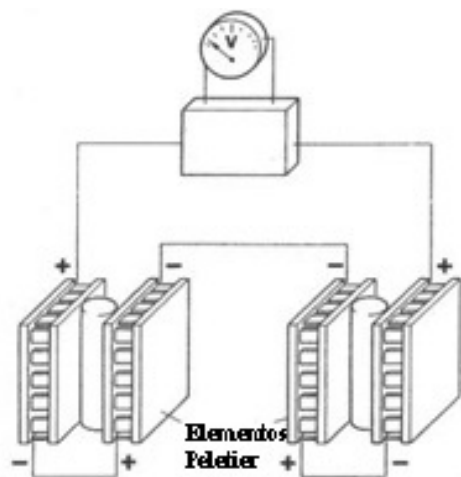


Figura 3.2: Principio de celdas gemelas

Las principales partes del TAM se observan en la figura 3.1 y son:

- Voltímetro digital (VD): Está incorporado en el tablero y monitorea continuamente el avance del experimento y la temperatura e indicadores de eficiencia del baño térmico. Un interruptor multi-posición en conjunción con el VD, permite acceder a cualquiera de éstos parámetros, sin necesidad de interrumpir la medición.

- **Cubierta con bisagras:** En ella se encuentra el panel de control que tiene cuatro interruptores (uno para cada canalⁱ, y permite seleccionar, entre 7 posiciones, la sensibilidad de trabajo en un intervalo de 3 a 300 μ W), dos potenciómetros que permiten el ajuste a cero y una unidad de calibración donde se conecta la computadora que registra los resultados del experimento.

- **Ámpula removible:** ésta posee 3 principales partes: en la parte superior se encuentra un motor que impulsa el agitador (dentro de la celda) y asegura una agitación constante en un intervalo de 80 a 100 revoluciones por minuto; en la parte inferior se encuentra la celda y por último, posee un canal por donde se introduce una cánula que permite la inyección del titulante a la celda.

- **Cilindros de Mediciones:** se encuentra ubicados dentro del termostato de agua y se mantienen a temperatura constante. Las celdas son introducidas en el interior del cilindro de medición y son alojadas en el vaso o taza de mediciones que se encuentra entre un par de elementos Peltier que a su vez están en contacto con disipadores metálicos de calor.

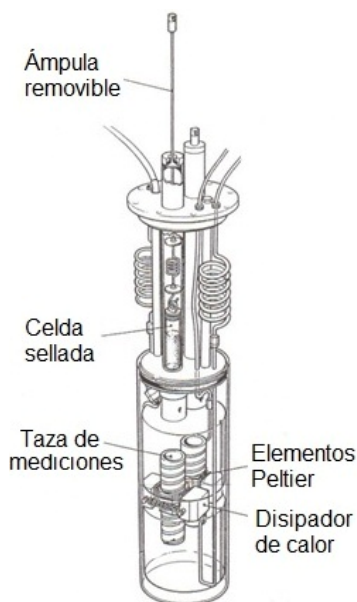


Figura 3.3: cilindro de medición

ⁱ Un canal de medición comprende el cilindro de medición y su amplificador de señal individual presente en la cubierta con bisagras.

3.5 Arreglo experimental

Todas las disoluciones (CD y A) fueron preparadas con un buffer de acetatos o disolución de KCl (1M). El buffer, a su vez fue preparado a partir de disoluciones de ácido acético y acetato de sodio 0.1M en agua destilada, desionizada y desgasificada.

Como ya se ha mencionado, el calorímetro utiliza la configuración diferencial que consiste en un sistema de dos celdas, una de reacción y otra de referencia como se esquematiza en la figura 3.4.

En la celda de reacción se deposita la disolución del antioxidante ((±)-catequina), en la celda de referencia el blanco (buffer de acetatos o KCl (1M)) y en las jeringas la disolución de ciclodextrina. Con este acomodo se resta automáticamente el calor de dilución de la ciclodextrina (ecuación (4.3) en el siguiente capítulo). El calor de dilución del antioxidante se determina en un segundo experimento.

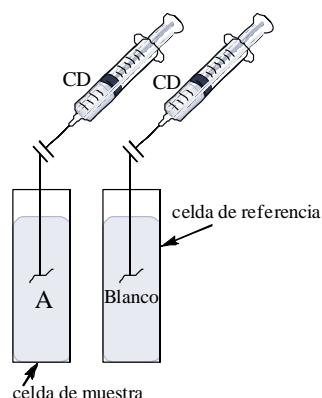


Figura 3.4: Esquema de las celdas de referencia y de muestra utilizadas

Las titulaciones se realizan, inyectando simultáneamente, las disoluciones (CD) a ambas celdas, a través de jeringas con cánulas muy delgadas. La inyección está controlada por medio de una computadora y se puede establecer el volumen, la velocidad y el número de titulaciones en cada experimento.

El progreso de la reacción es monitoreado en la computadora y los resultados son almacenados en forma de gráfica de potencia contra tiempo (potenciograma) como la mostrada en la figura 3.5, donde la primera señal y la última corresponden

a calibraciones hechas por el calorímetro y las señales entre ellas están relacionadas al proceso de formación del complejo CD-A.

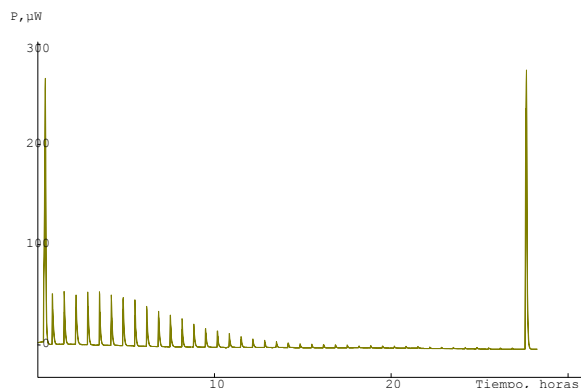


Figura 3.5: Potenciograma obtenido mediante la técnica ITC

En esta gráfica, cada pico o señal corresponde a cada titulación y su área bajo la curva (tomando como referencia la línea base) corresponde al calor involucrado en el proceso de formación del complejo de inclusión. La señal que se observa es la diferencia entre el proceso llevado a cabo en la celda de muestra (titulación de una disolución de (±)-catequina con una disolución de ciclodextrina) y aquél en la celda de referencia (titulación del blanco con ciclodextrina). Se observa que las señales son cada vez más pequeñas hasta llegar a ser casi cero lo que nos indica que se ha alcanzado el equilibrio.

Debido a que las calibraciones simulan un proceso exotérmico (liberación de calor ($\Delta H < 0$)) el sentido de estas señales indica el sentido de un proceso exotérmico. Es decir que si las señales experimentales tienen el mismo sentido que el de la calibración como en el caso de la figura 3.5, el proceso es exotérmico.

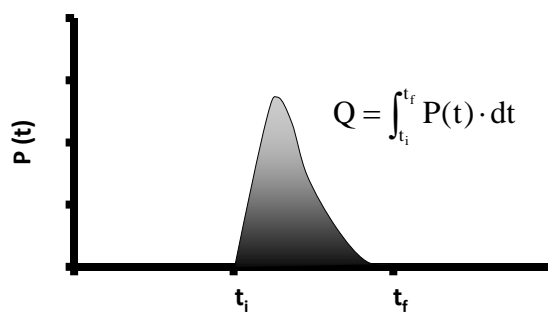


Figura 3.6: Determinación del calor de adición

Posteriormente a partir del programa del TAM y proporcionándole las condiciones experimentales de concentración (CD y A) y las áreas calculadas, se obtiene un entalpograma como el de la figura 3.7 al que se la ajusta el modelo descrito en el siguiente capítulo.

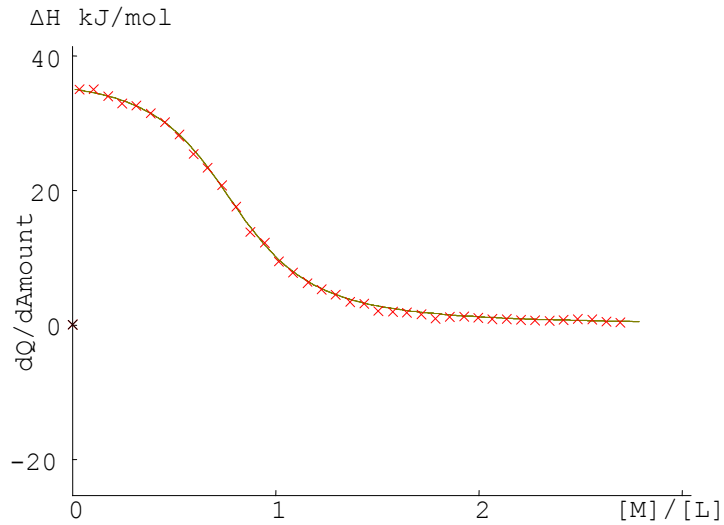


Figura 3.7: Enthalpograma

Capítulo IV.
Fundamento
Termodinámico

Como se mencionó en el capítulo anterior, la formación de complejos de inclusión no involucra la formación o ruptura de enlaces covalentes; consiste esencialmente en una sustitución de moléculas de agua (presentes al interior de la CD), por moléculas menos polares. En este proceso, la entalpía y entropía tienen un papel fundamental y sus cambios son resultado de varias contribuciones:²⁶

- La inserción de la parte hidrofóbica de la molécula huésped en la cavidad interna de la CD.
- La liberación de las moléculas de agua de la cavidad de la CD hacia el bulto.
- La deshidratación de la molécula huésped.
- Los tres puntos anteriores, dan lugar a la sustitución de interacciones poco favorecidas, polar-no polar (entre las moléculas de agua y la cavidad de la CD y entre las moléculas de agua y el huésped) por interacciones más favorecidas del tipo polar-polar (entre las moléculas de agua del bulto de la solución y las liberadas de la cavidad de la CD) y no polar-no polar (entre las moléculas del huésped y la cavidad de la CD).
- La formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo aromáticos del huésped y aquellos en la periferia de la CD.
- Las interacciones de Van der Waals.
- Los cambios conformacionales de la CD y la liberación de tensión del anillo durante la formación del complejo.

Por lo anterior, conocer los parámetros termodinámicos ΔH° , ΔG° y ΔS° es fundamental para comprender el proceso de formación del complejo de inclusión.

En el presente capítulo, se presentan las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la constante de equilibrio, estequiometría, ΔH° , ΔG° y ΔS° .

4.1 Modelo termodinámico empleado TAM.

El equilibrio de formación del complejo CD-A considerando una estequiometría 1:1, es:



y su constante asociada es:

$$K_{CD-A} = \frac{[CD-A]}{[CD][A]} \quad (4.2)$$

Donde:

[CD-A]: concentración del complejo antioxidante-ciclodextrina formado.

[CD]: concentración de la ciclodextrina libre.

[A]: concentración del antioxidante libre.

En el experimento antes descrito, el calor total de la reacción está asociado a la suma del calor de dilución de la ciclodextrina, el correspondiente al antioxidante y el calor de formación del complejo formado.

$$\Delta H_{Total}^0 = \Delta H_{CD}^{0 \text{ Dilución}} + \Delta H_A^{0 \text{ Dilución}} + \Delta H_{CD-A}^{0 \text{ Formación}} \quad (4.3)$$

En el diseño experimental utilizado, el equipo resta automáticamente el calor de dilución de la ciclodextrina al calor total, sin embargo el calor de dilución del antioxidante debe ser determinado mediante un experimento idéntico, excluyendo la disolución de CD. Para todos los experimentos de este trabajo, este valor ($\Delta H_A^{0 \text{ Dilución}}$) es cero.

Cuando se agrega una alícuota de la solución de CD, el balance de energía está definido por la ecuación: $Q_p = \Delta H_1^0 = \frac{[CD-A]}{[CD]_0} \Delta H_{Total}^0$ (4.4)

Donde ΔH_1 representa el calor asociado a la adición de la alícuota.

De la ecuación (4.2) se puede despejar el valor de [CD-A] obteniendo:

$$[CD-A] = K_{CD-A}[CD][A] \quad (4.5)$$

Haciendo un balance de materia de la ciclodextrina y del antioxidante, sus concentraciones iniciales están expresadas mediante:

$$[CD]_0 = [CD] + [CD-A] \quad (4.6)$$

$$[A]_0 = [A] + [CD-A] \quad (4.7)$$

Sustituyendo (4.5) en (4.6) se obtiene:

$$[CD]_0 = [CD] + K_{CD-A}[CD] \cdot [A] \quad (4.8)$$

Sustituyendo (4.5) y (4.8) en (4.4), su inverso queda expresado mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{\Delta H_1^0} = \frac{1}{\Delta H_{Total}^0} + \frac{1}{\Delta H_{Total}^0 [A] K_{CD-A}} \quad (4.9)$$

Sustituyendo (4.4) en (4.7), se obtiene:

$$[A] = [A]_0 - \frac{\Delta H_1^0}{\Delta H_{Total}^0} [CD]_0 \quad (4.10)$$

Tanto la ecuación (4.9) como la (4.10), son utilizadas por el software del TAM y son ajustadas a los datos experimentales del potenciograma para determinar los valores de la constante de formación del complejo y el ΔH_{total}^0 , a través del método de mínimos cuadrados.

4.2 Cálculo del cambio de Entropía y de Energía Libre de Gibbs.

El cálculo de entropía y energía libre de Gibbs se realiza mediante las ecuaciones:

$$\Delta G_{CD-A}^0 = -RT \ln K_{eq} \quad (4.11)$$

$$\Delta G_{CD-A}^0 = \Delta H_{CD-A}^{Formación} - T\Delta S_{CD-A}^0 \quad (4.12)$$

Donde:

T es la temperatura en K

R la constante universal de los gases $8.31447 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

Capítulo V.

Resultados y Análisis de resultados

Los resultados que se presentan a continuación, se dividen en 3 partes. En la primera, se describen los resultados (a fuerza iónica constante) de la titulación del antioxidante estudiado ((±)-catequina) con las 3 CD nativas y las derivadas hidroxipropiladas de la β -CD. En la segunda parte, se estudia el efecto del pH en la formación del complejo A- β -CD (Antioxidante- β -Ciclodextrina) y finalmente en la tercer parte se estudia el efecto de la temperatura en la formación del complejo A- β -CD.

El calor de dilución del antioxidante se determinó para cada uno de los experimentos que se presentan a continuación, en todos los casos su valor es cero, por lo que no se muestran los potenciogramas correspondientes.

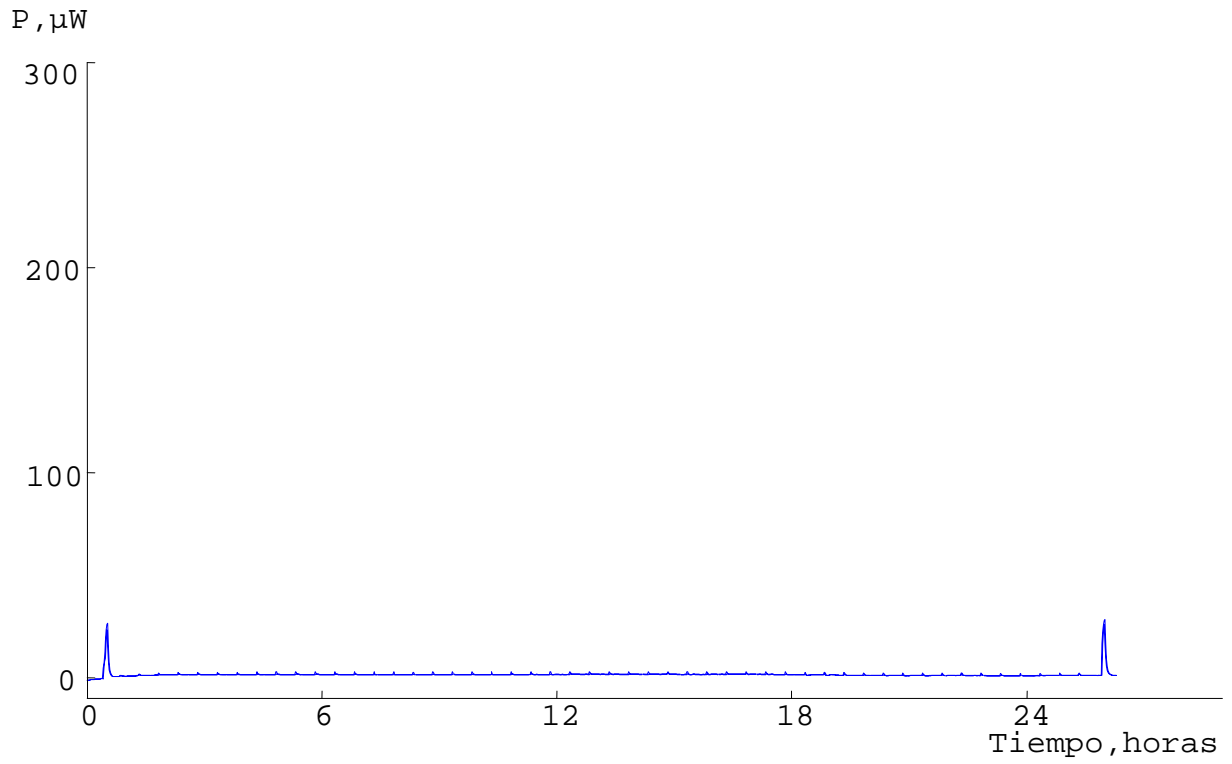
En todos los experimentos aquí descritos, se hizo variar “n” (promedio de moléculas de antioxidante que puede entrar en la cavidad de la ciclodextrina) para tener un mejor ajuste.

5.1 Resultados a fuerza iónica constante

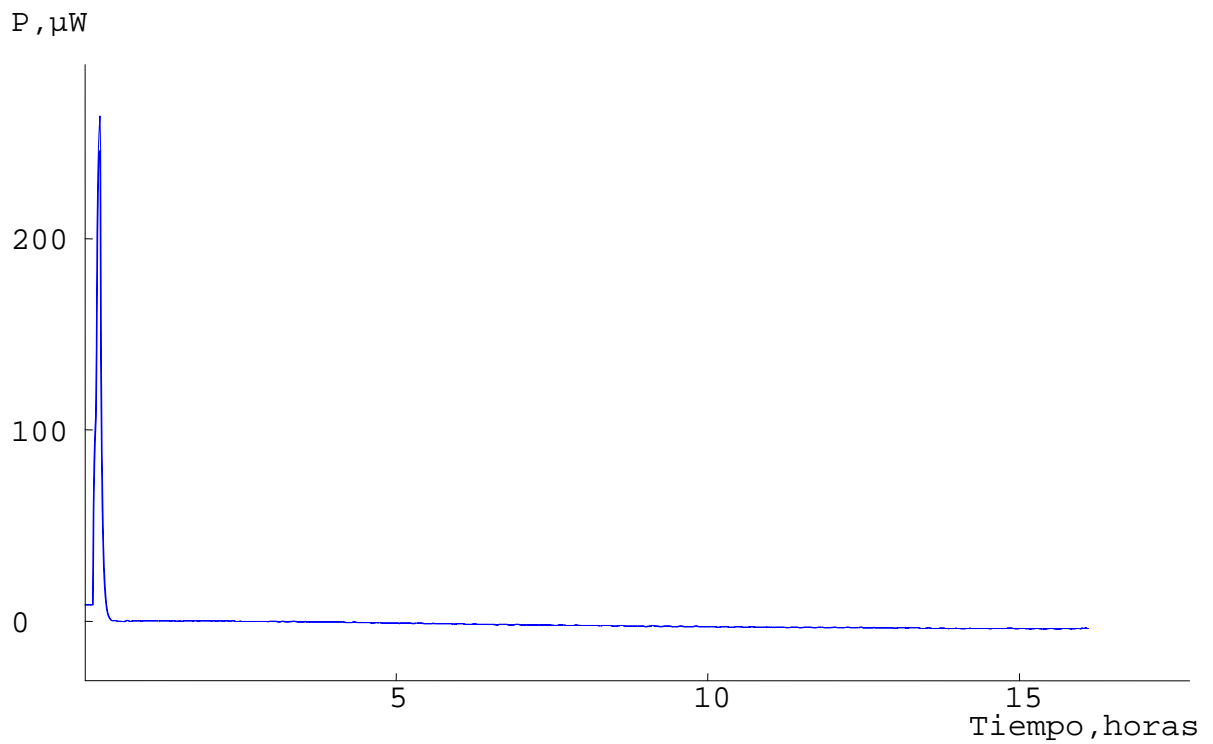
Al iniciar este trabajo, se pretendía comparar los valores de la constante de formación del complejo A-CD, obtenidos mediante dos técnicas. La primera técnica es la ITC y se explica en la sección 3.3 de este escrito. La segunda es la voltamperometría cíclica, que es utilizada por el grupo de trabajo de la Dra. Norma Angélica Macías Rubalcava; esta técnica requiere utilizar un electrolito soporte (KCl). Para asegurar que la determinación de las constantes se realizara bajo las mismas condiciones, también en este trabajo, se utilizó una disolución de KCl 1M. Sin embargo la determinación por voltamperometría cíclica no se llevó a cabo.

5.1.1 Pruebas con las CD nativas

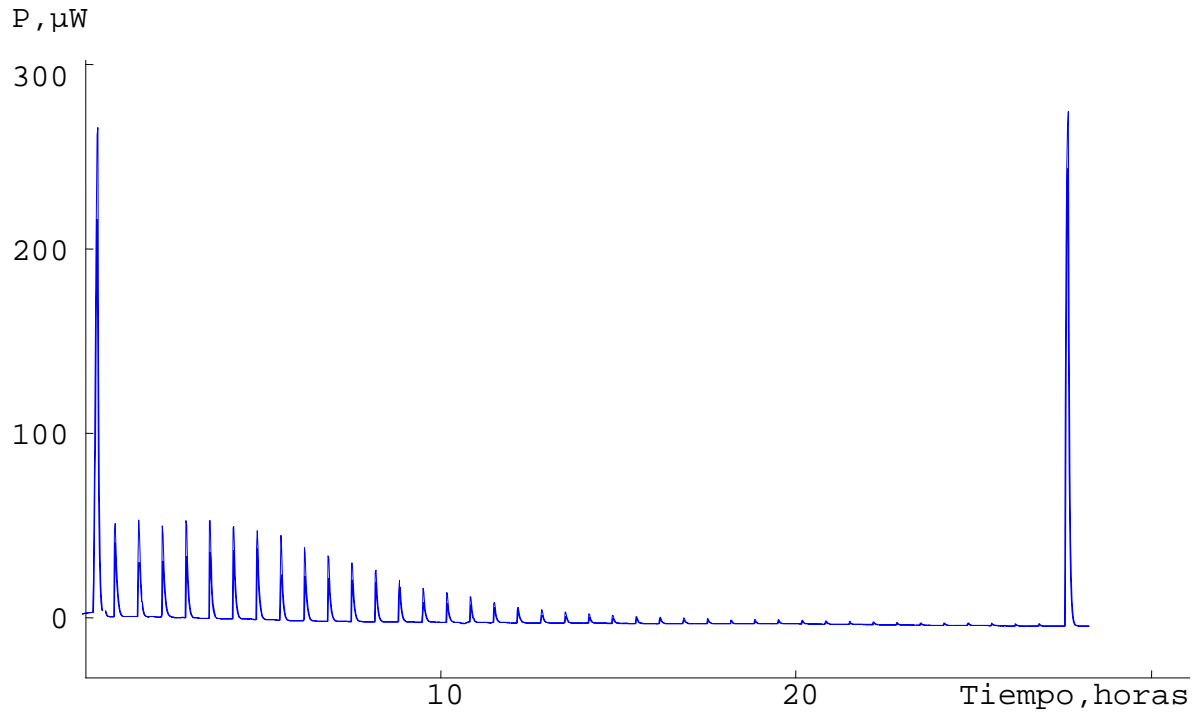
Primeramente se tituló el antioxidante con cada una de las tres CD nativas, a 298.15K. En todos los casos se utilizó una concentración inicial de CD 12mM y de (±)-catequina 2mM; y se hizo variar la sensibilidad del equipo, desde 300 μ W hasta 30 μ W. En éste conjunto de experimentos sólo se detectó la formación del complejo con la β -CD nativa. A continuación se muestran los potenciogramas obtenidos (en la misma escala). Posteriormente se presenta el entalpograma asociado a la formación del complejo A- β -CD.



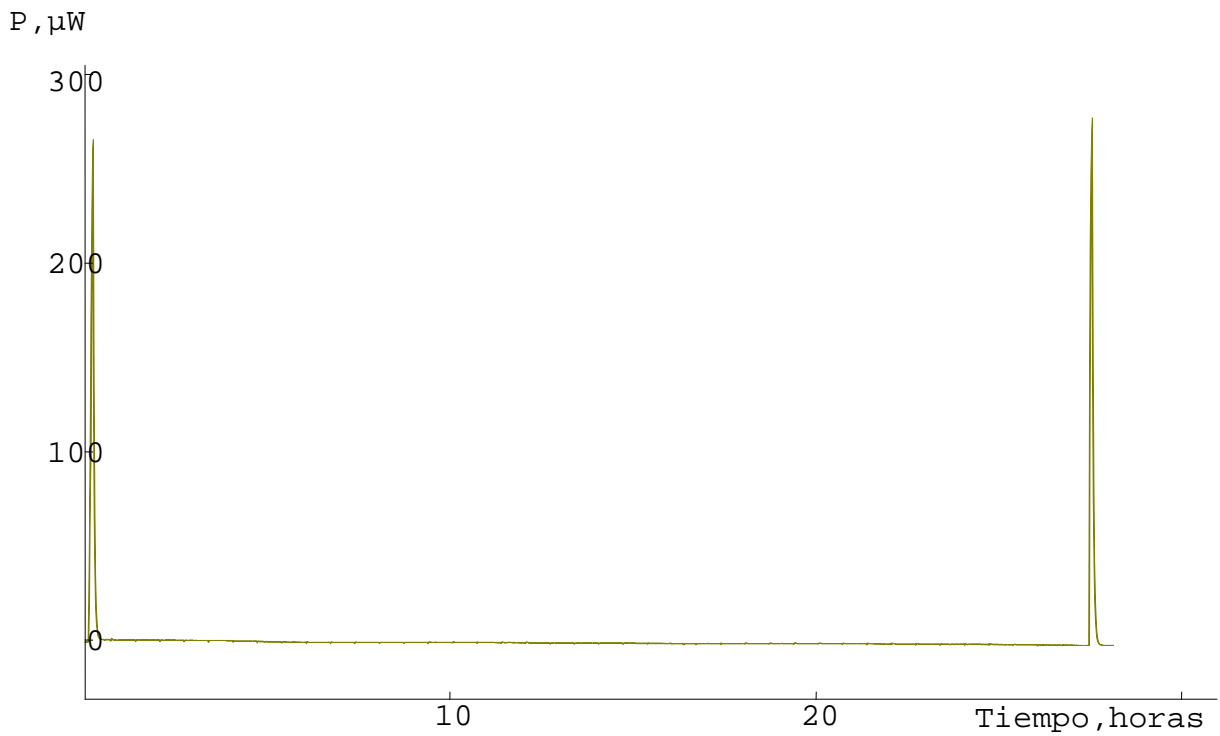
Potenciograma 1: Titulación de (±)-catequina con α -CD en KCl (1M)



Potenciograma 2: Titulación de (±)-catequina con γ -CD en KCl (1M)

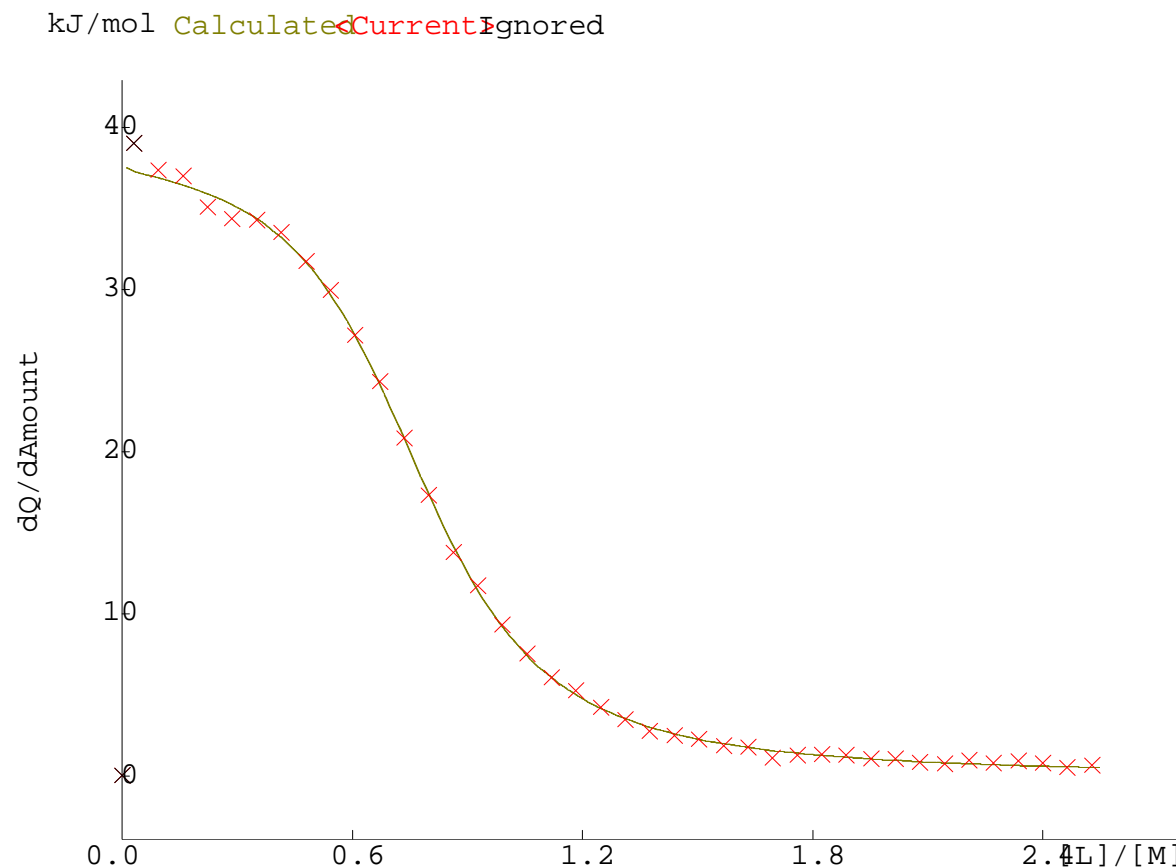


Potenciograma 3: Titulación de (±)-catequina con β -CD en KCl (1M)



Potenciograma 4: Titulación de (±)-catequina con KCl (1M)

Mediante ITC, no se observó la formación de ningún complejo de inclusión con α -CD y γ -CD. Esto puede deberse principalmente a que el tamaño de su cavidad interna no es el adecuado para alojar en su interior al antioxidante. Por el contrario, el proceso de formación del complejo con β -CD es espontáneo ($\Delta G^\circ < 0$) y exotérmico ($\Delta H < 0$).



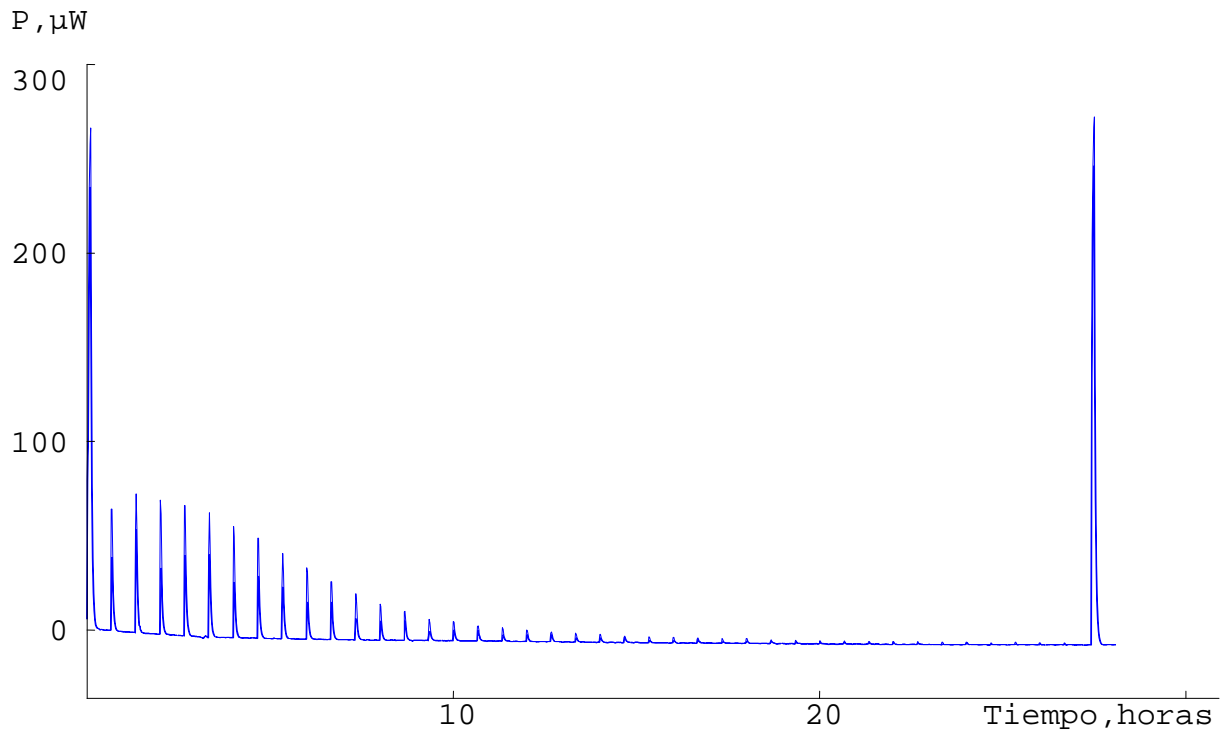
Entalpograma 1: Titulación de (±)-catequina con β -CD en KCl (1M)

5.1.2 Resultados obtenidos con β -CD hidroxipropiladas

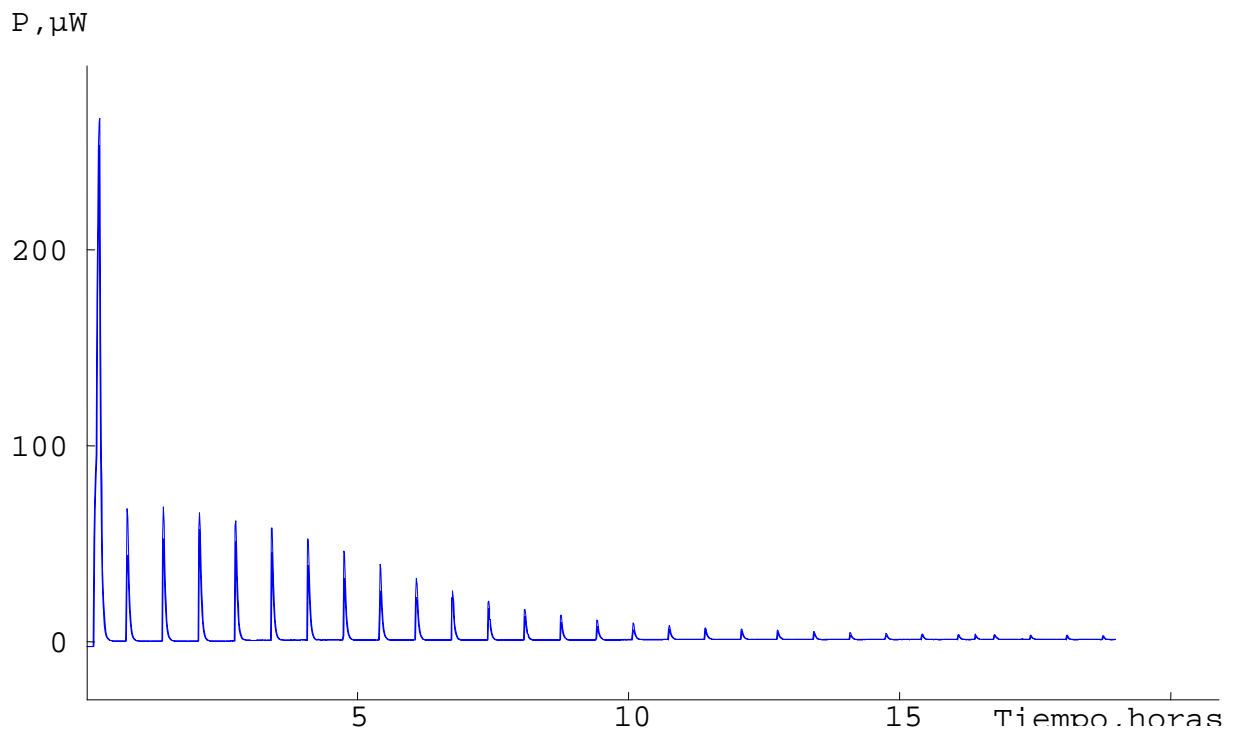
A continuación se enuncian los resultados obtenidos mediante el arreglo experimental descrito en 3.5. Se utilizaron CD modificadas (hidroxipropil- β -CD) con sustitución molecular (MS^i) diferente.

El experimento a $MS=0.8$ no se pudo concluir por problemas con la electricidad y se repitió al día siguiente con las mismas disoluciones y posteriormente con disoluciones frescas.

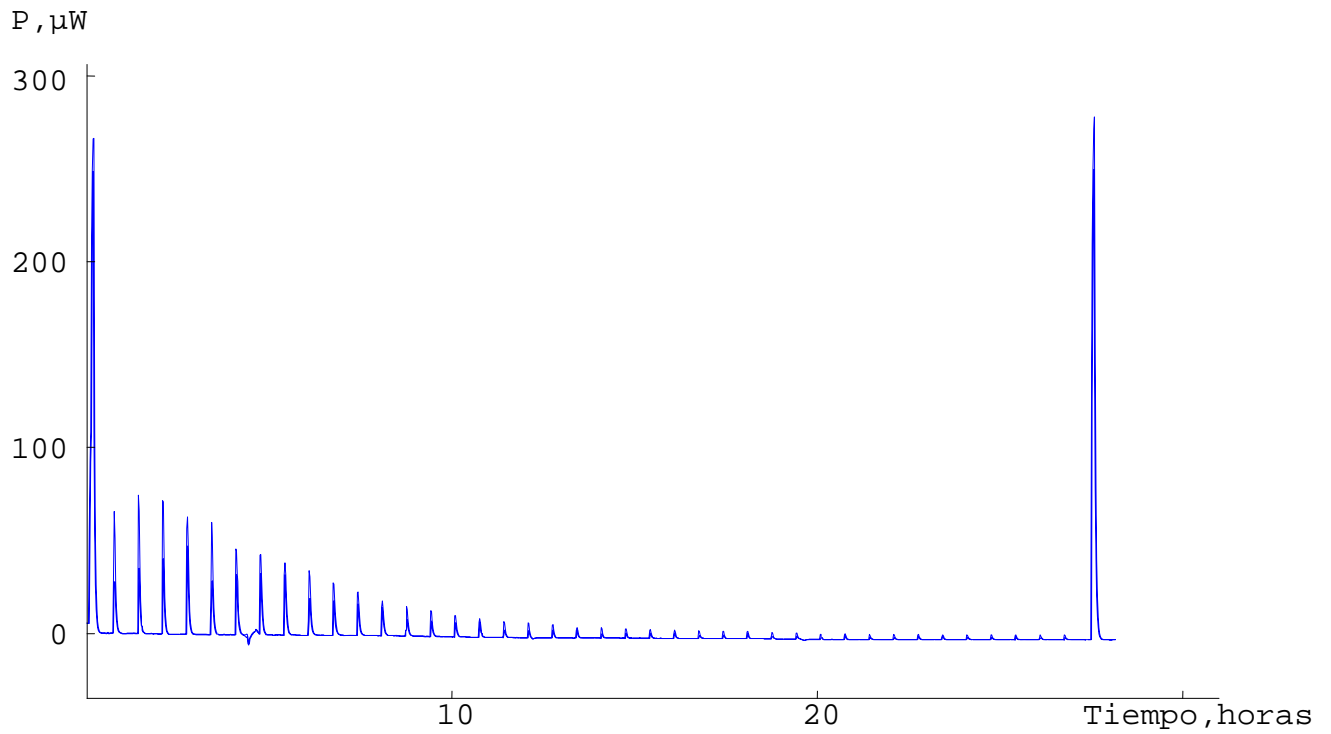
ⁱ El MS es un promedio del número de grupos hidroxilo sustituidos en una glucopiranososa



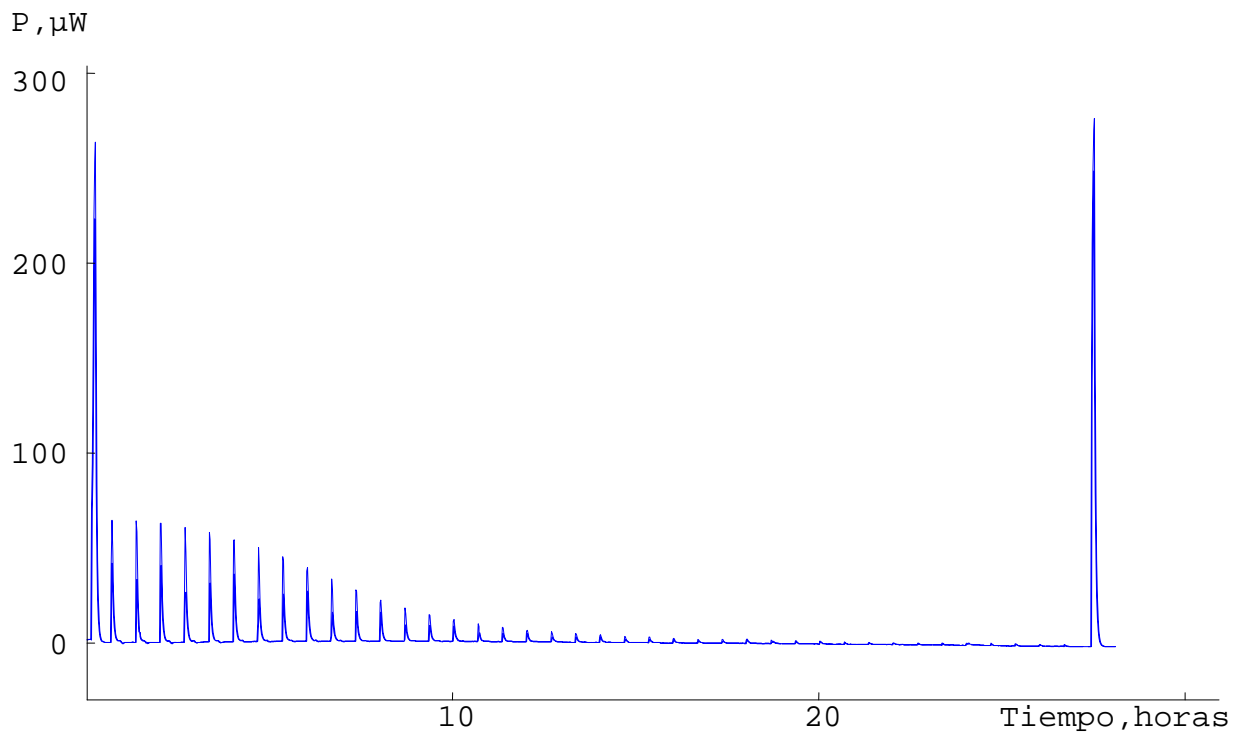
Potenciograma 5: Titulación de (±)-catequina con HP-β-CD MS=1 en KCl (1M)



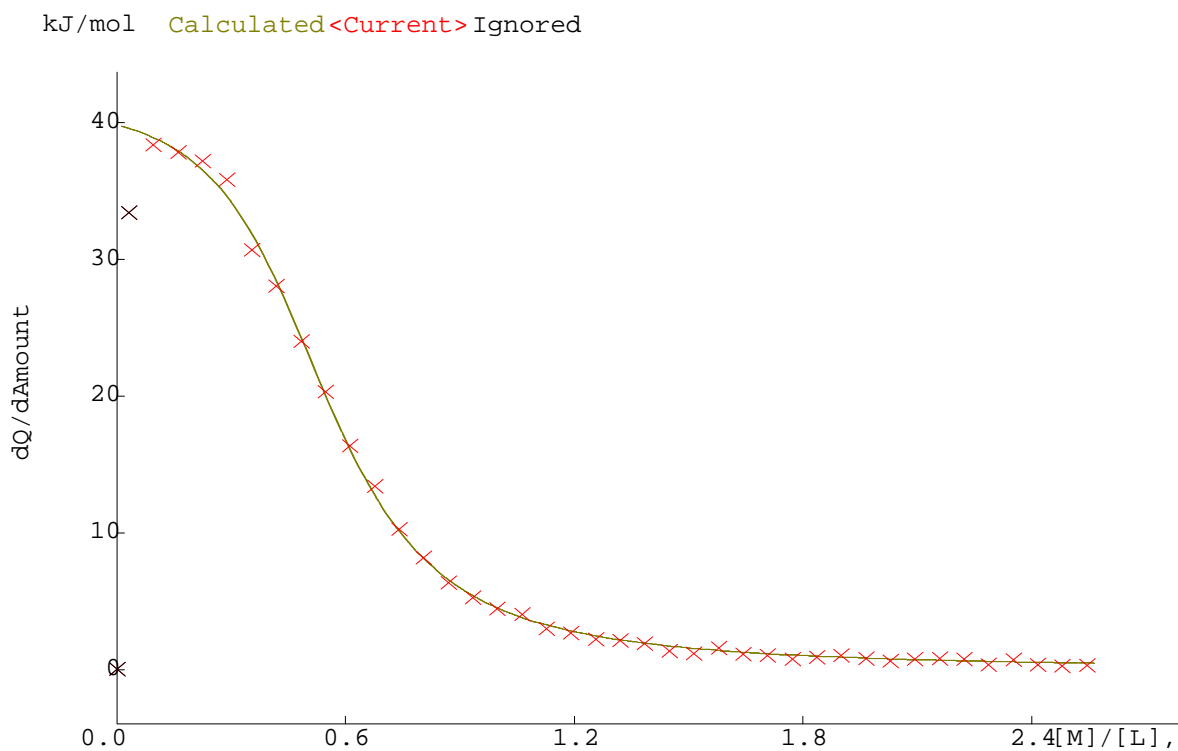
Potenciograma 6: Titulación de (±)-catequina con HP-β-CD MS=0.8 en KCl (1M)



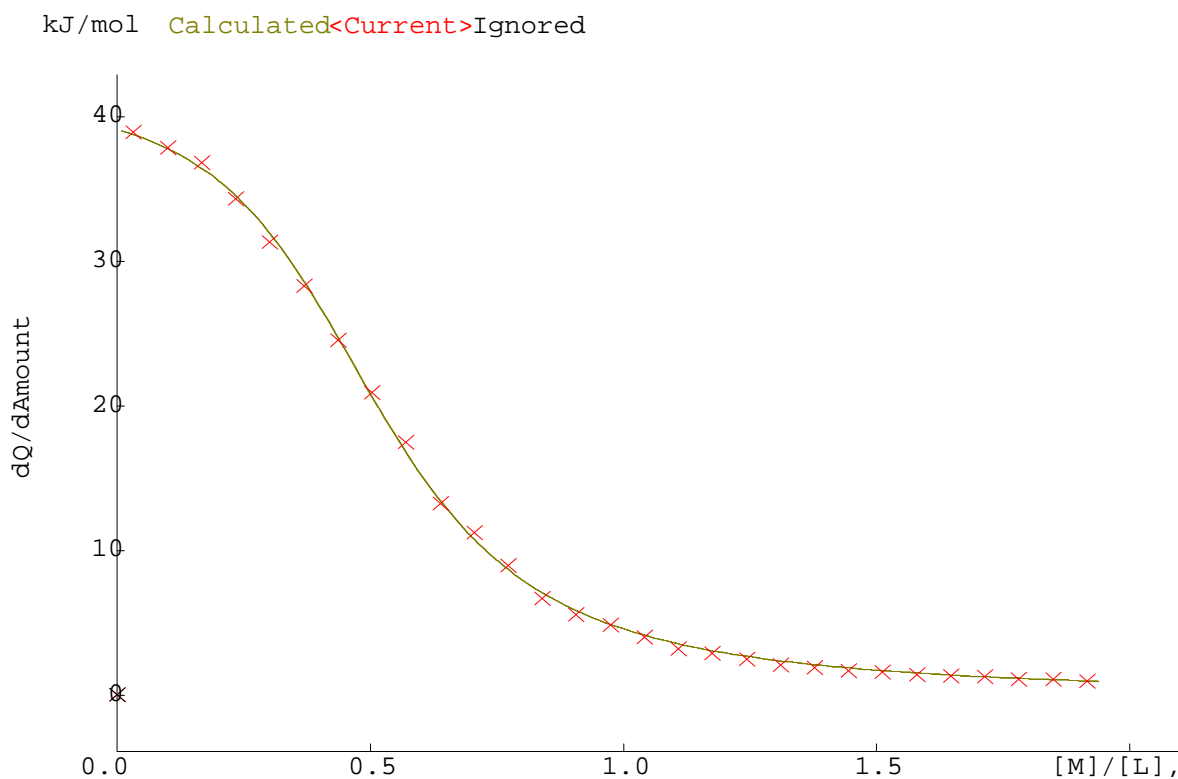
Potenciograma 7: Titulación de (±)-catequina con HP- β -CD MS=0.8 en KCl (1M)



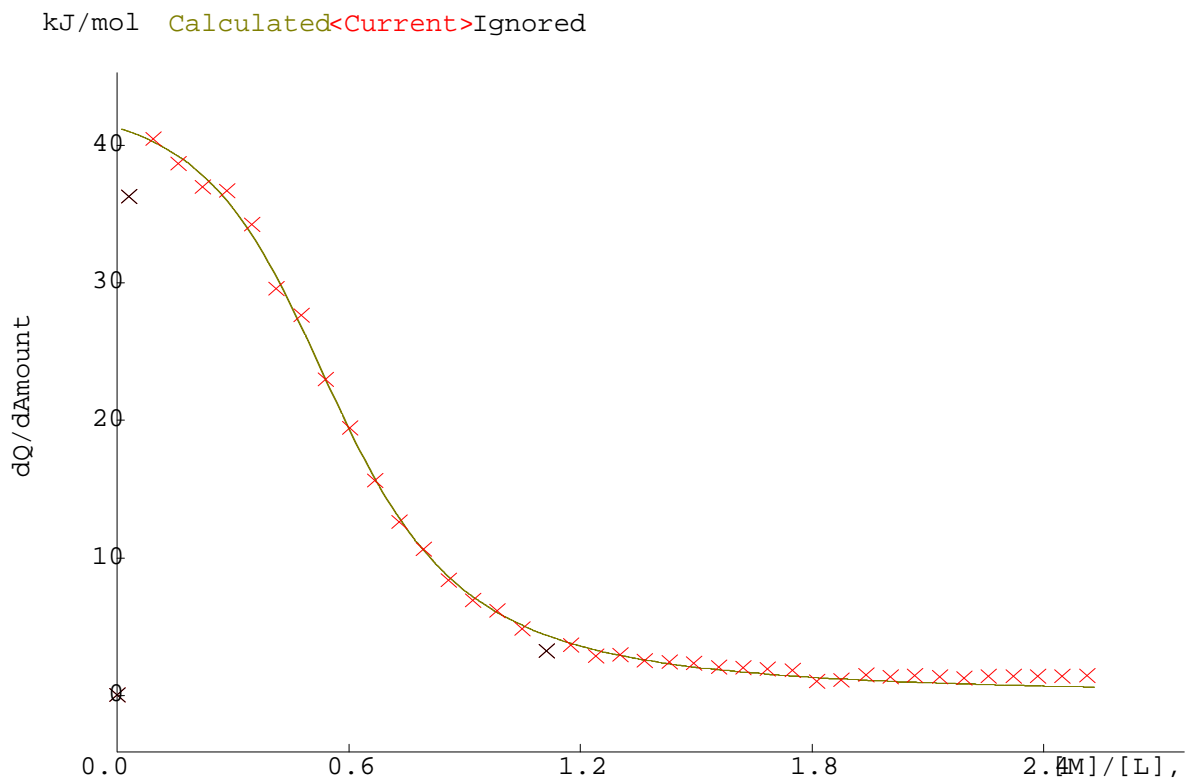
Potenciograma 8: Titulación de (±)-catequina con HP- β -CD MS=0.6 en KCl (1M)



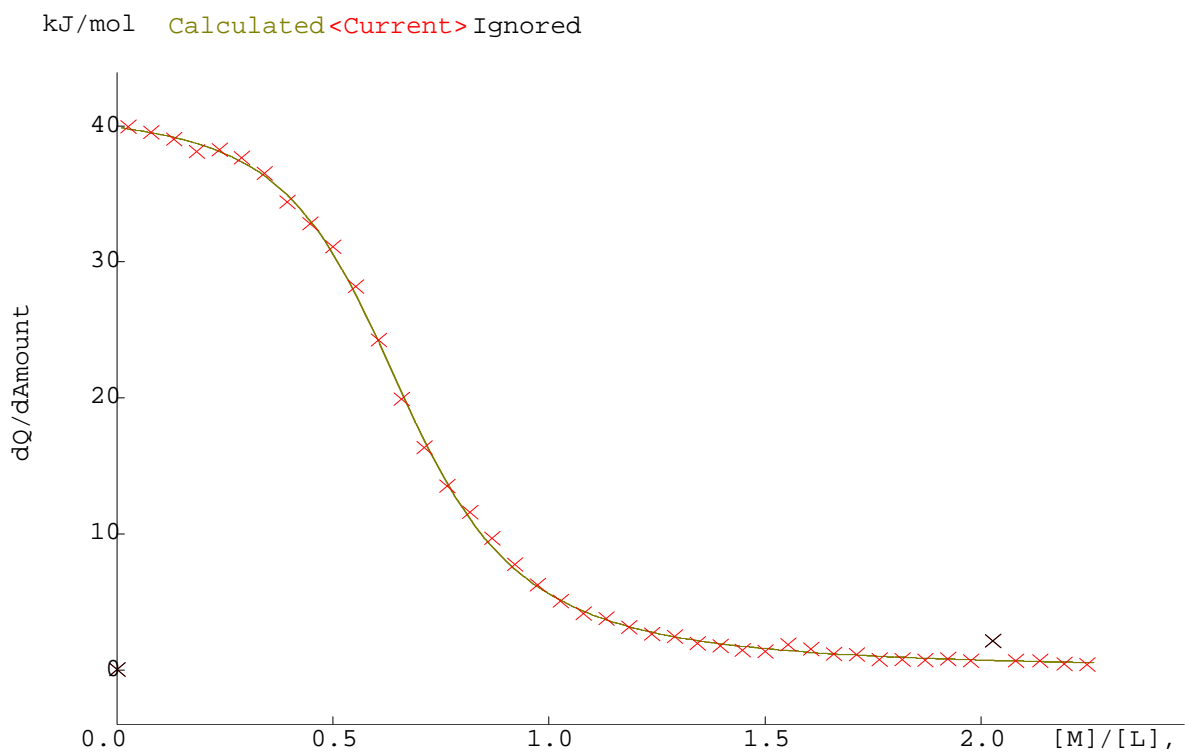
Entalpograma 2: Titulación de (±)-catequina con HP-β-CD MS=1 en KCl (1M)



Entalpograma 3: Titulación de (±)-catequina con HP-β-CD MS=0.8 en KCl (1M)



Entalpograma 4: Titulación de (±)-catequina con HP-β-CD MS=0.8 en KCl (1M)



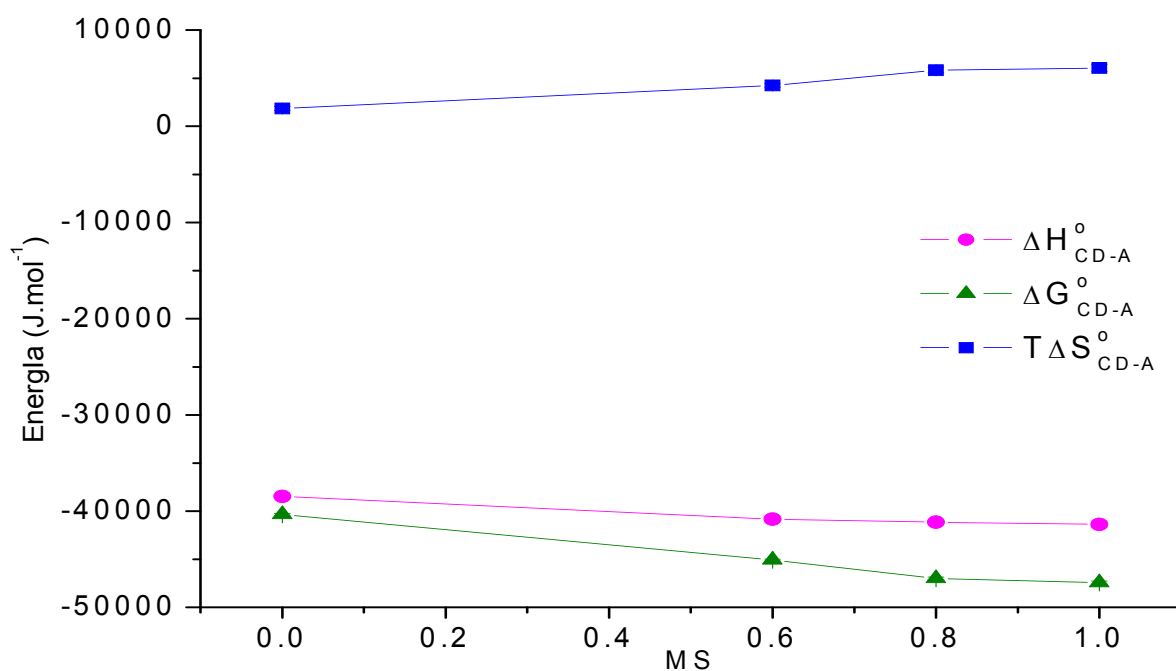
Entalpograma 5: Titulación de (±)-catequina con HP-β-CD MS=0.6 en KCl (1M)

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de los complejos con β -CD y sus derivadas hidroxipropiladas a 298.15K. (El MS=0 corresponde al estudio con la β -CD nativa).

MS	n	$K_{CD-A} (M^{-n})$	$\Delta H_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$	$\Delta G_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$	$T \Delta S_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$
0	1.19	50820 \pm 1954	-38.49 \pm 0.18	-40.34 \pm 0.95	1.85 \pm 0.20
0.6	1.35	181593 \pm 7341	-40.84 \pm 0.15	-45.08 \pm 0.10	4.24 \pm 0.18
0.8	1.55	302943 \pm 16402	-41.16 \pm 0.25	-46.99 \pm 0.13	5.83 \pm 0.28
0.8	1.45	164316 \pm 12834	-43.35 \pm 0.43	-44.74 \pm 0.19	1.39 \pm 0.48
1	1.53	340319 \pm 22798	-41.38 \pm 0.32	-47.44 \pm 0.17	6.06 \pm 0.36

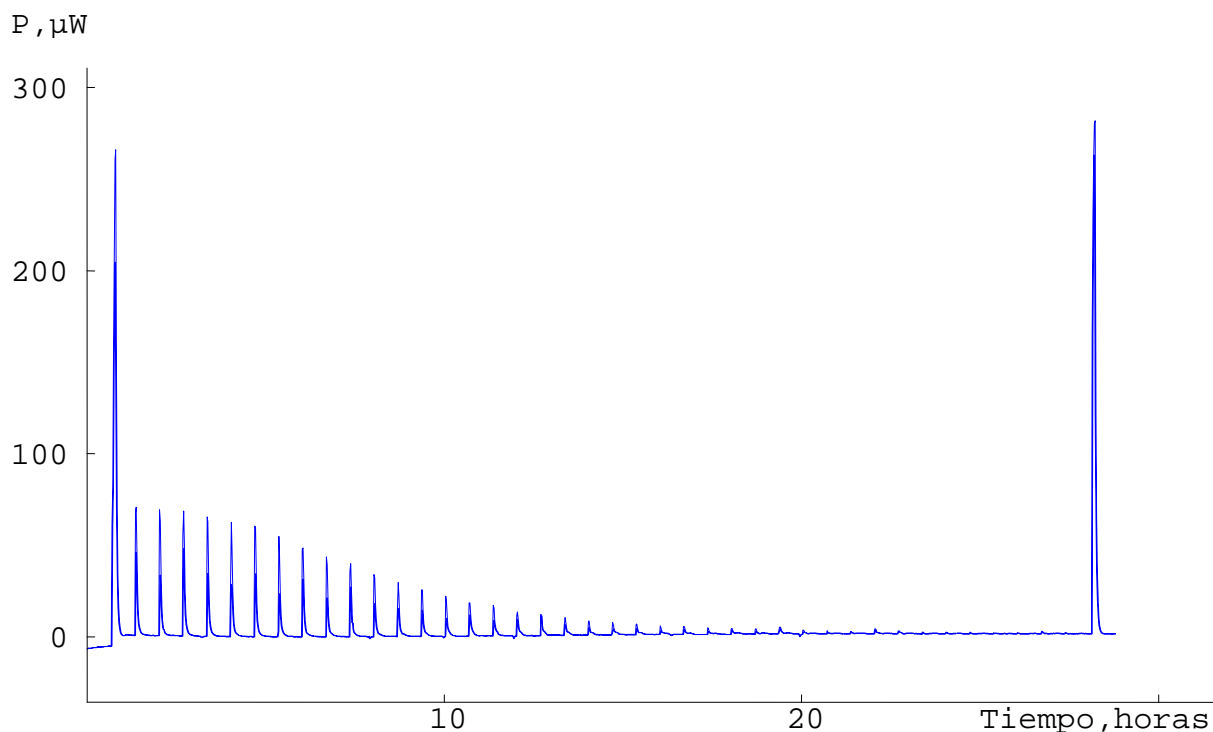
En la tabla 1 se observa que al incrementar el MS de 0 a 1 el ΔH° se hace más negativo, es decir, más exotérmico; esto puede deberse a que al aumentar los grupos hidroxipropilo, aumenta la probabilidad de formar puentes de hidrógeno.

Además, conforme se incrementa el MS, aumenta la entropía, lo que podría indicar un mejor acomodo del antioxidante en la cavidad de la ciclodextrina; lo anterior puede explicar el incremento del número promedio de moléculas de antioxidante (n) que pueden entrar en la cavidad de la ciclodextrina y por ende, da lugar a una mayor liberación de moléculas de agua desde la cavidad de la CD al bulto de la disolución. Ambas contribuciones (entálpica y entrópica) dan como resultado un ΔG° más negativo y por lo tanto un proceso más favorecido a mayores valores de MS.

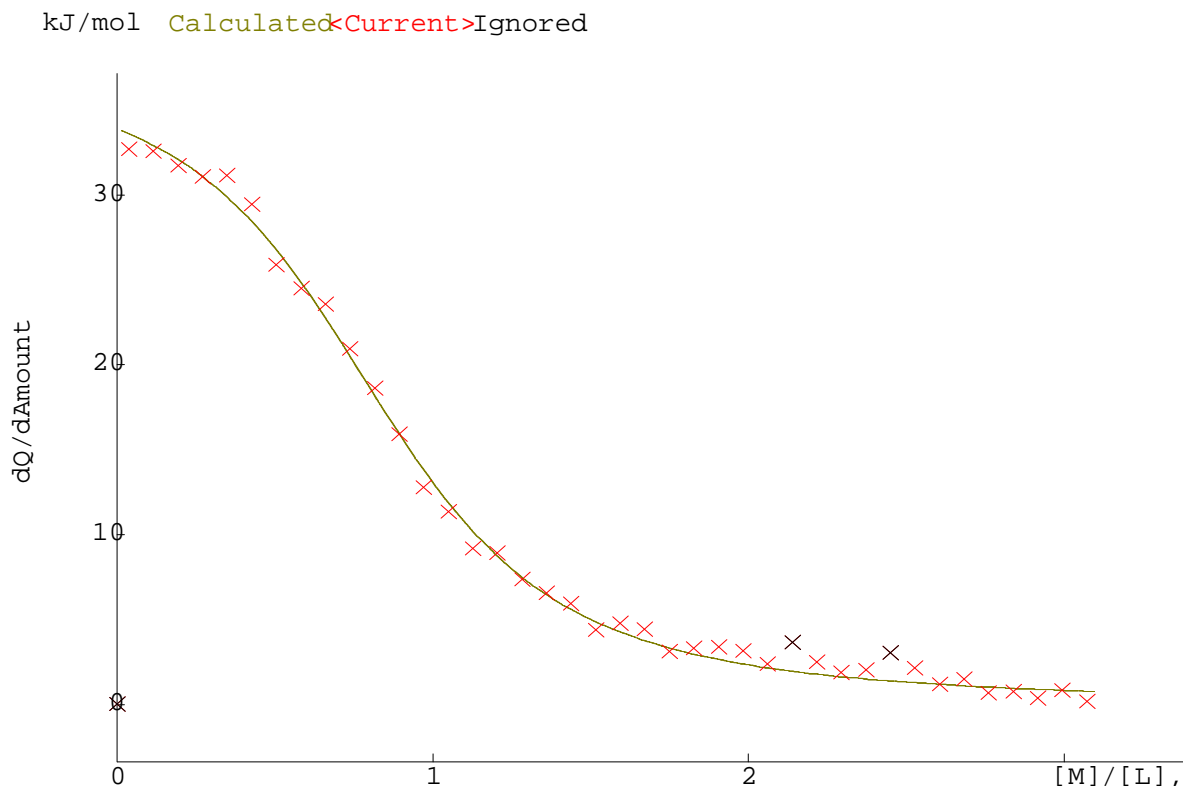


Gráfica 1: Variación de los parámetros termodinámicos en función del MS.

El experimento con la HP- β -CD MS: 0.8 no se completó y sólo se realizaron 28 de las 40 titulaciones. Para tener el potenciograma con las 40 titulaciones, se repitió el experimento un día después y con las mismas disoluciones. Los resultados no fueron reproducibles, esto se observa principalmente en el valor de K_{CD-A} que disminuyó a poco menos de la mitad de su valor. Lo anterior puede deberse a que la catequina en disolución pudo oxidarse, por lo que en vez de medir los parámetros de la formación del complejo de la catequina con la CD, se midieron aquellos de la formación del complejo de la CD con los productos de oxidación de la catequina o de una mezcla de ambos complejos. Es por esto que se repitió el experimento con nuevas disoluciones. A continuación se muestra el entalpograma y el potenciograma correspondientes.



Potenciograma 9: Titulación de (±)-catequina con HP- β -CD MS=0.8 en KCl (1M)



Entalpograma 6: Titulación de (±)-catequina con HP-β-CD MS=0.8 en KCl (1M)

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de los complejos con HP-β-CD MS=0.8.

MS	n	$K_{CD-A} (M^{-n})$	$\Delta H_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$	$\Delta G_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$	$T\Delta S_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$
0.8	1.06	6889 ± 517	-37.36 ± 0.53	-32.94 ± 0.19	-4.41 ± 0.56
0.8	1.55	11363 ± 2856	-101.66 ± 12.06	-34.92 ± 0.62	-66.74 ± 12.08

Del entalpograma anterior, el mejor ajuste de los datos se da a $n=1.06$, sin embargo los resultados no se asemejan a los de la tabla 1, incluso si se fija el valor de n a aquel del MS=0.8 ($n=1.55$).

Una de las hipótesis iniciales de la falta de reproducibilidad observada, era que la catequina en polvo, con la que se preparaban las disoluciones, se había oxidado durante su almacenamiento en el laboratorio. Es por esto que se mandó una muestra a la USAI (Unidad de Servicios Analíticos para la Investigación) para obtener su espectro de FT-IR.

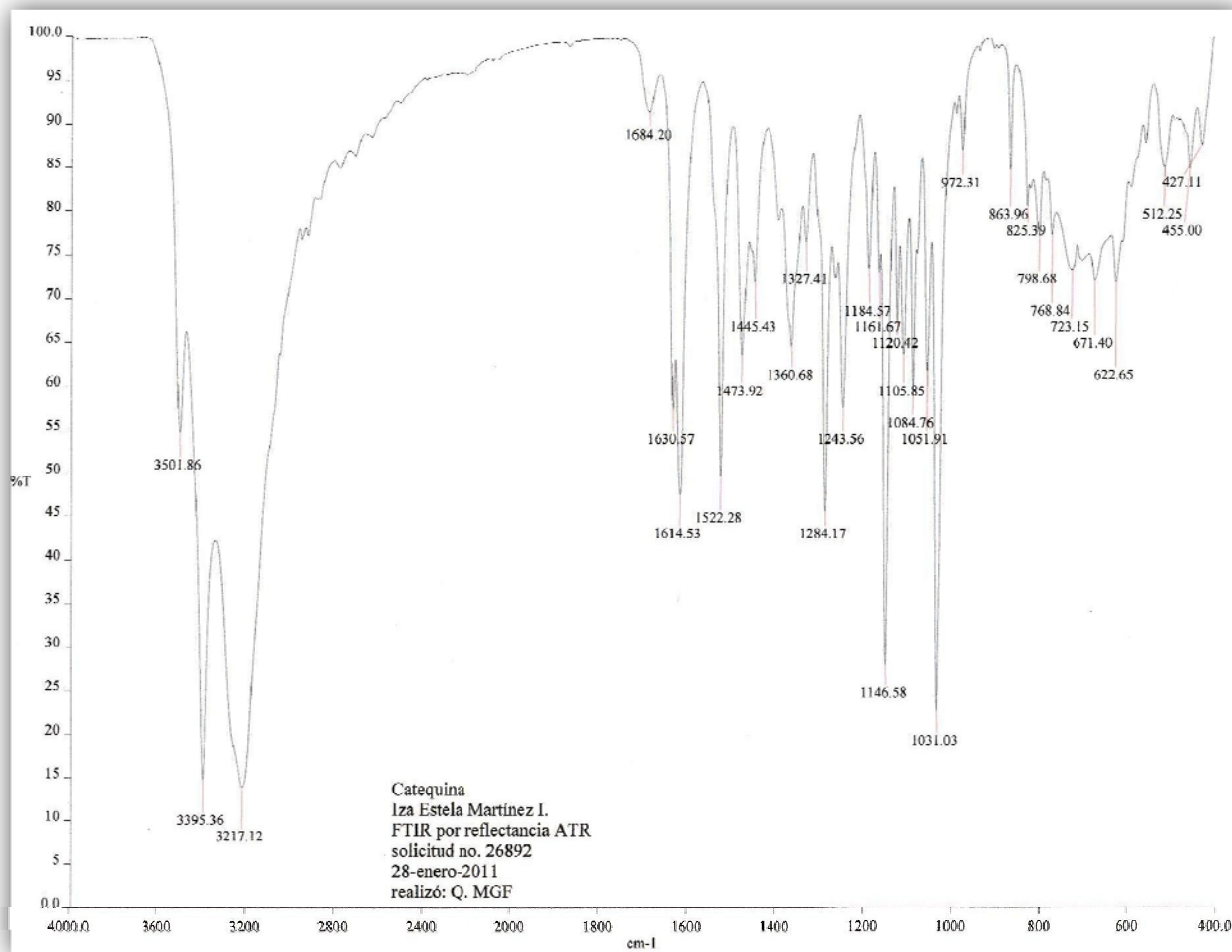


Figura 5. 1: Espectro IR de la (±)-catequina

Como se mencionó en el capítulo 1 la catequina se oxida para dar su respectiva o-quinona, por lo tanto la presencia de grupos carbonilo en el FT-IR se pondría en evidencia que la catequina se oxidó. En el espectro anterior, no se observa la presencia de bandas intensas en el intervalo de $1680-1800\text{cm}^{-1}$ lo que nos indicaría la presencia de grupos carbonilo; es por esto que se puede afirmar que el polvo utilizado no estaba oxidado antes de preparar las disoluciones.

Por otra parte, comparando el espectro obtenido con aquél reportado en la literatura (figura 5.2) se puede observar que ambos presentan las mismas bandas, por lo que se puede afirmar que se trata de la (±)-catequina.

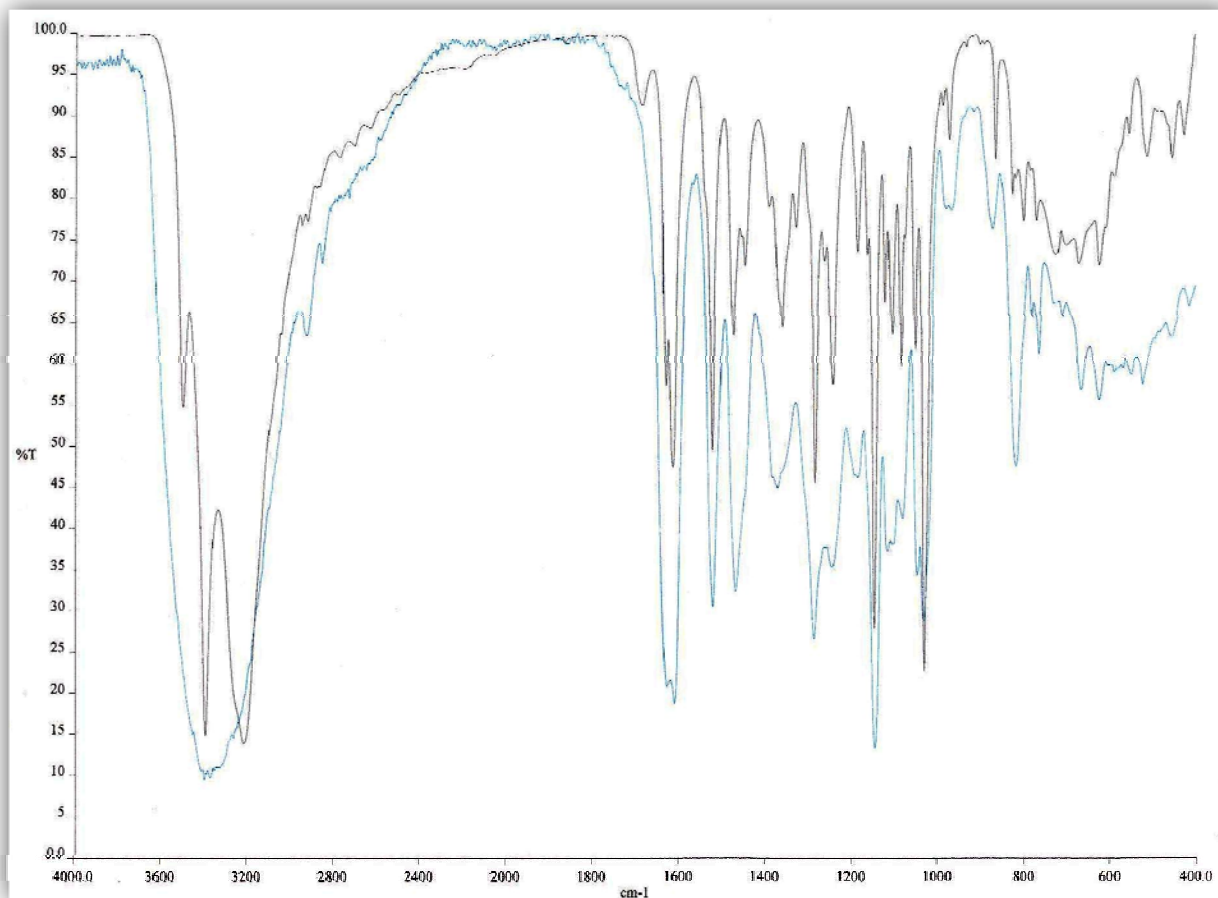


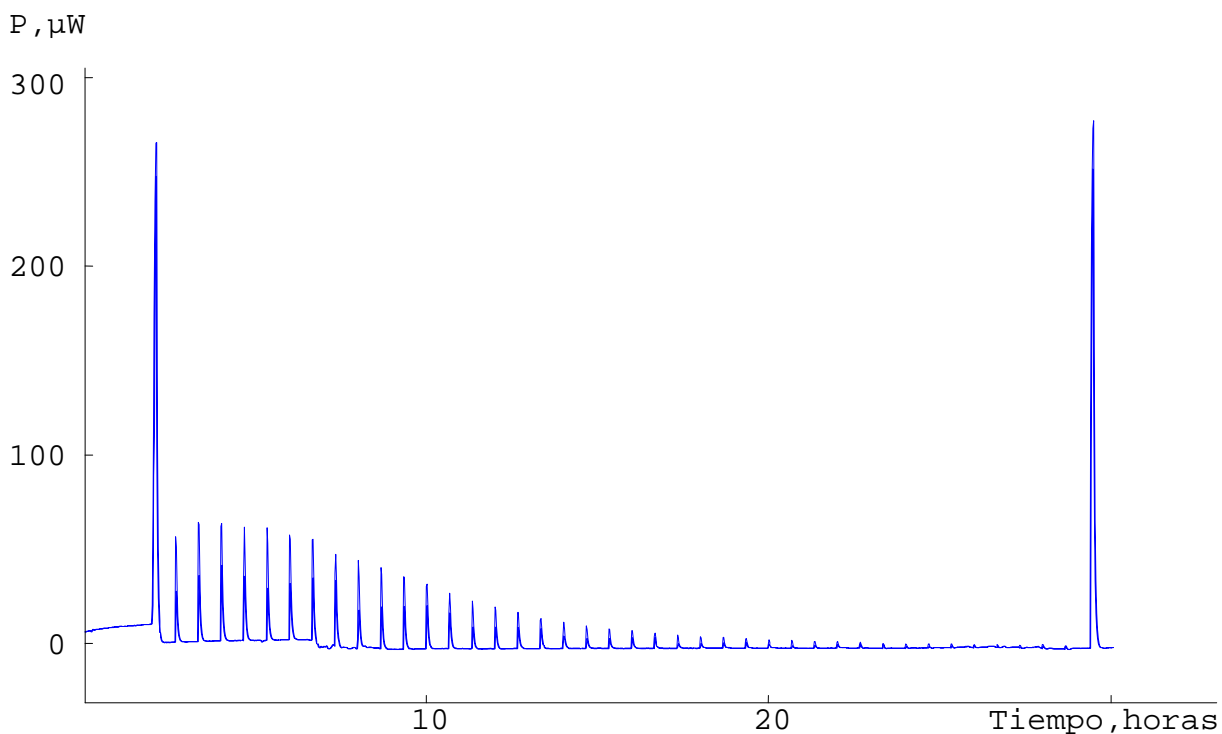
Figura 5. 2: Espectro IR experimental y teórico del antioxidante utilizado.

Otra hipótesis que se planteó, fue que durante la titulación, la (\pm)-catequina libre pudo oxidarse, esto explicaría la presencia de una coloración amarilla en la disolución de la celda de muestra al terminar los experimentos. Este cambio de coloración se atribuyó, en un inicio, a la formación del complejo, pero en la literatura^{10,11} se encontró que la catequina puede formar dímeros coloridos a pH preferentemente básicos. Además de acuerdo a Mendel²⁷ y Janeiro²⁸, la catequina es inestable a pH altos y poco estable a pH neutros. Todo lo anterior puede explicar la falta de reproducibilidad observada en los experimentos hasta ahora analizados, ya que cualquier ligera variación de pH podría dar lugar a la formación de dímeros y afectar los parámetros termodinámicos de la formación del complejo.

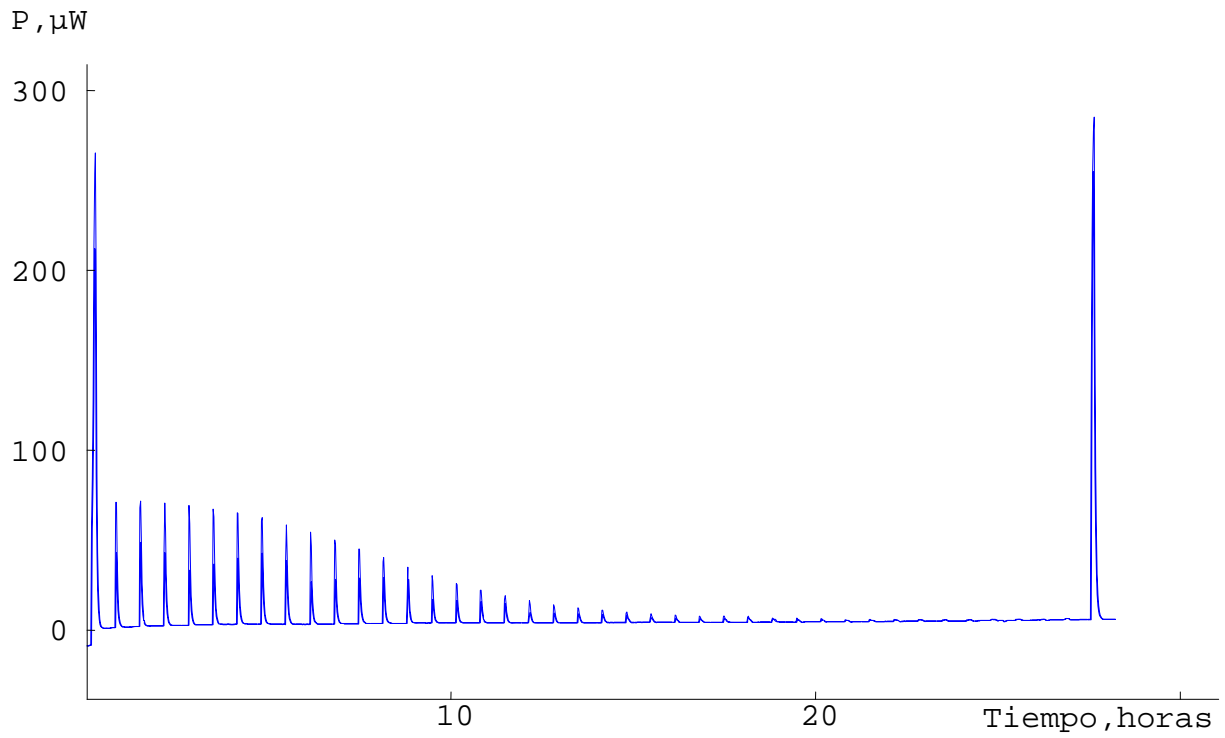
Tomando en cuenta todo lo anterior se decidió estudiar la formación del complejo, controlando el pH, en un intervalo de pH de 3 a 5 con la β -CD.

5.2 Dependencia de los parámetros termodinámicos con el pH a 298.15K

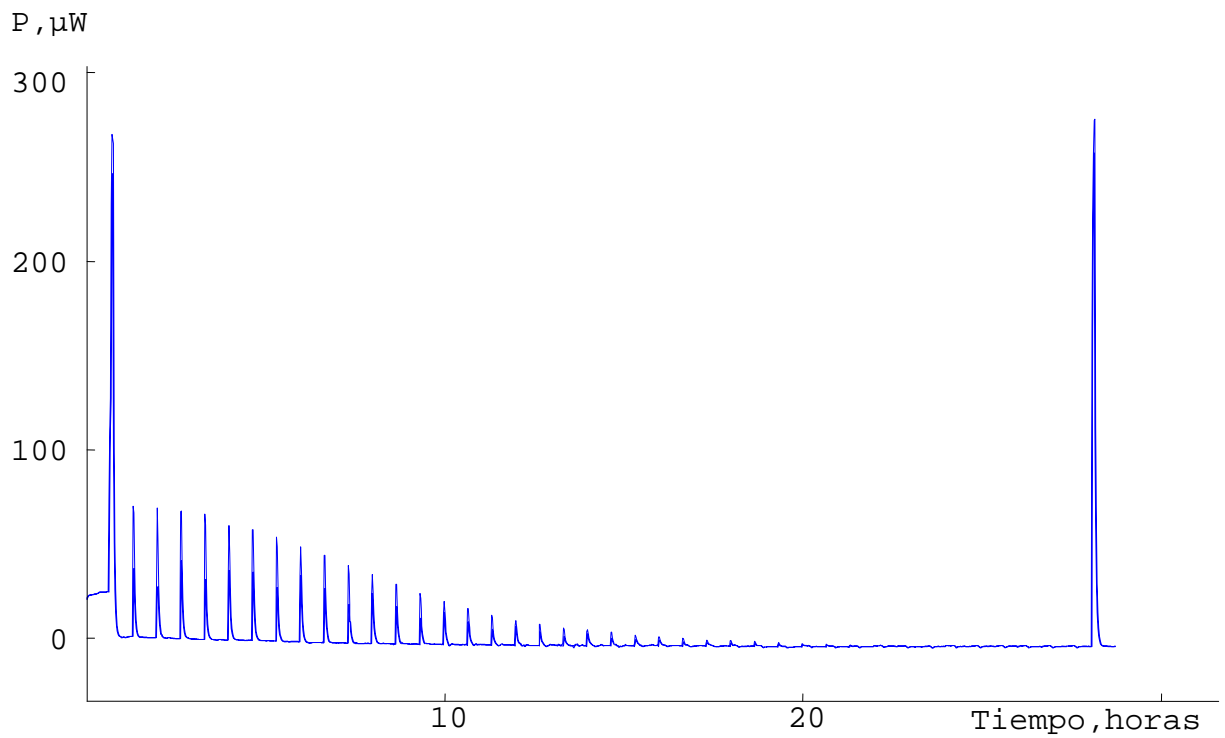
Se realizaron 40 titulaciones de 25 μ L de CD 12mM a una disolución de (\pm)-catequina 2mM ambas a pH constante con buffer de acetatos, T=298.15K y una sensibilidad del equipo de 300 μ W. Se hizo variar el pH en un intervalo de 3 a 5 y a continuación se muestran los potenciogramas y entalpogramas correspondientes.



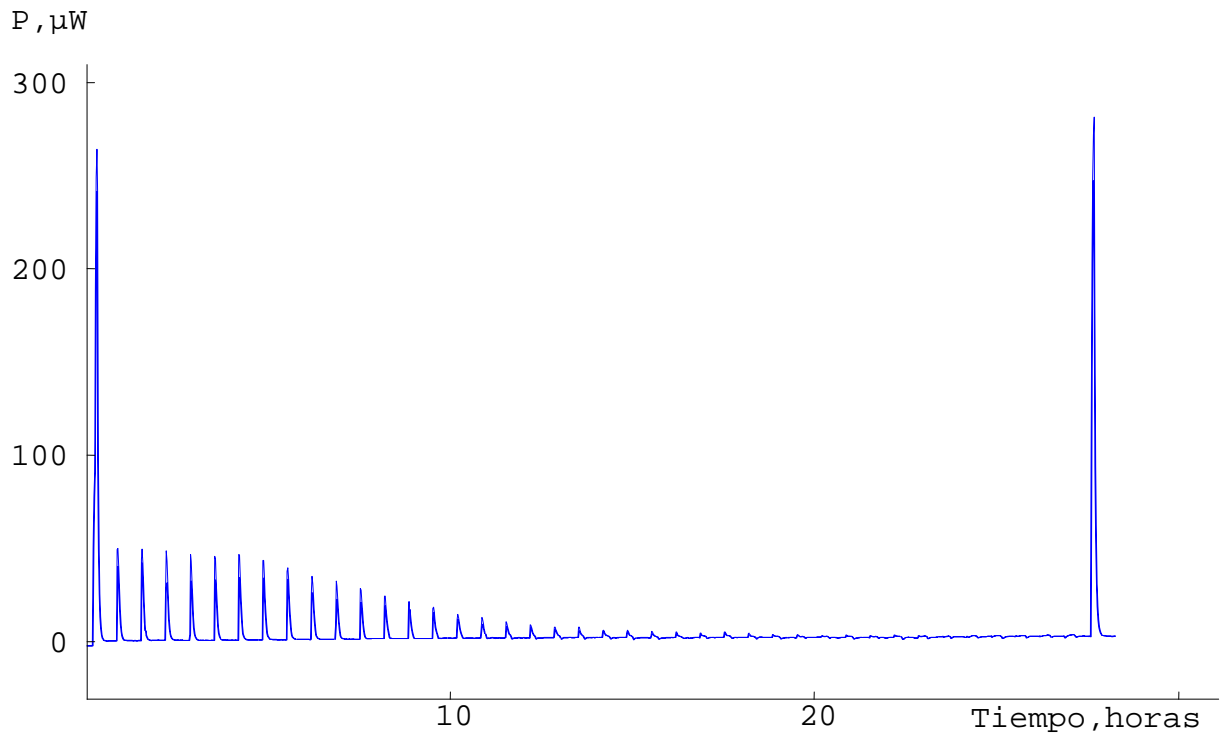
Potenciograma 10: Titulación de (\pm)-catequina con β -CD a pH=3 y T=298.15K



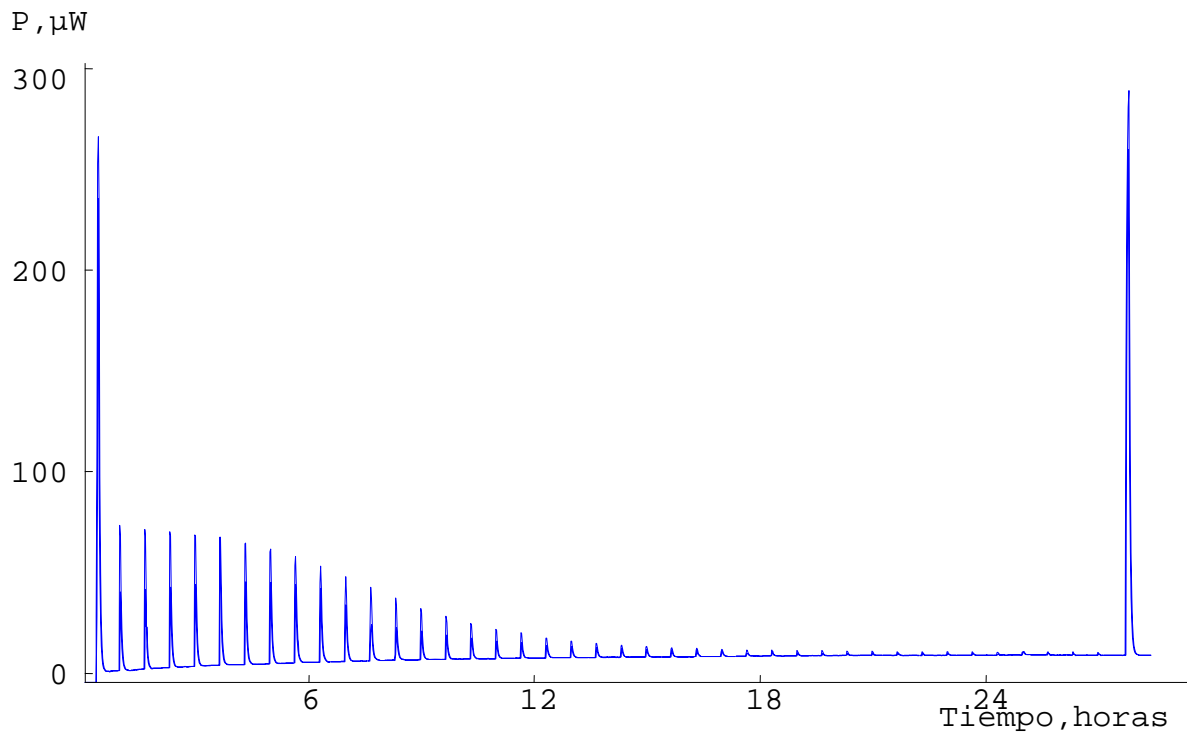
Potenciograma 11: Titulación de (\pm)-catequina con β -CD a $\text{pH}=3.5$ y $T=298.15\text{K}$



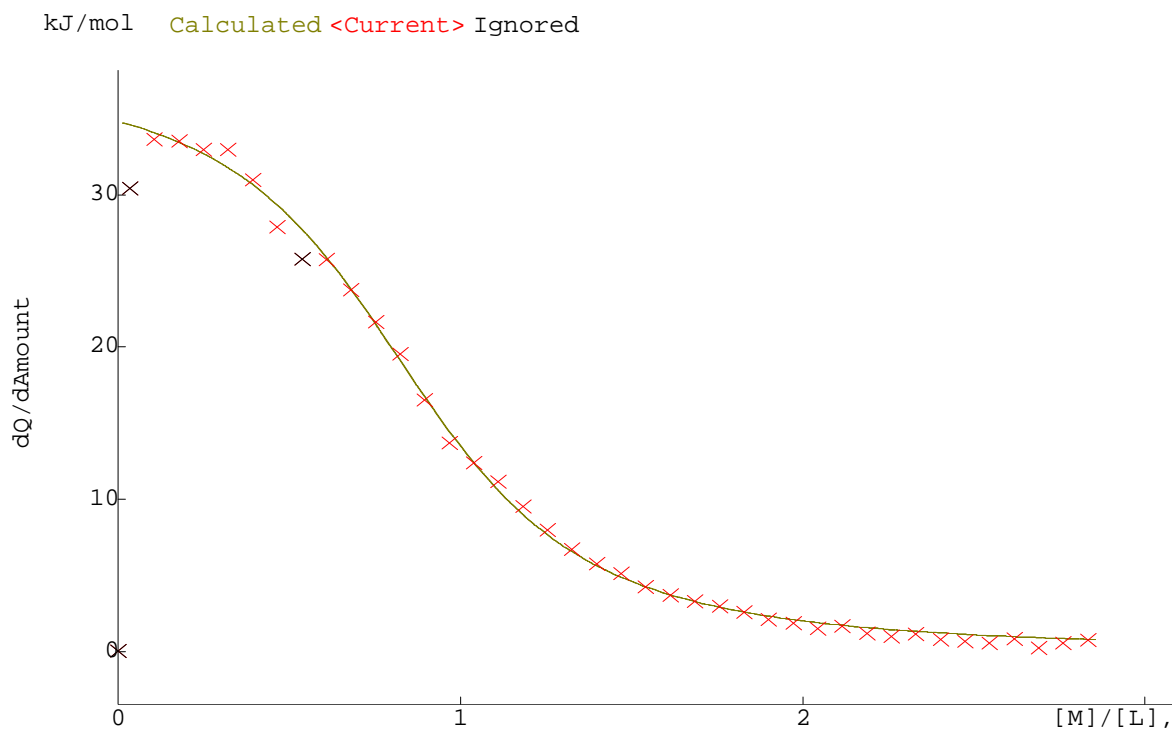
Potenciograma 12: Titulación de (\pm)-catequina con β -CD a $\text{pH}=4$ y $T=298.15\text{K}$



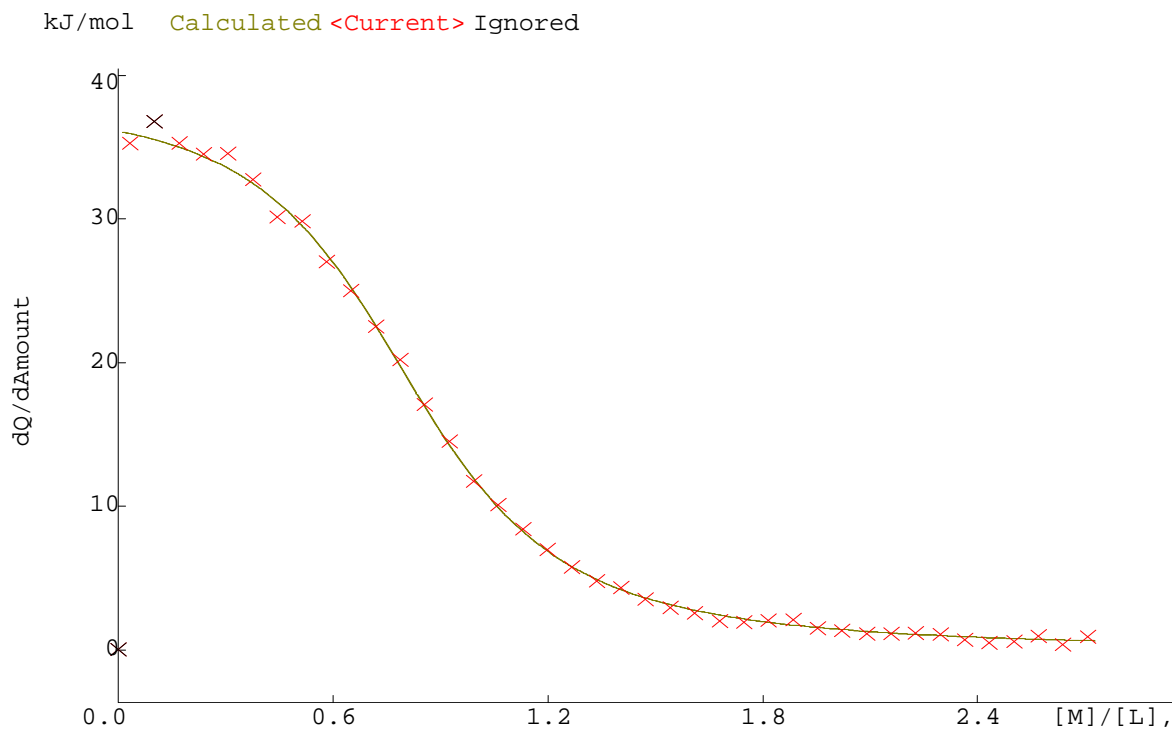
Potenciograma 13: Titulación de (\pm)-catequina con β -CD a $\text{pH}=4.5$ y $T=298.15\text{K}$



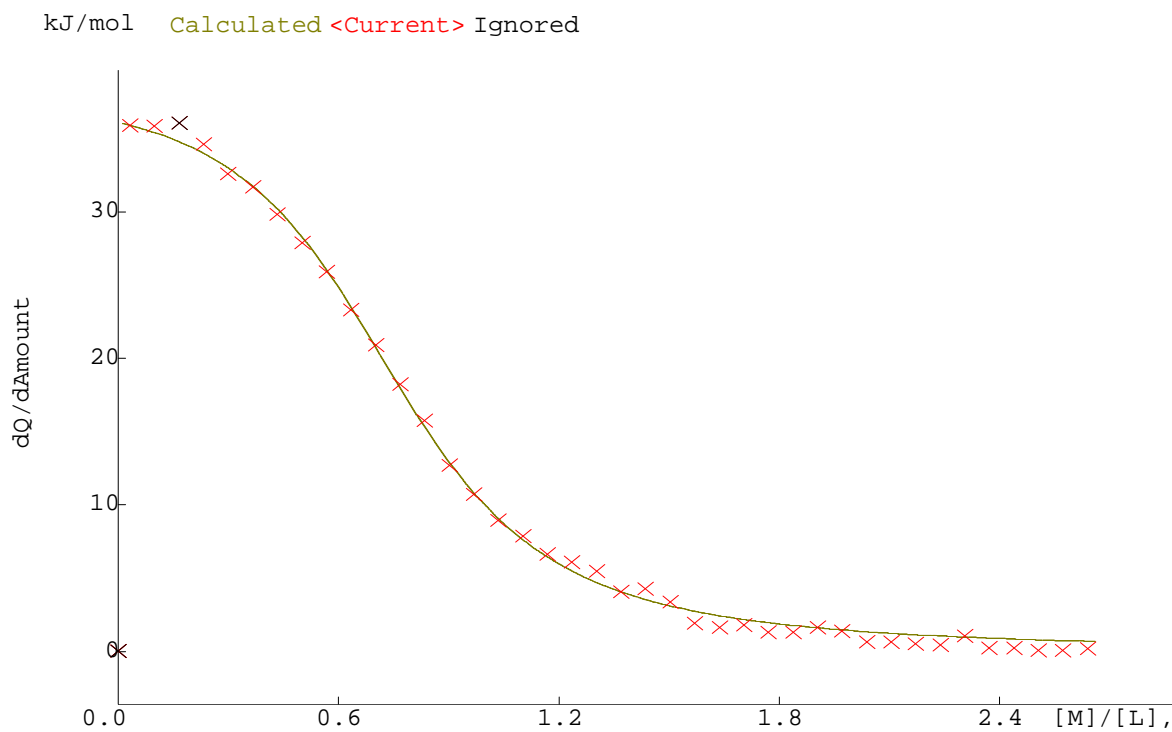
Potenciograma 14: Titulación de (\pm)-catequina con β -CD a $\text{pH}=5$ y $T=298.15\text{K}$



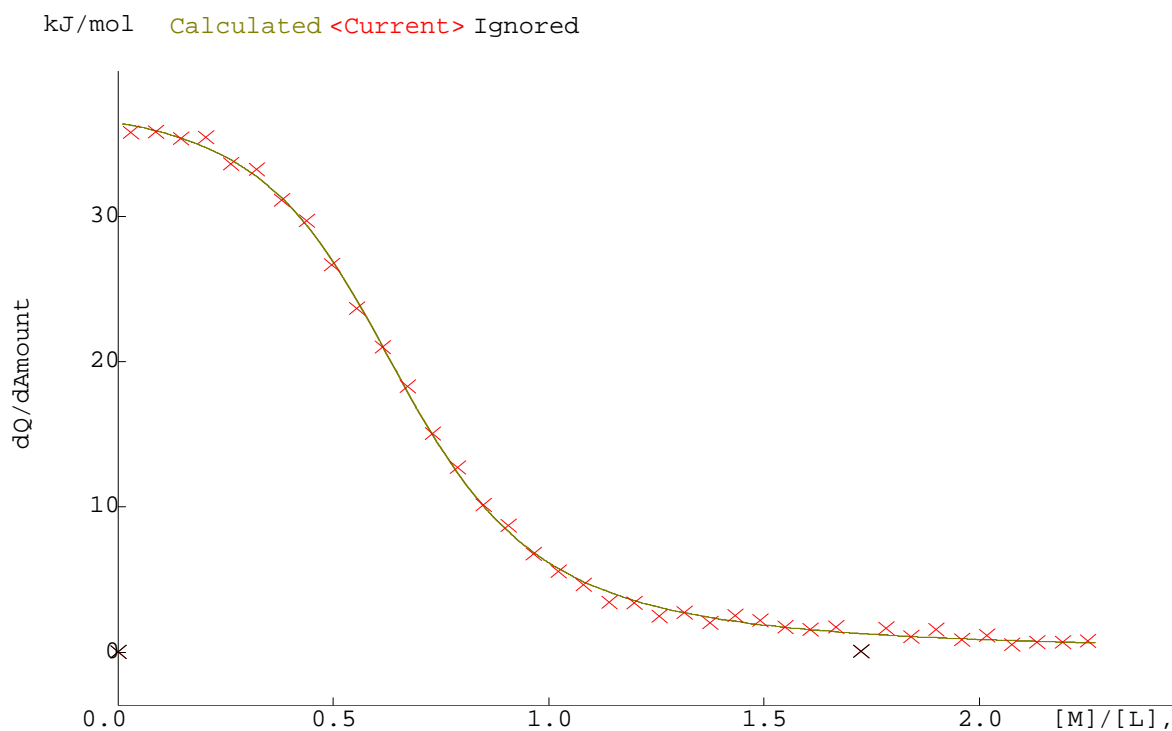
Entalpograma 7: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=3 y T=298.15K



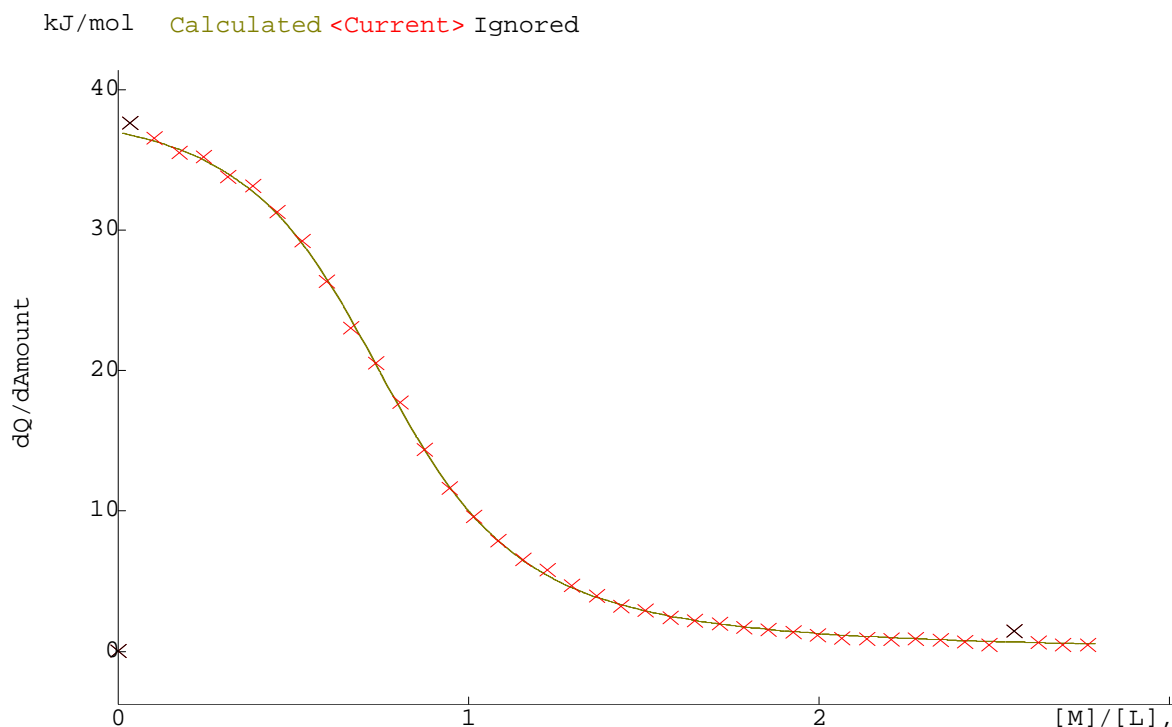
Entalpograma 8: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=3.5 y T=298.15K



Entalpograma 9: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=4 y T=298.15K



Entalpograma 10: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=4.5 y T=298.15K



Entalpograma 11: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=5 y T=298.15K

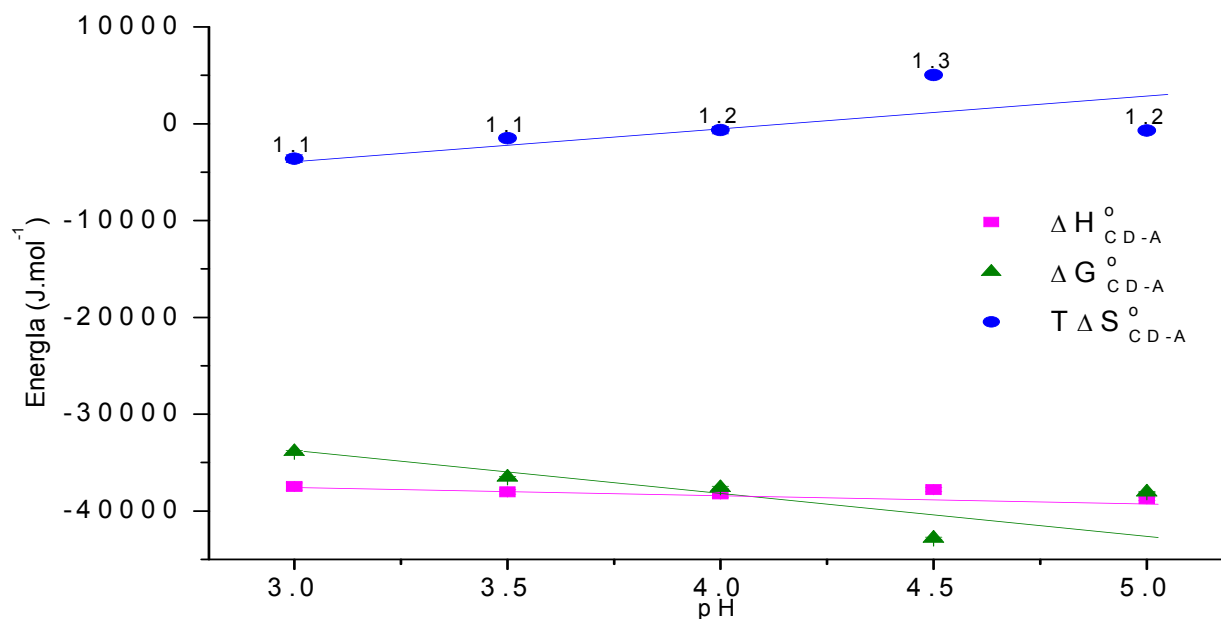
Tabla 3. Parámetros termodinámicos de los complejos con β-CD a diferentes pH.

pH	n	$K_{CD-A} (M^{-n})$	$\Delta H_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$	$\Delta G_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$	$T\Delta S_{CD-A}^{\circ} (kJ.mol^{-1})$
3	1.05	8887 ± 455	-37.47 ± 0.36	-33.87 ± 0.13	-3.606 ± 0.39
3.5	1.11	18240 ± 763	-38.03 ± 0.25	-36.53 ± 0.10	-1.499 ± 0.27
4	1.17	24128 ± 1458	-38.24 ± 0.35	-37.59 ± 0.15	-0.651 ± 0.38
4.5	1.33	98822 ± 5089	-37.79 ± 0.21	-42.83 ± 0.13	5.03 ± 0.25
5	1.17	27597 ± 690	-38.74 ± 0.17	-38.05 ± 0.06	-0.691 ± 0.18

De los potenciogramas mostrados anteriormente, se observa que la formación de los complejos es exotérmica en todos los casos. En la gráfica 2 se observa que el proceso es guiado por la entalpía y que conforme aumenta el pH, el ΔH° se hace ligeramente más negativo.

En las estructuras del antioxidante, en la figura 1.6 y de la CD, en la figura 2.2, se puede observar que poseen 5 y 21 grupos hidroxilo, respectivamente, los cuales pueden ser protonados a pH más ácidos. Es decir, conforme se disminuye el pH, aumenta la probabilidad de que los grupos OH se encuentren en su forma protonada y desfavorece la formación de puentes de hidrógeno. El antioxidante en su forma protonada tendrá mucha menor afinidad por la cavidad hidrofóbica de la

CD, ya que las interacciones del tipo no polar-no polar se verán disminuidas. Consecuentemente, conforme se incrementa el pH, las interacciones entre el antioxidante y la CD son más fuertes, y se liberará más calor (el ΔH° se hace más negativo).



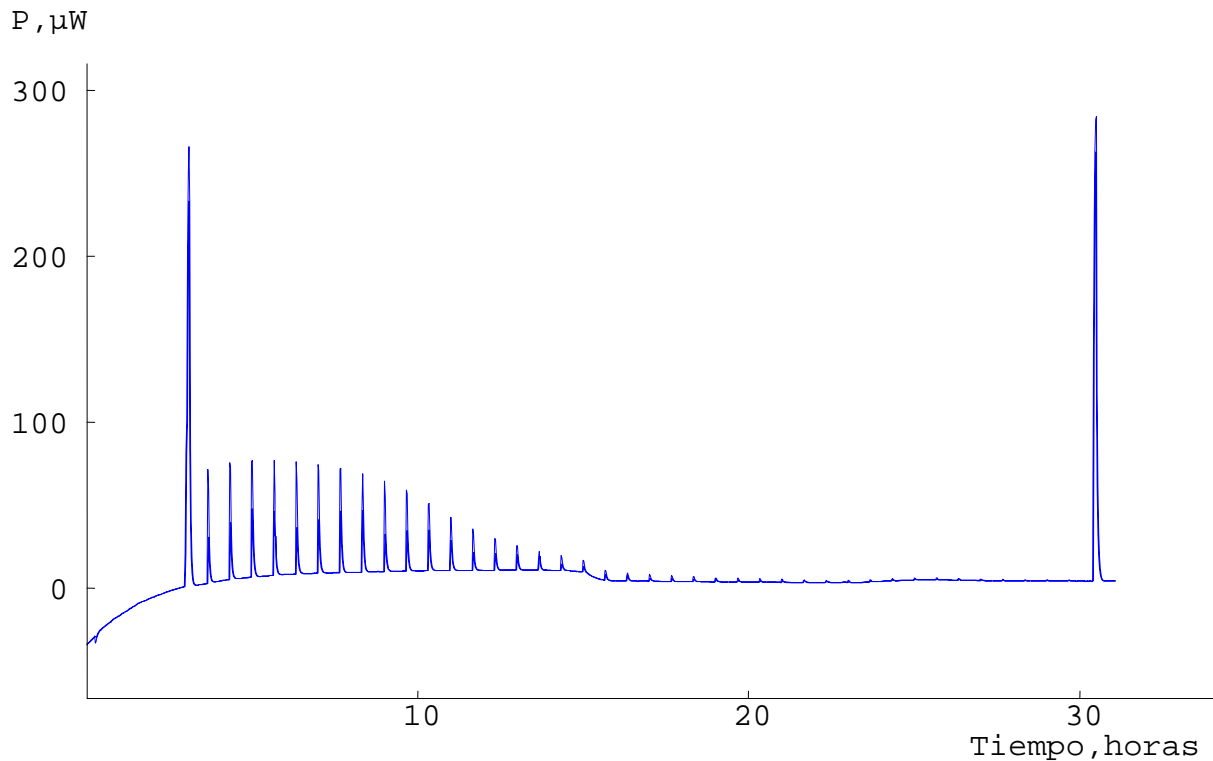
Gráfica 2: Variación de parámetros termodinámicos con el pH a 298.15K (las líneas en la gráfica sólo muestran una tendencia, en cada caso se muestra el valor de n resultado del ajuste)

Por otra parte, el aumento de puentes de hidrógeno puede dar lugar a un mejor acomodo del antioxidante en la CD e incrementar el valor de n (el número de moléculas de (±)-catequina que se introducen en la CD).

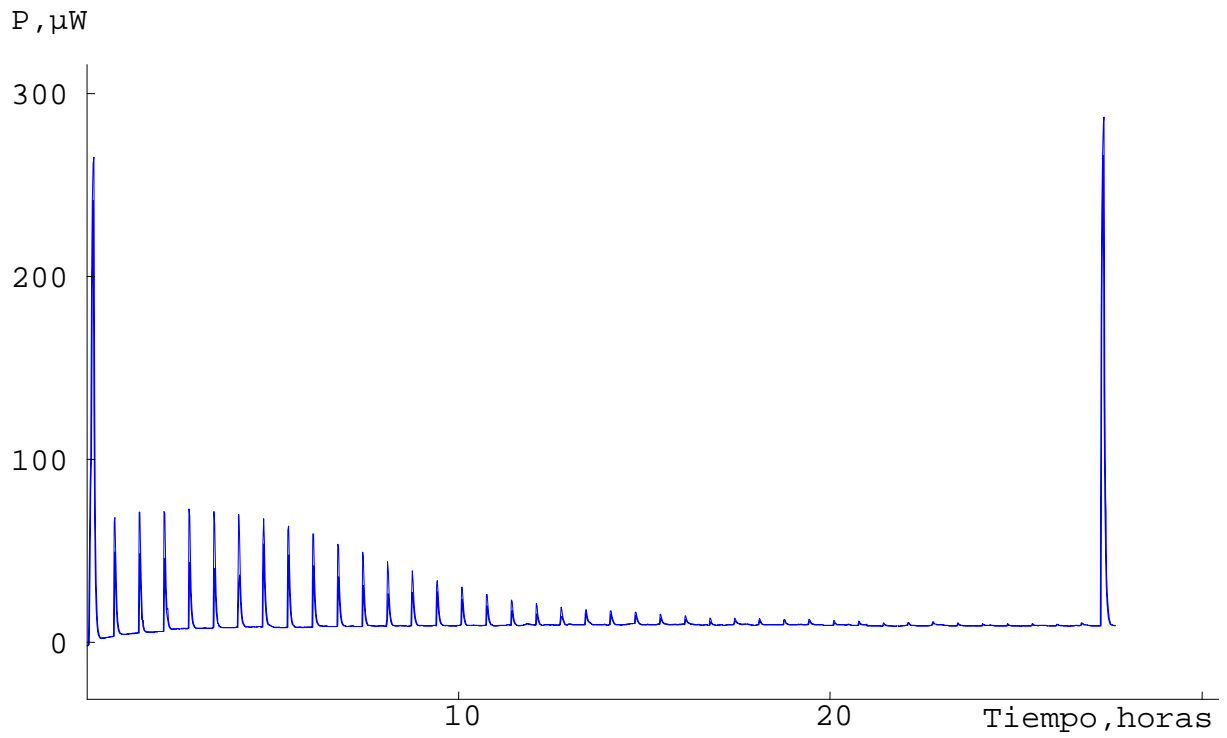
En la tabla 2 y la gráfica 2, se observa que conforme se aumenta n, aumenta el cambio de entropía. Esto se debe principalmente a que al incrementar el número de moléculas que entran en la cavidad de la CD, aumenta el número de moléculas de agua liberadas al bulto. En general éste aumento se observa conforme se aumenta el pH. Debido a las contribuciones entrópica y entálpica el ΔG° tiende a ser más negativo a pH mayores, y por lo tanto la formación del complejo antioxidante-CD es favorecida a pH menos ácidos. Además, se observa un mínimo de ΔG° a pH=4.5, por lo que la formación del complejo de inclusión entre el antioxidante y la CD es más espontáneo a este pH.

5.3 Dependencia de los parámetros termodinámicos con la temperatura a pH=3 y pH=4

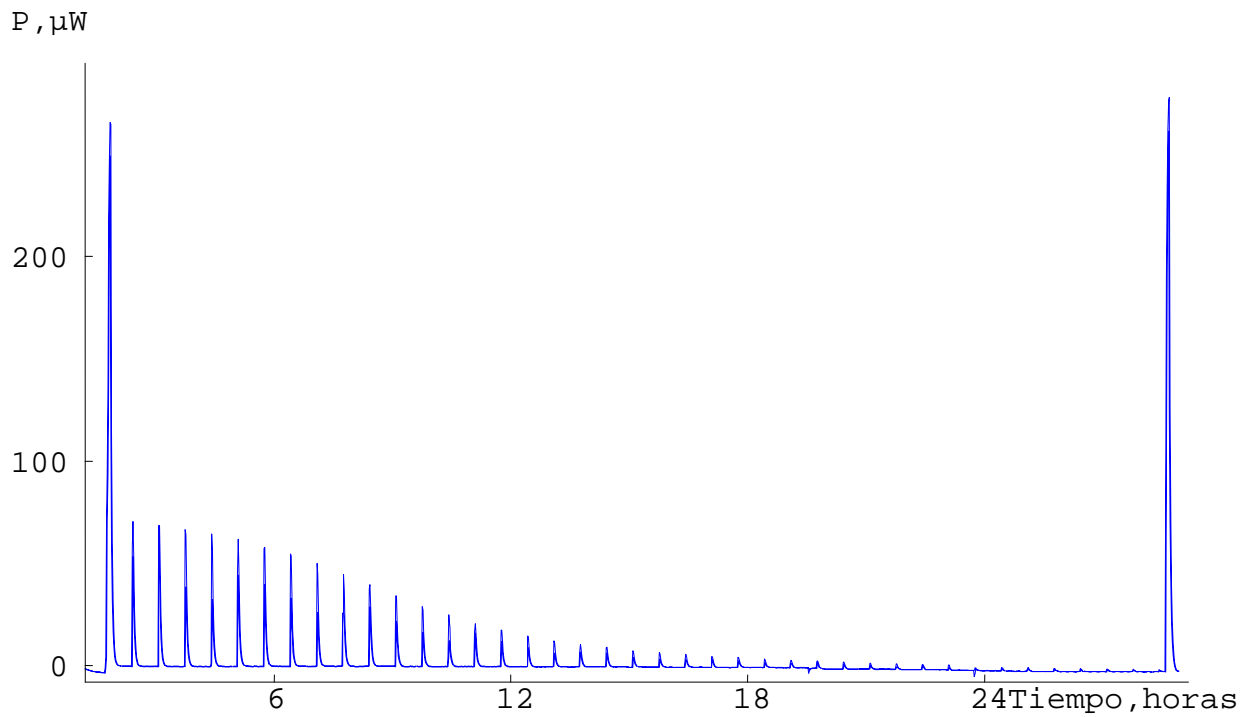
Para observar el efecto de la temperatura en los parámetros termodinámicos de la formación del complejo, se hizo variar la temperatura en un intervalo de 288.15K a 308.15K a pH=3 y pH=4. Se utilizaron las mismas condiciones que en 5.2. A continuación se muestran los potenciogramas y entalpogramas correspondientes.



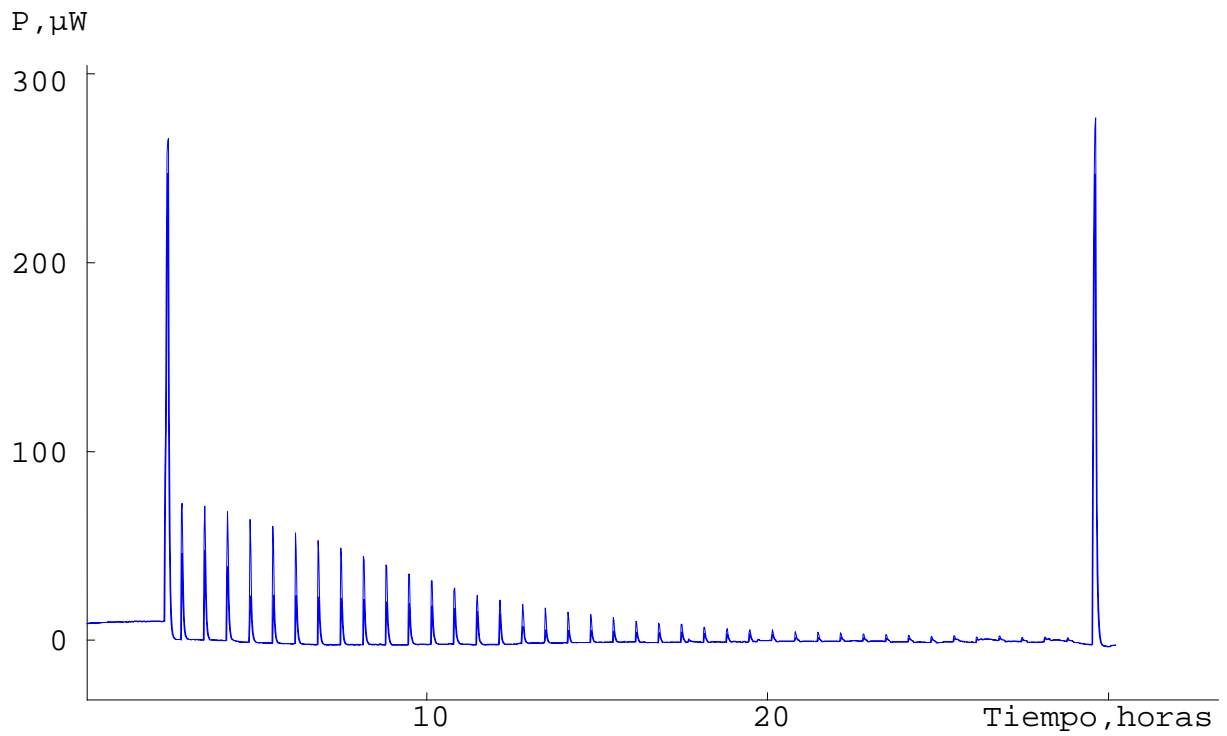
Potenciograma 15: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=3 y T=288.15K



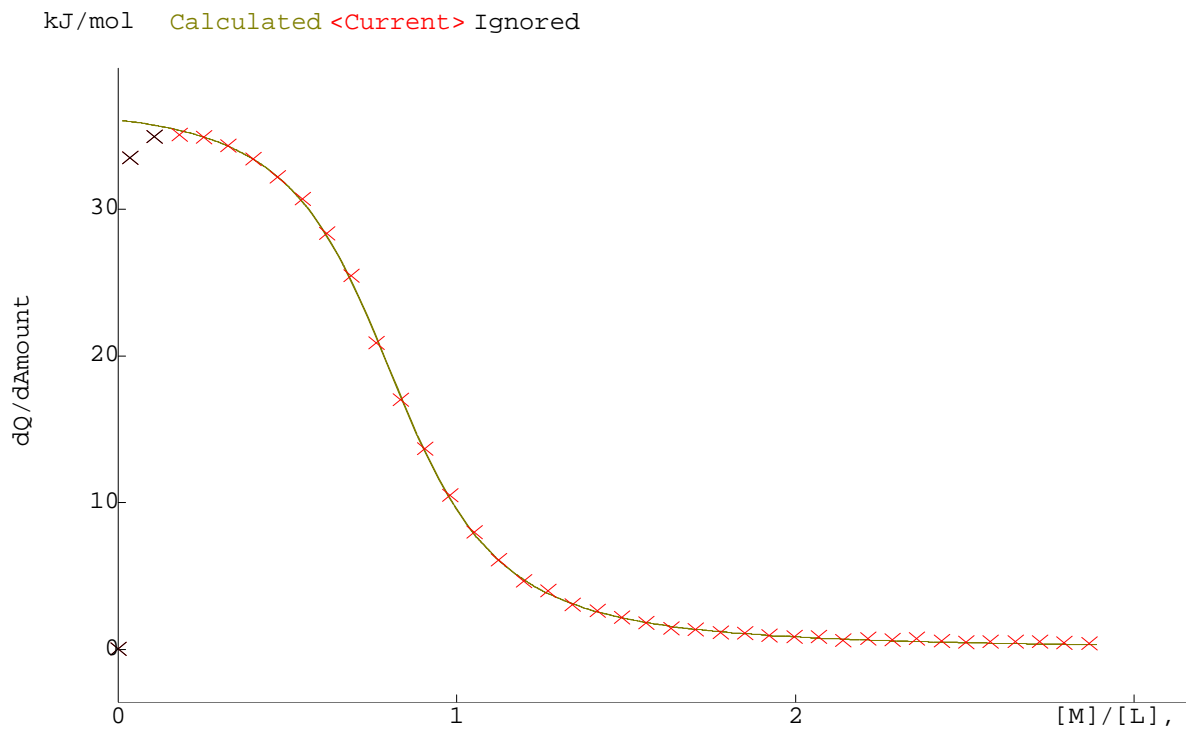
Potenciograma 16: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=3 y T=293.15K



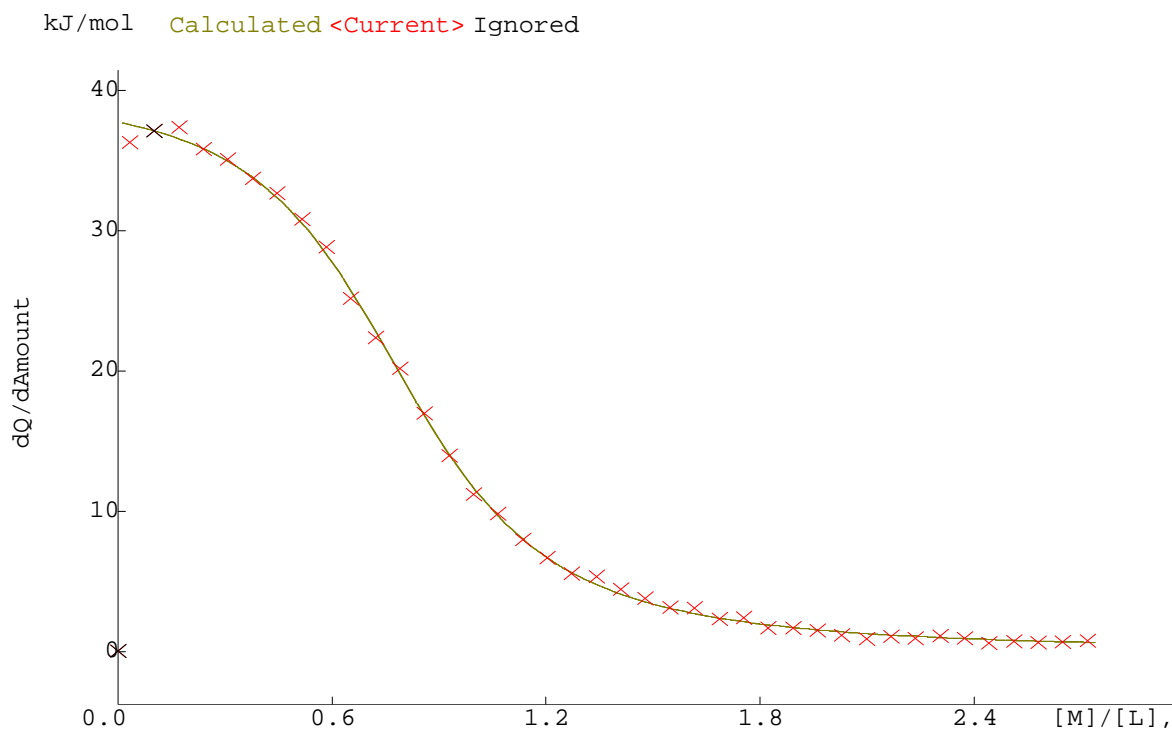
Potenciograma 17: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=3 y T=303.15K



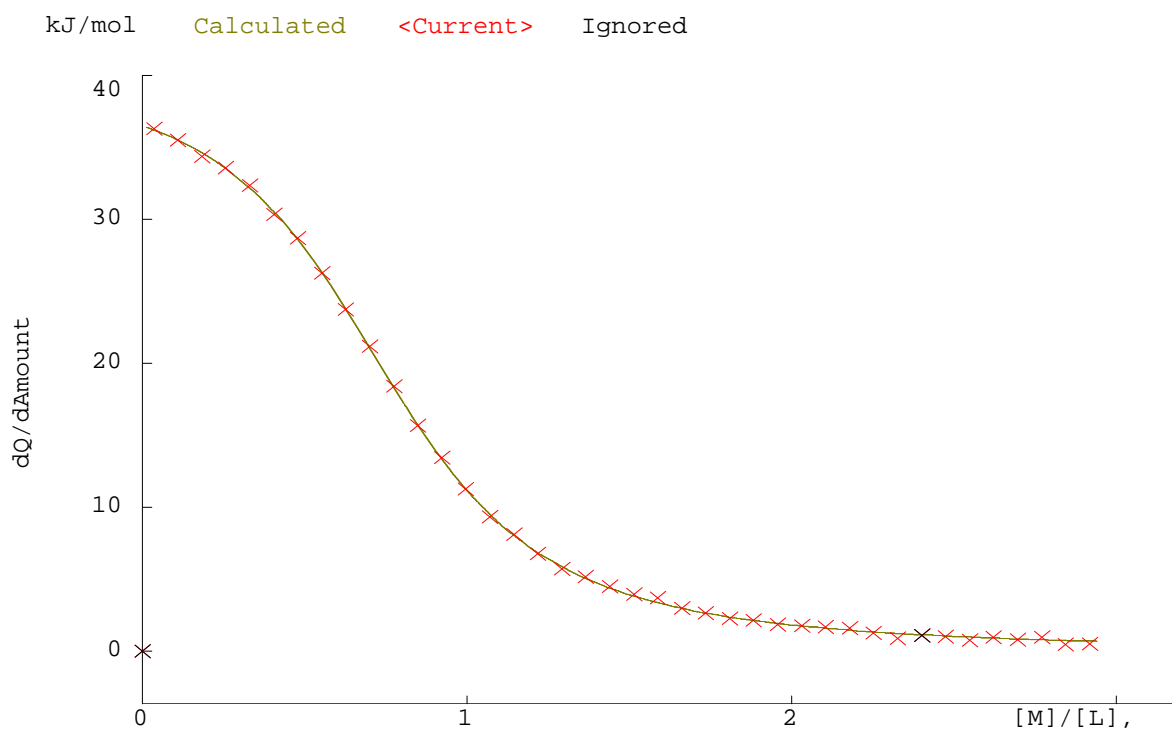
Potenciograma 18: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=3 y T=308.15K



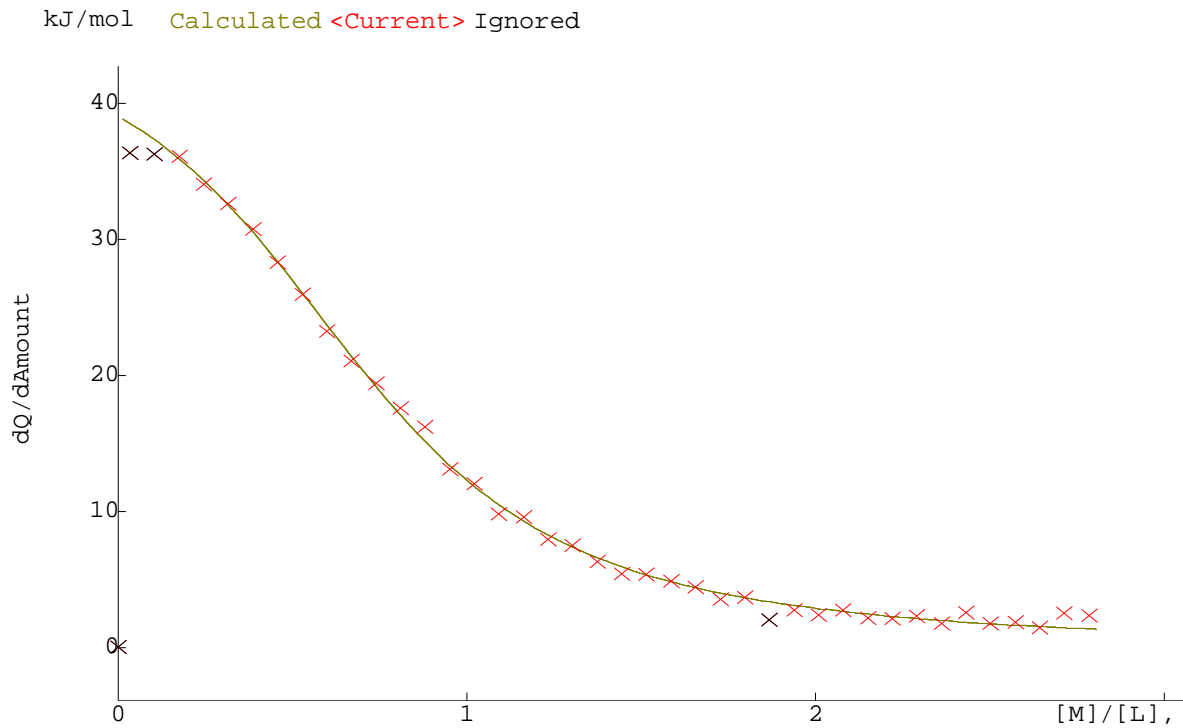
Entalpiograma 12: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=3 y T=288.15K



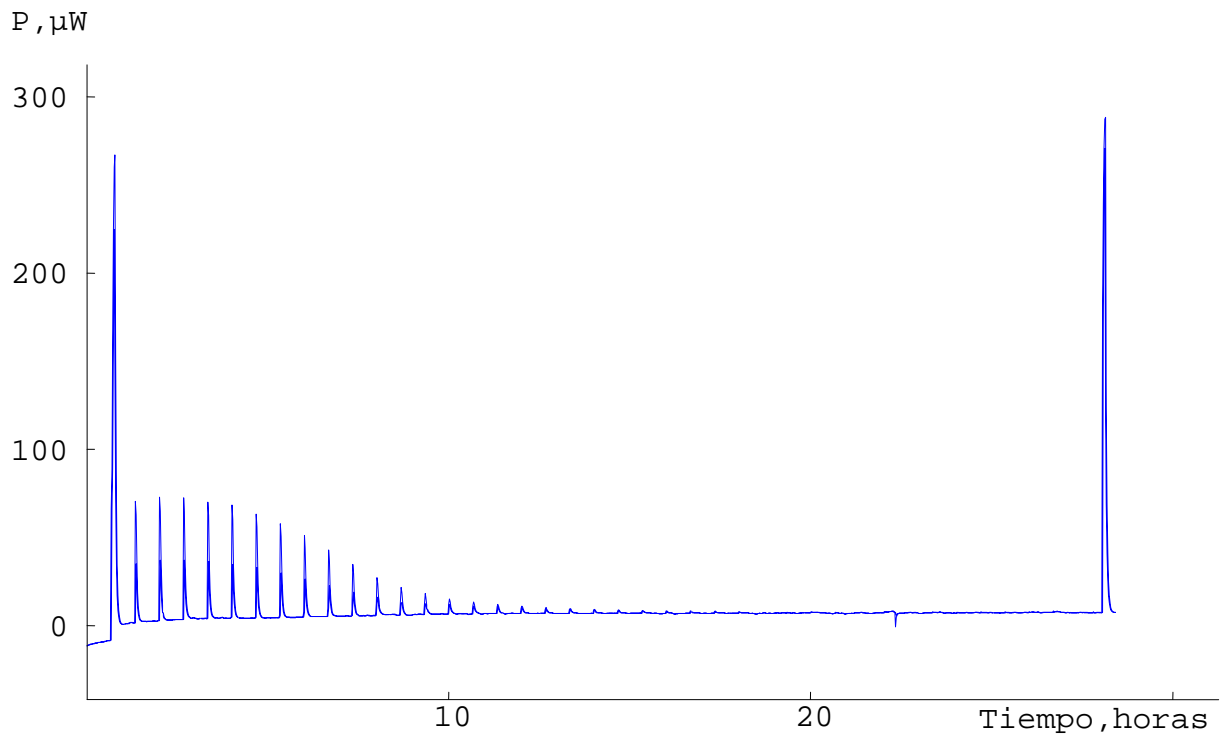
Entalpograma 13: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=3 y T=293.15K



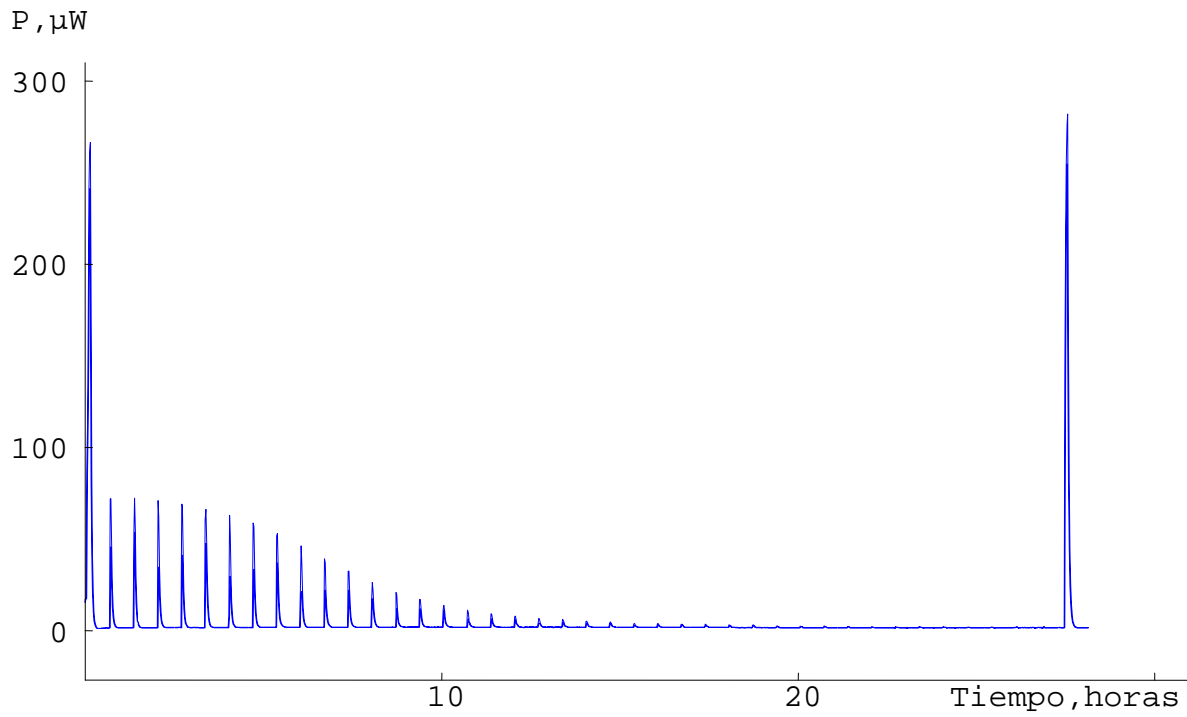
Entalpograma 14: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=3 y T=303.15K



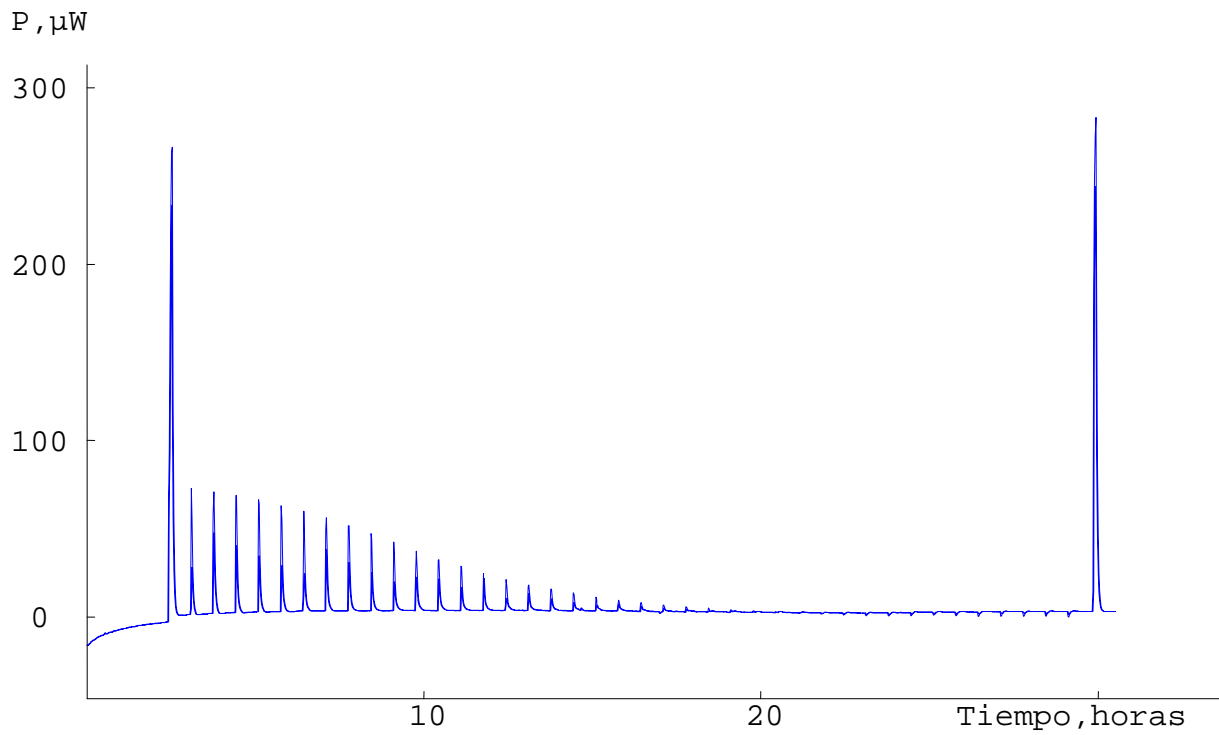
Entalpograma 15: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=3 y T=308.15K



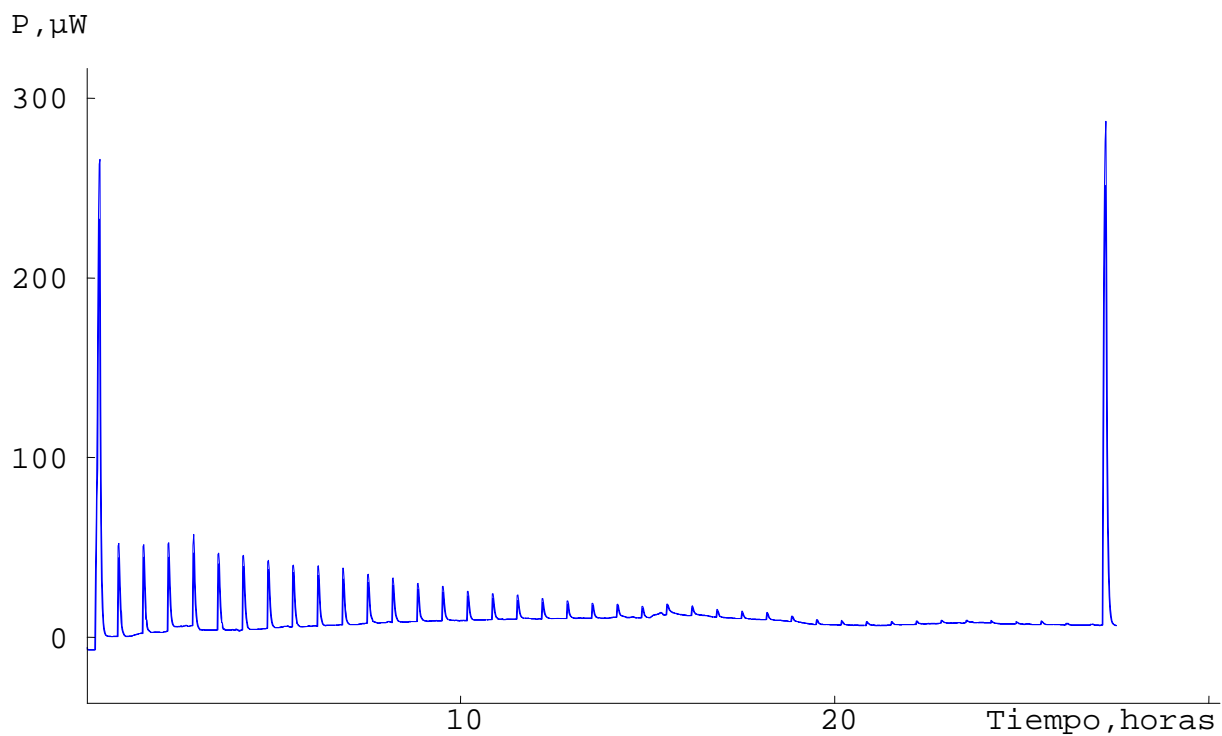
Potenciograma 19: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=4 y T=288.15K



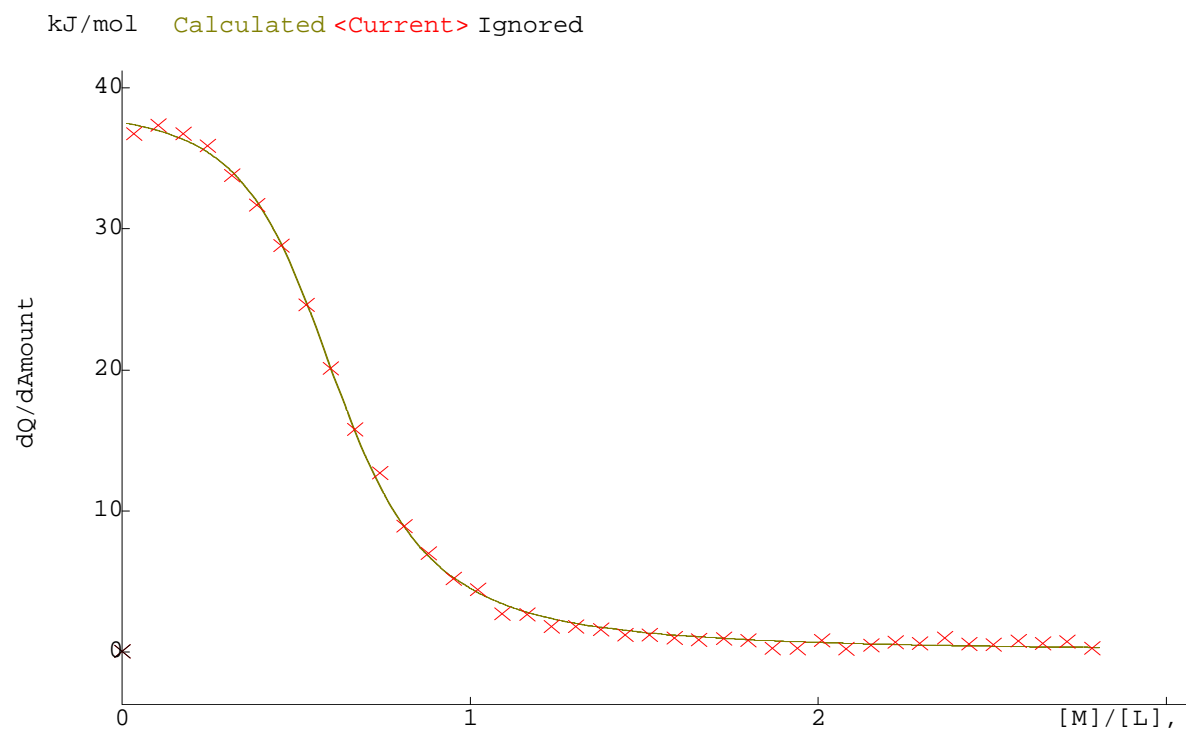
Potenciograma 20: Titulación de (\pm)-catequina con β -CD a pH=4 y T=293.15



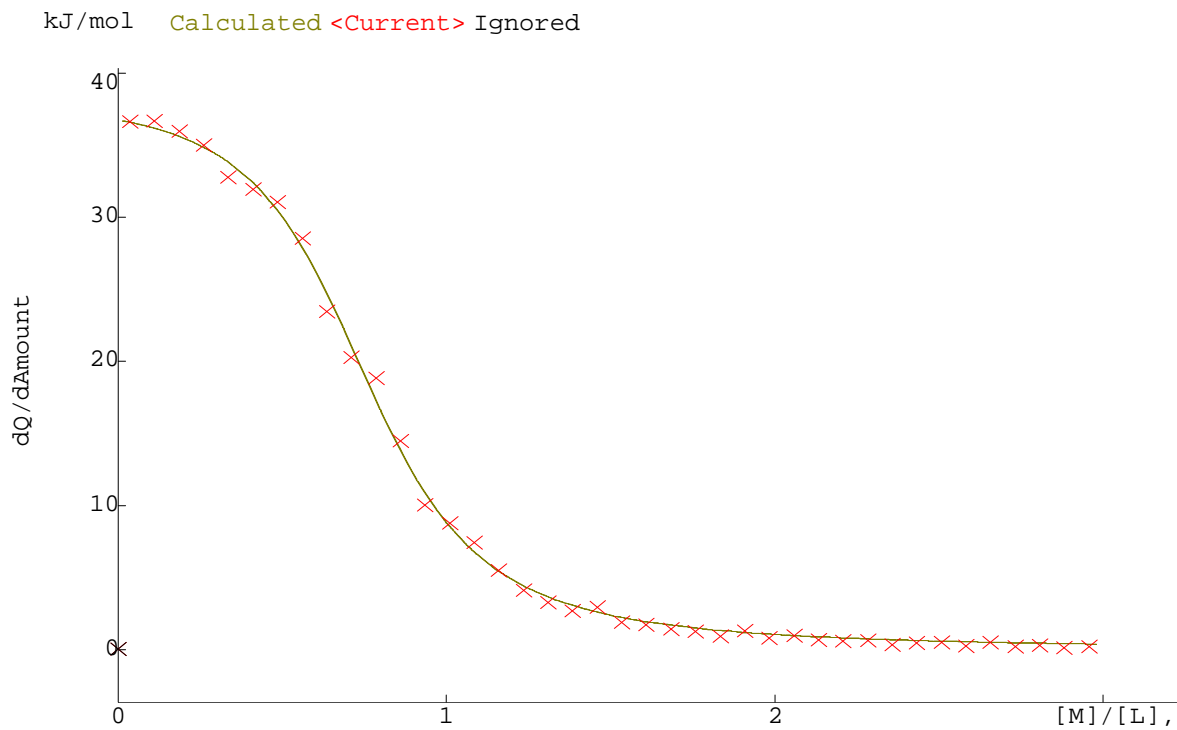
Potenciograma 21: Titulación de (\pm)-catequina con β -CD a pH=4 y T=303.15K



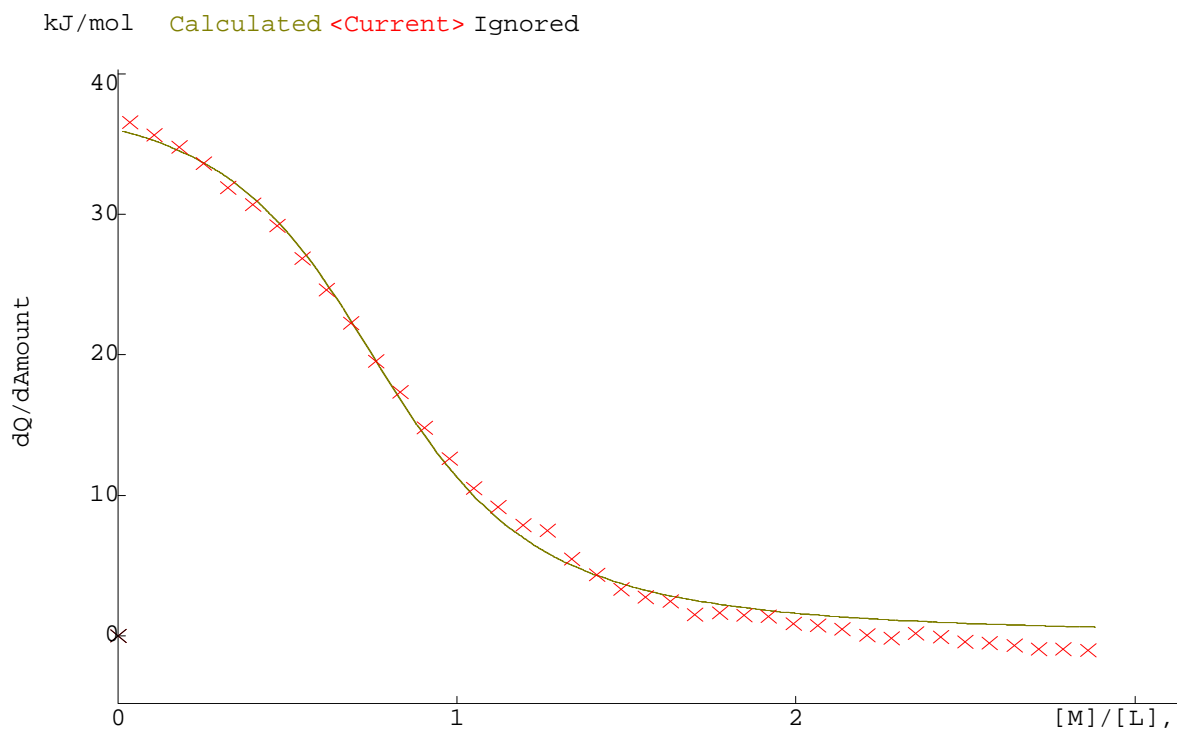
Potenciograma 22: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=4 y T=308.15K



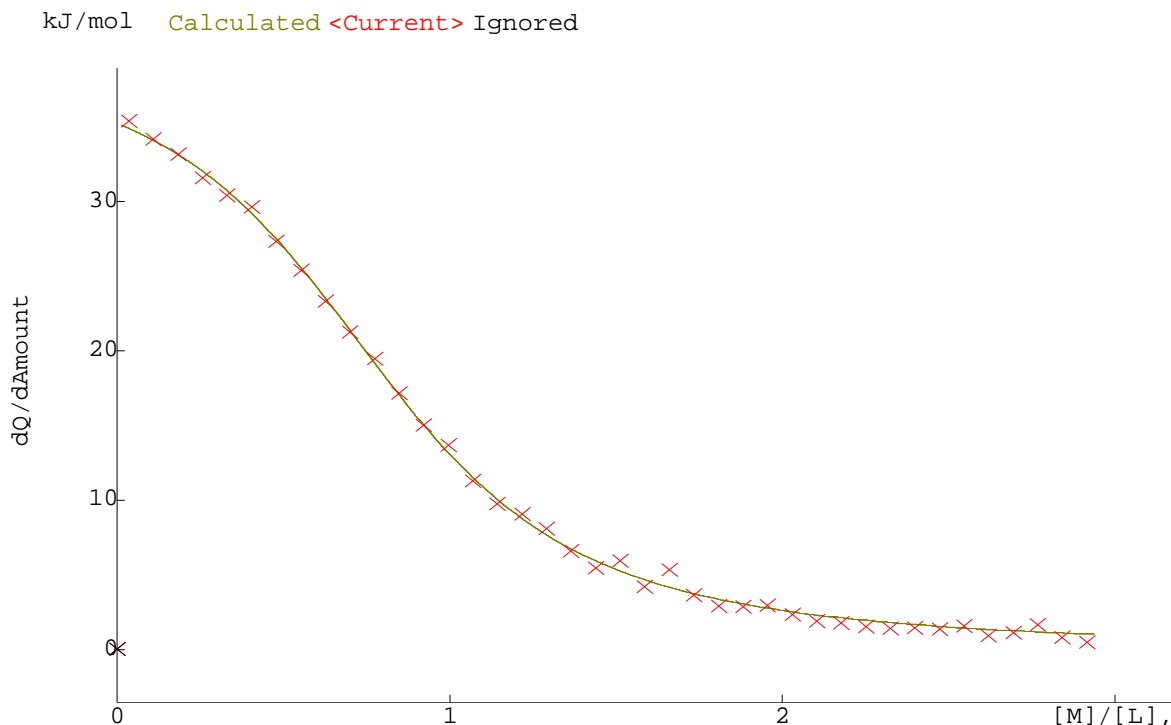
Entalpiograma 16: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=4 y T=288.15K



Entalograma 17: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=4 y T=293.15K



Entalograma 18: Titulación de (±)-catequina con β-CD a pH=4 y T=303.15K



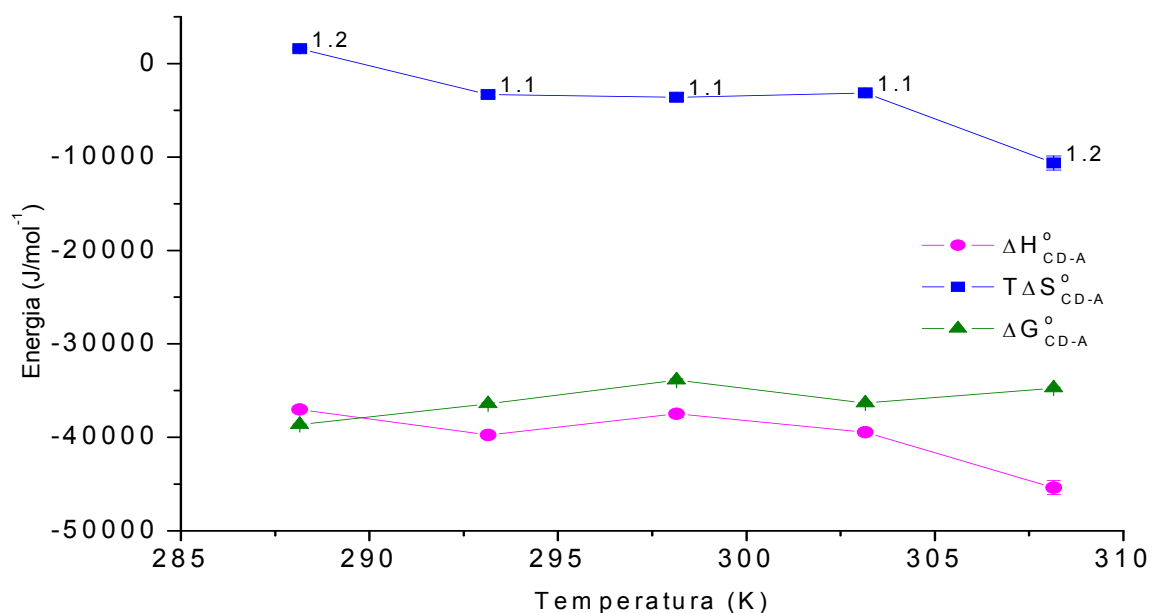
Entalpograma 19: Titulación de (±)-catequina con β -CD a pH=4 y T=308.15K

Tabla 4. Parámetros termodinámicos de los complejos con β -CD a diferentes temperaturas a pH=3

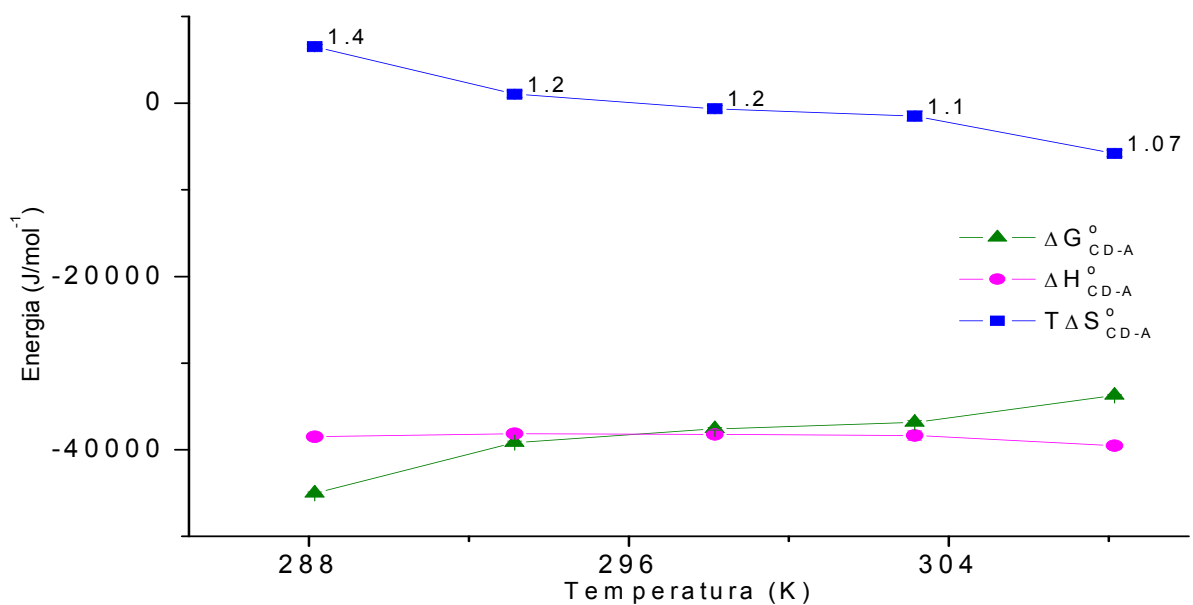
T	n	$K_{CD-A} (M^{-n})$	ΔH_{CD-A}° (kJ.mol ⁻¹)	ΔG_{CD-A}° (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S_{CD-A}^{\circ}$ (kJ.mol ⁻¹)
288.15	1.15	46091 ± 1006	-37.03 ± 0.10	-38.62 ± 0.05	1.59 ± 0.12
293.15	1.13	20926 ± 900	-39.74 ± 0.25	-36.42 ± 0.10	-3.32 ± 0.27
298.15	1.05	8887 ± 455	-37.47 ± 0.36	-33.87 ± 0.13	-3.61 ± 0.39
303.15	1.14	14770 ± 276	-39.45 ± 0.12	-36.32 ± 0.05	-3.13 ± 0.13
308.15	1.16	8269 ± 417	-45.37 ± 0.75	-34.73 ± 0.13	-10.64 ± 0.76

Tabla 5. Parámetros termodinámicos de los complejos con β -CD a diferentes temperaturas a pH=4

T	n	$K_{CD-A} (M^{-n})$	ΔH_{CD-A}° (kJ.mol ⁻¹)	ΔG_{CD-A}° (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S_{CD-A}^{\circ}$ (kJ.mol ⁻¹)
288.15	1.43	269573 ± 16531	-38.50 ± 0.21	-45.00 ± 0.15	6.51 ± 0.26
293.15	1.20	44218 ± 3185	-38.14 ± 0.33	-39.19 ± 0.18	1.04 ± 0.37
298.15	1.17	24128 ± 1458	-38.24 ± 0.35	-37.59 ± 0.15	-0.65 ± 0.38
303.15	1.13	16685 ± 1495	-38.35 ± 0.53	-36.86 ± 0.23	-1.49 ± 0.57
308.15	1.07	6370 ± 278	-39.52 ± 0.37	-33.72 ± 0.11	-5.81 ± 0.39



Gráfica 3: Variación de parámetros termodinámicos con la temperatura a pH=3
(en cada caso se muestra el valor de n resultado del ajuste)



Gráfica 4: Variación de parámetros termodinámicos con la temperatura a pH=4
(en cada caso se muestra el valor de n resultado del ajuste)

De los potenciogramas anteriores se observa que todos los procesos son exotérmicos.

Como se observa en las gráficas 3 y 4 el proceso es guiado por la entalpía; el ΔH° permanece casi constante en temperaturas inferiores a 308K sin embargo a 308K se observa un decremento considerable, que es evidencia de que las interacciones entre el antioxidante y la CD son más fuertes. Se observa que en todos los casos la constante de equilibrio disminuye conforme se aumenta la temperatura. Lo anterior se debe a que la constante de equilibrio varía con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Van't Hoff (5.1).

$$\frac{\partial \ln K_p}{\partial T} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (5.1)$$

Esta ecuación predice que la constante de equilibrio, para un proceso exotérmico a presión constante, aumenta al disminuir la temperatura; en consecuencia, de acuerdo a la ecuación (4.11), el ΔG° se hace más negativo y el proceso se hace más espontáneo, conforme disminuye la temperatura.

Al incrementarse la constante de equilibrio, el equilibrio se desplaza hacia la formación de productos, es decir, la formación de los complejos de inclusión y la liberación de moléculas de agua al bulto, por lo que al disminuir la temperatura, las moléculas de agua (en un estado ordenado) del interior de la CD y de la esfera de solvatación del antioxidante son desplazadas al bulto (estado menos ordenado), lo cual explica el aumento de la entropía. También se observa que a pH=4, conforme disminuye la temperatura, se incrementa n y aumenta la entropía.

Conclusiones

- La (\pm)-catequina puede formar complejos de inclusión con la β -CD y sus derivadas HP- β -CD.
- La cavidad de la β -CD, a diferencia de aquéllas de la α -CD y γ -CD, posee el tamaño adecuado para alojar al antioxidante estudiado.
- Los parámetros termodinámicos (ΔH° , ΔG° , ΔS° y K) de formación del complejo pueden ser determinados mediante calorimetría de titulación isotérmica.
- El proceso de formación de los complejos de inclusión es guiado por la entalpía y exotérmica en todos los casos.
- A pesar de que la contribución entálpica es la más importante, la contribución entrópica es aquella que determina la variación del ΔG° .
- Se observó que pequeñas variaciones de pH pueden dar lugar a la oxidación de la catequina por lo que mantener el pH en un valor inferior a cinco, es fundamental para llevar a cabo estudios con el antioxidante.
- En general, un incremento de “n” (número promedio de moléculas de antioxidante dentro de la CD) puede explicar un mejor acomodo de la catequina dentro de la CD, lo que:
 - Da lugar a una mayor liberación de moléculas de agua de hidratación de la CD y de la esfera de solvatación de la catequina al bulto de la disolución. Por lo anterior, se podría explicar el aumento del cambio de entropía conforme se incrementa “n”.
 - Favorece la inclusión del antioxidante en la CD.
 - Aumenta el valor de la constante de formación del complejo y por lo tanto disminuye el ΔG° y el proceso es más espontáneo.
 - Se lleva a cabo a mayores MS, mayores pH y menor temperatura.
- Al incrementar el MS, aumentan los grupos hidroxipropilo en la CD, aumenta la probabilidad de formar puentes de hidrógeno, lo que podría explicar que el ΔH° sea más negativo.
- Conforme se incrementa el pH, la probabilidad de que los grupos OH estén protonados, disminuye; por lo que se favorece la formación de puentes de hidrógeno. Lo que podría explicar que en el intervalo de pH estudiado, conforme se incrementa el valor de pH, el proceso es ligeramente más exotérmico.

- El aumento de puentes de hidrógeno puede dar lugar a un mejor acomodo del antioxidante en la CD e incrementar el valor de “n”.
- El ΔH° permanece casi constante en temperaturas inferiores a 35°C, sin embargo a 35°C, se observa un decremento considerable, que es evidencia de que las interacciones entre el antioxidante y la CD son más fuertes.
- De acuerdo a la ecuación de Van't Hoff, la constante de equilibrio, para un proceso exotérmico a presión constante, aumenta conforme se disminuye la temperatura. Por lo que el proceso es más espontáneo (el ΔG° se hace más negativo) conforme disminuye la temperatura.
- De los resultados anteriores, las condiciones óptimas para la formación del complejo son pH=4.5 y 288.15K. Sin embargo, conforme se aumenta el pH, la catequina se oxida más fácilmente y conforme disminuye la temperatura, su solubilidad también disminuye. Por lo anterior, se recomendaría trabajar a pH=4 y 293.15K.

Recomendaciones para trabajo futuro

- Estudiar la cinética de oxidación de la catequina a diferentes pH y temperaturas, en su forma libre y formando un complejo de inclusión.
- Evaluar la actividad antioxidante de la catequina en su forma acomplejada.
- Caracterizar termodinámicamente la formación de complejos de inclusión en el intervalo de pH estudiado, con otro buffer.
- Evaluar la viabilidad de utilizar el complejo CD-A, como aditivo en alimentos para retrasar su oxidación.

Referencias

-
- [1] F. Shahindi, P.K. Janitha P.D. Wanasundara; **Phenolic antioxidants**; Critical Review Food Science and Nutrition, 32(1), 67-103, 1992.
- [2] G. G. Gross, R. W. Hemingway y T. Yoshida; **Plant polyphenols 2: chemistry, biology, pharmacology, ecology**, Kluwer Academic/Plenum, NY, 1999.
- [3] G. Astray, C. Gonzalez-Barreiro, J.C. Mejuto, R. Rial-Otero, J. Simal-Gándara; **A review on the use of cyclodextrins in foods**; Food Hydrocolloids; 23; 1631–1640; 2009.
- [4] US Patent 4975293: **Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and compositions**, (1990).
- [5] J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon; **Antioxidants in food, Practical applications**, CRC press, Inglaterra, 2001.
- [6] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller y G. Paganga, **Antioxidant properties of phenolic compounds**, Trends in Plant Science, 2(4),152-159; 1997.
- [7] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller y G. Paganga.; **Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and phenolic acids**; Free Rad. Biol. Med, (20), 331-342, 1996.
- [8] S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M. G. Simic; **Flavonoids as Antioxidants**; J. Am. Chem. Soc., 116 (11), 4846–4851, 1994.
- [9] Catherine A. Rice-Evans, Nicholas J. Miller and George Paganga, **Antioxidant properties of phenolic compounds**, Trends in Plant Science, April 1997, Vol. 2, No. 4, 152-159.
- [10] T.A. Geissman; **The chemistry of flavonoid compounds**, the Macmillan company, NY, 1962.
- [11] **S. Guyot, J. Vercauteren y V. Cheynier; Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase**; Phytochemistry, 42(5) 1279-1288, 1996.

- [12] S. Guyot, V. Cheynier, J. Souquet y M. Moutounet; **Influence of pH on the Enzymatic Oxidation of (+)-Catechin in model systems**; J. Agric. Food Chem. 43, 2458-2462, 1995.
- [13] J. Szejtli; **Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry**; Chem. Rev.; 98; 1743-1753, 1998.
- [14] T. Loftsson y D. Duchêne; **Historical Perspectives Cyclodextrins and their pharmaceutical applications**; International Journal of Pharmaceutics; 329; 1-11, 2007.
- [15] A. Biwer, G. Antranikian y E. Heinzle; **Enzymatic production of cyclodextrins**; Appl Microbiol Biotechnol; 59; 609–617, 2002.
- [16] W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith y T. Takaha; **Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues-Beyond the Doughnut**; Chem. Rev.; 98; 1787-1802, 1998.
- [17] G. Astray, C. Gonzalez-Barreiro, J.C. Mejuto, R. Rial-Otero, J. Simal-Gándara; **A review on the use of cyclodextrins in foods**; Food Hydrocolloids; 23; 1631–1640, 2009.
- [18] M.L. Bender, y M. Komiyama; **Cyclodextrin chemistry**. Berlin: Springer, 1978.
- [19] V. T. D'Souza. "Cyclodextrins" Chemical reviews no. 5 vol. 98 (1998).
- [20] E. M. Martin Del Valle, **Cyclodextrins and their uses: a review**; Process Biochemistry; 39; 1033-1046; (2004).
- [21] P. Atkins, J. de Paula, **Physical Chemistry**, Oxford University Press, 8^a Ed.
- [22] M. Eftink y R. Biltonen, **Thermodynamics of interacting biological systems**, in biological microcalorimeter; A. E. Beezer ed.
- [23] K. J. Laidler y J. H. Meiser, **Fisicoquímica**, Compañía editorial continental S.A. de C.V, 2^a ed, México 1999.

- [24] **Manual de uso e instalación del calorímetro Thermal Activity Monitor** (TAM de Thermometric, Suecia).
- [25] I. Wadsö, **Microcalorimetry of aqueous and biological systems**, in Solution Calorimetry, IUPAC commission on thermodynamics Vol.IV Blackwell Scientific Publications. UK (1994).
- [26] M. Friedman and H. S. Jürgens, **Effect on pH on the stability of Plant Phenolic compounds**, J. Agric. Food Chem; 48; 2101-2110; (2000).
- [27] P. Janeiro, A. M. Oliveira-Brett, **Catechin electrochemical oxidation mechanisms**, Analytica Chimica Acta; 518; 109-115; (2004).